



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

AKIŞ ENJEKSİYON – KROMATOGRAFİK YÖNTEMLERLE İMMOBİLİZE HÜMİK ASİDİN SABİT FAZ ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Orhan GEZİCİ

DOKTORA TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Eylül-2010
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

DOKTORA TEZİ

AKIŞ ENJEKSİYON – KROMATOGRAFİK YÖNTEMLERLE İMMOBİLİZE HÜMİK ASİDİN SABİT FAZ ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Orhan GEZİCİ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Hüseyin KARA

2010, 230 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. A. Güleren ALSANCAK
Prof. Dr. Hüseyin KARA
Doç. Dr. Zafer YAZICIGİL
Yrd. Doç. Dr. Ahmet AYAR
Yrd. Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI

Bu çalışmada; saflaştırılmış hümik asit (HA), 15-35 μm parçacık ebadına sahip aminopropil silika (APS) destek katısına kimyasal bağ oluşumu temelinde immobilize edilmiş ve bazı nükleosit (Uridin, Timidin, Sitidin, Adenosin ve Guanosin) ve nükleobazlara (Urasil, Timin, Sitosin, Adenin, Guanin) karşı sergilediği sabit faz özellikleri kapsamlı bir şekilde incelenmiştir.

Çeşitli yöntemler ve tekniklerle (elemental analiz, FTIR, termogravimetrik analizler, potansiyometrik titrasyonlar, yüzey yük özellikleri, katı-sıvı temas açısı ölçümleri, SEM analizleri ve çözünürlük testleri) karakterize edilen immobilize hümik asit esaslı materyalin (EC-HA-APS) çalışılan şartlarda yüksek fiziksel ve kimyasal dayanım sergilediği görülmüştür. FTIR analizlerinden, HA'nın APS'ye amid bağı yoluyla bağlandığı tespit edilmiş ve 170 mgHA/gAPS'lik immobilizasyon verimi elde edilmiştir. Çözünürlük testlerinden, EC-HA-APS'nin, çalışılan şartlara bağlı olarak, pH=8'e kadar kararlı olduğu görülmüş ve EC-HA-APS ile yürütülen HPLC denemeleri pH≤7,5'te gerçekleştirilmiştir.

EC-HA-APS'nin çalışılan türlere karşı sergilediği sabit faz özellikleri önce; ters-faz sıvı kromatografisi (RPLC) ve hidrofilik etkileşme kromatografisi (HILIC) şartlarında incelenmiş ve kromatografik davranışların şekillenmesinde rol alan mekanizmalar tartışılmıştır. RPLC ve HILIC modları için 4,6x100 mm ölçülerinde EC-HA-APS ile doldurulmuş bir kromatografik kolon kullanılmıştır. Kolon şartlandırma işlemi, hareketli faz bileşimi, sıcaklık ve akış hızı gibi deneysel parametrelerin kapasite faktörü (k'), seçicilik faktörü (α) ve ayırma gücü (R_S) üzerine etkisi detaylı bir şekilde incelenmiştir.

RPLC ve HILIC şartlarında yürütülen analizlerden sonra, çalışılan türlerin özellikleri de dikkate alınarak, EC-HA-APS'ye ligand-değiştirme özelliği kazandırılıp

ligand-değiştirme kromatografisi (LEC) şartlarında da bazı çalışmalar yapılmıştır. Çalışmalarda; 4,6x150 mm ölçülerinde, EC-HA-APS ile doldurulmuş bir kromatografik kolon kullanılmış ve EC-HA-APS'ye ligand-değiştirici özellik kazandırmak için metal iyonu (M^{n+}) çözeltilerinin kolona basamaklı bir şekilde yüklendiği bir yöntem izlenmiştir. Böylece; sabit faz, kolon şartlarında, ligand değiştirici bir şekle kolayca dönüştürülebilmiştir. Sabit fazın çalışılan şartlardaki maksimum gözlenen kapasitesinin Cu(II) ve Co(II) için sırasıyla 0,278 ve 0,297 mmolM^{n+}/gEC-HA-APS olduğu tespit edilmiştir.

LEC şartlarında; hareketli fazdaki organik çözücü oranı (%0-50), sıcaklık (25-45 ^{o}C) ve yüklenen metal iyonu türü (Cu^{2+} ve Co^{2+}) gibi deneysel parametrelerin *k'*, α ve R_S değerleri üzerindeki etkisi incelenmiştir. Yapısında $–NH_2$ grubu bulunduran nükleosit ve nükleobazların Cu(II) yüklenmiş sabit fazla daha yüksek düzeyde etkileşmeye girdiği görülmüştür.

Organik çözücü oranı, RPLC ve LEC şartlarında (%0-50 aralığında) arttıkça; HILIC şartlarında ise (%70-90 aralığında) azaldıkça, türlerin kolondan daha hızlı bir şekilde elue edildikleri tespit edilmiştir.

RPLC, HILIC ve LEC modları için türetilen van't Hoff eğrilerinden alıkonma entalpisinin ekzotermik olduğu ve çalışılan sıcaklık aralığında (25-45 ^{o}C) sıcaklığa bağlı olarak mekanizmada bir değişikliğin meydana gelmediği anlaşılmıştır. Kromatografik ayırmaların iyileştirilmesinde, sıcaklığın etkisi kapsamlı bir şekilde incelenmiş ve sıcaklık arttırıldıkça türlerin kolondan daha kolay bir şekilde elue edilebildiği, sıcaklıkta yapılacak uygun ayarlamalar ile istenilen ayırma gücüne erişilebildiği görülmüştür. Ayırmaları optimize edebilmek için; HPLC uygulamalarında sıkça rastlanmayan bir deneysel parametre olan sıcaklık gradyenti bu çalışmada (LEC şartlarında) uygulanmış ve bu şekilde kromatografik ayırmaların önemli oranda iyileştirilebildiği görülmüştür.

RPLC-HILIC ve RPLC-LEC modları arasındaki ortogonallik geometrik yaklaşım temelinde değerlendirilmiş olup; RPLC ve HILIC modları arasında %48,5; RPLC ve LEC modları arasında da %17,6'lık bir ortogonalliğin olduğu bulunmuştur. Elde edilen sonuçlar; immobilize hümik asidin farklı HPLC modlarında kullanılabilirliği ile ilişkilendirilmiştir.

Çalışılan üç HPLC modunda, türleri hem izokratik hem de gradyent şartlarda yüksek tekrarlanabilirlikle ayırmanın mümkün olduğu görülmüştür. Hareketli fazdaki organik çözücü yüzdesi, akış hızı ve sıcaklıkta uygulanan gradyent programları ile ayırmalar önemli oranda iyileştirilebilmiştir. Türlerin *k'* değerlerindeki standart sapma düzeyinin ≤0,03 olduğu tespit edilmiştir. EC-HA-APS ve APS ile doldurulmuş kolonlar üzerinde çeşitli şartlarda kaydedilen kromatogramlar birbiriyle karşılaştırılmış ve böylece immobilizasyon işleminin önemi vurgulanmıştır.

Çalışılan HPLC modlarında, türlerin EC-HA-APS sabit fazı üzerindeki elüsyon verimliliklerini değerlendirmek amacıyla, akış enjeksiyon tekniğiyle kaydedilen pik alanları ile HPLC analizlerinden kaydedilen pik alanları karşılaştırılmıştır. Sonuçlar; her iki teknikle elde edilen pik alanlarının %95 ve üzerinde birbiriyle örtüştüğünü göstermiştir. Böylece; türlerin sabit faza tersinmez bir şekilde tutunduğu ile ilgili herhangi bir bulguya rastlanmamıştır.

Çeşitli yöntemler ve tekniklerle karakterize edilen EC-HA-APS'nin;

- Çalışılan şartlarda yüksek fiziksel ve kimyasal kararlılığa sahip olması,
- RPLC, HILIC ve LEC gibi farklı kromatografik modlarda çalışabilme esnekliğini göstermesi,
- RPLC, HILIC ve LEC modları arasında kolayca geçiş imkanı vermesi
- Farklı metal iyonları yüklenmek sûretiyle farklı türlere karşı sergilediği kapasite ve seçiciliğin kolayca değiştirilebilmesi,

gibi özellikleri göz önünde bulundurulduğunda, sabit faz olarak üstün özellikler sergilediği görülmüştür.

İmmobilize hümik asit esaslı materyalin "*multifonksiyonel sabit faz*" karakterinin ilk defa bu kadar kapsamlı bir incelemeye/değerlendirmeye tabi tutulduğu bu çalışmayla, farklı HPLC modlarında (ör. RPLC, HILIC ve LEC) kullanılmaya elverişli, ucuz, verimli ve çevreyle dost bir sabit fazı bilim dünyasına sunabilme fırsatı doğmuştur.

Anahtar Kelimeler: HILIC, HPLC, Hümik Asit, İmmobilizasyon, Kromatografi, Ligand-değiştirme kromatografisi, Nükleositler, Nükleobazlar, Ortogonallik; Sabit Faz

ABSTRACT

Ph.D THESIS

INVESTIGATING THE STATIONARY PHASE CHARACTERISTICS OF IMMOBILIZED HUMIC ACID BY USING FLOW INJECTION – CHROMATOGRAPHIC METHODS

Orhan GEZİCİ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN CHEMISTRY

Advisor: Prof. Dr. Hüseyin KARA

2010, 230 Pages

Jury
Prof. Dr. A. Güleren ALSANCAK
Prof. Dr. Hüseyin KARA
Doç. Dr. Zafer YAZICIGİL
Yrd. Doç. Dr. Ahmet AYAR
Yrd. Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI

In the present study, purified humic acid (HA) was immobilized to aminopropyl silica solid support (15-35 μm in particle size) through chemical bond formation, and the stationary phase characteristics of the obtained material towards some nucleosides (i.e. Uridine, Thymidine, Cytidine, Adenosine, and Guanosine) and nucleobases (i.e. Uracil, Thymine, Cytosine, Adenine, and Guanine) were investigated, in detail.

Humic acid-immobilized material (EC-HA-APS), which was characterized through various methods and techniques (such as elemental analysis, FTIR, thermogravimetric analyses, potentiometric titrations, surface charge characteristics, contact angel measurements, SEM analyses, and stability tests), was found to exhibit high physical and chemical stability under studied conditions. It was concluded from the FTIR analyses that HA was immobilized to APS via amid-bond formation, and amount of HA bonded to APS was found to be 170 mgHA/gAPS. Stability tests revealed high stability of EC-HA-APS until pH=8, depending on the studied conditions, and so in HPLC studies performed on EC-HA-APS medium pH was ≤7.5.

The stationary phase characteristics of EC-HA-APS were, at first, investigated under reversed phase liquid chromatography (RPLC) and hydrophilic interaction chromatography (HILIC) conditions, and the mechanisms taking role in chromatographic behaviors were discussed. An HPLC column (4.6x100, *i.d.* x *length*; as mm) packed with EC-HA-APS was used in HPLC analyses performed under RPLC and HILIC conditions. Effect of some experimental variables, such as column conditioning process, mobile phase composition, temperature, and flow rate, on retention factor (k'), selectivity factor (α), and resolution (R_S) was investigated, in detail.

After having been performed the analyses under RPLC and HILIC conditions, EC-HA-APS has been turned into a ligand exchanger form, and thus some experiments have been performed under ligand-exchange chromatography (LEC) conditions, too, by taking the physicochemical properties of the studied species into account. In the studies, a column (4.6x150, *i.d.* x *length*; as mm) packed with EC-HA-APS was used, and the stationary phase was turned into a ligand exchanger form by loading a metal ion (M^{n+}) solution to the column in a stepwise manner where the concentration of metal ion solution was gradually increased. Thus, the stationary phase was, easily, turned into a ligand exchanger form under column conditions. Maximum observable capacities of the column towards Cu(II) and Co(II) were determined as 0,278 and 0,297 mmolM^{n+}/gEC-HA-APS, respectively.

Under LEC conditions, the effect of percentage of organic modifier in mobile phase (within the range 0-50%; v/v), temperature (25-45 ^{o}C), type of the metal ion loaded (Cu^{2+} and Co^{2+}) on k', α, and R_S was studied. The species, which bear $–NH_2$ group in their structure, showed higher degree of interaction with *Cu*-EC-HA-APS.

The studied species eluted more easily with (*i*) increasing the percentage of organic modifier in the range 0-50% under RPLC and LEC conditions, and (*ii*) decreasing the percentage of organic modifier in the range 70-90% under HILIC conditions.

It was concluded from the van't Hoff plots derived for RPLC, HILIC and LEC modes that retention enthalpy had an exothermic character, and there was no change in the mechanism responsible for retention depending on temperature. Special care was given to the effect of temperature on chromatographic separations, and the studied species were found to elute faster with increasing temperature. Also, chromatographic separations were found to be improved by careful adjustment of temperature. The temperature gradient, which is not a common experimental parameter being used in HPLC studies, has been also used in the present (under LEC conditions), and chromatographic separations have been significantly improved in this way.

Orthogonality between RPLC-HILIC, and RPLC-LEC modes was evaluated through geometric approach, and % orthogonalities between the applied modes were found as 48.5% and 17.6%, respectively. Obtained results were related with the usability of EC-HA-APS in different modes of HPLC.

The studied species were found to be separated through isocratic and gradient elution under each studied HPLC mode with high reproducibility. Through the gradient programs applied in percentage of organic modifier, flow rate and temperature, chromatographic separations were improved, significantly. Standard deviation in k' values of the species were found as ≤0.03. Under different experimental conditions, the chromatograms recorded on the columns packed with EC-HA-APS and APS were compared with each other, and thus the importance of HA immobilization to APS was emphasized.

In order to evaluate the elution efficiency of the studied species for each applied HPLC mode, area of the peaks recorded via flow injection technique and those recorded from HPLC analyses were compared. The results showed that peak areas fitted over 95%. So, no evidence, which could be related with irreversible binding of the species to the stationary phase, was observed.

EC-HA-APS exhibited superior properties due to the following reasons:

- High physical and chemical stability under the studied conditions,
- Flexibility to use it in different HPLC modes, such as RPLC, HILIC and LEC,
- Easy adaptation to different HPLC modes
- Easy variations in its capacity and selectivity by loading different metal ions

"*Multifunctional stationary phase*" behavior of a humic-based material has been studied/evaluated for the first time through this study, and thus an inexpensive, efficient and environmentally-friendly stationary phase, which is useful in different HPLC modes (i.e. RPLC, HILIC, and LEC) as well, has been presented to the scientific committee.

Keywords: Chromatography, HILIC, HPLC, Humic acid, Immobilization, Ligand-exchange chromatography, Nucleosides, Nucleobases, Orthogonality

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Hüseyin KARA danışmanlığında tamamlanarak, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Doktora Tezi olarak sunulmuştur.

Hümik asit esaslı materyallerin katı faz ekstraksiyon sisteminde katı faz olarak kullanılabilirliği ile ilgili yüksek lisans çalışmamızdan edindiğimiz tecrübelerin ışığında, immobilize hümik asidin farklı HPLC modlarında sabit faz olarak kullanılabilirliğinin bir doktora tezi kapsamında incelenmeye değer bir konu olduğu düşünülmüştür. Altı senelik bir çalışma sonucunda elde ettiğimiz sonuçlar bu düşüncemizi desteklemiş ve immobilize hümik asit esaslı materyalin üç farklı HPLC modunda kullanılabilen bir sabit faz özelliği sergilediği görülmüştür. Gözlenen bu üstün özellik nedeniyle, immobilize hümik asit esaslı sabit fazın farklı özelliklere sahip kimyasal türlerin kromatografik analizlerinde geniş bir kullanım alanı bulabileceği düşünülmüştür.

Tezin yazım aşamasında, bilimsel değeri yüksek veriler/sonuçlar sunmanın yanı sıra, bu sonuçların düzgün ve sade bir Türkçe kullanılarak sunulmasına da büyük özen gösterilmiştir. Bu tez kapsamında sunulan çalışmalar ile ilgili yapısal eleştirileri büyük bir ilgili ile beklediğimizi de belirtmek isteriz. Bu çalışmanın, kromatografi ile ilgilenen araştırmacılar için faydalı olması dilek ve temennisiyle bu bölümü sonlandırmadan önce; bu çalışmada emeği geçen ve aşağıda isimleri zikredilen hocalarıma ve arkadaşlarıma şükranlarımı sunmak isterim.

Başta danışman hocam Prof. Dr. Hüseyin KARA olmak üzere; tez izleme komitesi üyeleri Yrd. Doç. Dr. Ahmet AYAR ve Yrd. Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI'ya katkılarından dolayı teşekkürü bir borç bilirim.

Fen Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Mustafa ERSÖZ ve Kimya Bölüm Başkanı Prof. Dr. İbrahim KARATAŞ'a; çalışmalarım süresince yardımlarını esirgemeyen Kimya Bölümünün değerli öğretim elemanlarına teşekkür ederim.

Maddi-manevi desteklerinden ötürü, başta Yrd. Doç Dr. Fatih DURMAZ ve Uzm. Mustafa TOPKAFA olmak üzere, Analitik Kimya Araştırma Grubumuzda yer alan tüm arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Çalışmaların yürütülebilmesi için gerekli mali kaynağı, BAP 082011043 nolu proje ile sağlayan S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri (BAP) Koordinatörlüğüne de teşekkür etmek isterim.

Ayrıca; aşağıda adı geçen arkadaşlarıma ve hocalarıma, belirtilen yardımlarından/desteklerinden dolayı ayrı ayrı teşekkür ederim:

Dr. Jiri Kuçerik (Brno University, Termogravimetrik analizler), Doç. Dr. Uğur TAMER (Gazi Üniversitesi Eczacılık Fak. Analitik Kimya Anabilim Dalı, immobilize hümik asidin kromatografik kolonlara doldurulması), Doç. Dr. Mustafa TABAKÇI ve Öğr. Gör. Fatih SEVGİ (Hümik asidin katı destek maddesine immobilizasyonu), Uzm. Mustafa TOPKAFA (FTIR ve AAS analizleri), Arş. Gör. Ahmet Nuri KURŞUNLU (FTIR analizleri), Doktora Öğrencisi Fatih ÖZCAN (SEM analizleri), Uzm. İlker AKIN, Yüksek Lisan Öğrencisi Leyla GÜRFİDAN ve Yüksek Lisans Öğrencisi Özlem OĞUZHAN (Sıvı-katı temas açısı, Contact Angle, ölçümleri).

Ayrıca; dostlarım, Arş. Gör. Mevlüt BAYRAKCI ve Arş. Gör. Salih Zeki BAŞ'a katkılarından dolayı teşekkür etmek isterim.

Ve de; çalışmalarım süresince desteğini ve güler yüzünü esirgemeyen sevgili eşim Fatma GEZİCİ'ye; üzerimde büyük emek sahibi annem Elife GEZİCİ'ye, amcam Mehmet GEZİCİ'ye, ablam Handan SEVEN'e ve ağabeyim Muammer GEZİCİ'ye şükranlarımı sunarım.

Son olarak; bir gülüşü yüzlerce doktora tezine bedel olan oğlum Muhammed Mustafa'dan, çalışmalarım süresince kendisine yeterince vakit ayıramadığım için özür diliyor, bu özrümün bir göstergesi olarak da bu doktora tezini O'na atfediyorum.

Orhan GEZİCİ
KONYA-2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **vii**

ÖNSÖZ ..... **x**

İÇİNDEKİLER ..... **xii**

ŞEKİLLER DİZİNİ ..... **xiv**

TABLOLAR DİZİNİ ..... **xviii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xix**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Hümik Maddeler 1
1.2. Hümik Asidin Fiziksel, Kimyasal ve Spektroskopik Özellikleri 3
1.2.1. Hümik asidin karakterizasyonu 6
1.2.2. Hümik asidin kimyasal türlerle etkileşmesi 11
1.2.3. Katı/sabit faz olarak hümik asit 14
1.3. Kromatografik Ayırma Teknikleri 17
1.3.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) 18
1.4. Sabit Fazların Karakterizasyonu 25

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **28**

3. MATERYAL VE METOT **38**

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler 38
3.2. Hümik Asidin Saflaştırılması 38
3.3. Hümik Asidin İmmobilizasyonu 40
3.4. Karakterizasyon 44
3.4.1. Elemental analiz 44
3.4.2. FTIR analizleri 44
3.4.3. Potansiyometrik titrasyonlar 45
3.4.4. Termogravimetrik analizler 46
3.4.5. İmmobilize olmuş HA miktarının belirlenmesi 46
3.4.6. Yüzey-yük özelliklerinin belirlenmesi 47
3.4.7. Katı-sıvı temas açısı ölçümleri 49
3.4.8. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizleri 49
3.4.9. Çözünürlük testleri 50
3.4.10. EC-HA-APS'nin metal bağlama özelliklerinin incelenmesi 50
3.5. Kullanılan HPLC Sistemi 51
3.6. Kromatografik İşlemler ve Akış Enjeksiyon Analizleri 54
3.6.1. RPLC ve HILIC şartlarında yürütülen analizler 55
3.6.1.1. Şartlandırma işleminin etkisi 56
3.6.1.2. Akış hızının etkisi 56
3.6.1.3. Hareketli fazdaki organik çözücü türünün ve yüzdesinin etkisi 57

3.6.1.4. Hareketli fazdaki amonyak çözeltisi ve sıcaklığın etkisi 57
3.6.1.5. Kolon ön-şartlandırma işleminin etkisi 58
3.6.2. Ligand-değiştirme kromatografisi şartlarında yürütülen işlemler 58
3.6.2.1. EC-HA-APS'nin ligand değiştirici şekle dönüştürülmesi 59
3.6.2.2. *M*-EC-HA-APS üzerinde yürütülen kromatografik analizler 59
3.6.3. Akış enjeksiyon-kromatografik analizler 60

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI 61

4.1. Karakterizasyon 61
4.1.1. Elemental analiz 61
4.1.2. FTIR analizleri 62
4.1.3. Potansiyometrik titrasyonlar 68
4.1.4. Termogravimetrik analizler 72
4.1.5. İmmobilize olmuş hümik asit miktarının belirlenmesi 76
4.1.6. Yüzey yük özelliklerinin belirlenmesi 77
4.1.7. Katı-sıvı temas açısı ölçümleri 80
4.1.8. SEM analizleri 85
4.1.9. Çözünürlük testleri 86
4.1.10. EC-HA-APS'nin metal bağlama özelliklerinin değerlendirilmesi 89
4.2. RPLC ve HILIC Şartlarında Yürütülen Kromatografik İşlemler 101
4.2.1. Şartlandırma işleminin etkisi 101
4.2.2. Hareketli faz akış hızının etkisi 106
4.2.3. Hareketli fazdaki organik çözücü türü ve yüzdesinin etkisi 107
4.2.4. Hareketli fazdaki amonyak çözeltisi ve sıcaklığın etkisi 123
4.2.5. Kolon ön-şartlandırma işleminin etkisi 152
4.2.6. Kromatografik ayırmaların optimizasyonu 155
4.2.7. EC-HA-APS kolonu için performans parametreleri 162
4.3. Ligand-değiştirme Kromatografisi Şartlarında Yürütülen İşlemler 168
4.3.1. *Cu*-EC-HA-APS üzerinde yürütülen kromatografik işlemler 168
4.3.1.1. Hareketli faz bileşiminin etkisi 168
4.3.1.2. Hareketli fazdaki organik çözücü yüzdesinin etkisi 173
4.3.1.3. Hareketli fazdaki Cu(II) konsantrasyonunun etkisi 178
4.3.1.4. Sıcaklığın etkisi 181
4.3.2. *Co*-EC-HA-APS üzerinde yürütülen kromatografik işlemler 186
4.3.2.1. Hareketli fazdaki organik çözücü yüzdesinin etkisi 186
4.3.2.2. Sıcaklığın etkisi 190
4.3.3. *M*-EC-HA-APS kolonu için performans parametreleri 197
4.4. Akış Enjeksiyon-Kromatografik Analizler 204

5. TARTIŞMA 206

5.1. EC-HA-APS'nin Literatürdeki Bazı Sabit Fazlarla Karşılaştırılması 206
5.2. EC-HA-APS'nin Farklı HPLC Modlarında Kullanılabilirliği 208
5.3. Sabit Faz Olarak EC-HA-APS'nin Gözlenen Diğer Bazı Üstün Özellikleri 214

6. SONUÇ VE ÖNERİLER 219

7. KAYNAKÇA 223

ÖZGEÇMİŞ 230

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1. Aldrich hümik asidin saflaştırılmasında izlenen işlem basamakları 40
Şekil 3.2. Saflaştırılmış HA'nın immobilizasyonunda izlenen işlem basamakları ve immobilizasyon için önerilen mekanizma..... 43
Şekil 3.3. Kullanılan HPLC sisteminin şematik gösterimi 53
Şekil 3.4. Çalışılan nükleosit ve nükleobazlar için pK_a değerleri..... 55
Şekil 4.1. HA, APS, HA-APS ve EC-HA-APS için FTIR spektrumları 65
Şekil 4.2. Kapatma (*end-capping*) işleminin etkisiyle immobilize hümik asidin FTIR spektrumundaki bazı karakteristik bantlarda meydana gelen değişim..... 66
Şekil 4.3. EC-HA-APS, *Cu*-EC-HA-APS ve *Co*-EC-HA-APS için kaydedilen FTIR spektrumlarındaki bazı bantlarda gözlenen değişimler..... 67
Şekil 4.4. 0,01 M (a); 0,05 M (b) ve 0,10 M (c) NaCl çözeltilerinde suyun K_{su} değerini tayin etmek için yürütülen titrasyondan elde edilen veriler 70
Şekil 4.5. Saflaştırılmış HA için farklı konsantrasyonlara sahip NaCl çözeltilerinde elde edilen titrasyon eğrileri ve birinci türevleri..... 71
Şekil 4.6. HA, APS, HA-APS ve EC-HA-APS için termogram (TG) ve diferansiyel termogram (DTG)..... 74
Şekil 4.7. APS, HA-APS ve EC-HA-APS için termogramlar..... 75
Şekil 4.8. pH değişimi metoduna göre HA-APS ve EC-HA-APS için pH_{pzc} değerlerinin belirlenmesi..... 78
Şekil 4.9. Kütle titrasyon metoduyla APS için pH_{pzc} değerinin belirlenmesi..... 79
Şekil 4.10. Temas açısı (contact angle) ile sistemdeki yüzey gerilimleri arasındaki ilişkinin şematik olarak gösterimi 83
Şekil 4.11. APS, HA, HA-APS ve EC-HA-APS için yüzeyde kaydedilen ve temas açılarının hesaplanmasında kullanılan damla görüntüleri..... 84
Şekil 4.12. APS için SEM görüntüsü..... 85
Şekil 4.13. EC-HA-APS için SEM görüntüsü 86
Şekil 4.14. Sulu ortamda çözünmüş HA, $Na_2H_2Y+NH_3$ ve HA+$Na_2H_2Y+NH_3$ karışımları için kaydedilen UV-Vis. Spektrumları..... 87
Şekil 4.15. EC-HA-APS'den ayrılan HA miktarının 0,01 M NaCl ve $Na_2H_2Y+NH_3$ ortamlarında değerlendirilmesi 88
Şekil 4.16. $Na_2H_2Y+NH_3$ ortamında EC-HA-APS'den ayrılan HA miktarının ardıl iki etkileştirme için değerlendirilmesi..... 88
Şekil 4.17. Cu(II) için elde edilen breakthrough eğrileri ve denge izoterm verilerinin türetilmesinde kullanılan metotların bu eğriler üzerinde uygulandığı bölgelerin grafiksel gösterimi..... 92
Şekil 4.18. Co(II) için EC-HA-APS üzerinde elde edilen breakthrough eğrileri 93
Şekil 4.19. Cu(II) için Scatchard eğrisi..... 96
Şekil 4.20. Co(II) için Scatchard eğrisi..... 97
Şekil 4.21. Cu(II) iyonlarının EC-HA-APS üzerinden 0,1 F Na_2H_2Y+0,1 F NH_3 (pH=7,5) çözeltisi ile geri kazanımını değerlendirmek amacıyla yürütülen işlemler ve bu işlemler sırasında elde edilen eğriler 100
Şekil 4.22. Hareketli fazdaki MeOH oranına bağlı olarak nükleositlerin kapasite faktörlerindeki değişim..... 102
Şekil 4.23. Hareketli fazdaki MeOH oranına bağlı olarak nükleositler için şartlandırma işleminden önce ($k_1^{'}$) ve sonra ($k_2^{'}$) kaydedilen *k'* değerlerinin karşılaştırmalı olarak gösterimi..... 103

Şekil 4.24. Nükleositler için EC-HA-APS üzerinde şartlandırma işleminden önce (α_1) ve sonra (α_2) kaydedilen α değerlerindeki değişimin hareketli fazdaki MeOH oranına bağlı olarak gösterimi 105
Şekil 4.25. Teorik tabaka yüksekliği (HETP) ile hareketli faz akış hızı arasındaki ilişkinin grafiksel gösterimi..... 106
Şekil 4.26. Su-MeOH hareketli faz sisteminde, hareketli fazdaki MeOH oranına bağlı olarak nükleositlerin *k'* değerlerindeki değişim 108
Şekil 4.27. Su-MeCN hareketli faz sisteminde, hareketli fazdaki MeCN oranına bağlı olarak nükleositlerin kapasite faktörlerindeki değişim..... 111
Şekil 4.28. Nükleositler için Su-MeOH ve Su-MeCN hareketli faz sistemleriyle RPLC şartlarında izokratik elüsyonla elde edilen bazı kromatogramlar 114
Şekil 4.29. Nükleositler için Su-MeCN hareketli faz sistemiyle HILIC şartlarında izokratik elüsyonla elde edilen kromatogram..... 115
Şekil 4.30. Su-MeOH hareketli faz sisteminde, MeOH oranına bağlı olarak nükleobazların kapasite faktörlerindeki değişim. 117
Şekil 4.31. Su-MeCN hareketli faz sisteminde, MeCN oranına bağlı olarak nükleobazların kapasite faktörlerindeki değişim. 118
Şekil 4.32. Nükleobazlar için Su-MeOH hareketli faz sistemiyle RPLC şartlarında gradyent elüsyonla elde edilen kromatogram 122
Şekil 4.33. RPLC şartlarında nükleositlerin *k'* değerlerinin NH_3 çözeltisinin pH değeri ve sıcaklığa bağlı olarak değişimi 125
Şekil 4.34. Nükleositler için RPLC şartlarında NH_3-MeOH hareketli faz sistemiyle elde edilen bazı kromatogramlar 128
Şekil 4.35. HILIC şartlarında nükleositlerin *k'* değerlerinin NH_3 çözeltisinin pH değeri ve sıcaklığa bağlı olarak değişimi 130
Şekil 4.36. HILIC şartlarında, nükleositler için farklı sıcaklıklarda NH_3-MeCN hareketli faz sistemiyle elde edilen kromatogramlar..... 132
Şekil 4.37. HILIC şartlarında, nükleositler için farklı sıcaklıklarda NH_3-MeCN hareketli faz sistemiyle elde edilen kromatogramlar..... 133
Şekil 4.38. HILIC şartlarında, nükleositler için farklı sıcaklıklarda elde edilen kromatogramlar 134
Şekil 4.39. RPLC şartlarında nükleobazların *k'* değerlerinin NH_3 çözeltisinin pH değeri ve sıcaklığa bağlı olarak değişimi 136
Şekil 4.40. HILIC şartlarında nükleobazların *k'* değerlerinin NH_3 çözeltisinin pH değeri ve sıcaklığa bağlı olarak değişimi..... 139
Şekil 4.41. Nükleobazlar için HILIC şartlarında elde edilen kromatogramlar..... 140
Şekil 4.42. Çalışılan nükleosit ve nükleobazların moleküler yapıları ve pK_a değerleri..... 141
Şekil 4.43. Nükleositler için RPLC şartlarında NH_3 çözeltisinin farklı pH değerleri için türetilen van't Hoff eğrileri 144
Şekil 4.44. Nükleobazlar için RPLC şartlarında NH_3 çözeltisinin farklı pH değerleri için türetilen van't Hoff eğrileri 145
Şekil 4.45. Nükleositler için HILIC şartlarında NH_3 çözeltisinin farklı pH değerleri için türetilen van't Hoff eğrileri 150
Şekil 4.46. Nükleobazlar için HILIC şartlarında NH_3 çözeltisinin farklı pH değerlerinde türetilen van't Hoff eğrileri..... 151
Şekil 4.47. Kolon ön-şartlandırma işleminin nükleobazların kromatografik ayrılmaları üzerine etkisinin grafiksel gösterimi 154
Şekil 4.48. Nükleositler için optimum şartlarda elde edilen kromatogram 156

Şekil 4.49. Nükleositler için belirlenen optimum şartlarda, hareketli fazda farklı çözeltiler kullanılarak elde edilen kromatogramlar 159
Şekil 4.50. Nükleositler için belirlenen optimum şartlarda, hareketli fazda farklı organik çözücüler kullanılarak elde edilen kromatogramlar 160
Şekil 4.51. Bazı nükleobazlar için kromatografik ayırmanın akış hızı temelinde optimizasyonu..... 161
Şekil 4.52. Nükleositler için EC-HA-APS sabit fazı üzerinde gün-içi tekrar analizlerinden kaydedilen kromatogramlar 163
Şekil 4.53. Nükleositler için APS ve EC-HA-APS kolonlar ile gradyent şartlarda elde edilen kromatogamların karşılaştırmalı olarak gösterimi 165
Şekil 4.54. Nükleositler için APS ve EC-HA-APS kolonlar ile HILIC şartlarında elde edilen kromatogramların karşılaştırmalı olarak gösterimi..... 167
Şekil 4.55. Nükleositler için *Cu*-EC-HA-APS sabit fazı üzerinde farklı hareketli faz bileşimlerinde elde edilen kapasite faktörlerinin grafiksel gösterimi 171
Şekil 4.56. Nükleositler için EC-HA-APS ve *Cu*-EC-HA-APS sabit fazları üzerinde farklı hareketli faz bileşimlerinde elde edilen kapasite faktörlerinin karşılaştırmalı olarak gösterimi 172
Şekil 4.57. Bazı nükleosit ve nükleobazların *Cu*-EC-HA-APS üzerinde sergilediği *k'* değerlerinin hareketli fazdaki MeOH oranına bağla olarak değişimi 174
Şekil 4.58. Bazı nükleositler için *Cu*-EC-HA-APS üzerinde izokratik elüsyonla elde edilen kromatogram 176
Şekil 4.59. Bazı nükleositler için *Cu*-EC-HA-APS üzerinde gradyent elüsyonla elde edilen kromatogram 176
Şekil 4.60. Bazı nükleosit ve nükleobazlar için izokratik ve gradyent şartlarda *Cu*-EC-HA-APS üzerinde kaydedilen kromatogramlar 177
Şekil 4.61. Hareketli fazdaki Cu(II) konsantrasyonu ile bazı nükleositlerin *k'* değerleri arasındaki ilişki..... 179
Şekil 4.62. Hareketli fazdaki Cu(II) konsantrasyonuna bağlı olarak bazı nükleositlerin kromatografik ayırmalarında gözlenen farklılaşmalar 180
Şekil 4.63. Bazı nükleositler için farklı sıcaklıklarda kaydedilen kromatogramlar... 182
Şekil 4.64. Bazı nükleobazlar için farklı sıcaklıklarda kaydedilen kromatogramlar 183
Şekil 4.65. Sıcaklık, organik çözücü yüzdesi ve akış hızında uygulanan gradyent programları ile nükleositlerin kromatografik ayırmalarında gözlenen iyileşmeler 184
Şekil 4.66. Bazı nükleosit ve nükleobazlar için *Cu*-EC-HA-APS üzerinde yüksek sıcaklıklarda kaydedilen kromatogram 185
Şekil 4.67. Bazı nükleosit ve nükleobazların *Co*-EC-HA-APS sabit fazı üzerinde sergilediği kapasite faktörlerinin hareketli fazdaki MeOH oranına bağla olarak değişimi..... 187
Şekil 4.68. *Co*-EC-HA-APS üzerindeki tekrarlanabilirliğin bazı nükleositler için gün-içi (a-c) ve diğer bir Co(II) yükleme işleminden sonra (d) kaydedilen kromatogramlarla değerlendirilmesi 189
Şekil 4.69. Bazı nükleositler için *Co*-EC-HA-APS üzerinde farklı sıcaklıklarda kaydedilen kromatogramlar..... 191
Şekil 4.70. Bazı nükleobazlar için *Co*-EC-HA-APS üzerinde farklı sıcaklıklarda kaydedilen kromatogramlar..... 192

Şekil 4.71. Bazı nükleosit ve nükleobazlar için *Co*-EC-HA-APS üzerinde yüksek sıcaklıkta kaydedilen kromatogram 193
Şekil 4.72. Nükleosit ve nükleobazlar için *Co*-EC-HA-APS üzerinde sıcaklık ve akış hızında gradyent uygulanarak ve hareketli fazda MeCN kullanılarak kaydedilen ayırma 194
Şekil 4.73. Bazı nükleositler için *Co*-EC-HA-APS üzerindeki kromatografik ayırmaların sıcaklık gradyenti temelinde iyileştirilmesi 195
Şekil 4.74. Bazı nükleositlerin kromatografik ayırmalarını iyileştirmek için uygulanan sıcaklık gradyenti ve kaydedilen kromatogram 196
Şekil 4.75. Bazı nükleositler için EC-HA-APS, *Cu*-EC-HA-APS ve *Co*-EC-HA-APS sabit fazları üzerinde aynı şartlarda kaydedilen kromatogramların karşılaştırmalı olarak gösterimi 199
Şekil 4.76. Bazı nükleobazlar için EC-HA-APS, *Cu*-EC-HA-APS ve *Co*-EC-HA-APS üzerinde aynı şartlarda kaydedilen kromatogramların karşılaştırmalı olarak gösterimi 200
Şekil 4.77. Sabit faza Cu(II) iyonu yükleme işleminde izlenen yöntemin kromatografik ayırmalar üzerindeki etkisi 202
Şekil 4.78. Sabit faza Co(II) yükleme işleminde izlenen yöntemin kromatografik ayırmalar üzerindeki etkisi 203
Şekil 5.1. RPLC ve HILIC modları için normalize edilmiş alıkonma süreleri ve farklı durumlar için hesaplanan ortogonallik düzeyleri 211
Şekil 5.2. RPLC ve LEC modları için normalize edilmiş alıkonma süreleri ve hesaplanan ortogonallik düzeyi 213
Şekil 5.3. İmmobilize hümik asit esaslı sabit faz üzerinde, çeşitli hareketli faz bileşimlerinde ve akış hızlarında gözlenen sistem basıncı 216
Şekil 5.4. İmmobilize hümik asit esaslı sabit faz üzerinde, farklı hareketli faz bileşimlerinde gözlenen sistem basıncı 217
Şekil 5.5. İmmobilize hümik asit esaslı sabit faz üzerinde bazı nükleobazlar için yüksek akış hızında kaydedilen kromatogram 218

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1.1. Çeşitli doğal kaynaklardan elde edilen hümik asitler için elemental bileşimler 7
Tablo 1.2. Ticari olarak temin edilebilen bazı hümik madde fraksiyonlarının elemental bileşimleri..... 7
Tablo 1.3. Hümik ve fulvik asitlerin FTIR spektrumlarında gözlenen bazı karakteristik bantlar ve bu bantların ilgili olduğu yapılar 10
Tablo 4.1. HA, APS, HA-APS ve EC-HA-APS için elemental analiz sonuçları 62
Tablo 4.2. HA'daki bazı asidik fonksiyonel grupların sayısı ile ortamın iyonik şiddeti arasındaki ilişki [a] 72
Tablo 4.3. EC-HA-APS'deki immobilize olmuş HA miktarı için çeşitli tekniklerle belirlenen değerler 77
Tablo 4.4. HA, APS, HA-APS ve EC-HA-APS için hesaplanan temas açısı (θ) değerleri [a] 82
Tablo 4.5. Cu(II) ve Co(II) için EC-HA-APS üzerinde hesaplanan denge sorpsiyon verileri [a] 91
Tablo 4.6. Cu(II) ve Co(II) için Scatchard eğri analizi temelinde hesaplanan izoterm parametreleri..... 95
Tablo 4.7. Su-MeOH hareketli faz sistemi için MeOH oranına bağlı olarak nükleositlerin *k'* değerlerindeki değişim [a] 109
Tablo 4.8. Su-MeCN hareketli faz sistemi için MeCN oranına bağlı olarak nükleositlerin *k'* değerlerindeki değişim [a] 112
Tablo 4.9. Su-MeOH hareketli faz sistemi için MeOH oranına bağlı olarak nükleobazların *k'* değerlerindeki değişim [a] 119
Tablo 4.10. Su-MeCN hareketli faz sistemi için MeCN oranına bağlı olarak nükleobazların *k'* değerlerindeki değişim [a] 119
Tablo 4.11. RPLC şartlarında nükleositlerin *k'* değerlerinin NH_3 çözeltisinin pH'sı ve sıcaklığa bağlı olarak değişimi [a] 126
Tablo 4.12. HILIC şartlarında nükleositlerin *k'* değerlerinin NH_3 çözeltisinin pH'sına ve sıcaklığa bağlı olarak değişimi [a] 129
Tablo 4.13. RPLC şartlarında nükleobazların *k'* değerlerinin NH_3 çözeltisinin pH'sına ve sıcaklığa bağlı olarak değişimi [a] 137
Tablo 4.14. HILIC şartlarında nükleobazların *k'* değerlerinin NH_3 çözeltisinin pH'sı ve sıcaklığa bağlı olarak değişimi [a] 138
Tablo 4.15. Optimizasyondan sonra nükleositlerin R_S değerlerinde gözlenen değişim..... 157
Tablo 4.16. Bazı nükleobazlar için kromatografik ayırmanın optimizasyonuyla ayırma gücünde gözlenen değişimler 162
Tablo 4.17. Bazı nükleosit ve nükleobazların *Cu*-EC-HA-APS üzerinde sergilediği *k'* değerlerinin hareketli fazdaki MeOH oranına bağlı olarak değişimi 175
Tablo 4.18. Bazı nükleosit ve nükleobazların *Co*-EC-HA-APS üzerinde sergilediği *k'* değerlerinin hareketli fazdaki MeOH oranına bağlı olarak değişimi 188
Tablo 4.19. HPLC ve FIA teknikleriyle kaydedilen pik alanlarının karşılaştırılması [a] 205

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α	:	Seçicilik faktörü
C	:	Denge konsantrasyonu
D	:	Çözünenin dağılma oranı
ϕ	:	Faz oranı
ΔH^o	:	Alıkonma entalpisi
ΔS^o	:	Alıkonma entropisi
K_a	:	Asidik iyonlaşma sabiti
K_b	:	Langmuir izoterm sabiti
K_{su}	:	Su için iyonlar çarpımı sabiti
k'	:	Kapasite faktörü (Alıkonma faktörü)
γ	:	Yüzey gerilimi
$\%O$	:	% ortogonallik
P	:	Pik kapasitesi
q	:	Birim adsorban miktarı başına adsorplanan madde miktarı
q_m	:	Langmuir izoterm sabiti
R	:	Gaz sabiti
R_S	:	Ayırma gücü (Resolüsyon)
%T	:	% transmitans
t_R	:	Alıkonma süresi
t_M	:	Ölü zaman
$t_{R,min}$	:	İlk elue olan pik için alıkonma süresi
$t_{R,max}$	:	Son elue olan pik için alıkonma süresi
%v/v	:	Hacimce yüzde konsantrasyon
Z	:	Yük yoğunluğu

Kısaltmalar

APS	:	Aminopropil silika
Co-EC-HA-APS	:	Co(II) iyonu yüklenmiş EC-HA-APS
Cu-EC-HA-APS	:	Cu(II) iyonu yüklenmiş EC-HA-APS
EC-HA-APS	:	Kapatma işlemine tâbi tutulmuş immobilize hümik asit
FTIR	:	İnfrared spektroskopisi
HA	:	Hümik asit
HA-APS	:	Kapatma işlemine tâbi tutulmamış immobilize hümik asit
HILIC	:	Hidrofilik etkileşme kromatografisi
HPLC	:	Yüksek perfromanslı sıvı kromatografisi
HS	:	Hümik maddeler
LEC	:	Ligand-değiştirme kromatografisi
mAU	:	Miliabsorbans unit
MeCN	:	Asetonitril
MeOH	:	Metanol
NaA	:	Hümik asidin sodyum formu
pH_{pzc}	:	Sıfır yük noktasına karşılık gelen pH değeri
RPLC	:	Ters faz sıvı kromatografisi
SEM	:	Taramalı elektron mikroskopisi
TGA	:	Termogravimetrik analiz

1. GİRİŞ

Günümüzde, yüksek performanslı sıvı kromatografisinde (HPLC) sabit faz olarak kullanılabilecek yüksek seçiciliğe sahip ucuz materyaller elde edebilmek için çok sayıda çalışma yürütülmektedir. Bu amaçla; genel bir eğilim olarak, uygun bir katı desteğin yüzeyine uygun fonksiyonel gruplar veya moleküller bağlanarak çeşitli özelliklere sahip sabit fazlar elde edilmektedir. Bu tür işlemler için genellikle karmaşık kimyasal reaksiyonlardan faydalanılmakta ve bu da, hem sentez hem de saflaştırma aşamalarında yüksek miktarda organik çözücünün kullanılmasını gerektirmektedir. Dahası; bu tür işlemlerin çoğu zaman yoğun iş gücü gerektirdiği de bilinmektedir. Uygun katı destek maddelerinin yüzeyine doğal olarak oluşmuş makromoleküllerin immobilize edilmesi ve böylece verimli, çevreyle dost ve ucuz sabit fazların elde edilmesi son zamanlarda alternatif bir yol olarak karşımıza çıkmaktadır.

Hümik asit (HA); doğal olarak oluşmuş ve sulu ortamda çözünme özelliği sergileyen makromoleküllere verilen genel bir isim olup, makromoleküler yapısında aromatik, hetereosiklik, alifatik ve iyonlaşabilen yapılar bir arada bulunabilmektedir. Bu kompleks makromoleküler yapı nedeniyle HA, birçok kimyasal tür ile etkileşebilir. Bu özellik, HA'nın çeşitli kimyasal türlerin giderimi, geri kazanımı ve uzaklaştırılması amacıyla *katı faz* ve kromatografik analizleri için de *sabit faz* olarak kullanılabileceği fikrini doğurmuştur. Fakat; HA'nın sulu ortamda sergilediği yüksek çözünme özelliği, bu fikrin hayata geçirilmesi noktasında önemli bir engel teşkil etmiştir. HA'nın diğer fizikokimyasal özelliklerinde önemli bir değişikliğe yol açmadan, düşük çözünme sergileyen bir şekle dönüştürülebileceği yöntemlerden biri; HA'nın katı bir destek maddesine tutturulduğu immobilizasyon işlemidir. Bu metotla, geniş bir pH aralığında düşük çözünme özelliği sergileyen ve parçacık ebadı ayarlanabilen HA esaslı ucuz ve verimli sabit fazlar elde etmek mümkündür.

1.1. Hümik Maddeler

Doğadaki organik maddelerin önemli bir kısmını teşkil eden hümik maddeler; başta bitkisel kalıntılar olmak üzere, hayvansal ve mikrobiyal kalıntıların çeşitli etkilerle bozuşması ve açığa çıkan yeni yapıların kondensasyonuyla (doğal olarak) oluşmuş karmaşık yapılı makromoleküllerdir. Toprakta, suda ve sedimentlerde katı ve/veya

çözünmüş halde bulunabilen hümik maddelerin birçok madde ile etkileşebildiği ve doğada önemli roller üstlendiği bilinmektedir (Tipping, 2002).

Sudaki ve topraktaki hümik maddelerin tamamı için genel bir tanım vermek güç olmakla beraber, Aiken ve ark. (1985) hümik maddeleri; "doğal olarak oluşan, renkleri sarıdan siyaha kadar değişebilen, yüksek moleküler kütleye sahip, dayanıklı, biyojenik ve heterojen organik maddeler" olarak tanımlamışlardır.

Thurman ve Malcolm (1981), sudaki hümik maddeleri tanımlamak için makromoleküler yapıdaki elementlerin oranına, moleküler kütleye, yapıdaki fonksiyonel gruplara atıfta bulunduktan sonra, hümik maddelerin sudaki çözünürlüklerine göre hümik asit ve fulvik asit olmak üzere iki alt gruba ayrılabileceğini belirtmiştir: Sulu ortamda, pH=2 veya altında çöken hümik madde fraksiyonuna hümik asit, bu şartlarda çözelti ortamında kalan fraksiyona ise fulvik asit demiştir.

Stevenson (1994) hümik maddeleri; "ikincil reaksiyonlar sonucu oluşmuş, renkleri sarıdan siyaha kadar değişebilen ve görece yüksek moleküler kütleye sahip maddeler" olarak tanımlamıştır.

Hümik maddeler, (çözünme özelliklerine göre) genellikle üç sınıfta incelenmektedir: fulvik asit, hümik asit ve hümin. Fulvik asit; sulu ortamda çözünme özelliği yüksek ve ortalama molekül kütlesi hümik asit ve hümine göre daha düşük olan fraksiyondur. Genel olarak fulvik asidin alifatik karakteri aromatik karakterinden daha belirgindir. Hümik asit; sulu ortamda asidik şartlarda çöken, genellikle pH=3'ün (Choppin, 1999) üzerinde çözünmeye başlayan hümik madde fraksiyonu olarak bilinir. Hümin ise, asidik ve bazik şartlarda kolayca çözünmeyen ve ortalama moleküler kütlesi hümik asit ve fulvik asitten daha büyük olan fraksiyon olarak nitelendirilir (Choppin, 1999; Gezici, 2004). Stevenson (1994) hümini; minerallere kuvvetli bir şekilde bağlanmış hümik asitten, yüksek derecede kondensasyona uğramış hümik maddelerden, melanin ve parafinik maddelerden oluşmuş, asidik ve bazik şartlarda kolayca çözünmeyen hümik madde fraksiyonu olarak tanımlamıştır. Bu üç hümik madde fraksiyonu karşılaştırıldığında; fulvik asitten hümine doğru ortalama moleküler kütlenin, karbon içeriğinin ve polimerleşme derecesinin arttığı; oksijen içeriğinin, çözünme özelliğinin ve iyon değiştirme karakterinin ise azaldığı söylenebilir (Gezici, 2004).

Başta tarım olmak üzere birçok alanda kullanılan hümik maddeler, yapılarındaki iyon değiştirici ve kompleksleştirici gruplar nedeniyle metal iyonlarının sulu ortamdan

sorpsiyonunda yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. Bu amaçla en çok kullanılan ve metal iyonlarıyla etkileşme özellikleri en çok incelenen hümik madde fraksiyonu hiç kuşkusuz hümik asittir (Tipping, 2002; Gezici, 2004).

1.2. Hümik Asidin Fiziksel, Kimyasal ve Spektroskopik Özellikleri

Doğada bulundukları kaynaklara göre hümik asitleri başlıca iki alt sınıfta incelemek mümkündür:

a) Toprak kaynaklı hümik asitler
b) Su kaynaklı hümik asitler

Toprak kaynaklı hümik asitler; yapı itibariyle oldukça aromatik bir yapıya sahiptir. Yani; benzen ve fenole benzeyen bir çok bileşen birbirlerine karmaşık olarak kondanse olmuştur. Su kaynaklı hümik asitlerde ise; aromatik yapılar bulunmakla birlikte, toprak kaynaklı hümik asitlerdeki kadar fazla değildir. Su kaynaklı hümik asitlerin yapılarında alifatik gruplar oldukça fazladır.

Hümik asidi, *kahverengi hümik asit* ve *gri hümik asit* şeklinde iki alt sınıfta incelemek de mümkündür. Bu iki hümik madde fraksiyonu, sulu ortamda farklı çözünme özelliği sergilemektedir: Kahverengi hümik asitler pH=2'nin üzerinde, gri hümik asitler ise pH=7'nin üzerinde çözünmeye başlayan hümik madde fraksiyonları olarak bilinir (Stevenson, 1994; Alvarez-Puebla ve ark., 2005).

Hümik asitler; leonardite, düşük ranklı kömürler ve turba gibi çeşitli doğal kaynaklardan elde edilebilmektedir (Perminova ve ark., 2007). Bu kaynaklardan hümik asitlerin ekstrakte edilmesi amacıyla en yaygın kullanılan metot, alkali ekstraksiyonu olup, temelde iki basamaklı bir işlemdir:

- Hümik asit kaynağı önce kuvvetli bir bazın (ör. NaOH, KOH) sulu çözeltisi ile etkileştirilir; bu aşamada hümik asit, tuzuna dönüştürülmüş olur.
- Sonra da; hümik asidin çözünmüş halde bulunduğu çözelti asitlendirilir; böylece siyah yumaklar halinde hümik asit elde edilmiş olur (Gezici, 2004).

Alkali ekstraksiyonuna alternatif olarak önerilen metotlara örnek olarak asidik dimetil sülfoksit (Hayes, 1985) ve asit pirofosfat (Gregor ve Powell, 1986) çözeltileriyle yapılan ekstraksiyonlar verilebilir. Hümik asidin kaynağından ekstraksiyonu sırasında

hümik asitte bazı yapısal değişimlerin meydana gelebileceği de belirtilmiştir (Janoš, 2003).

Hümik asit; molekül ağırlıkları birkaç yüz Dalton'dan birkaç yüz bin Dalton'a kadar değişebilen hümik madde fraksiyonlarından meydana gelmiştir. Toprak kaynaklı bir hümik asidi jel filtrasyon tekniğiyle fraksiyonlarına ayırıp elde ettiği fraksiyonların moleküler ağırlıklarını tayin eden Cameron ve ark. (1972), inceledikleri hümik asidin, moleküler ağırlıkları 2400 ile 1360000 aralığında değişen çok sayıda fraksiyondan meydana geldiğini tespit etmiştir. Polimerlerde, düzenli bir şekilde tekrar eden kimyasal bölgeler olmasına karşın, hümik asitlerde bazı kimyasal bölgelerin yapı içerisinde üniform bir tekrarından bahsetmek güçtür. Alifatik ve aromatik birimlere bağlı fonksiyonel grupların üniform bir dağılım sergilememesi nedeniyle hümik asidin moleküler kütlesini daha detaylı bir şekilde belirtmek zordur (Shin ve ark., 1999). Hümik asit yaklaşık olarak % 40-60 karbon, % 30-50 oksijen, %2-6 hidrojen, % 1-3 azot ve % 0,1-2,0 kükürt ihtiva etmektedir. Yapıda; karbonil, alkolik ve fenolik hidroksiller, karboksilatlar, aminler, amidler ve diğer bazı fonksiyonel gruplar da bulunmaktadır. Bütün bu fonksiyonel gruplar, hümik asidi hem hidrofilik ve hem de hidrofobik bölgelere sahip bir makromolekül haline getirir (Choppin, 1999; Shin ve ark., 1999; Tipping, 2002; Baker ve Khalili, 2003). Ayrıca; hümik asidin yapısında bir miktar kinhidron grubu da bulunmakta ve bu gruplar yapıda serbest radikallerin bulunmasına yol açmaktadır. Yapıda bulunan serbest radikaller, hümik aside redoks reaksiyonlarına girme özelliği katmaktadır. Hidrojen elektroduna karşın hümik maddelerin indirgenme potansiyelinin 0,5–0,7 V aralığında değiştiği bildirilmiştir (Choppin, 1999).

Hümik maddelerin yapısında bulunan hidrojenin %80'i karbona ve geri kalan kısmı ise oksijene bağlanmış olarak bulunur. Sadece oksijene bağlanmış hidrojenlerin dissosyasyonu olası olup, bu nedenle hümik asidin toplam asitliği genellikle karboksil ve fenolik hidroksil gruplarına atfedilir. Hümik maddelerde dissosiye olabilen hidrojen iyonu miktarı için üst limitin 10 meq/g olduğu belirtilmiştir. Bu değer, hümik asit için 4–6 meq/g düzeyindedir. Yapıda çok sayıda bulunan bu asidik karaktere sahip fonksiyonel gruplar hümik aside poliprotik bir özellik katmaktadır. Bu gruplar, yapıda genellikle tekli bulunmalarına karşın, makromoleküler yapıdaki konformasyonel ve yapısal değişmeler nedeniyle birbirine yaklaşarak çok dişli ligand olarak nitelendirilebilecek bölgeler oluşturur. Makromoleküler yapıda çok sayıda bulunan asidik fonksiyonel gruplar nedeniyle hümik asitler, geniş bir aralıkta değişen pK_a

değerleri sergiler. Bununla birlikte, yapıdaki karboksil gruplarının hemen hemen tamamı pH=7'de dissosiye olmuş halde bulunur (Tipping, 2002). Hümik asitteki negatif yükler, yapıdaki karboksil, fenolik ve/veya enolik hidroksillerin dissosyasyonundan; pozitif yükler ise imit, sekonder ve tersiyer amin yapılarından kaynaklanmaktadır (Campitelli, 2006).

Hümik asidin yapısında bulunan ^{13}C ve ^{14}C içeriği, bu makromoleküllerin yaşı hakkında fikir edinilmesini sağlamış ve toprak kaynaklı hümik asitler için 700–1600 yıllık değerler bulunmuştur (Tipping, 2002). Hümik asitlerin yapısında, kaynağına bağlı olarak, çok düşük oranlarda fosforun da bulunduğu bilinmektedir. Ayrıca; doğal hümik asitler Ca, Mg, Cu ve Zn gibi metalleri de ihtiva etmektedir. Bu metaller, doğal ortamda hümik asit ile şelatlaşmış olarak bulunurlar (Gezici, 2004).

Hümik maddelerin çözelti ortamındaki moleküler şeklinin belirlenmesi amacıyla yürütülen çalışmalardan çıkarılabilecek genel bir sonuç olarak; fulvik asitlerin hemen hemen küresel bir yapıya sahip olduğu ve fulvik asit taneciklerinin %75'e kadar su molekülleri tarafından işgal edildiğini söylemek mümkündür. Molekül ağırlığı 50000'e kadar olan hümik asitler için de benzer bir durumun söz konusu olduğu belirtilmiştir. Küçük moleküllerin şekilleri ve büyüklükleri, moleküler yapıdaki yük oranı ve elektrolit konsantrasyonundaki değişimlerden az etkilenirken, görece daha büyük moleküller bu değişimlerle daha yüksek düzeyde büzüşme veya şişmeye uğrayabilir. Hümik asidin heterojen yapıları göz önünde bulundurulduğunda, ortam şartlarına bağlı olarak yapıda çeşitli konformasyonel değişimlerin görülmesi beklenir. Çözelti ortamındaki hümik maddelerin kimyasını anlamak zor olmakla birlikte, bu durumun katı haldeki hümik maddeler için daha da zor olduğu belirtilmelidir. Diğer taraftan, bazı araştırmacılara (Swift, 1989) göre; hümik makromoleküllerin yoğun bir moleküller konformasyonda bulunması kaydıyla, katı haldeki hümik maddeler ile çözelti ortamındakiler arasında çok fazla bir farklılık yoktur. Ayrıca; hümik asidin moleküler şeklinin ve büyüklüğünün iyonların hümik asitlere bağlanmasıyla da değiştiği belirtilmelidir. Aslında, hümik asidin şekli ve büyüklüğü katyonların hümik asit makromoleküllerine bağlanmasını etkilerken, katyonların hümik makromoleküllerine bağlanmasıyla da hümik asidin moleküler şekli ve büyüklüğü değişebilmektedir. Yani, her iki olgu birbirini karşılıklı olarak etkileyebilmektedir (Tipping, 2002).

Chiou (1990), BET metoduyla (N_2 adsorpsiyonu) katı hümik asidin spesifik yüzey alanını 1 m^2/g olarak tayin etmiştir. Çözünmüş ve hidratlaşmış hümik asitlerin

spesifik yüzey alanı belirtilirken, genellikle *etkin yüzey alanı* terimi kullanılmaktadır. HA için etkin yüzey alanı birkaç bin m^2/g düzeyinde olabilmektedir (Tipping, 2002).

Hümik asitler, ultraviyole ve görünür bölgedeki ışınları absorplayabilen özelliğe sahiptir. Hümik asit, yapısındaki fonksiyonel grupların görünür bölgedeki absorpsiyonu nedeniyle sarıdan kahverengiye kadar değişebilen farklı renklerde bulunabilmektedir. Ultraviyole ve görünür bölgedeki spektrumlarda, absorbansın artan dalga boyu ile üstel olarak azaldığı görülebilir. Hümik asitlerin floresans özellik gösterdikleri de bilinmektedir. pH arttıkça ve dolayısıyla yapıdan proton ayrıldıkça, floresans değerinde artış gözlenir. Hümik asitte iki temel florofor grup bulunup; bunlar için uyarılma dalga boyu aralıkları 315–390 nm ve 415–470 nm'dir (Bloom ve Leenheer, 1989). Hümik asit, spektroskopik özellikleri nedeniyle doğada önemli roller üstlenir.

Sonuç olarak; hümik asit, moleküler ağırlıkları geniş bir aralıkta dağılan hümik madde fraksiyonlarından meydana gelen doğal makromoleküler olup, ortalama molekül ağırlığı elde edildiği kaynağa ve kullanılan ekstraksiyon yöntemine göre farklılık gösterebilmektedir. Ortalama molekül ağırlığı ve molekül büyüklüğündeki bu tür farklılaşmalar, hümik asidin fizikokimyasal özelliklerinde ve kimyasal türlerle etkileşmesinde farklılaşmalara yol açabilmektedir. Bu nedenle; hümik asidin kullanıldığı çalışmalarda, çalışılan hümik asidin fizikokimyasal özelliklerinin uygun yöntemlerle/tekniklerle belirlenmesi gerekmektedir.

1.2.1. Hümik asidin karakterizasyonu

Hümik asidin karakterizasyonunda kullanılan tekniklerin pratikteki temel amacının, moleküler yapıyı tamamen aydınlatmaktan ziyade, yapıdaki fonksiyonel grupların türü ve miktarı hakkında kalitatif ve kantitatif veriler elde etmek, yapının aromatiklik ve heterojenlik düzeyini belirlemek üzerinde yoğunlaştığı görülmektedir. Bu amaçla yaygın olarak kullanılan teknikler; elemental analiz, potansiyometrik titrasyonlar, bazı spektroskopik teknikler ve boyut eleme kromatografisidir.

Hümik asidin yapısı başlıca C, H, O, N, S ve az miktarda P elementlerinden meydana gelmektedir. Elemental analiz ile makromoleküler yapıdaki bu elementlerin miktarı hakkında kantitatif veriler elde edilebilmektedir. Bu da; hümik asidin orijini ve aromatiklik düzeyi hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Çeşitli kaynaklardan elde

edilen hümik asitlerin elemental içerikleri için aşağıdaki veriler sunulmuştur (Tablo 1.1; Tipping, 2002):

Tablo 1.1. Çeşitli doğal kaynaklardan elde edilen hümik asitler için elemental bileşimler

	%C	%H	%N	%S	%O
Toprak kaynaklı HA	52,8 – 58,7	2,2 – 6,2	0,8 – 4,3	0,1 – 1,5	32,8 – 38,3
Yer altı suyu HA	65,5	5,2	2,4	1,0	24,8
Nehir suyu HA	52,2	4,9	2,1		41,7

Ticari olarak temin edilebilen bazı hümik madde fraksiyonlarının elemental içerikleri için de aşağıdaki veriler sunulmuştur (Tablo 1.2; Alvarez-Puebla ve ark. 2005):

Tablo 1.2. Ticari olarak temin edilebilen bazı hümik madde fraksiyonlarının elemental bileşimleri [a]

	%C	%H	%N	%S	%O	Kül
Hümin	39,8	5,02	0,21	1,12	37,5	16,4
Gri hümik asit	55,5	4,28	0,80	1,30	38,1	-
Kahverengi hümik asit	51,2	4,10	0,86	0,72	43,2	-
Fulvik asit	40,1	3,57	0,67	0,65	55,0	-

[a] Ticari ürün: Fluka

Hümik asit, geniş bir aralıkta değişen pK_a değerlerine sahip fonksiyonel gruplar içerir. Bu nedenle, hümik asidin yapısındaki asidik fonksiyonel grupların sayısını basit bir titrasyon işlemiyle ayrı ayrı belirlemek kolay değildir. Hümik asitlerin karakterizasyonunda potansiyometrik titrasyonlar yaygın olarak kullanılır ve genelde iki amaç yürütülür:

a) Hümik asitte bulunan ve asidik özelliği görece yüksek olan –COOH ve –OH gruplarının eşdeğer gram sayısını belirlemek

b) Bu grupların dissosyasyon özellikleri hakkında kantitatif veriler elde etmek.

Literatürde bu amaçla önerilen titrasyon metotlarını *direkt* ve *indirekt* olmak üzere iki sınıfta incelemek mümkündür:

Hümik asitteki asidik grup sayısını belirlemek için kullanılan indirekt metotlar; $Ba(OH)_2$ ve $Ca(CH_3COO)_2$ metotları olarak bilinir. $Ba(OH)_2$ metodu, hümik asitteki toplam asidik grup sayısını (karboksil ve fenolik hidroksil) belirlemek için kullanılır. $Ca(CH_3COO)_2$ metodunda ise amaç, -COOH gruplarının sayısını bulmaktır. Bu nedenle her iki metot birlikte kullanılır ve toplam asidik grup sayısından karboksilik asit gruplarının sayısı çıkarılarak fenolik hidroksil gruplarının sayısı hesaplanır. Her iki metotta da çözünmüş haldeki hümik asit Ba^{2+} veya Ca^{2+} kompleksleri halinde çöktürülür ve elde edilen çökelekler sulu fazdan ayrılır. Çökelekten arındırılan sulu fazın ayarlı bir asit ile geri titrasyonundan asidik grupların sayısı bulunur. İndirekt metotlarda karşılaşılan en büyük güçlük, elde edilen çökeleklerin sulu fazdan etkin bir şekilde ayrılamamasından kaynaklanmaktadır. Ortamda katı halde kalan hümik asidin metal kompleksleri, geri titrasyon aşamasında yanlışlıklara neden olmaktadır. Bu metotlardan daha iyi verim alabilmek için ortamdaki çökelekler ultrafiltrasyon gibi bir teknik ile giderilebilir. İndirekt titrasyonlarda karşılaşılan bir diğer güçlük ise; ortamda fazla miktarda bulunan alkalilerin ($Ba(OH)_2$ ve $Ca(CH_3COO)_2$) oluşan çökeleğe adsorplanması ve bunların çökeleğin yüzeyinden verimli bir şekilde uzaklaştırılamamasıdır. Bu da, titrasyonda yanlışlıklara yol açmaktadır (Tipping, 2002).

İndirekt titrasyona kıyasla daha kolay olan ve hümik asidin karakteri hakkında kısa zamanda daha fazla bilgi sağlayan direkt titrasyon metodu, son zamanlarda yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Direkt titrasyonun en büyük avantajı, hem asidik grupların sayısı hem de dissosyasyon özellikleri hakkında önemli bilgiler sağlayabilmesidir. Bu metot, katı hümik asidin belirli miktardaki sulu ortama (genellikle elektrolit varlığında) ilave edilmesi ve kombine bir pH elektrodu yardımıyla (ilave edilen ayarlı asit/baz hacmine bağlı olarak) pH'daki değişimin dikkatli bir şekilde takip edilmesine dayanır. Bu yönteme göre; pH=8'deki yük yoğunluğu –COOH grubu sayısıyla ilişkilendirilirken, pH=10 ile pH=8'deki yük yoğunlukları farkının 2 katı da fenolik –OH grubu sayısıyla ilişkilendirilmektedir (Ritchie ve Perdue, 2003; Thurman ve Malcolm, 1981; Ma ve ark., 2001). Bu metotta karşılaşılan en büyük güçlüklerden biri, titrantın ortama

ilavesinden sonra hümik asit makromoleküllerinin proton bağlama veya proton vermesine ilişkin dengenin kurulabilmesi için uzun süre gerekebilmesidir. Direkt titrasyonla çalışırken dikkat edilmesi gereken en önemli hususlar; kullanılan titrantın dikkatli bir şekilde ayarlanması ve pH elektrodunun iyi bir şekilde kalibre edilmesidir. Direkt titrasyonda yorumlanabilir veriler genellikle pH=3–11 aralığında elde edilir. Ayrıca; titrasyonların farklı iyonik şiddetlerde yürütülmesi ile hümik asitteki fonksiyonel grupların özellikleri hakkında daha kapsamlı bilgiler elde etmek de mümkündür.

Hümik asidin karakterizasyonu amacıyla kullanılan spektroskopik tekniklerden UV-Vis. ve FTIR spektrofotometrik analizler en yaygın kullanılanlardır. Ultraviyole ve görünür bölgedeki spektrumlarda, absorbansın artan dalga boyu ile üstel olarak azaldığı görülebilir. Yük-transfer bantları ve saçılma 400 nm'den daha uzun dalga boylarında görülür. Ayrıca; 280 nm'deki molar absorpsiyon ile yapının aromatiklik düzeyi arasında yüksek bir korelasyonun bulunduğu da bilinmektedir (Chin ve ark. 1994). Hümik asidin spektrumu, yapıdaki asidik fonksiyonel grupların iyonlaşmasıyla değişiklik gösterir. Bu nedenle; ortamın pH değeri arttırıldıkça, absorbansta artış gözlenir. Metal katyonlarının hümik aside bağlanmasıyla da absorpsiyon değerlerinde değişimler gözlenebilmektedir (Buffle, 1988; Buffle, 1990; Tipping, 2002).

E4/E6 olarak ifade edilen oran, 465 ve 665 nm'deki absorbans değerlerinin oranı olup, bu oranın büyüklüğü yapının aromatiklik düzeyi ile ilişkilendirilmektedir. E4/E6 oranının tayini için absorbans ölçümlerinde genellikle hümik asit 0,05 M $NaHCO_3$ çözeltisinde çözündürülür. Düşük E4/E6 oranları aromatik yapıların görece yüksek düzeyde kondensasyona uğramış olduğunu gösterirken; görece yüksek E4/E6 oranı ise aromatiklik düzeyinin düşük olduğunu ve dolayısıyla alifatik karakterin daha yüksek olduğunu gösterir (Campitelli, 2006). Fong ve Mohamed (2007), yaptıkları literatür araştırmasından, farklı kaynaklardan elde edilen hümik ve fulvik asitlerin E4/E6 oranlarının hümik asitler için 2,4–9,5 aralığında; fulvik asitler içinse 1,9–22 gibi geniş aralıklarda değiştiğini belirtmiştir.

Hümik asidin UV-Vis. spektrumundan yapı hakkında detaylı bilgiler elde etmek güçtür. Çünkü; hümik asidin karmaşık yapısı, yapıda bulunan fonksiyonel gruplara karşılık gelen geçişlerin üst üste binmesine neden olmaktadır (Tipping, 2002).

UV-Vis. spektroskopisine kıyasla yapı hakkında daha detaylı bilgiler sunan FTIR analizleri, hümik maddelerin karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. FTIR spektroskopik analizlerde kullanılan en karakteristik bantlardan biri 1720 cm^{-1}

dolaylarında olup, C=O grubundaki gerilme titreşimlerine atfedilir. Fulvik asitlerde, yapıdaki C=O gruplarının sayısı hümik aside göre daha yüksek olduğundan, 1720 cm^{-1} dolaylarındaki bant daha belirgindir (Fong ve Mohamed, 2007). Hümik ve fulvik asitlerin FTIR spektrumlarında gözlenen karakteristik bantlardan başlıcaları Tablo 1.3'te verilmiştir (Koopal ve ark, 1998; Fong ve Mohamed, 2007):

Tablo 1.3. Hümik ve fulvik asitlerin FTIR spektrumlarında gözlenen bazı karakteristik bantlar ve bu bantların ilgili olduğu yapılar

Dalga sayısı (cm^{-1})	**Titreşim türü**	**İlgili fonksiyonel gruplar/yapılar**
3400	O-H gerilme	- COOH ; Ar-OH ; R-OH
2900	C-H gerilme	Alifatik yapılar
1715	C=O gerilme	-COOH ; aldehit ; keton yapıları
1625	C=C gerilme	Aromatik yapılar
1400	C-H eğilme	Alifatik yapılar; COO^- için asimetrik gerilme
750 -1000	C-O gerilme; Si-O gerilme	Polisakkarit zincirleri; silikat yapıları

Hümik maddelerin yapısal özellikleri hakkında detaylı bilgiler elde edebilmek için kullanılan tekniklerden önce, hümik maddeler genellikle uygun ayırma teknikleriyle fraksiyonlarına ayrılır. Bu amaçla, kromatografik teknikler yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bir numunedeki toplam hümik madde miktarının belirlenmesinde ters faz sıvı kromatografisi (RPLC) kullanılabilmekle beraber, bu kromatografi modu ile hümik maddelerin yapısı hakkında kapsamlı bilgiler elde edilememektedir. Hümik maddelerin yapısal özellikleri hakkında kapsamlı bilgiler edinmek amacıyla en yaygın kullanılan (ve en faydalı bilgiler sunan) kromatografik teknik *boyut eleme kromatografisidir*. Boyut eleme kromatografisiyle, hümik maddeler fraksiyonlarına ayrılır ve böylece hümik maddedeki fraksiyonların moleküler kütle dağılımı hakkında kantitatif veriler elde edilebilir. Hümik maddelerin yapısal özellikleri hakkında bilgi edinmek amacıyla kullanılan diğer bir kromatografik teknik ise GC-MS olup; bu teknik genellikle, piroliz ve termoliz işlemleriyle hümik maddelerden açığa çıkan ürünlerin analizinde kullanılmaktadır. Bazı kısıtlamaları olmakla birlikte, elektroforetik tekniklerin de hümik maddelerin karakterizasyonunda kullanıldığını belirtmek gerekir. Hümik maddelerin sulu ortamdan ayrılmasında sorpsiyon işlemlerinden de faydalanılmaktadır. Bu işlemlerde, sulu ortamda çözünmüş halde

bulunan hümik maddeler, iyonik karaktere sahip olmayan adsorbanlarda (ör. XAD) tutulur ve ardından uygun bir pH gradyenti uygulanarak farklı pKa değerlerine sahip hümik madde fraksiyonları ayrılır. Ayrılan bu fraksiyonlar uygun tekniklerle karakterize edilir (Janoš, 2003).

1.2.2. Hümik asidin kimyasal türlerle etkileşmesi

Doğal ortamda, hümik asit hem çözünmüş hem de katı halde, birçok kimyasal türün taşınımı ve bitkiler tarafından kullanımı üzerinde önemli etkilere sahiptir. Yapısında bulunan hidrofobik, hidrofilik ve iyonlaşabilen gruplar nedeniyle hümik asit, apolar, polar ve iyonik türlerle kompleksleşme, yük-transfer etkileşmeleri, hidrofobik etkileşmeler, dipol-dipol etkileşmeleri, iyon-değiştirme ve hidrojen bağı oluşumu gibi farklı mekanizmalar üzerinden etkileşebilir (Luo, 2007). Hümik asidin kimyasal türlerle etkileşme özellikleri hümik asidin çözünmüş halde bulunduğu bir çözelti ortamında veya hümik asidin katı halde bulunduğu katı-sıvı ara-yüzeylerinde incelenebilmektedir.

Hümik asit ile etkileşme özellikleri en çok incelenen kimyasal türler hiç kuşkusuz metal iyonlarıdır. Moleküler yapısında, metal iyonlarının bağlanabileceği fonksiyonel gruplar içeren hümik asit, hem çözünmüş hem de katı halde metal iyonlarıyla farklı düzeylerde etkileşebilmektedir.

Hümik asidin metal iyonlarıyla etkileşmesinde en çok –COOH ve aromatik –OH grupları rol almaktadır. Makromoleküler yapıda fazla sayıda bulunan ve belirli bir dağılım sergilemeyen bu gruplar nedeniyle hümik asit geniş bir aralıkta değişebilen p*K*a değerleri sergiler. p*K*a değerlerinin geniş bir aralıkta olması, hümik asitlerin zayıf ve kuvvetli iyon değiştirici olarak davranabilmesine imkan tanır. Ayrıca; doğal polielektrolit yapısı da, yüklü parçacıklar etrafında çift katmanlı bir difüzyon tabakasının oluşmasını sağlar. Hümik asitteki kuvvetli asidik gruplar, aromatik halkaya fenolik –OH grubuna göre (genellikle) "orto" pozisyonunda bağlı olan karboksilatlardır. Bu karboksilatların kümelenmesi, elektrostatik alan etkisini doğurur ve bu etkinin sonucu olarak da, metal iyonlarının çok dişli mekanizmaya göre kuvvetle bağlanabileceği bölgeler oluşur. Kümelenmemiş karboksilatlar ile fenolik –OH grupları ise daha zayıf asidik gruplar olarak davranır. O halde; hümik asitlerde metal iyonlarıyla kompleks oluşturabilecek 3 gruptan söz etmek mümkündür (Davies, 1997; Filella, 1990; Baker ve Khalili, 2003; Gezici, 2004):

a) Kümelenmiş karboksilat grupları (kuvvetli asidik bölgeler)

b) Kümelenmemiş karboksilat grupları (zayıf asidik bölgeler)

c) Fenolik ve alifatik –OH grupları (daha zayıf asidik bölgeler).

Metal iyonları hümik asitteki bu fonksiyonel gruplarla iyon-değiştirme ve kompleks-oluşturma mekanizmaları üzerinden etkileşebilir. Bu iki mekanizmadan hangisinin daha etkili olduğu ortam şartlarına, hümik asidin yapısal özelliklerine, metal iyonunun kimyasına ve çözeltideki konsantrasyonuna bağlı olarak değişir. Bununla birlikte; her iki mekanizmada da en büyük rolü karboksil gruplarının oynadığı söylenebilir. İyon-değiştirmeye göre daha kuvvetli bir etkileşme olan kompleks-oluşturma mekanizması için aşağıdaki etkileşme tiplerinden söz edilebilir (Pandey, 1999; Baker ve Khalili, 2003; Gezici, 2004):

a) Karboksil ve fenolik hidroksil grupları arasında metal iyonunun şelatlaşması

b) İki karboksil grubu arasında metal iyonunun şelatlaşması

c) Bir karboksil grubuyla metal iyonunun kompleksleşmesi

d) Fenolik hidroksil ve fenolik eter grupları ile metal iyonunun kompleksleşmesi

Metal iyonları hem çözünmüş hem de katı haldeki hümik aside bu etkileşmeler üzerinden bağlanabilir. Buna ilaveten; metal iyonları katı haldeki hümik aside, seçiciliği daha düşük olan adsorpsiyon mekanizmasına göre de tutunabilir.

Metal iyonlarının hümik asitteki fonksiyonel gruplarla etkileşmeleri tanımlanırken *iç-küre* ve *dış-küre* kompleksleşmesi terimleri de yaygın olarak kullanılmaktadır. İç-küre kompleksleşmesinde; çözünmüş halde bulunan metalin iç koordinasyon küresinden bir veya birkaç su molekülü ayrılır ve yerine hümik asitteki ligand değiştirici özelliğe sahip fonksiyonel gruplar koordine olur. Bu etkileşme oldukça kuvvetlidir. Dış-küre kompleksleşmesinde ise, metal, koordine ettiği çözücü molekülleriyle beraber, hümik asitteki fonksiyonel gruplara (aralarında direkt bir bağ oluşmaksızın) bağlanır. Bu tip etkileşmeler, iç-küre kompleksleşmesine göre daha zayıftır ve temelde elektrostatik kuvvetlere dayanır.

Hümik asidin metal iyonlarıyla etkileşmesinde, yapıdaki fonksiyonel gruplar kadar, molekül büyüklüğü de etkilidir. Yapılan bazı spektroskopik çalışmalar, hümik asidin molekül büyüklüğünün artmasıyla, metal iyonlarının hümik aside bağlanma sabitinin de arttığını göstermiştir. Aslında, moleküler yapının büyümesiyle yapıdaki karboksil grubu sayısının azalması ve dolayısıyla metal iyonlarının hümik asitle daha

zayıf etkileşmeye girmesi beklenirdi. Bu beklenmeyen durum, molekül büyüklüğüne bağlı olarak hümik asit fraksiyonlarındaki fonksiyonel gruplardaki farklılaşmalar ve hümik asit fraksiyonlarının üç boyutlu yapılarındaki değişikliklerle ilişkilendirilmiştir (Shin ve ark., 1999). Küçük molekül yapısına sahip hümik maddelerin yapısındaki iyonik grupların sayısı daha yüksektir ve bu nedenle metal iyonlarıyla kompleks oluşturma eğilimi daha yüksektir (Fong ve Mohamed, 2007). Fakat; yukarıda da belirtildiği gibi, metal iyonlarının molekül ağırlığı büyük hümik maddelerle oluşturduğu komplekslerin oluşum sabitlerinin daha yüksek olduğu belirtilmiştir (Shin ve ark., 1999).

Hümik asidin moleküler şekli ve büyüklüğü ile (özellikle çok yüklü) metal katyonlarının hümik makromolekülleriyle etkileşme düzeyi, birbirini karşılıklı olarak etkileyen olaylardır. Hümik makromoleküllerine birden fazla yüke sahip katyonların bağlanmasının bir sonucu olarak makromoleküler yapıda konformasyonel değişiklikler meydana gelir ve sonuçta hümik makromoleküllerin büyüklüğünde bir düşüş gözlenir. Makomoleküler yapıdaki küçülmeyle birlikte, hümik asitteki elektron-donör gruplar birbirine yaklaşır ve çok dişli ligand olarak nitelendirilebilecek bağlanma bölgeleri oluşur. Yani, hümik aside bağlanan bir metal katyonu, daha sonra bağlanacak metal katyonlarının etkileşme düzeyini değiştirebilmektedir. Makromoleküler yapının yüksek düzeyde rijit olması durumunda, hümik makromoleküllerindeki fonksiyonel grupların bir kısmı, metal iyonlarının etkileşmesi için uygun bir pozisyonda bulunmaz. Hümik asitlerin fizikokimyası ile ilgili bilgilerimizin yeterli düzeyde olmaması, hümik asitlerle metal iyonları arasındaki etkileşme türlerini detaylı bir şekilde anlamamız noktasında önemli bir sınırlama getirmektedir (Tipping, 2002).

Su ve topraktaki hümik madde içeriği, organik maddelerin taşınımı ve biyolojik olarak faydalı olabilirliğini etkileyebilmektedir. Hümik asitlerin karmaşık moleküler yapısı ve heterojenliği nedeniyle organik türler ile etkileşme özelliklerini detaylı bir şekilde belirlemek zordur. Bununla birlikte; hümik maddelerin organik kirleticiler ile etkileşmesinde, hümik maddenin yapısal özelliklerinin etkili olduğu bilinmektedir. Hümik maddedeki O/C ve H/C oranlarındaki farklılaşmaların bir sonucu olarak, organik kirleticilerin hümik maddeler ile etkileşmesinde rol alan mekanizmalarda farklılaşmaların gözlenebileceği belirtilmiştir. Örneğin; hümik maddedeki O/C oranının azalması ve H/O oranının artmasıyla pirenin hümik maddelere bağlanmasında rol alan mekanizmanın “dağılma”dan “adsorpsiyon”a doğru kaydığı belirtilmiştir. Hümik asitle poliaromatik hidrokarbonlar arasındaki etkileşmelerin ise büyük oranda yük transferi ve

hidrofobik etkileşmelere dayandığı bildirilmiştir (Kollist-Siigur ve ark., 2001; Luo ve ark., 2007).

Hümik maddelerin su saflaştırma proseslerinde; suyun koku, tat ve renk şiddetlerinin artmasına neden olduğu da bilinmektedir. Ayrıca; suyun dezenfeksiyonu amacıyla kullanılan klorlama işlemi sırasında hümik asidin trihalometan oluşumunda rol aldığı da bildirilmiştir (Vik ve Eikebrokk, 1989; Fong ve Mohamed, 2007).

Hümik asit; yapısında bulunan kinhidron grupları aracılığıyla serbest radikaller oluşturabilmekte ve bu nedenle redoks tepkimelerine yatkın bir özellik sergilemektedir. Ayrıca; yeryüzü sularında bulunan hümik asitlerin, ışığın etkisiyle fotolize uğradığı ve mikromolar düzeyinde H_2O_2 açığa çıkardığı bildirilmiştir (Choppin, 1999).

1.2.3. Katı/sabit faz olarak hümik asit

Hümik asidin sulu ortamda metal iyonlarını tutabilme ve tutulan iyonları düşük pH'larda bırakabilme özelliği, metal iyonlarının giderimi ve geri kazanımı amacıyla yapılacak işlemlerde faydalı bir özellik olarak karşımıza çıkmaktadır. Fakat; hümik madde kaynaklarından alkali ekstraksiyonu yoluyla elde edilen hümik ve fulvik asitler, pH>3 olan bütün sulu çözeltilerde az veya çok çözünürler ve bu özellik, doğrudan katı/sabit faz olarak kullanılmalarına önemli bir kısıtlama getirmektedir (Gezici, 2004).

Hümik asidin katı/sabit faz olarak kullanımı ile ilgili bir diğer kısıtlama ise; katı hümik asidin parçacık ebadının mâkul bir şekilde ayarlanamaması ve katı partiküllerin çözelti ortamından kolayca ayrılamamasıdır. Ayrıca; katı hümik asidin kolonlara doldurulmasında da bir takım güçlüklerle karşılaşılmaktadır (Gezici, 2004).

Sonuç olarak; hümik asidin katı/sabit faz olarak kullanımını kısıtlayan üç ana nedenden söz edilebilir:

a) Hümik asidin çözünebilme özelliği
b) Hümik asit partiküllerinin parçacık ebadının kolayca ayarlanamaması
c) Katı hümik asidin süspansiyonlarından kolayca ayrılamaması

Hümik asidin düşük çözünme özelliği sergileyen ve uygun parçacık ebadına sahip bir şekle dönüştürülmesi amacıyla literatürde kullanılan metotlardan en bilinenleri *çözünürsüzleştirme* (insolubilization) ve *immobilizasyondur*.

Çözünürsüzleştirmede; katı hümik asit 330 ^{o}C'ta 1,0 saat süreyle ısıl işleme tâbi tutulur ve ısının etkisiyle yapıda meydana gelen bazı değişikliklerin bir sonucu olarak düşük çözünme özelliği sergileyen bir şekle dönüştürülür (Seki ve Suzuki 1995). Çözünürsüzleştirme işlemiyle elde edilen materyalin en büyük dezavantajı, partikül ebadının makul bir şekilde ayarlanamaması, elde edilen katı partiküllerin süspansiyonlarından kolayca ayrılamaması ve kolon şartlarında yürütülecek işlemlerde kolonlara kolayca doldurulamamasıdır.

İmmobilizasyonda ise; hümik asit, uygun bir katı destek maddesine fiziksel ve/veya kimyasal etkileşmelerle tutturulur. Katı destek maddesi olarak genellikle yüzeyi uygun fonksiyonel gruplarla modifiye edilmiş silika ve bazı polimerik maddeler kullanılmaktadır. Yapısal özelliklerinin iyi bir şekilde kontrol edilebilmesi, sergilediği yüksek mekanik dayanım ve kimyasal kararlılık nedeniyle silika, kromatografik işlemlerde tercih edilen bir katı destek maddesidir.

Fiziksel etkileşmelere dayanan immobilizasyon işlemlerinde; genellikle hümik asit ile katı destek maddesi arasında iyonik ve hidrojen bağı oluşumuna dayanan etkileşmeler rol almaktadır. Fakat; bu şekilde elde edilen materyallerden, özellikle yüksek pH değerlerinde, hümik asidin ayrılması beklenir.

Hümik asidin silika yüzeyine kimyasal bağ oluşumuyla immobilize edildiği teknikler incelendiği zaman; immobilizasyon işleminin genellikle *aromatik halkalar*, *azot içeren bazı fonksiyonel gruplar* ve *karboksilik asit grupları* üzerinden yapıldığı görülmektedir.

Hümik asitteki aromatik halkalar üzerinden yapılan immobilizasyon işleminde katı destek maddesi olarak kullanılan silikanın yüzeyi öncelikle diazonyum grubu içeren bir yapı bağlanmak suretiyle modifiye edilir ve ardından hümik asit ile etkileştirilip immobilizasyon gerçekleştirilir. Bu işlemde, diazonyum grupları hümik asitteki aromatik yapılara bağlanır.

İmmobilizasyonda hümik asitteki azot grubu içeren fonksiyonel grupların rol aldığı durumda ise; katı destek maddesi olarak kullanılan silikanın yüzeyi glutaraldehit ile modifiye edilir. Glutaraldehit ile modifiye edilmiş katı destek maddesine hümik asit azotlu fonksiyonel grupları üzerinden bağlanır.

Hümik asitteki karboksil grupları, immobilizasyon işlemlerinde hümik asidin en çok tercih edilen fonksiyonel gruplarıdır. Bu immobilizasyon şeklinde; katı destek maddesi olarak kullanılan silika öncelikle, yüzeyine aminopropil silika gibi bir fonksiyonel grup bağlanmak suretiyle aktifleştirilmektedir. Yüzeyinde amino grupları

bulunan silikanın hümik asit ile uygun şartlarda etkileştirilmesiyle hümik asidin immobilizasyonu gerçekleştirilir. Bu işlemle; katı destek maddesi ve hümik asit arasında kuvvetli amit ve/veya iyonik bağların oluştuğu düşünülmektedir (Koopal ve ark., 1998; Yang ve Koopal, 1999; Kollist-Siigur ve ark., 2001; Klavins ve Eglite, 2002; Prado ve ark., 2003; Prado ve ark., 2004). Polistriendivinilbenzen ve merrifield gibi reçinelerin katı destek maddesi olarak kullanıldığı immobilizasyon işlemlerinde de benzer etkileşmelerden faydalanılmaktadır (Klavins ve Eglite, 2002; Klavins ve ark., 2006). Bu tür immobilizasyon işlemlerinde son aşamada, hümik asit immobilize edilmiş katı faz, genellikle, hümik asidin bağlanmadığı aktif fonksiyonel grupların uygun kimyasal işlemlerle kapatılmasını kapsayan çeşitli işlemlere tâbi tutulur (*end-capping*).

Hümik asidin aminopropil silika yüzeyine karboksil grupları üzerinden immobilizasyonunda ortam şartlarına bağlı olarak iyonik etkileşmeler ve kovalent bağ oluşumu rol alabilir. Kararlı bir yapı elde etme bakımından kovalent bağ oluşumuna dayanan immobilizasyon daha çok tercih edilmektedir. Hümik asidin yüzeye kovalent bağ oluşumuyla bağlanma veriminin susuz ortamda daha yüksek olduğu, sulu ortamda iyonik etkileşmelerin de immobilizasyonda rol alabildiği düşünülmektedir (Koopal ve ark., 1998). Hümik asidin aminopropil silikaya kovalent bağ oluşumu üzerinden bağlanma verimliliğini arttırmak için immobilizasyon işlemi genellikle dimetilformamid (DMF) ortamında yapılmaktadır. DMF, hümik asit için iyi bir çözücü olması ve susuz bir ortam sağlaması bakımından uygun bir çözücü olmakla birlikte, yüksek sıcaklıklarda bozunma özelliği sergilemekte ve elde edilen katı materyalin saflaştırılması aşamasında biraz güçlük çıkarabilmektedir. Mâkul sıcaklıklarda çalışmak ve katı materyali çeşitli organik çözücülerle etkileştirip saflaştırmak sûretiyle bu güçlükler kolayca aşılabilmektedir.

Hümik asidin çözünmeyen bir şekle dönüştürülmesi amacıyla kullanılan diğer bir yöntemde ise hümik asit; formaldehit (ve bazen fenolik bir bileşik) ile etkileştirilerek bir dizi polikondensasyon reaksiyonuna tâbi tutulur ve böylece çözünmeyen bir yapıya dönüştürülür (Klavins ve Eglite, 2002; Klavins ve ark., 2006).

1.3. Kromatografik Ayırma Teknikleri

Kromatografi; bir numunede yer alan bileşenlerin *hareketli faz* ve *sabit faz* olarak ifade edilen iki faz arasında farklı dağılma oranları sergileyerek birbirinden ayrılmasına dayanan bir ayırma ve saflaştırma yöntemidir **(**Skoog ve ark., 1996**)**.

Herhangi bir ön işleme tâbi tutmadan, karışımlarda bulunan bileşenler hakkında kalitatif ve kantitatif veriler elde etmek genellikle zordur. Çünkü; karışımlardaki bileşenleri diğer bileşenlerden gelebilecek girişimlerden etkilenmeden ayrı ayrı tayin etmek amacıyla kullanılabilecek sınırlı sayıda kimyasal ve instrümental teknik mevcuttur **(**Skoog ve ark., 1996**)**. Bu nedenle kromatografik ayırmalardaki temel hedef; genellikle bir numunedeki bileşenlerin tayin edilmesine yöneliktir (lineer kromatografi). Ayrıca; kromatografik ayırmalar, numunede bulunan bileşenlerin birbirinden ayrılıp saf halde elde edilmesini de olası kılmaktadır (preparatif kromatografi).

Kromatografi; günümüzde bir çok alanda yaygın bir şekilde kullanılan bir ayırma ve saflaştırma yöntemi olup, bu amaçla geliştirilen çok sayıda kromatografik teknik bulunmaktadır. Bu nedenle, kromatografik yöntemleri basit bir şekilde sınıflandırmak zordur. Kromatografik ayırma yöntemlerini/tekniklerini dört başlık altında sınıflandırmak mümkündür:

Numunedeki bileşenlerin sabit faz üzerindeki ilgili sorpsiyon izotermlerine göre

- *Lineer kromatografi*: Numunedeki bileşenlerin sergilediği izoterm lineerdir ve bu nedenle gözlenen kromatografik bantların konumu ve şekli konsantrasyondan bağımsızdır. Gözlenen bantlar Gaus eğrisine benzeyen bir şekil sergiler.

- *Lineer olmayan kromatografi*: Bileşenler için ilgili izotermler lineer değildir ve bu nedenle bantların yeri ve şekli konsantrasyona bağlı olarak değişebilir (Guiochon ve ark., 1994). Bu, kromatografinin ilk uygulanan şekillerinden biri olup, preparatif amaçlar için kullanılabildiği gibi; sabit faz ile analit arasındaki sorpsiyon izotermlerinin türetilmesi amacıyla da kullanılabilmektedir (frontal kromatografi).

Hareketli faz ile sabit fazın fiziksel haline göre

Bu sınıflandırma şeklinde genel bir kabul olarak; önce hareketli fazın, sonra da sabit fazın fiziksel hali belirtilir. Eğer sadece (sıvı kromatografisi veya gaz kromatografisi gibi) tek bir fiziksel hal vurgulanmışsa bu, hareketli faz ile ilişkilendirilir. Buna göre aşağıdaki kromatografi çeşitlerinden söz edilebilir:

- Sıvı–Sıvı kromatografisi
- Sıvı–Bağlı-faz kromatografisi
- Sıvı–Katı kromatografisi
- Gaz–Sıvı kromatografisi
- Süperkritik akışkan kromatografisi

Hareketli faz ile sabit fazın birbiriyle fiziksel olarak temasa getirilme şekline göre

- Kolon kromatografisi (ör. Sıvı kromatografisi, Gaz kromatografisi, Süperkritik akışkan kromatografisi)
- Düzlemsel kromatografi (ör. İnce tabaka kromatografisi, kâğıt kromatografisi)

Numunedeki bileşenlerin ayrılmasında rol alan fiziksel veya kimyasal mekanizmaların türüne göre

- Adsorpsiyon kromatografisi
- Dağılma kromatografisi
- İyon-değiştirme kromatografisi
- Ligand-değiştirme kromatografisi
- Boyut eleme kromatografisi

Kromatografik ayırma teknikleri hakkında çok fazla detaya girmeden, doktora tezimizin kapsamında yer alması bakımından HPLC'deki bazı uygulamalar ile ilgili bilgiler aşağıda ayrı başlıklar halinde verilmiştir.

1.3.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)

Kolon şartlarında yürütülen klasik sıvı kromatografisinde çapı ve uzunluğu sırasıyla 1-5 cm ve 50-500 cm aralığında değişen kolonlar kullanılmış ve hareketli faz bu kolonlardan yerçekiminin etkisiyle geçirilmiştir. Bu şartlarda uygun akış hızları sağlamak amacıyla sabit fazın tanecik boyutu görece büyük (150-200 μm) tutulmuştur. Fakat bu şartlarda bile çalışılabilen akış hızlarının çok düşük olduğu görülmüştür. Vakum veya basınç sistemleri kullanılarak akış hızları arttırılmıştır, fakat bu sefer de yüksek akış hızlarında teorik tabaka sayısının azalması nedeniyle kolon verimliliğinde önemli düşüşler gözlenmiştir. Kromatografiyle ilgilenen araştırmacılar, yüksek kolon verimliliği elde etmek amacıyla sabit fazın parçacık ebadının düşürülmesi gerektiğini

anlamıştır. Düşük parçacık ebadına sahip kolonlardan hareketli fazı yüksek akış hızlarıyla geçirebilmek için de yüksek basınçlarda çalışmayı mümkün kılan özel ekipmanlara ihtiyaç duyulmuştur (Skoog ve ark., 1996).

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC); sıvı haldeki hareketli fazın kromatografik kolonda yer alan sabit faz üzerinden yüksek akışlarda geçirilebilmesini mümkün kılan özel teçhizatların bulunduğu bir kromatografik teknik olup, günümüzde hem analitik hem de preparatif amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır.

HPLC'de yaygın kullanım alanı bulan uygulamalardan bazıları dağılma kromatografisi, adsorpsiyon kromatografisi, iyon-değiştirme kromatografisi, ligand-değiştirme kromatografisi ve boyut eleme kromatografisidir.

Dağılma kromatografisi

Dağılma kromatografisi; en çok kullanılan sıvı kromatografisi uygulamalarını kapsayıp, genellikle *sıvı-sıvı* ve *bağlı-faz* olmak üzere iki alt sınıfa ayrılır:

Sıvı-Sıvı kromatografisi; uygun bir sıvının kolon dolgu maddesine fiziksel olarak tutturulmasına dayanır. Dağılma kromatografisinde ilk kullanılan teknik olan Sıvı-Sıvı kromatografisinde, kolon dolgu maddesine tutturulmuş sıvının zaman içerisinde hareketli fazda çözünmesi nedeniyle bu uygulamanın bazı dezavantajları mevcuttur.

Bağlı-faz dağılma kromatografisinde ise; kolon dolgu maddesinin yüzeyine kimyasal bağ oluşumuna göre uygun fonksiyonel gruplar bağlanır. Sabit faz ile hareketli fazın polaritelerine göre bağlı-faz dağılma kromatografisi *normal-faz (NPLC)* ve *ters-faz (RPLC)* olarak iki kısma ayrılır.

NPLC'de sabit faz silika ve alümina gibi polar karaktere sahip materyallerden oluşur. Hareketli faz ise heksan ve izopropil eter gibi düşük polariteye sahip çözücülerdir. Dağılma kromatografisinin ilk kullanılan uygulaması NPLC'dir.

RPLC; düşük polar karaktere sahip sabit faz üzerinde (ör. C8, C18), polaritesi yüksek çözücülerle (Su, MeOH, MeCN, vb.) numunedeki bileşenlerin ayrılmasına dayanır. RPLC, hiç kuşkusuz, en çok kullanılan HPLC uygulamalarından bir tanesidir (Skoog ve ark., 1996). Bu uygulamada kullanılan (düşük polariteye sahip) sabit fazların sulu ortamda büzüşebilmesi nedeniyle, özellikle küçük moleküler yapıya sahip türler sabit faz ile yeterli düzeyde etkileşmeye girememekte ve bu da seçiciliği düşürmektedir. Belirtilen bu olumsuzluğa çözüm sunmak amacıyla, RPLC'de kullanılan sabit fazlarda

amid gibi polar gruplar içeren alkil zincirlerinin kullanılabileceği belirtilmiştir (Olsen, 2001).

RPLC'nin farklı bir uygulaması olan *iyon-çifti kromatografisi*, iyonik türlerin ayrılması ve tayini için kullanılan bir kromatografi türüdür. Bu kromatografi türünde, sabit faz C18 gibi düşük polariteye sahip materyallerden oluşup, hareketli faz MeOH gibi organik çözücüler içeren sulu tampon çözelti ve analit ile zıt yüke sahip bir karşıt iyon içeren iyonik bir bileşikten meydana gelmektedir. Karşıt iyon ile analit birleşerek RPLC şartlarında alıkonabilen nötral bir türe (iyon çifti) dönüşür. İyon çifti kromatografisi ile iyonik türlerin kromatografik ayrılmalarında yüksek seçicilik elde edilebilmektedir. Bu nedenle, bazen iyon-değişim kromatografisine tercih edilebilmektedir (Skoog ve ark. 1996).

İyon-eşleme ters-faz sıvı kromatografisi olarak bilinen diğer bir uygulamada ise, iyonik karaktere sahip sabit fazın yüzeyi, sabit fazdaki fonksiyonel gruplarla zıt işarete sahip uygun bir bileşik ile kapatılır ve sabit faz bu şekliyle RPLC şartlarında kullanılabilecek bir şekle dönüşmüş olur.

Küçük moleküler yapıya sahip bileşiklerin RPLC modunda sabit faz ile düşük düzeyde etkileşmeye girmesi nedeniyle bu tür bileşiklerin RPLC modundaki kromatografik ayırmaları için metot geliştirmede bazı zorluklarla karşılaşılmaktadır. Bu tür bileşikler için NPLC şartlarında metot geliştirme daha kolay olmakla birlikte, NPLC şartlarındaki analizlerin düşük tekrarlanabilirlik sergilemesi ve kütle spektrofotometresinin kullanıldığı analizlerde iyonlaştırmada karşılaşılan güçlükler nedeniyle, özellikle farmakolojide çok tercih edilmemektedir. Bunun yanı sıra; sadece suda çözünen bileşikleri NPLC şartlarında ayırmak önemli ölçüde güçlük çıkarmaktadır. NPLC ve RPLC'de karşılaşılan bu tür sorunlara, dağılma kromatografisinin yeni bir uygulaması olan *hidrofilik etkileşme kromatografisi* (HILIC) çözüm sunabilmektedir (Olsen, 2001).

HILIC'ın ilk uygulamalarında karbonhidrat ve peptid analizleri üzerinde durulmuş olup, günümüzde birçok kimyasal türün analizinde kullanıldığı görülmektedir. HILIC; hareketli fazda sudan daha düşük bir polarite indisine sahip (su ile karışabilen) bir organik çözücü ile suyun kullanıldığı bir kromatografi türü olup, organik çözücünün yüzdesi genellikle %60 (v/v)'ın üzerindedir. HILIC'da, silika ve amino, siyano, amid gibi gruplar içeren polar karaktere sahip sabit fazlar kullanılmaktadır. NPLC'de olduğu gibi, HILIC şartlarında da polaritesi en yüksek analitin alıkonma süresi en fazladır. Fakat; NPLC'de su ile karışmayan organik çözücünün yerini HILIC'da su ile

karışabilen bir organik çözücü almıştır. NPLC'den farklı olarak HILIC, sadece suda çözünen bileşiklerin kromatografik analizlerini de olası kılmaktadır. Buna ilaveten; HILIC şartlarının MS ile yapılan tayinler için uygun olduğu da bilinmektedir (Guo ve Gaiki, 2005). HILIC, daha önce de kullanılmakla birlikte *hidrofilik etkileşme kromatografisi* ismi ilk defa Alpert tarafından 1990'da kullanılmaya başlanmıştır (Alpert, 1990).

Adsorpsiyon kromatografisi

Sıvı-Katı kromatografi olarak da bilinen adsorpsiyon kromatografisinde sabit faz olarak genellikle silika ve alümina kullanılmaktadır. Bu iki sabit fazın adsorpsiyon özellikleri birbirine çok benzediğinden, adsorpsiyon kromatografisinde sabit fazın seçicilik üzerinde çok fazla bir etkisi yoktur. Bu nedenle; adsorpsiyon kromatografisinde *k'* (alıkonma faktörü) ve α (seçicilik faktörü) değerlerini değiştirmek için hareketli fazın bileşimi önemli rol alır. Adsorpsiyon kromatografisinde uygun hareketli faz bileşimlerinin belirlenmesi amacıyla *çözücü gücü* (ε) olarak ifade edilen ve birim alan başına çözücünün adsorpsiyon enerjisi anlamına gelen bir indisten faydalanılır. Bu parametre, kullanılan sabit faza bağlı olarak değişebilmektedir. Analitler için kromatografik ayrılmaların uygun olduğu şartları belirlemek için biri kuvvetli (ε değeri büyük) ve diğeri de zayıf olan (ε değeri küçük) iki çözücü seçilir ve bu çözücülerin farklı oranlarda karıştırılmasıyla *k'* değerleri ayarlanır. Belirlenen *k'* değerlerinde hareketli fazda kullanılan çözücüleri değiştirerek seçicilik iyileştirilebilir.

Adsorpsiyon kromatografisi; mol kütlesi 5000'den küçük polar olmayan bileşikleri ayırmak için uygun bir yöntemdir. Söz konusu analitlerin düşük polariteye sahip olmaları nedeniyle sulu çözeltilerde çözünmesi zordur. Dolayısıyla; bu türlerin kromatografik ayırmalarında (hareketli faz olarak su ve su ile karışabilen polar çözücülerin kullanıldığı) RPLC uygun olmayacaktır.

Adsorpsiyon kromatografisi ile düşük polariteye sahip türler başarılı bir şekilde ayrılabilir ve bu amaçla hareketli faz olarak polaritesi düşük çözücü karışımları kullanılır (Skoog ve ark., 1996). Adsorpsiyon kromatografisi ile NPLC'de kullanılan sabit ve hareketli fazlar birbiriyle benzerlik göstermektedir. Bu iki uygulama arasındaki en belirgin fark, kromatografik ayırmaları gerçekleştirilen bileşiklerin polariteleridir: NPLC'de analitler polar karaktere sahip iken; adsorpsiyon kromatografisinde bileşikler düşük polariteye sahiptir. Analitler ile sabit faz arasında polar-polar etkileşmelerin etkili

olduğu NPLC'den farklı olarak; adsorpsiyon kromatografisinde analitler ile sabit faz arasındaki etkileşme şekli adsorpsiyondur.

İyon-değiştirme kromatografisi

İyon-değiştirme kromatografisinde; yapısına kovalent bağlarla bağlanmış iyonik fonksiyonel grupların bulunduğu çapraz bağlı polimerik reçineler en yaygın olarak kullanılan sabit fazlardır. Bu reçinelerdeki iyonik grupların taşıdığı yükün işaretine göre iyon-değiştirme kromatografisi; *katyon-değiştirme* ve *anyon-değiştirme* kromatografisi isimleri altında farklı şekillerde uygulanabilmektedir. İyon-değiştirme kromatografisinde kullanılan sabit fazları dört kategoriye ayırmak mümkündür:

a) Kuvvetli asidik katyon değiştiriciler ($-SO_3^-$, $-CH_2CH_2SO_3^-$ gibi fonksiyonel gruplar)
b) Zayıf asidik katyon değiştiriciler ($-COO^-$, $-CH_2COO^-$ gibi fonksiyonel gruplar)
c) Kuvvetli bazik anyon değiştiriciler ($-CH_2N(CH_3)_3^+$ gibi fonksiyonel gruplar)
d) Zayıf bazik anyon değiştiriciler ($-NH_3^+$, $-CH_2CH_2NH(CH_2CH_3)_2^+$ gibi fonksiyonel gruplar)

Kuvvetli asidik katyon değiştirici reçinelerdeki fonksiyonel gruplar yüksek iyonlaşma özelliğine sahip olduğundan, asidik çözeltilerde bile anyonik şekilde bulunabilirler. Bu özellik; kuvvetli asidik katyon değiştiricilerin asidik çözeltilerde de yüksek iyon-değiştirme kapasitesi sergilemelerine olanak tanır. Fakat; zayıf asidik katyon değiştirici reçinelerdeki fonksiyonel gruplar genellikle pH=4'ün altında protonlanır ve bu nedenle asidik çözeltilerde bu katyon değiştirici reçinelerin iyon değiştirme kapasitesi düşer.

Kuvvetli bazik anyon değiştirici reçineler genellikle kuvarterner amonyum gibi fonksiyonel gruplar içerir ve bu gruplar geniş bir pH aralığında protonlanmış şekilde bulunabilir. Bu özellikleri nedeniyle geniş bir pH aralığında yüksek anyon-değiştirme kapasitesi sergileyebilirler. Zayıf bazik anyon değiştiriciler ise ancak zayıf bazik şartlarda protonlanmış şekilde bulunabilirler ve bu nedenle bu reçineler kuvvetli bazik şartlarda düşük anyon-değiştirme kapasitesi sergiler.

İyon değiştirici bir reçinenin sergilediği seçicilik, reçinedeki fonksiyonel grupların zayıf veya kuvvetli olmasına göre değişebildiği gibi, reçinedeki çapraz bağlanma seviyesine de bağlıdır. Fakat genel bir eğilim olarak; kuvvetli asidik bir katyon değiştirici daha büyük yüke sahip bir katyona karşı daha yüksek seçicilik sergiler. Bu nedenle; iyon değiştirici bir sabit fazın türlere karşı sergilediği seçicilikte

iyonun yük/yarıçap oranı önemli bir faktördür. İyon değiştirici bir reçinenin aynı yüke sahip farklı iyonlara karşı sergilediği kapasite, hidratlaşmış çapı daha küçük olan iyon için daha yüksektir.

İyon-değiştirme kromatografisinde hareketli faz olarak genellikle sulu tampon çözeltiler kullanılır. Hareketli fazın pH'sı ve iyonik içeriği, analitlerin elüsyonunda önemli deneysel parametrelerdir.

HPLC sistemlerine uyarlanmış iyon-değiştirme kromatografisinde detektör olarak genellikle iletkenlik detektörleri kullanılır. Fakat; hareketli fazda kullanılan tampon çözeltilerde bulunan iyonik türler nedeniyle iyonik karaktere sahip analitlerin bu detektörlerle tayininde bazı güçlükler çıkmaktadır. İletkenliğe hareketli fazdan gelen katkıları minimuma indirgemek için iyon-değiştirme kromatografisinde *iyon-baskılayıcı kolonlar* kullanılmaktadır. İyon-değiştirme kromatografisi günümüzde birçok alanda uygulanan bir tekniktir (Harvey, 2000).

Ligand-değiştirme kromatografisi

Ligand-değiştirme kromatografisi (LEC), ilk defa 1961'de Helfferich (Helfferich, 1961) tarafından yazılan kısa bir makale ile duyurulmuştur. Helfferich'i bu yöntemi önermeye yönelten temel problem; 1,3-diamino-2-hidroksipropan'ı amonyak içeren sulu bir çözeltiden ayıramamasıydı. Bu problemi çözmek için; cam bir kolonu, Cu(II) amonyum kompleksi yüklenmiş bir katyon değiştirici reçine ile doldurmuş ve ardından amonyak ve diamin içeren sulu çözeltiyi kolona beslemiştir. Bu şartlarda, 1,3-diamino-2-hidroksipropan kolonda tutulmuş Cu(II) ile kompleks oluşturmuş ve böylece çözelti ortamından sabit faza geçirilebilmiştir. Daha sonra, kolonda tutulan maddeyi kolondan sıyırıp saf halde elde edebilmek için kolona sulu amonyak çözeltisi beslemiştir. Bu şekilde kolonda kompleksleşerek tutulmuş 1,3-diamino-2-hidroksipropan kolondan ayrılıp sulu faza geçmiş ve yerini amonyak molekülleri almıştır. Bu işlem süresince kolona yüklenmiş Cu(II) moleküllerinin çok az bir kısmının kolondan ayrıldığını, kolonda yer değiştiren türlerin sadece (ligand özelliğine sahip) amonyak ve 1,3-diamino-2-hidroksipropan olduğunu görmüştür. Bu nedenle; bu işleme "ligand-değiştirme (*ligand-exchange*)" ismini vermiştir (Davankov ve ark., 1988).

LEC'nin ilk uygulamalarında, (ağır) metal iyonlarını kuvvetli bir şekilde bağlayabilen gruplar içeren bir sabit faza metal iyonu yüklenerek immobilize edilmiştir. Bu işlemde, metal iyonunun orbital boşluklarına, sabit fazdaki elektron-donör özelliğe

sahip fonksiyonel gruplardan elektron aktarılır ve böylece metal iyonu ile bu gruplar arasında koordine kovalent bağlar oluşur. Bu şekilde immobilize edilen metal iyonu, elektron kabuğunu çözücü molekülleriyle tamamlar. Ligand özelliğine sahip türlerin (analit) bu çözücü molekülleriyle yer değiştirmesiyle ligand-değiştirme işlemi gerçekleşir.

LEC'de, metal iyonuyla kompleksleşme eğilimi daha yüksek olan tür kolondan daha geç elue olur. Yani; türlerin metal iyonuyla kompleksleşme eğilimlerinin farklılaşmasına göre türler kolondan ayrılır. Ligand karakterine sahip türlerin kolondan elue edilebilmeleri için hareketli fazda yine ligand karakterine sahip bir türün olması gerekir. Örneğin; su molekülleri veya amonyak bu işlevi görebilir. LEC'nin bu tür uygulamalarında, sabit faza immobilize edilmiş metal iyonlarının bir kısmı (veya tamamı), hareketli fazda kullanılan ligandların etkisiyle zaman içerisinde sabit fazdan ayrılır. Bu da, ligand-değiştirme işleminin verimini düşürür. Bu nedenle; ligand-değiştirme işlemlerinde kullanılan kolonun zaman içerisinde metal iyonu yüklenerek rejenere edilmesi gerekir. Kolondaki "metal iyonu kanamasını" minimuma indirmek (ve dolayısıyla kolonun ligand-değiştirme performansını sabit tutmak) amacıyla, ligand-değiştirme işlemleri süresince hareketli fazda sürekli olarak düşük konsantrasyonlarda metal iyonu bulundurmak, uygulanan alternatif bir yöntemdir. LEC'nin günümüzde yaygın olarak kullanılan bu uygulamasında, metal iyonu hem sabit faza koordine olmakta hem de hareketli fazda yer almaktadır. Dolayısıyla; ligand karakterine sahip türler hem sabit fazdaki immobilize metal iyonu ile hem de hareketli fazda çözünmüş halde bulunan metal iyonu ile kompleksleşebilir. Metal iyonuyla kompleks oluşturma eğilimi yüksek olan tür sabit fazdaki metal iyonuyla etkileştiği için kolondan geç elue olur. Metal iyonu ile kompleksleşme eğilimi düşük olan türler ise hem sabit fazdaki hem de hareketli fazdaki metal iyonu etkileşmeyecek ve bu nedenle kolondan hızlı bir şekilde elue olacaktır. Bu yöntemde, hareketli fazdaki metal iyonunun konsantrasyonunu değiştirerek ligand karakterine sahip türlerin *k'* değerlerini değiştirmek mümkündür. Ayrıca; LEC'nin klasik uygulamalarında olduğu gibi kolonun zaman içerisinde rejenere edilmesine de gerek kalmamaktadır.

LEC'nin yukarıda belirtilen şekillerinden hangisi kullanılırsa kullanılsın, metal iyonunun sabit faza kuvvetli bir şekilde bağlanmış olması gerekir. Bu nedenle; sabit faz olarak, metal iyonu ile kararlı kompleksler oluşturabilen fonksiyonel gruplar içeren materyaller tercih edilir. Ligand özelliğine sahip türlerin kolondan elue edilebilmesi için hareketli fazda ligand özelliğine sahip bir türün bulunması da gerekmektedir. Aksi

taktirde, sabit faza immobilize edilmiş metal iyonuna koordine kovalent bağlarla bağlanmış türler elue edilemeyecektir. Bu nedenle; hareketli faz olarak (amonyak gibi) ligand özelliğine sahip bileşiklerin çözeltileri kullanılır. Fakat; hareketli fazda kullanılan ligandın metal iyonuyla çok kararlı kompleksler oluşturması durumunda da immobilize edilmiş metal iyonu sabit fazdan ayrılıp çözelti ortamına geçecektir. Bu nedenle; hareketli fazda kullanılan ligandın metal iyonuyla etkileşme düzeyi dikkatli bir şekilde değerlendirilmelidir. Ayrıca; hareketli faza su ile karışabilen organik bir çözücünün ilave edilmesiyle, bazı türlerin LEC şartlarında sergilediği k' değerlerinin değiştirilebilmesi de mümkündür.

Boyut-eleme kromatografisi

Boyut-eleme kromatografisinde ayırma; çözünen türlerin sabit fazın gözeneklerine girebilme yetenekleri temelindedir. Küçük moleküler yapıya sahip türler sabit fazın gözenekli yapısında daha fazla alıkonulacağı için kolondan daha geç elue olacaktır. Sabit fazın gözeneklerinden önemli derecede daha küçük boyuta sahip türler kolondan eş-zamanlı olarak elue olacaktır. Boyut-eleme kromatografisinde kullanılan sabit fazlardaki fonksiyonel gruplar deaktive edilir ve böylece ayırmada sadece sabit fazın gözenekli yapısı rol alır. Ayrıca; boyut seçiciliğine sahip bir sabit fazın seçiciliği sonsuz değildir.

Boyut-eleme kromatografisi büyük moleküler yapıya sahip polimerlerin ve biyomoleküllerin hızlı bir şekilde ayrılmasında kullanılan etkili bir yöntemdir. Bu kromatografi şeklinin en önemli uygulamalarından bir tanesi de; türlerin moleküler ağırlıklarının belirlenmesidir (Harvey, 2000).

1.4. Sabit Fazların Karakterizasyonu

HPLC, birçok kimyasal türün kalitatif ve kantitatif analizinde kullanılan en popüler tekniklerden bir tanesidir. HPLC ile yapılan analizlerin verimliliğini belirleyen en önemli faktörlerden biri; kullanılan sabit fazdır. Bu nedenle; literatürde çok sayıda sabit fazın incelendiği görülmektedir. Literatürdeki sabit fazlar arasında özellikleri en çok incelenenlerin hiç kuşkusuz, yüzeyi kimyasal yollarla modifiye edilmiş silika esaslı sabit fazlar olduğu söylenebilir (Kowalska ve ark., 2006).

HPLC'de sabit faz olarak kullanılan bir materyalin ayrıma verimliliği kadar, bu sabit faz üzerinde yapılan ayırmalarda rol alan mekanizmaların da bilinmesi gerekir. Bu da çoğu zaman, kullanılan sabit fazın kapsamlı bir şekilde karakterize edilmesiyle mümkün olur. Bir HPLC kolonunun verimliliğini belirleyen en önemli faktörler; kullanılan katı destek maddesinin homojen olması ve katı destek maddesinin yüzeyine bağlanan fonksiyonel grupların yüzeyde homojen bir dağılım sergilemesidir. Bu nedenle; kullanılan katı destek maddesinin ve yüzeyi modifiye etmek için kullanılan ligandların yüksek kalitede olmaları ve fizikokimyasal özelliklerinin iyi bilinmesi gerekir (Kowalska ve ark., 2006).

Sabit fazların karakterizasyonunda yaygın olarak kullanılan teknikler; FTIR, katı-hal NMR teknikleri (ör. *magic angle spinning solid-state NMR*), floresans spektroskopisi, atomik mikroskopi, elektron mikroskopisi ve diferansiyel taramalı kalorimetri teknikleridir. Gazların katı materyallere adsorpsiyonu, katının gözenek boyutunun dağılımı ve gözenekliliği hakkında bilgi sunar. Ayrıca; elemental analiz ile sabit fazın yüzeyine bağlanan ligandların miktarını kantitatif olarak belirlemek mümkündür. Sabit fazın yüzeyine bağlanan ligand miktarının belirlenmesinde kullanılan en kolay tekniklerden bir tanesi de termogravimetrik analizlerdir. Bu analizlerde, ısıl etkiyle kütlede meydana gelen azalma, katı destek maddesinin yüzeyine bağlanan ligand miktarıyla ilişkilendirilebilir (Kowalska ve ark., 2006).

Sabit fazların karakterizasyonunda kromatografik teknikler de yaygın bir kullanım alanı bulmuştur. Bu tekniklerde; çeşitli kimyasal türlerin incelenen sabit faz üzerindeki kromatografik davranışları değerlendirilir ve böylece sabit faz kapsamlı bir şekilde karakterize edilebilir. Bu aşamada, bazı istatistiksel teknikler (ör. *temel bileşen analizi*, *faktöriyel dizayn*), sabit fazın karakterizasyonunda büyük kolaylık sağlar. Ayrıca; kimyasal türlerin çalışılan sabit faz üzerinde farklı sıcaklıklarda sergiledikleri k' değerleri, van't Hoff eğrilerinin türetilebilmesine olanak tanır. Bu eğrilerle, incelenen türlerin alıkonma özelliklerine entalpi ve entropinin katkısı kolayca değerlendirilebilir. Sabit fazları karakterize etmek için bazı maddelerin alıkonma parametrelerine dayalı deneysel testler de önerilmiştir. Kimata ve ark. (1989), urasil, tiyoüre, amilbenzen, bütilbenzen, trifenilen, o-terfenil, kafein, fenol ve benzilamin bileşiklerini; alkil zincirlerinin sayısını, hidrofobikliği, sterik seçiciliği, hidrojen bağı kapasitesi ve iyon-değiştirme kapasitesini belirlemek için kullanmıştır. Engelhardt ve ark. (1990; 1997), hidrofobikliği ve silanol aktivitesini değerlendirmek için çeşitli bileşikler önermiş ve nötral bileşiklerin alıkonmasının yüzeydeki karbon yoğunluğuna ve kimyasal olarak

bağlanmış organik ligandlardaki karbon uzunluğuna bağlı olduğunu belirtmiştir. Eğer incelenen sabit faz üzerinde anilin fenolden önce elue olmuşsa ve toluidin izomerleri birbirinden ayrılmamışsa, yüzeydeki silanol aktivitesinin düşük olduğu ve incelenen sabit fazın bazik bileşiklerin ayrılması için uygun olduğu düşünülmüştür. Literatürde daha birçok yöntemin önerildiği ve bunların büyük oranda RPLC sabit fazlarını karakterize etmek için kullanıldığı görülmektedir (detaylı bilgi için Bkz. Kowalska ve ark., 2006). Önerilen bu metotlar, incelenen kimyasal türlerin ayrılması için uygun sabit fazın belirlenmesini de kolaylaştırmaktadır.

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Hümik asitler; yapılarındaki farklı özelliklere sahip gruplar nedeniyle birçok kimyasal tür ile farklı düzeylerde etkileşebilmektedir. Hümik asidin (HA) sulu ortamda çözünebilme özelliği nedeniyle, kimyasal türlerin HA ile etkileşme türlerinin sıvı-katı ara yüzeyinde incelenmesi noktasında bir dizi güçlükle karşılaşılmaktadır. Bu ve benzeri güçlükleri bertaraf etmek ve HA'yı katı/sabit faz olarak etkin bir şekilde kullanabilmek amacıyla literatürde çeşitli yöntemler önerilmiştir. Bu yöntemler; hem kimyasal türler ile hümik asidin etkileşme özelliklerinin aydınlatılması, hem de HA'nın katı/sabit faz olarak kullanılabileceği yolların araştırılması bakımından önem arz etmektedir (Gezici, 2004; Gezici ve ark., 2005). HA'nın düşük çözünme özelliği sergileyen bir şekle dönüştürülmesi amacıyla literatürde en yaygın kullanılan metotlar; çözünürsüzleştirme (*insolubilizasyon*) ve immobilizasyondur.

Seki ve Suzuki (1995); katı haldeki HA'yı 330 ^{o}C'ta 1,0 saat süreyle ısıtarak HA'nın çözünme özelliğini azaltmışlardır. Çözünürsüzleştirme (*insolubilization*) adı verilen bu metotla elde edilen materyalin (çözünürsüzleştirilmiş hümik asit, IHA) sulu ortamda pH=10'a kadar çözünmediği görülmüştür. Çözünürsüzleştirme işleminin etkisiyle, hümik asidin yapısında bulunan asidik grupların sayısında %25'lik bir azalmanın meydana geldiği, diğer taraftan IHA'nın bazı metallerle kompleksleşme sabitinin, hümik asidin aynı metallerle olan kompleksleşme sabitlerine çok yakın olduğu görülmüştür.

Baker ve Khalili (2003; 2004); bakır, nikel ve kurşun iyonlarının sulu ortamdan giderimi için adsorban madde olarak IHA'yı kullanmıştır. Kesikli yöntemin kullanıldığı bu çalışmalarda, metal iyonlarının giderimi üzerine bazı deneysel parametrelerin etkisi incelenmiş ve bazı adsorpsiyon izotermlerinin çeşitli deneysel şartlarda elde edilen verilere uyumu değerlendirilmiştir.

Gezici ve ark. (2004; 2005; 2007); bazı metal iyonlarının sulu ortamdan sorpsiyonu için IHA'yı katı faz olarak kullanmış ve metal iyonlarının IHA ile etkileşme tiplerini kolon şartlarında değerlendirmişlerdir. Bu çalışmalarda; sorpsiyon verilerinin türetilmesi için breakthrough tekniğinden faydalanılmış olup, adsorban madde olarak kullanılan IHA, yarı-sürekli bir kolon sisteminde önce sodyum formuna dönüştürülmüştür. İncelenen metal iyonlarının (Cu^{2+} ve Ni^{2+}) katı faz ile etkileşme özellikleri adsorpsiyon izotermleriyle değerlendirilmiştir.

Çelebi ve ark. (Celebi ve ark., 2009); IHA'nın sodyum formunu kullanarak radyoaktif sezyum ve baryum iyonlarının sorpsiyon karakterini kesikli bir sistemde incelemiştir. Sorpsiyon karakteri, bazı adsorpsiyon izoterm modellerinin ışığında değerlendirilmiştir.

Kolon şartlarında yapılan ayırma işlemlerinin verimliliğinde en önemli belirleyici faktörlerden bir tanesi; kullanılan katı/sabit fazın fizikokimyasal özellikleridir. Uygun tanecik boyutu, yaygın olarak kullanılan kimyasallara karşı dayanım, yüksek seçicilik ve kapasite, kolay rejenere edilebilme, kolay temin edilebilme ve ucuzluk; katı/sabit faz olarak kullanılacak materyallerde aranan belli başlı özelliklerdendir (Gezici ve ark., 2006a; Küçükosmanoğlu ve ark., 2006).

IHA; yüksek mekanik dayanım sergilemesine karşın; parçacık boyutunun kolay ayarlanamaması, kromatografik kolonlara makul bir şekilde doldurulamaması ve (ısının etkisiyle ham HA'nın yapısında önceden bulunan bazı fonksiyonel grupların yapıdan uzaklaşmasının bir sonucu olarak) metal iyonlarına karşı görece daha düşük kapasite sergilemesi gibi dezavantajlara sahiptir. Belirtilen bu ve buna benzer mahzurlar göz önünde bulundurulduğunda, hümik asidin mekanik dayanımı yüksek bir katı destek maddesine immobilize edildiği immobilizasyon yöntemlerinin daha kapsamlı bir kullanım alanı bulabileceği düşünülmektedir (Koopal ve ark., 1998). Bu amaçla yürütülen çalışmalarda HA, yüzeyi aktifleştirilmiş silika ve çeşitli polimerik katı destek maddelerine immobilize edilmiştir.

HA'nın katı destek maddelerine immobilize edildiği ilk çalışmalara örnek olarak HA'nın anyon değiştirici reçinelere (Heitkamp ve Wagener, 1982), hematit partiküllerine (Ho ve Miller, 1985) ve alginat jellerine (Seki ve ark., 1990) adsorbe edilmesi verilebilir. Elde edilen materyaller, ağır metal iyonlarının geri kazanımında kullanılmıştır. Fakat; özellikle yüksek pH değerlerinde yüzeye adsorbe olmuş hümik asidin yüzeyden ayrılması nedeniyle, bu materyallerin rejenere edilmesinde ve tekrar kullanımında güçlüklerle karşılaşılmıştır.

Chen ve ark. (1985); HA'yı, çapraz bağlı polistiren reçinelerine immobilize etmişler ve elde edilen materyalin rejenerasyon işlemlerine dayanım gösterdiğini görmüşlerdir.

Szabo ve ark. (1990; 1992); HA'nın silika parçacıklarına adsorpsiyon ve kimyasal bağ oluşumuyla immobilizasyonunu incelemişlerdir.

Szabo ve ark. (1992) ve Bulman ve ark. (1997); HA'yı, yüzeyi diazonyum tuzuna modifiye edilmiş silikaya immobilize etmiştir. Bu metotta; HA'daki aromatik –

OH grupları, diazonyum grubunun HA'daki aromatik halkanın orto- ve para-pozisyonlarına bağlanmasına yol açmaktadır. Bu metotla elde edilmiş materyalin yüksek iep (izoelektrik noktası) değeri sergilediği görülmüştür (Eprahim ve ark., 1994). HA'nın bu metotla silika yüzeyine kimyasal olarak immobilize edilmiş olmasına karşın, çözelti ortamında önemli miktarda HA'nın yapıdan ayrıldığı görülmüştür (Eprahim ve ark., 1994).

Bulman ve arkadaşlarının (1997) kullandığı bir diğer yöntemde ise; HA, yüzeyi glutaraldehitle modifiye edilmiş silikaya immobilize edilmiştir. Bu yöntemde; silikanın yüzeyindeki aldehit grupları ile hümik asitteki azot içeren uygun fonksiyonel gruplar arasında amit bağı oluştuğu düşünülmektedir.

Koopal ve ark. (1998); stabilitesi yüksek materyaller elde etmek için HA'nın aminopropil silikaya çeşitli yöntemlerle immobilizasyonunu incelemiştir. Çalışmalarında; HA'nın aminopropil silikaya a) adsorpsiyon, b) glutaraldehit, c) *N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilkarbodiimid hidroklorür (EDC) ve d) aminopropil silikadaki $-NH_2$ grupları ile HA'daki karboksil grupları arasında amid bağı oluşumuna dayanan metotlarla immobilizasyonu incelenmiştir. HA bağlanmış materyallerin stabilitesini arttırmak için asetilleme veya kapatma (*end-capping*) adı verilen bir işlemden daha faydalanılarak, aminopropil silikanın yüzeyinde bulunan ve hümik asit ile reaksiyona girmemiş $-NH_2$ grupları kapatılmış ve zayıf olarak bağlanmış hümik asit makromoleküllerinin uzaklaştırılması sağlanmıştır. Bu metotlardan sonuncusuyla elde edilen ve asetilleme işlemine tabi tutulup saflaştırılan materyalin (yukarıda verilen diğer üç metotla elde edilenlere kıyasla) daha düşük iep değerine (iep=2,6) sahip olduğu ve bağlanan HA miktarının da (72 mgHA/gSiO_2) daha yüksek olduğu görülmüştür. Kapatma işleminin, HA immobilize edilmiş materyallerin stabilitesini önemli oranda arttırdığı sonucuna da varılmıştır. Nitekim; kapatma işlemi yapılmamış materyalden pH=11'de salınan HA oranı %3 iken, asetilleme işleminden sonra bu oranın %0,1'e kadar düştüğü bildirilmiştir. İncelenen bu dört metot arasından, en düşük stabiliteye sahip ürün glutaraldehit metoduyla elde edilmiş olup, iep değeri diğer metotlarla elde edilen materyallere kıyasla daha yüksek çıkmıştır.

Yang ve Koopal (1999); HA'nın immobilizasyonu için katı destek maddesi olarak 3-aminopropil dimetiletoksi silan ile yüzeyi aktifleştirilmiş silikayı kullanmıştır. HA'nın katı destek maddesine sulu ortamda tutunmasına dayanan bu metotta; ikinci aşamada end-capping işlemi CH_3COONa–EDC (*N*-(3-dimetilaminopropil)-*N'*-etilkarbodiimid hidroklorür) ile yapılmıştır. HA'nın bu metotla immobilizasyonu daha

basit işlemlerle gerçekleştirilmiştir. Katı destek maddesi olarak yüzeyi 3-aminopropil dimetiletoksi silan ile aktifleştirilmiş silika kullanılarak, oda sıcaklığında, HA'nın kısa bir süre zarfında immobilize edilebildiği görülmüştür. Herhangi bir kantitatif veri olmamakla birlikte, elde edilen materyalin yüksek pH değerlerinde stabil olduğu belirtilmiştir. Bu şekilde elde edilen materyal, p-nitrofenol'ün sorpsiyonunda kullanılmış ve elde edilen veriler adsorpsiyon izotermleriyle değerlendirilmiştir.

Klavins ve Eglite (2002); HA'nın aminopropil silika, epoksipropil silika, merrifield reçinesi (klorometillenmiş stiren-divinilbenzen kopolimeri) ve epoksipropil selüloz katı destek maddelerine immobilizasyonunu incelemiştir. Çeşitli immobilizasyon yöntemlerinin incelendiği çalışmada ayrıca; HA'nın bir polikondensasyon reaksiyonuyla çözünmeyen bir şekle dönüştürülmesi de incelenmiştir. Elde edilen materyallerden bazılarına p-aminobenzen ve bazı metal iyonlarının sorpsiyon özellikleri hakkında da veriler sunulmuştur.

Prado ve ark. (2003); HA'yı, yüzeyi aminopropiltrimetoksi silan (APS) ile modifiye edilmiş silikaya sulu ortamda immobilize etmiş ve indigo karmin boyasının sulu ortamdan sorpsiyonunda adsorban olarak kullanmıştır. Takip edilen immobilizasyon işleminin, HA ile aminopropil silikadaki protonlanmış amin grupları arasında hidrojen bağı oluşumu ve/veya iyonik etkileşmeler temelinde olduğu düşünülmektedir. Farklı kaynaklardan elde edilen hümik asitlerin immobilizasyonunda, katı destek maddesine 84–102 mgHA/gAPS dolayında hümik asidin immobilize olduğu görülmüştür. Çalışmada; elde edilen materyallerin çözünürlük testleri ile ilgili kantitatif veriler sunulmamıştır.

Bir diğer çalışmada Prado ve ark. (2004); yukarıdaki metotla elde edilen HA immobilize edilmiş materyallerin termogravimetrik analiz, FTIR, ^{13}C- ve ^{29}Si-CP/MAS–NMR spektroskopileri ve EDS (*energy dispersive spectrometer*) ile birleştirilmiş SEM (*scanning electronic microscopy*) ile karakterize edilmesi üzerinde durmuştur. Prado ve ark. (2005); yukarıda belirtilen yöntemle immobilize edilmiş HA esaslı materyalin bazı metal iyonlarıyla (bakır, nikel ve çinko) etkileşme özelliklerini sorpsiyon ve bazı termodinamik veriler ışığında irdelemiştir.

Klavins ve ark. (2006); bazı organik (p-aminobenzen, kristal viyole, metilen yeşili ve flavin mononükleotit) ve inorganik (Cu^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Mn^{2+} ve Cd^{2+}) türlerin HA immobilize edilmiş materyaller üzerindeki sorpsiyon özelliklerini incelemiştir. Çeşitli katı destek maddelerine (çeşitli yöntemlerle) immobilize edilmiş HA esaslı

materyallerin kullanıldığı çalışmada; sorpsiyon verileri büyük oranda kesikli yöntemle ve kısmen de kolon şartlarında türetilmiştir.

Luo ve ark. (2007); HA'yı tiyonil klorür ($SOCl_2$) ile etkileştirerek hümil klorüre dönüştürmüş ve ardından 3-aminopropiltrimetoksi silan ile modifiye edilmiş silika katı destek maddesine amid bağı oluşumu esasına göre immobilize etmiştir. Kapatma işleminin yapılmadığı çalışmada; elde edilen materyalin gözenekliliği azot adsorpsiyonu metoduna göre tayin edilmiştir. Elemental analiz ve diffuse reflectance FTIR spektroskopisi ile karakterize edilen materyal; yemeklik yağlardan benzo[a]piren'in sorpsiyonunda adsorban madde olarak kullanılmıştır. Bu amaçla; HA immobilize edilmiş materyallerden SPE (katı faz ekstraksiyon) kartuşları yapılmış ve kartuşlarda tutulan benzo[a]piren uygun bir eluent ile sıyrılarak RPLC şartlarında HPLC analizine tabi tutulmuştur. Çalışmada ayrıca; HA immobilize edilmiş materyal kromatografik kolona doldurulmuş ve benzo[a]piren için gözlenen breakthrough eğrilerinden denge adsorpsiyon verileri türetilmiştir.

Perminova ve arkadaşlarının (2007) önerdiği bir diğer metotta; leonardit kaynaklı bir HA ve hidrokinon-modifiye edilmiş HA'nın silikaya immobilizasyonu incelenmiştir. Yukarıdaki çalışmalardan farklı olarak; silika yüzeyi modifiye edilmeden, aminopropiltrimetoksi silan önce HA ile etkileştirilip alkoksisililenmiş hümik asitler elde edilmiş ve ardından silikaya immobilize edilmiştir. Elde edilen materyaller ile Np(V) ve Pu(V) türlerinin sorpsiyonu da incelenmiştir. Yüzeye immobilize edilmiş HA miktarının 240 mgHA/gSiO_2 olduğu bildirilmiştir. Bununla birlikte; elde edilen materyallerin farklı ortamlardaki stabilitesi ile ilgili kantitatif veriler sunulmamıştır.

Durmaz ve Kara (2008; 2010); bazı metal iyonlarının HPLC sisteminde, akış-enjeksiyon sisteminin yardımıyla, tayin edilmesi amacıyla immobilize hümik asidi katı faz olarak kullanmış ve bazı metal iyonlarının adsorpsiyon karakterini incelemiştir.

Kollist-Siigur ve ark. (2001); hümik (ve fulvik) asit bağlı sabit fazlar üzerinde, çeşitli deneysel parametrelerin bazı polisiklik aromatik bileşiklerin alıkonma özelliklerine etkisini incelemiş ve gözlenen özellikler, incelenen bileşiklerin *organik karbon dağılma sabiti* (K_{oc}) ile ilişkilendirilmiştir.

Casadei ve arkadaşlarının (2007) yürüttüğü bir çalışmada ise; glutaraldehit ile aktifleştirilmiş aminopropil silika kolona doldurulmuş ve ardından kolona metanol+fosfat tamponu (pH=7) (0,15/0,85; v/v) karışımında hazırlanmış 2 g/L'lik HA çözeltisi 0,50 mL/dak'lık akış hızında uzun süre yüklenmiştir. Reaksiyona girmeyen aldehit grupları ise, 2-aminoetanol ile kapatılmıştır. Bu şekilde elde edilen materyal;

fullerenlerin kromatografik ayrılmasında sabit faz olarak kullanılmıştır. HA immobilize edilmiş materyalin çeşitli ortamlardaki stabilitesi ile ilgili kantitatif verilerin sunulmadığı bu çalışmada; sabit fazın stabilitesi, C60'ın sabit faz üzerindeki alıkonma faktörünün zaman içerisindeki değişimi temelinde açıklanmaya çalışılmıştır.

Yu ve ark. (2008); immobilize HA'yı, bazı alkaloidlerin kromatografik ayrılmalarında sabit faz olarak kullanmış ve sabit fazın HILIC karakteri üzerinde yoğunlaşmıştır. Hareketli fazdaki organik çözücü oranı, hareketli fazın iyonik şiddeti ve hareketli fazdaki tamponlayıcı madde türünün kapasite faktörleri üzerine etkisinin incelendiği çalışmada, HA bağlı materyal üzerinde elde edilen k' değerlerindeki tekrarlanabilirliğin yüksek ve dolayısıyla sabit faz stabilitesinin de yüksek olduğu belirtilmiştir.

Nükleositler ve nükleobazlar; biyokimya ve eczacılık olmak üzere birçok alanda yaygın olarak kullanılan ve bu nedenle kalitatif-kantitatif analizleri büyük öneme sahip bileşiklerdir. Ayrıca; yirminci yüzyılın en büyük projelerinden biri olan insan genomlarının kodlarının çözülmesine yönelik çalışmalar da bu bileşiklerin tayinlerinin önemini bir kez daha ortaya koymuştur (Li ve ark., 2004).

Cohn (1949); 1949'da nükleotidlerin ayrılması için iyon-değişim kromatografisini önermiştir. Daha sonraki yıllarda Horvath ve ark. (1967); nükleotid analizleri için yüksek performanslı sıvı kromatografisini kullanmıştır. O günden bu yana HPLC, nükleik asitlerin ve nükleik asitlerin yapı taşlarının analizinde yaygın olarak kullanıla gelmiştir. 1980'li yılların başında ortaya çıkan (elektroforezin yeni bir şekli olan) kapiler elektroforez, nükleik asit yapı taşlarının analizine yeni bir soluk getirmiştir. Bu teknik; yüksek verimlilik, düşük numune miktarı ve hızlı olması bakımından HPLC'ye üstünlük sağlamaktadır. Bununla birlikte; kullanılan teçhizatlarda ve kolon dolgu maddelerindeki yenilikler nedeniyle HPLC, günümüzde nükleosit ve nükleobazların kalitatif ve kantitatif analizlerinde kullanılan en popüler tekniklerden biri olmaya devam etmektedir (Li ve ark., 2004).

Nükleosit ve nükleobazların kromatografik tayininde yaygın olarak kullanılan başlıca HPLC metotları; RPLC, iyon-değiştirme kromatografisi (IEC; *ion-exchange chromatography*), iyon çifti kromatografisi (IPC; *ion-pairing chromatography*) ve NPLC'dir (Li ve ark. 2004). Bu metotlar arasında en çok kullanılanı; hiç kuşkusuz RPLC'dir. Literatür araştırması; nükleosit ve nükleobazların kromatografik davranışlarının çok sayıda sabit faz üzerinde incelendiğini göstermektedir.

Literatürdeki çalışmalardan aşağıdaki sonuçlar çıkarılabilir:

- Literatürde çeşitli yöntemler olmakla birlikte; HA'nın az çözünen bir şekle dönüştürülüp HPLC'de sabit faz olarak kullanılabileceği en uygun yöntemin immobilizasyon olduğu söylenebilir.

- Yüksek stabilite gösteren bir materyal edebilmek amacıyla literatürde verilen immobilizasyon yöntemlerinden en uygun olanın ve en çok tercih edilenin; susuz ortamda yürütülen ve HA'daki karboksil gruplarıyla aminopropil silikadaki amin grupları arasında amid bağı oluşumuna dayanan (ardından kapatma işleminin yapıldığı) metot olduğu görülmektedir.

- Katı destek maddesi olarak silika esaslı materyallerin polimerik olanlardan daha yüksek fiziksel ve kimyasal dayanım sergilediği, şişme ve büzüşme özellikleri bakımından da daha elverişli olduğu anlaşılmaktadır.

- Literatürde; HA immobilize edilmiş materyallerin farklı pH değerlerinde ve çeşitli çözücü/çözelti ortamlarındaki stabilitesi ile ilgili bazı kantitatif veriler sunulmakla birlikte; bu verilerin genellikle sulu ortamda veya NaCl çözeltilerinde türetildiği görülmektedir.

- Literatürde; araştırmacıların genellikle immobilize HA'nın adsorban madde olarak kullanımı üzerinde yoğunlaştığı; HPLC'de sabit faz olarak kullanılabilirliğinin incelendiği az sayıda çalışmanın olduğu görülmektedir. Mevcut çalışmalarda da; sabit faz özelliklerinin çok dar bir kapsamda incelendiği tespit edilmiştir.

- Zaman içerisinde, immobilize HA esaslı sabit fazların, kromatografik davranışları incelenen kimyasal türlere karşı sergilediği sabit faz özelliklerindeki değişimler/eğilimler, kapsamlı bir bilimsel yaklaşımla değerlendirilmemiştir.

- İmmobilize HA esaslı sabit fazların kullanıldığı çalışmalarda, farklı kromatografik modlardaki (ör. RPLC, HILIC, LEC vs.) davranışlar kapsamlı bir değerlendirmeye tabi tutulmamıştır.

- Literatürde; HA immobilize edilmiş materyallerin LEC'de sabit faz olarak kullanıldığı hiçbir çalışmanın bulunmadığı da görülmektedir.

- Son olarak; nükleosit ve nükleobazların immobilize HA esaslı sabit fazlar üzerindeki kromatografik davranışlarının daha önce incelenmediği görülmektedir.

Günümüzde kullanılan ve ticari olarak temin edilebilen HPLC sabit fazlarıyla birçok kimyasal tür çeşitli kromatografik modlarda başarılı bir şekilde analiz edilmekle birlikte, daha yüksek seçicilik sergileyen sabit fazlara ihtiyaç duyulmaktadır. Bu noktada; kromatografi ile ilgilenen araştırmacılar arasında sabit fazların tasarlanmasına yönelik iki eğilim söz konusudur (Kowalska ve ark., 2006):

- Hidrofobik zincir içerisinde polar gruplar da bulunduran sabit fazlar
- Birçok fonksiyonel grubu bir arada bulunduran sabit fazlar

Bu çalışma; kimyasal yolla aminopropil silikaya (APS) immobilize edilmiş HA esaslı materyalin sabit faz özelliklerinin incelenmesini kapsamaktadır. Yapısında; hidrofobik, aromatik, hidrofilik, iyonlaşabilen ve hidrojen bağı yapmaya elverişli çok sayıda fonksiyonel grup bulunduran HA'nın silika yüzeyine immobilizasyonuyla elde edilecek materyalin, birçok kimyasal türe karşı yüksek seçicilik sergileyen ve farklı HPLC modlarında kullanılmaya elverişli bir sabit faz olacağı düşüncesiyle bu çalışmaya yöneldik.

İmmobilize HA'nın multifonksiyonel özelliklerini açığa çıkarmak ve sabit faz özelliklerini çeşitli HPLC modlarında kapsamlı bir şekilde inceleyebilmek amacıyla; model bileşikler olarak, sulu ortamda çözünme özelliği sergileyen ve yapısında hidrofilik, hidrofobik, elektron-donör ve iyonlaşabilen gruplar içeren bazı nükleosit ve nükleobazlar seçilmiştir. Böylece; HA immobilize edilmiş materyalin sabit faz özelliklerinin RPLC, HILIC ve LEC şartlarında aynı model bileşikler ile incelenebileceği düşünülmüştür. Yani; immobilize HA'nın, birden fazla HPLC modunda ayırmaları mümkün kılabilecek bir sabit faz özelliği sergileyebileceğini ve kromatografi ile ilgilenen tüm araştırmacıların hayallerini süsleyen "*çok fonksiyonlu sabit faz*" fikrinin hayata geçirilmesinde önemli bir çıkış noktası sunacağını düşünüyoruz.

Yapılan bu çalışma, dört ana başlık altında incelenebilir:

Birinci bölümde; saflaştırılan Aldrich hümik asit aminopropil silikaya immobilize edilmiş ve elde edilen materyal; elemental analiz, FTIR, termogravimetrik analizler, immobilize olmuş hümik asit miktarının belirlenmesi, yüzey yük özelliklerinin belirlenmesi, sıvı-katı temas açısı ölçümleri, SEM analizleri, çözünürlük testleri gibi tekniklerle/işlemlerle karakterize edilmiştir.

İkinci bölümde; uygun kromatografik kolonlara doldurulan HA esaslı sabit faz üzerinde bazı nükleosit ve nükleobazların kromatografik davranışları RPLC ve HILIC modlarında incelenmiştir. Bu amaçla; öncelikle, zaman içersinde sabit faz özelliklerinde gözlenen farklılaşmalar değerlendirilmiş ve sabit faz üzerinde tekrarlanabilir sonuçlar alınabildiği görüldükten sonra diğer kromatografik işlemler yürütülmüştür. Tek bileşenli numuneler kullanılarak yürütülen bazı denemelerde, çeşitli deneysel parametrelerin (akış hızı, hareketli fazın bileşimi, amonyak çözeltisi ve sıcaklık) kromatografik davranışlar üzerine etkisi incelenmiştir. Tek bileşenli numunelerle yürütülen denemelerden elde edilen sonuçlardan faydalanarak, çok bileşenli numuneler için kromatografik ayırmaların gerçekleştirilebileceği deneysel şartlarda bazı analizler yürütülmüştür. Türler için RPLC ve HILIC şartlarında kaydedilen ayırmalar karşılaştırılmış ve ayırmalar için olası mekanizmalar önerilmiştir. Kromatografik davranışları daha kapsamlı bir şekilde değerlendirebilmek amacıyla, farklı sıcaklıklarda hem RPLC hem de HILIC şartlarında çeşitli analizler yürütülmüştür. Bu analizlerden elde edilen verilerden, çalışılan bileşiklerin her biri için van't Hoff eğrileri türetilmiş ve bileşiklerin sabit faz ile etkileşmesinde rol alan mekanizmaların sıcaklığa bağımlılığı değerlendirilmiştir.

Üçüncü bölümde; immobilize HA esaslı sabit faz, Cu(II) ve Co(II) metal iyonları yüklenerek ligand değiştirici bir şekle dönüştürülmüş ve çalışılan türlerin sabit fazın ligand değiştirici şekli üzerindeki kromatografik davranışları incelenmiştir. Hareketli fazdaki organik çözücü yüzdesi, sıcaklık ve sabit faza yüklenen metal iyonu türü gibi deneysel parametrelerin kromatografik davranışlar üzerine etkisi kapsamlı bir değerlendirmeye tabi tutulmuş ve kaydedilen ayırmalar karşılaştırılmıştır. Elde edilen verilerden; immobilize HA esaslı materyalin farklı HPLC modlarında sabit faz olarak kullanılabilirliği, "ortogonallik" temelinde değerlendirilmiştir.

Dördüncü bölümde; belirlenen deneysel şartlarda, çalışılan türlerin immobilize HA esaslı sabit faz üzerindeki elüsyon verimliliği üç farklı HPLC modunda (RPLC, HILIC ve LEC) incelenmiştir. Bunun için; uygun bir valf sistemi kullanılarak türler için immobilize HA esaslı sabit faz ile doldurulmuş kolon üzerinde (farklı HPLC modlarında) kaydedilen pik alanları, akış-enjeksiyon yöntemiyle kaydedilen pik alanları ile karşılaştırılmıştır.

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Kimyasallar ve Çözeltiler

Deneylerde; ilgili işlemler için uygun saflıkta kimyasal maddeler kullanılmış olup; Merck, Fluka, Sigma-Aldrich ve LabScan firmalarından temin edilmiştir. Sodyum formundaki Aldrich hümik asit (NaA) uygun işlemlerle saflaştırılmış ve protonlanmış şekline (HA) dönüştürüldükten sonra immobilizasyon işleminde kullanılmıştır. Hümik asidin immobilizasyonu N,N-dimetilformamid (DMF; su içeriği≤%0,01; moleküler elek üzerinde muhafaza edilmiş; Fluka) ortamında gerçekleştirilmiş ve bu amaçla katı destek maddesi olarak, 15-35 μm parçacık ebadına sahip aminopropil silika (APS; gözenek boyutu ~9 nm; Fluka) kullanılmıştır. APS yüzeyinde HA ile reaksiyona girmemiş $–NH_2$ grupları asetilklorür (Merck) ile etkileştirilerek kapatılmıştır. Çözünürlük testlerinde; EDTA'nın (H_4Y) disodyum tuzu (Na_2H_2Y; Merck), NH_3 (Merck) ve NaCl (Merck) kullanılarak hazırlanan çözeltiler kullanılmıştır. HPLC analizlerinde; organik yürütücü faz olarak HPLC saflıkta Metanol (MeOH; LabScan) ve Asetonitril (MeCN; LabScan) kullanılmıştır. Hareketli fazdaki farklı türlerin etkisini incelemek için NH_3 (Merck), H_3PO_4 (Merck) ve CH_3COOH (Merck) kullanılarak uygun konsantrasyonlarda çeşitli çözeltiler hazırlanmıştır. Kromatografik özellikleri incelenen kimyasal türlerin (nükleositler ve nükleobazlar; Sigma) test çözeltileri MeOH ve suda hazırlanmış ve kullanılmadan önce 0,20 μm'lik naylon filtrelerden (Grace) süzülmüştür. Metanol'de güç çözünme özelliği sergileyen türlerin çözünürlüğünü arttırmak için (gerektiğinde) ortama 1 M'lık NaOH (Merck) çözeltisinden birkaç damla ilave edilmiştir. Numuneler, kullanılmadığı zamanlarda buzdolabında muhafaza edilmiştir. Çalışmalarda, TKA marka ultra saf su cihazından taze olarak temin edilen ultra saf su (Su; 0,059 μScm^{-1}) kullanılmıştır. pH ölçümleri, Jenway marka kombine pH ölçüm sistemi ile yapılmıştır.

3.2. Hümik Asidin Saflaştırılması

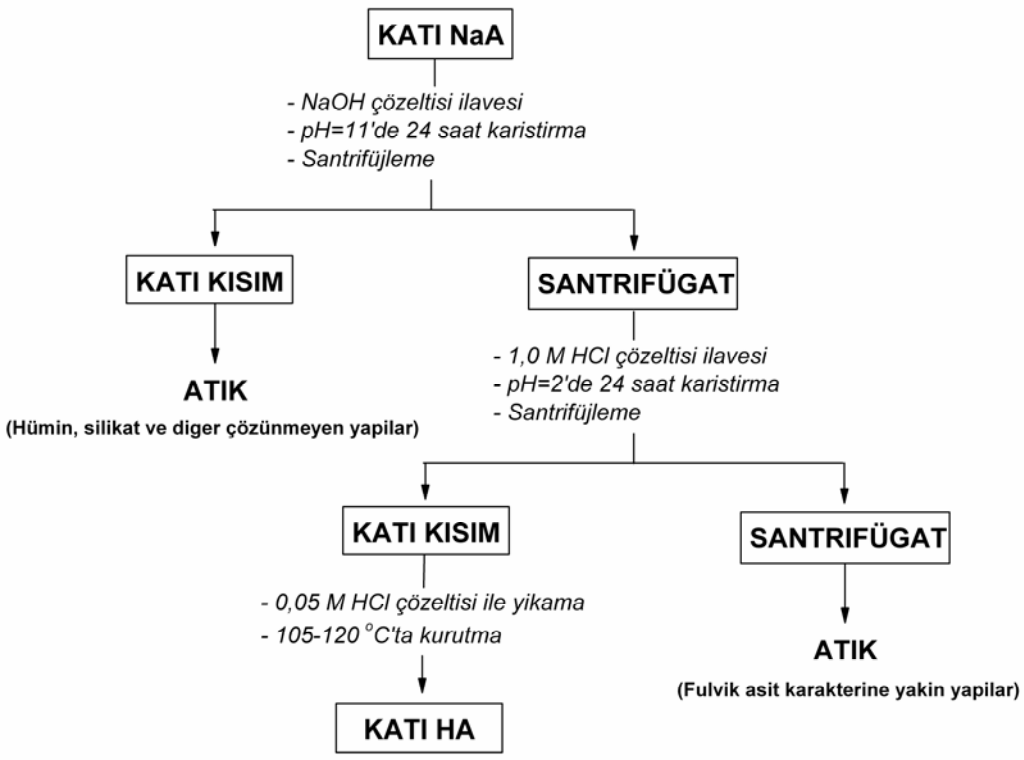
Ticari olarak temin edilebilen NaA, çözünmeyen birtakım safsızlıkların yanı sıra, fulvik asit karakterine yakın özellik gösteren ve sulu ortamda çözünme özelliği yüksek yapılar bulundurabilmektedir. Bu nedenle; immobilizasyon işleminde kullanılan NaA, kullanılmadan önce bazı ön işlemlere tabi tutularak hem protonlanmış şekline (HA) dönüştürülmüş, hem de daha saf bir hale getirilmiştir. Bu aşamada, sulu ortamda

pH=2'de çözünmeyen yapılar hümik asit olarak değerlendirilmiş ve işlemlerde bu fraksiyon kullanılmıştır. NaA'nın saflaştırılması ve HA formuna dönüştürülmesi için literatürde belirtilen (Koopal ve ark. 1998) aşağıdaki işlemler takip edilmiş olup, işlem basamakları Şekil 3.1'de şematik olarak verilmiştir:

a) *Katı haldeki NaA'nın NaOH çözeltisi ile etkileştirerek çözündürülmesi*: Bu işlemin amacı; alkalide çözünmeyen kalıntıları uzaklaştırmaktır. Bunun için yaklaşık 10 g katı HA, pH=11 olacak şekilde 1,0 L NaOH çözeltisiyle oda sıcaklığında 24 saat boyunca etkileştirilmiştir. Belirtilen süre sonunda elde edilen karışım 3000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenerek katı kalıntılar uzaklaştırılmış ve santrifügat bir sonraki aşama için saklanmıştır.

b) *NaA'nın HA'ya dönüştürülmesi*: Kullanılan hümik asidin protonlanmış bir şekilde bulunması, özellikle immobilizasyon basamağında büyük önem arz etmektedir. Çünkü; APS ile HA arasında meydana gelecek amid-bağı oluşumuna dayanan reaksiyonda, HA'daki –COOH gruplarının dissosyasyona uğramamış olması gerekmektedir. Bu amaçla; yukarıda elde edilen santrifügata pH=2 olacak şekilde 1,0 M HCl ilave edilmiş ve elde edilen asidik karışım 24 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Belirtilen süre sonunda katı halde elde edilen kısım 3000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenerek sulu fazdan ayrılmıştır. Elde edilen katı HA, 50-75 mL 0,05 M HCl ile birkaç defa yıkanarak ortamda bulunabilecek sodyum ve diğer inorganik yapıların uzaklaştırılması sağlanmıştır. Asit ile yıkama işlemi, santrifügat renksiz oluncaya kadar tekrarlanmış ve böylece, asidik ortamda çözünebilen hümik madde fraksiyonları uzaklaştırılmıştır.

c) *HA'nın kurutulması*: Bir önceki basamakta elde edilen bulamaç halindeki karışım, 105 ^{o}C'ta 4-5 saat süreyle kurutularak kullanıma hazır hale getirilmiştir.



Şekil 3.1. Aldrich hümik asidin saflaştırılmasında izlenen işlem basamakları

3.3. Hümik Asidin İmmobilizasyonu

Saflaştırılmış HA, APS'ye literatürde belirtilen metoda (Koopal ve ark., 1998) göre immobilize edilmiştir. İşlem basamakları Şekil 3.2'de verilen bu metot; HA'nın APS yüzeyine kimyasal bağ oluşumuyla bağlanmasına dayanmaktadır. Hümik asitteki –COOH grupları ile APS'deki $–NH_2$ grupları arasında amid-bağı oluşumuna dayanan bu işlem susuz ortamda gerçekleştirilmekte olup; bu amaçla çözücü olarak susuz DMF kullanılmaktadır. Ortamda su bulunduğu zaman HA, APS yüzeyine amid-bağı oluşumuna kıyasla daha zayıf olan etkileşmelerle de tutunabilmektedir. Bu nedenle; immobilizasyon işleminde moleküler elek üzerinde kurutulmuş ve argon atmosferinde muhafaza edilmiş DMF (H_2O<%0,01) kullanılmış ve reaksiyon ortamının nem kapmaması için gerekli önlemler alınmıştır. Deneysel süreçte kullanılan kaplar temizlendikten sonra DMF ile durulanarak çözünebilen safsızlıkların uzaklaştırılması sağlanmıştır.

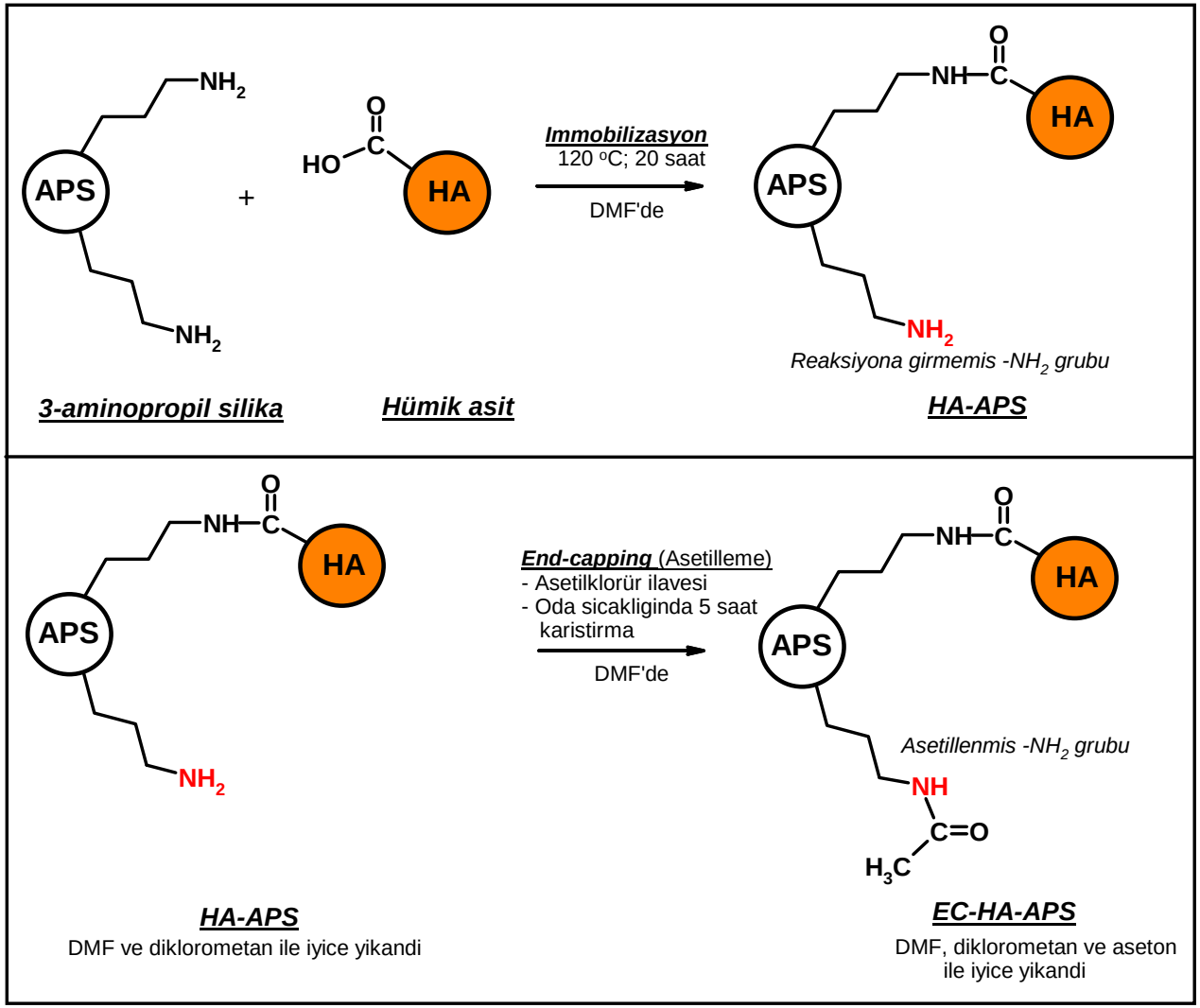
İmmobilizasyon aşamasında, APS yüzeyine immobilize edilecek HA'nın ortamda çözünmüş olarak bulunması gerekmektedir. Bu amaçla; 5,000 g HA 500 mL DMF'de çözündürülmüş ve daha sonra ortama 16,667 g kurutulmuş APS ilave

edilmiştir. Elde edilen karışım kısa bir süre karıştırıldıktan sonra reaksiyon ortamına 300 mL DMF daha ilave edilmiş ve geri soğutucu altında 120 ^{o}C'ta 22 saat süreyle karıştırılmıştır. Bu işlemden elde edilen katıyı (HA-APS) ayırmak için santrifüjleme yapılmış ve elde edilen katı, DMF ile (süzüntü renksiz oluncaya kadar) yıkanmıştır. Böylece; DMF ortamında çözünebilen ve APS'ye fiziksel olarak tutunmuş HA makromolekülleri ortamdan uzaklaştırılmıştır. DMF, kaynama noktasına yakın sıcaklıklarda bozunabilen bir özelliğe sahip olduğundan, HA-APS yüzeyinde adsorplanmış DMF, HA-APS'nin kurutulmasıyla uzaklaştırılamamakta ve bu nedenle önemli bir safsızlık kaynağı teşkil etmektedir. Bu nedenle; HA-APS sırasıyla diklorometan ve aseton ile birkaç sefer yıkanmış ve elde edilen katı kurutularak bir sonraki işlemde kullanılmak üzere muhafaza edilmiştir.

HA'nın yukarıda belirtilen yöntemle APS'ye immobilizasyonunda, APS yüzeyinde bulunan $-NH_2$ gruplarının tamamı (özellikle sterik etkilerden dolayı) HA ile reaksiyona giremediği ve işlem sonucunda yüzeyde serbest halde bulunduğu belirtilmiştir (Koopal ve ark., 1998). Bu grupların polar karakteri yüksek olup, kuvvetli hidrojen bağı yapabilme özelliğine sahiptir. Ayrıca; yüksek elektron-donör karakterleri nedeniyle bu gruplar, birçok kimyasal tür ile zayıf veya kuvvetli etkileşmelere girebilir. Dolayısıyla; reaksiyona girmemiş $-NH_2$ gruplarının, immobilizasyon işlemiyle elde edilen ürünün fizikokimyasal özelliklerini önemli ölçüde etkilemesi beklenir. Bu nedenle; $-NH_2$ gruplarının uygun bir işlem ile etkisinin azaltılması gerekmektedir. Bu amaç için literatürde (Koopal ve ark., 1998) sonlandırma, kapatma veya asetilleme (*end-capping*) diye ifade edilen kimyasal bir işlem kullanılmaktadır. Bu işlem; HA-APS yüzeyinde bulunan $-NH_2$ gruplarının asetillenerek amid yapılarına dönüştürülmesine dayanmaktadır (Bkz. Şekil 3.2). Bu amaç için en çok kullanılan reaktif, hiç şüphesiz asetik anhidrittir. Asetik anhidrit; $-NH_2$ gruplarını ılıman şartlarda verimli bir şekilde kapatabilme özelliğine sahiptir. Bu kimyasal maddenin ithalatında karşılaşılan güçlükler nedeniyle çalışmamızda, kapatma reaksiyonu için reaktif olarak asetilklorür kullanılmıştır. Asetilklorür, asetikanhidrite göre daha reaktif olduğundan, reaksiyon ortamına çok yavaş bir şekilde (karıştırılarak) ilave edilmiştir.

$-NH_2$ gruplarını kapatmak için izlenen yöntemin ana basamakları şu şekildedir: Kurutulmuş 5,000 g HA-APS 250 mL DMF'ye ilave edilmiş ve birkaç dakika karıştırıldıktan sonra elde edilen karışıma 12,5 mL asetilklorür damla damla ilave edilmiştir. Bu karışım, oda sıcaklığında 5 saat süreyle karıştırılmış ve bu süre sonunda katı madde (*end-capped* HA-APS; EC-HA-APS), santrifüjleme ile sıvı fazdan

ayrılmıştır. Asetilklorür'ün etkisi ile EC-HA-APS'den ayrışan HA yapılarını uzaklaştırmak için DMF ile (santrifügat renksiz oluncaya kadar) yıkama işlemi yapılmıştır. Daha sonra, katıda kalan DMF'yi gidermek için diklorometan ve aseton ile yıkama işlemleri sürdürülmüş ve elde edilen ürün 105 ^{o}C'ta birkaç saat süreyle kurutulmuştur. Son olarak; pH=10 olan 1,0 M sulu NaCl çözeltisiyle yıkanan EC-HA-APS tekrar 105 ^{o}C'ta birkaç saat süreyle kurutulup muhafaza edilmiştir.



Şekil 3.2. Saflaştırılmış HA'nın immobilizasyonunda izlenen işlem basamakları ve immobilizasyon için önerilen mekanizma (Koopal ve ark., 1998)

3.4. Karakterizasyon

İmmobilizasyon işlemiyle elde edilen materyalin özellikleri hakkında fikir edinmek ve immobilizasyon işleminin verimliliğini değerlendirmek amacıyla; HA, APS, HA-APS ve EC-HA-APS aşağıdaki tekniklerle/yöntemlerle karakterize edilmiştir:

a) Elemental analiz
b) FTIR analizleri
c) Potansiyometrik titrasyonlar
d) Termogravimetrik analizler
e) İmmobilize olmuş HA miktarının belirlenmesi
f) Yüzey yük özelliklerinin belirlenmesi
g) Katı-sıvı temas açısı ölçümleri
h) SEM analizleri
i) Çözünürlük testleri
j) Metal bağlama özelliklerinin incelenmesi

3.4.1. Elemental analiz

HA, APS, HA-APS ve EC-HA-APS için elemental analizler Orta Doğu Teknik Üniversitesi (O.D.T.Ü.) AR-GE Eğitim ve Ölçme Merkezi'nde yaptırılmıştır. Elemental analiz ile HA'nın yapısında bulunan C, H, N ve S kükürt elementlerinin oranı tayin edilmiş; O elementi miktarı ise C, H, N, S, kül ve nem oranlarının toplam kütleden çıkarılmasıyla hesaplanmıştır. APS, HA-APS ve EC-HA-APS için Si elementinin oranı belirlenmediğinden, sadece C, H, N ve S elementlerinin oranı belirlenmiştir. Analizlerde; LECO CHNS-932 cihazı kullanılmış olup, elementlerin oranlarında gözlenen değişimler immobilizasyon işlemiyle ilişkilendirilmiştir.

3.4.2. FTIR analizleri

Hümik asidin makromoleküler yapısında bulunan fonksiyonel gruplar hakkında fikir edinebilmek; immobilizasyon ve kapatma işlemlerinin etkisiyle APS'deki yapısal değişimleri değerlendirebilmek amacıyla HA, APS, HA-APS ve EC-HA-APS için FTIR analizleri yürütülmüştür. Analizlerde Perkin-Elmer marka (Spectrum 100 model) FTIR

spektrofotometresi kullanılmış olup; spektrumlar, KBr ile pelet oluşturmadan kaydedilmiştir.

Cu(II) ve Co(II) iyonlarının EC-HA-APS'ye bağlanma karakterini değerlendirmek amacıyla *Cu*-EC-HA-APS ve *Co*-EC-HA-APS için de FTIR analizleri yürütülmüştür. Bunun için; 0,1 g EC-HA-APS, 0,1 M'lık $Cu(NO_3)_2$ ve $CoCl_2$ çözeltilerinin 20 mL'lik ayrı kısımlarına ilave edilmiş ve karışım 2 saat süreyle oda sıcaklığında karıştırılmıştır. Daha sonra, katı kısım süzülmüş ve süzüntüde metal iyonu kalmayıncaya kadar Su ile yıkanmıştır. 110 ^{o}C'ta 2 saat süreyle kurutulan *Cu*-EC-HA-APS ve *Co*-EC-HA-APS katıları için FTIR spektrumları, yukarıda belirtilen cihaz ile KBr peletleri oluşturmadan kaydedilmiştir.

3.4.3. Potansiyometrik titrasyonlar

Direk titrasyonun sağladığı avantajlar nedeniyle, çalışmalarımızda bu metot kullanılmıştır. Deneylerde, titrant olarak ayarlı NaOH çözeltisi (~0,100 M) kullanılmış ve aynı gün içerisinde en az iki farklı zaman diliminde (ve her zaman diliminde de 3 tekrar titrasyonunun ortalaması alınacak şekilde) ayarlanarak kullanılmıştır. Titre edilecek hümik asitten 0,0250 g tartılmış ve belirli konsantrasyona sahip NaCl çözeltilerinin 25'er mL'sine ilave edilmiştir. Elde edilen karışım, dengeye gelmesi için bir süre karıştırılmış ve kombine pH elektrodu yardımıyla okunan potansiyel değeri kaydedilmiştir. Daha sonra, her ~0,050 (±0,006) mL'lik titrant ilavesinden sonraki pH değişimleri dikkatli bir şekilde kaydedilmiştir. Denge şartlarının oluşabilmesi için pH okumaları, titrant ilavesinden 15-30 s sonra yapılmış ve pH metrede 10 s sabit kalan bir değer kaydedilmiştir. Özellikle bazik şartlarda, havanın karbondioksitinden kaynaklanabilecek hataları önlemek için pH okumalarında bu süre çok fazla uzatılmamıştır.

Hümik asit için potansiyometrik titrasyonlar, NaCl bakımından 0,01; 0,05 ve 0,10 M çözeltilerin kullanıldığı ortamlarda yapılmıştır. Su için K_{su} değeri, çalışılan her bir iyonik şiddet için deneysel olarak belirlenmiş ve bunun için ayarlı asit-baz çözeltileri (HCl ve NaOH; ~0,10 M) kullanılmıştır. pH elektrodu, 4,01; 7,00 ve 10,00 tamponlarıyla dikkatli bir şekilde kalibre edilmiştir.

3.4.4. Termogravimetrik analizler

Saflaştırılmış HA'da ısıl işlemle meydana gelebilecek yapısal değişiklikler hakkında fikir edinmek ve içerdiği kül miktarını tayin etmek amacıyla termogravimetrik (TGA) ve diferansiyel termogravimetrik analizler (DTGA) yürütülmüştür. Analizlerde; TGA Q5000 V3 10 Build 258 cihazı kullanılmış; termogramlar (TG) ve diferansiyel termogramlar (DTG) 40–1100 ^{o}C aralığında kaydedilmiştir. Analizler; dakikada 10 ^{o}C'luk sıcaklık artışları olacak şekilde, 60 mL/dak'lık dinamik hava atmosferi altında Al_2O_3 tabakları kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

İmmobilizasyon ve asetilleme işlemlerinin etkisi hakkında daha kapsamlı veriler edinmek amacıyla APS, HA-APS ve EC-HA-APS için de TGA ve DTGA analizleri yürütülmüştür. Termogravimetrik analizlerle; APS'ye immobilize edilmiş HA miktarı hakkında da fikir edinilmiş olup; analizler, yukarıda belirtilen cihaz ve şartlarda yürütülmüştür.

3.4.5. İmmobilize olmuş HA miktarının belirlenmesi

APS'ye immobilize olmuş HA makromoleküllerinin miktarı, üç farklı teknikle belirlenmiş ve elde edilen değerler birbiriyle karşılaştırılmıştır:

a) Spektrofotometrik (UV-Vis.)
b) Termogravimetrik
c) Elemental analiz

Spektrofotometrik yöntemde; bilinen miktarlarda HA-APS ve EC-HA-APS katıları 5,0 M'lık sulu NaOH çözeltisi ile 80 ^{o}C'ta 6 saat süreyle karıştırılarak etkileştirilmiştir. Bu bazik şartlar altında, APS yüzeyine hem zayıf etkileşmelerle hem de kimyasal bağ ile bağlanmış HA makromoleküllerinin APS yüzeyinden ayrılarak sulu ortama geçtiği düşünülmektedir (Koopal ve ark., 1998). Belirtilen süre sonunda sulu ortama geçen HA miktarı, APS yüzeyine immobilize olmuş HA miktarı olarak değerlendirilmiş ve bu miktar, UV-Vis. Spektrofotometresi (Shimadzu 1700) ile 410 nm'de belirlenmiştir. Ölçümlerde kullanılan standart çözeltiler, hümik asit immobilize edilmiş materyallere uygulanan prosedürün aynısı izlenerek hazırlanmıştır. Ölçümlerden önce kalibrasyon amacıyla kullanılan standart çözeltilerin ve numunelerin pH'sı 10,5 olacak şekilde ayarlanmıştır.

Termogravimetrik yöntemde ise hesaplamalar; APS, HA-APS ve EC-HA-APS katıları için kaydedilen termogramlardan yola çıkarak yapılmıştır. Bunun için termogramlardan hesaplanan kül miktarlarındaki farklılaşmalar temelinde bir yaklaşıma gidilmiştir.

Elemental analiz temelinde yapılan hesaplamada ise; C ve N elementlerinin oranı (C/N) kullanılmıştır. HA, APS ve EC-HA-APS için C/N oranlarından immobilize olmuş HA miktarı kolayca hesaplanmıştır.

3.4.6. Yüzey-yük özelliklerinin belirlenmesi

Adsorban veya sabit faz olarak kullanılacak materyallerin yüzeylerinde net bir yükün bulunmadığı ve "sıfır yük noktasına karşılık gelen pH (pH_{pzc})" olarak ifade edilen özelliğin incelenmesi, sabit faz ile analit arasındaki etkileşmeleri değerlendirme bakımından çok önemlidir. pH_{pzc}; katının yüzeyindeki (+) yüklerin toplamı ile (-) yüklerin toplamının birbirlerini tam olarak dengelediği anda katı taneciklerinin etrafını saran sıvının pH değerine karşılık gelen bir niceliktir. Özellikle; iyonik ve iyonlaşabilen kimyasal türlerin sabit faz ile etkileşme karakterini mâkul bir şekilde yorumlayabilme noktasında, kullanılan sabit fazın pH_{pzc} değeri önemli bilgiler sunmaktadır. Aşağıdaki üç durum, pH_{pzc} değeri ile ortamın pH değeri arasındaki ilişkiyi açıklamaktadır (Reymond ve Kolenda, 1999; Gezici ve ark., 2006b):

a) $pH < pH_{pzc}$: Eğer ortamın pH değeri sabit fazın pH_{pzc} değerinden küçükse, sabit fazın yüzeyi gözlenebilen net bir pozitif yükle yüklenmiştir,
b) $pH > pH_{pzc}$: Eğer ortamın pH değeri sabit fazın pH_{pzc} değerinden büyükse, sabit fazın yüzeyi gözlenebilen net bir negatif yükle yüklenmiştir,
c) $pH = pH_{pzc}$: Eğer ortamın pH değeri sabit fazın pH_{pzc} değerine eşitse, sabit fazın yüzeyinde gözlenebilen net bir yükten söz edilmez.

Bu durumları göz önünde bulundurduğumuzda; örneğin, katyonik bir kimyasal türün durum "a" için sabit fazın yüzeyindeki net pozitif yükten dolayı itileceği söylenebilir. Diğer taraftan, "b" durumu için katyonik tür, sabit fazın yüzeyindeki net negatif yük nedeniyle, sabit faz tarafından iyonik kuvvetlerin etkisiyle çekilecektir. Sabit faz ile katyonik tür arasında iyonlaşmaya yol açacak herhangi bir reaksiyon yoksa,

"c" durumu için sabit faz ile katyonik tür arasında (pratik olarak) herhangi bir iyonik etkileşmeden söz edilemeyeceği söylenebilir.

Bir adsorban veya sabit faz için pH_{pzc} değeri deneysel olarak belirlenir. "pH değişimi *(pH drift)*" ve "kütle titrasyon *(mass titration)*" (Schwarz ve ark., 1984; Noh ve Schwarz, 1989; Reymond ve Kolenda, 1999; Gezici ve ark., 2006b) metotları literatürde bu amaçla yaygın olarak kullanılan metotlardandır. Birinci metotta; sabit fazın eşit miktarları, farklı pH değerlerine sahip ayrı sulu ortamlara ilave edilir ve elde edilen karışım (dengeye gelmesi için) yaklaşık 24 saat süreyle karıştırılır. Özellikle havadaki karbondioksitten gelebilecek hataları düzeltmek için aynı şartlarda şahit numuneler hazırlanır (bu karışımlara katı materyal ilave edilmez). Karışım dengeye geldikten sonra sulu fazın pH değeri ölçülür (pH_{son}) ve ilk pH değeri (pH_{ilk}) ile arasındaki ilişkiyi yorumlamak için bazı grafik tekniklerine başvurulur. Bu tekniklerden birinde pH_{son}, pH_{ilk} değerine karşı grafiğe geçirilir ve elde edilen eğride $pH_{son} = pH_{ilk}$ olan nokta pH_{pzc} olarak değerlendirilir. Bu teknikle çalışırken, genellikle grafik üzerinde eğri ile birlikte bir doğru çizilir ve bu doğru ile eğrinin kesiştiği nokta pH_{pzc} olarak ifade edilir. Diğer bir teknikte ise, ΔpH değeri ($pH_{son} - pH_{ilk}$) hesaplanır ve pH_{ilk} değerine karşı grafiğe geçirilir. Elde edilen eğride $\Delta pH=0$ olan nokta pH_{pzc} olarak ifade edilir. Bununla birlikte; bazen $\Delta pH=0$ yerine, ΔpH'nın sıfıra en yakın olan değerine karşılık gelen pH_{ilk} değeri pH_{pzc} olarak değerlendirilir. Daha doğru sonuçlar elde etmek için bu çalışmada, veri noktaları uygun bir polinomal denkleme grafik programı (OriginPro 7.5) kullanılarak uydurulmuş ($r^2 > 0,999$) ve pH_{pzc} değerini bulmak için polinomun karşılık geldiği eğrinin pH_{ilk} eksenini kestiği nokta ($\Delta pH=0$) tespit edilmiştir. Yürütülen deneylerde, işlemlerin gerçekleştirildiği cam tüplerin yüzeylerindeki iyonlaşmadan kaynaklanabilecek hataları azaltmak için şöyle bir yöntem izlenmiştir: pH'sı ayarlanan sulu çözelti deney tüplerine ilave edilmiş ve sabit faz ilave edilmeden önce 24 saat süreyle çalkalanmıştır. Bu süre sonunda, tüpteki çözeltinin pH değeri okunmuş ve pH_{ilk} olarak kaydedilmiştir.

Kütle titrasyon metodunda ise; katı/süspansiyon oranı (%w/w) 0,01; 0,10; 1,00; 5,00; 10,00; vb. olacak şekilde değiştirilir ve içeride hava kalmayacak şekilde ağzı iyice kapanabilen tüplere konulur. Sistemin dengeye gelmesi için yaklaşık 24 saat kadar tüpleri çalkalamak gerekir. Bu süre sonunda sıvı fazın pH değeri ölçülür ve %w/w değerlerine karşı grafiğe geçirilir. Elde edilen eğrinin dikleştiği ve yataylaştığı kısımlarında çizilen asimptotların kesiştiği noktaya karşılık gelen pH değeri, pH_{pzc} olarak ifade edilir. Uygun bir denklemin elde edilen verilere grafik programı ile

uydurulmasıyla da bu değeri hesaplamak mümkündür. Örneğin; $y=a-bc^x$ türü bir asimptotik denklem veri noktalarına uydurulduğunda APS için pH_{pzc}=9,8 olarak bulunmuştur (Şekil 4.1; r^2=0.997).

Günümüzde, adsorban ve sabit fazların yüzey yük özelliklerini belirlemek için elektroforetik tekniklerden yaygın bir şekilde faydalanılmaktadır. Bu tekniklerle bulunan değerler sabit fazın "izoelektrik noktası (iep)" olarak ifade edilir ve teorik olarak pH_{pzc} değerinden farklıdır. iep değerleri ilgili sabit fazın yüzey yük özellikleri hakkında daha kapsamlı bilgiler sunmakla birlikte, pH_{pzc} değerlerinin de pratikte kullanışlı bilgiler sunduğunu belirtmek gerekir.

Yüzey yük özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yürütülen tüm deneyler 0,01 M NaCl çözeltisi ortamında yürütülmüş ve pH ölçümlerinde kullanılan pH ölçüm sistemi, ölçümlerden önce dikkatli bir şekilde kalibre edilmiştir.

3.4.7. Katı-sıvı temas açısı ölçümleri

İmmobilizasyon işleminin etkisiyle yüzeyin ıslanabilme karakterinde meydana gelen değişiklikleri değerlendirmek amacıyla APS, HA, HA-APS ve EC-HA-APS için temas açısı (*contact angel*) ölçümleri yapılmıştır. Sıvı faz olarak saf Su ve Metanol'ün kullanıldığı ölçümler, KSV (CAM 200 model) optik temas açısı ölçüm cihazı ile yürütülmüştür. Temas açısı ölçümlerinde, 10 bar'lık bir basınç altında pelet haline getirilen katıların her birinin yüzeyine 2-6 µL sıvı damlatılmış ve gözlenen damla görüntüleri 5-10 saniye içerisinde kaydedilmiştir. Bu görüntüler, kullanılan cihazın yazılımı tarafından Young-Laplace eşitliği temelinde değerlendirilmiş ve temas açıları hesaplanmıştır.

3.4.8. Taramalı elektron mikroskopisi (SEM) analizleri

APS, HA-APS ve EC-HA-APS'nin partikül büyüklüğü ve şekli hakkında bilgi edinmek amacıyla SEM (*scanning electron microscopy*) analizleri yapılmış ve her bir katı için SEM görüntüleri değerlendirilmiştir. SEM görüntüleri ZEISS marka (EVO LS 10 model) cihaz ile $5x10^{-7}$ atm'lik vakum altında LaB_6 (Lantanium hegsaborait) lamba ile alınmış ve görüntülerin alınmasında karbon plakalar kullanılmıştır.

3.4.9. Çözünürlük testleri

EC-HA-APS'nin HPLC'de sabit faz olarak kullanılabilmesi için yüzeye immobilize edilmiş HA makromoleküllerinin ortam şartlarına bağlı olarak yüzeyden ayrılmaması gerekmektedir. İmmobilizasyon ve kapatma işlemlerinden sonra elde edilen EC-HA-APS, çeşitli organik çözücülerle (ör. DMF, diklorometan ve aseton) ve pH=10 olan 1,0 M sulu NaCl çözeltisiyle yıkanmıştır. Bu şekilde saflaştırılan EC-HA-APS'nin, sulu ortamda, çeşitli pH değerlerindeki çözünme özelliklerini incelemek amacıyla, belirli miktarlarda (~0,025 g) EC-HA-APS, pH=7–11 aralığında farklı pH değerlerine sahip sulu 0,01 F Na_2H_2Y+0,01 F NH_3 karışımının 25 mL'si ile 72 saat süreyle etkileştirilmiştir. Katı fazdan ayrılan HA miktarını belirlemek için sulu faz UV-Vis. spektrofotometresi (Shimadzu 1700) ile analiz edilmiştir. Farklı pH değerlerindeki muhtemel çözünme eğilimlerini makul bir şekilde değerlendirebilmek için yukarıda belirtilen işleme tabi tutulan katı EC-HA-APS kısımları saf su ile durulandıktan sonra aynı pH değerlerine sahip taze 0,01 F Na_2H_2Y+0,01 F NH_3 çözeltisi ile ikinci bir 72 saatlik etkileşmeye tabi tutulmuştur. Çözelti ortamına geçen HA miktarını tayin etmek için elde edilen sulu çözeltilerin pH değerleri 10,5'e ayarlanmış ve UV-Vis spektrofotometresi ile 410 nm'de absorbans değerleri ölçülmüştür.

EC-HA-APS'nin stabilitesi, pH değeri 7–10 aralığında değişen 0,01 M NaCl çözeltilerinde de değerlendirilmiştir. Bu amaçla; EC-HA-APS, farklı pH değerlerine sahip 0,01 M NaCl çözeltileriyle 72 saat süreyle etkileştirilmiş ve bu süre sonunda sulu faza geçen HA miktarı spektrofotometre ile 410 nm'de belirlenmiştir.

3.4.10. EC-HA-APS'nin metal bağlama özelliklerinin incelenmesi

EC-HA-APS'nin Cu(II) ve Co(II) iyonlarıyla etkileşme özelliklerini değerlendirmek amacıyla her bir metal iyonu için denge sorpsiyon verileri basamaklı frontal analiz (*Stepwise Frontal Analysis*; SFA) metoduyla türetilmiştir. Bunun için metal iyonlarının $Cu(NO_3)_2$ ve $CoCl_2$ çözeltileri kullanılmış ve elde edilen sorpsiyon verileri Scatchard (Scatchard, 1949) eğri analizine tabi tutulmuştur. Scatchard eğri analizi ile metal iyonlarının EC-HA-APS'ye bağlanmasında rol alan spesifik etkileşmeler ve bu etkileşmelerin ilişkili olabileceği mekanizmalar değerlendirilmiştir. Metal iyonu çözeltisi kolona 0,50 mL/dak'lık akış hızında beslenmiş olup, işlemler süresince sıcaklık 25 ^oC'ta sabitlenmiştir. Metal yükleme işlemi, HPLC sisteminde,

işlemler arasında herhangi bir kesiklik olmadan yürütülmüş; Cu(II) ve Co(II) için sinyaller 595 ve 507 nm dalga boylarında kaydedilmiştir.

SFA metoduna göre kolona yüklenen metal iyonlarının bağlanma stabilitesini değerlendirmek amacıyla, çeşitli hareketli fazlarla etkileştirildikten sonra kolondan ayrılan metal iyonu miktarı atomik absorpsiyon spektrofotometresi (AAS; UNICAM 929 model) ölçümleri ile belirlenmiştir.

EC-HA-APS'ye bağlanan metal iyonlarının 0,1 F Na_2H_2Y+0,1 F NH_3 (pH=7,5) karışımı ile sıyrılma verimliliğini değerlendirmek amacıyla; belirtilen karışım, metal iyonu yüklenmiş kolona 0,50 mL/dak'lık akış hızında beslenmiş ve detektörde gözlenen pik için taban çizgisi (base-line) gözleninceye kadar kolondan sıyrılan metal iyonları toplanmıştır. Toplanan bu kısımlar, AAS ölçümlerine tabi tutulmuş ve sıyrılan metal iyonu miktarı belirlenmiştir. Metal iyonu besleme aşamasında kolonda tutulan metal iyonu miktarı ilgili breakthrough eğrilerinden hesaplanmış ve hesaplanan değerler (q_B) 0,1 F Na_2H_2Y+0,1 F NH_3 (pH=7,5) karışımıyla sıyrılan metal iyonu miktarıyla (q_{AAS}) karşılaştırılmıştır. Her bir metal iyonu için % sıyırma verimi (% *SV*) aşağıdaki eşitlikle hesaplanmıştır:

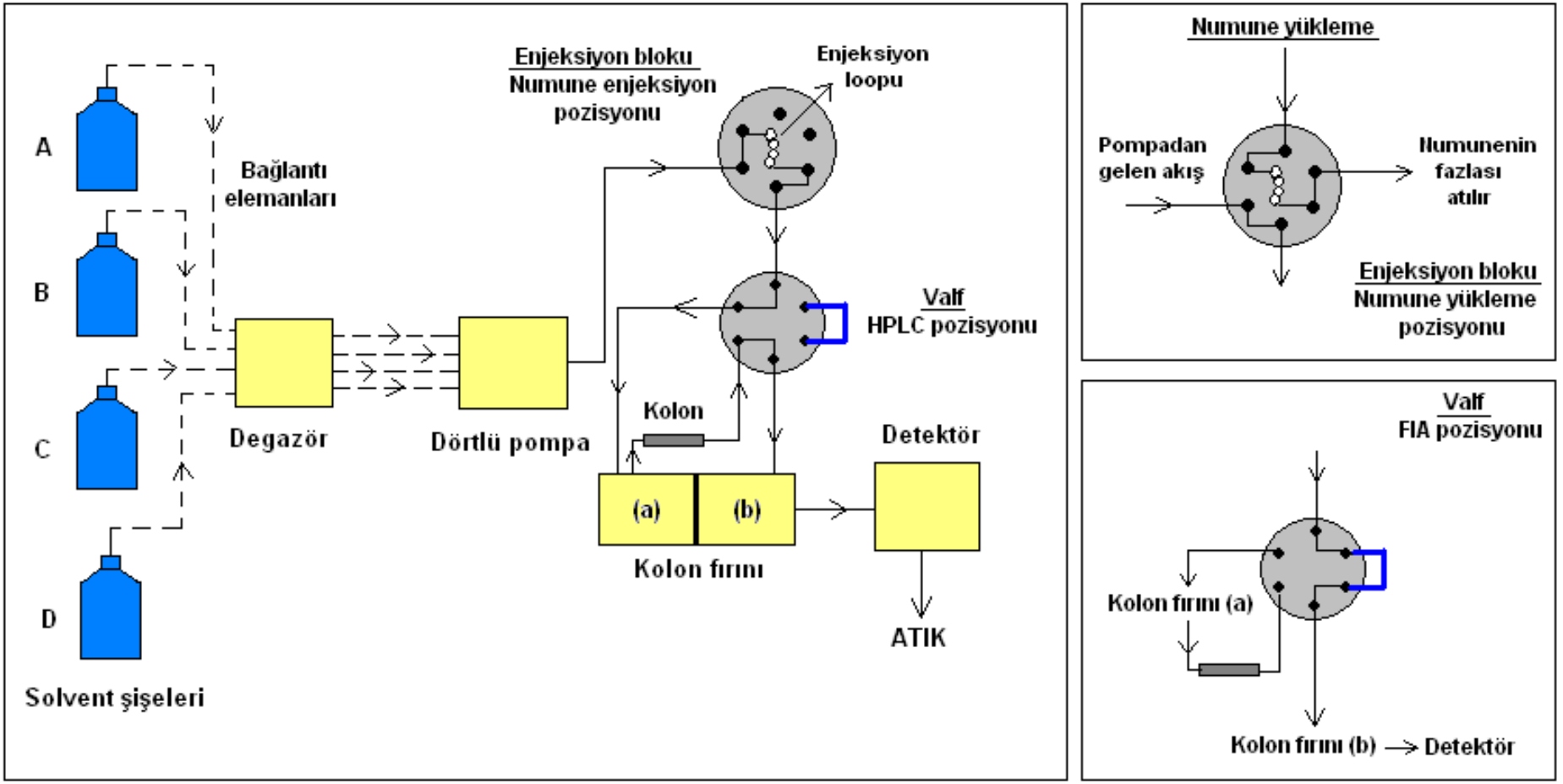
$$\% SV = \frac{q_{AAS}}{q_B} \times 100$$

3.5. Kullanılan HPLC Sistemi

İşlemlerde, Şekil 3.3'te şematik olarak gösterilen HPLC sistemi (Agilent 1100 model) kullanılmıştır. Degazörlü (G1379A) dörtlü pompa (G1311A), termostatlı kolon kompartımanı (G1316A), dalga boyu değiştirilebilir detektör (G1314A; 190-600 nm) ve manuel enjektör bloğundan (Rheodyne 7725i) oluşan bu sistemde, numune enjeksiyonu için belirli bir hacme sahip laboratuar yapımı enjeksiyon loopu (2 µL) kullanılmıştır. Kolon fırınına monte edilen bir valf ile sistem, gerektiğinde bir akış-enjeksiyon analiz (*flow-injection analysis*; FIA) sistemi olarak da kullanılabilmiştir (Bkz. Şekil 3.3). Sinyaller, Chemstation 2001 yazılımı ile kaydedilip değerlendirilmiştir.

Sabit faz olarak kullanılan EC-HA-APS, ticari olarak temin edilebilen ve paslanmaz çelikten imal edilmiş HPLC kolonlarına yüksek basınç altında bir "slurry packer" kullanılarak doldurulmuştur. Bu amaçla; EC-HA-APS su ile karıştırılarak bulamaç haline getirilmiş ve yüksek basınç altında çalışabilen pompa vasıtasıyla kolona

doldurulmuştur. İşlemlerde; 4,6x100 ve 4,6x150 (*iç çap* x *uzunluk*; mm ölçülerinde) ebadında kolonlar kullanılmıştır. Kolonlar doldurulduktan sonra 0,1 F Na_2H_2Y+0,1 F NH_3 karışımı (pH=7,5), Su ve MeOH ile bir süre şartlandırıldıktan sonra kullanılmış ve kullanılmadığı zamanlarda ise MeOH-Su ortamında muhafaza edilmiştir. Kromatografik işlemlerde kullanılan yürütücü fazlar ve çözeltiler 0,20 μm'lik naylon filtrelerden süzüldükten sonra kullanılmıştır.



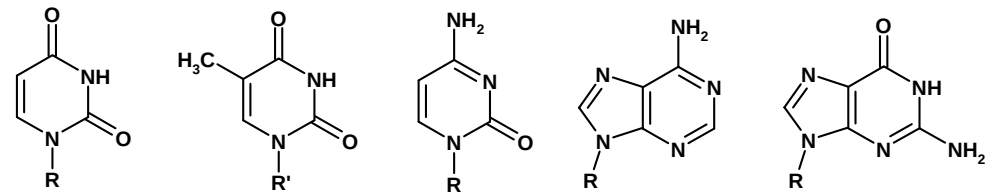
Şekil 3.3. Kullanılan HPLC sisteminin şematik gösterimi

3.6. Kromatografik İşlemler ve Akış Enjeksiyon Analizleri

Küçük moleküler yapıları ve polar karakterleri nedeniyle RPLC şartlarındaki kromatografik ayırmalarında bazı güçlüklerle karşılaşılan nükleosit ve nükleobazların kromatografik davranışlarını immobilize hümik asit esaslı bir sabit faz üzerinde incelemenin ilginç olacağı düşünülmüştür. Ayrıca; immobilize hümik asit esaslı sabit fazın multifonksiyonel özelliklerinin açığa çıkarılması bakımından da bu bileşiklerin faydalı olacağı düşünülmüştür. Bu noktadan hareketle; bu çalışmada kromatografik davranışları incelenecek 10 tane nükleosit ve nükleobaz seçilmiş olup, bu bileşiklerin bazı özellikleri Şekil 3.4'te verilmiştir.

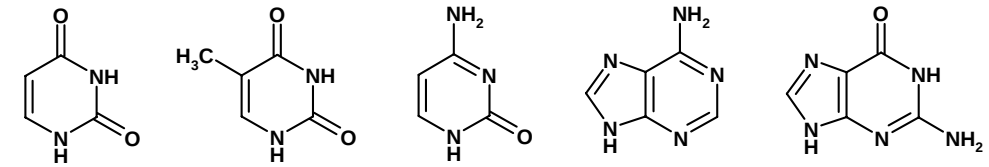
İmmobilize hümik asidin önce EC-HA-APS şekli kullanılarak sabit faz özellikleri ters-faz sıvı kromatografisi (RPLC) ve hidrofilik etkileşme kromatografisi (HILIC) şartlarında değerlendirilmiştir. Çalışmaların diğer bir bölümünde ise; EC-HA-APS, Cu(II) ve Co(II) iyonları yüklenerek *Cu*-EC-HA-APS ve *Co*-EC-HA-APS şekillerine dönüştürülüp ligand-değiştirme kromatografisi (LEC) şartlarındaki kromatografik davranışlar değerlendirilmiştir. Böylece; immobilize hümik asidin metal iyonu yüklenmemiş (EC-HA-APS) ve metal iyonu yüklenmiş (*M*-EC-HA-APS) şekillerinin nükleositler ve nükleobazlara karşı sergilediği sabit faz özellikleri kapsamlı bir şekilde değerlendirilmiştir. İncelenen sabit faz, her denemeden önce (aksi belirtilmediği sürece) detektörden sabit bir sinyal elde edilinceye kadar (base-line) ilgili hareketli faz bileşimi ile şartlandırılmıştır.

(a)



	Uridin (Urd)	Timidin (Tyd)	Sitidin (Cyd)	Adenosin (Ado)	Guanosin (Guo)
p*Ka1*	9.3	9.8	4.15 [a]	3.5 [a]	1.5 [a]
p*Ka2*	12.5	12.85	12.5	12.5	9.2

(b)



	Urasil (Ura)	Timin (Thy)	Sitosin (Cyt)	Adenin (Ade)	Guanin (Gua)
p*Ka1*	9.5	9.9	4.45	4.15	3.2
p*Ka2*	-	-	12.2	9.8	9.6

Şekil 3.4. Çalışılan nükleosit ve nükleobazlar için pK_a değerleri (Li ve ark., 2004)

[a] $-NH_2$ grubunun protonlanmasına ilişkin pK_a değeridir.
[b] R: ribosil; R' : deoksiribosil

3.6.1. RPLC ve HILIC şartlarında yürütülen analizler

EC-HA-APS'nin RPLC ve HILIC şartlarındaki sabit faz özelliklerinin belirlenmesi amacıyla yürütülen çalışmalar; 4,6x100 mm ölçülerinde bir kromatografik kolon üzerinde yürütülmüştür. Deneysel parametrelerin etkisini incelemek için önce tek bileşenli numunelerle bazı analizler yürütülmüş ve kaydedilen piklerden, kromatografik kapasite faktörleri (*k'*) hesaplanmıştır. *k'* değerlerindeki farklılaşmalar, incelenen deneysel parametrelerin etkisiyle ilişkilendirilmiştir. Etkisi incelenen deneysel parametreleri şu şekilde sıralamak mümkündür:

- Akış hızı
- Hareketli fazın bileşimi (hareketli fazdaki organik çözücü ve Su oranı)
- Hareketli fazdaki farklı pH değerlerine sahip amonyak çözeltisi
- Sıcaklık
- Kolonun ön şartlandırılmasında kullanılan hareketli faz bileşimi

Tek bileşenli numunelerle yürütülen analizlerden elde edilen sonuçların ışığında, çalışılan nükleosit ve nükleobazlar için kromatografik ayırmaların mümkün olduğu şartlarda çok bileşenli numuneler kullanılarak analizler yürütülmüştür. Bazı türlerin kromatografik ayırmaları, iki seviyeli ve iki değişkenli tam bir faktöriyel dizayn (2^2) temelinde optimize edilmiştir. Nükleositler için kaydedilen optimum ayırmalara karşılık gelen şartlarda 0,1 F NH_3, 0,1 F H_3PO_4 ve 0,1 F CH_3COOH çözeltileri kullanılarak kaydedilen kromatogramlar karşılaştırılmış ve NH_3 çözeltisinin etkisi değerlendirilmiştir. Çeşitli şartlarda kaydedilen kromatografik ayırmalar, aynı şartlarda APS sabit fazı ile doldurulmuş aynı ebattaki kolon üzerinde elde edilen kromatografik ayırmalarla karşılaştırılmış ve böylece immobilizasyon işleminin etkisi vurgulanmıştır.

Belirtilen analizlerden önce, sabit faz üzerinde elde edilen sonuçların tekrarlanabilirliği, farklı zaman dilimlerinde, kolonun MeOH-Su hareketli faz sistemiyle etkileştirilme derecesine bağlı olarak incelenmiştir. Elde edilen veriler, sabit fazın şartlanma derecesiyle ilişkilendirilmiştir.

3.6.1.1. Şartlandırma işleminin etkisi

Kolonun ilk kullanılmaya başlandığı zamandan itibaren, hareketli fazdaki MeOH oranına bağlı olarak nükleositlerin *k'* değerlerindeki değişimler periyodik olarak takip edilmiştir. Bu amaçla; zaman içerisinde çeşitli tekrar analizleri yürütülmüş ve *k'* değerlerindeki tekrarlanabilirlik değerlendirilmiştir. Günler-arası tekrar analizlerinden elde edilen *k'* değerlerindeki standart sapma düzeyi ≤0,03 olduğunda, kolonun uygun şartlanma seviyesine ulaştığı kabul edilmiş ve uygun şartlanma seviyesine ulaşan kolon üzerinde diğer analizler yürütülmeye başlanmıştır. Yani, daha sonraki işlemlerin tamamı, yeterli düzeyde şartlandırılmış kolon üzerinde yürütülmüştür.

3.6.1.2. Akış hızının etkisi

Teorik tabaka yüksekliği ile hareketli fazın akış hızı arasındaki ilişkiyi değerlendirmek amacıyla, EC-HA-APS sabit fazı üzerinde, 0,15–1,50 mL/dak aralığında değişen farklı akış hızlarında bazı denemeler yapılmıştır. Denemeler; RPLC şartlarında 0,1 F NH_3 (pH=7)-MeOH hareketli faz sistemi kullanılarak yürütülmüş ve Urd ve Cyd için elde edilen verilerin ortalaması cinsinden verilmiştir. Elde edilen

verilerden, tek bileşenli numunelerle yürütülecek analizlerin hangi akış hızında yürütüleceği belirlenmiştir. Analizler süresince, kolon fırını sıcaklığı 25 ^{o}C'a ve deteksiyon dalga boyu 254 nm'ye ayarlanmıştır.

3.6.1.3. Hareketli fazdaki organik çözücü türünün ve yüzdesinin etkisi

Nükleosit ve nükleobazlar için *k'* değerleri, farklı oranlarda organik çözücü içeren Su-MeOH ve Su-MeCN hareketli faz sistemleri kullanılarak türetilmiştir. Hareketli fazdaki organik çözücü oranına (%1-90; v/v) bağlı olarak *k'* değerlerindeki değişimler irdelenmiştir. Böylece; RPLC ve HILIC şartlarına karşılık gelen şartlardaki kromatografik davranışlar kapsamlı bir değerlendirmeye tabi tutulabilmiştir.

Belirtilen tüm analizler süresince; hareketli faz akış hızı 0,50 mL/dak, kolon fırınının sıcaklığı 25 ^{o}C ve detektörün dalga boyu 254 nm olacak şekilde ayarlanmıştır.

3.6.1.4. Hareketli fazdaki amonyak çözeltisi ve sıcaklığın etkisi

Yapılan bazı ön denemeler, hareketli fazda kullanılan NH_3 çözeltisinin, çalışılan türlerin elüsyon derecelerinin ayarlanmasında çok faydalı olduğunu göstermiş ve bu nedenle farklı pH değerlerine sahip 0,1 F'lik NH_3 çözeltileri kullanılarak RPLC ve HILIC şartlarında sırasıyla NH_3-MeOH ve NH_3-MeCN hareketli faz sistemleriyle bazı analizler yürütülmüştür. Bu analizlerle, türlerin *k'* değerlerinin NH_3 çözeltisinin pH'sına (3-7) ve sıcaklığa (25-45 ^{o}C) bağlı olarak değişimi incelenmiştir. Yani; NH_3/NH_4^+ türlerinin sabit faza karşı yarışmalı türler olarak etkisini değerlendirmek amacıyla hareketli fazda, farklı pH değerlerine sahip 0,1 F NH_3 çözeltileri kullanılmıştır. Analizlerden hemen önce, NH_3 çözeltileri taze olarak hazırlanmış ve pH'ları 0,1 M HCl çözeltisiyle istenen seviyeye ayarlanmıştır. NH_3 çözeltisinin etkisi, RPLC ve HILIC şartlarına karşılık gelen hareketli faz bileşimlerinde ayrı ayrı incelenmiştir. RPLC şartlarında nükleositler ve nükleobazlar için yürütülen denemelerde, hareketli faz olarak sırasıyla 0,1 F NH_3 (pH=3,5–7,0)-MeOH (99:1; v/v) ve 0,1 F NH_3 (pH=3,5–7,0)-MeOH (9:1; v/v) karışımları; HILIC şartlarında ise her iki bileşik grubu için de 0,1 F NH_3 (pH=3,5–7,0)-MeCN (1:9; v/v) karışımı kullanılmıştır. Analizler, her bir pH değerinde üç farklı sıcaklıkta (25; 35 ve 45 ^{o}C) olmak üzere, farklı pH değerlerinde yürütülmüştür.

Böylece; her bir pH değerinde, incelenen bileşiklerin her biri için van't Hoff grafikleri çizilmiş ve türlerin kromatografik davranışlarının şekillenmesinde rol alan mekanizmalarda sıcaklığın ne tür bir etkiye sahip olduğu incelenmiştir. Farklı sıcaklıklarda yürütülen analizlerde, kolondan çıkan hareketli faz kısımları, sıcaklığı 25 ^{o}C'a ayarlanmış kolon fırınına yönlendirildikten sonra detektöre gönderilmiştir. Böylece; tüm analizler süresince deteksiyon sıcaklığı da sabitlenmiştir.

3.6.1.5. Kolon ön-şartlandırma işleminin etkisi

Kolonun ön-şartlandırılmasında kullanılan hareketli faz bileşiminin etkisi, RPLC şartlarında (Su-MeOH karışımı ile) denenmiştir. Bu denemelerde, analit olarak Ura, Thy ve Cyt içeren bir numune kullanılmış ve hareketli faz bileşimi (analiz başlatıldığı andan itibaren) Su-MeOH (9:1; v/v) olacak şekilde ayarlanmıştır. Her analizden önce kolon, %0–35 (v/v) aralığında değişen MeOH içeriğine sahip hareketli faz bileşimleri kullanılarak şartlandırılmıştır. Sabit fazın her bir durum için incelenen maddelere karşı sergilediği ayırma gücündeki (R_S) farklılaşmalar, kolon ön-şartlandırma işleminde kullanılan hareketli faz bileşiminin etkisiyle ilişkilendirilmiştir.

3.6.2. Ligand-değiştirme kromatografisi şartlarında yürütülen işlemler

EC-HA-APS'nin RPLC ve HILIC şartlarındaki sabit faz özellikleri incelendikten sonra, metal iyonu yüklenmiş şeklinin sabit faz özellikleri de incelemeye tâbi tutulmuştur. Bu kapsamda yürütülen çalışmalarda; *Cu*-EC-HA-APS ve *Co*-EC-HA-APS üzerinde bazı nükleosit (Urd, Tyd, Cyd, Ado ve Guo) ve nükleobazların (Ura, Thy, Cyt, Ade ve Gua) kromatografik davranışları incelenmiştir. Denemelerde; EC-HA-APS ile doldurulmuş 4,6x150 mm ölçülerinde bir kolon kullanılmıştır.

EC-HA-APS, dinamik şartlarda, kolona uygun konsantrasyonlara seyreltilmiş 0,10 M $Cu(NO_3)_2$ ve 0,10 M $CoCl_2$ çözeltileri beslenerek ligand değiştirici şekle dönüştürülmüştür. Metal çözeltileri kolona, hareketli fazdaki metal çözeltisi konsantrasyonunun tedricen arttırıldığı basamaklı yükleme işlemiyle yüklenmiştir. Sabit fazda tutulan metal iyonlarının stabilitesi, farklı hareketli faz bileşimlerinde, kolondan çıkan hareketli faz kısımlarının AAS analizlerine tâbi tutulmasıyla değerlendirilmiştir. Sabit fazdaki metal iyonunu sıyırmak amacıyla 0,1 F NH_3-0,1 F Na_2H_2Y karışımı

(pH=7,5) kullanılmış ve metal iyonlarının bu karışımla sıyırılma verimlilikleri değerlendirilmiştir.

3.6.2.1. EC-HA-APS'nin ligand değiştirici şekle dönüştürülmesi

HA'nın ağır metal iyonlarıyla etkileşebilme özelliği nedeniyle, EC-HA-APS'nin LEC'de sabit faz olarak kullanılabileceği ön-görülmüştür. EC-HA-APS'yi ligand değiştirici şekle dönüştürmek amacıyla, HA ile kararlı kompleksler oluşturan Cu(II) ve Co(II) iyonlarının kullanılmasının uygun olacağı düşünülmüştür. Bunun için metal iyonlarının $Cu(NO_3)_2$ ve $CoCl_2$ tuzlarından hazırlanan çözeltileri EC-HA-APS ile doldurulmuş kolona basamaklı bir şekilde yüklenmiştir. Her bir metal iyonu için hazırlanan stok çözelti (0,100 M; herhangi bir pH ayarlaması yapılmamıştır), konsantrasyonu HPLC sisteminde 0,005-0,100 M aralığında değişecek şekilde Su ile seyreltilmiş ve basamaklı bir şekilde kolona beslenmiştir. Metal iyonlarının kolona basamaklı bir şekilde beslenmesiyle elde edilen breakthrough eğrilerinden her bir metal iyonu için denge sorpsiyon verileri de türetilmiştir. Basamaklı frontal analiz (SFA) metodu ile hesaplanan denge sorpsiyon verileri, Scatchard eğri analizi ile irdelenmiştir. Böylece; EC-HA-APS, metal iyonu yüklenmiş *M*-EC-HA-APS şekline dönüştürülmüştür.

Kolonda tutulan metal iyonlarının stabilitesini değerlendirmek amacıyla, çeşitli hareketli faz sistemleriyle etkileştirilen kolondan ayrılan metal iyonu miktarı atomik absorpsiyon spektrofotometresi (AAS) ile belirlenmiştir. Ayrıca; metal iyonlarının 0,1 F Na_2H_2Y+0,1 F NH_3 (pH=7,5) çözeltisiyle sıyırma verimliliği de AAS ölçümleriyle değerlendirilmiştir.

3.6.2.2. *M*-EC-HA-APS üzerinde yürütülen kromatografik analizler

Basamaklı bir yüklemeden sonra ligand değiştirici şekle dönüştürülen EC-HA-APS'nin *Cu*-EC-HA-APS ve *Co*-EC-HA-APS şekilleri üzerinde nükleosit ve nükleobazlar için bazı analizler yürütülmüştür. Deneysel parametre olarak hareketli faz bileşimi ve sıcaklığın etkisi incelenmiş olup; elde edilen veriler, ligand-değiştirme mekanizması ile ilişkilendirilmiştir. Bu analizlerden hesaplanan *k'* değerleri, aynı

kolonda, aynı şartlarda ve fakat sabit fazın metal iyonu yüklenmemiş şekli üzerinde elde edilen *k'* değerleriyle karşılaştırılarak metal iyonu yükleme işleminin etkisi değerlendirilmiştir. Ayrıca; hareketli fazdaki metal iyonu çözeltisi konsantrasyonunun bazı türlerin kromatografik davranışları üzerindeki etkisi de incelenmiştir. LEC şartlarında, sıcaklık gradyentinin kromatografik ayırmalar üzerindeki etkisi de çalışılmıştır.

3.6.3. Akış enjeksiyon-kromatografik analizler

Kromatografik davranışları incelenen türlerin sabit faz ile etkileşme düzeyleri hakkında detaylı bilgiler elde etmek amacıyla türlerin tek bileşenli numuneleriyle bazı akış enjeksiyon-kromatografik analizler yürütülmüştür. Bu işlemlerde, HPLC cihazına monte edilen bir valf sistemi kullanılmış olup, bu sayede cihaz gerektiğinde bir akış enjeksiyon sistemi olarak da kullanılabilmiştir. Valf sisteminin, akış enjeksiyon-kromatografik analizlerde aldığı pozisyonlar Şekil 3.3'te şematik olarak gösterilmiştir.

Yürütülen analizlerde; hareketli faz olarak RPLC, HILIC ve LEC modları için Su-MeOH (2:3; v/v) karışımı kullanılmış olup; analizler, uygun bir süre şartlandırılan 4,6x150 mm ölçülerindeki kolon ile yürütülmüştür. Hareketli fazın akış hızı ve sıcaklık sırasıyla 1,00 mL/dak ve 25 ^{o}C'ta sabitlenmiştir.

Tek bileşenli numuneler önce kromatografik kolona enjekte edilmiş ve her bir tür için kaydedilen piklerin alanları, numunelerin akış enjeksiyon tekniğiyle doğrudan detektöre gönderilmesiyle elde edilen piklerin alanları ile karşılaştırılmıştır. Türler için her iki teknikle elde edilen pik alanlarındaki farklılaşmalar, türlerin sabit fazla etkileşme düzeyi ile ilişkilendirilmiştir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI

4.1. Karakterizasyon

HA, APS, HA-APS ve EC-HA-APS; elemental analiz, FTIR, potansiyometrik titrasyonlar, TGA, immobilize olmuş hümik asit miktarının belirlenmesi, pH_{pzc} analizleri (yüzey yük özelliklerinin incelenmesi), katı-sıvı temas açısı ölçümleri, SEM analizleri, çözünürlük testleri ve metal bağlama özelliklerinin incelenmesi bakımından karakterize edilmiştir. Bu işlemlerden elde edilen sonuçlarla ilgili detaylı bilgi aşağıda ayrı başlıklar altında sunulmuştur.

4.1.1. Elemental analiz

HA, APS, HA-APS ve EC-HA-APS için elemental analiz sonuçları Tablo 4.1'de verilmiştir. C, H, N ve S elementlerinin oranları direkt tayin edilmiş olup, O elementinin oranı ise; belirtilen elementlerin oranları, yapıdaki kül ve nem oranı toplamının toplam kütleden çıkartılmasıyla hesaplanmıştır. APS, HA-APS ve EC-HA-APS'deki Si elementinin oranı belirlenmediğinden, tabloda bu materyaller için O elementinin oranı verilmemiştir. Kül miktarı ise termogravimetrik analizlerle belirlenmiştir.

Elde edilen sonuçlar incelendiğinde, HA'nın yapısında en çok bulunan elementin C olduğu görülebilir (~%65). Yapıdaki yüksek C oranına karşın H oranının düşük olması, hümik asidin yüksek düzeyde aromatik karaktere sahip olduğunu düşündürmektedir. Oksijen için hesaplanan ~%29'luk değer, HA'nın yapısında bulunan karboksilik asit, aromatik ve alkolik hidroksit, eter, ester ve hetereosiklik yapılarla ilişkilendirilebilir. N elementi için bulunan yaklaşık %1,7'lik değeri de yapıdaki amin, amid ve hetereosiklik yapılarla ilişkilendirmek mümkündür.

Ticari olarak temin edilebilen hümik asitler için literatürdeki verilerle (Alvarez-Puebla ve ark. 2005; Bkz. Tablo 1.2) kıyaslandığında, bu çalışmada kullanılan hümik asitteki O yüzdesinin daha düşük, C yüzdesinin ise daha yüksek olduğu görülmüştür. N elementinin yüzdesinin literatürdeki değerlerden daha yüksek olduğunu söylemek mümkündür.

APS, HA-APS ve EC-HA-APS için elde edilen elemental analiz sonuçlarından immobilizasyon işlemi hakkında önemli bilgiler edinilmiştir. HA immobilizasyonu ile ilgili en önemli bulgu, HA-APS ve EC-HA-APS için belirlenen C elementi yüzdesinin

APS'deki C yüzdesinden belirgin bir şekilde farklılaşmasıdır. İmmobilizasyon işleminden sonra C yüzdesinde gözlenen artış, yapıya bağlanan HA'daki organik şebeke ile ilişkilendirilebilir. HA-APS için C, H ve N elementlerinin oranı APS için bulunan değerlerden daha yüksek çıkmasına rağmen; EC-HA-APS'deki H ve N elementleri için bu oranların daha düşük olduğu görülmektedir. Bu durumun, kapatma (*end-capping*) işleminin etkisiyle bir miktar HA'nın APS'den ayrılmasıyla ilişkili olduğu düşünülmüştür.

Elemental analiz sonuçlarına bakıldığında, APS için C ve N elementlerinin oranının (C/N=2,82) beklenen düzeye (C/N=2,57) yakın olduğu görülmektedir. Çünkü; APS'deki C ve N elementlerinin kaynağı aminopropil grubu olup, bu gruptaki C/N oranı 2,57 olmalıdır. Bu nedenle; APS'ye immobilize olmuş HA miktarını C/N oranı temelinde yorumlamanın mümkün olduğu görülmüştür. Bu amaçla yapılan hesaplamalar sonraki bölümlerde verilmiştir.

Sonuç olarak elemental analizlerden; HA'nın APS'ye immobilize olduğu görülmüş ve immobilize olmuş HA miktarının C ve N elementleri temelinde hesaplanabileceği görülmüştür.

Tablo 4.1. HA, APS, HA-APS ve EC-HA-APS için elemental analiz sonuçları

	C (%)	H (%)	N (%)	S (%)	O (%)
HA [a]	64,57	5,18	1,73	0,59	28,56
APS [b]	5,80	1,89	2,06	-	-
HA-APS [b]	14,56	2,41	2,51	-	-
EC-HA-APS [b]	11,65	1,86	1,79	-	-

[a] Değerler, kuru-külsüz madde temelinde verilmiştir.

[b] Değerler kuru madde temelinde verilmiştir.

4.1.2. FTIR analizleri

Elemental analiz sonuçlarından, HA'nın APS'ye bağlandığı anlaşılmış fakat bağlanmada fiziksel veya kimyasal etkileşmelerin ne düzeyde rol aldığı ile ilgili bir sonuca gidilememiştir. HA'nın APS'ye, beklenen kimyasal bağ oluşum mekanizması (amid-bağı oluşumu) üzerinden bağlandığını teyit etmek amacıyla FTIR analizleri yürütülmüştür.

HA, APS, HA-APS ve EC-HA-APS için kaydedilen FTIR spektrumları Şekil 4.1'de toplu halde verilmiş olup, her bir spektrum için karakteristik bantlar şekil üzerinde belirtilmiştir.

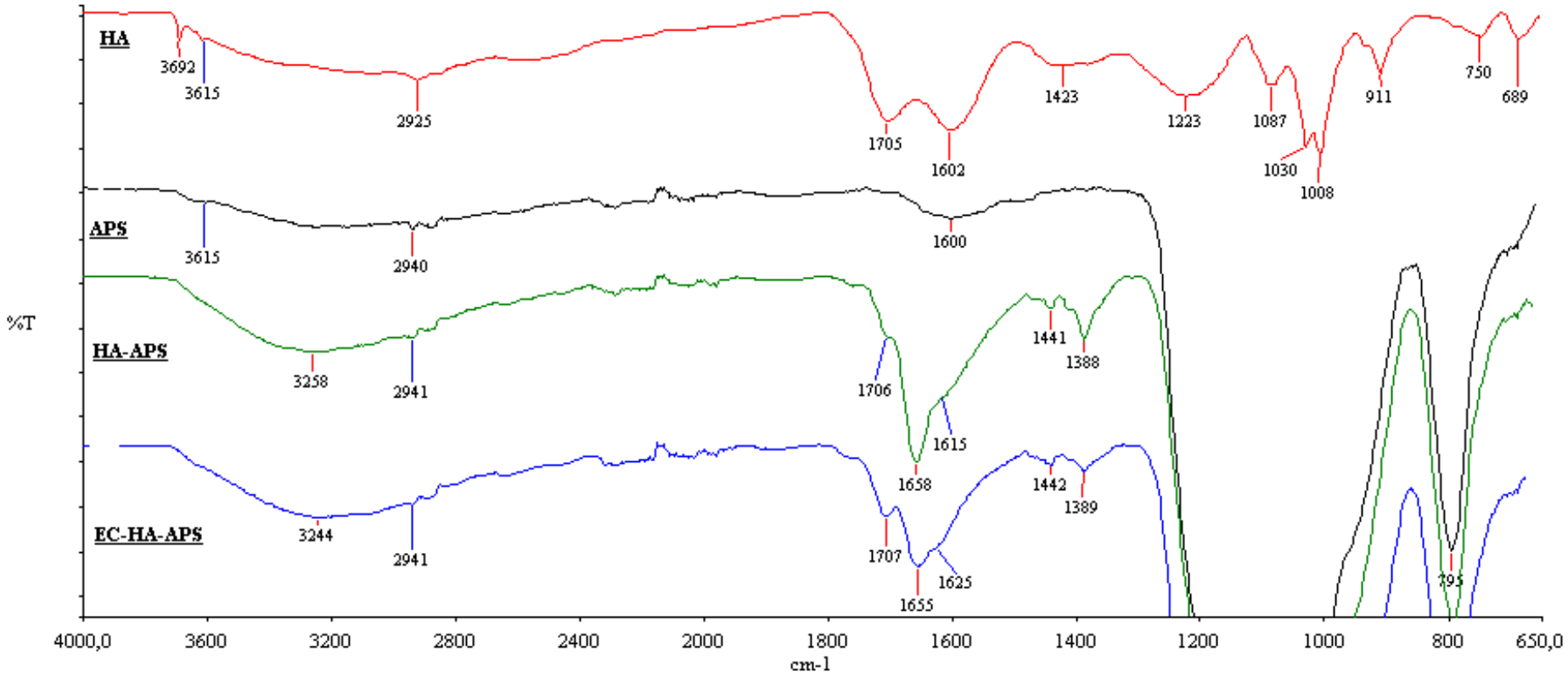
HA için kaydedilen FTIR spektrumu ve gözlenen karakteristik bantlar daha önce belirtilenlerle (Stevenson, 1994) benzerlik göstermektedir:

3700-3400 cm^{-1}:	Alkolik ve fenolik O-H gerilme titreşimleri ve amin grupları için N-H gerilme titreşimleri,
2925 cm^{-1}:	Alifatik C-H gerilme titreşimleri,
1705 cm^{-1}:	–COOH grupları için C=O gerilme titreşimleri,
1602 cm^{-1}:	Primer amin grupları için N-H gerilmeleri, aromatik ve konjuge dien yapılarındaki C-C titreşimleri,
1423 cm^{-1}:	Alifatik C-H deformasyon, fenolik O-H gerilme titreşimleri ve COO^- grubu için simetrik gerilme titreşimi,
1223 cm^{-1}:	C-H deformasyon, fenoller için C-O gerilme titreşimleri,
911 ve 1087 cm^{-1}:	Polisakkarit yapılar için C-O gerilme titreşimleri,
1030 cm^{-1}:	Alifatik amin yapıları için C-N gerilme titreşimleri, primer alkol yapıları için C-O gerilme titreşimleri ve aromatik C-OH yapılarından kaynaklanan titreşimler,
1008 cm^{-1}:	Silikat yapıları için Si-O gerilme titreşimleri,
700-650 cm^{-1}:	Monosübstitüe benzen yapılarından ileri gelen titreşimler,

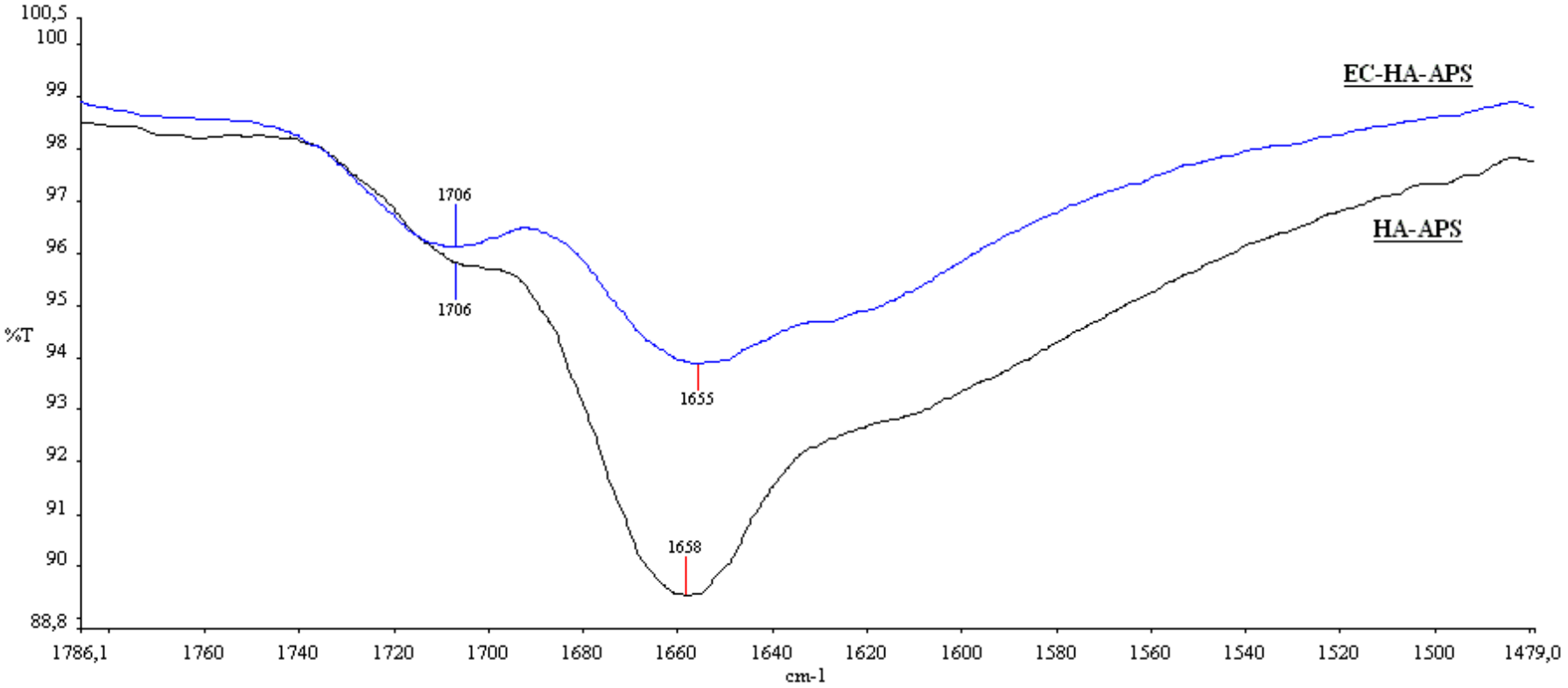
APS'nin spektrumunda, 1250-1000 cm^{-1} aralığındaki Si-O-Si asimetrik titreşimler ile 950-700 cm^{-1} aralığındaki Si-OH eğilme titreşimleri HA'ya ait birçok karakteristik bandı maskelemektedir (Koopal ve ark., 1998). Bu nedenle; FTIR analizlerinden HA'nın immobilizasyonu ile ilgili kapsamlı bilgiler edinmek zordur. Bununla birlikte; FTIR spektrumlarında, HA'nın immobilizasyonuyla ilişkilendirilebilecek önemli bir bulguya rastlanmıştır. HA-APS ve EC-HA-APS'nin spektrumlarında, HA'nın APS'ye immobilizasyonuna atfedilebilecek en önemli bulgu, immobilizasyondan sonra 1658-1655 cm^{-1} dolayında çok belirgin bir şekilde açığa çıkan bantlardır. Bu bantları, amit yapılarından ileri gelen C=O titreşimleriyle ilişkilendirmek mümkündür. Ayrıca; immobilizasyon işleminden sonra 1388-1440 cm^{-1} dolaylarında gözlenen $–CH_2$ ve CH_3 deformasyon ve eğilme bantlarının da APS'ye kıyasla daha

belirgin hale geldiği görülmektedir. Bu durum; immobilizasyon işleminden sonra yüzeye bağlanan HA moleküllerinin etkisiyle alifatik yapıların miktarında meydana gelen artışla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca; immobilizasyondan sonra, 1707 cm^{-1} dolaylarında açığa çıkan ve karboksil gruplarındaki C=O yapılarıyla ilişkilendirilen bant, HA'nın yoğun bir şekilde immobilize olduğunu göstermektedir. Bu bant, EC-HA-APS'nin spektrumunda daha belirgin bir şekilde görülebilmektedir (Şekil 4.2). Sonuç olarak; FTIR analizlerinden HA'nın APS'ye kimyasal bağ oluşumu temelinde immobilize olduğu anlaşılmıştır.

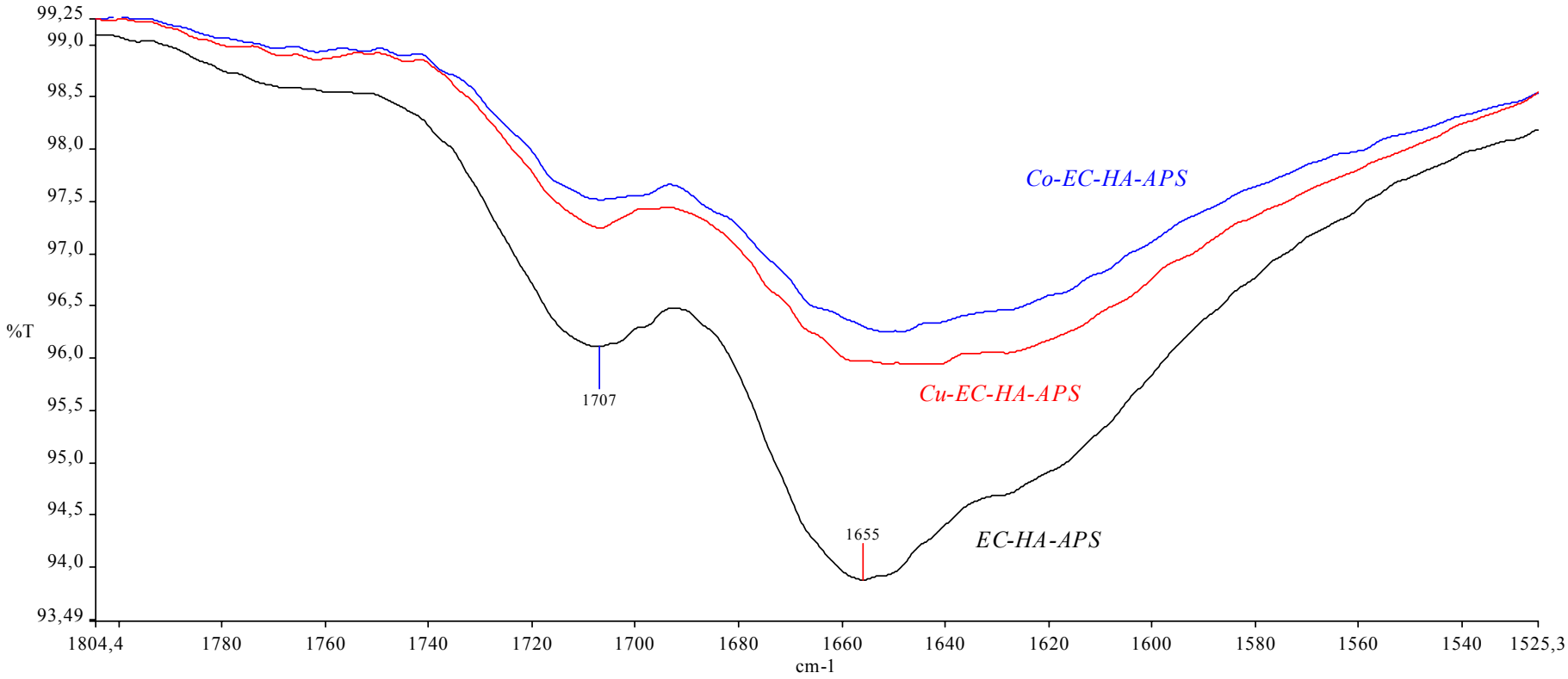
EC-HA-APS'nin Cu(II) ve Co(II) iyonlarıyla etkileşme özellikleri hakkında fikir edinmek amacıyla *Cu*-EC-HA-APS ve *Co*-EC-HA-APS için yürütülen FTIR analizlerinden elde edilen spektrumlar Şekil 4.3'te verilmiştir. Spektrumlarda gözlenen en belirgin değişim, metal iyonu ile etkileştirildikten sonra karboksil ve amid gruplarındaki karbonillerden kaynaklandığı düşünülen 1707 ve 1655 cm^{-1}'deki bantların şiddetinde gözlenen azalmalardır. Bu durum; metal iyonlarının EC-HA-APS'deki karbonil grubu içeren yapılarla etkileştiğini düşündürmüştür. Nitekim; Alvarez-Puebla ve ark. (2005); Co(II) bağlanmış HA için 1710 cm^{-1} dolaylarındaki bandın şiddetinin pH arttıkça azaldığını tespit etmiş ve bunun, Co(II) iyonlarının –COOH gruplarıyla kompleksleşme derecesindeki artıştan kaynaklandığını belirtmiştir. Böylece; FTIR spektrumlarından, Cu ve Co iyonlarının immobilize HA'daki karbonil grubu içeren yapılarla (ör. karboksil gruplarıyla) etkileştiğine dair önemli bir bulgu elde edilmiştir.



Şekil 4.1. HA, APS, HA-APS ve EC-HA-APS için FTIR spektrumları



Şekil 4.2. Kapatma (*end-capping*) işleminin etkisiyle immobilize hümik asidin FTIR spektrumundaki bazı karakteristik bantlarda meydana gelen değişim



Şekil 4.3. EC-HA-APS, *Cu*-EC-HA-APS ve *Co*-EC-HA-APS için kaydedilen FTIR spektrumlarındaki bazı bantlarda gözlenen değişimler

4.1.3. Potansiyometrik titrasyonlar

HA'nın yapısında bulunan fonksiyonel grupların sayısını tayin etmek amacıyla; öncelikle kullanılan saf suyun farklı iyonik şiddetlerdeki K_{su} değerleri deneysel olarak belirlenmiştir. Bunun için konsantrasyonu bilinen NaCl çözeltisinden 25 mL'lik ayrı ayrı iki kısım alınmış ve 0,05 mL'lik artışlarla ayarlı NaOH (~0,1 M) ve HCl (~0,1 M) çözeltileri kullanılarak titre edilmiştir. Her bir ilaveden sonra pH metreden potansiyel değişimi (E) mV cinsinden okunarak kaydedilmiştir. E değerinin -log$X$ (yani -log[H^+] veya -log[OH^-]) değerine karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen doğruların kesişme noktası, K_{su} değerinin hesaplanmasında kullanılmıştır (Neves ve ark., 2003). Bu şekilde elde edilen grafikler Şekil 4.4'te görülmektedir.

HA için kaydedilen titrasyon eğrileri Şekil 4.5'te verilmiş olup, HA'daki yük yoğunluğunun (Z) pH'ya karşı değişimi cinsinden gösterilmiştir. Her bir nokta için Z değerini hesaplamak için yük denkliğinden faydalanılmıştır (Ritchie ve Perdue, 2003):

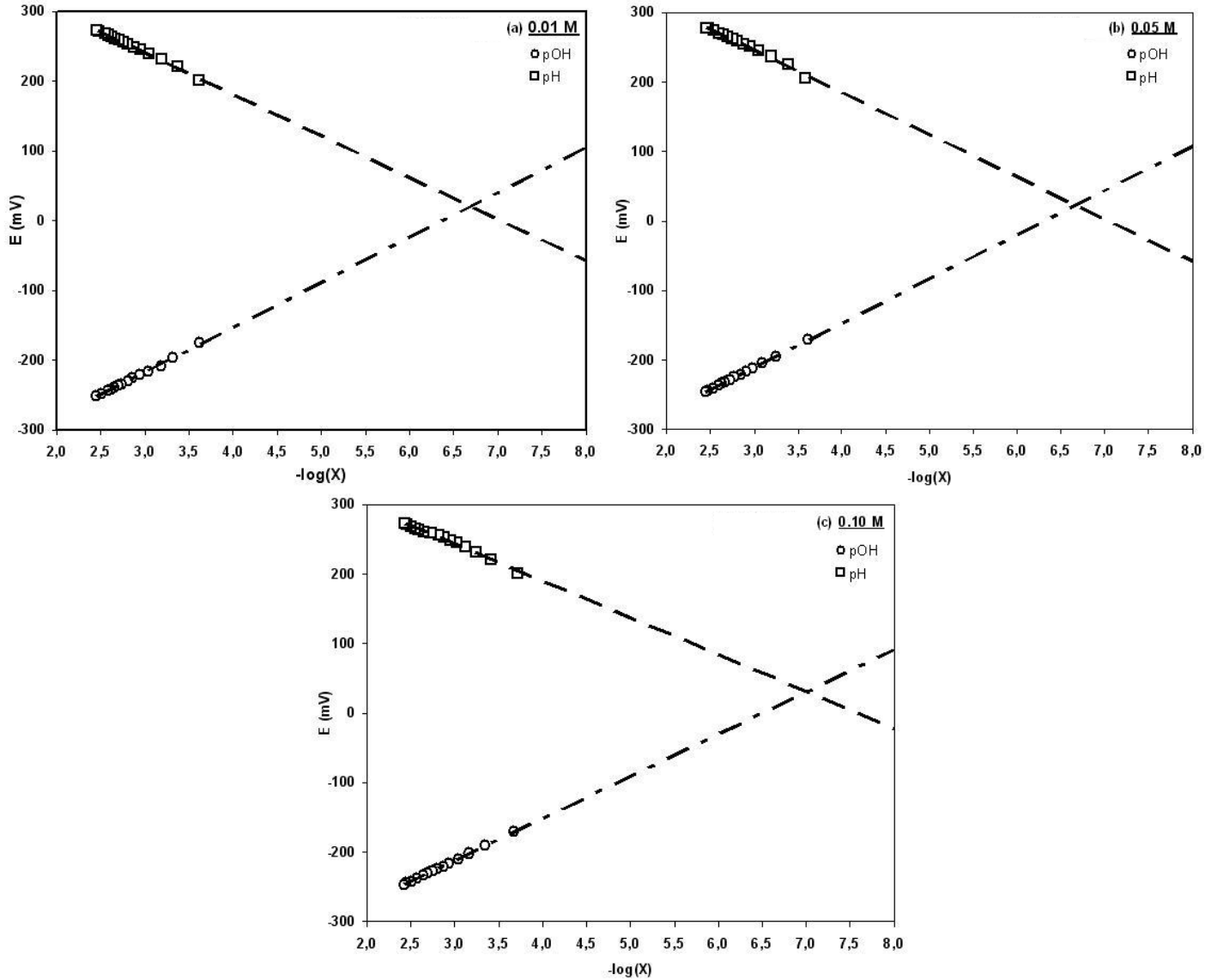
$$[Na^+] + [H^+] + Z[HA] - [Cl^-] - [OH^-] = 0$$

Burada; *[Na^+]*, *[H^+]*, *[Cl^-]* ve *[OH^-]* ilgili türlerin denge konsantrasyonunu belirtmektedir ve birimi mol/L'dir. *[HA]* ise; HA'nın konsantrasyonunu ifade etmek için kullanılmış ve birimi g/L olarak alınmıştır. Verilen türlerin konsantrasyonuna ait birimler dikkate alındığında, Z'nin birimi "mol/g"olarak bulunur. –COOH ve –OH gruplarının tesir değerliği "1" olduğundan, birim "meq/g" cinsinden kolayca yazılabilir. Bu yönteme göre; pH=8'deki yük yoğunluğu –COOH grubu sayısıyla ilişkilendirilirken, pH=10 ile pH=8'deki yük yoğunlukları farkının 2 katı [2x($Z_{pH=10}$-$Z_{pH=8}$)] da fenolik –OH grubu sayısıyla ilişkilendirilmektedir (Ritchie ve Perdue, 2003; Thurman ve Malcolm, 1981; Ma ve ark., 2001).

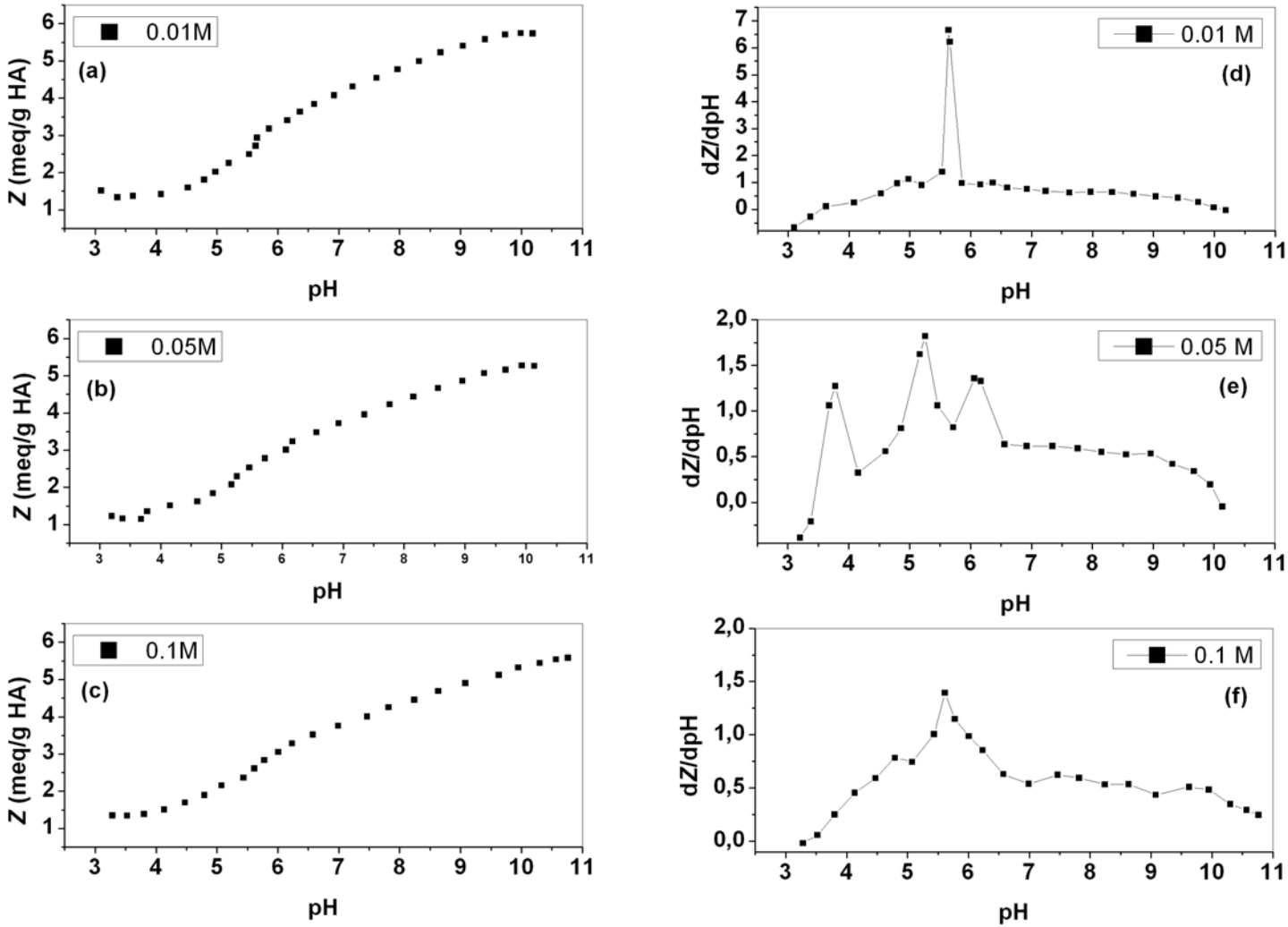
Çalışılan deneysel şartlarda iyonik şiddette çok önemli bir değişiklik olmamakla beraber, titrant ilavesinin yapıldığı her nokta için iyonik şiddetteki düzeltmeler hesaplamalarda göz önünde bulundurulmuştur. Yük denkliği için verilen yukarıdaki eşitlikte, [Na^+] ve [Cl^-] ortama ilave edilen NaCl konsantrasyonundan bulunabilir. [H^+] ise pH metreden okunan değer ile H^+'nın ilgili iyonik şiddetteki aktivite katsayısından hesaplanabilir. [OH^-] değeri; [H^+] ve suyun deneysel olarak belirlenen iyonlar çarpımı sabitinden (K_{su}) hesaplanabilir.

HA'nın direkt titrasyonuyla, yapıdaki fonksiyonel grupların iyonlaşma özellikleri hakkında önemli bilgiler edinilebilir. Bu bağlamda, titrasyon verilerinin

modellemesini kapsayan çok sayıda çalışmanın (Nederlof ve ark., 1993; Neves ve ark., 2003; Ritchie ve Perdue, 2003) bulunduğunu da belirtmek gerekir. Fakat bu çalışmada, potansiyometrik titrasyon verilerinin modellemesine gidilmeyip; asidik grupların iyonlaşma özellikleri hakkında bazı bilgileri sunmakla yetinilmiştir. Bu amaçla; HA'nın yük yoğunluğunun (*Z*) pH'ya göre dağılımı, elde edilen titrasyon verilerinin ışığında açıklanmaya çalışılmıştır. HA için *Z* değeri pH'ya karşı grafiğe geçirildiğinde, elde edilen eğrilerde çok belirgin sıçramaların olduğu bölgelerden söz etmenin güç olduğu görülmüştür (Şekil 4.5). Bu durum; HA'nın makromoleküler yapısında bulunan ve asidik karakteri geniş bir aralıkta değişebilen fonksiyonel grupların yapı içerisinde bir arada bulunmalarından kaynaklanmaktadır. Fakat; direkt titrasyon verilerinin birinci türevleri alındığında, fonksiyonel grupların dağılımı hakkında bazı bilgiler elde etmek mümkündür. Birinci türevin alınmasıyla elde edilen grafiklerdeki (Şekil 4.5) maksimumlar, makromoleküler yapıdaki farklı fonksiyonel grupların dağılımı hakkında bilgi sunmaktadır. Şekil 4.5'te görüldüğü gibi; ortamın iyonik şiddetine bağlı olarak, bu maksimumlar özellikle pH=3–7 aralığında dağılmaktadır. Bu pH aralığında gözlenen maksimumlar, HA'nın yapısında bulunan –COOH gruplarına; pH=7–10 aralığında (görece daha zayıf olarak) gözlenenlerse yapıdaki –OH gruplarına atfedilmiştir. Fenolik –OH gruplarıyla ilişkilendirilen maksimumların 0,10 M'lık NaCl ortamında daha belirginleştiği görülmüştür. Sonuç olarak; çalışılan HA'daki asidik fonksiyonel grupların pH=3'ün üzerinde iyonlaşmaya başladığı ve pH=7 dolaylarında bu grupların büyük oranda iyonlaşmış bir şekilde bulunduğu söylenebilir. Daha yüksek pH'larda ise fenolik –OH gruplarının iyonlaşmaya başladığı anlaşılmıştır.



Şekil 4.4. 0,01 M (a); 0,05 M (b) ve 0,10 M (c) NaCl çözeltilerinde suyun K_{su} değerini tayin etmek için yürütülen titrasyondan elde edilen veriler (X: $[H^+]$ veya $[OH^-]$; 0,01 M; 0,05 M ve 0,10 M için K_{su} değerleri sırasıyla $4{,}17 \times 10^{-14}$, $4{,}57 \times 10^{-14}$ ve $9{,}55 \times 10^{-15}$ olarak bulunmuştur)



Şekil 4.5. Saflaştırılmış HA için farklı konsantrasyonlara sahip NaCl çözeltilerinde elde edilen titrasyon eğrileri (*soldaki eğriler; a-c*) ve birinci türevleri (*sağdaki eğriler; d-f*)

Direkt titrasyondan hesaplanan fonksiyonel grup sayıları Tablo 4.2'de toplu halde verilmiştir. Tablodan da görüldüğü üzere; incelenen iyonik şiddetlerin her biri için hesaplanan fonksiyonel grup sayıları birbirine çok yakın olup, karboksil grubu sayısının fenolik hidroksil gruplarının sayısından daha fazla olduğu görülmektedir. Bu durum, hümik asitlerde gözlenen genel bir karakter olup, karboksil gruplarının hümik asidin asidik karakterinde büyük rol oynadığını göstermektedir.

Tablo 4.2. HA'daki bazı asidik fonksiyonel grupların sayısı ile ortamın iyonik şiddeti arasındaki ilişki [a]

	NaCl Çözeltisinin Konsantrasyonu		
	0,01 M	**0,05 M**	**0,10 M**
-COOH (meq/g)	5,6	5,2	5,2
-OH (meq/g)	2,2	2,1	2,4
Toplam	7,8	7,3	7,6

[a] Değerler, kuru-külsüz temelde hesaplanmıştır. Kül miktarı, termogravimetrik olarak belirlenmiştir

4.1.4. Termogravimetrik analizler

HA, APS, HA-APS ve EC-HA-APS için kaydedilen termogram (TG) ve diferansiyel termogram (DTG) Şekil 4.6'da görülmektedir.

HA için kaydedilen TG ve DTG eğrilerinde, 40–150 ^{o}C aralığındaki kütle kaybı yapıdaki nem ile ilişkilendirilmiş olup, HA'nın ısıl bozunumu ilgili iki basamaklı bir işlemin söz konusu olduğu görülmektedir. Birinci basamaktaki (180–355 ^{o}C) yaklaşık %12'lik bir kütle kaybı HA'daki molekül ağırlığı düşük uçucu yapılarla ilişkilendirilebilir. Kütlede en büyük düşüşün gözlendiği ikinci basamakta (355–800 ^{o}C), yaklaşık %66'lık bir azalmanın meydana geldiği ve geride (1000 ^{o}C'ta bile) değişmeden kalan yaklaşık %14'lük bir kütlenin kaldığı görülmektedir. Bu kütlenin, HA'daki kül ile ilişkili olduğu düşünülmüştür.

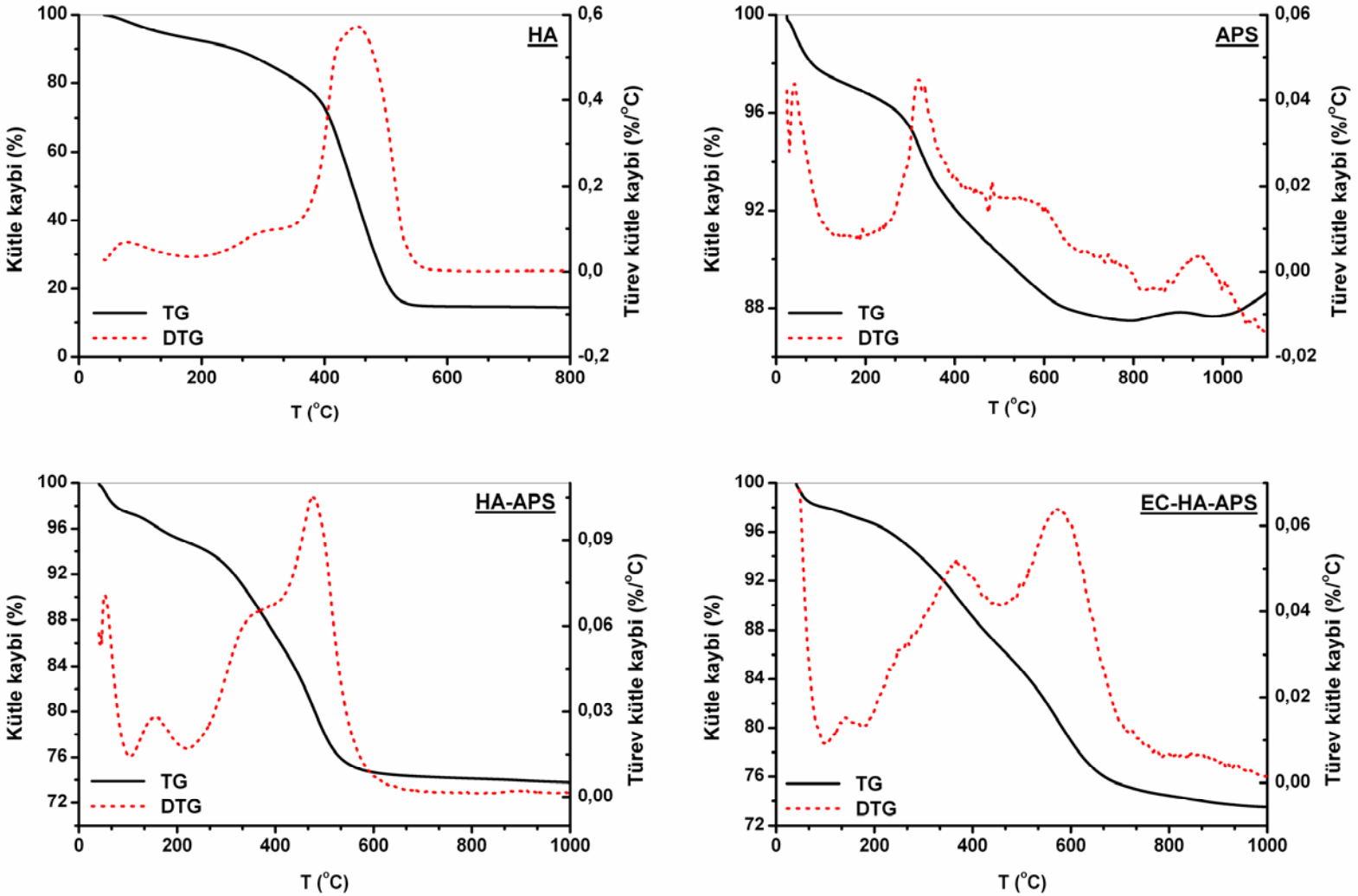
APS için kaydedilen eğrilerde; 24-169 ^{o}C aralığında kütlede gözlenen azalma (%2,94) yapıdaki nem ile ilişkilendirilmiştir. Kütledeki en büyük düşüş (%9,53), 169-800 ^{o}C aralığında meydana gelmiş olup, bu düşüşü yapıdaki aminopropil grubu ile ilişkilendirmek mümkündür. 800 ^{o}C'tan daha yüksek sıcaklıklarda kütlede gözlenen artışın ise; külün yüksek sıcaklıklardaki oksidasyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

HA-APS için kaydedilen eğrilerde ise yapıdaki nemin iki basamaklı bir işlem sonucunda ayrıldığı görülmüş olup; 40-103 ^{o}C ve 103-219 ^{o}C aralıklarında gözlenen (sırasıyla) %2,64 ve %2,53'lük azalmalar yapıdaki nem ile ilişkilendirilmiştir. Bu iki basamaklı azalmaları; yapıdaki nemin yanı sıra, HA-APS'nin saflaştırılması aşamasında kullanılan kaynama noktası düşük organik çözücü kalıntıları ile ilişkilendirmek de mümkündür. Daha yüksek sıcaklıklarda; 219-395 ^{o}C ve 395-1000 ^{o}C aralıklarında meydana gelen sırasıyla %7,76 ve %13,29'luk kütle kayıpları HA-APS'deki organik yapılarla ilişkilendirilmiş olup; yüksek sıcaklıklarda bozunmadan kalan %73,78'lik kütlenin ise HA-APS'de ısıl etkiyle değişmeden kalan yapılardan (ör. SiO_2) kaynaklandığı düşünülmüştür.

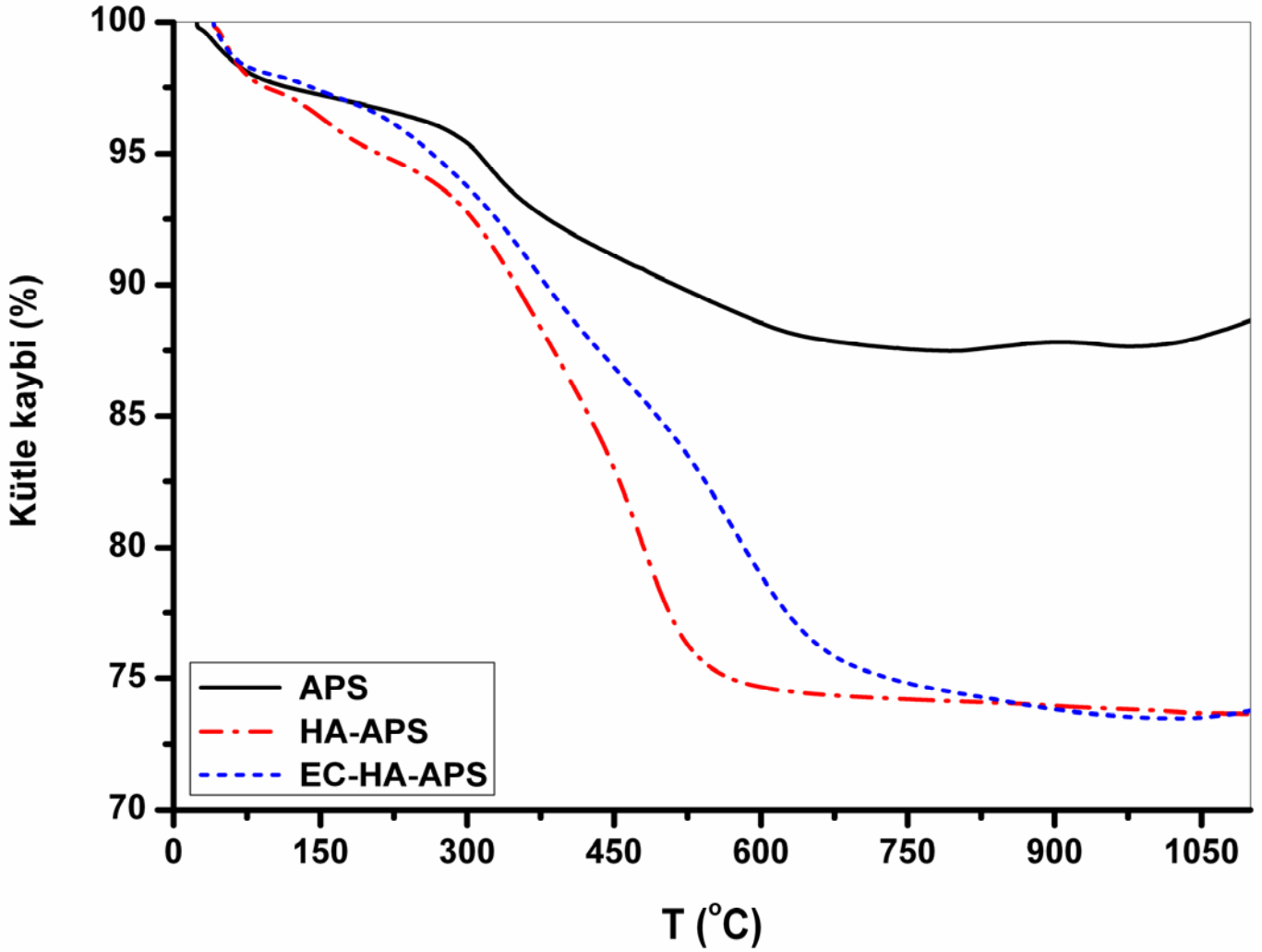
EC-HA-APS için kaydedilen eğrilerde; 40-101 ^{o}C ve 101-176 ^{o}C aralıklarında kütlede, yapıdaki nem ile ilişkilendirilen iki basamaklı bir azalma görülmektedir (sırasıyla %2,01 ve %3,04). Kütlede gözlenen bu iki basamaklı azalmayı hem nem, hem de EC-HA-APS'nin saflaştırılması aşamasında kullanılan kaynama noktası düşük organik çözücü (aseton, diklorometan) kalıntılarıyla da ilişkilendirmek mümkündür. Termogramdan, kütlede 176-448 ^{o}C ve 448-1000 ^{o}C aralıklarında sırasıyla %10,04 ve %13,43'lük kayıpların meydana geldiği görülmekte olup; yüzeydeki HA makromolekülleriyle ilişkilendirilmiştir. Yüksek sıcaklıklarda, %71,48'lik bir kütlenin değişmeden kaldığı görülmüştür.

HA'nın APS'ye immobilizasyonundan sonra ısıl işlemin etkisiyle kütlede meydana gelen azalmaları daha kolay anlamak için; APS, HA-APS ve EC-HA-APS için kaydedilen termogramlar Şekil 4.7'de karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Termogramlardan; ısıl etkiyle kütlede meydana gelen azalmanın (APS'ye kıyasla) HA-APS ve EC-HA-APS'de daha fazla olduğu görülebilir. Kütledeki bu farklılaşma APS yüzeyine immobilize olmuş HA makromolekülleriyle ilişkilendirilmiştir.

Termogramlardan; APS, HA-APS ve EC-HA-APS için kül oranları sırasıyla %87,52, %73,78 ve %71,48 olarak bulunmuştur. APS ile EC-HA-APS'nin kül oranları arasında gözlenen %16,04'lük fark, yüzeye bağlanan HA miktarıyla ilişkilendirilmiştir. Termogravimetrik analizlerden elde edilen bir diğer sonuç ise EC-HA-APS'nin HA-APS'ye kıyasla daha yüksek bir ısıl dayanım sergilemesidir. Bu durum, asetilleme işlemiyle elde edilen EC-HA-APS'nin daha yüksek termal stabilite sergilediğini gösterir. Sonuç olarak; TGA ve DTGA analizlerinden HA'nın APS'ye başarılı bir şekilde immobilize olduğu görülmüştür.



Şekil 4.6. HA, APS, HA-APS ve EC-HA-APS için termogram (TG) ve diferansiyel termogram (DTG)



Şekil 4.7. APS, HA-APS ve EC-HA-APS için termogramlar

4.1.5. İmmobilize olmuş hümik asit miktarının belirlenmesi

APS'ye immobilize olmuş HA miktarı UV-Vis. spektroskopisi, TGA ve elemental analiz teknikleriyle belirlenmiştir.

Spektroskopik analizlerden elde edilen sonuçlar; EC-HA-APS için immobilize olmuş HA miktarının 199 mgHA/gAPS olduğunu göstermiştir.

İmmobilize olmuş HA miktarını termogravimetrik analiz sonuçlarından hesaplayabilmek için APS ve EC-HA-APS'de gözlenen kül miktarlarındaki değişim esas alınarak bir hesaplama yöntemi izlenmiştir. Kaydedilen termogramlardan, en yüksek kül miktarına sahip materyalin APS olduğu görülmektedir. APS'ye HA makromolekülleri immobilize olduğunda, ısıl etkiyle kütle kaybında bir artışın gözlenmesi ve dolayısıyla HA immobilize edilmiş materyalin, APS'ye kıyasla, daha düşük kül oranına sahip olması beklenir. Yani; kül miktarında gözlenen azalma, APS'ye bağlanan HA miktarıyla ilişkilendirilebilir. Bu noktadan hareketle; EC-HA-APS için immobilize olmuş HA miktarı 191 mgHA/gAPS olarak hesaplanmıştır. UV-Vis. spektroskopisi ile tayin edilen değerlerle kıyaslandığında, EC-HA-APS için hesaplanan değerlerin birbiriyle uyumlu olduğu söylenebilir.

İmmobilize olmuş HA miktarının hesaplanmasında kullanılan bir diğer yöntem ise elemental analiz olup; HA, APS ve EC-HA-APS'deki C ve N elementlerinin oranlarındaki (C/N) değişimler temel alınmıştır. Bunun için "*a*" g APS ile "*b*" g HA'nın reaksiyona girip $a+b=1$ g EC-HA-APS oluşturduğu farz edilmiştir. Elemental analiz sonuçlarından; "*a*" g kuru APS'deki C ve N elementlerinin miktarlarını sırasıyla $(0{,}0580.a)$ ve $(0{,}0206.a)$; "*b*" g HA'daki C ve N elementlerinin miktarlarını ise sırasıyla $(0{,}5425.b)$ ve $(0{,}0145.b)$ g şeklinde yazmak mümkündür. Kuru EC-HA-APS için C/N oranı 6,507 olduğundan, aşağıdaki iki eşitlikle "*a*" ve "*b*" değerleri hesaplanabilir:

$$* \quad \frac{(0{,}0580 \times a + 0{,}5425 \times b)}{(0{,}0206 \times a + 0{,}0145 \times b)} = 6{,}507$$

$$* \quad (a + b) = 1$$

Buradan; b=0,145 g (immobilize olmuş HA miktarı) ve a=0,855 g (APS miktarı) olarak hesaplanır. Yani; APS'nin gramı başına 170 mg HA'nın immobilize olduğu anlaşılmaktadır.

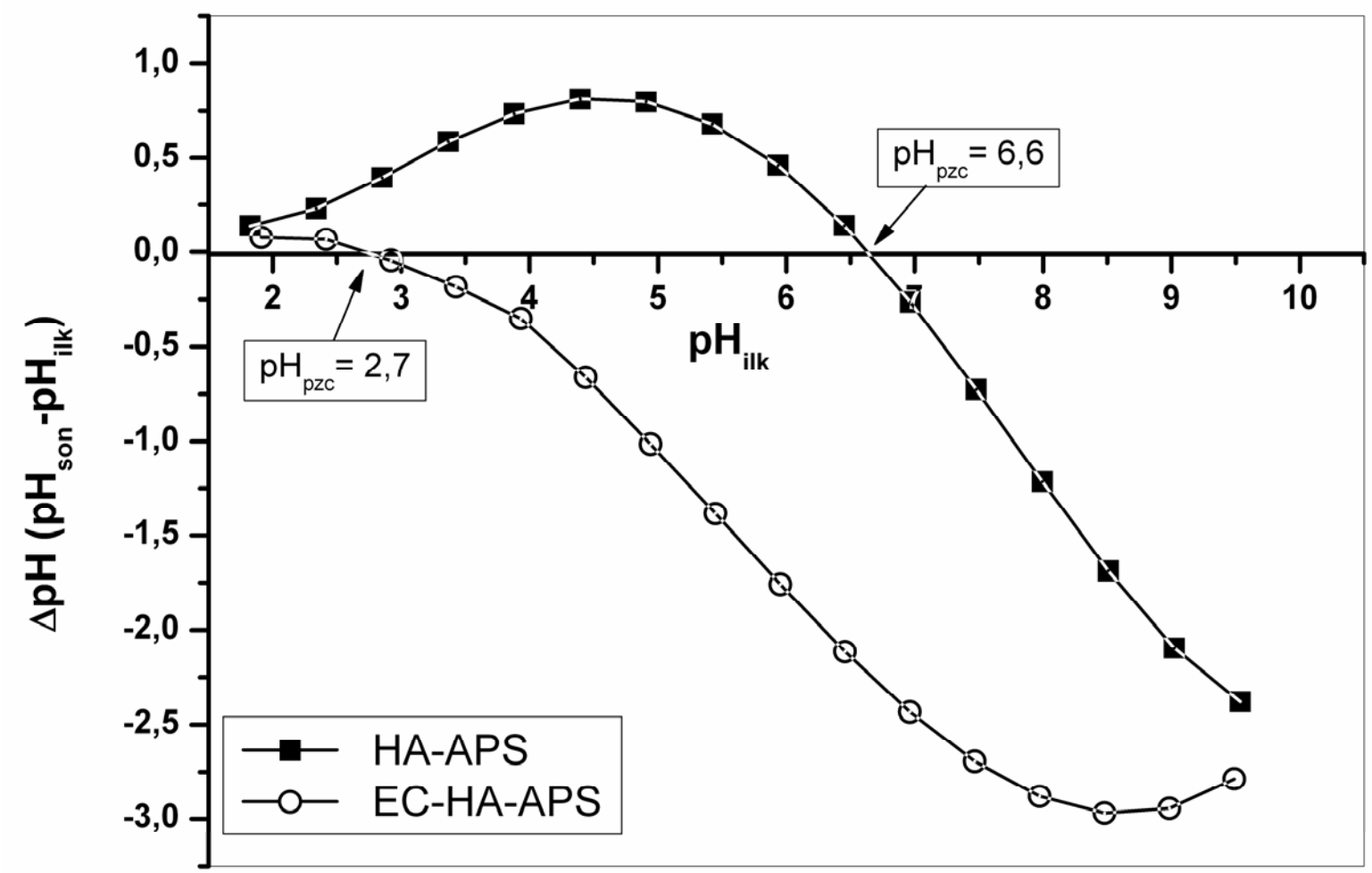
Yüzeye bağlanan HA miktarını tayin etmek için kullanılan üç teknikle elde edilen sonuçlar Tablo 4.3'te toplu halde verilmiştir. Tablodan görüldüğü üzere, spektrofotometrik ve termogravimetrik olarak tayin edilen değerler birbiriyle uyumlu olup, elemental analiz temelinde hesaplanan değer biraz düşük çıkmıştır. Bununla birlikte; elemental analiz sonuçlarından hesaplanan değerin, C ve N elementlerinin oranlarındaki değişimlerden yola çıkılarak hesaplanmış olması nedeniyle daha makul olduğu düşünülmüştür.

Tablo 4.3. EC-HA-APS'deki immobilize olmuş HA miktarı için çeşitli tekniklerle belirlenen değerler

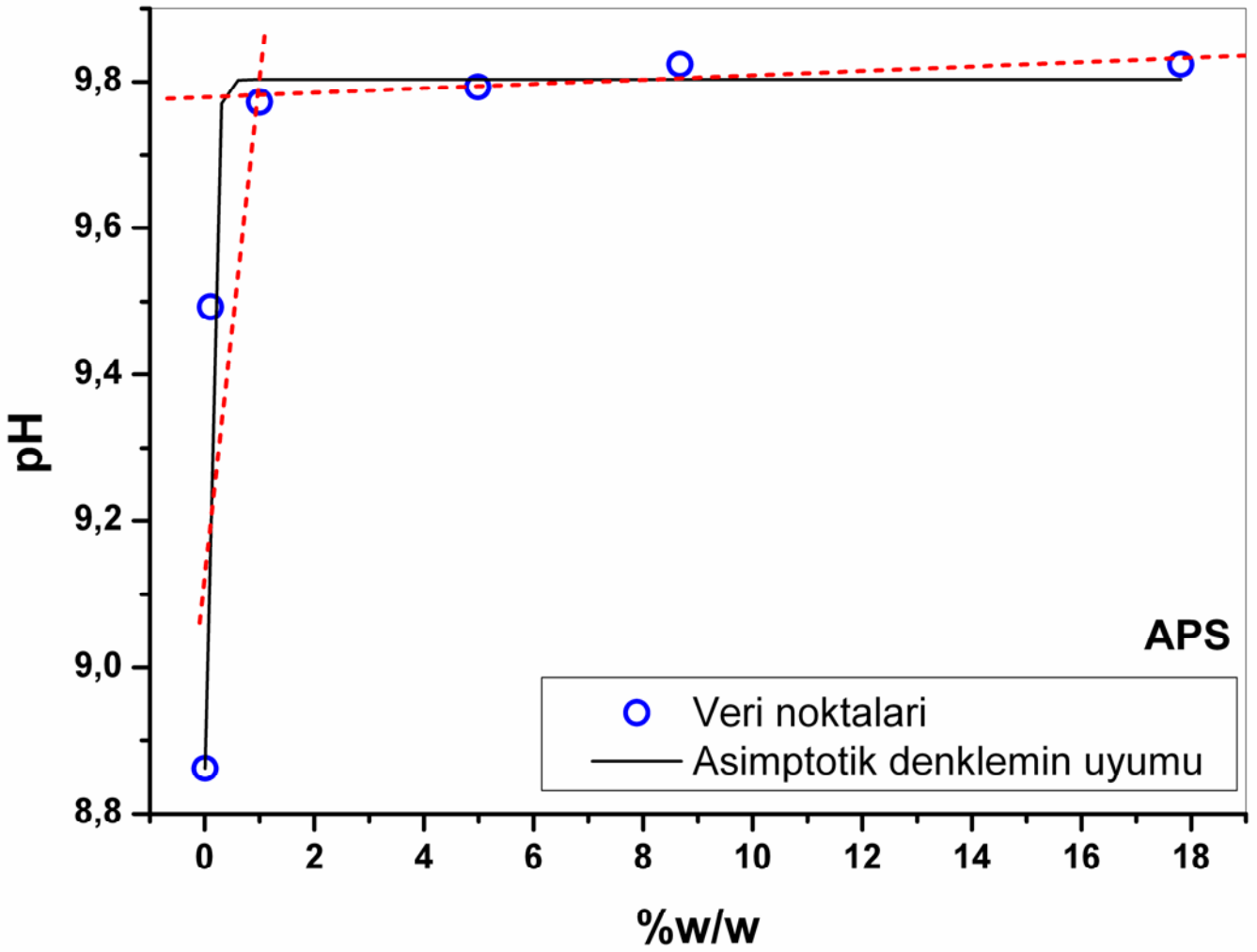
	Spektrofotometrik	Termogravimetrik	Elemental analiz
mgHA/gAPS	199	191	170

4.1.6. Yüzey yük özelliklerinin belirlenmesi

Yüzey yük özelliklerini incelemek amacıyla HA-APS ve EC-HA-APS için pH değişimi metodu, APS için de kütle titrasyon metodu kullanılmış olup; her bir metot ile elde edilen verilerden türetilen grafikler Şekil 4.8 ve Şekil 4.9'da verilmiştir. APS, HA-APS ve EC-HA-APS için hesaplanan pH_{pzc} değerleri incelendiğinde; APS'nin 9,8 olan pH_{pzc} değerinin immobilizasyon işleminden sonra 6,6'ya (HA-APS için) düştüğü görülmektedir. Yani; immobilizasyon işleminden sonra, yüzeye bağlanan HA makromoleküllerinin etkisiyle pH_{pzc} değerinde önemli bir düşüş gözlenmiştir. Bu durum; APS'deki $-NH_2$ gruplarının HA ile etkileştiğini göstermektedir. EC-HA-APS'nin pH_{pzc} değerinin ise 2,7'ye kadar düştüğü görülmektedir. HA-APS ve EC-HA-APS'nin yüzey yük özelliklerinde gözlenen bu önemli farklılaşma, kapatma işlemiyle APS'nin yüzeyinde bulunan ve HA ile reaksiyona girmemiş $-NH_2$ gruplarının asetillenmesi ve böylece bazik karakterinin azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. EC-HA-APS'nin düşük pH_{pzc} değerinin, EC-HA-APS için literatürde belirtilen (Koopal ve ark. 1998) izoelektrik nokta değerine (iep=2,6) yakın olduğu görülmüştür. Sonuç olarak; immobilizasyon ve asetilleme (end-capping) işlemleriyle yüzeyin asidik özelliklerinde belirgin bir artış olduğu tespit edilmiş ve HA'nın APS'ye amid-bağı yoluyla bağlandığı teyit edilmiştir.



Şekil 4.8. pH değişimi metoduna göre HA-APS ve EC-HA-APS için pH_{pzc} değerlerinin belirlenmesi



Şekil 4.9. Kütle titrasyon metoduyla APS için pH_{pzc} değerinin belirlenmesi [a]

[a] %w/w: katı kütlesinin süspansiyon kütlesine oranı

4.1.7. Katı-sıvı temas açısı ölçümleri

Katı-sıvı temas açısı (*contact angel*); katının sıvı tarafından ıslanabilme özelliğinin kantitatif bir ölçüsü olup; adsorpsiyon, yüzey serbest enerjisi, ara-yüzey gerilimi ve dağılma gibi birçok konu hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Kromatografide sabit faz olarak kullanılacak bir materyalin, hareketli faz olarak kullanılan çözücülerle ıslanabilmesi, kromatografik ayırmaların verimliliğini etkileyen önemli bir faktördür.

Optik bir yüzey gerilimi ölçüm cihazı, bir sıvı damlasının görüntüsünü kaydedip, damlanın şeklini zamanın bir fonksiyonu olarak analiz edebilir. Söz konusu damlanın şekli; ilgili sıvının yüzey gerilimi, öz kütlesi ve bulunduğu ortama bağlı olarak değişir. Katı bir yüzeye damlatılan bir sıvıya ait damlanın şekli, sistemdeki yüzey gerilimlerine [katı-sıvı (γ_{K-S}), katı-gaz (γ_{K-G}), sıvı-gaz (γ_{S-G})], bağlı olarak belirlenir. Damlanın katı yüzeyiyle oluşturduğu açı (θ) ile yüzey gerilimleri arasında Şekil 4.10'da verilen ilişki söz konusudur. θ açısının 90^o'den küçük olduğu durumlarda sıvının katıyı ıslattığı; daha büyük olduğu durumlarda ise ıslatmadığı kabul edilir. 0^o'lik bir θ açısı ise sıvının katıyı kusursuz bir şekilde ıslattığını gösterir (KSV instruments web adresi).

APS, HA, HA-APS ve EC-HA-APS için yürütülen temas açısı ölçümlerinde sıvı olarak Su ve MeOH kullanılmış ve elde edilen sonuçlar Tablo 4.4'te verilmiştir. Temas açısını hesaplamak için yüzeyde oluşturulan damlaların görüntüsü yüksek çözünürlükle kaydedilmiş ve bu görüntü sistemde Young-Laplace eşitliğine otomatik olarak uydurulmuştur. Yüzeydeki damlanın sağ ve sol taraflarından yapılan ölçümlerden hesaplanan temas açılarının ortalaması, sıvının katı yüzeye temas açısı olarak değerlendirilmiştir. Temas açısı temelindeki değerlendirmelerimizde; sıvı damlaları çalışılan katı yüzeylere damlatılmış ve gözlenen görüntü 5-10 saniye içerisinde kaydedilmiştir. Yani; çalışılan katı materyaller için temas açıları, damlanın yüzeye damlatılmasından kısa bir süre sonra ölçülmüş ve zaman içerisinde açıda meydana gelebilecek değişimler üzerinde yoğunlaşılmamıştır. Ayrıca; temas açısının ölçümünü etkileyebilecek, sıvının adsorpsiyonu gibi olgular için de detaylı değerlendirmelere gidilmemiştir.

Tablo 4.4'te verilen θ değerlerinden; Su ile ıslanma karakteri en yüksek katının EC-HA-APS olduğu söylenebilir. EC-HA-APS için hesaplanan $14,6^o$'lik temas açısı, yüzeyin hidrofilik karakterinin çok yüksek olduğunu göstermektedir. Ölçümler esnasında, Su damlasının EC-HA-APS yüzeyinde çok hızlı bir şekilde dağıldığı

görülmüştür. Ayrıca; EC-HA-APS için MeOH kullanılarak kaydedilen temas açısının 11,7 olduğu tespit edilmiştir. Yani; EC-HA-APS'nin hem Su hem de MeOH ile yüksek düzeyde bir ıslanabilme karakteri sergilediği görülmüştür.

HA-APS için kaydedilen görüntüden temas açısı 33,8^{o} olarak hesaplanmış olup, yüzeyin ıslanabilme karakterinin EC-HA-APS'den daha düşük olduğunu göstermektedir. HA-APS'nin bu davranışının, yüzeye bağlanmış HA makrolomeküllerinin sayısının EC-HA-APS'ye kıyasla daha fazla olması ve bu nedenle yüzeyin daha kapalı bir yapı sergilemesiyle ilişkili olduğu düşünülmüştür. HA-APS'de gözlenen bir diğer durum da; temas açısının 30-60 s içerisinde 15,7^{o} değerine düşmüş olmasıdır. Yapısında hidrofobik gruplar içeren maddelerin suya karşı benzer davranışlar sergilediği bilinmektedir (KSV instruments web adresi). Diğer taratan; HA-APS'nin MeOH ile daha kolay ıslanabildiği tespit edilmiş ve temas açısı değerinin 15,5^{o} olduğu görülmüştür.

HA gibi yapısında çok sayıda hidrofilik grup içeren bir maddenin su ile kolayca ıslanabilmesi beklenirken, HA için hesaplanan 62,0^{o}'lik temas açısı bunun böyle olmadığını göstermiştir. HA'nın sergilediği bu görece düşük ıslanabilme özelliğinin, HA makromoleküllerinin çok kuvvetli moleküller-arası etkileşmelere girmiş olması ve bunun bir sonucu olarak da yapının kolayca ıslanamayan kapalı bir şekle dönüşmüş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu durum; HA-APS'nin EC-HA-APS'ye göre suya karşı niçin daha düşük ıslanabilme özelliği sergilediğini açıklar mahiyettedir. Buna karşın; HA için MeOH kullanılarak kaydedilen temas açısının 8,5^{o} olduğu görülmüştür. Bu durumun, MeOH'nın yapısında hem hidrofobik (-CH_3) hem de hidrofilik (-OH) yapıları bir arada bulunduruyor olmasıyla ilişkili olduğu ve bu özelliği nedeniyle MeOH'nın HA'yı daha kolay ıslatabildiği düşünülmüştür.

APS için Su kullanılarak hesaplanan temas açısının (35,0^{o}) hem HA-APS, hem de EC-HA-APS için hesaplanan değerlerden (sırasıyla 33,8^{o} ve 14,6^{o}) yüksek olduğu görülmüştür. Bu nedenle; APS'nin su molekülleriyle ıslanabilme karakterinin daha düşük olduğu söylenebilir. RPLC şartlarında APS ve EC-HA-APS sabit fazlarıyla doldurulmuş 4,6x100'lük kromatografik kolonlarla yürütülen kromatografik işlemlerde, APS'nin sistemde görece çok yüksek basınç oluşumuna yol açtığı görülmüştür. Bu nedenle, APS sabit fazı ile yürütülen kromatografik işlemlerde 0,50 mL/dak'lık akış hızında bile sistemde yüksek basınç gözlenmiştir. Diğer taraftan; EC-HA-APS ile (hem RPLC hem de HILIC şartlarında) yürütülen kromatografik işlemlerde 5,00 mL/dak'lık akış hızlarında bile gözlenen basıncın çok yüksek olmadığı görülmüştür. Bu durum;

immobilizasyon işlemiyle APS'nin sabit faz özelliklerinde olumlu anlamda bir değişikliğin meydana gediğini göstermektedir. Ayrıca; EC-HA-APS'nin su molekülleriyle çok hızlı bir şekilde ıslanması, buna karşın HA-APS'nin daha zayıf bir ıslanabilme karakteri sergilemesi, kapatma (*end-capping*) işlemiyle HA immobilize edilmiş materyallerin ıslanabilme karakterinin arttığını göstermektedir. APS için MeOH kullanılarak hesaplanan 14,9^{o}'lik temas açısı, APS'nin MeOH ile kolayca ıslanabildiğini göstermekle birlikte, EC-HA-APS'nin hem Su hem de MeOH ile daha düşük temas açıları sergilemesi nedeniyle, HA'nın immobilizasyonuyla APS'nin çalışılan çözücülerle ıslanabilme karakterinde belirgin bir artışın meydana geldiği anlaşılmaktadır.

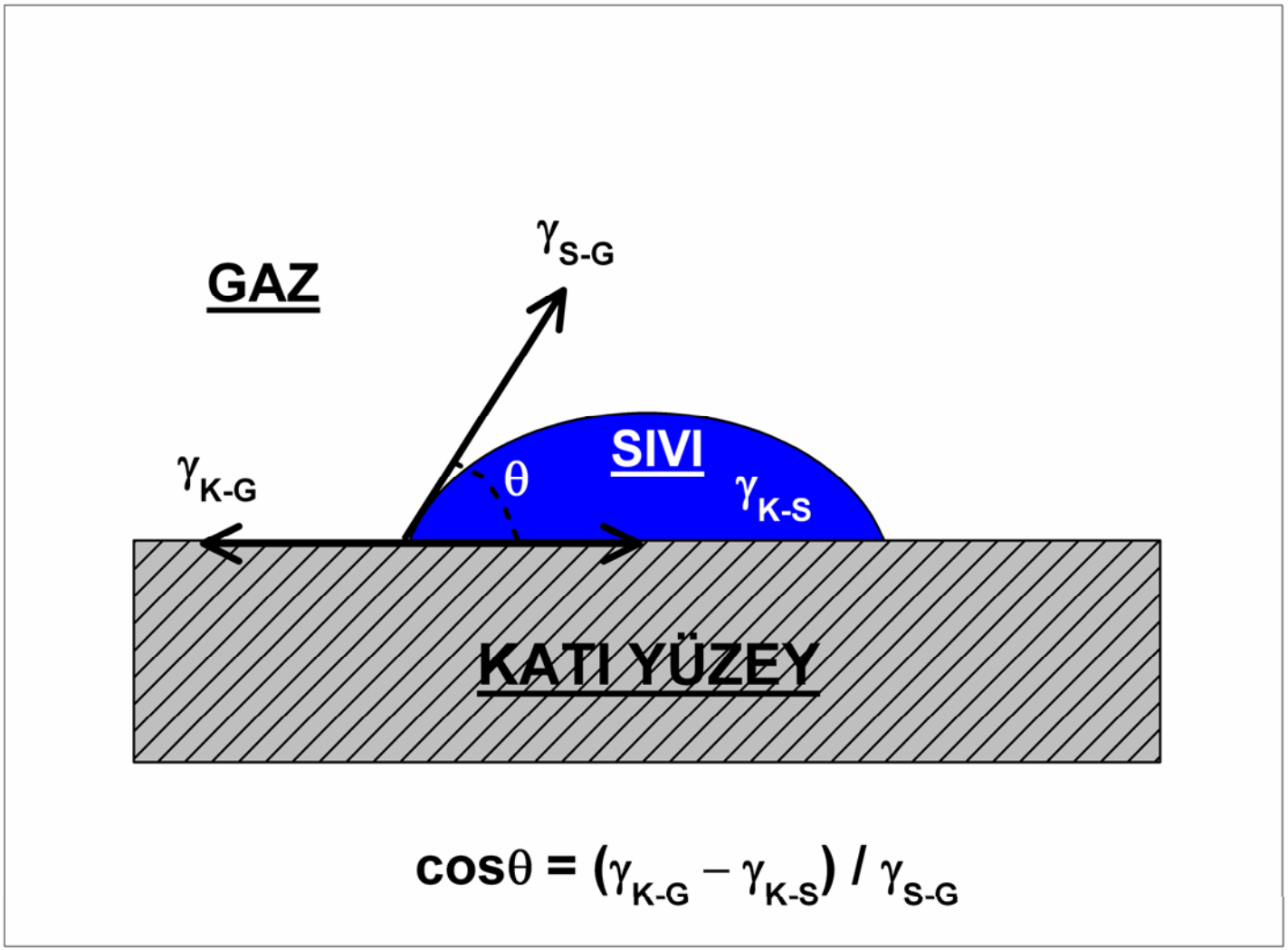
İncelenen katıların hepsi Su ve MeOH'ya karşı 90^{o}'den daha küçük temas açısı sergilediğinden; bu katıların çalışılan sıvılar ile ıslanabildiği görülmüş, fakat su ile en iyi ıslanan katının EC-HA-APS olduğu anlaşılmıştır. Benzer sonuçlar MeOH ile de elde edilmiş olup, EC-HA-APS'nin her iki çözücüye karşı sergilediği bu özelliğin, Su ve Su ile karışabilen çözücülerle yürütülecek kromatografik işlemlerde faydalı olacağı düşünülmüştür.

APS, HA, HA-APS ve EC-HA-APS için suyun yüzeye damlatılmasından 5-10 saniye sonra kaydedilen ve temas açılarının hesaplanmasında kullanılan görüntüler Şekil 4.11'de verilmiştir.

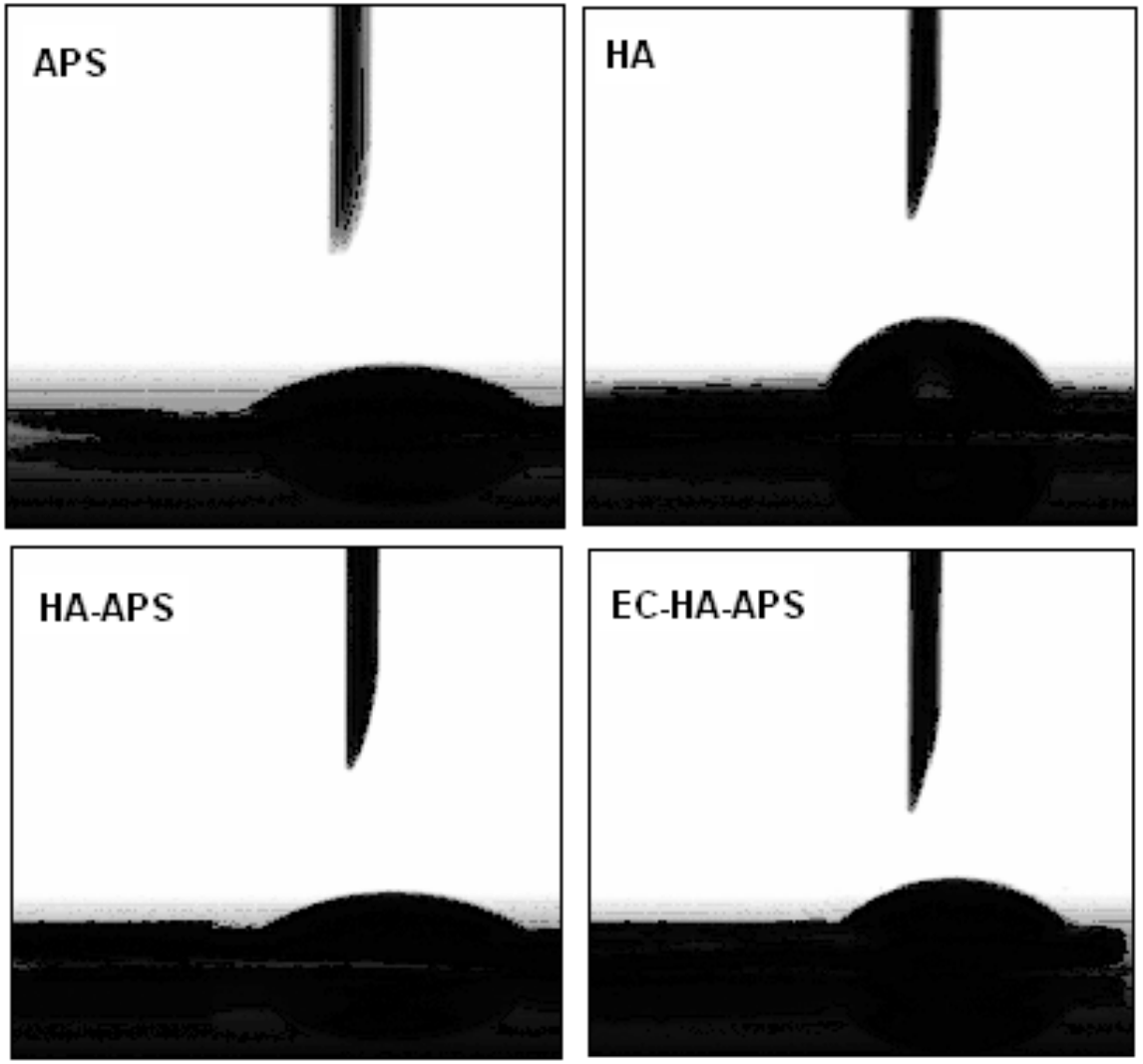
Tablo 4.4. HA, APS, HA-APS ve EC-HA-APS için hesaplanan temas açısı (θ) değerleri [a]

	HA	**APS**	**HA-APS**	**EC-HA-APS**
θ_{ort} (Su)	62,0 ^{o}	35,0 ^{o}	33,8 ^{o}	14,6 ^{o}
θ_{ort} (MeOH)	8,46 ^{o}	14,9 ^{o}	15,5 ^{o}	11,7 ^{o}

[a] Veriler; sıvı faz olarak Su ve MeOH'nın kullanıldığı şartlarda elde edilmiştir. Her bir durum için damla hacmi 2-6 µL olup, ölçümler oda sıcaklığında (~20-25 ^{o}C) yapılmıştır.



Şekil 4.10. Temas açısı (contact angle) ile sistemdeki yüzey gerilimleri arasındaki ilişkinin şematik olarak gösterimi

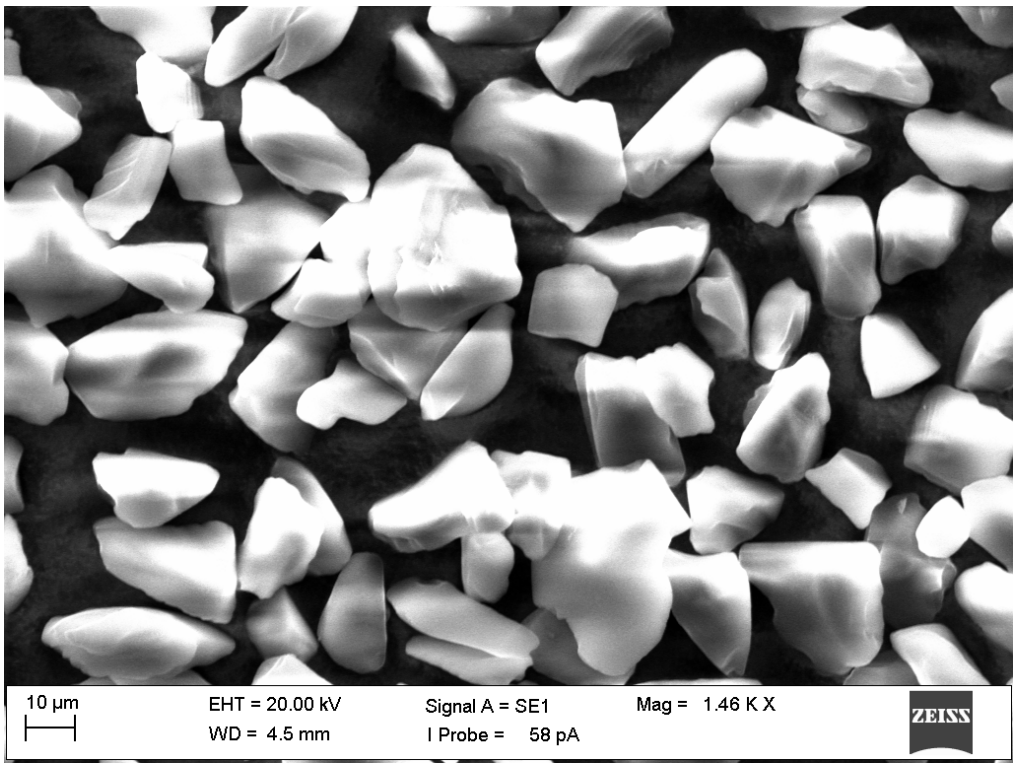


Şekil 4.11. APS, HA, HA-APS ve EC-HA-APS için yüzeyde kaydedilen ve temas açılarının hesaplanmasında kullanılan damla görüntüleri

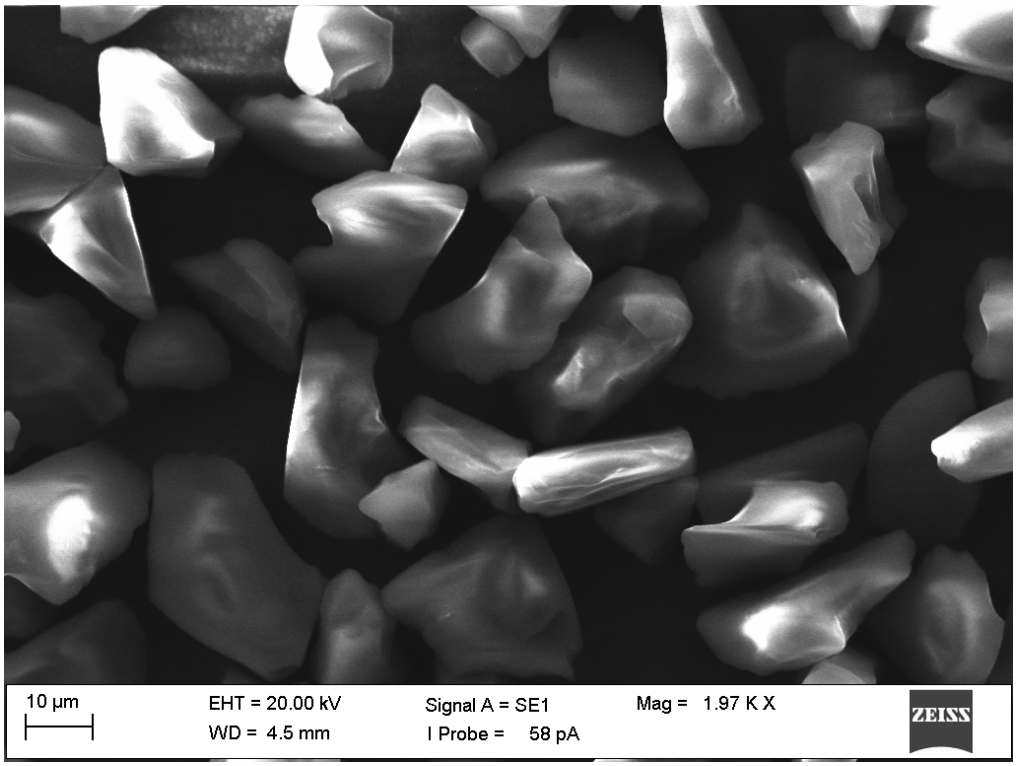
4.1.8. SEM analizleri

APS, HA-APS ve EC-HA-APS'nin partikül yapısı ve partikül boyutlarındaki dağılımlar hakkında fikir edinebilmek için taramalı elektron mikroskobu (SEM) ile bu katıların yüzey görüntüleri alınmıştır.

APS (Şekil 4.12) ve EC-HA-APS (Şekil 4.13) için verilen görüntüler incelendiğinde; partikül boyutu, üretici firma tarafından belirtilen 15-35 μm aralığında değişen parçacıklar olduğu gibi; bu aralıktan sapan parçacıkların da bulunduğu görülebilir. Ayrıca; partiküllerin üniform bir geometrik yapı sergilediklerini söylemek güç olup; küresel bir yapı sergilemedikleri görülmektedir. Ticari olarak temin edilebilen sabit fazlarda kullanılan parçacıkların bu çalışmada kullanılan katı destek maddesine kıyasla daha üniform bir dağılım sergilediklerini ve küresel bir geometride bulunduklarını belirtmek gerekir.



Şekil 4.12. APS için SEM görüntüsü



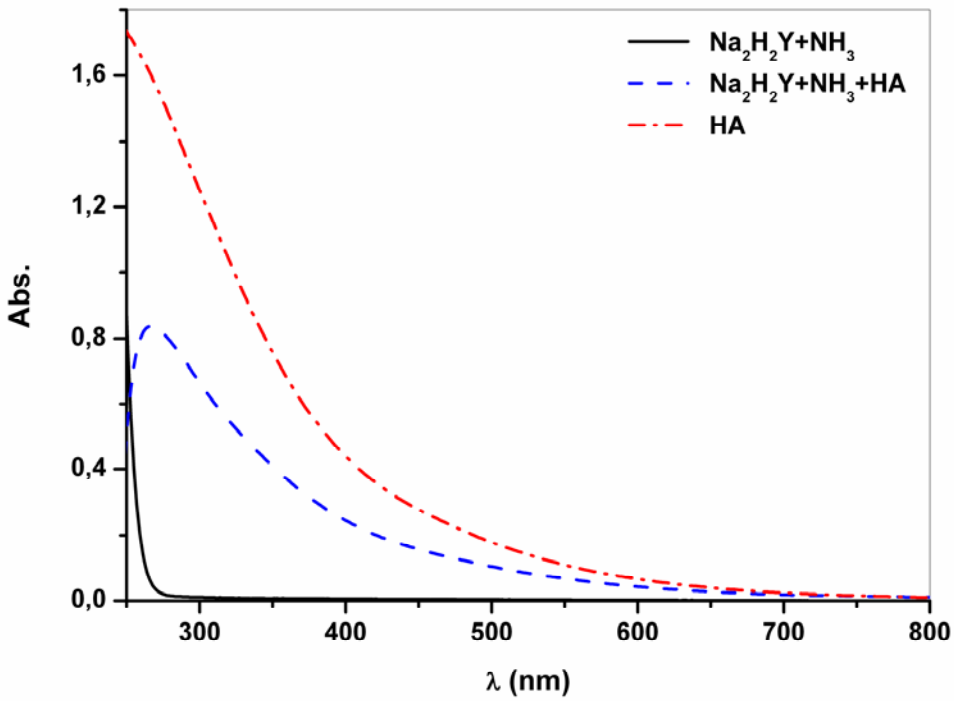
Şekil 4.13. EC-HA-APS için SEM görüntüsü

4.1.9. Çözünürlük testleri

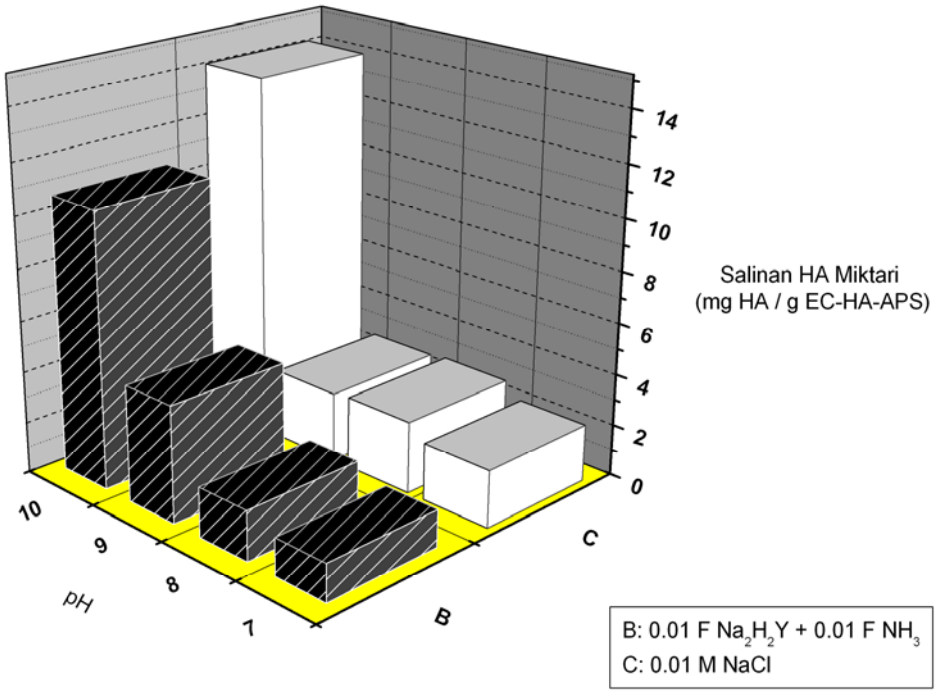
EC-HA-APS'nin kararlılığı hakkında bilgi edinmek amacıyla, farklı pH değerlerinde yapıdan ayrılan HA miktarları UV-Vis. spektrofotometrik ölçümlerle tayin edilmiştir. Bu kapsamdaki çalışmalar, farklı pH değerlerindeki NaCl ve $Na_2H_2Y+NH_3$ çözeltilerinde yürütülmüştür. İncelenen şartlarda, EC-HA-APS'den salınan HA miktarı UV-Vis. spektrofotometresi ile 410 nm'de tayin edilmiştir. HA, $Na_2H_2Y+NH_3$ ve $HA+Na_2H_2Y+NH_3$ karışımları için kaydedilen UV-Vis. spektrumları Şekil 4.14'te verilmiş olup; şekilden, 410 nm'de $Na_2H_2Y+NH_3$ karışımının çok düşük absorbans değeri verdiği ve bu nedenle ölçümlerde herhangi bir zorluk çıkarmayacağı anlaşılmaktadır.

0,01 M NaCl çözeltilerinde yürütülen çözünürlük testlerinden, EC-HA-APS'nin pH=8'e kadar dayanım sergilediği görülmüştür (Şekil 4.15). Bu şartlarda, pH=7 ve 8'de EC-HA-APS'den salınan HA miktarının, çalışılan tüm şartlarda, immobilize olmuş toplam HA miktarının %2'sini geçmediği görülmüştür. Bu da; EC-HA-APS'nin bu şartlarda çok iyi bir dayanım sergilediğini göstermektedir.

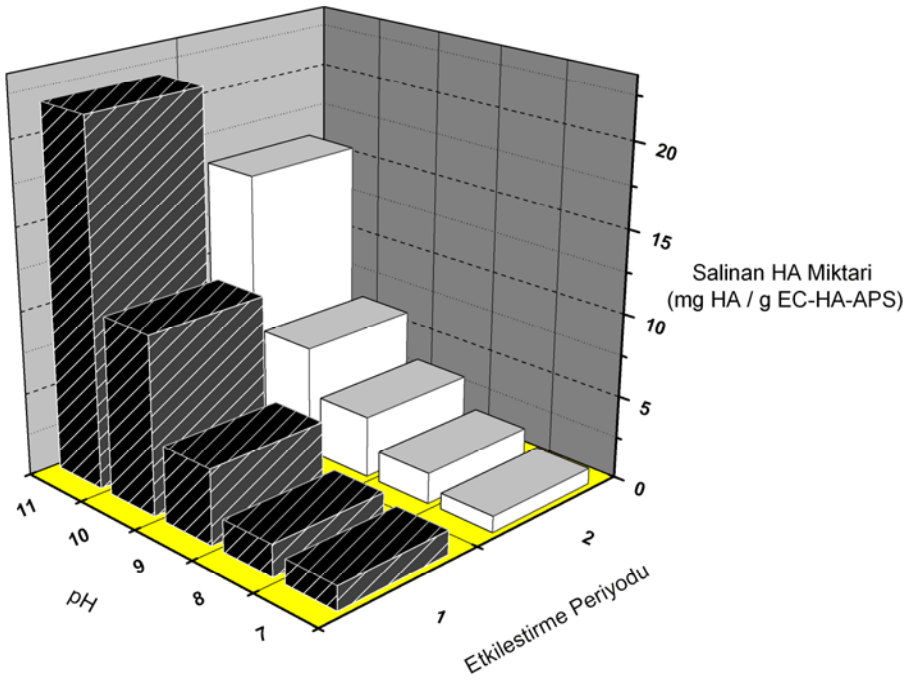
Benzer şekilde; 0,01 F Na_2H_2Y+0,01 F NH_3 (pH=7; 8; 9; 10 ve 11) karışımı ile 72 saat süreyle etkileştirilen EC-HA-APS'nin pH=8'e kadar yüksek dayanım sergilediği görülmüştür (Şekil 4.16). Bu karışımla ardıl iki adet 72 saatlik etkileştirme işleminden sonra bile, pH=8'de yüzeyden ayrılan HA makromoleküllerinin toplam miktarı EC-HA-APS'nin gramı başına 5 mg'ı geçmemiştir. İkinci periyotta bir miktar daha salınımın olduğu dikkate alındığında, pH=8'in yukarısındaki pH değerlerinin sabit faz için riskli olabileceği düşünülmüştür. Bu durum; silika esaslı materyallerde gözlenen genel bir karakterdir. Ayrıca; tampon çözeltilerin silika esaslı sabit fazlardaki ligandların yüzeyle yaptıkları bağları zayıflattıkları da bilinmektedir. Literatürde, EC-HA-APS için verilen çözünürlük testleri ile ilgili sınırlı düzeydeki verilerin genellikle NaCl çözeltileriyle elde edildiği ve çözünürlükteki eğilimlerle ilgili çok kapsamlı bilgilerin sunulmadığı görülmüştür. Bu çalışmada yürütülen çözünürlük testlerinden; EC-HA-APS'nin hem NaCl hem de Na_2H_2Y+NH_3 ortamındaki çözünme eğilimi değerlendirilmiştir. Yüksek pH değerlerinde bile salınan HA miktarının düşük olması, HA ile APS arasında kimyasal bağ oluşumuna dayanan bir etkileşmenin varlığını teyit etmiştir.



Şekil 4.14. Sulu ortamda çözünmüş HA, Na_2H_2Y+NH_3 ve HA+Na_2H_2Y+NH_3 karışımları için kaydedilen UV-Vis. Spektrumları



Şekil 4.15. EC-HA-APS'den ayrılan HA miktarının 0,01 M NaCl ve $Na_2H_2Y+NH_3$ ortamlarında değerlendirilmesi



Şekil 4.16. $Na_2H_2Y+NH_3$ ortamında EC-HA-APS'den ayrılan HA miktarının ardıl iki etkileştirme için değerlendirilmesi

4.1.10. EC-HA-APS'nin metal bağlama özelliklerinin değerlendirilmesi

EC-HA-APS'yi *Cu*-EC-HA-APS ve *Co*-EC-HA-APS'ye dönüştürmek için sırasıyla $Cu(NO_3)_2$ ve $CoCl_2$ çözeltileri kullanılmış ve metal iyonu çözeltileri sabit faza (basamaklı frontal analiz, SFA, metodunda olduğu gibi) basamaklı bir şekilde yüklenmiştir. Bunun için metal iyonunun yaklaşık 100 mM'lık bir çözeltisi hazırlanmış ve bu stok çözelti HPLC sisteminde bulunan dörtlü pompa yardımıyla sistem içerisinde uygun konsantrasyonlara seyreltilerek kolona beslenmiştir. Kolon her bir konsantrasyon için dengeye ulaştığında (ilgili breakthrough eğrisi plato değerine ulaştığında), besleme çözeltisinin konsantrasyonu bir sonraki konsantrasyona arttırılmıştır (Şekil 4.17 ve Şekil 4.18). Son basamaktan sonra kolona Su beslenmiş ve zayıf tutulmuş ve/veya tutulmamış metal iyonlarının kolondan uzaklaştırılması sağlanmıştır. Böylece; metal iyonları sabit faza basamaklı bir yöntemle yüklenmiş ve aynı zamanda metal iyonları için denge adsorpsiyon verilerinin türetilebileceği breakthrough eğrileri de SFA metoduyla elde edilmiştir.

SFA; klasik frontal analizin farklı bir uygulaması olup, denge adsorpsiyon izoterm verilerinin kısa bir süre içerisinde türetilebilmesine olanak sağlamaktadır. Bu metotta; analitin besleme çözeltisindeki konsantrasyonu, kademeli bir şekilde arttırılır veya azaltılır. Besleme çözeltisinin konsantrasyonunun kademeli bir şekilde arttırıldığı SFA modu göz önünde bulundurulursa; önce, analit en düşük konsantrasyonda beslenir ve ilgili breakthrough eğrisi plato değerine ulaşınca sistemin dengeye geldiği anlaşılır. Yani bu durumda, kolona beslenen çözelti konsantrasyonu ile kolondan çıkan çözelti konsantrasyonu birbirine eşit hale gelir ve besleme çözeltisinin konsantrasyonu bu noktada bir derece arttırılır. Çalışılan konsantrasyon değerlerine karşılık gelen breakthrough eğrileri (analizde herhangi bir kesiklik olmaksızın) bu şekilde sırasıyla elde edilir. Besleme aşamasında gözlenen breakthrough eğrisinin keskin bir çıkış sergilemesi kaydıyla, *i* platosuna karşılık gelen konsantrasyon (C_i) için sabit faz tarafından tutulan analit miktarı (q_i) aşağıdaki formülle hesaplanabilir:

$$q_i = q_{i-1} + \frac{(V_{R,i} - V_0) \times (C_i - C_{i-1})}{V_S} \quad ; C_i > C_{i-1} \geq 0$$

Burada; $V_{R,i}$ ilgili breakthrough eğrisinin alıkonma hacmini, V_0 ölü hacmi ve *i*-1 kolonun *i* basamağına geçmeden önceki durumunu göstermektedir. Cu(II) ve Co(II) için kaydedilen SFA eğrileri Şekil 4.17 ve Şekil 4.18'te verilmiş olup, son konsantrasyona

(100 mM) karşılık gelen plato değeri gözlendikten sonra kolona Su beslenmiş ve aşağı doğru inen bir breakthrough eğrisi (*diffuse rear*) elde edilmiştir. Bu; denge adsorpsiyon verilerinin "karakteristik noktaya göre frontal analiz" (*frontal analysis by characteristic point*, FACP) metoduyla hesaplanabileceği eğridir. Denge adsorpsiyon verilerinin FACP metoduyla türetilebilmesi için; istenen konsantrasyon değerine karşılık gelen nokta eğri üzerinde belirlenir ve eğrinin bu konsantrasyonun altında kalan alanı (ölü hacim çıkarıldıktan sonra) integrasyonla hesaplanır. Hesaplanan bu alan, ilgili konsantrasyon değerinde analitin tutulan miktarını verir. FACP metoduyla, adsorpsiyon izotermi için çok sayıda nokta elde etmek mümkündür. Fakat bu metottan iyi sonuçlar elde edebilmek için çalışılan şartlarda kolonun teorik tabaka sayısının yüksek olması ve detektörün dikkatli bir şekilde kalibre edilmesi gerekmektedir (Guiochon 1994, Gezici 2009).

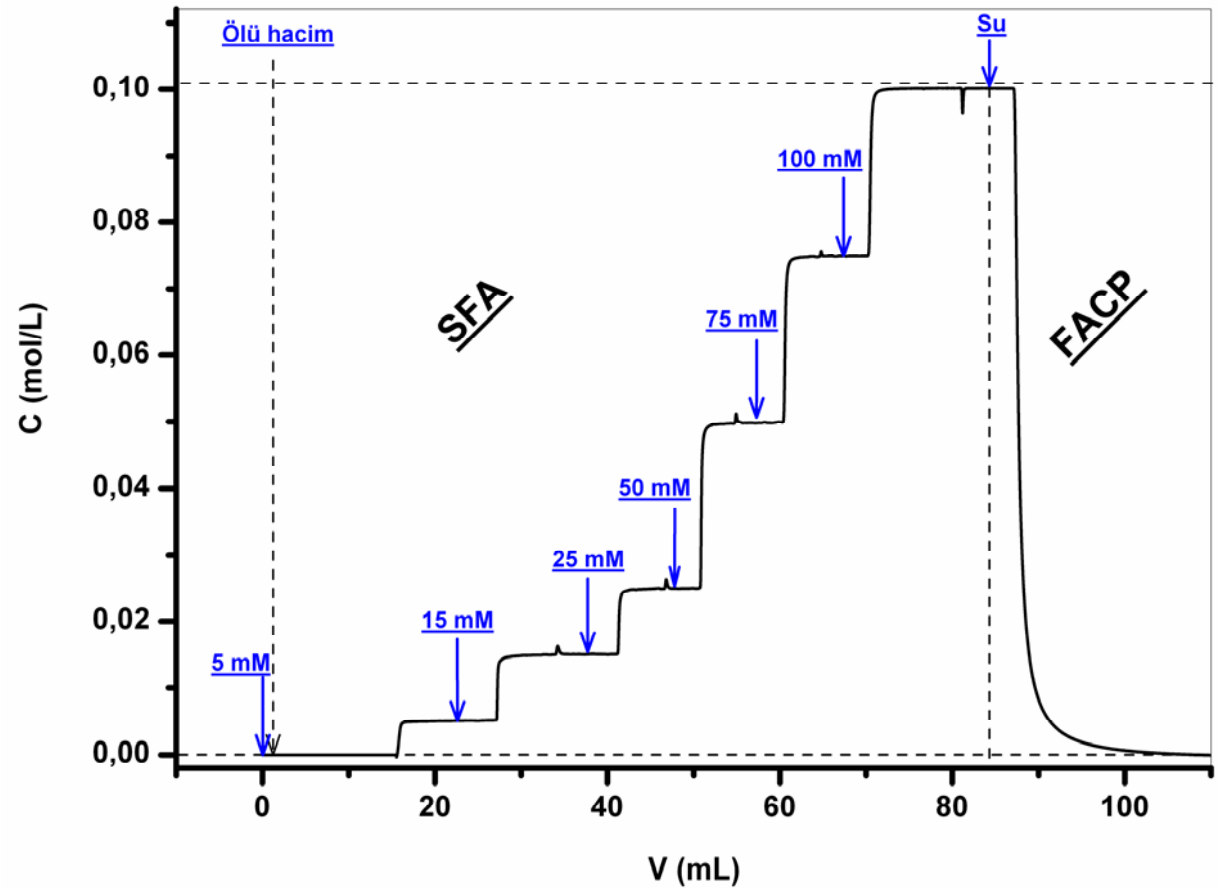
Cu(II) için denge sorpsiyon verileri hem SFA hem de FACP metoduyla türetilmiş olup; Co(II) için veriler sadece SFA metoduyla hesaplanmıştır. Hesaplanan veriler Tablo 4.5'te toplu halde verilmiştir. SFA ve FACP metotlarıyla elde edilen verilere bakıldığında; düşük konsantrasyonlar için hesaplanan veriler hariç, diğer verilerin birbirine yakın oldukları görülebilir. Düşük konsantrasyonlarda gözlenen bu farklılaşma, düşük konsantrasyonlarda kolondaki yayılmaların FACP metodunda kullanılan eğrinin şekli üzerinde yüksek bir etkiye sahip olmasından kaynaklanmaktadır. Ayrıca; FACP metodunda teorik tabaka sayısı arttıkça frontal analiz ve FACP metotları ile hesaplanan verilerin birbiriyle daha tutarlı hale geldikleri belirtilmiştir (Guiochon, 1994). SFA metoduyla elde edilen verilerin doğruluğu daha yüksek olduğundan (Guiochon, 1994), çalışmalarımızda izoterm verilerinin türetilmesinde SFA metoduyla elde edilen veriler kullanılmıştır.

Tablo 4.5. Cu(II) ve Co(II) için EC-HA-APS üzerinde hesaplanan denge sorpsiyon verileri [a]

Cu(II) için SFA metoduyla hesaplanan veriler						
C (mmol/mL)	0,005	0,015	0,025	0,050	0,075	0,100
q (mmol/g)	0,073	0,108	0,134	0,188	0,234	0,278
Cu(II) için FACP metoduyla hesaplanan veriler						
C (mmol/mL)	0,005	0,015	0,025	0,050	0,073	0,100
q (mmol/g)	0,048	0,088	0,116	0,170	0,213	0,256
Co(II) için SFA metoduyla hesaplanan veriler						
C (mmol/mL)	0,005	0,015	0,025	0,050	0,075	0,100
q (mmol/g)	0,059	0,110	0,122	0,188	0,247	0,297

[a] Metal iyonu çözeltileri 0,50 mL/dak'lık bir akış hızında beslenmiş ve kolon fırınının sıcaklığı 25 ^{o}C'ta sabitlenmiştir. Metal iyonlarının orijinal çözeltileri kullanılmış olup, herhangi bir pH ayarlaması yapılmamıştır. Deteksiyon dalga boyları Cu(II) ve Co(II) için sırasıyla 595 ve 507 nm'dir. Kromatografik kolon, 4,6x150 mm ölçülerindedir.

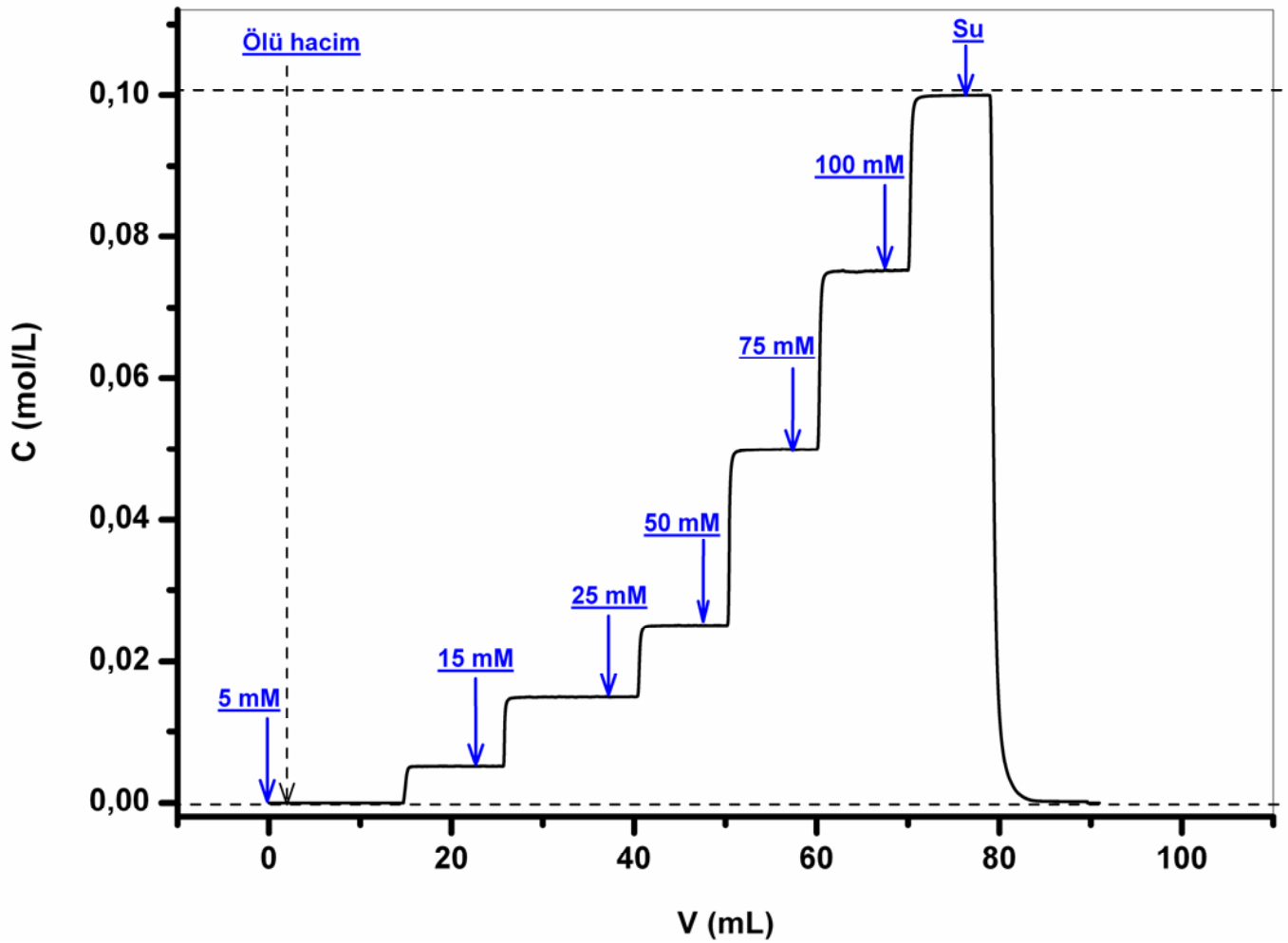
EC-HA-APS'yi ligand değiştirici şekle SFA metodu ile dönüştürmenin, kolona tek basamakta 100 mM'lık metal iyonu çözeltisi yüklemekten daha avantajlı olduğu görülmüştür. SFA metodu ile yapılan metal iyonu yüklemelerinde hem tutulan metal iyonu miktarının daha fazla olduğu, hem de tutulan metal iyonunun bağlanma stabilitesinin daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu durum; basamaklı yüklemenin bir sonucu olarak, immobilize HA makromoleküllerinde meydana gelen konformasyonel değişimlerle ilişkilendirilmiştir.



Şekil 4.17. Cu(II) için elde edilen breakthrough eğrileri ve denge izoterm verilerinin türetilmesinde kullanılan metotların bu eğriler üzerinde uygulandığı bölgelerin grafiksel gösterimi [a]

Besleme çözeltisi: $Cu(NO_3)_2$ (Herhangi bir pH ayarlaması yapılmamıştır); Akış hızı: 0,50 mL/dak; Sıcaklık: 25 ^oC; Dalga boyu: 595 nm; Kolon: 4,6x150

[a] Platolarda görünen küçük pikler, ilgili konsantrasyonlarda uygulanan pertürbasyonlardan kaynaklanmaktadır. Pertürbasyonlar; sorpsiyon verilerinin Langmuir tipi tutulmalara uygun bir dağılım sergileyip-sergilemediği hakkında kaba bir bilgi elde etmek amacıyla kullanılmıştır.



Şekil 4.18. Co(II) için EC-HA-APS üzerinde elde edilen breakthrough eğrileri

Besleme çözeltisi: $CoCl_2$ (Herhangi bir pH ayarlaması yapılmamıştır); Akış hızı: 0,50 mL/dak; Sıcaklık: 25 ^{o}C; Dalga boyu: 507 nm; Kolon: 4,6x150

Cu(II) ve Co(II) iyonlarının EC-HA-APS sabit fazına sorpsiyon karakteri, Scatchard eğri analizi ile değerlendirilmiştir. Aşağıda verilen klasik Langmuir denkleminin (Langmuir, 1916) matematiksel bir transformasyonu olan Scatchard transformasyonu (Scatchard, 1949), veri noktalarındaki dağılımın değerlendirilmesi ve farklı afiniteye sahip bağlanma bölgeleri üzerinde gerçekleşen tutulma tipleriyle ilişkilendirilmesi bakımından büyük kolaylık sağlamaktadır. Bir Scatchard eğrisi; q/C oranının q'ya karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilir. Elde edilen grafikteki veri noktaları, eğimi negatif olan bir doğru üzerinde dağılıyorsa, tutulmaların Langmuir tipi tutulmalara uyduğu ve tutulmalarda rol alan fonksiyonel grupların tek tip olduğu kabul edilir. Eğer veri noktaları, eğimleri negatif olan iki doğru üzerinde dağılıyorsa, tutulmada farklı afiniteye sahip iki farklı bağlanmanın rol aldığı ve her bir doğruya karşılık gelen konsantrasyon aralığında gerçekleşen bağlanmaların Langmuir tipi tutulmalara uyduğu söylenebilir. Scatchard eğrisi üzerinde noktaların pozitif bir eğim sergileyecek şekilde dağılmaları durumunda ise; bağlanmaların Langmuir tipi tutulmalara uymadığı kabul edilir (Gezici ve ark. 2007, Ayar ve ark. 2007).

$$* \quad q = \frac{q_m K_b C}{1 + K_b C} \quad (\textit{Klasik Langmuir denklemi})$$

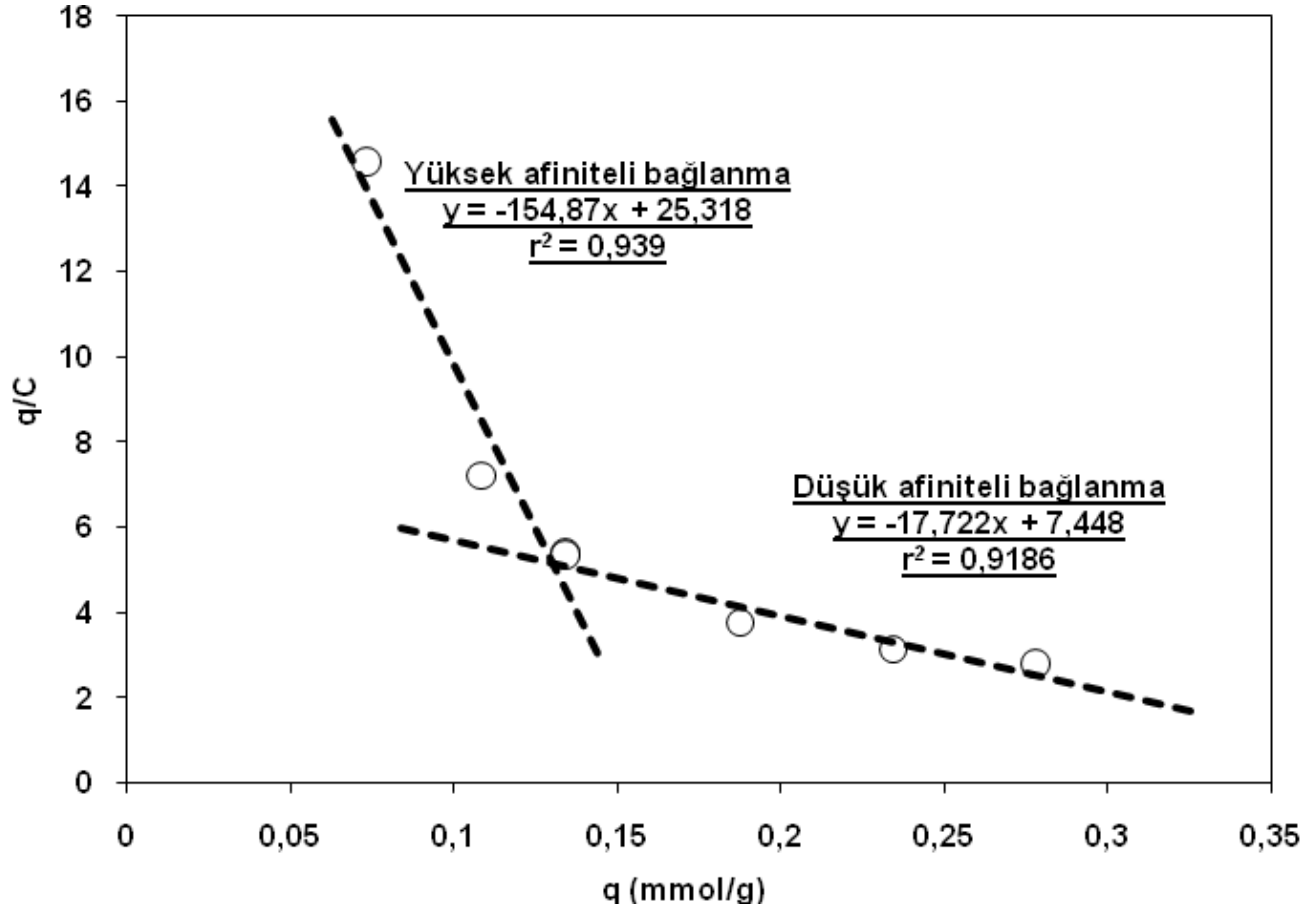
$$* \quad \frac{q}{C} = q_m K_b - q K_b \quad (\textit{Scatchard transformasyonu})$$

Cu(II) ve Co(II) için Şekil 4.19 ve Şekil 4.20'de verilen Scatchard eğrilerinden, her iki metal iyonunun da farklı afiniteye sahip iki tip tutulma üzerinden EC-HA-APS'ye bağlandığını söyleyebiliriz. Scatchard eğrilerinden hesaplanan izoterm parametreleri Tablo 4.6'da verilmiş olup; afinite sabitlerinden (K_b), EC-HA-APS'nin Cu(II) iyonlarına karşı sergilediği afinitenin (Co(II) iyonlarına kıyasla) daha yüksek olduğu sonucuna gidilebilir. Düşük konsantrasyonlarda EC-HA-APS'nin metal iyonlarına karşı daha yüksek afinite sergilediği de K_b değerlerinden görülebilir. Sonuç olarak; çalışılan metal iyonlarının EC-HA-APS'ye farklı afiniteye sahip iki tür spesifik etkileşme üzerinden bağlandığı söylenebilir. Söz konusu bu etkileşmelerin büyük oranda iyon-değiştirme ve kompleks oluşumu mekanizmalarına dayandığı düşünülmüştür. Düşük konsantrasyonlarda metal iyonlarının EC-HA-APS'ye daha yüksek afiniteli tutulmalarla bağlanması nedeniyle, bu şartlarda kompleks oluşum mekanizmasının daha aktif bir rol aldığı; yüksek konsantrasyonlarda ise iyon-değiştirme ve görece daha düşük kararlılığa sahip komplekslerin oluştuğu kompleks oluşum

mekanizmalarının rol almış olabileceği sonucuna gidilmiştir. FTIR spektrumlarında (Şekil 4.3), karbonil gruplarıyla ilişkili bantların şiddetinde gözlenen değişimler de metal iyonlarının sabit faz ile spesifik etkileşmeler üzerinden etkileştiği fikrini desteklemektedir. Metal iyonlarının EC-HA-APS ile karboksil ve fenolik –OH grupları üzerinden etkileştiği ve bu etkileşmelerde hem iyon-değiştirme hem de kompleks oluşumu mekanizmalarının rol aldığı düşünülmektedir.

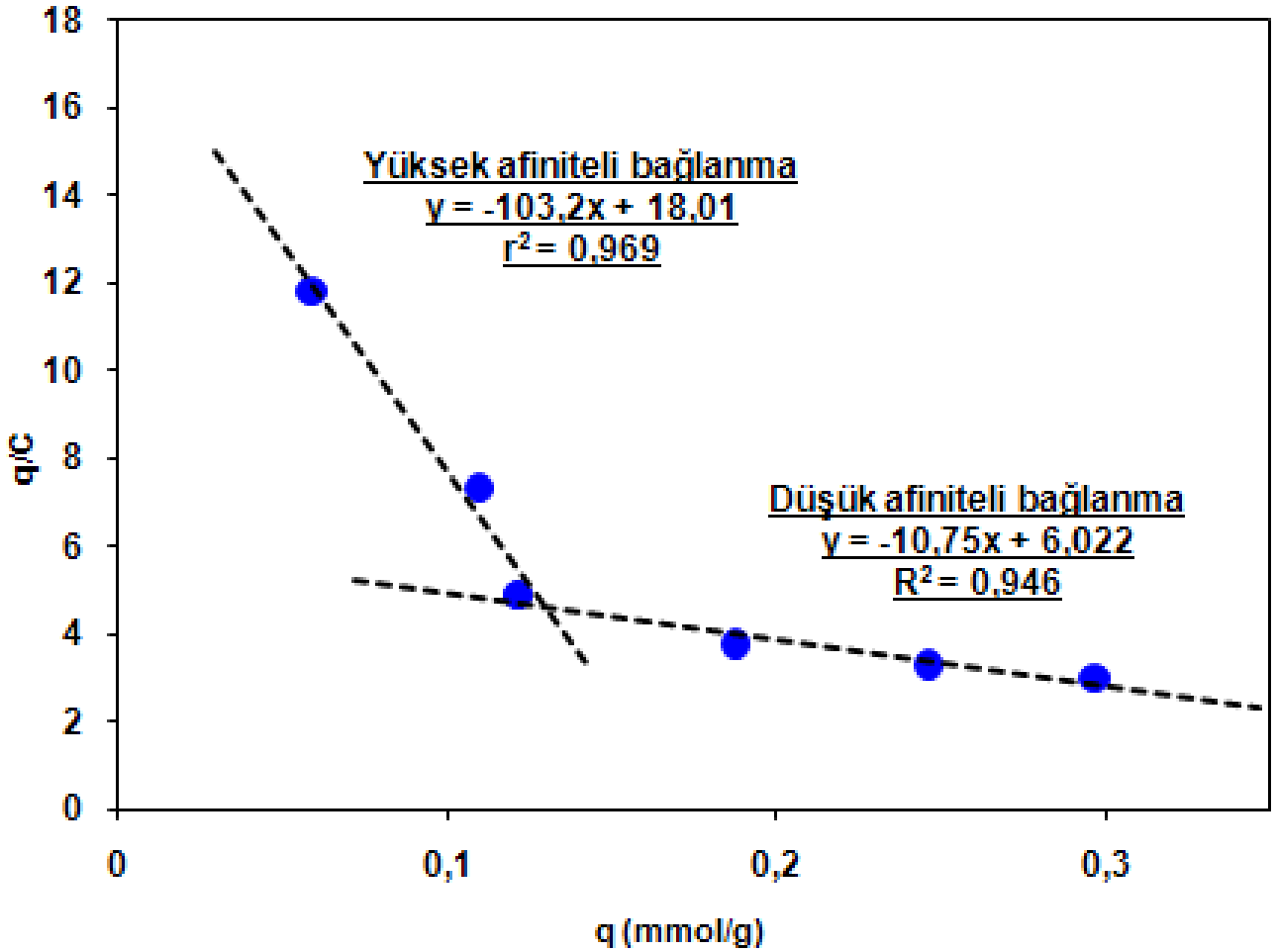
Tablo 4.6. Cu(II) ve Co(II) için Scatchard eğri analizi temelinde hesaplanan izoterm parametreleri

	Yüksek afiniteli bağlanmalar		*Düşük afiniteli bağlanmalar*	
	K_b (L/mol)	q_m (mmol/g)	K_b (L/mol)	q_m (mmol/g)
Cu(II)	154,9	0,164	17,72	0,420
Co(II)	103,2	0,174	10,75	0,560



Şekil 4.19. Cu(II) için Scatchard eğrisi

(Kesikli çizgilerle gösterilen doğrular, farklı afiniteye sahip bağlanma tipleriyle ilişkilendirilmiş olup, Langmuir izoterm parametreleri bu doğruların eğimi ve kesim notasından hesaplanmıştır)



Şekil 4.20. Co(II) için Scatchard eğrisi

(Kesikli çizgilerle gösterilen doğrular, farklı afiniteye sahip bağlanma tipleriyle ilişkilendirilmiş olup, Langmuir izoterm parametreleri bu doğruların eğimi ve kesim notasından hesaplanmıştır)

Sabit faza bağlanmış Cu(II) iyonlarının stabilitesini test etmek ve kullanılabilecek hareketli fazların etkisiyle sabit fazdan ayrılan Cu(II) iyonlarının miktarını belirlemek için kolona Cu(II) yüklendikten sonra taban çizgisi elde edilinceye kadar kolon Su ile yıkanmış ve ardından sırasıyla aşağıdaki hareketli fazların belirtilen miktarlarıyla etkileştirilmiştir:

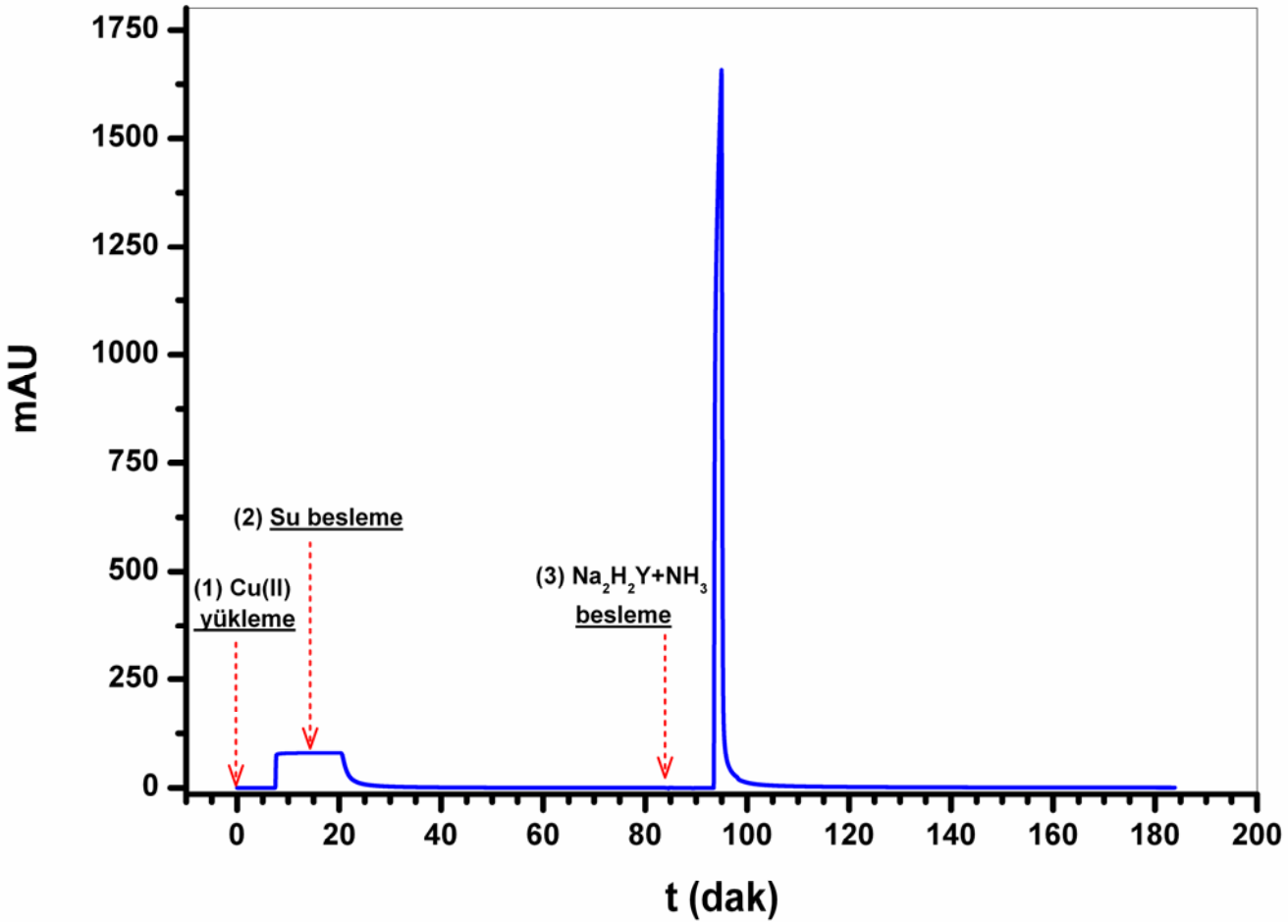
a) Su-MeOH; 3:1 (v/v); 500 mL
b) 0,1 F NH_3-MeOH; 3:1 (v/v); 185 mL; pH=6,0
c) 0,1 F NH_3-MeOH; 3:1 (v/v); 170 mL; pH=7,0
d) 0,1 F $NaCH_3COO$-MeOH; 3:1 (v/v); 395 mL; pH=7,0
e) 0,05 M NaCl-MeOH; 3:1 (v/v); 195 mL; pH=7,0

Her bir durum için kolondan çıkan hareketli faz kısımları toplanıp AAS ile analiz edilmiştir. AAS analizlerinde, standart ekleme metodu kullanılmış ve böylece matris etkisinden gelebilecek girişimlerin etkisi minimum düzeye indirilmeye çalışılmıştır. Yukarıdaki hareketli faz sistemlerinin (yaklaşık olarak) toplam 1,5 L'siyle etkileştirilen kolondan, tutulan Cu(II) iyonlarının %22,9'unun ayrıldığı görülmüştür (Bu işlemler süresince kullanılan hareketli faz sistemlerinden önce herhangi bir Cu(II) yüklemesi yapılmamıştır). *Cu*-EC-HA-APS'nin, yaklaşık 1,5 L hareketli fazla etkileştirildikten sonra bile kolona yüklenmiş Cu(II) iyonlarının yaklaşık %77'sini muhafaza etmesi, Cu(II) iyonlarının EC-HA-APS sabit fazı üzerinde kararlı bir şekilde immobilize olabildiğinin bir göstergesi olarak değerlendirilmiştir.

Co-EC-HA-APS için stabilite testleri sadece Su ve Su-MeOH hareketli faz sistemleriyle gerçekleştirilmiştir. Yaklaşık 2,0 L hareketli fazla etkileştirilen *Co*-EC-HA-APS'den ayrılan Co iyonlarının yaklaşık %25 dolayında olduğu görülmüştür. Yani; EC-HA-APS'ye bağlanmış Co iyonlarının %75'inin kararlı bir şekilde bağlandığı görülmüştür. Analizler süresince, EC-HA-APS'den ayrılan yaklaşık %25'lik bu metal iyonu miktarı, LEC şartlarında yürütülecek analizlerin tekrarlanabilirliğini olumsuz yönde etkileyebilir. Bu nedenle; kolonun her gün metal iyonu yüklenerek rejenere edilmesinin uygun olacağı düşünülmüştür. Bu şekilde yapılan günlük rejenerasyon işlemlerinin, LEC şartlarında kolonun verimliliğini arttırdığı görülmüştür.

Cu(II) iyonlarının 0,1 F Na_2H_2Y+0,1 F NH_3 (pH=7,5) çözeltisi ile sıyrılma verimliliğini değerlendirmek için; 0,1 F Na_2H_2Y+0,1 F NH_3 (pH=7,5) çözeltisi ve ardından su beslenerek yıkanan kolona tekrar Cu(II) iyonları yüklenmiştir. Bunun için

kolona 0,10 mol/L'lik Cu(II) çözeltisi beslenmiş ve sistem dengeye geldikten sonra kolon, taban çizgisi elde edilinceye kadar Su ile yıkanmıştır. Daha sonra, kolona 0,1 F Na_2H_2Y+0,1 F NH_3 (pH=7,5) çözeltisi beslenerek kolonda tutulmuş Cu(II) iyonları sıyrılmış ve kolondan çıkan hareketli faz kısımları AAS ölçümleri için toplanmıştır. Bu işlemler HPLC sisteminde herhangi bir kesiklik olmadan yürütülmüş ve her bir aşamada elde edilen breakthrough eğrileri Şekil 4.21'de verilmiştir. Cu(II) iyonlarının beslenmesi aşamasında elde edilen breakthrough eğrisinden kolonda tutulan Cu(II) miktarı hesaplanmış ve 0,1 F Na_2H_2Y+0,1 F NH_3 (pH=7,5) çözeltisi ile sıyırma aşamasında toplanan çözeltideki Cu(II) miktarı (AAS ölçümleri ile tayin edilmiştir) ile karşılaştırılmıştır. Benzer işlemler Co(II) için de yürütülmüş ve 0,1 F Na_2H_2Y+0,1 F NH_3 (pH=7,5) çözeltisi ile Cu(II) ve Co(II) iyonlarının %98±2'lik bir geri kazanımla sıyrılabildiği görülmüştür. Her iki metal iyonu için elde edilen yüksek sıyırma verimi, EC-HA-APS sabit fazının LEC şartlarında sabit faz olarak kullanıldıktan sonra 0,1 F Na_2H_2Y+0,1 F NH_3 (pH=7,5) çözeltisi ile etkileştirilip kolayca RPLC ve HILIC şartlarında kullanılabilecek şekle dönüştürülebileceğini göstermiştir. Bu nedenle; EC-HA-APS'nin, farklı HPLC modlarında çalışmaya elverişli bir sabit faz karakteri sergilediği düşünülmüştür.



Şekil 4.21. Cu(II) iyonlarının EC-HA-APS üzerinden 0,1 F Na_2H_2Y+0,1 F NH_3 (pH=7,5) çözeltisi ile geri kazanımını değerlendirmek amacıyla yürütülen işlemler ve bu işlemler sırasında elde edilen eğriler

Cu(II) yükleme: 0,10 mol/L $Cu(NO_3)_2$ –Herhangi bir pH ayarlaması yapılmamıştır; Sıcaklık: 25 ^oC; Sıyırma işlemi 0,1 F Na_2H_2Y+0,1 F NH_3 (pH=7,5) çözeltisi ile yapılmıştır

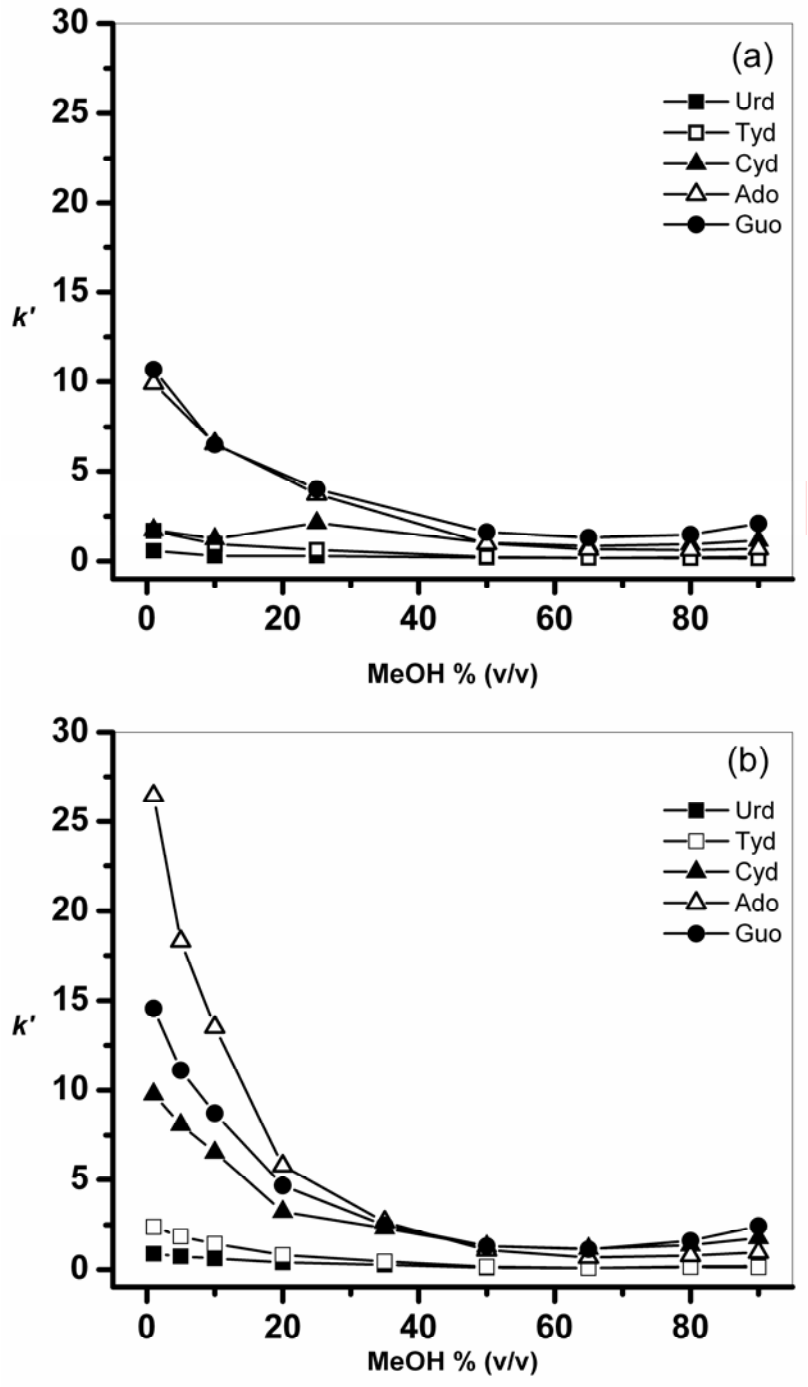
4.2. RPLC ve HILIC Şartlarında Yürütülen Kromatografik İşlemler

4.2.1. Şartlandırma işleminin etkisi

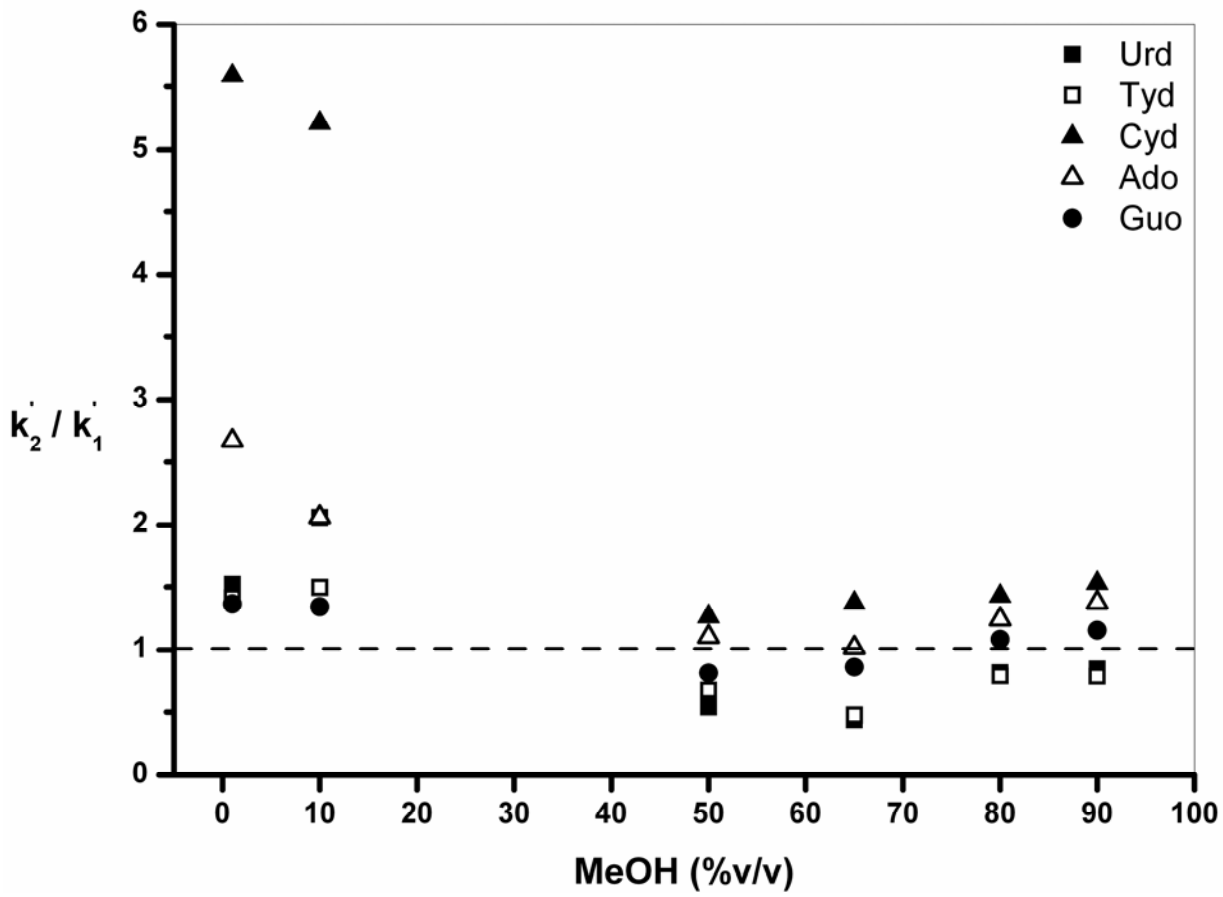
HPLC'de sabit faz olarak kullanılacak bir materyal ile tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek son derece önemlidir. Özellikle; hümik asit gibi karmaşık bir yapıya sahip bir makromolekülün katı destek maddesine immobilizasyonuyla elde edilen sabit faz ile elde edilen sonuçların tekrarlanabilirliğinin çok dikkatli bir şekilde değerlendirilmesi gerekmektedir. Bu nedenle; öncelikle, EC-HA-APS'nin bazı nükleositlere karşı sergilediği sabit faz özelliklerinin kararlılığı üzerinde durulmuştur. Bu amaçla; çalışılan türlerin sabit faz üzerinde sergilediği *k'* değerlerinin hareketli fazdaki MeOH yüzdesine bağlı olarak değişimi, kolonun ilk kullanılmaya başlandığı zamandan itibaren, *k'* değerlerindeki günler-arası tekrarlanabilirlik düzeyi ≤%3 (bağıl standart sapma) oluncaya kadar periyodik olarak incelenmiştir. Belirtilen tekrarlanabilirlik düzeyine ulaşıldıktan sonra kolonun uygun bir şekilde şartlandığı kabul edilmiş ve şartlandırılmış kolon üzerinde diğer analizler yürütülmeye başlanmıştır.

Kolonun ilk kullanılmaya başlandığı zamanda çalışılan türler için hesaplanan *k'* değerleri, aynı kolonun uygun şartlanma düzeyine erişmesinden sonra hesaplanan *k'* değerleriyle karşılaştırmalı olarak Şekil 4.22'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü üzere; şartlandırma işleminin etkisiyle türlerin *k'* değerlerinde belirgin değişimler meydana gelmiştir. Hareketli fazdaki MeOH yüzdesinin düşük olduğu şartlarda bu değişimlerin daha belirgin olduğu tespit edilmiş olup, şartlandırma işleminin etkisiyle türlerin elüsyon-sıralamasında da bazı değişimler gözlenmiştir. Şartlandırma işleminden sonra türlerin elüsyon-sırasında en önemli değişim Ado ile Guo türlerinde görülmüştür: Şartlandırma işlemine tabi tutulmamış sabit faz üzerinde Ado ile Guo'nun *k'* değerleri birbirine çok yakın çıkarken; şartlandırma işleminden sonra Ado'nun *k'* değerinde belirgin bir artış tespit edilmiş ve Guo'dan daha sonra elue olmuştur. *k'* değerlerindeki farklılaşmayı daha iyi değerlendirebilmek amacıyla, hareketli fazın çeşitli bileşimlerinde, incelenen her bir nükleosit için şartlandırma işleminden önce (k'_1) ve sonra (k'_2) elde edilen *k'* değerleri karşılaştırmalı olarak Şekil 4.23'te verilmiştir. Şekilden; hareketli fazdaki MeOH yüzdesinin %10 ve daha düşük olduğu durumlarda Cyd, Ado ve Guo için hesaplanan *k'* değerlerindeki artışın diğer türlere kıyasla yüksek olduğu görülmektedir. Diğer taraftan; Urd ve Tyd için bu şartlarda elde edilmiş *k'* değerlerindeki değişimin düşük olduğu söylenebilir. Hareketli fazdaki MeOH içeriğinin

%50 ve daha yüksek olduğu durumlarda ise tüm türler için hesaplanan *k'* değerlerindeki değişimlerin görece daha düşük olduğu görülmüştür.



Şekil 4.22. Hareketli fazdaki MeOH oranına bağlı olarak nükleositlerin kapasite faktörlerindeki değişim (a) Şartlandırma işleminden önce, (b) Şartlandırma işleminden sonra
Hareketli faz: Su-MeOH; Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Sıcaklık: 25 ^{o}C; Kolon: 4,6x100 mm ölçülerinde EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi: 2 µL (Not: Şekillerde verilen her bir nokta, en az iki tekrar analizinden elde edilen sonuçların aritmetik ortalamasıdır)

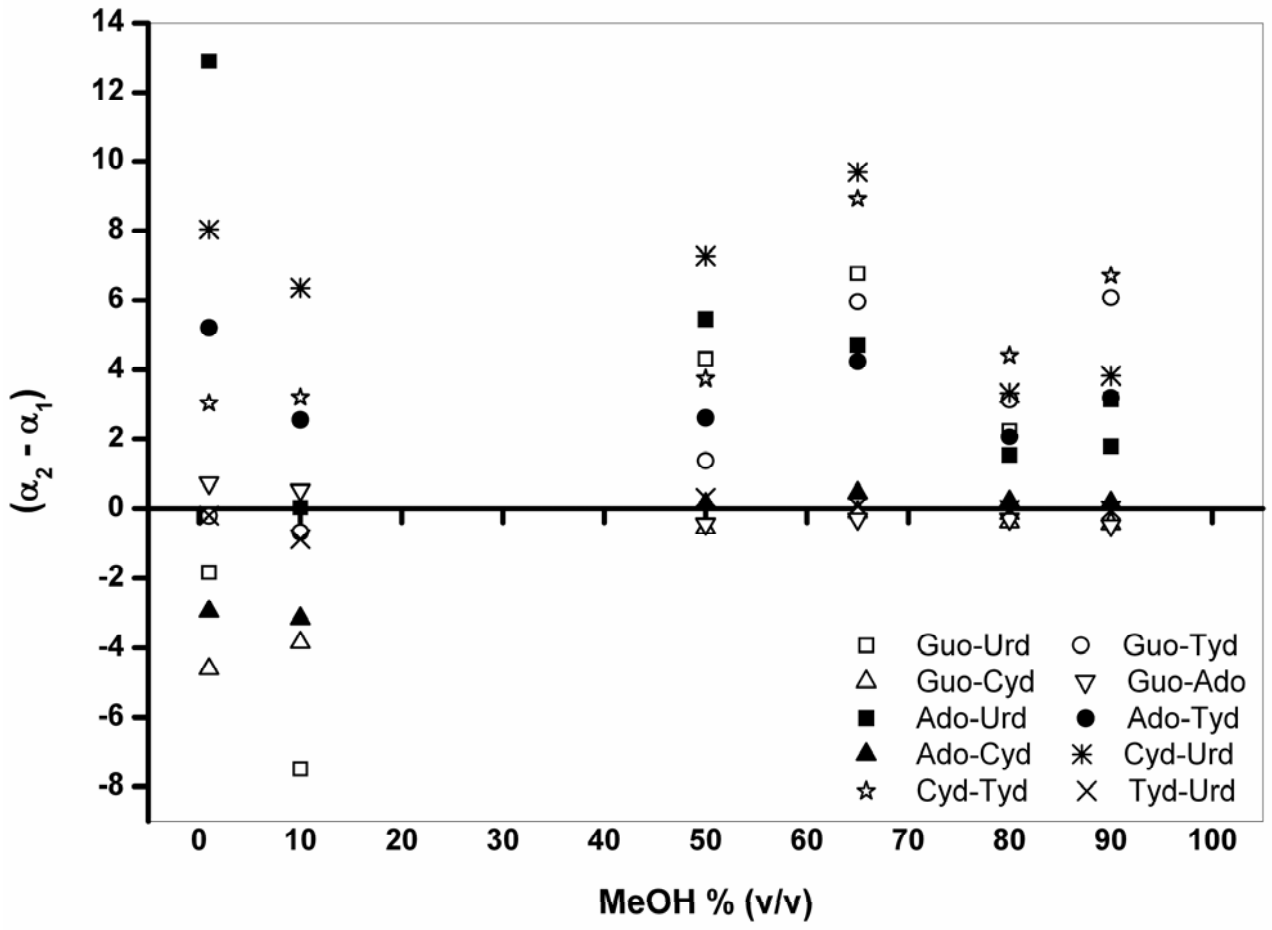


Şekil 4.23. Hareketli fazdaki MeOH oranına bağlı olarak nükleositler için şartlandırma işleminden önce ($k_1^{'}$) ve sonra ($k_2^{'}$) kaydedilen *k'* değerlerinin karşılaştırmalı olarak gösterimi

Hareketli faz: Su-MeOH; Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Sıcaklık: 25 ^{o}C; Kolon: 4,6x100 mm ölçülerinde EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi: 2 µL

Şartlandırma işleminin etkisiyle, sabit fazın türlere karşı sergilediği seçicilikte de önemli değişimlerin meydana geldiği görülmüştür. Seçicilik faktörlerindeki (α_1 ve α_2) değişim (α_2–α_1), Şekil 4.24'te verilmiş olup; hareketli fazdaki organik yürütücü oranına bağlı olarak zaman içerisinde sabit fazın incelenen türlere karşı seçiciliğinde bir artışın söz konusu olduğu görülmektedir.

Elde edilen verilerden; şartlandırma işleminin hem kapasite hem de seçicilik üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu görülmüş ve şartlandırma işleminden sonra çalışılan kolon üzerinde elde edilen verilerdeki tekrarlanabilirliğin yüksek olduğu tespit edilmiştir. Şartlandırma işleminin; sabit faz taneciklerinin kolonda daha uygun bir şekilde istiflenmesi ve immobilize olmuş HA makromoleküllerinin uygun hidratasyon/solvasyon derecesine ulaşması gibi etkilere sahip olduğu düşünülmektedir. Bu nedenle; sabit fazı Su ve MeOH bakımından zengin hareketli fazlarla, hem kolona doldurmadan önce hem de kolon şartlarında, uygun bir süre etkileştirme işleminin, sabit fazın kromatografik analizler için kararlı bir yapıya kavuşması bakımından son derece önemli olduğu sonucuna varılmıştır. Sabit fazın kolona doldurulmadan önce su-MeOH karışımında birkaç gün bekletilmesiyle şartlandırma işleminin daha kısa sürede tamamlanabileceği düşünülmektedir.

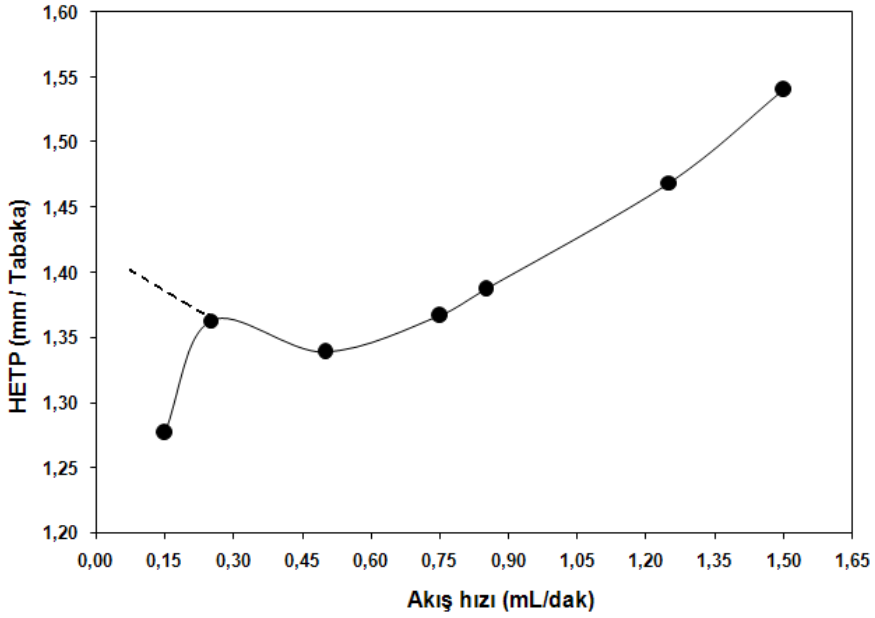


Şekil 4.24. Nükleositler için EC-HA-APS üzerinde şartlandırma işleminden önce (α_1) ve sonra (α_2) kaydedilen α değerlerindeki değişimin hareketli fazdaki MeOH oranına bağlı olarak gösterimi

Hareketli faz: Su-MeOH; Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Sıcaklık: 25 ^{o}C; Kolon: 4,6x100 mm ölçülerinde EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi: 2 µL

4.2.2. Hareketli faz akış hızının etkisi

Uygun şartlanma düzeyine erişen kolon üzerinde farklı akış hızlarında Su-MeOH (3:1; v/v) hareketli faz sistemi kullanılarak Urd ve Cyd türleri için teorik tabaka yükseklikleri (HETP) hesaplanmış ve iki tür için hesaplanan değerlerin ortalaması alınarak HETP ile akış hızı arasındaki ilişki incelenmiştir (Şekil 4.25). Şekilden de görüldüğü gibi, hareketli fazın akış hızı 1,50 mL/dak'dan 0,50 mL/dak'ya düşürüldükçe HETP azalmaktadır. Fakat; akış hızı 0,50'den 0,25 mL/dak'ya düşürüldüğünde HETP'de artış gözlenmiştir. Yani; 0,25-1,50 mL/dak aralığında en yüksek teorik tabaka sayısı 0,50 mL/dak'da elde edilmiştir. Akış hızı 0,25 mL/dak'dan 0,15 mL/dak'ya düşürüldüğünde HETP'nin biraz daha yükselmesi beklenirken tam tersine düştüğü görülmüştür (şekilde kesikli çizgi ile gösterilmemiştir). Çok düşük akış hızlarında elde edilen bu sonuç, türlerin düşük akış hızlarında sabit fazın gözeneklerinde daha iyi bir şekilde difüze olmasıyla ilişkilendirilmiştir. Elde edilen verilerden; analizlerin 0,50 mL/dak'lık akış hızında yürütülmesinin uygun olacağı sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.25. Teorik tabaka yüksekliği (HETP) ile hareketli faz akış hızı arasındaki ilişkinin grafiksel gösterimi [a]

(Hareketli faz: 0,1 F NH_3-MeOH (3:1; v/v); Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Sıcaklık: 25 ^oC; Kolon: 4,6x100 EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi: 2 µL)

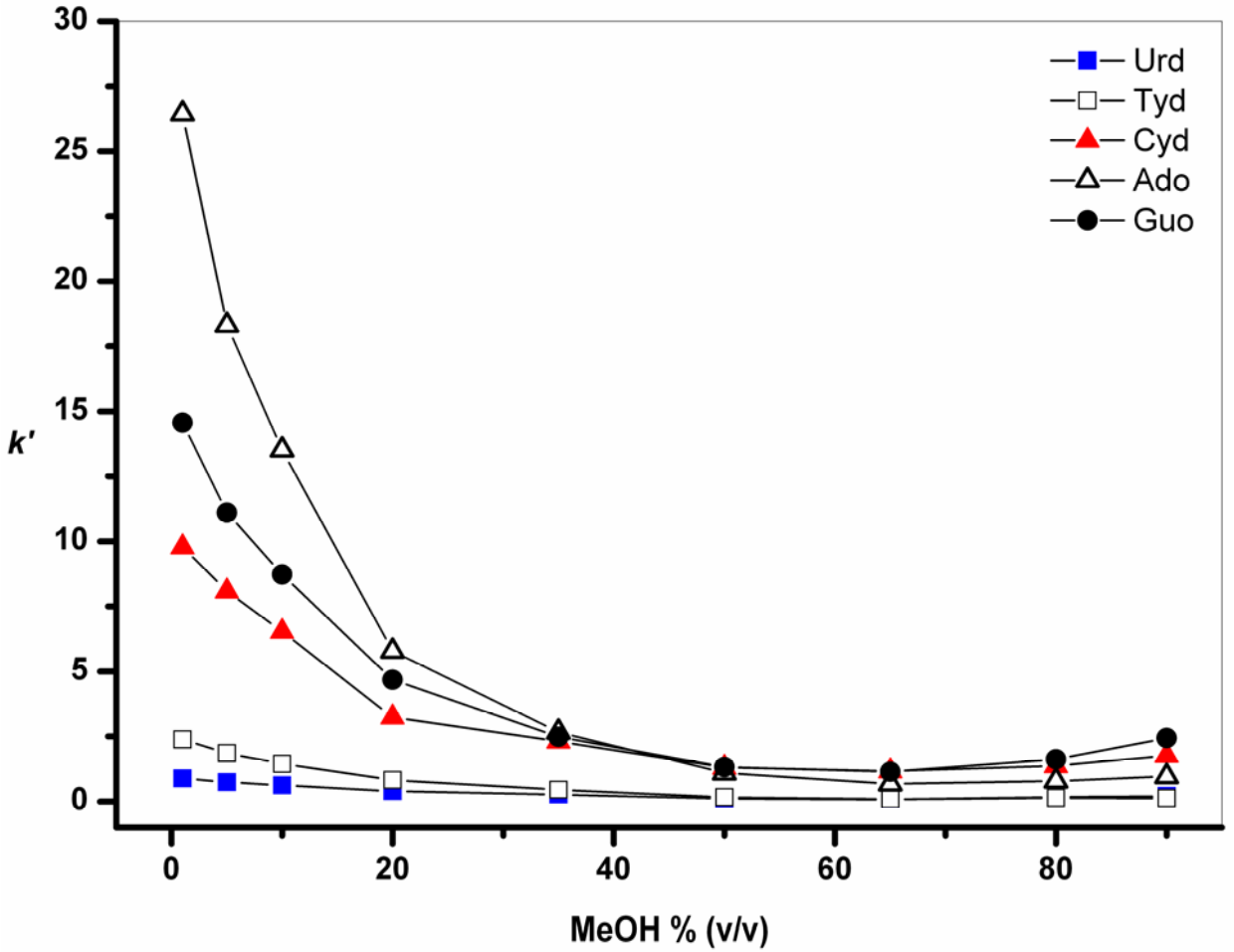
[a] Grafikte verilen akış hızlarına karşılık gelen HETP değerleri, Urd ve Cyd türleri için hesaplanan HETP değerlerinin ortalamasıdır. NH_3 çözeltisinin pH'sı, 0,1 M HCl ile 7,0'a ayarlanmıştır.

4.2.3. Hareketli fazdaki organik çözücü türü ve yüzdesinin etkisi

Hareketli fazın polaritesi ve çözücü etkisi, HPLC'de metot geliştirme amacıyla kullanılan parametrelerin en önemlilerindendir. Hareketli fazdaki organik çözücü türü ve oranının, incelenen türlerin kromatografik davranışları üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğu bilinmektedir. Bu amaçla; organik çözücü olarak çeşitli oranlarda MeOH veya MeCN'nin kullanıldığı sulu hareketli fazlarla bazı denemeler yürütülmüş ve hareketli fazdaki organik çözücü yüzdesine bağlı olarak çalışılan türlerin *k'* değerlerindeki değişimler incelenmiştir.

Hareketli fazdaki MeOH yüzdesindeki artışa bağlı olarak nükleositlerin *k'* değerlerinde, önce azalma ve sonra bir miktar artma yönünde bir eğilim gözlenmiştir (Bkz. Şekil 4.26 ve Tablo 4.7). Yani; *k'* değerleri, hareketli fazın MeOH yüzdesine karşı "iç-bükey" bir eğri sergilemiştir. MeOH oranının %60'tan daha yüksek ve daha düşük olduğu şartlar karşılaştırıldığında; bileşiklerin elüsyon-sırasında da bazı farklılaşmaların meydana geldiği görülebilir. Bu durum; sabit fazın hem RPLC, hem de HILIC karakterine uygun bir davranış sergilemiş olmasıyla ilişkilendirilmiştir. Ayrıca; çalışılan şartlarda genel bir eğilim olarak; Ado ve Guo'nun sabit faz ile görece daha yüksek düzeyde etkileşmeye girdiği görülmüştür.

Hareketli fazdaki MeOH oranına bağlı olarak *k'* değerlerindeki farklılaşmadan yola çıkarak; MeOH oranının %50'den düşük tutulduğu şartların kromatografik ayırmalar için uygun olacağı anlaşılmıştır. Diğer taraftan; MeOH oranının %60-90 aralığında tutulduğu durumlarda da *k'* değerlerinde bir miktar farklılaşma gözlenmiştir. Sabit fazın HILIC karakteri sergilemiş olduğu bu şartlarda, kromatografik davranışlardaki eğilimleri daha makul bir şekilde değerlendirebilmek amacıyla, organik çözücü olarak MeCN'nin kullanıldığı şartlarda yürütülecek bazı analizlerin uygun olacağı düşünülmüştür.



Şekil 4.26. Su-MeOH hareketli faz sisteminde, hareketli fazdaki MeOH oranına bağlı olarak nükleositlerin *k'* değerlerindeki değişim

Hareketli faz: Su-MeOH; Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Sıcaklık: 25 ^{o}C; Kolon: 4,6x100 mm ölçülerinde EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi: 2 µL

Tablo 4.7. Su-MeOH hareketli faz sistemi için MeOH oranına bağlı olarak nükleositlerin *k'* değerlerindeki değişim [a]

MeOH (%v/v)	***k'*±*s*** [a]				
	Urd	Tyd	Cyd	Ado	Guo
1	0,89±0,01	2,39±0,01	9,78±0,03	26,4±0,03	14,6±0,03
5	0,74±0,01	1,86±0,01	8,09±0,03	18,3±0,03	11,1±0,03
10	0,62±0,01	1,45±0,01	6,53±0,02	13,5±0,03	8,73±0,03
20	0,40±0,01	0,82±0,01	3,23±0,02	5,78±0,03	4,68±0,03
35	0,27±0,01	0,45±0,01	2,32±0,02	2,66±0,03	2,48±0,03
50	0,10±0,01	0,16±0,01	1,30±0,02	1,10±0,03	1,32±0,02
65	0,08±0,01	0,09±0,01	1,17±0,02	0,68±0,02	1,14±0,02
80	0,18±0,01	0,14±0,01	1,37±0,02	0,79±0,02	1,62±0,02
90	0,20±0,01	0,13±0,01	1,77±0,02	0,96±0,02	2,44±0,02

[a] Veriler, Şekil 4.26'da grafiksel olarak verilmiş olup, deneysel şartlar şekilde belirtilmiştir.

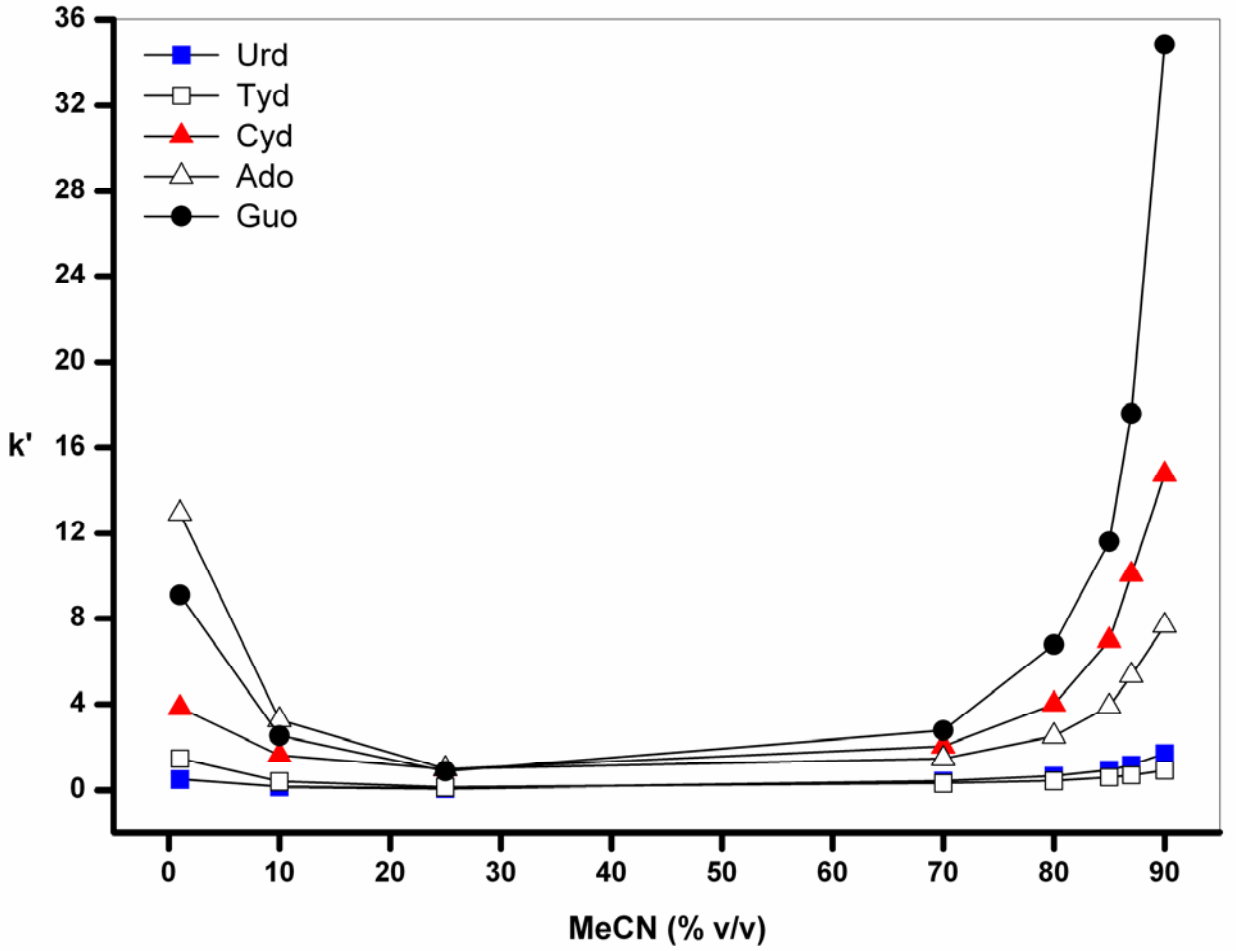
[b] *s*: Standart sapma; Tekrar sayısı, *n*=3

Sabit fazda immobilize olmuş halde bulunan HA makromoleküllerinin yapısında çok sayıda bulunan karboksil ve hidroksil gibi hidrofilik karakteri yüksek yapılar nedeniyle, sabit fazın HILIC karakteri sergileyebileceği düşünülmüştür. Yu ve ark. (2008), immobilize hümik asit esaslı sabit fazın bazı alkaloitlere karşı HILIC karakteri sergilediğini belirtmiş olup; çalışmalarımızda organik çözücü olarak MeOH'nın kullanıldığı denemelerden elde edilen verilerin de bu yönde bir sonucu desteklediği görülmüştür. Sabit fazın HILIC karakteri hakkında kapsamlı bilgiler elde etmek amacıyla, HILIC şartları için yaygın olarak kullanılan bir organik çözücü olan MeCN (Guo ve Gaiki, 2005) ile bazı analizler yürütülmüş ve nükleositler için *k'* değerleri hesaplanmıştır. Analizlerde; çeşitli oranlarda MeCN içeren Su-MeCN hareketli faz sistemi kullanılmıştır. MeCN oranının %1-90 aralığında değiştirildiği bu denemelerden elde edilen *k'* değerleri Şekil 4.27 ve Tablo 4.8'de verilmiştir.

Su-MeOH karışımlarından elde edilen sonuçlara benzer şekilde, *k'* değerlerinin hareketli fazdaki MeCN yüzdesindeki değişimlere karşılık "iç-bükey" bir eğri sergilediği ve bu durumun hareketli fazda MeOH'nın kullanıldığı duruma kıyasla daha belirgin olduğu görülmüştür. Yani; Su-MeOH hareketli faz sisteminin kullanıldığı durumlardan farklı olarak; hareketli fazda yüksek oranda (>%60) organik çözücünün kullanıldığı durumlarda *k'* değerlerindeki artışın çok daha belirgin olduğu tespit

edilmiştir. Böylece; hareketli fazdaki MeCN yüzdesinin genellikle %60'tan daha yüksek olduğu durumlarda gözlenen HILIC karakterinin (Alpert, 1990; Pack ve Risley, 2005; Guo ve Gaiki, 2005), EC-HA-APS üzerinde de gözlenebildiği görülmüştür. HILIC şartlarında, incelenen türlerin özelliklerine bağlı olarak MeCN yerine su ile karışabilen çeşitli alkollerin de kullanılabileceği belirtilmiştir (Olsen, 2001). Burada dikkat edilmesi gereken husus; kullanılan organik çözücünün "çözücü gücü" olarak ifade edilen niceliğinin suyun çözücü gücünden daha yüksek olmamasıdır. Örneğin; MeOH ve MeCN'nin çözücü güçleri sırasıyla 0,95 ve 0,65 olup (Skoog ve ark., 1996); MeOH'nın çözücü gücü MeCN'den daha yüksektir. Çalışmalarımızda, hareketli fazda MeOH oranının %60'tan büyük olduğu durumlarda sabit fazın HILIC karakterinin çok belirgin bir şekilde gözlenememesi, MeOH'nın MeCN'ye kıyasla daha yüksek olan çözücü gücüyle ilişkilendirilmiştir. Böylece; EC-HA-APS üzerinde HILIC şartlarında yürütülecek analizlerde MeCN'nin uygun bir organik çözücü olduğu görülmüştür.

RPLC şartlarında, MeCN yüzdesinin düşük olduğu durumlarda (MeCN<%20) elde edilen *k'* değerleri, Su-MeOH hareketli faz sistemi ile elde edilenlere kıyasla daha düşük çıkmış olup; bu durum, hareketli fazda kullanılan organik çözücünün cinsine bağlı olarak türlerin sabit faz ile etkileşme düzeylerinde farklılaşmaların olduğunu göstermektedir. Ayrıca; hareketli fazdaki organik çözücü ile analitler arasında, sabit faza karşı yarışmalı bir etkileşmenin mevcut olduğu ve bu yarışmalı etkileşmenin MeOH'nın kullanıldığı duruma kıyasla MeCN'de daha yüksek düzeyde olduğu düşünülmektedir. Türlerin, Su-MeCN sisteminde daha düşük *k'* değeri sergilemelerinin bu etkiden kaynaklanabileceği sonucuna varılmıştır.



Şekil 4.27. Su-MeCN hareketli faz sisteminde, hareketli fazdaki MeCN oranına bağlı olarak nükleositlerin kapasite faktörlerindeki değişim

Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Sıcaklık: 25 ^{o}C; Kolon: 4,6x100 EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi: 2 µL

Tablo 4.8. Su-MeCN hareketli faz sistemi için MeCN oranına bağlı olarak nükleositlerin *k'* değerlerindeki değişim [a]

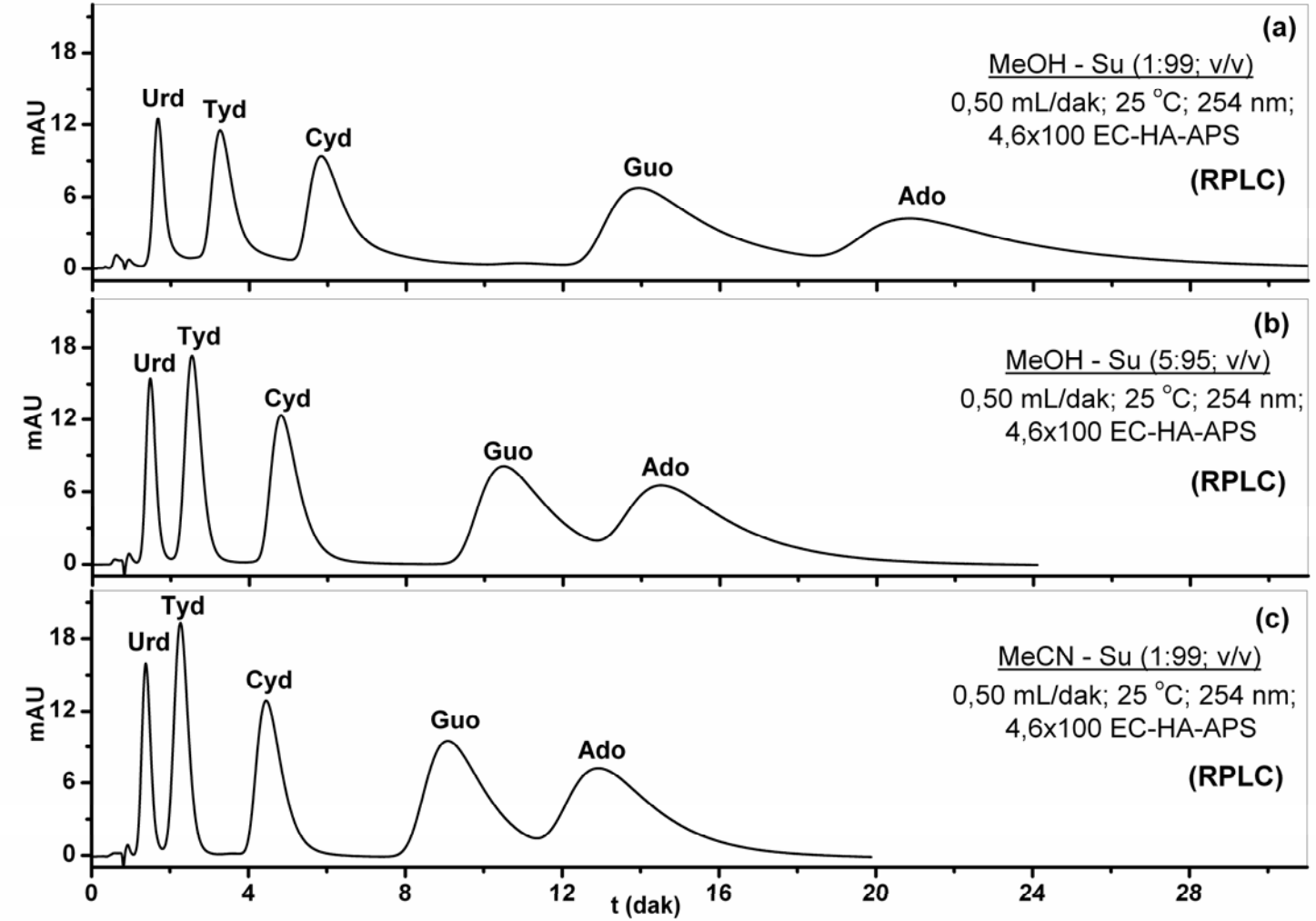
MeCN (%v/v)	***k'±s*** [b]				
	Urd	Tyd	Cyd	Ado	Guo
1	0,50±0,01	1,46±0,01	3,84±0,03	12,9±0,03	9,10±0,03
10	0,15±0,01	0,40±0,01	1,62±0,02	3,27±0,02	2,54±0,02
25	0,08±0,01	0,14±0,01	0,98±0,02	0,99±0,02	0,88±0,02
70	0,42±0,01	0,33±0,01	2,05±0,02	1,47±0,02	2,78±0,02
80	0,66±0,01	0,44±0,01	4,01±0,02	2,52±0,02	6,79±0,02
85	0,94±0,01	0,59±0,01	6,97±0,02	3,90±0,02	11,6±0,03
87	1,17±0,01	0,69±0,01	10,1±0,02	5,34±0,02	17,6±0,03
90	1,71±0,01	0,92±0,01	14,8±0,02	7,66±0,02	34,8±0,03

[a] Veriler, Şekil 4.27'de grafiksel olarak verilmiş olup, deneysel şartlar şekilde belirtilmiştir.

[b] *s*: Standart sapma; Tekrar sayısı, *n*=3

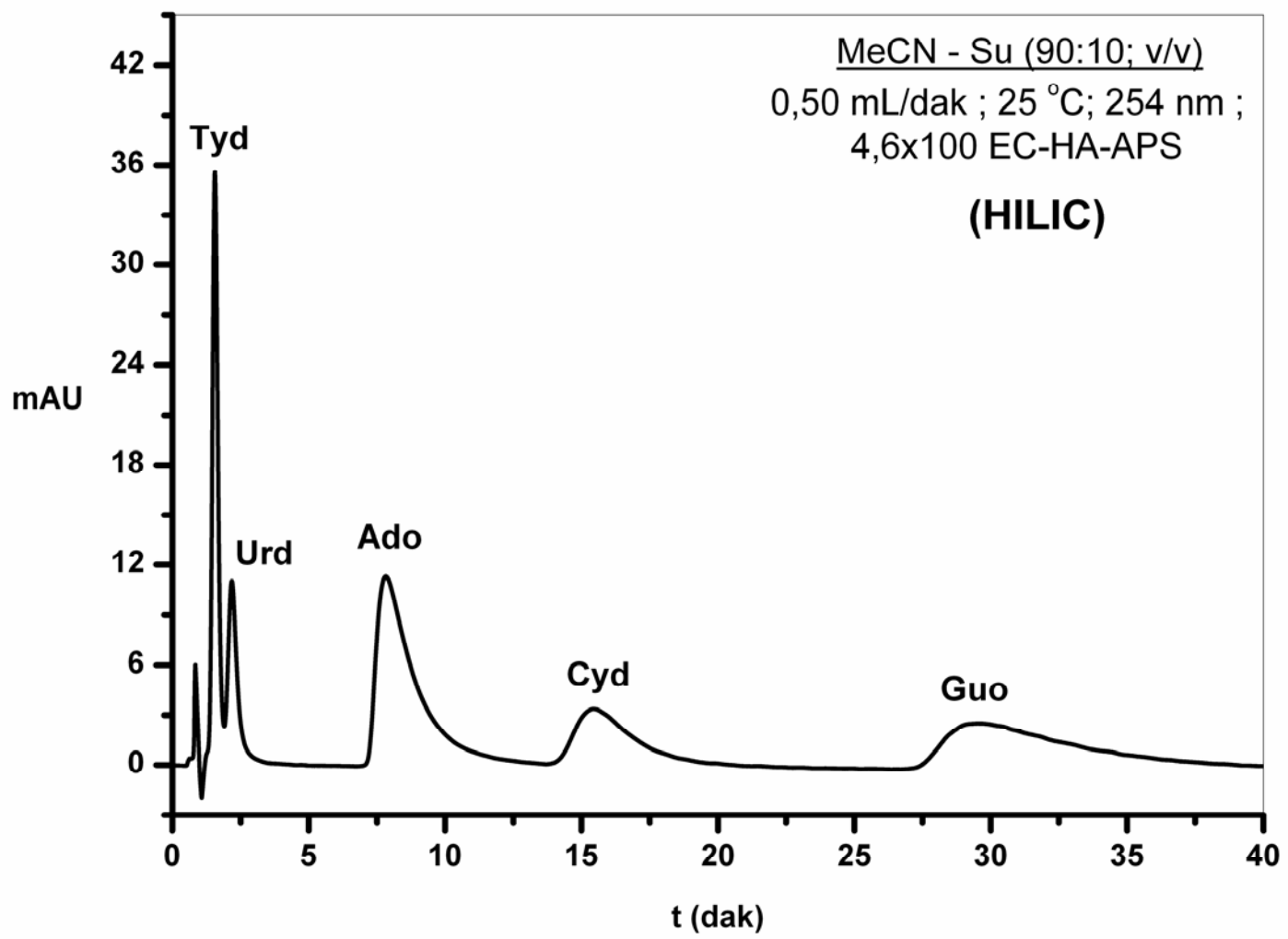
Nükleositler için elde edilen *k'* değerleri incelendiğinde; Su-MeOH ve Su-MeCN hareketli faz sistemlerinin kullanıldığı şartlarda, organik çözücü oranının %25-70 aralığında tutulduğu durumlarda analitlerin birbirine çok yakın *k'* değerleri sergiledikleri görülebilir. Bu nedenle, nükleositleri birbirinden kromatografik olarak ayırmak için bu aralığın uygun olmadığı söylenebilir. Nükleositleri, Su-MeOH hareketli faz sistemini kullanarak birbirinden ayırabilmek için MeOH oranının %50'den düşük tutulması gerektiği görülmüş ve türlerin kromatografik ayırmaları için sadece bir aralığın uygun olduğu anlaşılmıştır (Şekil 4.26). Diğer taraftan; Su-MeCN hareketli faz sistemi kullanılarak elde edilen veriler; kromatografik ayırmaların iki aralık için mümkün olduğunu göstermiştir (Şekil 4.27). Yani; sabit faz türlere karşı MeCN oranının %0-10 ararlığında tutulduğu bölgede RPLC; %70-90 aralığında ise HILIC karakteri sergilemiştir. Su-MeCN hareketli faz sistemi için MeCN oranının %25-70 aralığında olduğu durumlarda ise tüm nükleositlerin *k'* değerlerinde herhangi bir farklılaşma gözlenmemiş ve bu nedenle bu aralığın kromatografik ayırmalar için çok uygun olmadığı sonucuna varılmıştır. Organik çözücü oranının düşük tutulduğu bu aralıkta tüm türler düşük *k'* değeri sergilemiş olup; bu aralığın, akış enjeksiyon analizleri için uygun olabileceği düşünülmüştür.

HA'nın yapısında bulunan apolar gruplar nedeniyle EC-HA-APS'nin RPLC; karboksil ve hidroksil gibi hidrofilik gruplar nedeniyle de HILIC karakteri sergilediği düşünülmüştür. Bu nedenle; nükleositlerin her iki HPLC modunda ayrılabileceği şartlarda çok bileşenli numuneler kullanılarak bazı analizler yürütülmüştür. RPLC şartlarında Su-MeOH ve Su-MeCN hareketli faz sistemleri kullanılarak beş nükleosit (izokratik elüsyonla) birbirinden başarılı bir şekilde ayrılabildiği görülmüştür (Şekil 4.28). Şekilden; Su bakımından zengin hareketli fazların kullanıldığı durumlarda bile EC-HA-APS'nin türlere karşı yüksek düzeyde seçicilik sergilediği görülmekte olup; RPLC sabit fazları bu şartlarda genellikle büzüşür ve bu nedenle düşük seçicilik sergiler. Nükleositlerin HILIC şartlarında da, birbirinden izokratik elüsyonla ayrılabildiği görülmüştür (Şekil 4.29). Ayrıca; türlerin RPLC ve HILIC şartlarındaki elüsyon-sıralamaları karşılaştırıldığında bazı farklılaşmaların meydana geldiği tespit edilmiştir. Örneğin; RPLC şartlarında en son elue olan Ado, HILIC şartlarında üçüncü sırada elue olmuştur. Benzer durumlar diğer türler için de söz konusu olup; her iki HPLC modunda türlerin ayrılmasında farklı mekanizmaların rol almış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Böylece, EC-HA-APS sabit fazı ile hem RPLC hem de HILIC şartlarında nükleositler birbirinden başarılı bir şekilde ayrılabilmiştir.



Şekil 4.28. Nükleositler için Su-MeOH ve Su-MeCN hareketli faz sistemleriyle RPLC şartlarında izokratik elüsyonla elde edilen bazı kromatogramlar

Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Sıcaklık: 25 °C; Kolon: 4,6x100 EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi: 2 µL

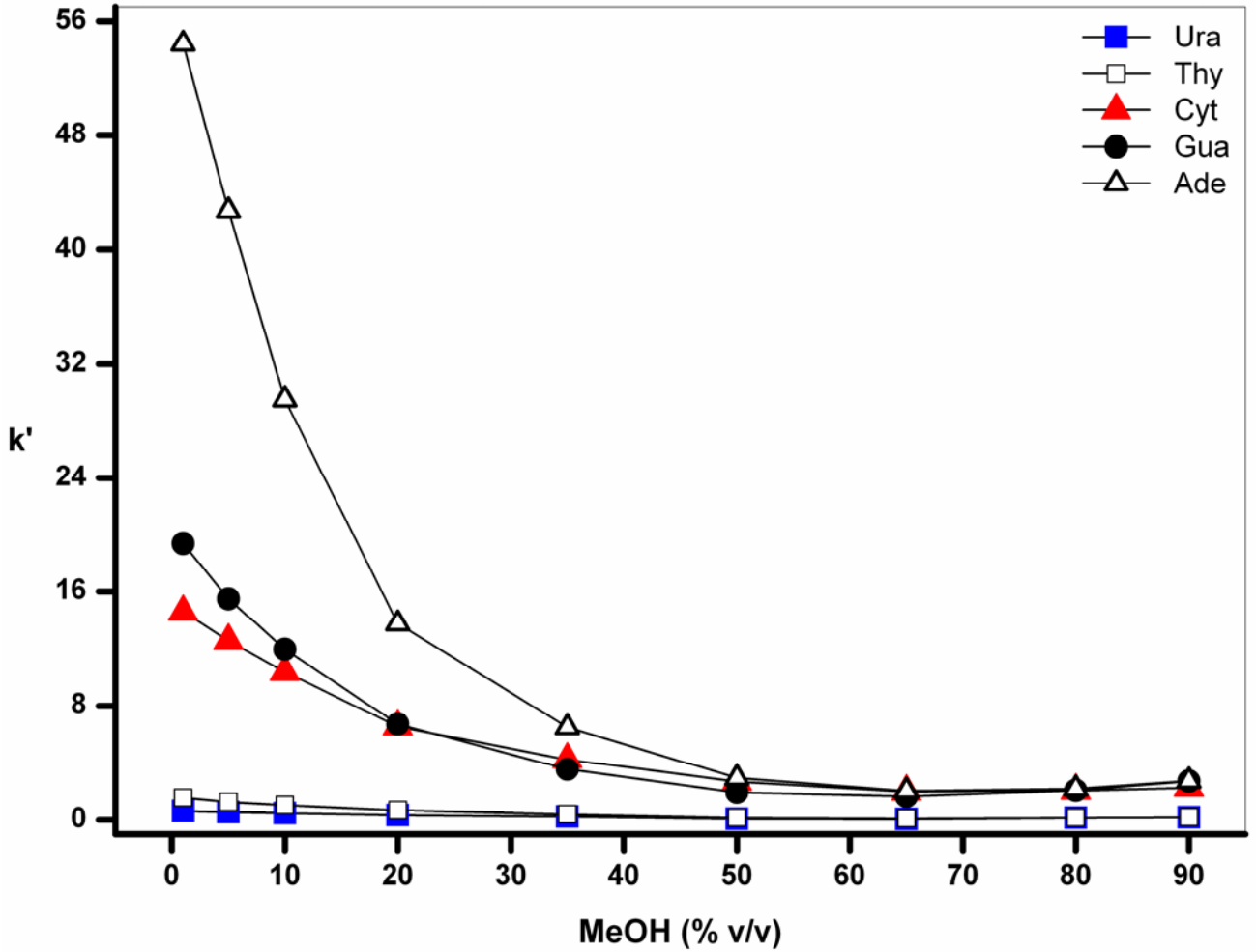


Şekil 4.29. Nükleositler için Su-MeCN hareketli faz sistemiyle HILIC şartlarında izokratik elüsyonla elde edilen kromatogram (Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Sıcaklık: 25 °C; Kolon: 4,6x100 EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi: 2 µL)

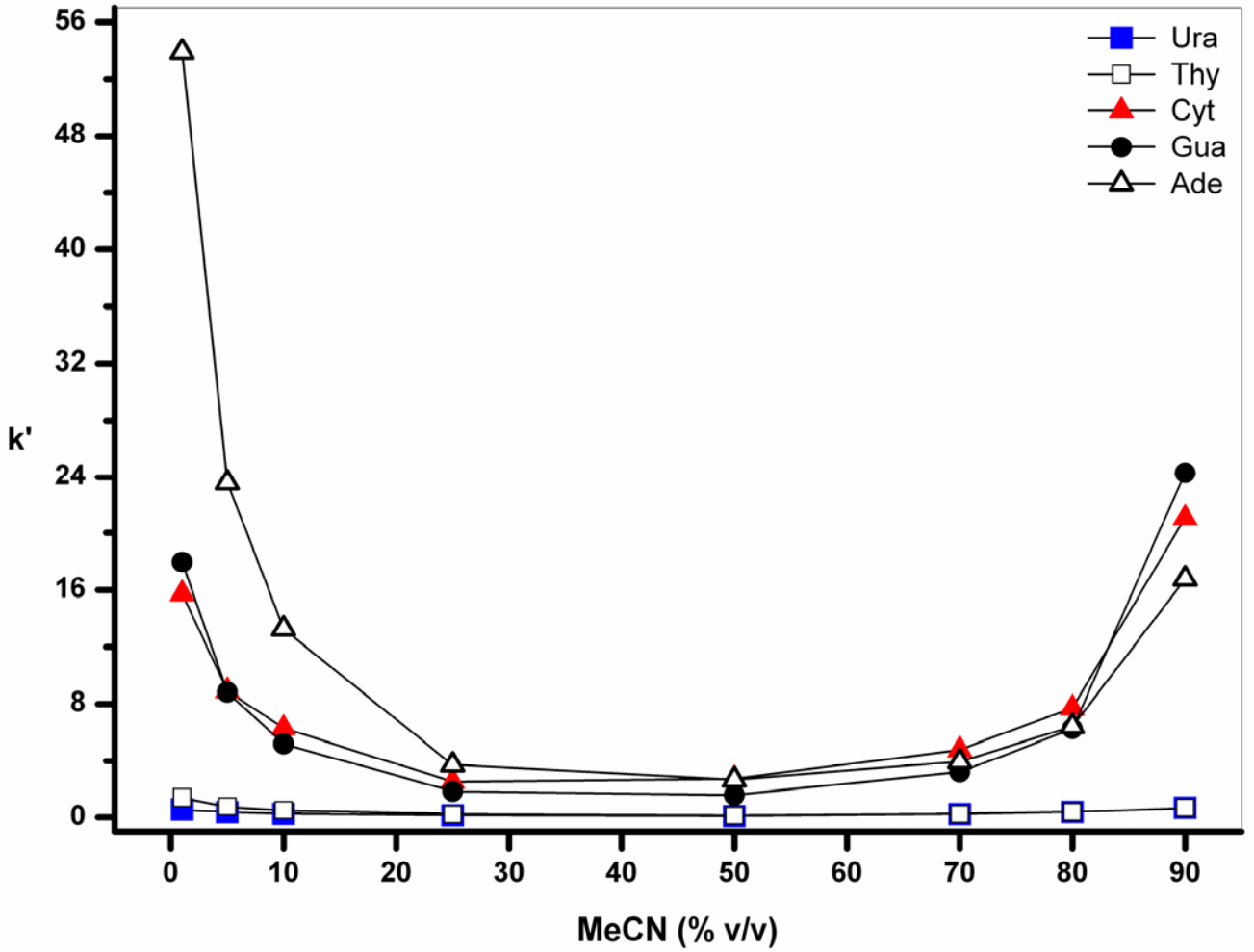
Nükleobazlar için Su-MeOH ve Su-MeCN hareketli faz sistemleri kullanılarak yapılan analizlerden elde dilen *k'* değerlerinin hareketli fazdaki organik çözücü yüzdesine karşılık değişimleri Şekil 4.30 ve Şekil 4.31'de verilmiştir. Şekillerden; incelenen nükleobazların elüsyon-sırasının (kendilerine karşılık gelen) nükleositlerin elüsyon-sırasına benzerlik gösterdiği görülebilir. Diğer taraftan; genel bir eğilim olarak, nükleobazların nükleositlerine kıyasla daha yüksek *k'* değerleri sergilediği söylenebilir. Bu durumun; yapılarında bulunan şeker halkalarının etkisiyle nükleositlerin sulu hareketli fazda daha yüksek düzeyde çözünme özelliği sergilemeleriyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Belirtilen şartlarda elde edilen *k'* değerleri Tablo 4.9 ve Tablo 4.10'da verilmiştir.

Nükleositlerde gözlenen durumlara benzer şekilde; Su-MeOH sisteminin kullanıldığı durumlarda, MeOH oranı %0-20 aralığında tutulduğu zaman türlerin *k'* değerlerinin birbirinden farklılaştığı görülmüş; diğer taraftan, MeOH oranının daha yüksek olduğu şartlarda, *k'* değerlerinde önemli düzeyde bir farklılaşma olmadığı gözlenmemiştir (Şekil 4.30).

Su-MeCN hareketli faz sisteminin kullanıldığı şartlarda nükleobazlar için hesaplanan *k'* değerleri, MeCN oranına bağlı olarak nükleositlerdekine benzer bir dağılım sergilemiştir. Nükleobazlar için yürüttüğümüz analizlerde, Su-MeOH ve Su-MeCN hareketli faz sistemlerinin her ikisiyle de, organik yürütücü oranının %0–5 (v/v) aralığında tutulduğu durumlarda Ade'nin kolondan zor elue olduğu görülmüştür (Şekil 4.31).



Şekil 4.30. Su-MeOH hareketli faz sisteminde, MeOH oranına bağlı olarak nükleobazların kapasite faktörlerindeki değişim. Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Sıcaklık: 25 ^{o}C; Kolon: 4,6x100 EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi: 2 µL



Şekil 4.31. Su-MeCN hareketli faz sisteminde, MeCN oranına bağlı olarak nükleobazların kapasite faktörlerindeki değişim. Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Sıcaklık: 25 ^{o}C; Kolon: 4,6x100 EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi: 2 µL

Tablo 4.9. Su-MeOH hareketli faz sistemi için MeOH oranına bağlı olarak nükleobazların *k'* değerlerindeki değişim [a]

MeOH (%v/v)	***k'±s*** [b]				
	Ura	Thy	Cyt	Ade	Gua
1	0,63±0,01	1,56±0,01	14,6±0,03	54,4±0,03	19,4±0,03
5	0,55±0,01	1,26±0,01	12,6±0,03	42,7±0,03	15,5±0,03
10	0,47±0,01	1,04±0,01	10,4±0,03	29,5±0,03	12,0±0,03
20	0,34±0,01	0,67±0,01	6,54±0,03	13,8±0,03	6,71±0,03
35	0,24±0,01	0,40±0,01	4,23±0,03	6,48±0,03	3,55±0,02
50	0,09±0,01	0,16±0,01	2,68±0,02	2,93±0,03	1,94±0,02
65	0,07±0,01	0,10±0,01	1,99±0,02	2,04±0,02	1,65±0,02
80	0,15±0,01	0,16±0,01	2,05±0,02	2,19±0,02	2,07±0,02
90	0,20±0,01	0,19±0,01	2,26±0,02	2,73±0,02	2,72±0,02

[a] Veriler, Şekil 4.30'da grafiksel olarak verilmiş olup, deneysel şartlar şekilde belirtilmiştir.

[b] *s*: Standart sapma; Tekrar sayısı, *n*=3

Tablo 4.10. Su-MeCN hareketli faz sistemi için MeCN oranına bağlı olarak nükleobazların *k'* değerlerindeki değişim [a]

MeOH (%v/v)	***k'±s*** [b]				
	Ura	Thy	Cyt	Ade	Gua
1	0,57±0,01	1,40±0,01	15,7±0,03	53,9±0,03	18,0±0,03
5	0,38±0,01	0,77±0,01	8,91±0,03	23,6±0,03	8,82±0,03
10	0,26±0,01	0,52±0,01	6,29±0,03	13,3±0,03	5,18±0,03
25	0,15±0,01	0,23±0,01	2,51±0,02	3,71±0,03	1,84±0,02
50	0,10±0,01	0,13±0,01	2,72±0,02	2,66±0,02	1,58±0,02
70	0,24±0,01	0,25±0,01	4,78±0,02	3,95±0,02	3,19±0,02
80	0,39±0,01	0,39±0,01	7,72±0,02	6,40±0,02	6,23±0,03
90	0,68±0,01	0,67±0,01	21,1±0,02	16,8±0,03	24,3±0,03

[a] Veriler, Şekil 4.31'de grafiksel olarak verilmiş olup, deneysel şartlar şekilde belirtilmiştir.

[b] *s*: Standart sapma; Tekrar sayısı, *n*=3

Nükleobazlar için çok bileşenli numunelerle RPLC şartlarında yürütülen deneylerde; Ade ve Gua'nın çok geç elue olması nedeniyle, izokratik elüsyonla kaydedilen kromatogramlardaki bazı piklerin, kromatografik amaçlarla kullanılamayacak kadar yayvanlaştığı görülmüştür. Nükleobazları kromatografik olarak ayırmak için akış hızı ve hareketli faz bileşiminde gradyent programları uygulanmış ve çalışılan 5 analit birbirinden başarılı bir şekilde ayrılabilmiştir (Şekil 4.32).

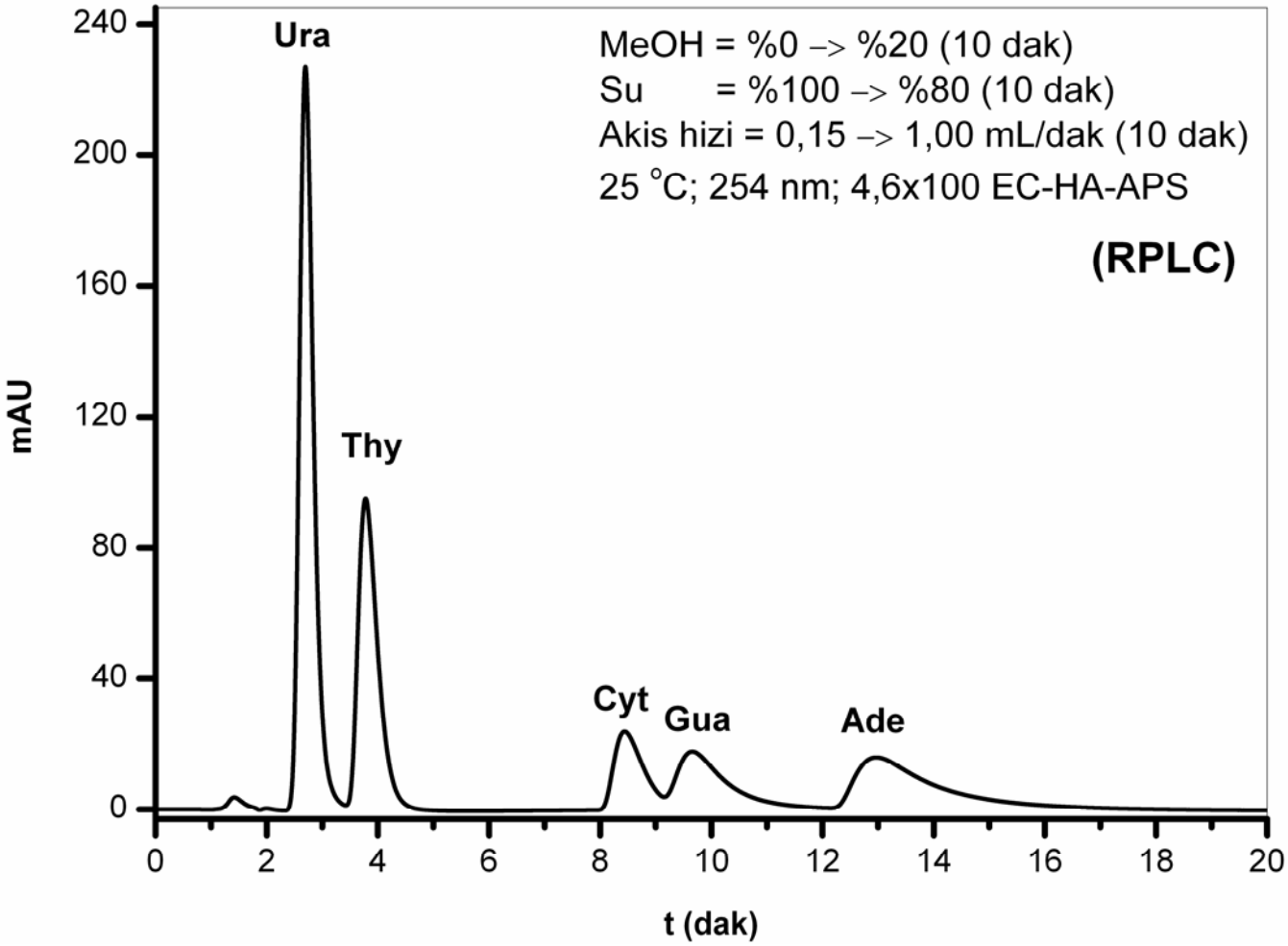
Hareketli fazdaki organik çözücü etkisini incelemek amacıyla yürütülen deneylerden; türlerin kromatografik ayrılmalarında rol alan mekanizmalar ile ilgili aşağıdaki yorumlara gidilmiştir:

RPLC şartlarında; hareketli fazdaki organik çözücü yüzdesi arttırıldıkça nükleosit ve nükleobazların *k'* değerlerinin düştüğü görülmüştür (Bkz. Şekil 4.22, Şekil 4.27, Şekil 4.30 ve Şekil 4.31). Ayrıca; incelenen tüm türlerin elüsyon-sırlamasıyla moleküler yapıları arasında bir ilişkinin olduğu anlaşılmış olup; yapısında -NH_2 grubu bulunduran türlerin (Cyt, Cyd, Ade, Ado, Gua ve Guo) sabit faz ile daha yüksek düzeyde etkileşmeye girdiği görülmüştür. Yapısında–NH_2 gurubu bulunduran türlerin, "*vertical stacking*" adı verilen bir etkiyle moleküller arası etkileşmelere girdiği ve bunun bir sonucu olarak da ilgili türlerin RPLC şartlarında sabit faz ile dispersif etkiler temelinde daha kuvvetli bir şekilde etkileştiği belirtilmiştir (Li ve ark., 2004). Cyd, Ado ve Guo'nun geç elue olmasında bu etkinin de rol almış olabileceği düşünülmüştür. Ura, Urd, Thy ve Tyd türlerinin hareketli fazda yüksek oranda Su bulunduğu durumlarda bile düşük *k'* değerleri sergilemeleri, sabit faz ile düşük düzeyde etkileşmeye girmiş olduklarını göstermektedir. Elde edilen verilerden; çalışılan tüm türlerin kromatografik davranışlarında hidrofobik etkileşmelerin önemli düzeyde rol aldığı sonucuna varılmıştır.

Çalışılan türlerin HILIC şartlarındaki kromatografik davranışlarının, sabit faza adsorplanmış su moleküllerinin oluşturduğu su bakımından zengin bir ara yüzey ile hareketli faz arasındaki dağılmaya dayanan (ve HILIC modu için öngörülen) bir mekanizma (Alpert, 1990) temelinde şekillendiği söylenebilir. Sabit fazın, hareketli fazdaki MeCN yüzdesinin %60'tan daha yüksek olduğu HILIC şartlarında, yapısında hidrofilik karakteri yüksek olan ribosil (veya deoksiribosil) grubu içeren nükleositlere karşı daha yüksek seçicilik gösterdiği anlaşılmıştır. Sabit fazın HILIC şartlarında nükleobazlara karşı daha düşük düzeyde seçicilik göstermesinin, nükleobazların yapısında belirtilen şeker halkasının bulunmamasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Yani; sabit fazın nükleositlere karşı daha yüksek düzeyde seçicilik sergilemesinde,

hidrofilik karakteri yüksek olan bu şeker gruplarının etkili olduğu düşünülmüştür. Elde edilen veriler; nükleosit ve nükleobazların HILIC şartlarında sergiledikleri elüsyon-sıralamalarının RPLC şartlarında gözlenen elüsyon-sıralamalarından farklılaştığını ve dolayısıyla kromatografik davranışların şekillenmesinde rol alan mekanizmalarda önemli değişikliklerin meydana gelmiş olduğunu göstermiştir.

RPLC ve HILIC şartlarında rol alan mekanizmalar hakkında daha kapsamlı yorumlar yapabilmek için pH ve sıcaklığın kromatografik davranışlar üzerindeki etkisinin kapsamlı bir şekilde incelenmesinin uygun olacağı düşünülmüştür.



Şekil 4.32. Nükleobazlar için Su-MeOH hareketli faz sistemiyle RPLC şartlarında gradyent elüsyonla elde edilen kromatogram

Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Sıcaklık: 25 ^{o}C; Kolon: 4,6x100 EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi: 2 µL; Diğer deneysel parametreler şekil üzerinde belirtilmiştir.

4.2.4. Hareketli fazdaki amonyak çözeltisi ve sıcaklığın etkisi

HPLC analizlerinde yaygın olarak kullanılan bir diğer deneysel parametre olan hareketli fazın pH değeri; hem analitlerin hem de kullanılan sabit fazın özellikleri üzerinde önemli etkilere sahiptir. EC-HA-APS ile yürütülen kromatografik analizlerde hareketli faz pH değerine bağlı olarak sabit faz yüzeyinin iyonlaşma derecesinde ve dolayısıyla yüzey alanında bazı farklılaşmaların olacağı ve bunun da kromatografik davranışlara yansıyacağı düşünülmüştür. Buna ilaveten; kromatografik davranışları incelenen nükleosit ve nükleobazların iyonlaşabilme özellikleri nedeniyle, makul bir şekilde ayarlanan hareketli faz pH değerinin, çalışılan türlere karşı sabit fazın sergilediği seçiciliğe önemli bir katkı sağlayabileceği düşünülmüştür.

HPLC analizlerinde; kromatografik ayırmaları iyileştirmek için deneysel bir parametre olarak pH'dan faydalanmak amacıyla genellikle, çalışılan pH değerinde yüksek tampon kapasitesi sergileyen tampon çözeltilerin kullanıldığı bilinmektedir. Bu çalışmada ise; çalışılan pH aralığında düşük tampon kapasitesi sergilemesine karşın, nükleosit ve nükleobazların kromatografik ayırmalarında verimli sonuçlar verdiği görülen farklı pH değerlerine sahip NH_3 çözeltileri kullanılmıştır. Nükleosit ve nükleobazların, yapılarındaki azot içeren fonksiyonel gruplar üzerinden sabit fazla etkileşme derecelerinin ayarlanmasında, NH_3/NH_4^+ türlerinin yarışmalı türler olarak davranabileceği ve bunun da kromatografik ayırmalarda faydalı olacağı düşünülmüştür. Ayrıca; LC-MS sistemlerinde NH_3/NH_4^+ türlerinin iyonlaşma aşamasında herhangi bir güçlük çıkarmayacağı da düşünülmüştür. NH_3/NH_4^+ türlerini içeren hareketli fazlar kullanılarak nükleosit ve nükleobazlar için elde edilen verilerin, benzer çalışmalar için bir kaynak teşkil etmesi bakımından da faydalı olacağı düşünülmüştür. Bu amaçla; hareketli faz olarak pH'sı 0,1 M HCl çözeltisi kullanılarak istenen değerlere ayarlanmış 0,1 F NH_3 çözeltileri, MeOH ve MeCN kullanılarak hem RPLC hem de HILIC şartlarında bazı analizler yürütülmüştür. RPLC ve HILIC şartlarında yürütülen deneylerde sırasıyla;

- 0,1 F NH_3 (pH=3,5–7,0) – MeOH (99:1; v/v) (Nükleositler için RPLC)

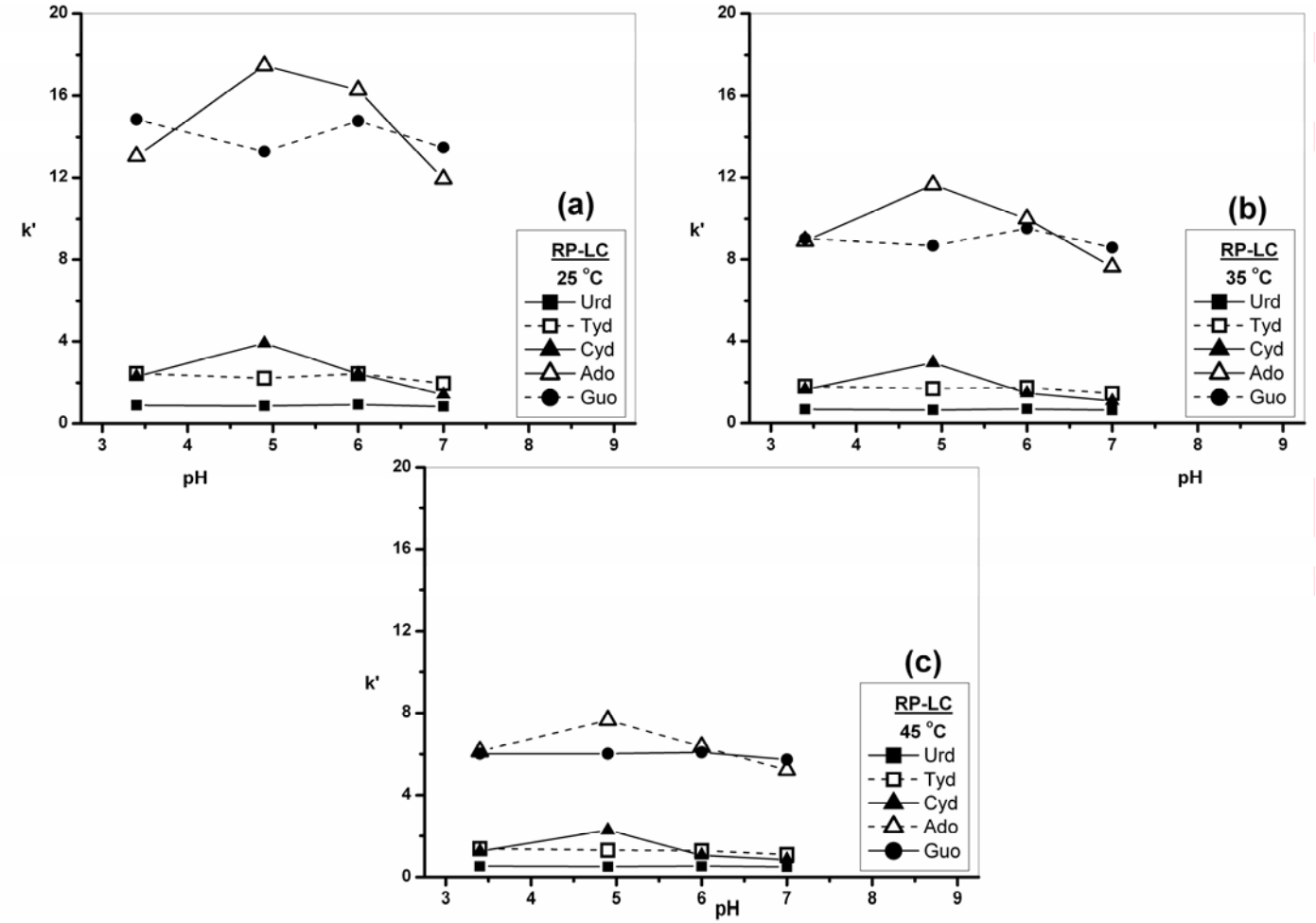
- 0,1 F NH_3 (pH=3,5–7,0) – MeOH (9:1; v/v) (Nükleobazlar için RPLC)

- 0,1 F NH_3 (pH=3,0–6,0) – MeCN (1:9; v/v) (Nükleositler ve nükleobazlar için HILIC)

hareketli faz sistemleri kullanılmıştır. NH_3 çözeltisinin çalışılan pH değerlerinin her biri için üç farklı sıcaklıkta yürütülen deneylerden elde edilen sonuçlar aşağıda verilmiştir:

Nükleositler için RPLC şartlarında yürütülen deneylerden elde edilen sonuçlar; hareketli fazda Su yerine NH_3 çözeltisi kullanıldığında, nükleositlerin *k'* değerlerinde belirgin bir düşüşün olduğunu göstermiştir (Şekil 4.33 ve Tablo 4.11). Bu sonuç; hareketli fazda NH_3/NH_4^+ türlerinin kullanılmasının uygun olacağı ile ilgili öngörülerimizi destekler niteliktedir. *k'* değerlerindeki düşüşün, yapısında $-NH_2$ grubu bulunduran Cyd, Ado ve Guo türlerinde daha belirgin olduğu görülmüştür. Üç farklı sıcaklıkta yürütülen pH denemeleri, Urd ve Tyd'nin *k'* değerlerinin hareketli faz pH'sına bağlı olarak çok önemli bir değişiklik sergilemediğini göstermiştir. Cyd için farklı pH'larda elde edilen sonuçlar; incelenen her üç sıcaklıkta da, pH=3,4'ten 4,9'a arttırıldığında *k'* değerinin önce arttığı ve bu noktadan sonra pH arttırıldıkça düşüşe geçtiğini göstermiştir. Ado için Cyd'de gözlenene benzer bir durum görülmüştür. Çalışılan pH aralığında Guo için hesaplanan *k'* değerleri birbirine çok yakın olup, *k'* değerlerinde pH'nın 3,4–7,0 aralığında arttırılmasıyla önce düşüş, ardından artış ve sonra tekrar düşüş şeklinde bir eğilim gözlenmiştir. Dört farklı pH değerinde elde edilen *k'* değerleri karşılaştırıldığında; türlerin *k'* değerlerindeki farklılaşmanın pH=5 dolaylarında daha belirgin olduğu görülebilir. Elde edilen verilerden; hareketli faz pH değerine bağlı olarak, sabit fazın türlere karşı sergilediği seçicilikte bazı değişimlerin meydana geldiği sonucuna varılmıştır. Ayrıca; hareketli faz pH değerine bağlı olarak türlerin elüsyon-sırasında da farklılaşmalar görülmüştür. Nitekim; pH=3,4 ve 7,0'da Ado Guo'dan önce elue olurken; pH=4,9 ve 6,0'da Guo Ado'dan önce elue olmuştur. pH=3,4; 6,0 ve 7,0'da Cyd ve Tyd'nin *k'* değerleri birbirine çok yakın çıkarken, pH=4,9'da Cyd'nin *k'* değeri belirgin bir farklılaşma göstermiştir.

NH_3 çözeltisinin farklı pH değerlerinde yürütülen sıcaklık denemelerinden elde edilen verilerden; Urd, Tyd ve Cyd'nin *k'* değerlerinin sıcaklık değişimlerinden çok fazla etkilenmediği; buna karşın, Ado ve Guo'nun *k'* değerlerinde önemli değişimlerin meydana geldiği görülmüştür. Bu nedenle; nükleositlerin kromatografik ayırmalarını optimize etmek için sıcaklığın faydalı bir deneysel parametre olarak değerlendirilebileceği anlaşılmaktadır.



Şekil 4.33. RPLC şartlarında nükleositlerin *k'* değerlerinin NH_3 çözeltisinin pH değeri ve sıcaklığa bağlı olarak değişimi

(a) 25 °C; (b) 35 °C ve (c) 45 °C; (Hareketli faz: NH_3-MeOH (99:1; v/v); Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Kolon: 4,6x100 EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi: 2 µL; 0,1 F NH_3 çözeltisinin pH'sı, 0,1 M HCl çözeltisi ile istenen seviyeye ayarlanmıştır)

Tablo 4.11. RPLC şartlarında nükleositlerin *k'* değerlerinin NH_3 çözeltisinin pH'sı ve sıcaklığa bağlı olarak değişimi [a]

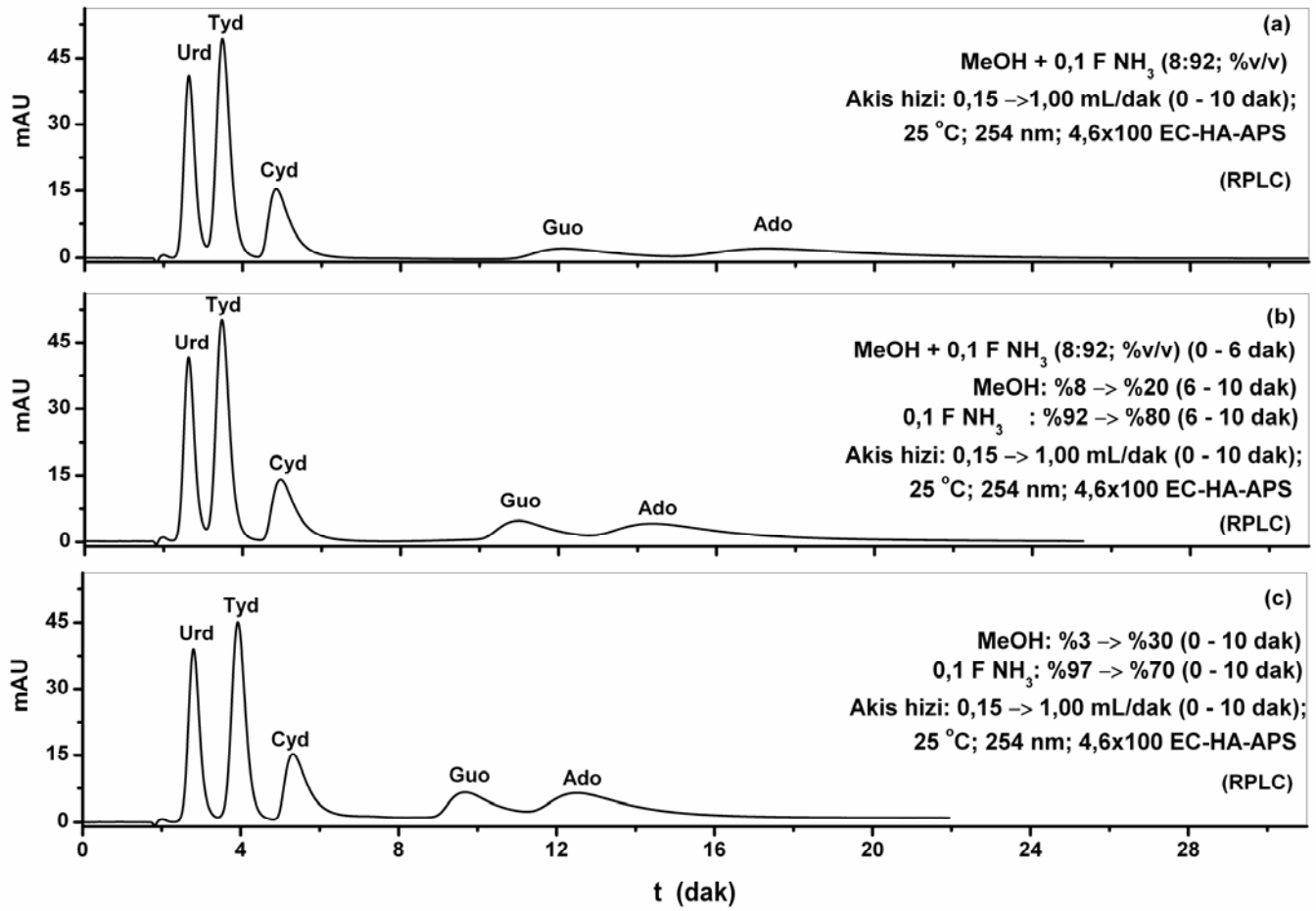
pH	T (°C)	***k'*±*s*** [b]				
		Urd	Tyd	Cyd	Ado	Guo
3,4	25	0,91±0,01	2,44±0,01	2,30±0,03	13,1±0,03	14,9±0,03
	35	0,68±0,01	1,81±0,01	1,65±0,02	8,90±0,03	9,02±0,03
	45	0,53±0,01	1,39±0,01	1,27±0,02	6,13±0,03	6,02±0,03
4,9	25	0,87±0,01	2,22±0,01	3,90±0,03	17,5±0,03	13,3±0,03
	35	0,66±0,01	1,69±0,01	2,94±0,03	11,6±0,03	8,68±0,03
	45	0,51±0,01	1,31±0,01	2,27±0,02	7,67±0,03	6,02±0,03
6,0	25	0,94±0,01	2,43±0,01	2,43±0,02	16,3±0,03	14,8±0,03
	35	0,70±0,01	1,75±0,01	1,47±0,02	10,0±0,03	9,52±0,03
	45	0,53±0,01	1,29±0,01	1,07±0,02	6,35±0,03	6,08±0,03
7,0	25	0,84±0,01	1,96±0,01	1,43±0,02	11,9±0,03	13,5±0,03
	35	0,64±0,01	1,46±0,01	1,10±0,02	7,62±0,03	8,58±0,03
	45	0,50±0,01	1,11±0,01	0,87±0,02	5,24±0,03	5,74±0,03

[a] Veriler, Şekil 4.33'te grafiksel olarak verilmiş olup, deneysel şartlar şekilde belirtilmiştir. Hareketli faz: NH_3-MeOH (99:1; v/v); Belirtilen pH değerleri, NH_3 çözeltilerinin pH'ları olup, 0,1 M HCl çözeltisi ile istenen seviyeye ayarlanmıştır.

[b] *s*: Standart sapma; Tekrar sayısı, *n*=3

Nükleositlerin tek bileşenli numuneleriyle RPLC şartlarında elde edilen *k'* değerlerinin birbirine çok yakın olduğu görülmüştür. Hareketli fazdaki MeOH oranı düşürülerek ilk üç türün (Urd, Tyd ve Cyd) ayrılmaları iyileştirilebilir, fakat bu durumda Ado ve Guo'nun elüsyonu uzun süre alacaktır. Bu nedenle; nükleositlerin RPLC şartlarındaki ayrılmalarının uygun bir gradyent programı kullanılarak iyileştirilmesinin uygun olacağı düşünülmüştür. Bunun için ayrılmaların en olası olduğu sıcaklık (25 °C) ve pH'da (5,0), hareketli fazdaki MeOH yüzdesi ve hareketli fazın akış hızında gradyent programları uygulanmıştır. Öncelikle; hareketli fazdaki MeOH oranı sabit tutulup hareketli fazın akış hızında gradyent uygulanmıştır (Şekil 4.34). Bu şekilde, elüsyonu uzun zaman alan Ado ve Guo'nun hızlı bir şekilde elue edilebileceği düşünülmüştür. Fakat; sadece akış hızında gradyent uygulayarak kromatografik ayrılmaların iyileştirilemeyeceği anlaşılmıştır. Nitekim; Şekil 4.34'te de görüldüğü gibi, akış hızı gradyentinde herhangi bir değişiklik yapmadan, MeOH gradyenti

uygulandığında, kromatografik ayırmanın iyileştirilebildiği görülmektedir. Ayrıca; akış hızı gradyentinde herhangi bir değişiklik yapmadan, MeOH'nın hareketli fazdaki başlangıç oranı düşürülüp gradyentle arttırıldığında, sadece ilk üç türün değil, aynı zamanda son iki türün kromatografik ayırmalarının da iyileştiği ve toplam analiz süresinin de kısaldığı görülmüştür (Şekil 4.34). Bu nedenle; hem akış hızında hem de hareketli fazdaki MeOH yüzdesinde yapılacak uygun gradyentlerle, çalışılan nükleositlerin birbirinden başarılı bir şekilde ayrılabileceği görülmüştür.



Şekil 4.34. Nükleositler için RPLC şartlarında NH_3-MeOH hareketli faz sistemiyle elde edilen bazı kromatogramlar

(a) Akış hızında gradyent uygulayarak; (b) ve (c) Akış hızında ve MeOH oranında gradyent uygulayarak (Enjeksiyon hacmi: 2 µL; Diğer deneysel şartlar şekiller üzerinde belirtilmiştir); NH_3 çözeltisi: 0,1 F; pH=5,0 (0,1 M HCl kullanılarak ayarlanmıştır)

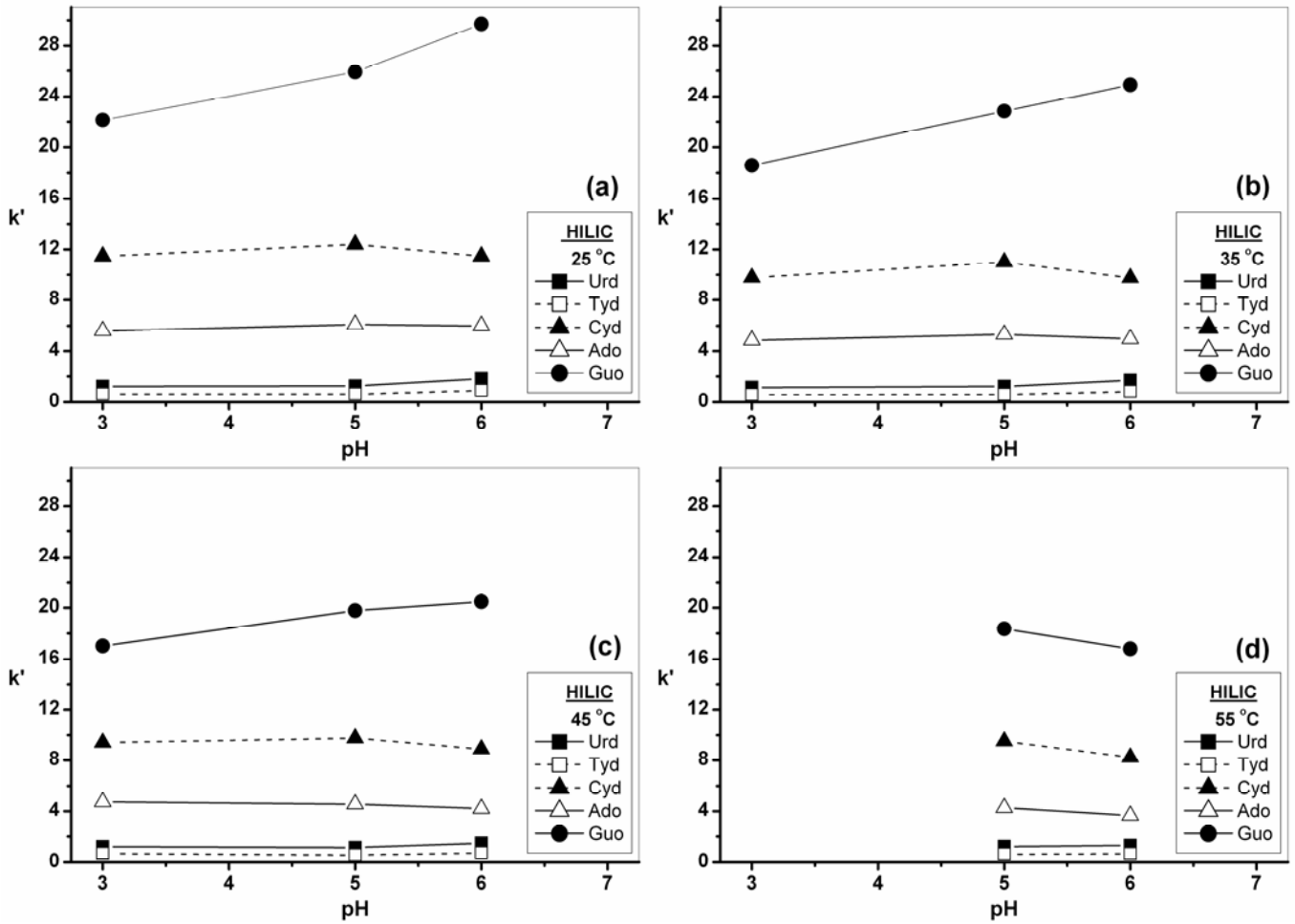
Nükleositler için HILIC şartlarında yürütülen pH denemelerinden elde edilen *k'* değerleri Şekil 4.35 ve Tablo 4.12'de verilmiştir. RPLC şartlarında elde edilen sonuçlara benzer şekilde; HILIC şartlarında da, hareketli fazda Su yerine NH_3 çözeltisi kullanıldığında türlerin *k'* değerlerinde düşüş gözlenmiştir. Üç farklı sıcaklıkta yürütülen deneyler; HILIC şartlarında Guo hariç diğer dört nükleositin *k'* değerlerinin pH değişimlerinden çok fazla etkilenmediğini göstermiştir. Sıcaklığın 25, 35 ve 45 ^oC olduğu durumlarda, pH=3,0'dan 6,0'a doğru arttırıldıkça Guo'nun *k'* değerinin arttığı görülmüştür. Guo için 55 ^oC'ta farklı bir durum gözlenmiş olup; bu sıcaklıkta pH 5,0'dan 6,0'a yükseltildiğinde *k'* değerinin düştüğü tespit edilmiştir.

Tablo 4.12. HILIC şartlarında nükleositlerin *k'* değerlerinin NH_3 çözeltisinin pH'sına ve sıcaklığa bağlı olarak değişimi [a]

pH	T (^oC)	$k' \pm s$ [b]				
		Urd	Tyd	Cyd	Ado	Guo
3,0	25	1,24±0,01	0,64±0,01	11,4±0,03	5,59±0,03	22,2±0,03
	35	1,15±0,01	0,59±0,01	9,78±0,03	4,84±0,03	18,6±0,03
	45	1,22±0,01	0,68±0,01	9,41±0,03	4,74±0,03	17,0±0,03
5,0	25	1,27±0,01	0,64±0,01	12,4±0,03	6,10±0,03	25,9±0,03
	35	1,24±0,01	0,62±0,01	11,0±0,03	5,31±0,03	22,9±0,03
	45	1,16±0,01	0,57±0,01	9,75±0,03	4,56±0,03	19,8±0,03
	55	1,23±0,01	0,64±0,01	9,52±0,03	4,28±0,02	18,4±0,02
6,0	25	1,82±0,01	0,91±0,01	11,5±0,03	6,00±0,03	29,7±0,03
	35	1,69±0,01	0,83±0,01	9,76±0,03	4,96±0,03	24,9±0,03
	45	1,50±0,01	0,74±0,01	8,89±0,03	4,21±0,02	20,4±0,03
	55	1,32±0,01	0,67±0,01	8,24±0,03	3,66±0,02	16,8±0,02

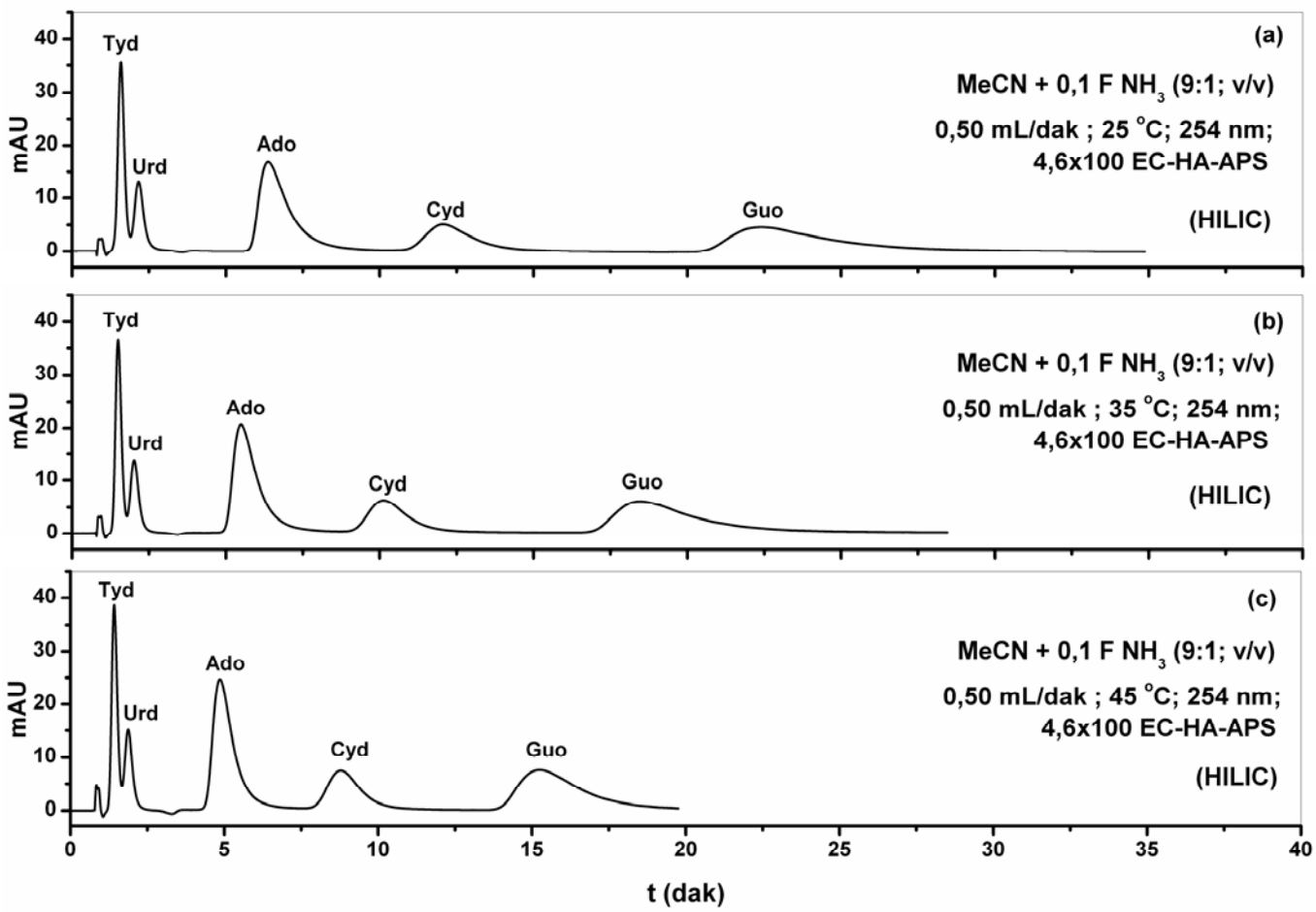
[a] Veriler, Şekil 4.35'te grafiksel olarak verilmiş olup, deneysel şartlar şekilde belirtilmiştir. Hareketli faz: NH_3-MeCN (1:9; v/v); Belirtilen pH değerleri, NH_3 çözeltilerinin pH'ları olup, 0,1 M HCl çözeltisi ile istenen seviyeye ayarlanmıştır.

[b] *s*: Standart sapma; Tekrar sayısı, *n*=3



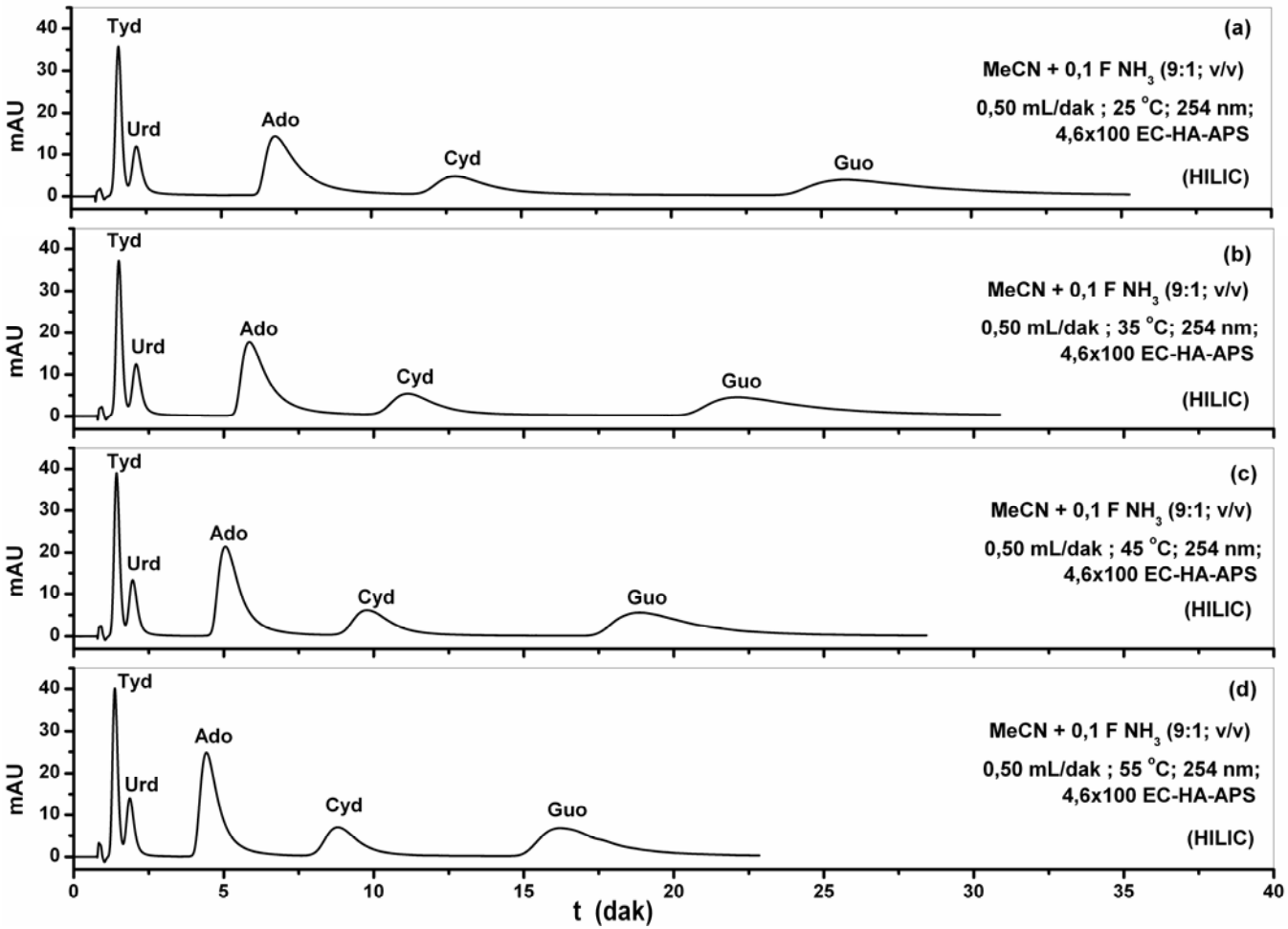
Şekil 4.35. HILIC şartlarında nükleositlerin *k'* değerlerinin NH_3 çözeltisinin pH değeri ve sıcaklığa bağlı olarak değişimi (a) 25 °C, (b) 35 °C, (c) 45 °C ve (d) 55 °C; (Hareketli faz: NH_3-MeCN (1:9; v/v); Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Kolon: 4,6x100 EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi: 2 µL; 0,1 F NH_3 çözeltisinin pH'sı, 0,1 M HCl çözeltisi ile istenen seviyeye ayarlanmıştır)

Nükleositler için HILIC şartlarında yürütülen denemeler, hareketli fazda Su yerine NH_3 çözeltisinin kullanılmasıyla türlerin daha makul R_S değerleriyle birbirinden ayrılabileceğini göstermiştir. Ayrıca; farklı sıcaklıklarda yürütülen pH denemelerinden, sıcaklık ve pH parametrelerinin uygun bir şekilde ayarlanmasıyla türlerin R_S değerlerinin iyileştirilebileceği anlaşılmıştır. Bu noktadan hareketle, çeşitli pH ve sıcaklıklarda nükleositlerin çok bileşenli numuneleriyle bazı denemeler yapılmıştır. Bu denemelerden elde edilen kromatogramlar Şekil 4.36, Şekil 4.37 ve Şekil 4.38'de verilmiş olup; nükleositlerin çalışılan üç pH değerinde başarılı bir şekilde ayrılabildiğini ve sıcaklığın arttırılmasıyla türler için kromatografik ayırmaların iyileştirilebildiğini göstermiştir. Nükleositler için RPLC ve HILIC şartlarında, hareketli faz pH'sı ayarlanarak elde edilen kromatografik ayırmalar karşılaştırıldığında; HILIC şartlarında EC-HA-APS'nin türlere karşı daha yüksek seçicilik sergilediğini söylemek mümkündür. Hareketli fazda NH_3 çözeltisi kullanıldığı zaman, çalışılan her iki kromatografi modunda da nükleositlerin kolondan daha çabuk elue olabildikleri tespit edilmiştir. Böylece; pH ve sıcaklık etkisi hem RPLC hem de HILIC şartlarında kapsamlı bir şekilde incelenmiş oldu.



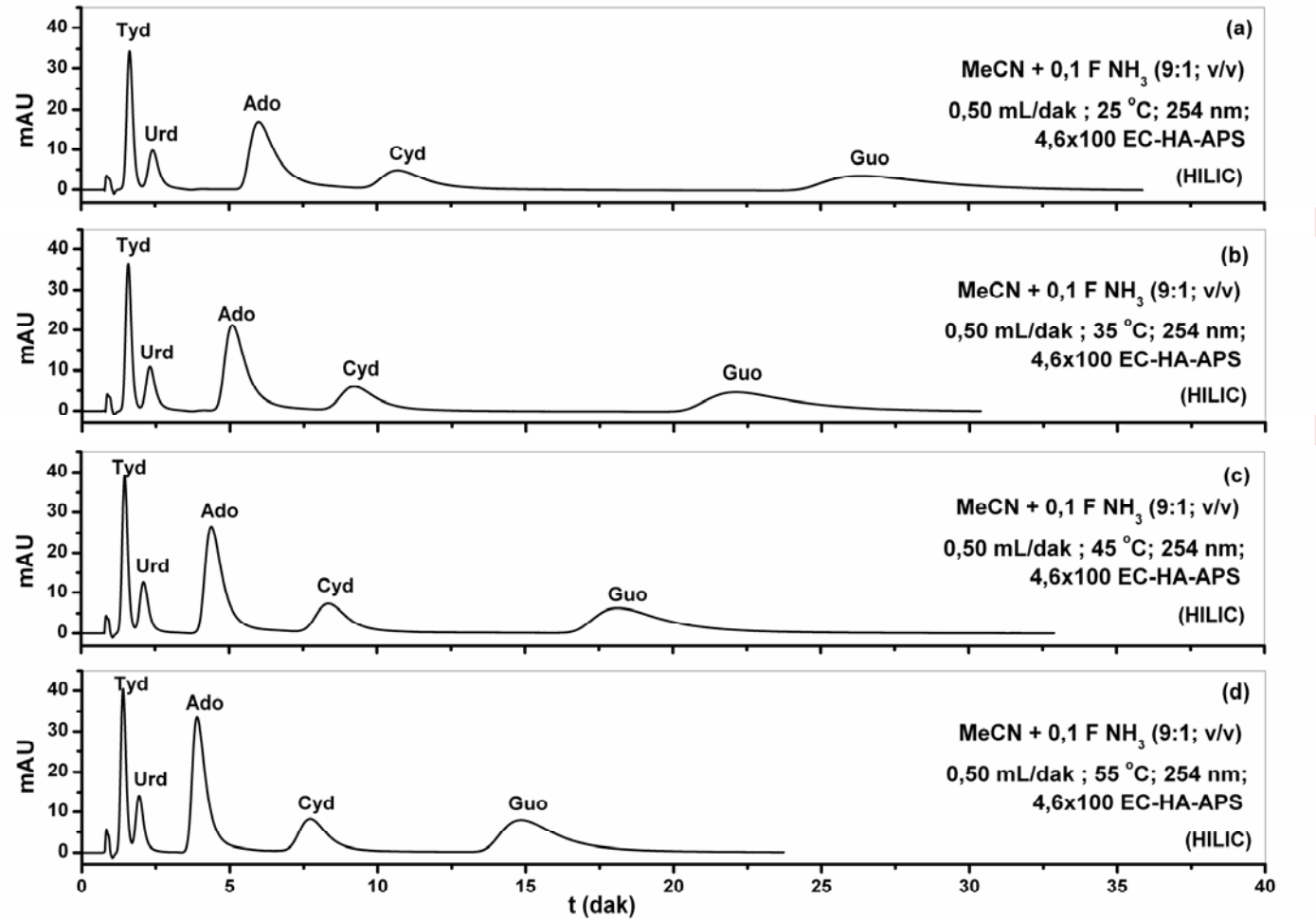
Şekil 4.36. HILIC şartlarında, nükleositler için farklı sıcaklıklarda NH_3-MeCN hareketli faz sistemiyle elde edilen kromatogramlar

(a) 25 ^oC; (b) 35 ^oC ve (c) 45 ^oC; (Hareketli faz: NH_3-MeCN (1:9; v/v); NH_3 çözeltisi: 0,10 F-pH=3,0; Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Kolon: 4,6x100 EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi: 2 µL)



Şekil 4.37. HILIC şartlarında, nükleositler için farklı sıcaklıklarda NH_3-MeCN hareketli faz sistemiyle elde edilen kromatogramlar

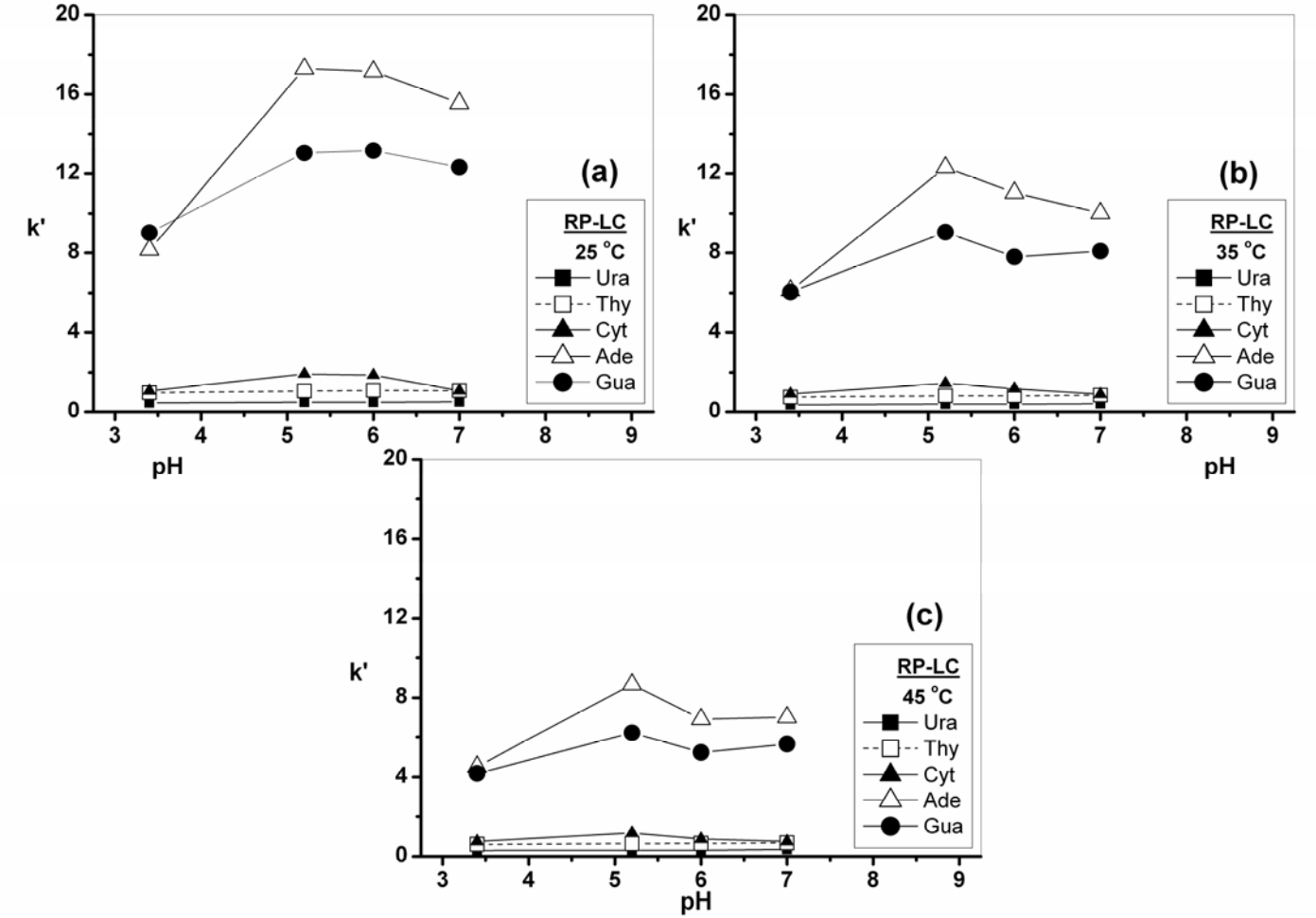
(a) 25 ^oC; (b) 35 ^oC; (c) 45 ^oC ve (d) 55 ^oC; (Hareketli faz: NH_3-MeCN (1:9; v/v); NH_3 çözeltisi: 0,10 F-pH=5,0; Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Kolon: 4,6x100 EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi: 2 µL)



Şekil 4.38. HILIC şartlarında, nükleositler için farklı sıcaklıklarda elde edilen kromatogramlar

(a) 25 °C; (b) 35 °C; (c) 45 °C ve (d) 55 °C; (Hareketli faz: NH_3-MeCN (1:9; v/v); NH_3 çözeltisi: 0,10 F-pH=6,0; Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Kolon: 4,6x100 EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi: 2 µL)

Nükleositlerde olduğu gibi, hareketli fazda Su yerine NH_3 çözeltisi kullanıldığında, Ura, Thy ve Cyt nükleobazları için RPLC şartlarında elde edilen *k'* değerlerinin birbirine çok yakın olduğu görülmüştür (Şekil 4.39 ve Tablo 4.13). Bu nedenle; nükleobazlar için NH_3-MeOH hareketli faz sistemi ile RPLC şartlarındaki ayırmaların çok tatmin edici olmadığı görülmüştür. Hareketli fazdaki MeOH oranının düşük tutulduğu durumlarda; Ura, Thy ve Cyt için kromatografik ayrımaların iyileştirilebileceği düşünülmüştür. Fakat bu durumda; Ade ve Gua'nın çok geç elue olduğu ve elde edilen piklerin yayıldığı görülmüştür. Nükleositlerde olduğu gibi, MeOH-NH_3 hareketli faz sisteminin kullanıldığı RPLC şartlarında, MeOH oranının düşürülmesi ve uygun gradyent programlarının uygulanmasıyla nükleobazların kromatografik ayrılmalarını optimize etmek mümkün gözükmektedir.



Şekil 4.39. RPLC şartlarında nükleobazların *k'* değerlerinin NH_3 çözeltisinin pH değeri ve sıcaklığa bağlı olarak değişimi

(a) 25 °C; (b) 35 °C ve (c) 45 °C; (Hareketli faz: NH_3-MeOH (9:1; v/v); Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Kolon: 4,6x100 EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi: 2 µL; 0,1 F NH_3 çözeltisinin pH'sı, 0,1 M HCl çözeltisi ile istenen seviyeye ayarlanmıştır)

Tablo 4.13. RPLC şartlarında nükleobazların *k'* değerlerinin NH_3 çözeltisinin pH'sına ve sıcaklığa bağlı olarak değişimi [a]

pH	T (°C)	***k'*±*s*** [b]				
		Ura	Thy	Cyt	Ade	Gua
3,4	25	0,45±0,01	0,97±0,01	1,07±0,03	8,16±0,03	9,02±0,03
	35	0,36±0,01	0,75±0,01	0,91±0,03	6,10±0,03	6,04±0,03
	45	0,30±0,01	0,60±0,01	0,75±0,02	4,52±0,03	4,18±0,03
5,2	25	0,49±0,01	1,05±0,01	1,92±0,03	17,3±0,03	13,0±0,03
	35	0,38±0,01	0,81±0,01	1,44±0,03	12,3±0,03	9,05±0,03
	45	0,31±0,01	0,64±0,01	1,16±0,03	8,68±0,03	6,22±0,03
6,0	25	0,49±0,01	1,08±0,01	1,86±0,03	17,1±0,03	13,2±0,03
	35	0,38±0,01	0,82±0,01	1,18±0,03	11,0±0,03	7,80±0,03
	45	0,31±0,01	0,65±0,01	0,86±0,02	6,91±0,03	5,23±0,03
7,0	25	0,50±0,01	1,08±0,01	1,07±0,02	15,6±0,03	12,3±0,03
	35	0,41±0,01	0,85±0,01	0,90±0,02	10,0±0,03	8,09±0,03
	45	0,34±0,01	0,68±0,01	0,74±0,02	7,01±0,03	5,65±0,03

[a] Veriler, Şekil 4.39'da grafiksel olarak verilmiş olup, deneysel şartlar şekilde belirtilmiştir. Hareketli faz: NH_3-MeOH (9:1; v/v); Belirtilen pH değerleri, NH_3 çözeltilerinin pH'ları olup, 0,1 M HCl çözeltisi ile istenen seviyeye ayarlanmıştır.

[b] *s*: Standart sapma; Tekrar sayısı, *n*=3

Nükleobazlar için HILIC şartlarında farklı pH ve sıcaklıklarda elde edilen *k'* değerlerine bakıldığında (Şekil 4.40 ve Tablo 4.14), Ura ve Thy için *k'* değerlerinin, kromatografik ayrılmalarını mümkün kılmayacak kadar birbirine yaklaştığı görülebilir. Benzer şekilde, Ade ve Cyt de birbirine çok yakın *k'* değerleri sergilemiştir. Nitekim; nükleobazların çok bileşenli numuneleriyle yürütülen analizlerden elde edilen kromatogramlar, çalışılan türlerin başarılı bir şekilde ayrılamadığını göstermektedir (Şekil 4.41). Hareketli fazda su yerine NH_3 çözeltisinin kullanılması, türlerin hızlı bir şekilde elue olmasına ve de sabit fazın türlere karşı sergilediği seçiciliğin azalmasına yol açmıştır. HILIC şartlarında, hareketli fazdaki MeCN oranının %90'dan daha düşük olduğu durumlarda sabit fazın seçiciliğindeki düşüş daha fazla olduğundan (Bkz. Şekil 4.31), bu şartlarda denemeler yürütülmemiştir.

Nükleosit ve nükleobazların EC-HA-APS sabit fazı üzerinde benzer davranışlar sergilemesi nedeniyle, nükleobazlar için kromatografik ayırmaların RPLC ve HILIC

modlarında, hareketli faz pH'sının ayarlanması temelinde optimizasyonu üzerinde çok fazla durulmamış ve elde edilen kromatogramlarla yetinilmiştir.

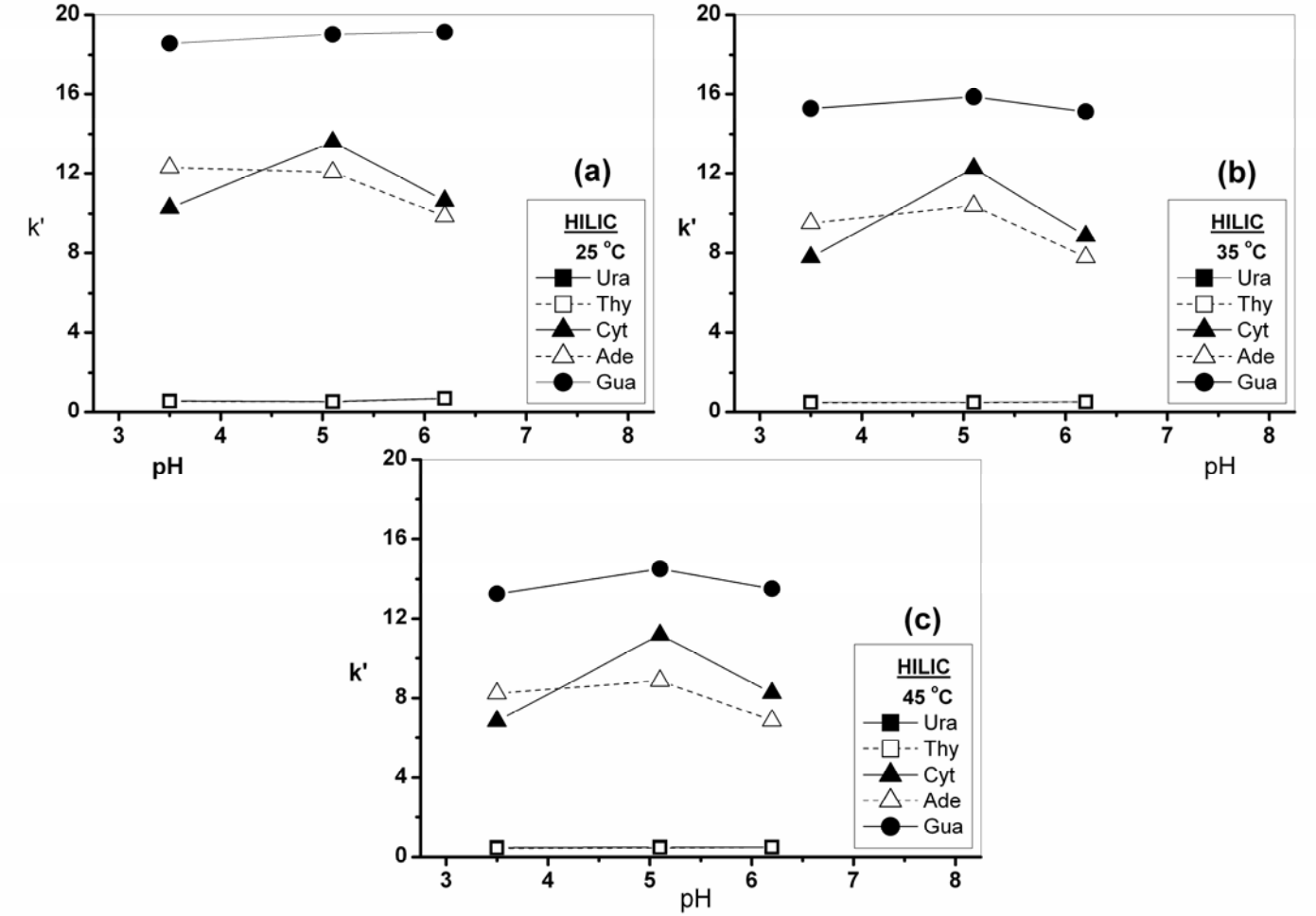
Nükleosit ve nükleobazların RPLC ve HILIC şartlarındaki kromatografik davranışları değerlendirildiğinde, hareketli fazda NH_3 çözeltisi kullanıldığında türlerin sabit faz üzerinden daha hızlı bir şekilde elue olabildiği sonucu çıkarılabilir. Bu durum, türlerin *k'* değerlerinin birbirine yaklaşmasına yol açsa da, hareketli fazdaki organik çözücü oranında yapılacak uygun bir gradyentle, türleri birbirinden başarılı bir şekilde ayrmanın mümkün olabileceği düşünülmüştür. Ayrıca; uygulanan HPLC moduna bağlı olarak türlerin elüsyon-sıralamasında da önemli farklılaşmalar gözlenmiş ve bu durum ayrımada rol alan mekanizmalarda meydana gelen değişimlerle ilişkilendirilmiştir.

Tablo 4.14. HILIC şartlarında nükleobazların *k'* değerlerinin NH_3 çözeltisinin pH'sı ve sıcaklığa bağlı olarak değişimi [a]

pH	T (^oC)	***k'*±*s*** [b]				
		Ura	Thy	Cyt	Ade	Gua
3,5	25	0,55±0,01	0,54±0,01	10,3±0,02	12,3±0,03	18,6±0,02
	35	0,49±0,01	0,49±0,01	7,78±0,03	9,52±0,03	15,3±0,03
	45	0,47±0,01	0,44±0,01	6,83±0,03	8,24±0,03	13,3±0,03
5,1	25	0,53±0,01	0,52±0,01	13,6±0,02	12,1±0,03	19,0±0,03
	35	0,49±0,01	0,47±0,01	12,3±0,03	10,4±0,03	15,9±0,02
	45	0,48±0,01	0,46±0,01	11,2±0,03	8,88±0,03	14,5±0,03
6,2	25	0,68±0,01	0,67±0,01	10,6±0,03	9,87±0,03	19,2±0,03
	35	0,52±0,01	0,50±0,01	8,86±0,03	7,79±0,03	15,1±0,03
	45	0,48±0,01	0,48±0,01	8,26±0,02	6,86±0,03	13,5±0,02

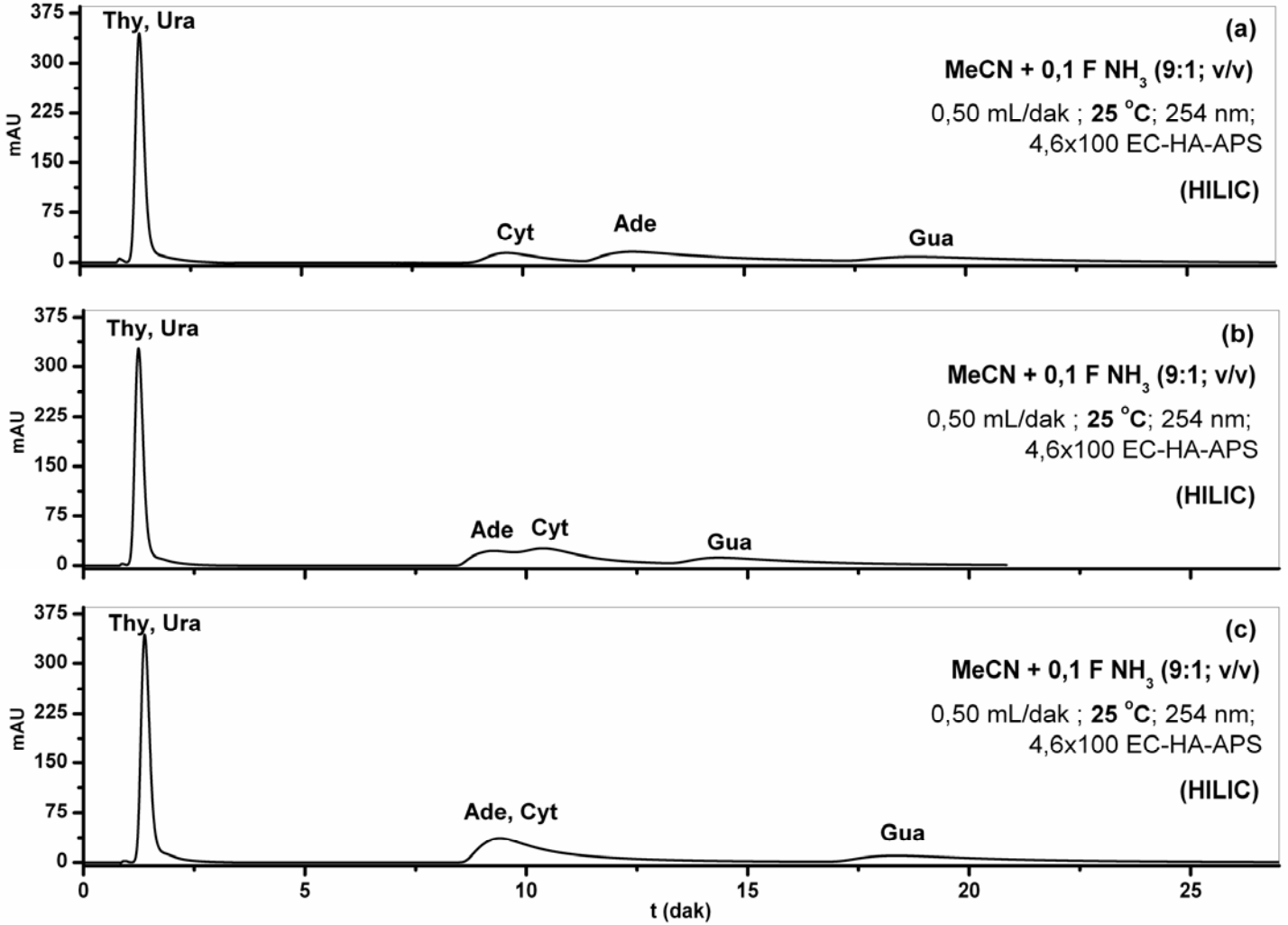
[a] Veriler, Şekil 4.40'ta grafiksel olarak verilmiş olup, deneysel şartlar şekilde belirtilmiştir. Hareketli faz: NH_3-MeCN (1:9; v/v); Belirtilen pH değerleri, 0,1 F NH_3 çözeltilerinin pH'ları olup, 0,1 M HCl çözeltisi ile istenen seviyeye ayarlanmıştır.

[b] *s*: Standart sapma; Tekrar sayısı, *n*=3



Şekil 4.40. HILIC şartlarında nükleobazların *k'* değerlerinin NH_3 çözeltisinin pH değeri ve sıcaklığa bağlı olarak değişimi

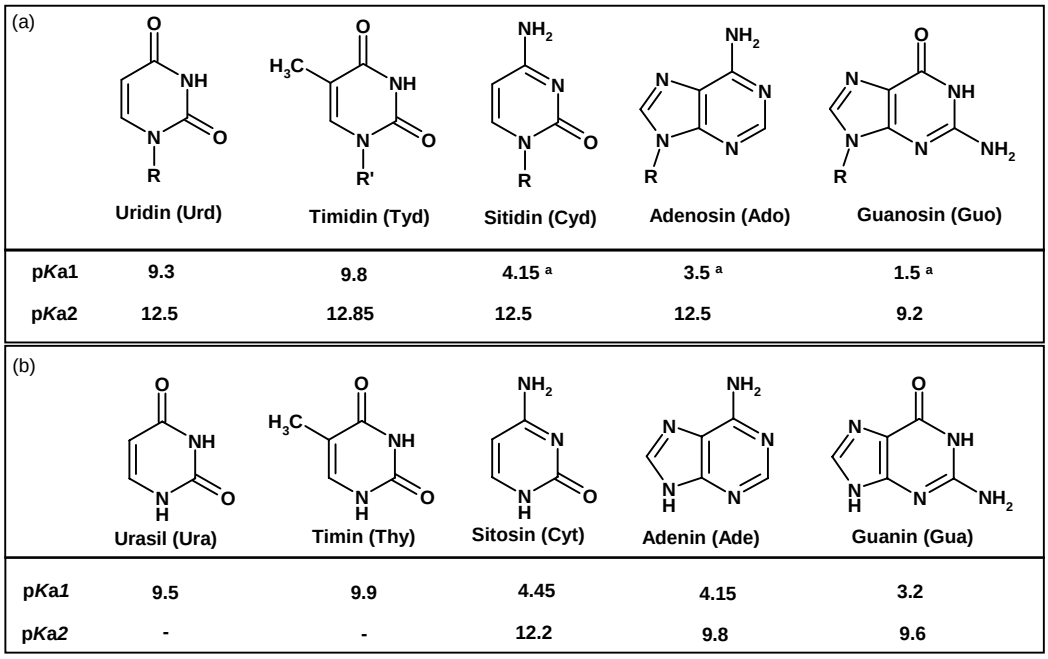
(a) 25 °C; (b) 35 °C ve (c) 45 °C; (Hareketli faz: NH_3-MeCN (1:9; v/v); Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Kolon: 4,6x100 EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi: 2 µL; 0,1 F NH_3 çözeltisinin pH'sı, 0,1 M HCl çözeltisi ile istenen seviyeye ayarlanmıştır)



Şekil 4.41. Nükleobazlar için HILIC şartlarında elde edilen kromatogramlar

0,1 F NH_3 çözeltisinin pH'sı: (a) pH=3,5; (b) pH=5,1 ve (c) pH=6,2; (Diğer deneysel şartlar şekil üzerinde belirtilmiştir)

Kromatografik davranışların şekillenmesinde rol alan mekanizmaları pH ve sıcaklık temelinde değerlendirmek için çalışılan nükleosit ve nükleobazların moleküler yapıları ve asidik iyonlaşma sabitleri (pK_a) Şekil 4.42'de verilmiştir. Hidrofobik, hidrofilik ve iyonlaşabilen yapılar ve π-π bağları içeren bu bileşiklerin, benzer yapılar içeren sabit faz ile hidrofobik, hidrofilik, iyonik ve π-π etkileşmeleri üzerinden etkileşmeye girebileceğini öngörmek mümkündür. Bu etkileşmelerin yanı sıra; hidrojen bağı oluşumunun da rol alabileceği belirtilmelidir. Yani; çalışılan türlerin kromatografik ayırmalarında spesifik karakteri yüksek ve düşük etkileşmelerin birlikte rol alması beklenir. Dolayısıyla; hem sabit fazın, hem de nükleosit ve nükleobazların sergilediği multifonksiyonel karakter nedeniyle, kromatografik davranışları tek bir mekanizma üzerinden açıklamak zordur. Deneysel şartlara bağlı olarak, yukarıda belirtilen bu etkileşmelerin düzeyinde farklılaşmalar olabilir ve bazıları baskın bir karakter sergileyebilir. Bu nedenle; incelenen bileşiklerin sabit faz üzerindeki kromatografik davranışlarının çeşitli mekanizmalar tarafından belirleneceği ve (belirtilen etkileşmelerin ortak bir etkisi olarak) yaygın olarak kullanılan sabit fazlara kıyasla kromatografik ayırmaların daha başarılı bir şekilde gerçekleştirilebileceği düşünülmüştür.



Şekil 4.42. Çalışılan nükleosit ve nükleobazların moleküler yapıları ve pK_a değerleri

[a] Amin grubunun protonlanmış şekli için ; [b] R: Ribosil; R': Deoksiribosil (Li ve ark., 2004)

pH ve sıcaklık denmelerinden; hareketli fazda su yerine NH_3 çözeltisi kullanıldığında türlerin daha düşük kapasite faktörleri sergiledikleri görülmüştür. Bu durum; çalışılan türler ile hareketli fazdaki NH_3/NH_4^+ türleri arasında sabit fazdaki bazı fonksiyonel gruplara karşı yarışmalı bir etkileşme ile ilişkilendirilmiştir. Çalışılan nükleosit ve nükleobazların moleküler yapılarına ve pK_a değerlerine bakarak; çalışılan pH aralığında (pH=3–7), nükleosit ve nükleobazların büyük oranda (iyonlaşmamış) moleküler halde bulunacağı söylenebilir. Diğer taraftan; yapısında $–NH_2$ grubu bulunduran nükleosit ve nükleobazların pH=3–5 aralığında kısmen $–NH_3^+$ şekillerine dönüşebileceğini de belirtmek gerekir. Sabit fazın 2,7 olan pH_{pzc} değeri göz önünde bulundurulduğunda, sabit faz yüzeyinin çalışılan pH aralığında net bir negatif yükle yüklenmiş olacağı ve dolayısıyla $–NH_3^+$ şekline dönüşebilen nükleosit ve nükleobazları iyonik etkileşmeler temelinde çekebileceğini söylemek mümkündür. Fakat; iyonlaşma karakteri yüksek olan türlerin su oranı yüksek hareketli fazda bulunma oranının da artacağını ve dolayısıyla daha hızlı bir şekilde kolondan elue olabileceğini de belirtmek gerekir. NH_3 çözeltisinin pH değerinin etkisini kapsamlı bir şekilde değerlendirebilmek için RPLC şartlarında farklı pH değerlerinde van't Hoff eğrileri türetilmiştir.

van't Hoff eğrileri; sabit faz özellikleri incelenen materyallerin karakterizasyonunda termodinamik etkileri değerlendirmek ve çalışılan deneysel şartlarda türlerin kromatografik davranışlarında rol alan mekanizmalardaki farklılaşmaları değerlendirmek bakımından öneme sahiptir. van't Hoff eğrisi; herhangi bir türün çalışılan deneysel şartlardaki kapasite faktörünün *e* tabanına göre logaritması (ln*k'*) ile mutlak sıcaklığın tersinin (1/T) grafiğe geçirilmesiyle elde edilir. Aşağıdaki eşitlikle ifade edilen van't Hoff eşitliği; ilgili türün kromatografik davranışlarının şekillenmesinde entalpi (ΔH) ve entropi (ΔS) katkılarının değerlendirilebilmesini mümkün kılar; bunun için ln*k'*–1/T eğrisinin eğimi ve ekseni kesim notasından faydalanılır (Kowalska ve ark 2006, Gou ve Gaiki 2005):

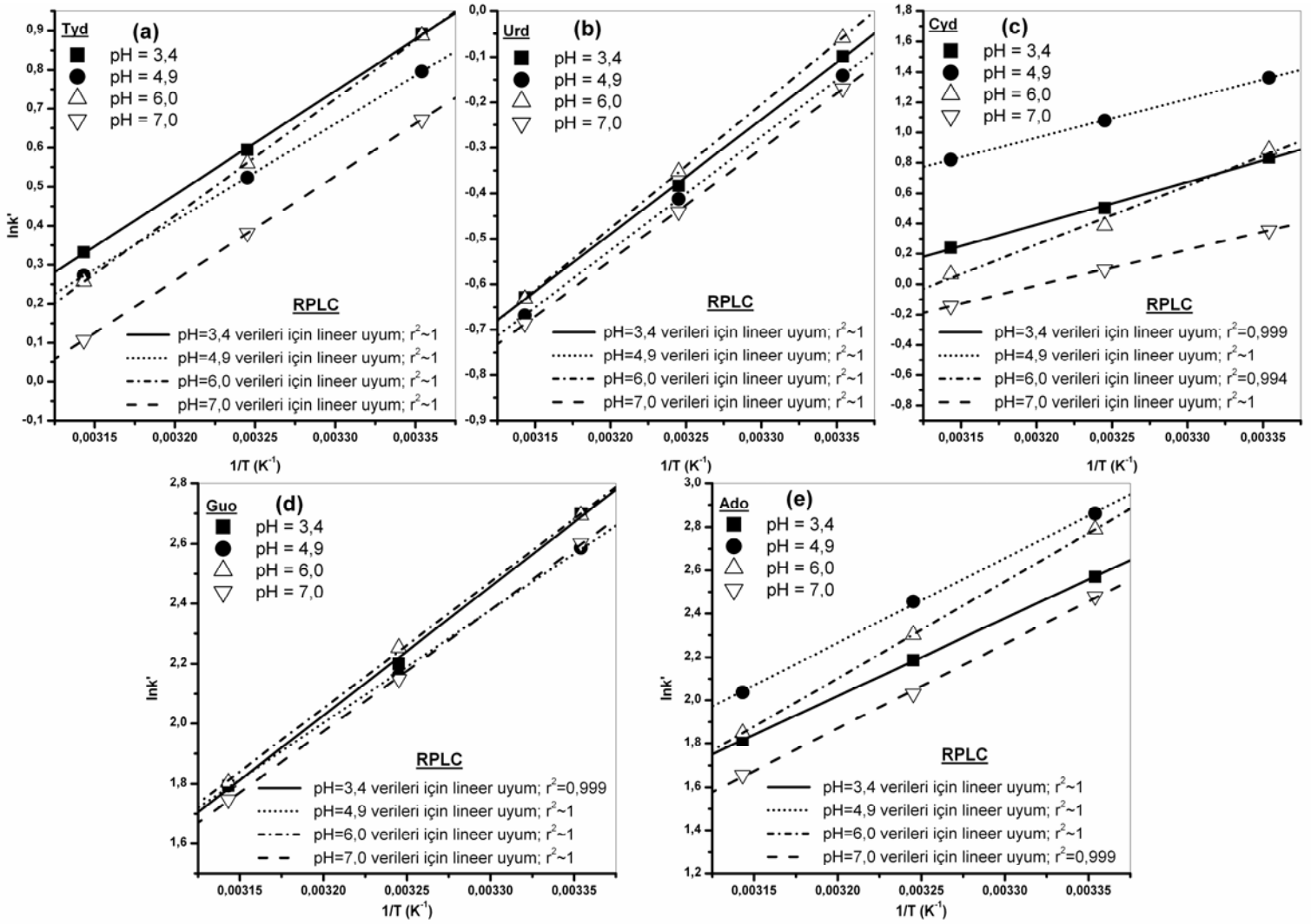
$$\ln k' = -\frac{\Delta H^\circ}{R} \times \frac{1}{T} + \frac{\Delta S^\circ}{R} + \ln \phi$$

Burada; ilgili tür için alıkonma entalpisi ve entropisi sırasıyla ΔH^o ve ΔS^o ile belirtilmiş olup; R, gaz sabitini ve ϕ, faz oranını göstermektedir.

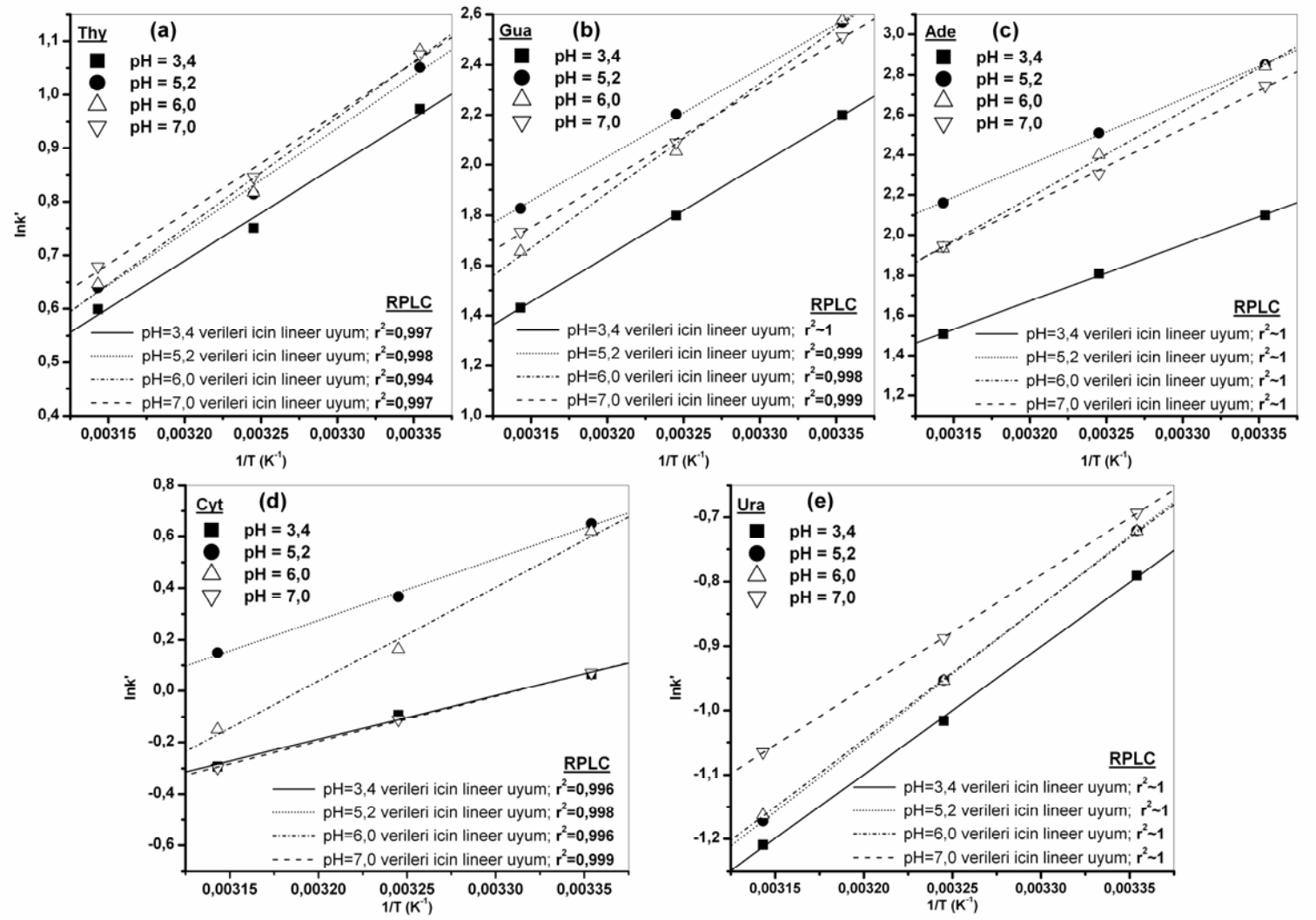
Çalışmalarımızda; van't Hoff eğrileri sadece, çalışılan deneysel şartlarda kromatografik davranışların belirlenmesinde rol alan mekanizmaların şeklinde sıcaklığa

bağlı bir değişikliğin olup-olmadığını anlamak amacıyla kullanılmış olup; termodinamik veriler temelinde yorumlara gidilmemiştir.

Nükleosit ve nükleobazlar için RPLC şartlarında türetilen van't Hoff eğrileri Şekil 4.43 ve Şekil 4.44'te verilmiştir. İncelenen türler için çalışılan aralıkta sıcaklık arttıkça kapasite faktörlerinin düştüğü görülmüş ve türetilen van't Hoff eğrilerindeki noktaların pozitif eğime sahip bir doğru oluşturacak şekilde dağıldıkları tespit edilmiştir (r^2=0,994–1,000). Bu, RPLC şartlarında karşılaşılan tipik bir durum olup, kromatografik davranışların şekillenmesinde fiziksel etkileşmelerin önemli düzeyde rol almış olduğunu gösterir. Ayrıca; van't Hoff eğrilerindeki noktaların lineer bir dağılım sergilemesi, kromatografik davranışların belirlenmesinde çalışılan sıcaklık aralığında tek tip bir mekanizmanın rol almış olması ve verilen sıcaklık aralığında mekanizmada herhangi bir farklılaşmanın meydana gelmemiş olmasıyla ilişkilendirilebilir. Belirtilen bu baskın mekanizmayla birlikte düzeyi daha zayıf olan başka tür mekanizmaların da (ör. iyon-değiştirme) rol almış olabileceği belirtilmelidir. Fakat; daha düşük düzeyde rol aldığı düşünülen bu tip etkileşmelerin, van't Hoff eğrilerinin şeklinde önemli bir değişiklik meydana getirmediği düşünülmüştür.



Şekil 4.43. Nükleositler için RPLC şartlarında NH_3 çözeltisinin farklı pH değerleri için türetilen van't Hoff eğrileri



Şekil 4.44. Nükleobazlar için RPLC şartlarında NH_3 çözeltisinin farklı pH değerleri için türetilen van't Hoff eğrileri

NH_3 çözeltisinin pH'sına bağlı olarak, RPLC şartlarında nükleositler için elde edilen *k'* değerlerindeki değişime bakıldığında (Şekil 4.33); NH_3 çözeltisinin pH'sına bağlı olarak türlerin elüsyon-sıralamasında bazı farklılaşmaların meydana geldiği görülebilir. Örneğin; pH=3,5 dolaylarında nükleositler için *k'* değerlerinin Urd<Cyd<Tyd<Ado<Guo; pH=5,0 dolaylarında Urd<Tyd<Cyd<Guo<Ado; pH=7,0 dolaylarında ise Urd<Cyd<Tyd<Ado<Guo sırasında arttığı görülmüştür. *k'* değerleri ve elüsyon-sıralamalarındaki en önemli farklılaşmalar Cyd, Ado ve Guo türlerinde gözlenmiş olup; Urd ve Tyd türlerinin kapasite faktörlerinin pH'ya göre çok önemli bir değişiklik sergilemediği görülmüştür. Bu durumun, her iki türün protonlanmış bir şekle dönüşmemiş olması ve dolayısıyla çalışılan pH aralığında sabit fazla etkileşme tiplerinin düzeyinde önemli bir değişiklik meydana gelmemiş olmasıyla ilişkili olduğu düşünülmüştür. Protonlanabilme eğilimi yüksek olan Cyd, Ado ve Guo türlerinin pK_a değerlerine bakarak, pH=3,5 dolaylarında türlerin protonlanmış şekillerine dönüşme eğiliminin Guo<Ado<Cyd sırasında artacağı söylenebilir. Yani; bu şartlarda protonlanmış şekli en baskın olan tür Cyd; en düşük olan ise Guo'dur. Aslında, protonlanmış türün, (bu şartlarda bile) yüzeyinde net bir negatif yük bulunduran sabit faz tarafından çekilmesi ve dolayısıyla daha geç elue olması beklenirdi. Fakat; sonuçlar bunun tam tersini göstermiştir: İlk elue olan tür Cyd ve son elue olan tür Guo olmuştur. Beklenmeyen bu durumun, protonlanarak iyonik bir şekle dönüşen türün su bakımından zengin olan hareketli faz tarafından hızlı bir şekilde elue olmasından kaynaklandığı düşünülmüştür. Diğer taraftan; hareketli fazda kullanılan NH_3 molekülleri bu şartlarda büyük oranda NH_4^+ türlerine dönüşecek ve sabit fazın negatif yüzeyiyle yarışmalı bir şekilde etkileşecektir. Hareketli fazdaki konsantrasyonu yüksek olan NH_4^+ 'un sabit fazın yüzeyindeki negatif yüklü fonksiyonel grupları kapatmasının bir sonucu olarak protonlanmış nükleositlerin sabit faz ile iyonik kuvvetler temelindeki etkileşmelere girme oranı önemli oranda düşmüş ve bu nedenle türler ile sabit faz arasındaki etkileşmeler büyük oranda hidrofobik etkileşmelere doğru kaymış olabilir. Bu noktada; protonlanma eğilimi yüksek olan türün (Cyd) sabit faz ile düşük düzeyde hidrofobik etkileşmelere; protonlanma eğilimi düşük olan türün (Guo) ise sabit faz ile daha yüksek düzeyde hidrofobik etkileşmelere girmiş olması beklenir. Cyd'nin pH=3,5 dolaylarında, (bu şartlarda protonlanamayan) Tyd'den bile önce elue olmasının bu etkilerin bir sonucu olduğu düşünülmüştür. Nitekim; pH=5,0 dolaylarında, yapısında $-NH_2$ grubu bulunan bu üç türün kapasite faktörlerinin arttığı görülmüştür. Bu durum; belirtilen şartlarda, türlerin büyük oranda protonlanmamış (moleküler) şekillerine dönüşmesi ve

böylece sabit faz ile daha yüksek düzeyde hidrofobik etkileşmeye girmiş olmasıyla ilişkilendirilmiştir. Türlerin hidrofobik, hidrojen bağı oluşumu, polar-polar ve π-π etkileşme düzeylerindeki farklılaşmanın bir sonucu olarak bu şartlarda, Ado en geç elue olan tür olmuştur. Fakat; Ado ile Guo'nun moleküler yapılarının birbirine benzemesi, moleküler yapı temelinde daha derinlemesine bir analizin yapılmasını zorlaştırmıştır. Cyd'nin bu iki türden de önce elue olması, görece küçük moleküler yapısı nedeniyle sabit faz ile daha düşük düzeyde hidrofobik (ve/veya dispersif etkileşmelere) girmiş olmasından kaynaklanmış olabilir. Yapısında $–NH_2$ gurubu bulunduran nükleositlerin "*vertical stacking*" adı verilen bir etkiyle moleküller arası etkileşmelere girdiği ve bunun bir sonucu olarak da ilgili türlerin sabit faz ile dispersif etkiler temelinde daha kuvvetli bir şekilde etkileştiği belirtilmiştir (Li ve ark., 2004). Cyd, Ado ve Guo'nun geç elue olmasında bu etkinin de kısmen rol aldığı düşünülmüştür. Hareketli faz pH değerinin 5,0'dan daha yüksek olduğu şartlarda Cyd, Ado ve Guo'nun kapasite faktörlerinin tekrar düşme eğilimine girdiği gözlenmiştir. pH değerinin arttırılmasıyla kapasite faktörlerinde gözlenen bu azalmanın, pH artışıyla nükleositlerin su bakımından zengin olan hareketli fazda çözünme eğilimlerinin artmasıyla ilişkili olduğu düşünülmüştür. Buna ilaveten; pH'nın artmasıyla, sabit faz ile hidrojen bağı oluşumuna dayanan etkileşmelerin düzeyinde de bazı farklılaşmaların meydana gelmiş olabileceği ve bunun da türlerin elüsyonunu hızlandırmış olabileceği düşünülmektedir.

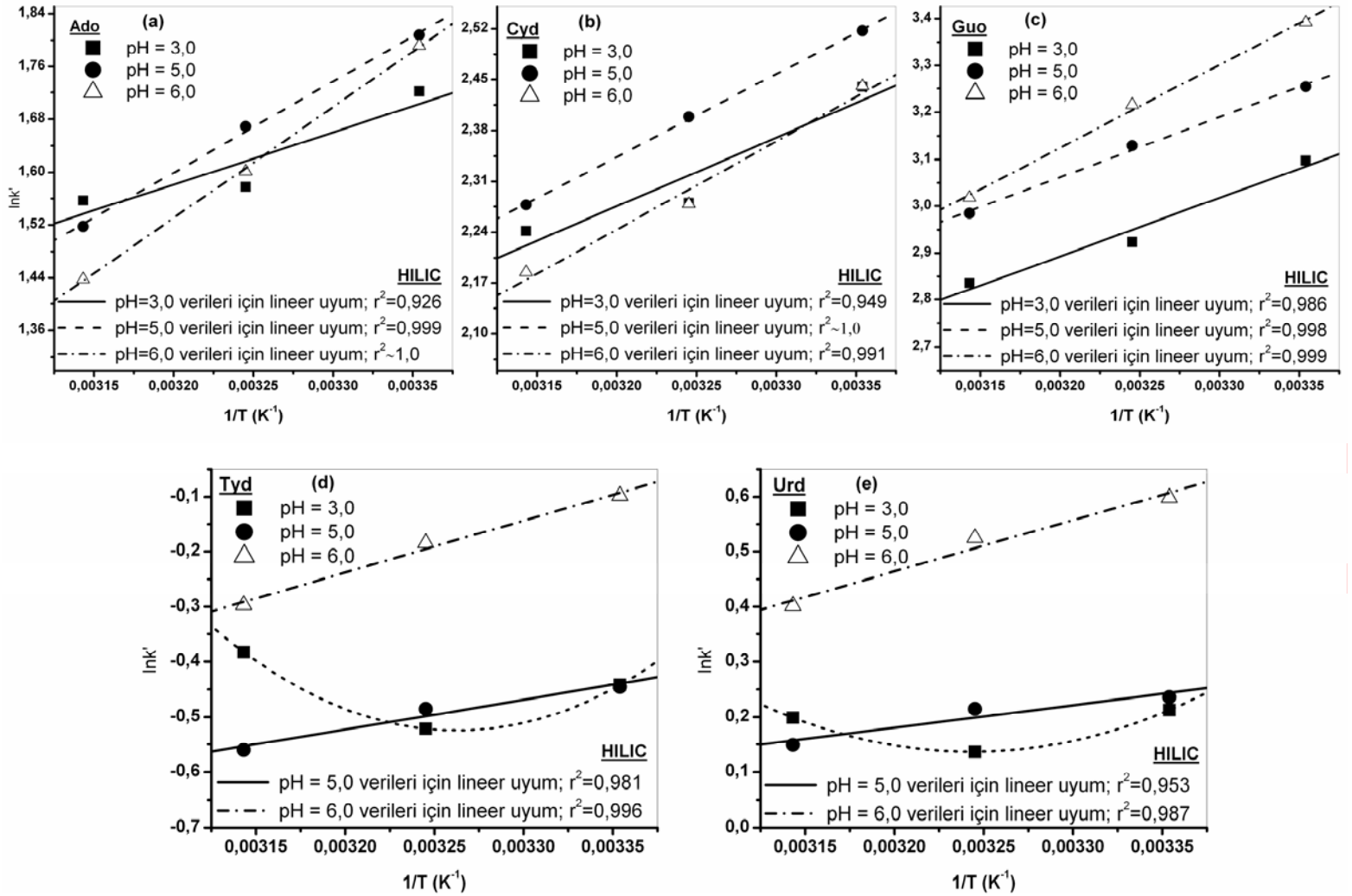
Sonuç olarak; RPLC şartlarında, çalışılan nükleosit ve nükleobazların kromatografik davranışlarının büyük oranda fiziksel etkileşmelere dayandığı, düşük pH değerlerinde rol alması beklenen iyonik etkileşmelerin, van't Hoff eğrilerinde farklılaşmaya yol açabilecek kadar yüksek düzeyde olmadığı düşünülmüştür. Diğer taraftan; NH_3 çözeltisinin pH değerinin kapasite faktörlerinde önemli farklılaşmalara yol açtığı ve bu farklılaşmaların büyük oranda türlerin iyonik forma dönüşebilme eğilimleriyle ilişkili olduğu görülmüştür. Benzer durumlar nükleobazlar için de gözlenmiş olup; protonlanma eğilimi yüksek olan Cyt, Ade ve Gua'nın pH=3,5 dolaylarında Cyt<Ade<Gua şeklinde bir elüsyon-sıralaması sergilediği görülmüştür. Ade'nin Cyt'den daha yüksek protonlanma eğilimine sahip olmasına karşın Cyt'den daha sonra elue olmasının, Ade'nin daha büyük bir moleküler yapıya sahip olması ve dolayısıyla sabit fazla daha yüksek düzeyde hidrofobik (ve/veya dispersif) etkileşmelere girmiş olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu pH değerinde, ortam sıcaklığı arttırıldığında Gua'nın *k'* değerindeki azalmanın Ade'den daha yüksek olduğu tespit edilmiştir (Şekil 4.39). Bu durum; Ade'nin sabit faz ile kısmen de olsa iyonik

etkileşmelere girmiş olmasından kaynaklanabilir. Genel bir eğilim olarak; pH=3,5 dolaylarında bu üç nükleobaz, nükleositlerinin (Cyd, Ado ve Guo) sergilediği davranışlara benzer davranışlar sergilemiştir. pH=5,0 ve 6,0'da nükleobazların alıkonma sürelerinin Ura<Thy<Cyt<Gua<Ade sırasında azaldığı görülmüş; pH=7,0 dolaylarında bu sıralama çok fazla değişmemekle birlikte Cyt ve Thy'nin *k'* değerlerinin birbirine çok yaklaştığı tespit edilmiştir. pH=5,0'dan 7,0'a doğru arttırıldığında Cyt, Ade ve Gua'nın *k'* değerlerindeki azalmanın nükleositlerininkinden daha düşük olduğu gözlenmiştir. Bu durum; pH artışıyla nükleobazların hareketli fazdaki çözünme karakterindeki artışın nükleositlerdeki kadar belirgin olmamasından kaynaklanabilir: Nükleositlerdeki şeker halkaları, bu türlerin hareketli fazdaki çözünmelerini (ve dolayısıyla elüsyonlarını) kolaylaştırmış olabilir. Nükleositlerdeki yorumlara benzer şekilde; nükleobazların kromatografik davranışlarının şekillenmesinde en baskın etkileşmenin hidrofobik etkileşmeler olduğu düşünülmüştür. Diğer taraftan; kromatografik ayırmaların iyileştirilmesinde pH ve sıcaklığın önemli etkilere sahip deneysel parametreler olduğu görülmüştür. van't Hoff eğrilerinden; aynı pH değerinde, sıcaklığın (çalışılan aralıkta) mekanizma üzerinde bir farklılaşmaya yol açmadığı sonucuna varılmıştır.

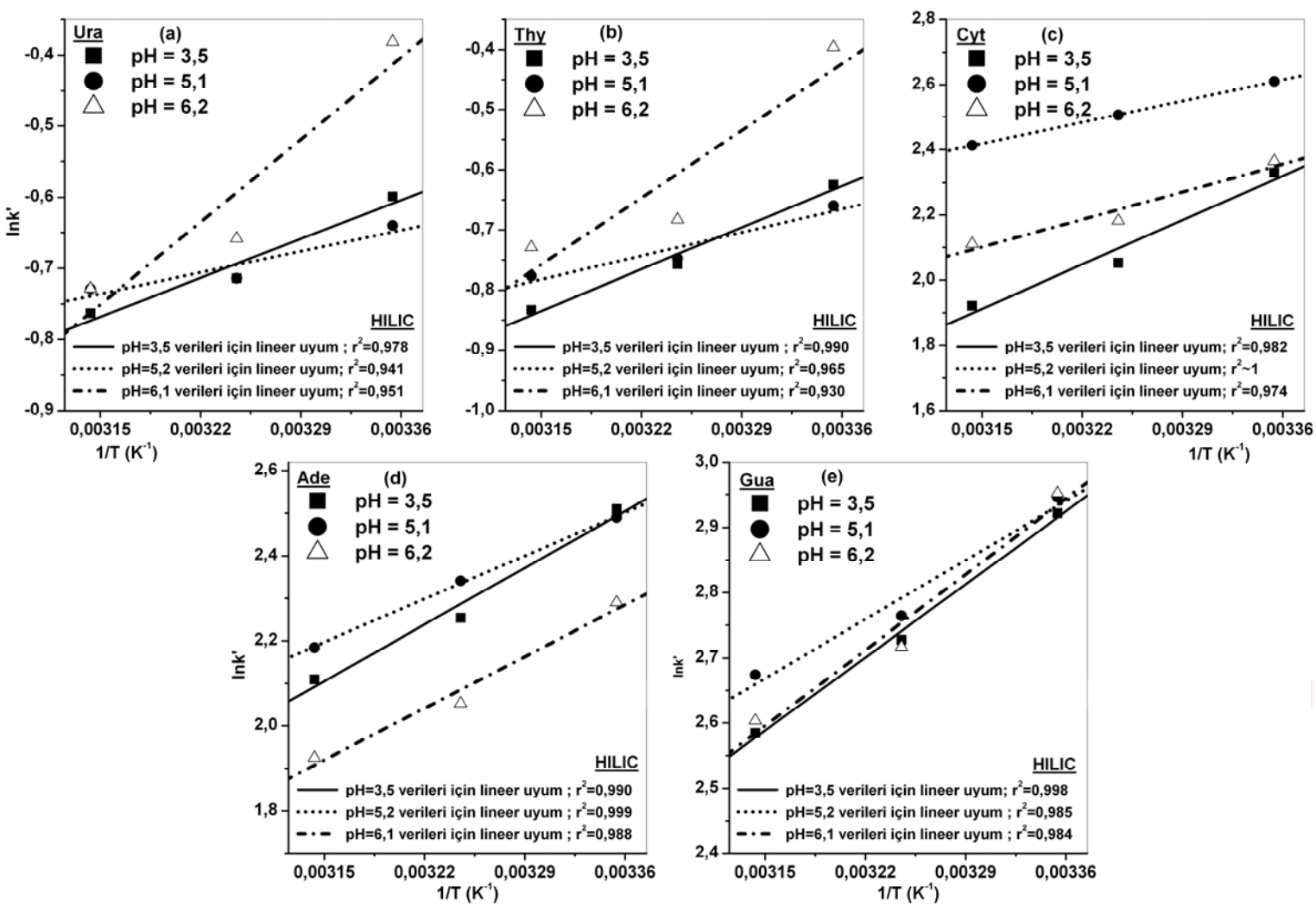
Nükleosit ve nükleobazlar için HILIC şartlarında türetilen van't Hoff eğrileri (Şekil 4.45 ve Şekil 4.46), RPLC şartlarında türetilenlerle (Şekil 4.43 ve Şekil 4.44) benzerlik göstermiştir. Eğrilerde gözlenen genel bir eğilim olarak; noktalar lineer bir dağılım sergilemekte ve pozitif eğime sahip bir doğru üzerinde dağılmaktadır. Bu nedenle; aynı pH değeri için HILIC modunda da kromatografik davranışların belirlenmesinde baskın olan tek tip bir mekanizmanın rol aldığı ve bu mekanizmanın çalışılan sıcaklık aralığında değişmediği sonucuna varılmıştır. Fakat; Urd ve Tyd için pH=3,0'da türetilen van't Hoff eğrilerinde noktaların (kısmen de olsa) lineerlikten saptığı tespit edilmiştir. RPLC şartlarında farklı sabit fazlar üzerinde çeşitli bileşikler için benzer bir davranış gözlenmiş olup; entalpi ve faz oranının (ϕ) sıcaklığa bağımlılığıyla ilişkilendirilmiştir (Cole ve Dorsey, 1992; Chester ve Coym, 2003). HILIC şartlarında bu davranışın çok yaygın olmadığı ve bunun için kapsamlı çalışmaların yapılması gerektiği de belirtilmiştir (Gou ve Gaiki, 2005). Nükleositler için HILIC şartlarında farklı pH ve sıcaklıklarda elde edilen *k'* değerlerindeki değişimlere bakıldığında (Şekil 4.35), Guo hariç diğer dört türün *k'* değerlerinin pH değişimlerinden çok fazla etkilenmediği görülebilir. Fakat; nükleobazlar için aynı şeyi söylemenin güç olduğu Şekil 4.40'ta görülmektedir: HILIC şartlarında pH'ya bağlı olarak

nükleobazların elüsyon sıralamasında farklılaşmaların meydana geldiği görülmüştür. Bu nedenle; nükleobazların HILIC şartlarındaki pH değişimlerinden daha çok etkilendiği düşünülmüştür. Nükleobazlar için HILIC şartlarında elde edilen verilerden türetilen van't Hoff eğrilerinin büyük oranda lineer olduğunu söylemek mümkündür ($0,93<r^2<1,0$). Bu nedenle; aynı pH değeri için mekanizmada sıcaklığa bağlı olarak herhangi bir değişikliğin meydana gelmediği, fakat NH_3 çözeltisinin pH'sının etkisiyle türlerin sabit faz ile etkileşme düzeylerinde bazı farklılaşmaların meydana gelmiş olduğu düşünülmüştür.

Sonuç olarak; nükleosit ve nükleobazların HILIC şartlarındaki kromatografik davranışlarının, hareketli faz ile sabit faza adsorplanmış su moleküllerinin oluşturduğu su bakımından zengin bir ara yüzey arasındaki dağılmaya dayanan bir mekanizma temelinde şekillendiği söylenebilir.



Şekil 4.45. Nükleositler için HILIC şartlarında NH_3 çözeltisinin farklı pH değerleri için türetilen van't Hoff eğrileri



Şekil 4.46. Nükleobazlar için HILIC şartlarında NH_3 çözeltisinin farklı pH değerlerinde türetilen van't Hoff eğrileri

4.2.5. Kolon ön-şartlandırma işleminin etkisi

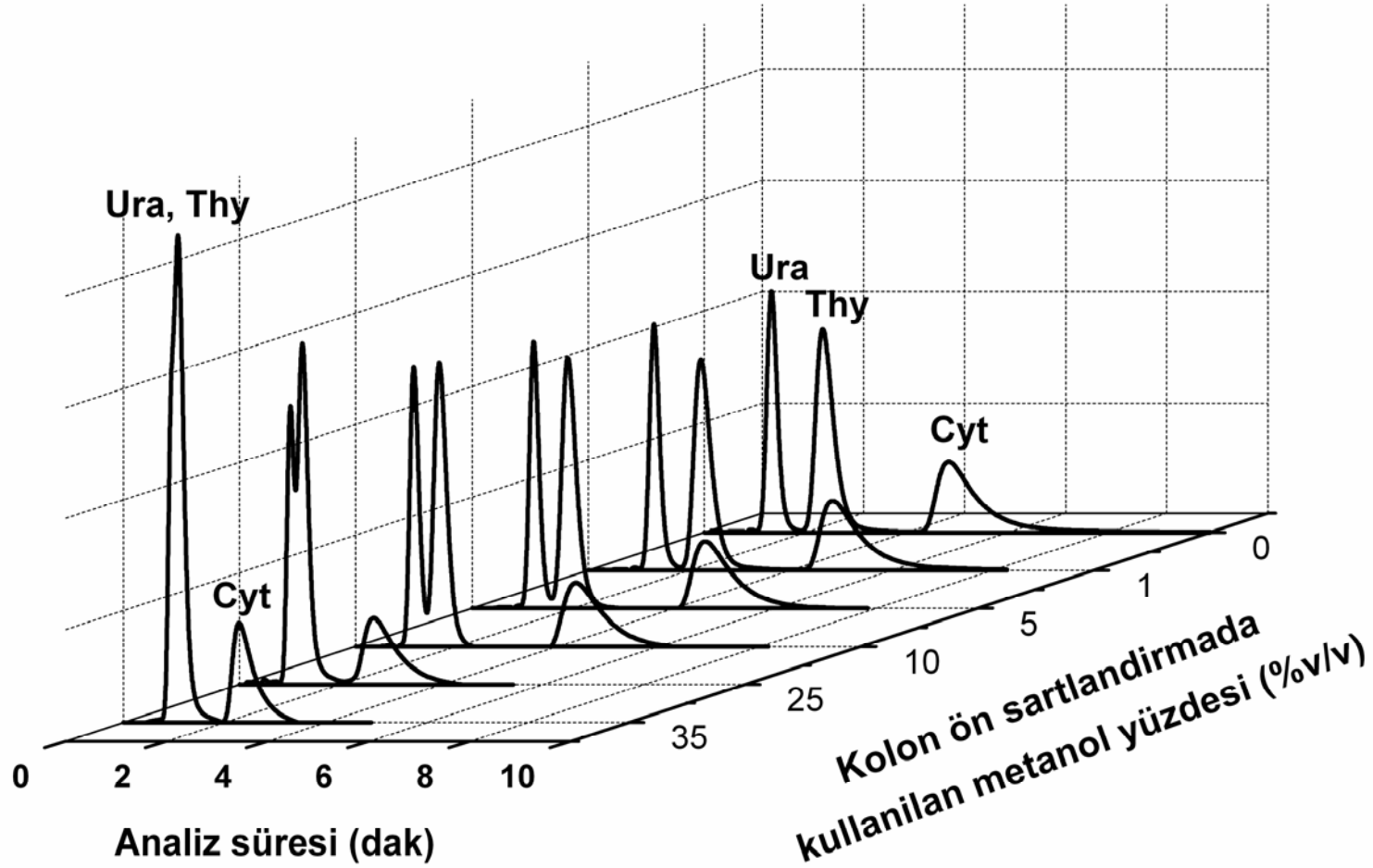
Suda yüksek çözünürlük sergileyen küçük moleküler yapıya sahip polar bileşiklerin RPLC modunda sabit faz ile düşük düzeyde etkileşmeye girmesi nedeniyle bu tür bileşiklerin kromatografik ayrılmaları için metot geliştirmede bazı zorluklarla karşılaşılmaktadır. Özellikle yüzeyinde hidrofobik gruplar bulunduran sabit fazlarla (ör. C18) yapılan analizlerde küçük moleküler yapıya sahip polar bileşiklerin birbirinden ayrılması için hareketli fazdaki organik çözücü oranının çok düşük tutulması gerekebilmektedir. Yüksek oranda su içeren hareketli fazlarla etkileştirilen sabit fazın yüzeyinde bulunan hidrofobik gruplar suyun etkisiyle kapanır ve analitler, ayırmalarında rol alan bu gruplarla yeterli düzeyde etkileşmeye giremez (Olsen, 2001).

EC-HA-APS, yüzeyine HA immobilize edilmiş bir sabit faz olup, yüzeydeki HA makromolekülleri hem hidrofilik hem de hidrofobik karaktere sahip yapılar içermektedir. Ana organik şebekeyi meydana getiren hidrofobik yapıların, yüksek oranda su içeren hareketli fazlarla etkileştirildiği zaman büzüşebileceği ve bu nedenle sabit fazın türlere karşı sergileyeceği kapasite ve seçicilikte düşüş gözlenebileceği düşünülmüştür. Diğer taraftan; HA'daki hidrofilik grupların etkisiyle, su oranı yüksek olan hareketli fazlarda bile EC-HA-APS açık bir yapı sergileyebilir. Hareketli fazdaki su ve organik çözücü oranına bağlı olarak sabit fazın geometrik yapısında meydana gelebilecek değişimlerin kromatografik davranışlar üzerindeki etkilerini değerlendirebilmek amacıyla bazı denemeler yürütülmüştür. Denemelerde; numune olarak Ura, Thy ve Cyt nükleobazlarının karışımı kullanılmış ve kromatografik ayırmalar %1 (v/v) oranında MeOH içeren Su-MeOH hareketli faz sistemi ile gerçekleştirilmiştir. Kromatografik denemelerden önce kolon %0-35 aralığında değişen oranlarda MeOH içeren Su-MeOH hareketli faz sistemiyle ön-şartlandırma işlemine tabi tutulmuştur. Ön-şartlandırma işlemlerinin etkisini değerlendirebilmek için; ön-şartlandırma işleminden sonra başlatılan kromatografik ayırmalarda hareketli faz bileşimi (Su–MeOH ; 99:1 (v/v)) sabit tutulmuştur. Böylece; ön-şartlandırma işlemine bağlı olarak çalışılan türlerin kromatografik ayırmalarındaki farklılaşmalar değerlendirilebilmiştir.

Yürütülen denemelerden elde edilen kromatogramlar Şekil 4.47'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi; kromatografik denemeler süresince kullanılan hareketli faz bileşimi aynı olmasına rağmen, kolon ön-şartlandırmada kullanılan MeOH oranına bağlı olarak ayırma gücünde farklılaşmalar gözlenmiştir. Kolon ön-şartlandırmada kullanılan

MeOH oranı arttırıldıkça, EC-HA-APS'nin türlere karşı sergilediği seçiciliğin azaldığı görülmektedir. Bu durumun; ön-şartlandırma işleminin etkisiyle sabit fazın yüzeyinde adsorplanan MeOH moleküllerinin miktarındaki değişimlerle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Ön-şartlandırmada kullanılan MeOH oranının %25 ve daha yüksek olduğu durumlarda, Ura ve Thy'nin birbirinden ayrılmamasının belirtilen bu etkiden kaynaklandığı düşünülmüştür.

Elde edilen veriler; EC-HA-APS'nin, RPLC şartlarında yüksek oranda su içeren hareketli faz sistemlerinde bile küçük moleküler yapıya sahip polar türlerle yüksek düzeyde etkileşmeye girebilme özelliğine sahip bir sabit faz olduğunu göstermiştir. Ayrıca; EC-HA-APS ile yürütülecek kromatografik analizlerde, kolon ön-şartlandırmanın bir deneysel parametre olarak değerlendirilebileceği sonucuna varılmıştır. Nitekim; EC-HA-APS ile RPLC şartlarında yürütülecek analizlerden önce, kolonun %0-5 MeOH içeren Su-MeOH hareketli faz sistemiyle etkileştirilmesinin, ayırma gücünün iyileştirilmesi bakımından faydalı olduğu görülmüştür.

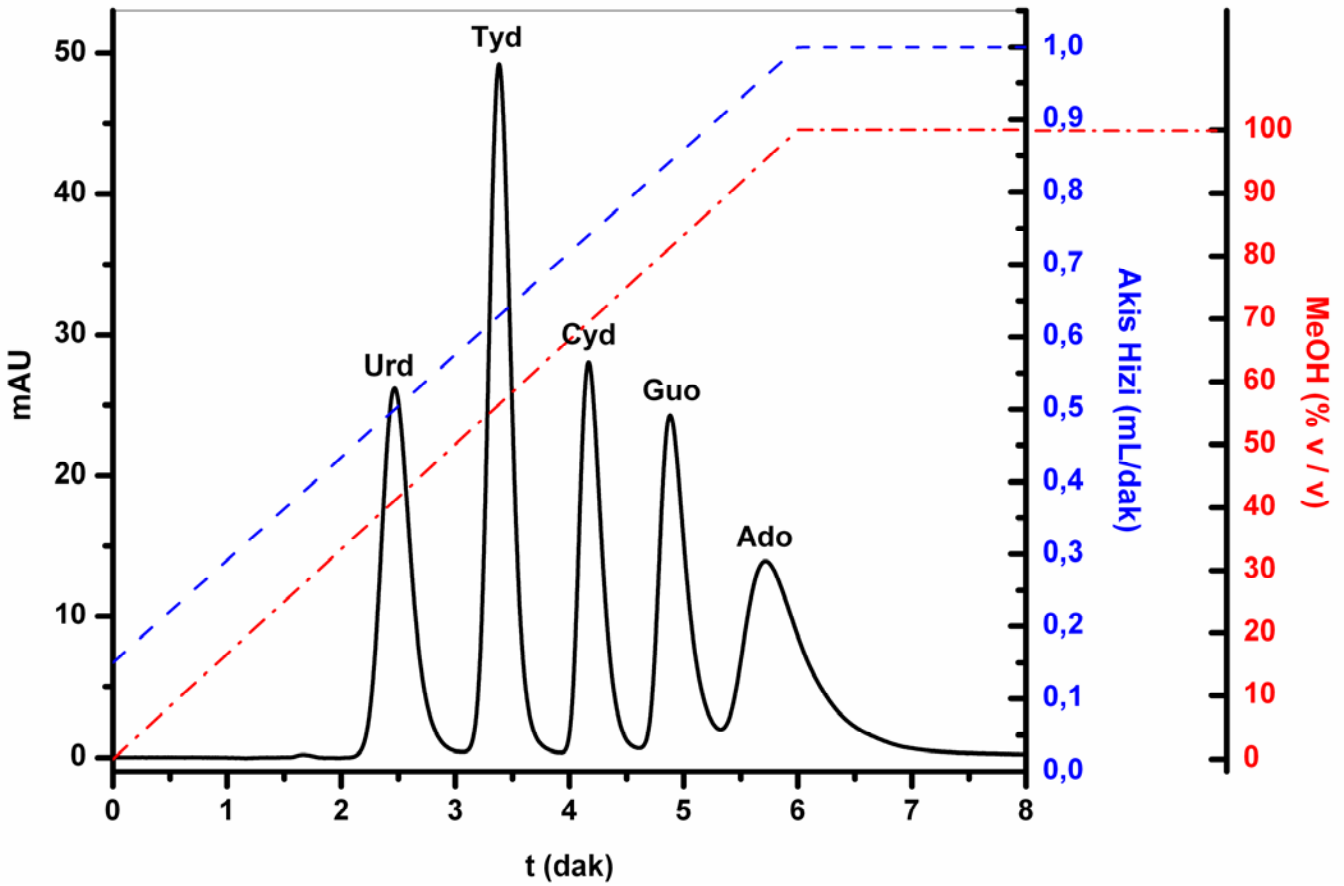


Şekil 4.47. Kolon ön-şartlandırma işleminin nükleobazların kromatografik ayrılmaları üzerine etkisinin grafiksel gösterimi

(Kolon ön-şartlandırmada kullanılan hareketli faz sistemi: Su-MeOH; Kromatografik analizlerde kullanılan hareketli faz: Su-MeOH (99:1; v/v); Akış hızı: 0,50 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Sıcaklık: 25 ^{o}C; Kolon: 4,6x100 EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi: 2 µL)

4.2.6. Kromatografik ayırmaların optimizasyonu

Nükleositlerin kromatografik ayırmaları, iki-seviyeli ve iki-değişkenli bir faktöriyel tasarım temelinde optimize edilmeye çalışılmıştır (Montgomery, 2005). Bu amaçla; deneysel parametre olarak *hareketli fazda uygulanan MeOH gradyentinin eğimi* ve *NH_3 çözeltisinin pH değerinin* seçildiği bu tasarımın ön-gördüğü deneylerden elde edilen sonuçlar; R_S değerlerinin 1,5 seviyesine çekilebilmesi için keskin bir MeOH gradyentinin uygulanması gerektiğini göstermiştir. Bu noktadan hareketle yürütülen denemelerden; çalışılan 5 nükleositin keskin bir MeOH gradyentiyle birbirinden başarılı bir şekilde ayrılabildiği görülmüştür (Şekil 4.48 ve Tablo 4.15). Kaydedilen kromatografik ayırma dikkatli bir şekilde incelendiğinde; uygulanan gradyent programıyla, aynı analiz süresince hareketli fazdaki organik çözücü oranının hem RPLC hem de HILIC şartlarına karşılık gelen düzeylerde değiştirildiği görülebilir. Bu durum; EC-HA-APS'nin RPLC ve HILIC karakteri sergileyen bir sabit faz olduğu ile ilgili yorumları destekler niteliktedir.



Şekil 4.48. Nükleositler için optimum şartlarda elde edilen kromatogram [a]

Hareketli faz: 0,1 F NH_3-MeOH; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Sıcaklık: 25 ^oC; Kolon: 4,6x100 EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi: 2 µL)

[a] Kolon, analizden önce sırasıyla Su-MeOH (1:1; v/v) ve ardından %100 Su hareketli fazlarıyla ön-şartlandırma işlemine tabi tutulmuştur. Analizler, %100 NH_3 çözeltisiyle başlatılmış ve analiz süresince MeOH oranı 0-6 dak aralığında gradyentle arttırılmıştır (%0 →%100; v/v). NH_3 çözeltisinin pH değeri 0,1 M HCl çözeltisi kullanılarak 5,0 seviyesine ayarlanmıştır.

Tablo 4.15. Optimizasyondan sonra nükleositlerin R_S değerlerinde gözlenen değişim

		Urd-Tyd	Tyd-Cyd	Cyd-Guo	Guo-Ado
R_S	*Optimizasyondan sonra* [a]	2,14	2,13	1,78	1,26
	Optimizasyondan önce [b]	1,73	1,38	4,95	0,81

[a] Şekil 4.48'de verilen kromatogramdan hesaplanmıştır

[b] Faktöriyel dizayn denemelerinde, parametrelerin orta seviyelerine karşılık gelen deneysel şartlarda kaydedilen bir kromatogramdan hesaplanmıştır

Belirlenen optimum şartlarda NH_3 çözeltisi yerine, pH=5,0 dolaylarında daha yüksek tampon kapasitesi sergileyebilen 0,1 F H_3PO_4 ve 0,1 F CH_3COOH çözeltileri kullanılarak bazı denemeler yürütülmüştür. Kullanılan çözeltilerin pH'ları, 0,1 M HCl çözeltisi ile 5,0 değerine ayarlanmıştır. Denemelerde; aşağıdaki hareketli faz sistemleri kullanılmış olup, her bir durumda kaydedilen kromatogramlar Şekil 4.49'da karşılaştırmalı olarak verilmiştir:

a) NH_3 (0,1 F; pH=5,0)-MeOH,

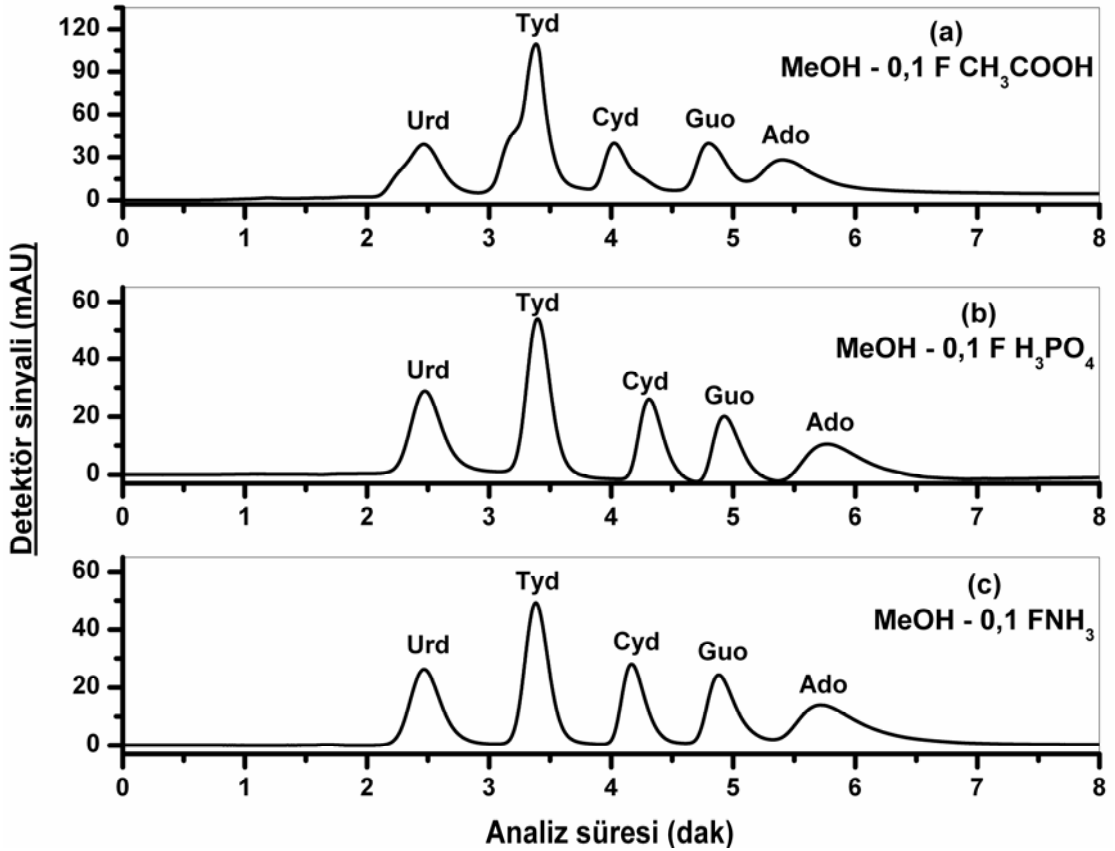
b) H_3PO_4 (0,1 F; pH=5,0)-MeOH

c) CH_3COOH (0,1 F; pH=5,0)-MeOH

Sonuçlar; türlerin elüsyon-sıralamasında, hareketli fazda kullanılan NH_3, CH_3COOH ve H_3PO_4 çözeltilerine bağlı olarak herhangi bir değişimin meydana gelmediğini göstermiştir. Ayrıca; NH_3–MeOH ve H_3PO_4–MeOH hareketli faz sistemleri kullanıldığında, sabit fazın türler için sergilediği ayırma gücünün de çok fazla değişmediği görülmüştür. Diğer taraftan; hareketli faz olarak CH_3COOH–MeOH kullanıldığında türlerin daha hızlı bir şekilde elue olduğu görülmüş olmakla beraber, kromatografik ayırmaların çalışılan diğer hareketli faz sistemlerindeki kadar başarılı olmadığı tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlar; kromatografik ayırmaların iyileştirilmesinde pH'nın yanı sıra, tamponlayıcı madde türünün de bir miktar etkiye sahip olduğunu göstermiştir. Ayrıca; nükleositlerin kromatografik ayırmalarında NH_3 çözeltisinin, HPLC analizlerinde yaygın olarak kullanılan H_3PO_4 ve CH_3COOH çözeltilerinden daha iyi sonuçlar verdiği de görülmüştür.

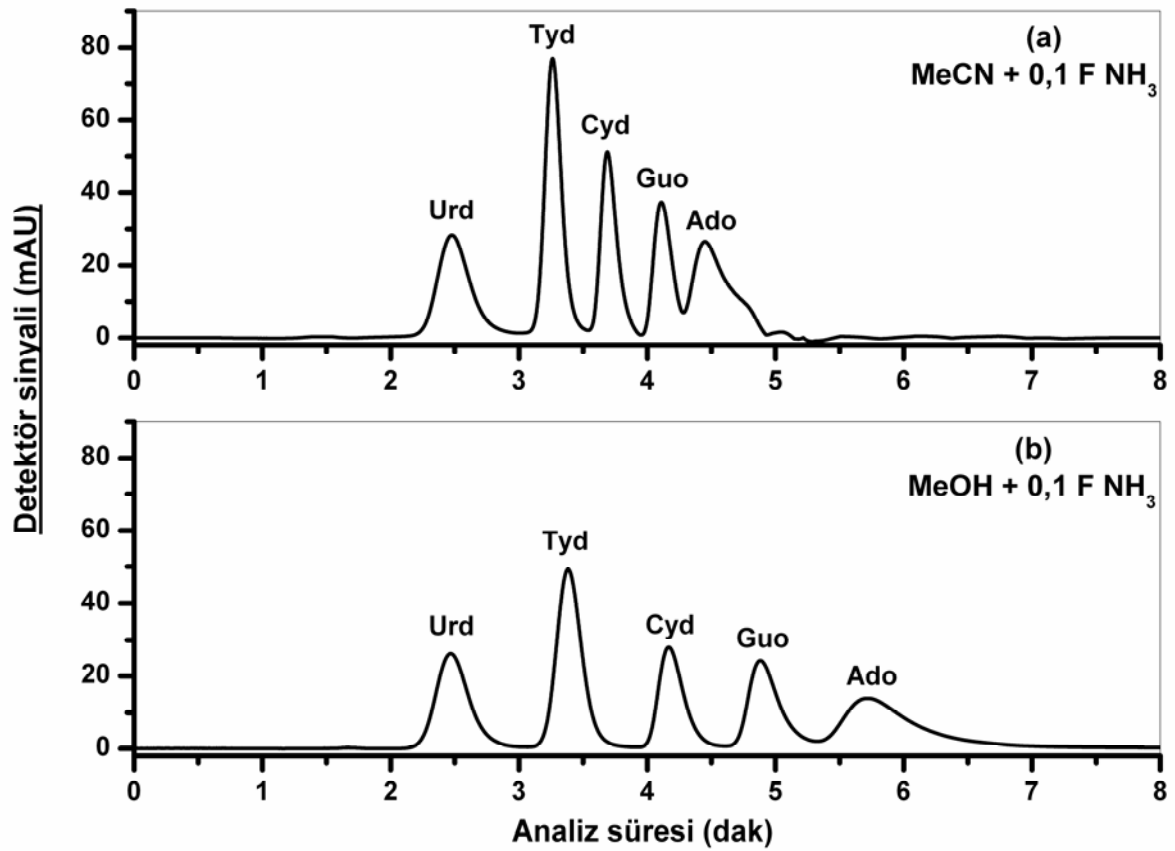
Hareketli fazda kullanılan organik çözücü türünün etkisini incelemek amacıyla belirlenen optimum şartlarda, NH_3 (0,1 F; pH=5,0)-MeOH ve NH_3 (0,1 F; pH=5,0)-MeCN hareketli faz sistemleri kullanılarak bazı deneyler yürütülmüş ve bu deneylerden elde edilen kromatogramlar Şekil 4.50'de verilmiştir. Sonuçlar; çalışılan hareketli faz sistemlerinden NH_3–MeCN ile türlerin daha hızlı bir şekilde elue olduğunu göstermiştir. Ayrıca; hareketli fazda kullanılan organik çözücü türüne bağlı olarak nükleositlerin elüsyon-sıralamasında herhangi bir değişiklik gözlenmemiştir. Sonuç olarak; hareketli fazda kullanılan organik çözücü türü değiştirilerek türlerin EC-HA-APS üzerindeki kromatografik ayırmalarının daha da iyileştirilebileceği ve kromatografik ayırmaların daha kısa bir süre zarfında gerçekleştirilebileceği görülmüştür.

Nükleositlere benzer davranışlar sergilemeleri nedeniyle, nükleobazların kromatografik ayırmalarının optimizasyonu üzerinde çok fazla durulmamıştır. Hareketli faz bileşimi, pH, sıcaklık ve akış hızı gibi deneysel parametrelerden faydalanarak kromatografik ayırmanın kolayca optimize edilebileceği düşünülmektedir. Örneğin; Ura, Thy ve Cyt türleri için kromatografik ayırmalar, sadece akış hızında ve numune konsantrasyonunda yapılan uygun ayarlamalar ile iyileştirilebilmiştir (Şekil 4.51). Optimizasyondan sonra R_S değerlerinde gözlenen değişimler Tablo 4.16'da karşılaştırmalı olarak verilmiştir.



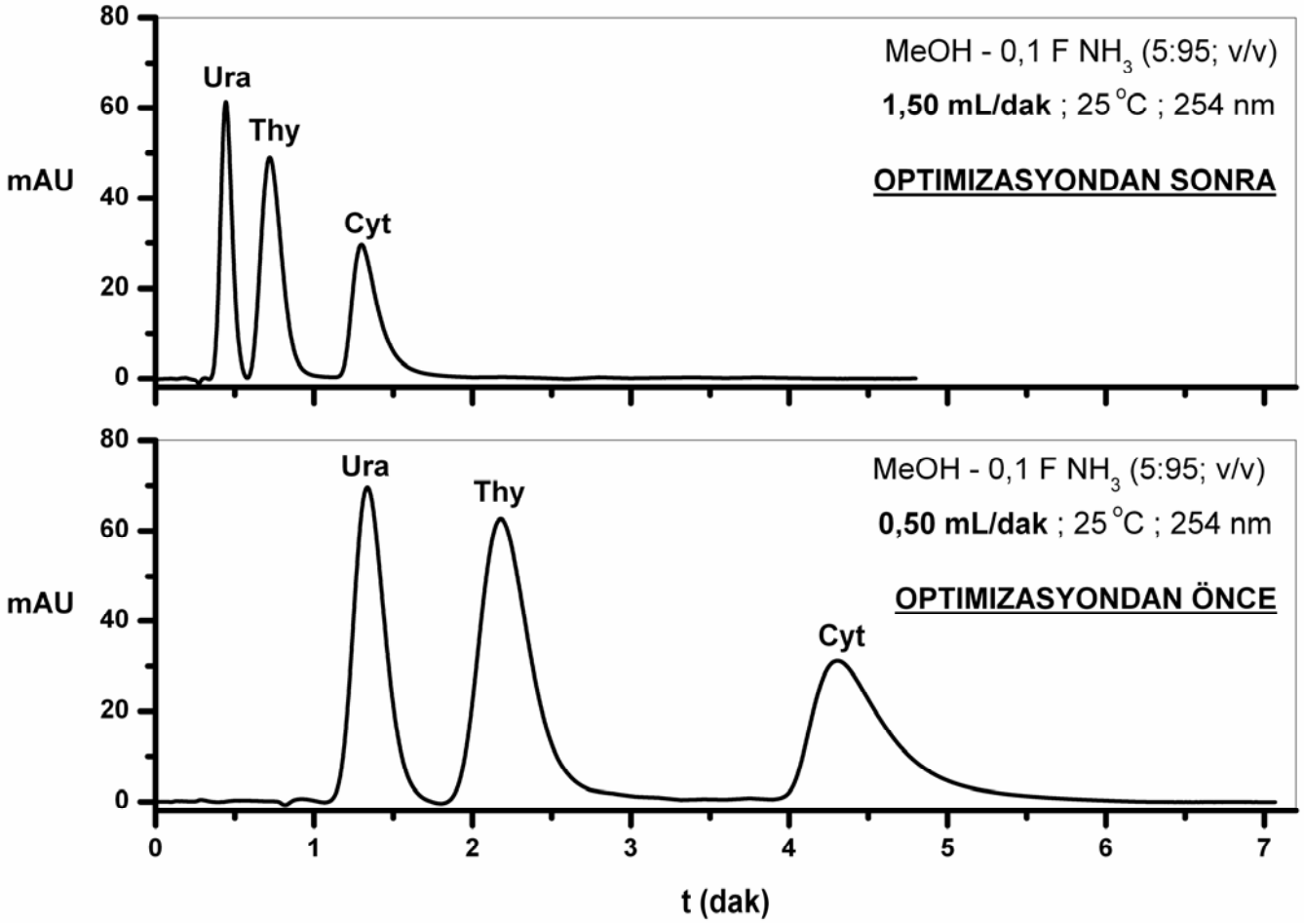
Şekil 4.49. Nükleositler için belirlenen optimum şartlarda, hareketli fazda farklı çözeltiler kullanılarak elde edilen kromatogramlar [a]

Hareketli faz: 0,1 F Çözelti-MeOH; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Sıcaklık: 25 ^{o}C; Kolon: 4,6x100 EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi 2 µL); Analizlerde kullanılan çözeltiler şekiller üzerinde belirtilmiştir; ([a] Kolon, analizlerden önce sırasıyla Su-MeOH (1:1; v/v) ve ardından %100 Su hareketli fazlarıyla ön-şartlandırma işlemine tabi tutulmuştur. Analizler, %100 NH_3, (veya CH_3COOH; H_3PO_4 çözeltileri) ile başlatılmış ve analiz süresince MeOH oranı 0-6 dak aralığında gradyentle arttırılmıştır (%0 →%100; v/v). Çözeltilerin pH değeri 0,1 M HCl ve 0,1 M NaOH çözeltileri kullanılarak 5,0 seviyesine ayarlanmıştır)



Şekil 4.50. Nükleositler için belirlenen optimum şartlarda, hareketli fazda farklı organik çözücüler kullanılarak elde edilen kromatogramlar [a]

Hareketli faz: 0,1 F NH_3-MeOH ve 0,1 F NH_3-MeCN; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Sıcaklık: 25 ^oC; Kolon: 4,6x100 EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi 2 µL); Analizlerde kullanılan organik çözücü şekiller üzerinde belirtilmiştir; ([a] Kolon, her analizden önce sırasıyla Su-MeOH (1:1; v/v) ve ardından %100 Su hareketli fazlarıyla ön-şartlandırma işlemine tabi tutulmuştur. Analizler, %100 NH_3 çözeltisiyle başlatılmış ve analiz süresince MeOH (veya MeCN) oranı 0-6 dak aralığında gradyentle arttırılmıştır (%0 →%100; v/v). NH_3 çözeltisinin pH değeri 0,1 M HCl çözeltisi kullanılarak 5,0 seviyesine ayarlanmıştır)



Şekil 4.51. Bazı nükleobazlar için kromatografik ayırmanın akış hızı temelinde optimizasyonu

Kolon, her analizden önce sırasıyla Su-MeOH (1:1; v/v) ve ardından %100 Su hareketli fazlarıyla ön-şartlandırma işlemine tabi tutulmuştur. Deteksiyon: 254 nm; Enjeksiyon hacmi: 2 µL; Diğer deneysel şartlar şekil üzerinde belirtilmiştir. NH_3 çözeltisinin pH değeri 0,1 M HCl çözeltisi kullanılarak 7,0 seviyesine ayarlanmıştır.

Tablo 4.16. Bazı nükleobazlar için kromatografik ayırmanın optimizasyonuyla ayırma gücünde gözlenen değişimler

		Ura-Thy	Thy-Cyt
R_S	*Optimizasyondan sonra* [a]	1,35	1,96
	Optimizasyondan önce [b]	1,74	2,99

4.2.7. EC-HA-APS kolonu için performans parametreleri

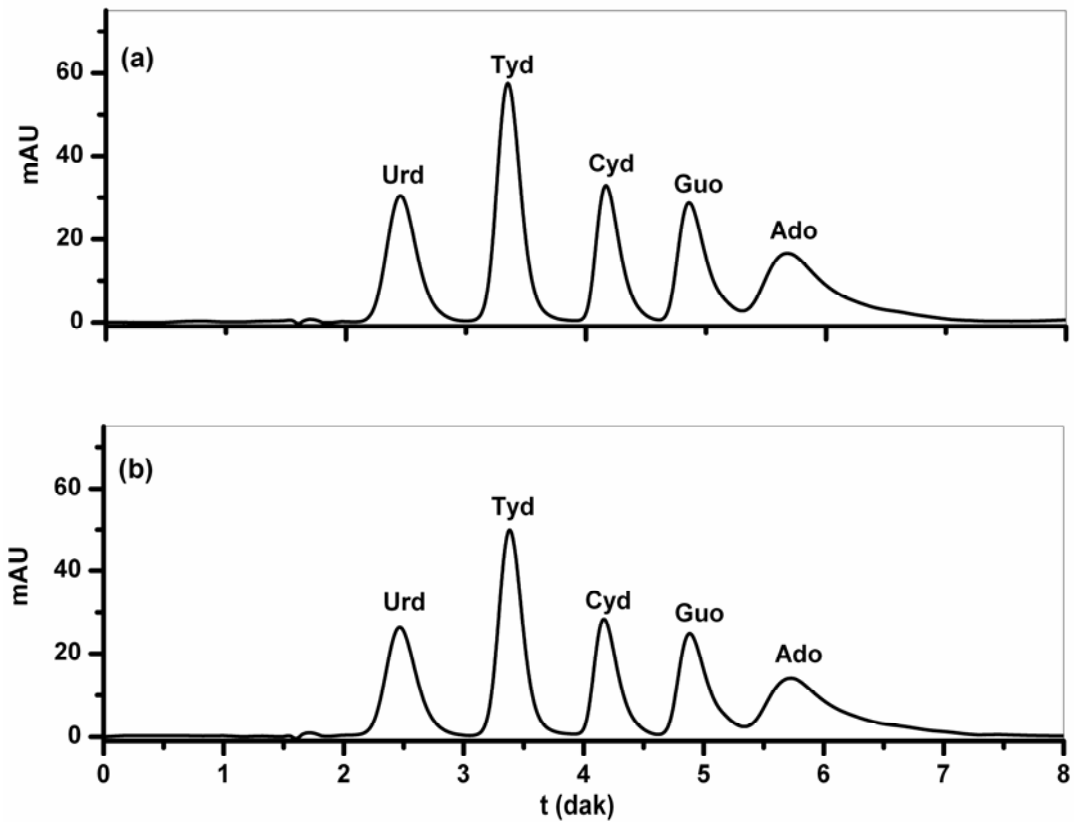
EC-HA-APS sabit fazı ile doldurulmuş 4,6x100 ebadındaki kolon ile elde edilen kromatografik analizlerden kolonun performansı *ortalama teorik tabaka sayısı* ve *tekrarlanabilirlik* bakımından değerlendirilmiş ve immobilizasyon işleminin etkisiyle kromatografik ayrılmalarda gözlenen değişimler irdelenmiştir.

EC-HA-APS kolonu ile RPLC ve HILIC şartlarında izokratik elüsyonla elde edilen ayrımalardan her bir tür için teorik tabaka sayısı (N); pik yarı yüksekliğindeki taban genişliği ($w_{0.5}$) ve alıkonma süresi (t_R) temelinde aşağıdaki eşitlikle hesaplanmış ve hesaplanan N değerlerinin ortalaması ortalama teorik tabaka sayısı (N_{ort}) olarak verilmiştir:

$$N = 5{,}54 \times \left(\frac{t_R}{w_{0.5}} \right)^2$$

RPLC ve HILIC şartlarında nükleositler için ortalama teorik tabaka sayısı metre başına sırasıyla 2605 ve 2991 olarak hesaplanmıştır.

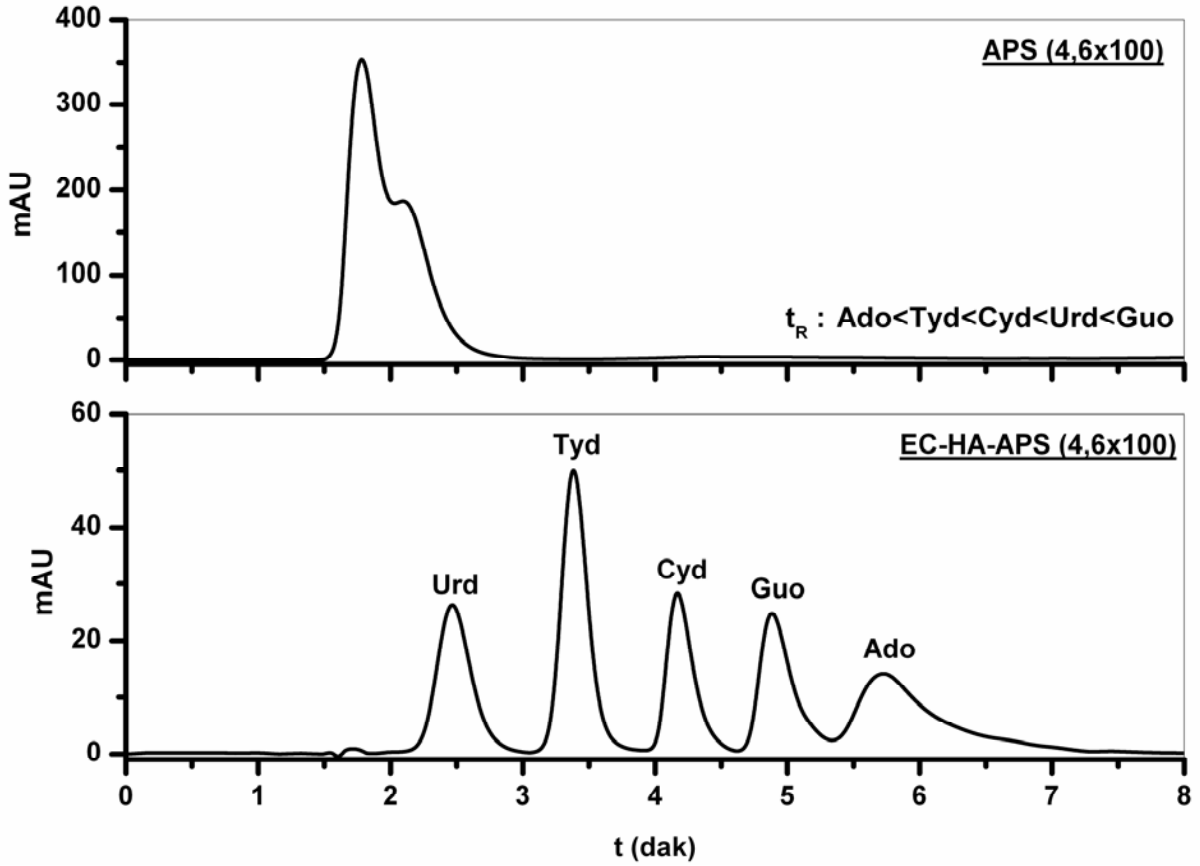
EC-HA-APS ile doldurulmuş 4,6x100 mm ölçülerinde bir kolon ile 12 ay süreyle yaklaşık 900 analiz yürütülmüş ve kolonun performansında herhangi bir düşüş gözlenmemiştir. Türlerin *k'* değerlerindeki gün-içi ve günler-arası standart sapma düzeyinin $\leq$0,03 olduğu görülmüş olup; gün-içi aynı şartlarda kaydedilen kromatogramlardan, ayırma gücü ve pik simetrisindeki tekrarlanabilirliğin de yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.52). Sonuçlar; sabit fazın kararlı bir yapı sergilediğini ve tekrarlanabilir sonuçlar verdiğini göstermiştir.



Şekil 4.52. Nükleositler için EC-HA-APS sabit fazı üzerinde gün-içi tekrar analizlerinden kaydedilen kromatogramlar

Hareketli faz: 0,1 F NH_3-MeOH; Akış hızı: 0,15-1,00 mL/dak (0-6 dak); Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Kolon fırını sıcaklığı: 25 ^{o}C; Kolon: 4,6x100 EC-HA-APS; Enjeksiyon hacmi 2 µL; Kolon, analizden önce sırasıyla Su-MeOH (1:1; v/v) ve ardından %100 su hareketli fazlarıyla ön-şartlandırma işlemine tabi tutulmuştur. Analizler, %100 NH_3 çözeltisiyle başlatılmış ve analiz süresince MeOH oranı 0-6 dak aralığında gradyentle arttırılmıştır. NH_3 çözeltisinin pH değeri 0,1 M HCl çözeltisi kullanılarak 5,0 seviyesine ayarlanmıştır.

İmmobilizasyon işleminin etkisini değerlendirebilmek amacıyla, nükleositlerin çok bileşenli numuneleriyle, EC-HA-APS ve APS ile doldurulmuş 4,6x100 mm ölçülerinde kolonlar kullanılarak aynı şartlarda bazı analizler yürütülmüş ve kaydedilen kromatogramlar karşılaştırmalı olarak Şekil 4.53'te verilmiştir. Şekilden; immobilizasyon işleminin etkisiyle APS'nin türlere karşı sergilediği kapasite ve seçiciliğindeki artış belirgin bir şekilde görülebilmektedir. Buna ilaveten; belirtilen şartlarda, türlerin EC-HA-APS ve APS sabit fazları üzerindeki elüsyon-sıralamalarında da farklılaşmaların olduğu görülmüştür. Nitekim; türlerin APS üzerindeki alıkonma süreleri Ado<Tyd<Cyd<Urd<Guo sırasında artarken, EC-HA-APS üzerindeki alıkonma süreleri Urd<Tyd<Cyd<Guo<Ado sırasında artmaktadır. Bu durum; APS yüzeyine HA'nın immobilize edilmesiyle sadece kapasite ve seçicilikte değil; aynı zamanda, kromatografik ayırmalarda rol alan mekanizmalarda da önemli farklılaşmaların meydana geldiğini göstermektedir.



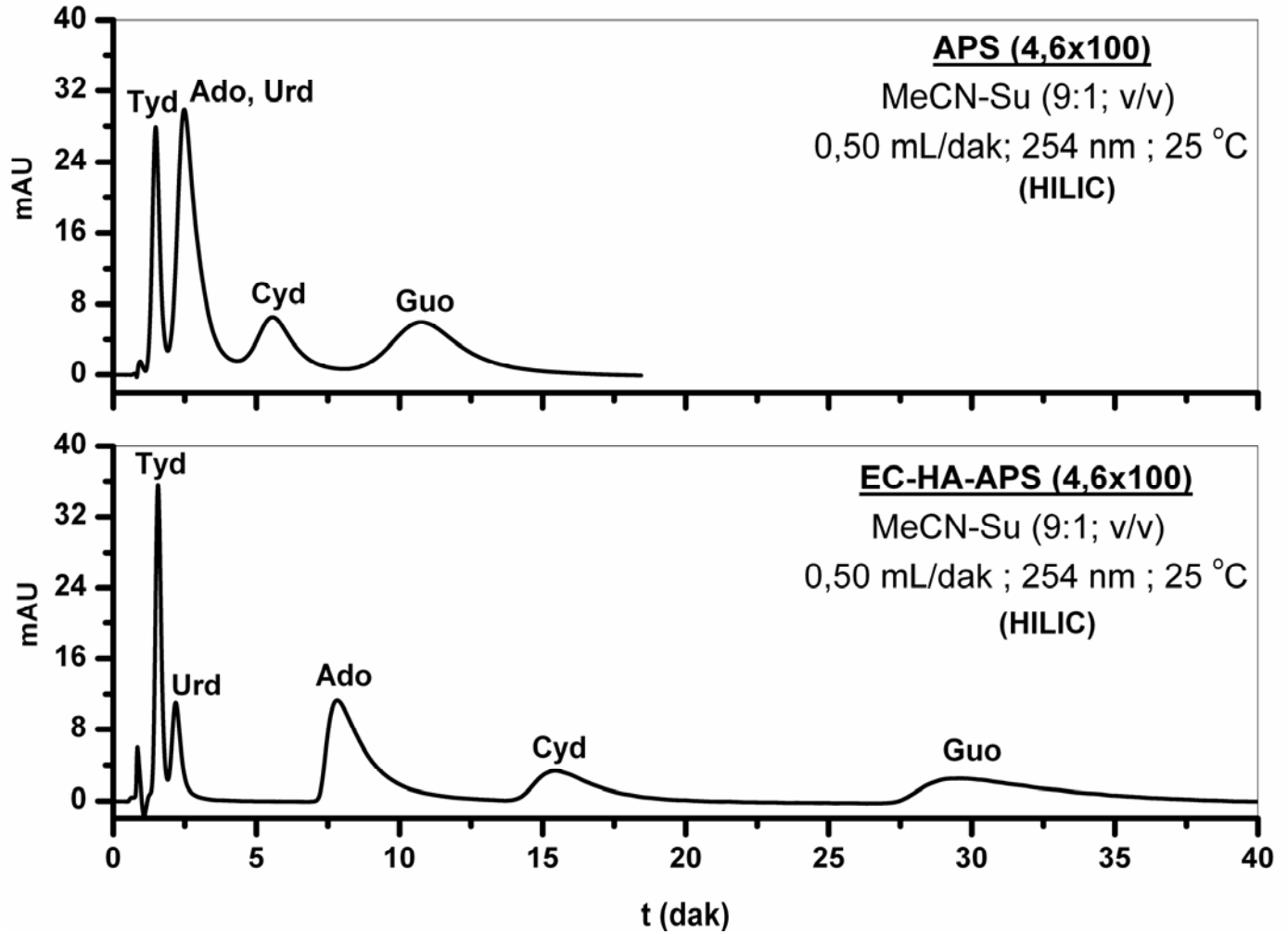
Şekil 4.53. Nükleositler için APS ve EC-HA-APS kolonlar ile gradyent şartlarda elde edilen kromatogamların karşılaştırmalı olarak gösterimi

Hareketli faz: 0,1 F NH_3-MeOH; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Kolon fırını sıcaklığı: 25 ^oC; Enjeksiyon hacmi 2 µL

[a] Kolonlar, analizlerden önce sırasıyla Su-MeOH (1:1; v/v) ve ardından %100 su hareketli fazlarıyla ön-şartlandırma işlemine tabi tutulmuştur. Analizler, %100 NH_3 çözeltisiyle başlatılmış ve analiz süresince MeOH oranı 0-6 dak aralığında gradyentle arttırılmıştır. NH_3 çözeltisinin pH değeri 0,1 M HCl çözeltisi kullanılarak 5,0 seviyesine ayarlanmıştır.

HILIC şartlarında, APS ve EC-HA-APS üzerinde kaydedilen kromatogramlar Şekil 4.54'te verilmiş olup, türlerin her iki sabit faz üzerindeki elüsyon-sıralamalarının birbirine büyük oranda benzediği görülmüştür. Bu durum; her iki sabit faz üzerinde kromatografik ayrılmalarda etkili olan mekanizmanın aynı olmasıyla ilişkilendirilmiştir. Nitekim; HILIC şartlarında ayırmada etkili olan temel mekanizma, analitlerin sabit faza adsorbe olmuş su moleküllerinin oluşturduğu ara yüzeyle hareketli faz arasında dağılmalarına dayanmaktadır (Alpert, 1990). EC-HA-APS üzerinde analitlerin daha yüksek *k'* değerleri sergilemelerinin, EC-HA-APS'nin söz konusu ara yüzeyinde daha yüksek derecede su molekülünün bulunması ve bu nedenle analitlerin dağılmalarına ilişkin dengenin düzeyinde farklılaşmaların meydana gelmesinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Buna ilaveten; immobilize olmuş HA makromoleküllerinin diğer bazı yapısal özelliklerinin de kapasite ve seçicilikte rol alabileceği unutulmamalıdır.

EC-HA-APS ile tekrarlanabilir sonuçlar almak için kolonun kullanılmadığı zamanlarda, Su-MeOH hareketli faz sisteminde dengeye getirilip saklanmasının uygun olduğu görülmüştür. Kullanılmadığı zamanlarda, EC-HA-APS'nin tampon ve tuz çözeltilerinden iyice arındırılması gerektiğini de belirtmek gerekir. Ayrıca; sulu ortamda yüksek stabilite sergilemesine rağmen, EC-HA-APS'nin pH=7,5'in üzerindeki hareketli fazlarla etkileştirilmesinin uygun olmayacağı ve özellikle bu pH değerlerine sahip asetat, amonyak ve EDTA çözeltilerinin yüzeyden bir miktar HA makromoleküllerinin ayrılmasına yol açabileceği hususu dikkate alınmalıdır.



Şekil 4.54. Nükleositler için APS ve EC-HA-APS kolonlar ile HILIC şartlarında elde edilen kromatogramların karşılaştırmalı olarak gösterimi

Deneysel şartlar şekil üzerinde belirtilmiştir.

4.3. Ligand-değiştirme Kromatografisi Şartlarında Yürütülen İşlemler

EC-HA-APS ile RPLC ve HILIC şartlarında yürütülen analizler, sabit fazın her iki kromatografi modunda kullanılabilirliği ile ilgili önemli bilgiler sunmuştur. Hümik asidin ağır metal iyonlarıyla kuvvetli bir şekilde etkileşebilme özelliği, Cu(II) ve Co(II) yüklenmiş EC-HA-APS'nin ligand değiştirici sabit faz olarak kullanılabileceğini düşündürmüştür. Bu amaçla; çalışmaların son bölümünde, EC-HA-APS'nin LEC şartlarında kullanılabilirliği üzerinde durulmuştur. Yürütülen çalışmalarda; EC-HA-APS iki farklı ligand değiştirici şekle dönüştürülmüş ve çalışılan türlerin kromatografik davranışları sabit fazın her iki ligand değiştirici şekli üzerinde incelenmiştir:

a) Cu(II) yüklenmiş EC-HA-APS; *Cu*-EC-HA-APS
b) Co(II) yüklenmiş EC-HA-APS; *Co*-EC-HA-APS

EC-HA-APS'nin ligand değiştirici bu iki şekli kullanılarak, çeşitli deneysel parametrelerin nükleosit ve nükleobazların kromatografik davranışları üzerine etkisi incelenmiştir. Hareketli fazdaki yarışmalı türler, hareketli fazdaki organik çözücü yüzdesi ve sıcaklık, bu kapsamda yürütülen çalışmalarda etkisi incelenen deneysel parametrelerdir. Ayrıca; HPLC ayırmalarında çok fazla uygulama alanı bulmamış bir deneysel parametre olan "sıcaklık gradyenti"nin kromatografik ayırmalar üzerindeki etkisi de değerlendirilmiştir.

4.3.1. *Cu*-EC-HA-APS üzerinde yürütülen kromatografik işlemler

4.3.1.1. Hareketli faz bileşiminin etkisi

4,6x150 mm ölçülerinde EC-HA-APS kolonuna basamaklı bir şekilde Cu(II) çözeltisi yüklenerek elde edilen ligand değiştirici sabit faz üzerinde nükleosit ve nükleobazlar için bazı analizler yürütülmüştür. Bu analizlerde; öncelikle nükleositlerin kromatografik davranışları üzerinde durulmuş olup; *Cu*-EC-HA-APS sabit fazı üzerinde aşağıda belirtilen hareketli faz sistemleri kullanılarak bazı analizler yürütülmüştür. Analizlerde kullanılan sulu çözeltilerin pH'ları 0,1 M HCl çözeltisi ile istenen düzeye ayarlanmıştır.

a) Su–MeOH (3:1; v/v)

b) NH_3 (0,1 F; pH=6,0)–MeOH (3:1; v/v)

c) NH_3 (0,1 F; pH=7,0)–MeOH (3:1; v/v)

d) $NaCH_3COO$ (0,1 F; pH=7,0)–MeOH (3:1; v/v)

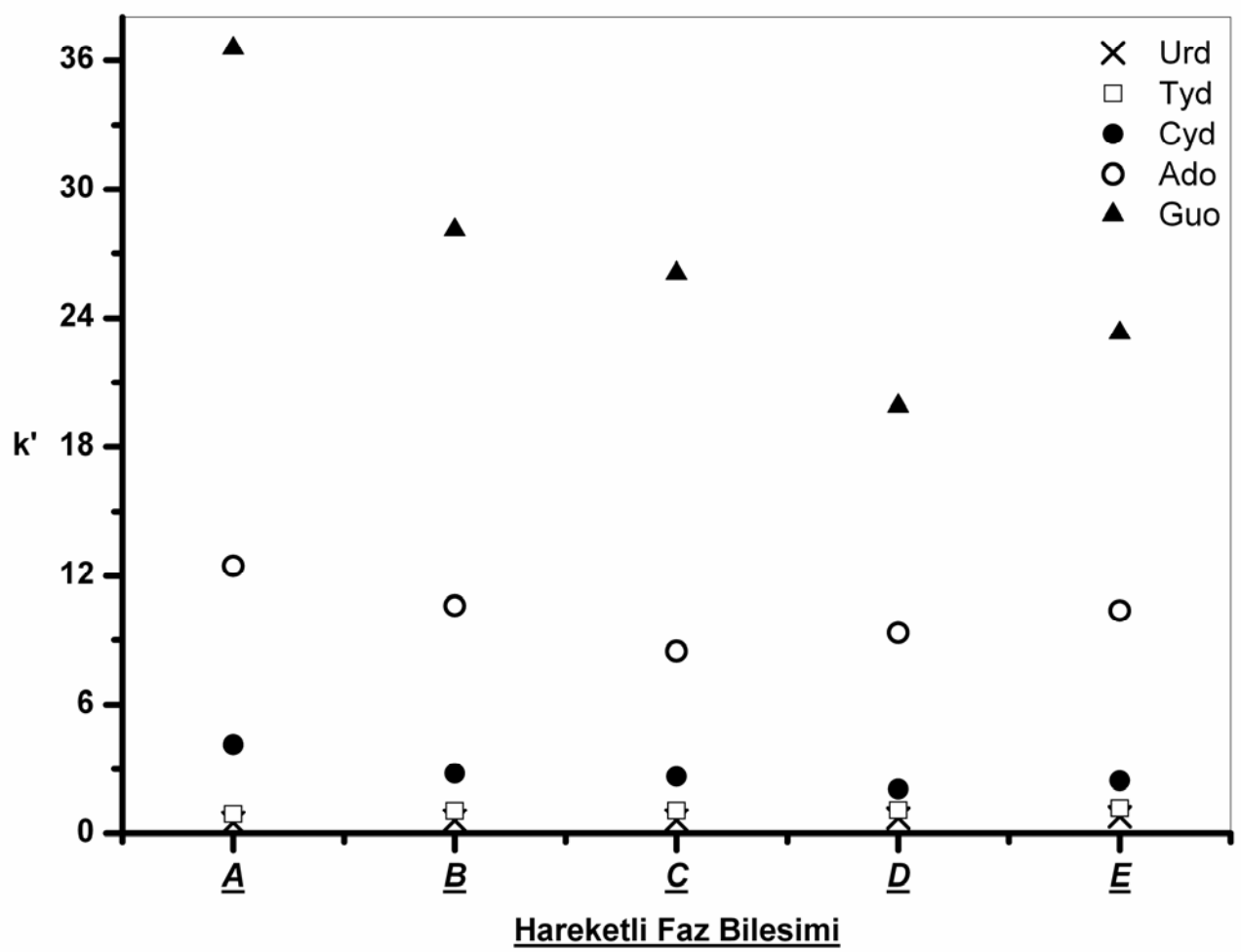
e) NaCl (0,05 M; pH=7,0)–MeOH (3:1; v/v)

Belirtilen hareketli faz sistemleri kullanılarak türler için elde edilen *k'* değerleri Şekil 4.55'te verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi çalışılan hareketli faz sistemlerinin tamamında en yüksek *k'* değerleri Guo için elde edilmiştir. RPLC şartlarında daha önce yürütülen analizlerden elde edilen sonuçlara benzer şekilde, Urd ve Tyd görece düşük *k'* değerleri sergilemiştir. Yapısında $-NH_2$ grubu bulunan Cyd, Ado ve Guo'nun MeOH yüzdesi yüksek hareketli fazlarda bile yüksek *k'* değerleri sergilemeleri, bu türlerin sabit faza yüklenmiş metal iyonuyla ligand-değiştirme mekanizmasına dayalı bir etkileşmeye girmiş olabileceğini düşündürmüştür. Metal iyonu yüklendikten sonra türlerin *k'* değerlerindeki değişimleri daha iyi anlamak amacıyla, aynı kolon üzerinde (aynı şartlarda) LEC ve RPLC şartlarında türler için elde edilen *k'* değerleri Şekil 4.56'da karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi; LEC şartlarında Cyd, Ado ve Guo için elde edilen *k'* değerlerinde en az iki katlık bir artış söz konusudur. Diğer taraftan; Urd ve Tyd için elde edilen *k'* değerlerindeki artışın daha az olduğu görülmüş olup; bu durumun, söz konusu iki türün sabit faza yüklenmiş metal iyonuyla görece düşük düzeyde etkileşmeye girmiş olmalarından kaynaklandığı düşünülmüştür..

Çalışılan türlerin elüsyon-sırasına bakıldığında, yapısında elektron-donör özelliği yüksek $-NH_2$ grubu içeren nükleositlerin (Cyd, Ado ve Guo) bu grubu içermeyenlerden (Urd ve Tyd) daha yüksek *k'* değerleri sergiledikleri görülebilir. $-NH_2$ grubu içeren türlerin (Cyd, Ado ve Guo) kendi aralarındaki elüsyon sıralamalarının, yapılarındaki $-NH_2$ grubunun protonlanma derecesiyle ilişkili olduğu düşünülmektedir. Nitekim; Cyd, Ado ve Guo için $-NH_2$ grubunun protonlanmasına ilişkin pK_a değerleri sırasıyla; 4,15, 3,50 ve 1,50 (Bkz. Şekil 4.42) olduğundan, çalışılan deneysel şartlarda (pH=6-7) türlerin protonlanmış şekillerine dönüşme eğilimleri Cyd>Ado>Guo sırasında azalacaktır. $-NH_2$ grubunun protonlanması, türlerin ligand karakterinin azalması ve dolayısıyla sabit faza immobilize edilmiş Cu(II) ile düşük düzeyde etkileşmesine yol açacaktır. Ado ve Guo'nun daha geç elue olmasında, bu türlerin Cu(II) ile daha kararlı

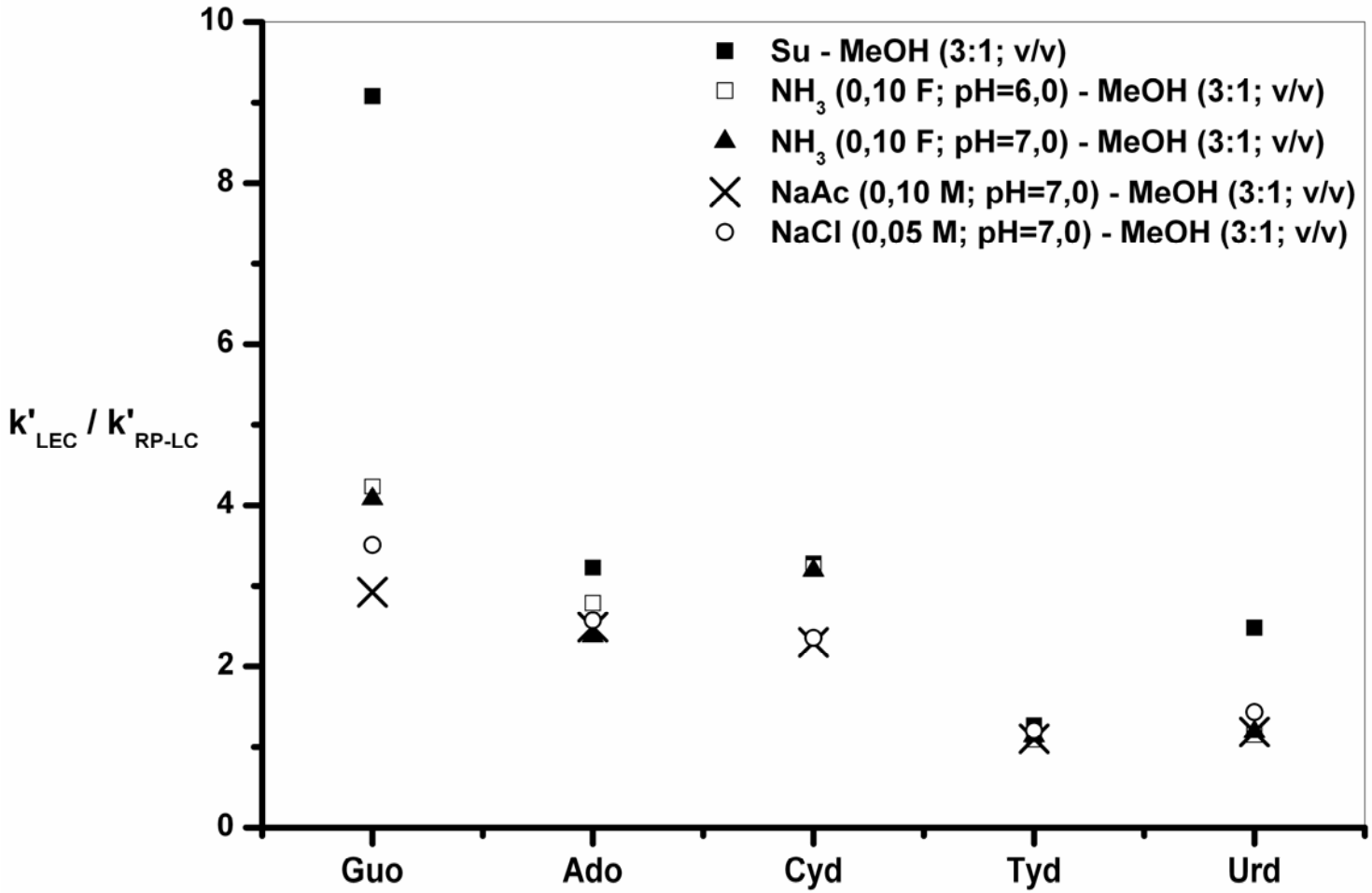
kompleks (ör. şelat) oluşturabilecek moleküler yapılara sahip olmalarının da etkili olmuş olabileceği düşünülmektedir. Farklı hareketli fazlar kullanılarak yürütülen denemeler, hareketli fazda kullanılan çözeltilerle türlerin daha kolay bir şekilde elue edilebildiklerini göstermiştir. Nitekim; Su-MeOH sistemi kullanılarak elde edilen *k'* değerlerinin diğer hareketli faz sistemleriyle (NH_3-MeOH, $NaCH_3COO$-MeOH ve NaCl-MeOH) elde edilenlerden daha yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 4.55). Çalışılan hareketli faz sistemlerinden $NaCH_3COO$-MeOH kullanıldığında, Guo en düşük *k'* değerini sergilemiştir. EC-HA-APS ile yürütülen denemelerle kıyaslandığında; türlerin *k'* değerlerindeki farklılaşmanın *Cu*-EC-HA-APS üzerinde daha yüksek olduğunu söylemek mümkündür. Elde edilen sonuçlar; *Cu*-EC-HA-APS'nin türlere karşı ligand değiştirici sabit faz özelliği sergilediğini ve türlerin *Cu*-EC-HA-APS üzerinde sergiledikleri *k'* değerlerinin EC-HA-APS üzerinde sergilediklerinden daha yüksek olduğunu göstermiştir (Şekil 4.56).

Cu-EC-HA-APS sabit fazı üzerinde nükleositler için elde edilen *k'* değerlerine bakıldığında; Ado ve Guo'nun %25 MeOH içeren hareketli fazda bile yüksek *k'* değerleri sergiledikleri görülmektedir. Bu durum; her iki türün *Cu*-EC-HA-APS sabit fazı üzerinde elüsyonunu zorlaştırmış ve elde edilen piklerin kromatografik amaçlarla kullanılamayacak kadar yayvanlaştırmıştır. Yüksek pH değerlerine sahip NH_3 çözeltilerinin hareketli faza ilavesiyle bu iki türün elüsyonunu hızlandırmak mümkün gözükse de, bu şartlarda sabit fazdan önemli oranda hümik asidin ayrılması beklenir. Bu nedenle; *Cu*-EC-HA-APS sabit fazı üzerinde Ado ve Guo'nun kromatografik davranışları üzerinde çok fazla durulmamıştır.



Şekil 4.55. Nükleositler için *Cu*-EC-HA-APS sabit fazı üzerinde farklı hareketli faz bileşimlerinde elde edilen kapasite faktörlerinin grafiksel gösterimi

Hareketli faz: [(A) MeOH-Su (1:3; v/v); (B) MeOH-0,1 F (pH=6) NH_3 (1:3; v/v); (C) MeOH-0,1 F (pH=7) NH_3 (1:3; v/v); (D) MeOH-0,1 F (pH=7) $NaCH_3COO$ (1:3; v/v); (E) MeOH-0,05 M (pH=7) NaCl (1:3; v/v)]; Akış hızı: 1,00 mL/dak; Sıcaklık: 25 ^oC; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Enjeksiyon hacmi: 2 µL



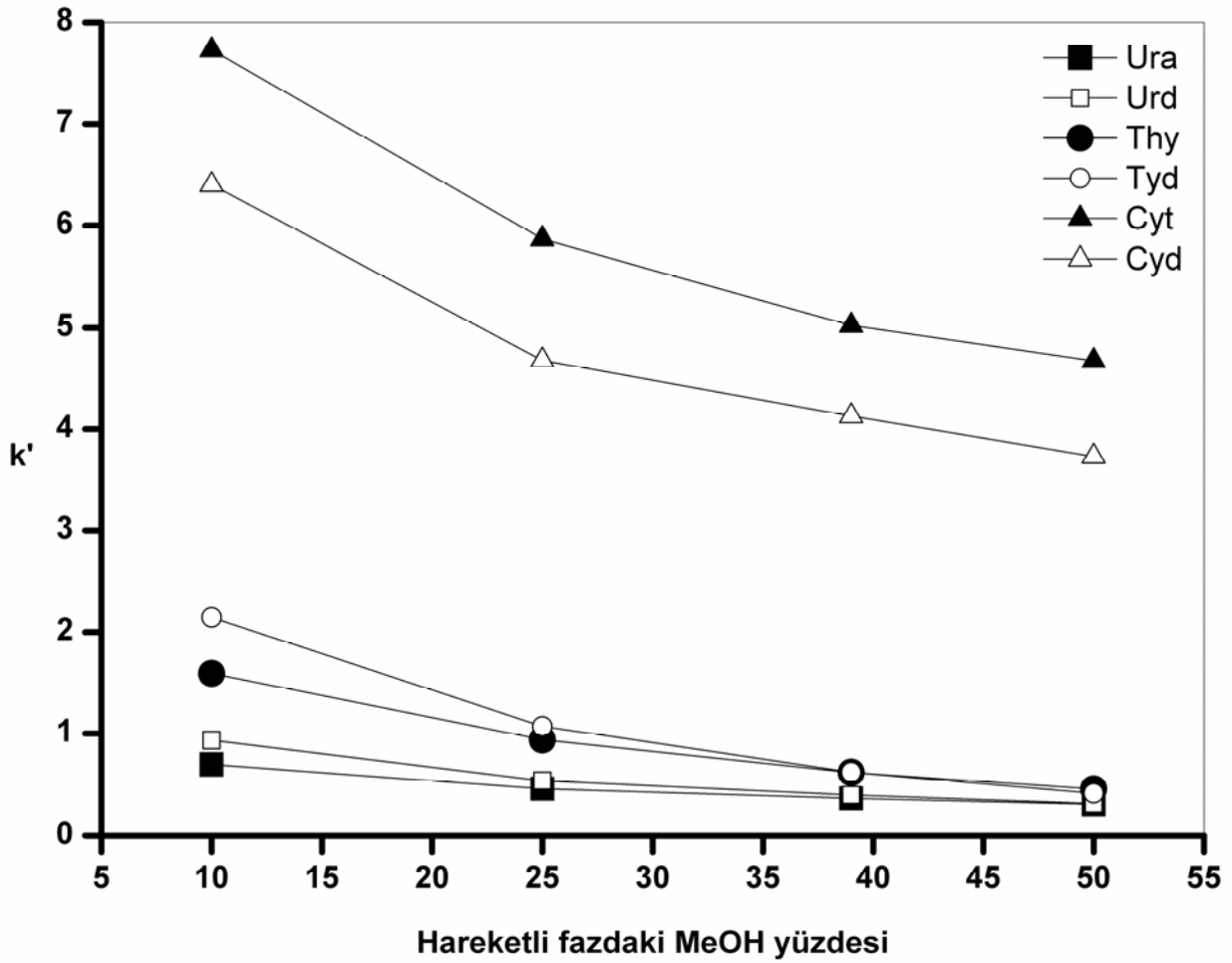
Şekil 4.56. Nükleositler için EC-HA-APS ve *Cu*-EC-HA-APS sabit fazları üzerinde farklı hareketli faz bileşimlerinde elde edilen kapasite faktörlerinin karşılaştırmalı olarak gösterimi

Deneysel şartlar Şekil 4.55'te belirtilmiştir

4.3.1.2. Hareketli fazdaki organik çözücü yüzdesinin etkisi

Çalışılan türlerin *Cu*-EC-HA-APS üzerindeki kromatografik davranışlarında hem sabit faza yüklenmiş metal iyonu, hem de immobilize olmuş HA'daki yapılar rol alabilir. Dolayısıyla; türlerin sabit fazla ligand-değiştirme mekanizmasının yanı sıra, daha zayıf etkileşmeler üzerinden de etkileşebileceği düşünülmüştür. Yani; hareketli fazdaki organik çözücü oranına bağlı olarak, türlerin EC-HA-APS'ye immobilize edilmiş Cu(II) ile oluşturacakları komplekslerin kararlılıkları değişebileceği gibi, türlerin immobilize HA ile etkileşme düzeyinde de bazı farklılaşmaların meydana gelmesi beklenmektedir. Türlerin *Cu*-EC-HA-APS ile etkileşme düzeylerinin, hareketli fazdaki organik çözücü oranında yapılacak uygun değişiklikler ile ayarlanabileceği düşüncesinden hareketle bazı analizler yürütülmüştür. Analizlerde; Su-MeOH hareketli faz sistemi kullanılmış olup, hareketli fazdaki MeOH oranı %10-50 (v/v) aralığında değiştirilerek bazı nükleosit ve nükleobazların *k'* değerlerindeki değişimler incelenmiştir.

Hareketli fazdaki MeOH oranı değiştirilerek yapılan deneyler; MeOH oranı arttırıldıkça incelenen tüm türlerin *Cu*-EC-HA-APS üzerinde daha kolay elue olduğunu göstermiştir (Şekil 4.57 ve Tablo 4.17). Yapısında $-NH_2$ grubu içermeyen türlerin *k'* değerlerinin hareketli fazdaki MeOH oranı arttırıldıkça (kromatografik ayrılmalarını mümkün kılmayacak kadar) birbirine yaklaştığı tespit edilmiştir. Diğer taraftan; hareketli fazdaki MeOH oranı arttırıldıkça, yapısında $-NH_2$ grubu bulunan Cyt ve Cyd'nin *k'* değerlerinin azaldığı, fakat bu iki türün *k'* değerlerindeki farkın çok fazla değişmediği görülmüştür. Hareketli fazda %50 (v/v) MeOH bulunduğu durumda bile bu iki türün görece yüksek *k'* değerleri sergilemelerinin, söz konusu türlerin alıkonmasında ligand-değiştirme mekanizmasının aktif bir rol almış olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.57. Bazı nükleosit ve nükleobazların *Cu*-EC-HA-APS üzerinde sergilediği *k'* değerlerinin hareketli fazdaki MeOH oranına bağla olarak değişimi

Hareketli faz: Su-MeOH; Akış hızı: 1,00 mL/dak; Sıcaklık: 25 ^{o}C; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Enjeksiyon hacmi: 2 µL

Tablo 4.17. Bazı nükleosit ve nükleobazların *Cu*-EC-HA-APS üzerinde sergilediği *k'* değerlerinin hareketli fazdaki MeOH oranına bağlı olarak değişimi

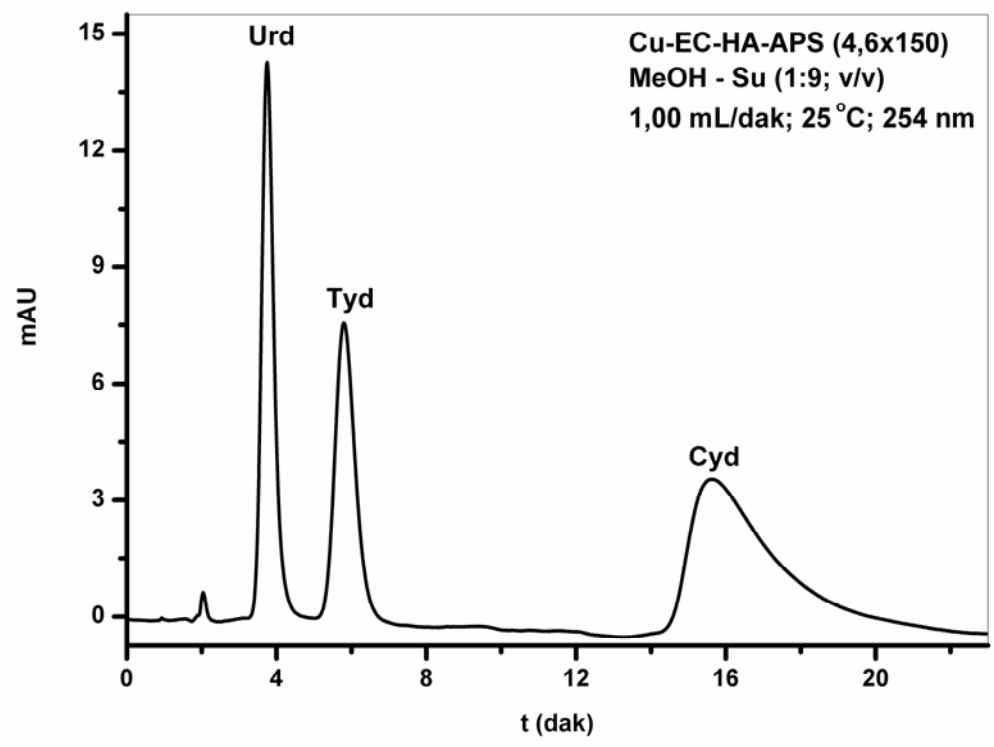
MeOH (%v/v)	***k'*±*s*** [b]					
	Ura	Urd	Thy	Tyd	Cyt	Cyd
10	0,70±0,02	0,93±0,02	1,59±0,03	2,14±0,02	7,73±0,03	6,40±0,03
25	0,46±0,01	0,54±0,03	0,94±0,02	1,07±0,02	5,87±0,03	4,68±0,03
39	0,37±0,01	0,40±0,01	0,62±0,01	0,62±0,01	5,02±0,02	4,13±0,03
50	0,31±0,02	0,32±0,01	0,46±0,01	0,42±0,01	4,67±0,02	3,73±0,02

[a] Veriler, Şekil 4.57'de grafiksel olarak verilmiş olup, deneysel şartlar şekilde belirtilmiştir.

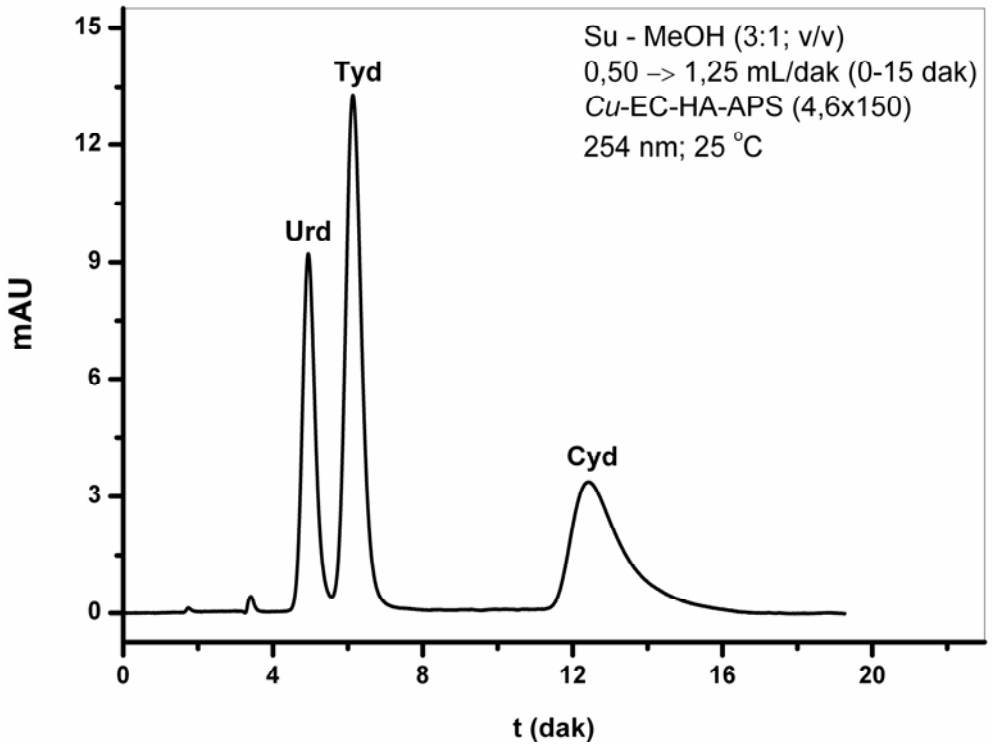
[b] *s*: Standart sapma; Tekrar sayısı, *n*=3

Cu-EC-HA-APS sabit fazı ile izokratik ve gradyent elüsyon şartlarında elde edilen kromatogramlar Şekil 4.58 ve Şekil 4.59'da verilmiş olup; Urd, Tyd ve Cyd türlerinin Su-MeOH hareketli faz sistemiyle birbirinden kolayca ayrılabildiği görülmüştür. Hareketli fazdaki MeOH oranı %25 dolaylarında olduğunda bile türlerin çok iyi resolüsyonlarla birbirinden ayrılabildiği görülmüş ve bu durumun sabit faza katılan ligand değiştirici karakterle ilişkili olduğu düşünülmüştür.

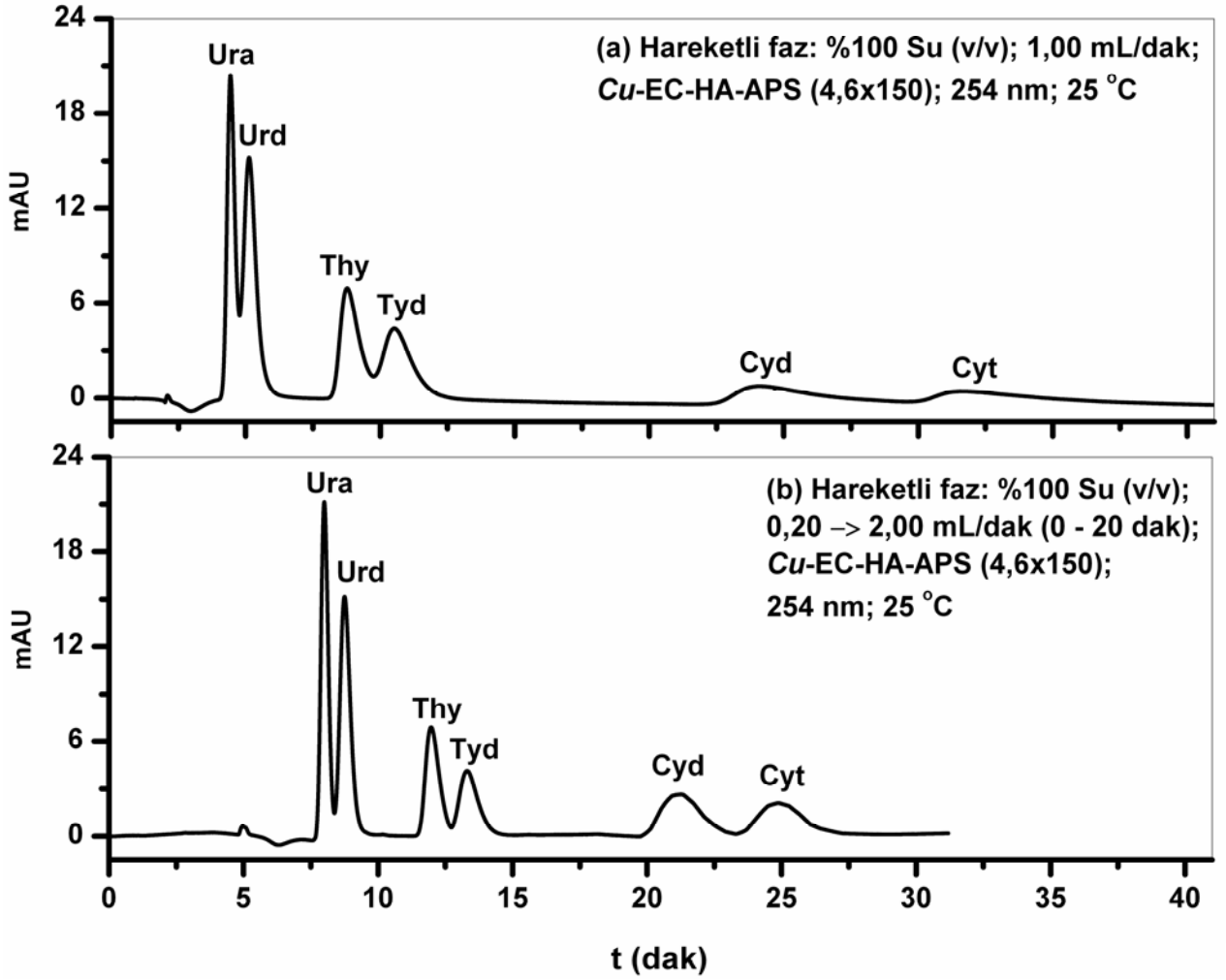
Cu-EC-HA-APS sabit fazı üzerinde Ura, Urd, Thy, Tyd, Cyt ve Cyd türlerinin birbirinden tamamen ayrılabilmesi için hareketli fazdaki MeOH oranının düşük tutulması gerektiği görülmüştür. Bu nedenle; hareketli fazda sadece su kullanılarak bu türlerin kromatografik ayrılmaları incelenmiştir. İzokratik ve gradyent elüsyonlarla elde edilen kromatogramlar Şekil 4.60'ta verilmiş olup, çalışılan 6 türün birbirinden sadece Su kullanılarak bile başarılı bir şekilde ayrılabildiği görülmüştür. Gradyent elüsyonda, hareketli fazın bileşiminde herhangi bir değişiklik yapılmadan sadece akış hızında gradyent uygulanmıştır.



Şekil 4.58. Bazı nükleositler için *Cu*-EC-HA-APS üzerinde izokratik elüsyonla elde edilen kromatogram
Enjeksiyon hacmi: 2 µL; diğer deneysel şartlar şekil üzerinde belirtilmiştir



Şekil 4.59. Bazı nükleositler için *Cu*-EC-HA-APS üzerinde gradyent elüsyonla elde edilen kromatogram
Enjeksiyon hacmi: 2 µL; diğer deneysel şartlar şekil üzerinde belirtilmiştir



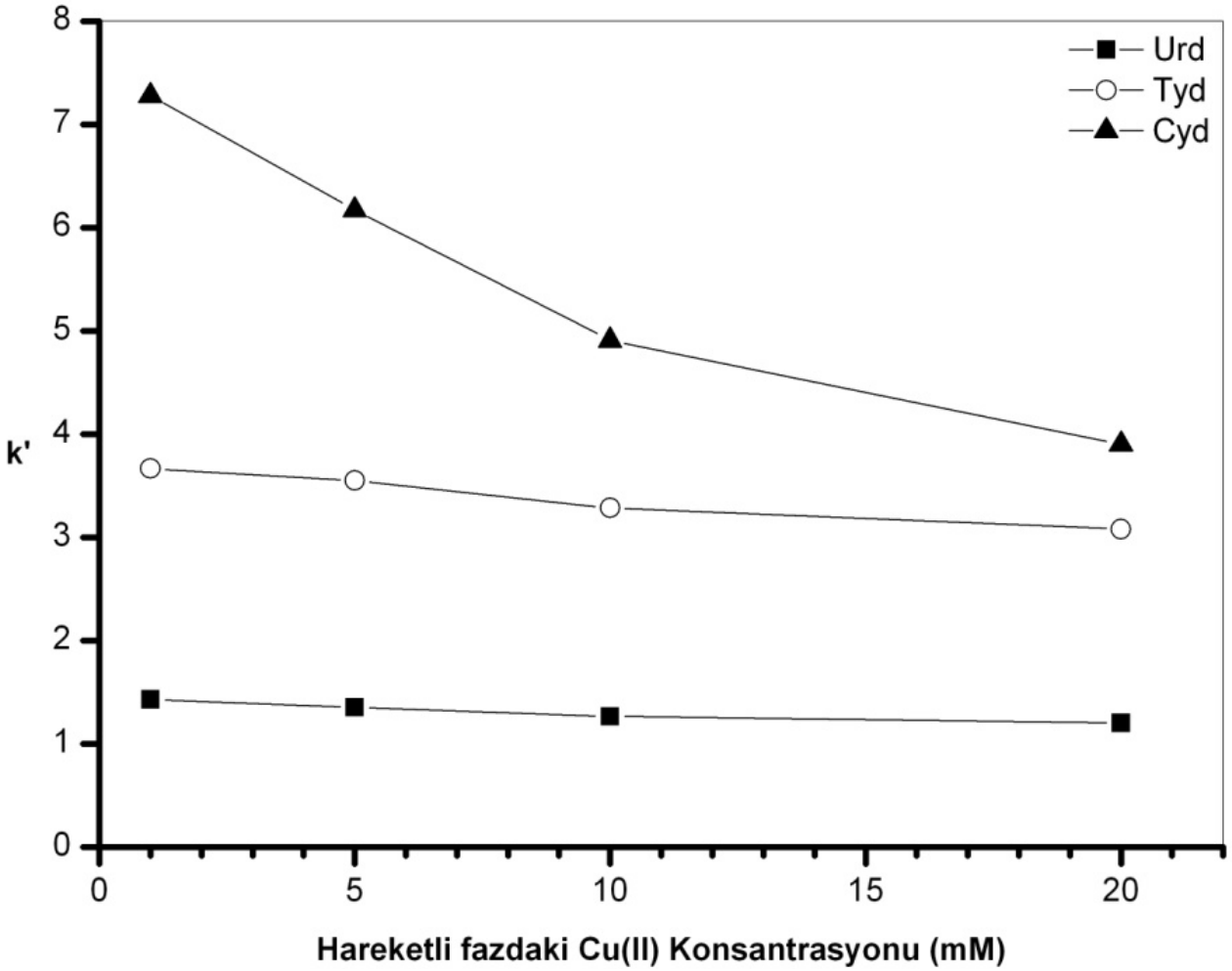
Şekil 4.60. Bazı nükleosit ve nükleobazlar için izokratik ve gradyent şartlarda *Cu*-EC-HA-APS üzerinde kaydedilen kromatogramlar
(a) İzokratik elüsyonla, (b) Akış hızında gradyent uygulayarak; Deneysel şartlar kromatogramlar üzerinde belirtilmiştir

4.3.1.3. Hareketli fazdaki Cu(II) konsantrasyonunun etkisi

Çalışılan türlerin Cu(II) ile etkileşme düzeyleri hakkında fikir edinmek amacıyla; hareketli fazdaki Cu(II) konsantrasyonuna bağlı olarak bazı nükleositlerin (Urd, Tyd ve Cyd) kromatografik davranışlarındaki değişimler incelenmiştir. Hareketli fazda Cu(II) iyonlarının kullanılmasına dayanan bu yaklaşımın, sadece türler ile Cu(II) iyonları arasındaki etkileşme düzeylerinin anlaşılması bakımından değil, aynı zamanda hareketli fazdaki Cu(II) konsantrasyonunun deneysel bir değişken olarak kullanılabilirliği hakkında fikir edinilmesi bakımından da faydalı olacağı düşünülmüştür. Bu amaçla; hareketli faz olarak HPLC sisteminde uygun konsantrasyonlara seyreltilen 0,10 M'lık $Cu(NO_3)_2$ çözeltisi kullanılmıştır.

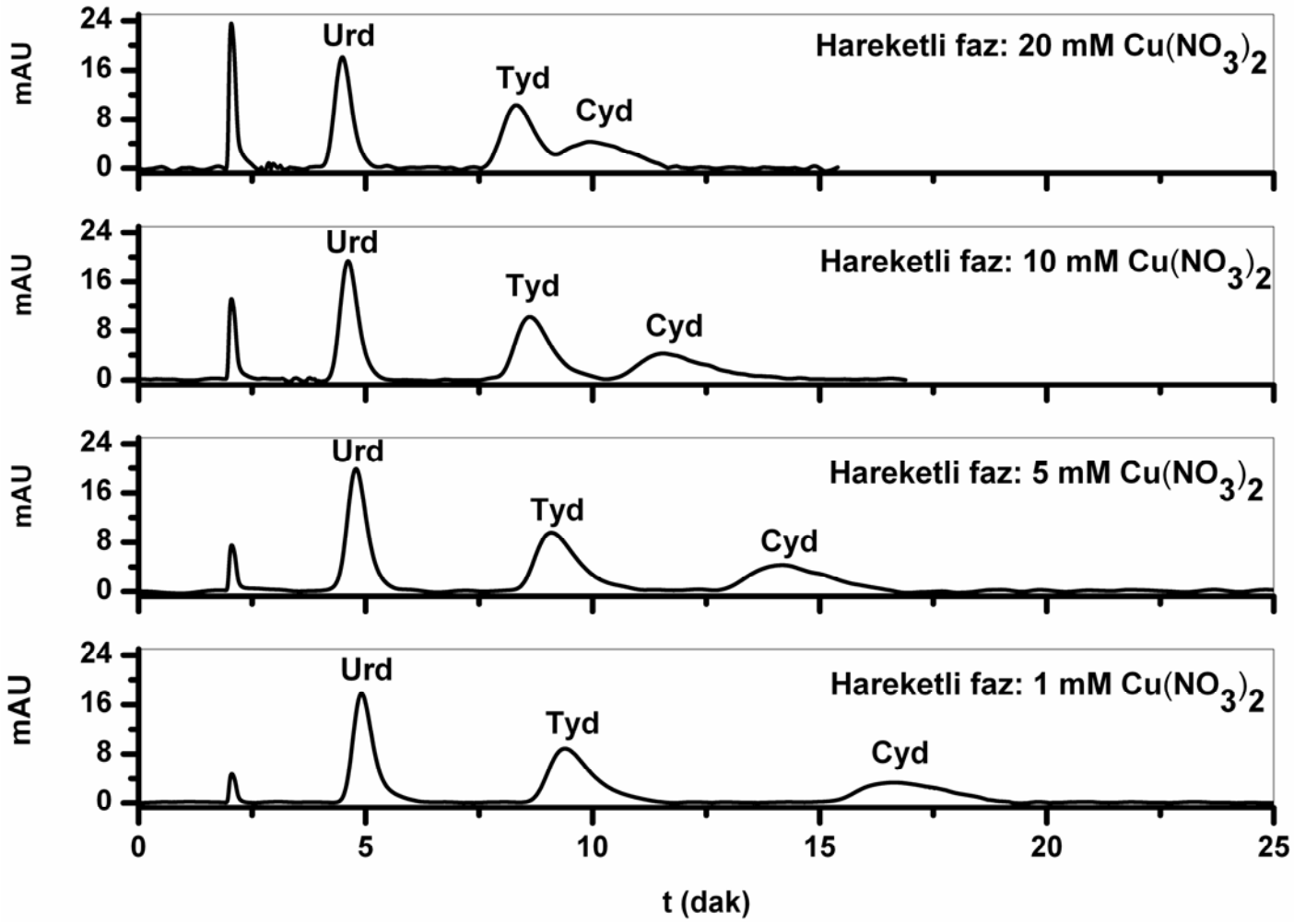
Çalışılan nükleositlerin *k'* değerlerinin hareketli fazdaki Cu(II) konsantrasyonuna bağlı olarak değişimi incelendiğinde (Bkz. Şekil 4.61), Cu(II) konsantrasyonundaki değişimlerden en çok etkilenen türün Cyd olduğu görülebilir. Bu durum; yapısında bulunan $-NH_2$ grubunun etkisiyle Cyd'nin Cu(II) ile daha kararlı kompleks oluşturmuş olmasıyla ilişkilendirilmiştir. Farklı konsantrasyonlarda Cu(II) içeren hareketli fazlar kullanılarak kaydedilen kromatogramlar (Şekil 4.62) incelendiğinde, kromatografik ayırmanın hareketli fazdaki Cu(II) konsantrasyonunda yapılacak uygun ayarlamalar ile kolayca iyileştirilebileceği görülebilir.

Elde edilen verilerin, *Cu*-EC-HA-APS üzerinde elde edilen verilerle uyumlu olduğu görülmüş ve yapısında $-NH_2$ grubu içeren türlerin Cu(II) ile daha yüksek düzeyde etkileşmeye girmiş olduğu sonucuna varılmıştır. *Cu*-EC-HA-APS üzerinde Cyd, Ado ve Guo türlerinin Urd ve Tyd'ye göre daha yüksek *k'* değeri sergilemelerinin de bu etkiden kaynaklandığı düşünülmektedir.



Şekil 4.61. Hareketli fazdaki Cu(II) konsantrasyonu ile bazı nükleositlerin *k'* değerleri arasındaki ilişki

Hareketli faz: $Cu(NO_3)_2$, herhangi bir pH ayarlaması yapılmamıştır; Akış hızı: 1,00 mL/dak; Sıcaklık: 25 ^oC; Deteksiyon: 254 nm; Enjeksiyon hacmi: 2 µL; Kolon: 4,6x150



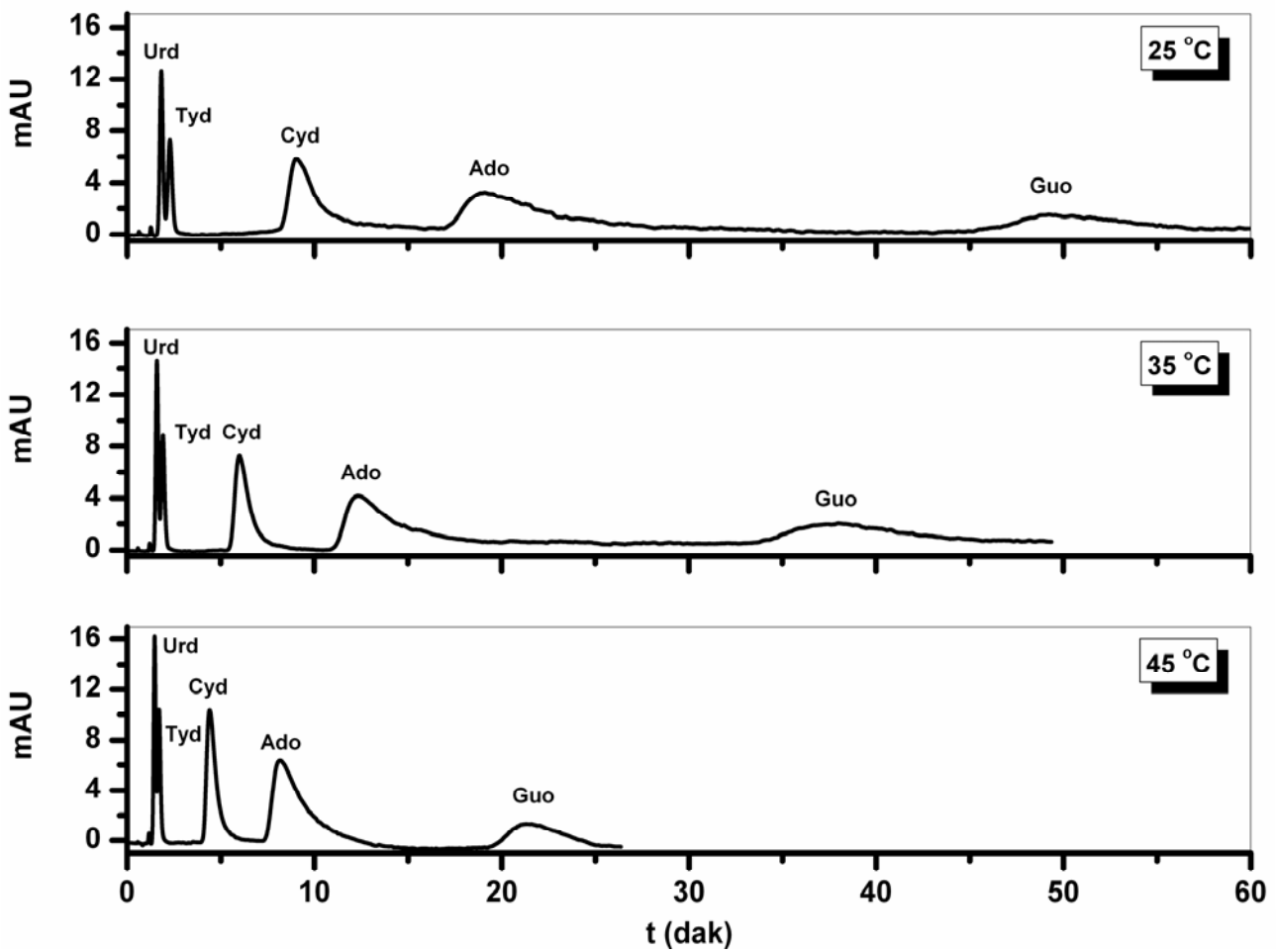
Şekil 4.62. Hareketli fazdaki Cu(II) konsantrasyonuna bağlı olarak bazı nükleositlerin kromatografik ayırmalarında gözlenen farklılaşmalar

Hareketli faz: $Cu(NO_3)_2$, herhangi bir pH ayarlaması yapılmamıştır; Akış hızı: 1,00 mL/dak; Sıcaklık: 25 ^oC; Deteksiyon: 254 nm; Enjeksiyon hacmi: 2 µL; Kolon: 4,6x150

4.3.1.4. Sıcaklığın etkisi

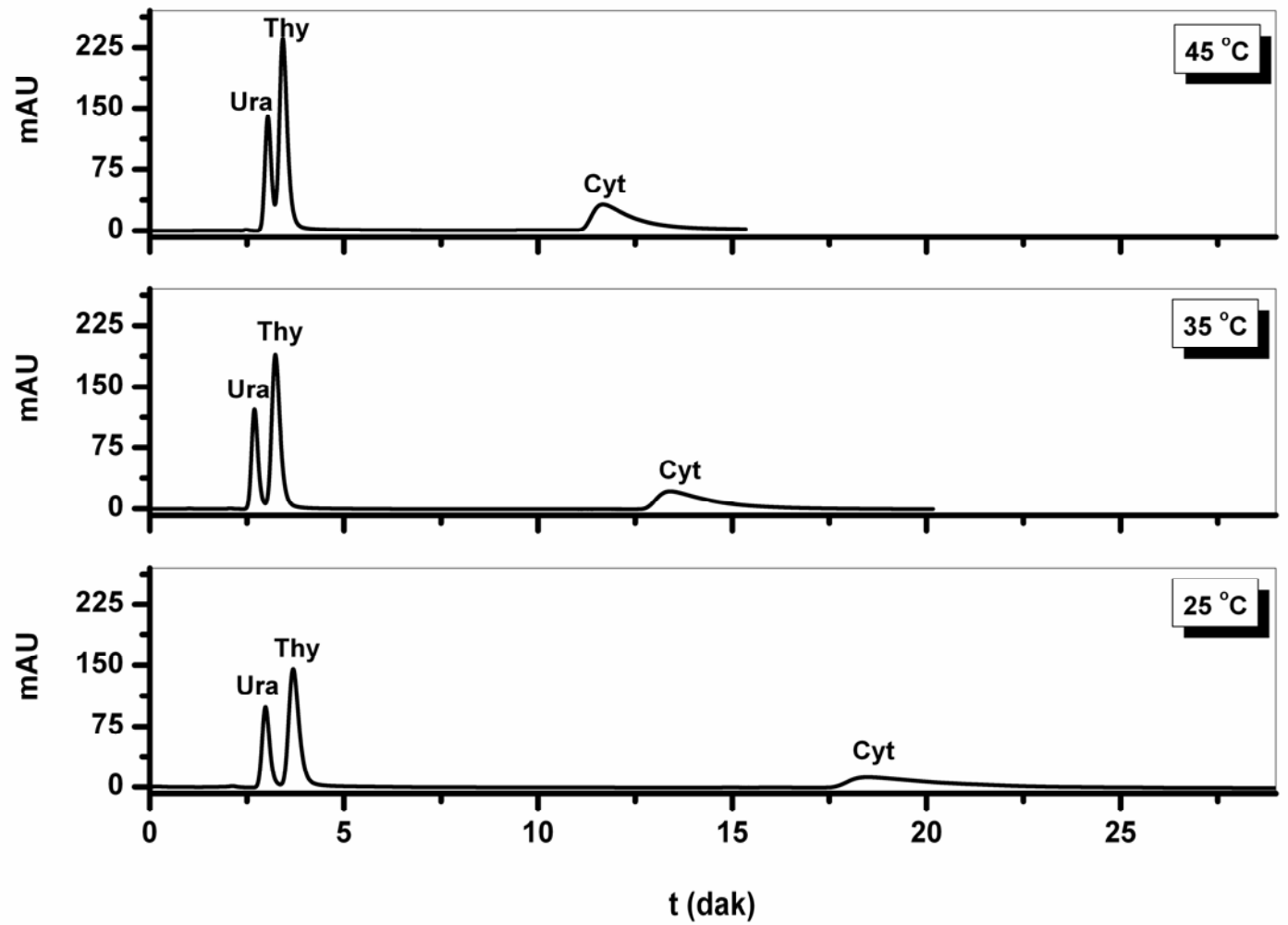
Bazı nükleosit ve nükleobazların kromatografik davranışları üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacıyla; farklı sıcaklıklarda (25; 35 ve 45 ^{o}C) bazı denemeler yürütülmüştür. Denemelerde hareketli faz olarak Su-MeOH (3:1; v/v) karışımı kullanılmış olup, çalışılan nükleosit (Urd, Tyd, Cyd, Ado ve Guo) ve nükleobazlar (Ura, Thy ve Cyt) için farklı sıcaklıklarda kaydedilen kromatogramlar sırasıyla Şekil 4.63 ve Şekil 4.64'te verilmiştir. Kromatogramlardan; çalışılan türler için *k'* değerlerinin sıcaklık arttıkça azaldığı ve kromatografik ayırmaların iyileştirilmesinde sıcaklığın önemli bir deneysel parametre olduğu görülmektedir. Özellikle; daha geç elue olan türlerin (ör. Guo) *k'* değerlerindeki düşüşün çok daha fazla olduğu görülmüş ve bu türlerin daha kısa sürede elue edilebilmesi için sıcaklığın çok faydalı olacağı düşünülmüştür. Diğer taraftan; sıcaklıktaki artışla, Urd ve Tyd'nin kromatografik ayırmalarının kötüleştiği görülmüştür. Çalışılan nükleositlerin kromatografik ayırmalarının iyileştirilmesi amacıyla, sıcaklıkta uygulanacak bir gradyent programının faydalı olacağı düşünülmüş ve bu noktadan hareketle yürütülen denemelerle, nükleositlerin kromatografik ayırmaları iyileştirilebilmiştir (Bkz. Şekil 4.65). Elde edilen sonuçlar, sıcaklık gradyentinin, kromatografik ayırmaların iyileştirilmesinde çok önemli bir deneysel parametre olduğunu göstermiştir.

Elde edilen veriler; geç elue olan türler için R_S değerlerinin iyileştirilmesinde yüksek sıcaklıklarda çalışmanın çok faydalı olduğunu göstermiştir. Nitekim; çalışılan 8 bileşik (Ura, Thy, Cyt, Urd, Tyd, Cyd, Ado ve Guo) için *Cu*-EC-HA-APS üzerinde 45 ^{o}C'ta kaydedilen kromatogramdan (Şekil 4.66), Ura-Urd ve Thy-Tyd çiftleri hariç diğer tüm türlerin birbirinden başarılı bir şekilde ayrılabildiği görülmektedir. Ayrıca; Cyt ve Cyd'nin de birbirinden başarılı bir şekilde ayrılmış olması, sabit fazın moleküler yapıdaki değişimlere karşı hassas bir özellik sergilediğini göstermektedir. *Cu*-EC-HA-APS üzerinde Ade ve Gua için yürütülen denemeler, bu türlerin yüksek sıcaklıklarda ve yüksek organik çözücü bileşimlerinde bile çok yüksek *k'* değeri sergilediklerini göstermiştir. Bu durum; söz konusu türlerin sabit faz immobilize olmuş Cu(II) ile çok kuvvetli bir şekilde etkileştiğini göstermektedir. Farklı metal iyonlarının kolona yüklenmesiyle bu türlerin kromatografik ayırmalarının da iyileştirilebileceği düşünülmüş ve bu amaçla bazı nükleosit ve nükleobazların *Co*-EC-HA-APS üzerindeki kromatografik davranışlarının da incelenmesinin uygun olacağı düşünülmüştür.



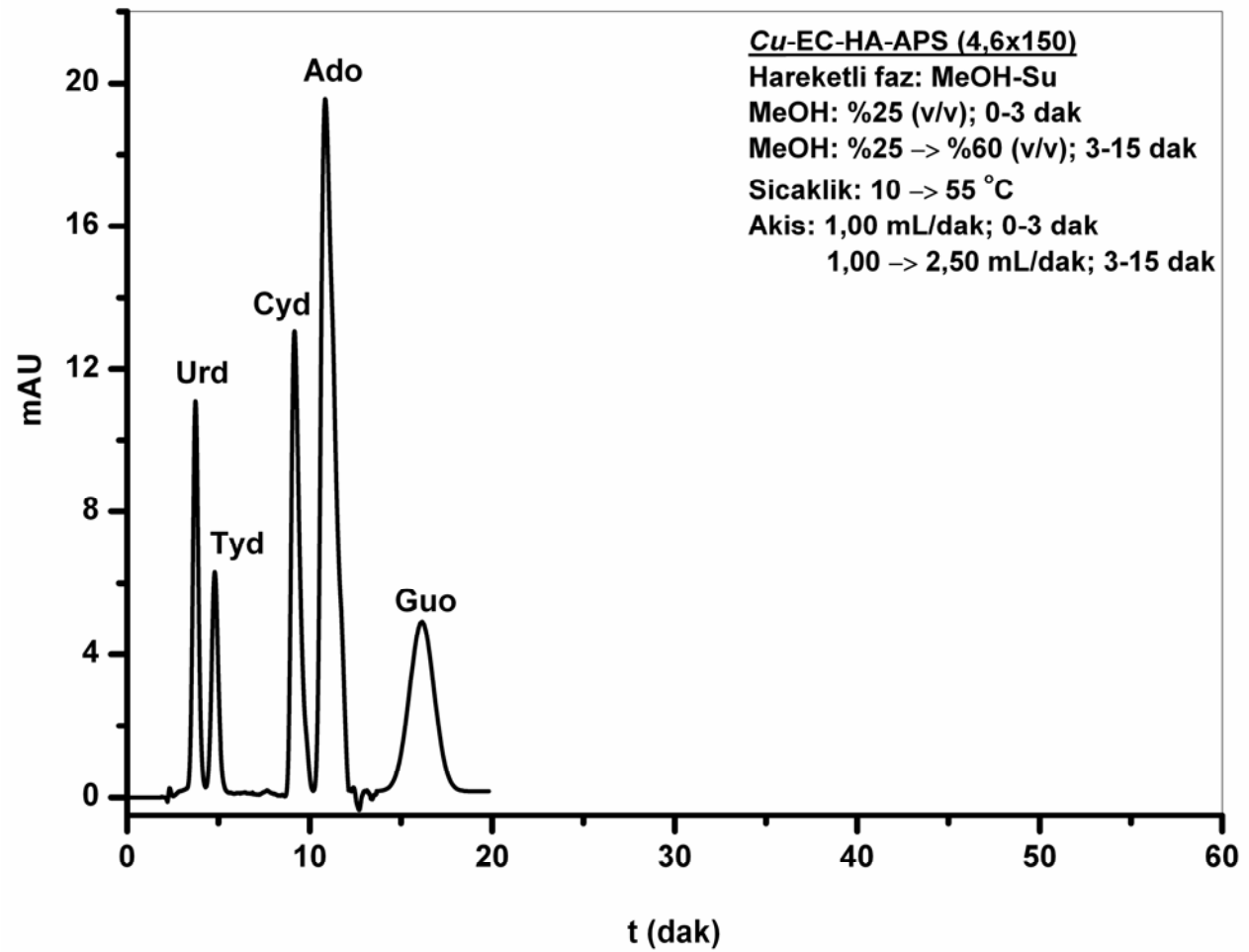
Şekil 4.63. Bazı nükleositler için farklı sıcaklıklarda kaydedilen kromatogramlar

Hareketli faz: MeOH-Su (1:3; v/v); Akış hızı: 1,75 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Kolon: *Cu*-EC-HA-APS (4,6x150); Enjeksiyon hacmi: 2 µL



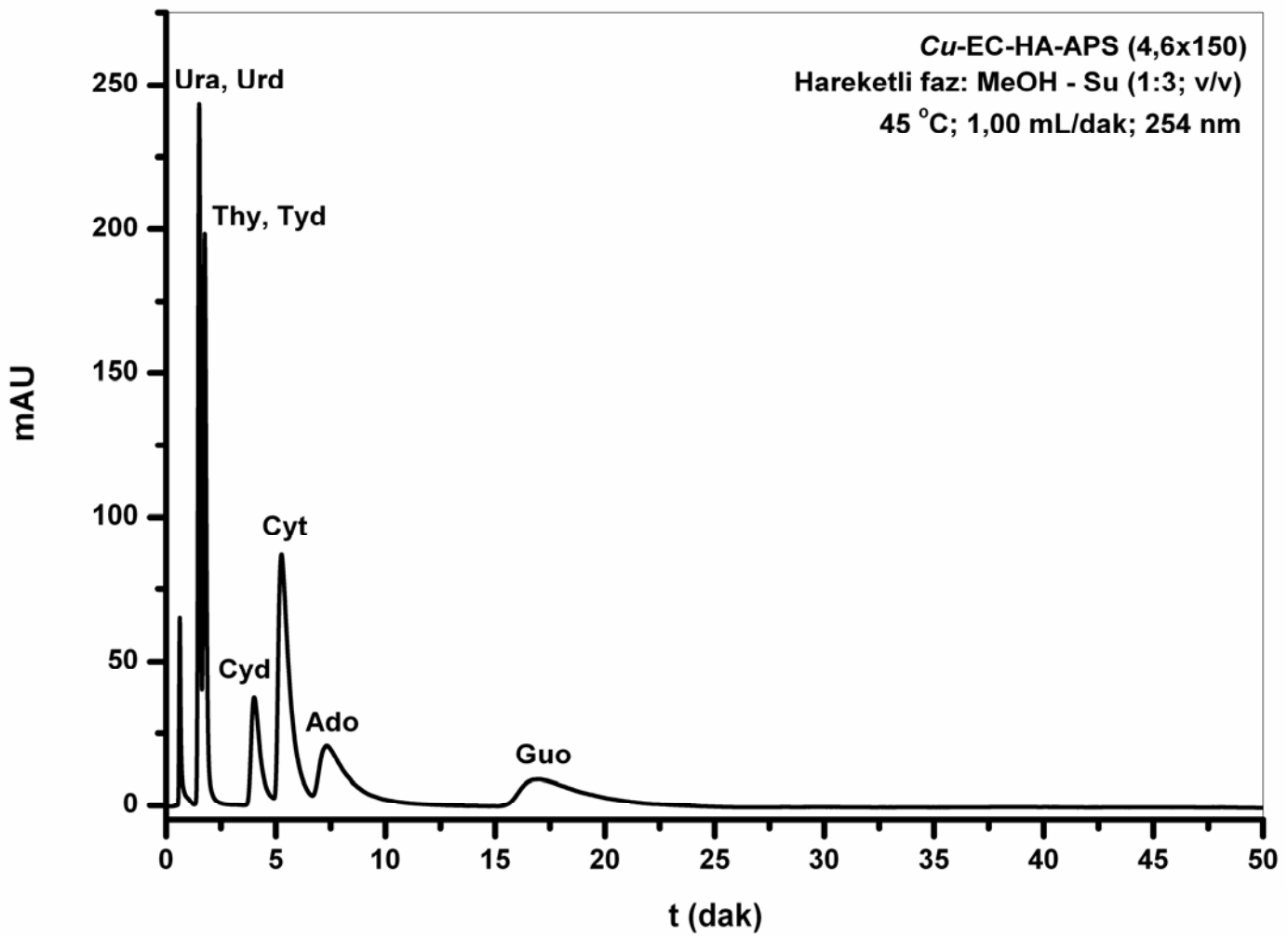
Şekil 4.64. Bazı nükleobazlar için farklı sıcaklıklarda kaydedilen kromatogramlar

Hareketli faz: MeOH-Su (1:3; v/v); Akış hızı: 1,00 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Kolon: *Cu*-EC-HA-APS (4.6x150); Enjeksiyon hacmi: 2 µL



Şekil 4.65. Sıcaklık, organik çözücü yüzdesi ve akış hızında uygulanan gradyent programları ile nükleositlerin kromatografik ayırmalarında gözlenen iyileşmeler

Deneysel şartlar şekil üzerinde belirtilmiştir



Şekil 4.66. Bazı nükleosit ve nükleobazlar için *Cu*-EC-HA-APS üzerinde yüksek sıcaklıklarda kaydedilen kromatogram

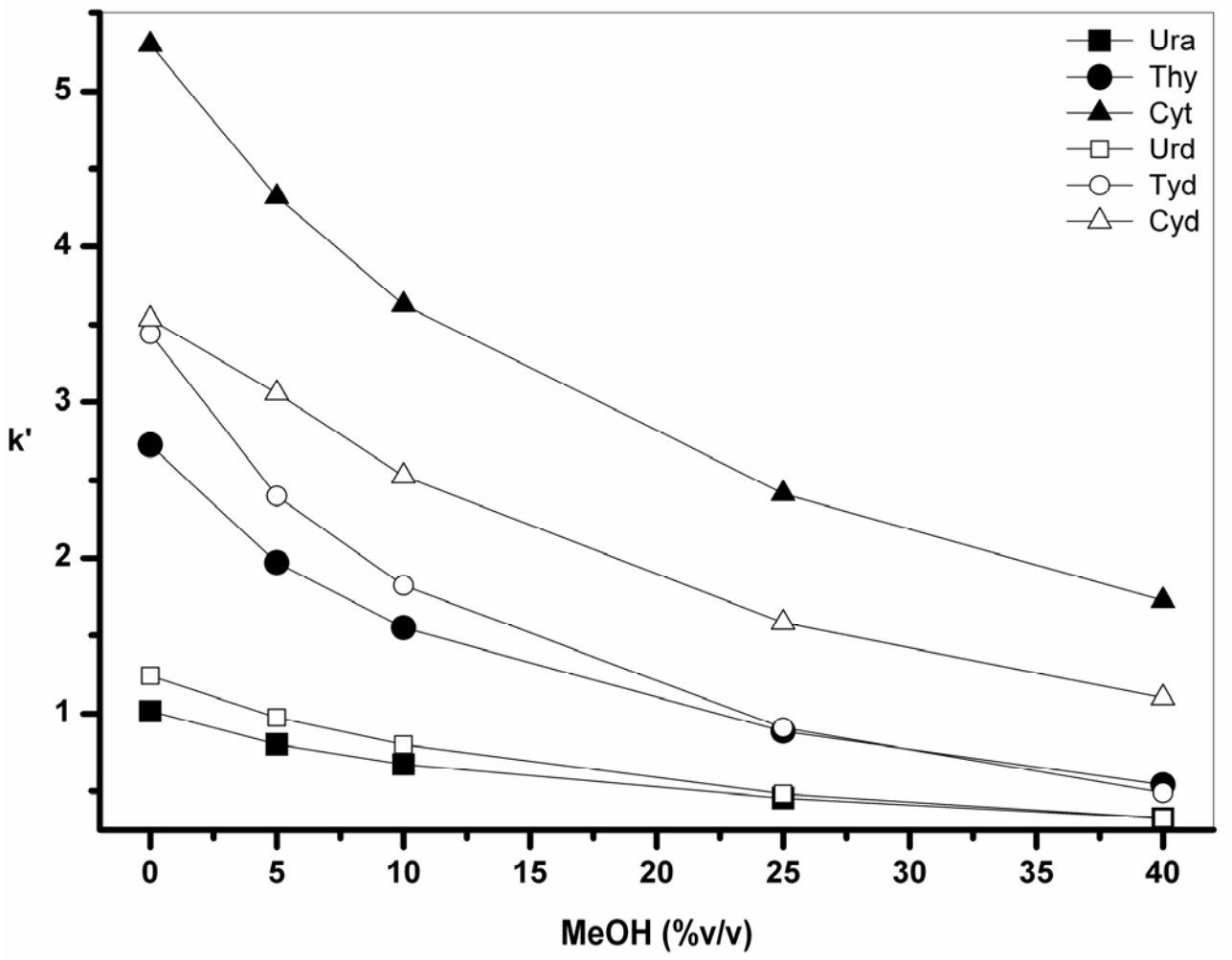
Deneysel şartlar şekil üzerinde belirtilmiştir

4.3.2. *Co*-EC-HA-APS üzerinde yürütülen kromatografik işlemler

EC-HA-APS sabit fazına farklı metal iyonları yüklenerek türlerin kromatografik davranışlarında meydana gelebilecek değişiklikleri değerlendirmek amacıyla Co(II) yüklenmiş EC-HA-APS sabit fazı (*Co*-EC-HA-APS) ile bazı analizler yürütülmüştür. Analizlerde; hareketli fazdaki organik çözücü yüzdesinin ve sıcaklığının etkisi incelenmiştir.

4.3.2.1. Hareketli fazdaki organik çözücü yüzdesinin etkisi

Hareketli fazdaki organik çözücü yüzdesinin etkisini incelemek amacıyla yapılan çalışmalarda; organik çözücü olarak MeOH kullanılmış ve farklı bileşimlere sahip Su-MeOH hareketli faz sistemleri kullanılarak bazı nükleosit (Urd, Tyd, Cyd) ve nükleobazların (Ura, Thy, Cyt) *k'* değerlerindeki değişimler değerlendirilmiştir. Elde edilen veriler (Şekil 4.67 ve Tablo 4.18); hareketli fazdaki organik çözücü yüzdesi arttıkça çalışılan tüm türlerin *k'* değerlerinin azaldığını göstermiştir. *Cu*-EC-HA-APS üzerinde elde edilen *k'* değerleriyle kıyaslandığında; yapısında $-NH_2$ grubu içeren Cyt ve Cyd türleri için *Co*-EC-HA-APS üzerinde elde edilen *k'* değerlerinin daha düşük olduğu görülebilir (Bkz. Şekil 4.57 ve Şekil 4.67). Bu durumun, amin grubu içeren türlerle Cu iyonlarının kuvvetli kompleks yapabilme özelliğinden kaynaklandığı düşünülmüştür. Nitekim; $-NH_2$ grubu içeren (ve moleküler kütlesi daha büyük olan) Ado, Guo, Ade ve Gua türleri, *Cu*-EC-HA-APS sabit fazı üzerinde Su-MeOH hareketli faz sistemiyle çok zor elue olmuş ve elde edilen pikler önemli oranda yayvanlaşmıştır. Çalışılan diğer türlerin (Ura, Thy, Urd, Tyd) *k'* değerlerinin, EC-HA-APS'ye yüklenen metal iyonu cinsinden çok fazla etkilenmediği de tespit edilmiştir.



Şekil 4.67. Bazı nükleosit ve nükleobazların *Co*-EC-HA-APS sabit fazı üzerinde sergilediği kapasite faktörlerinin hareketli fazdaki MeOH oranına bağla olarak değişimi

Akış hızı: 1,00 mL/dak; Sıcaklık: 25 ^{o}C; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Enjeksiyon hacmi: 2 µL

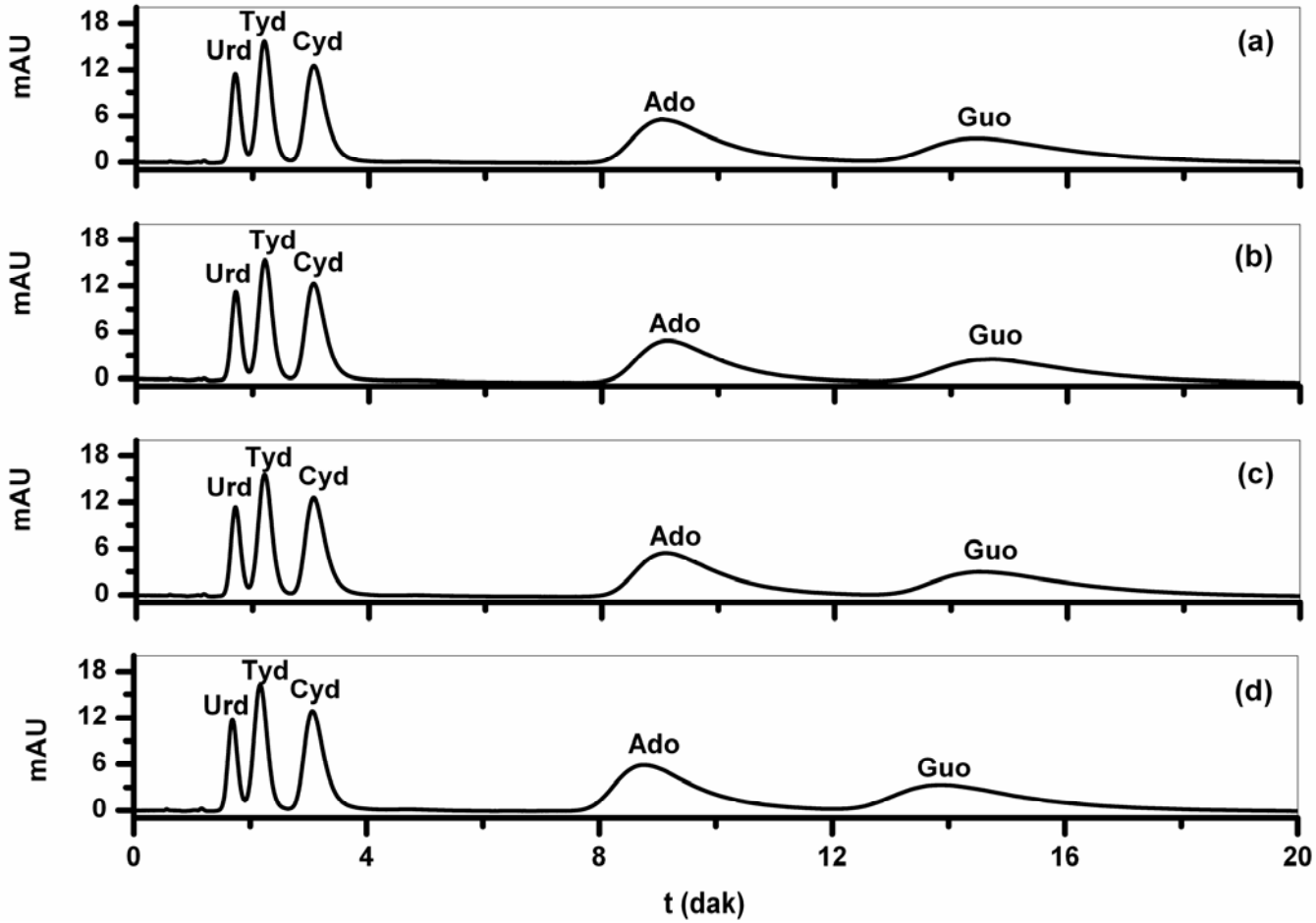
Tablo 4.18. Bazı nükleosit ve nükleobazların *Co*-EC-HA-APS üzerinde sergilediği *k'* değerlerinin hareketli fazdaki MeOH oranına bağlı olarak değişimi

MeOH (%v/v)	***k'*±*s*** [b]					
	Ura	Urd	Thy	Tyd	Cyt	Cyd
0	1,02±0,02	1,24±0,02	2,72±0,02	3,44±0,02	5,30±0,03	3,54±0,03
5	0,80±0,02	0,98±0,02	1,97±0,02	2,40±0,02	4,32±0,03	3,06±0,03
10	0,67±0,01	0,80±0,01	1,55±0,01	1,82±0,01	3,63±0,03	2,53±0,02
25	0,45±0,01	0,48±0,01	0,89±0,01	0,91±0,01	2,41±0,02	1,58±0,02
40	0,32±0,01	0,32±0,01	0,54±0,01	0,49±0,01	1,72±0,02	1,10±0,02

[a] Veriler, Şekil 4.67'de grafiksel olarak verilmiş olup, deneysel şartlar şekilde belirtilmiştir.

[b] *s*: Standart sapma; Tekrar sayısı, *n*=3

Cyt ve Cyd türlerinin *Co*-EC-HA-APS üzerinde (*Cu*-EC-HA-APS'ye kıyasla) daha kolay elue olabilmesi, $-NH_2$ grubu içeren diğer türlerin (Ado, Ade, Guo ve Gua) de *Co*-EC-HA-APS üzerinde kolayca elue edilebileceğini düşündürmüştür. Nükleositlerin çok bileşenli numuneleriyle yürütülen analizlerden elde edilen kromatogramlar Şekil 4.68'de verilmiş olup, bu tezi doğrular niteliktedir. Şekil 4.68'de ayrıca, aynı gün içinde ve ikinci bir Co(II) yüklemesinden sonra kaydedilen kromatogramlar da verilmiş olup; *Co*-EC-HA-APS ile hem türlerin alıkonma sürelerinde hem de kolonun ayırma gücünde yüksek düzeyde tekrarlanabilirlik gözlenmiştir. İkinci bir metal yükleme işleminden sonra sadece Guo'nun alıkonma süresinde bir miktar düşüş gözlenmiştir.



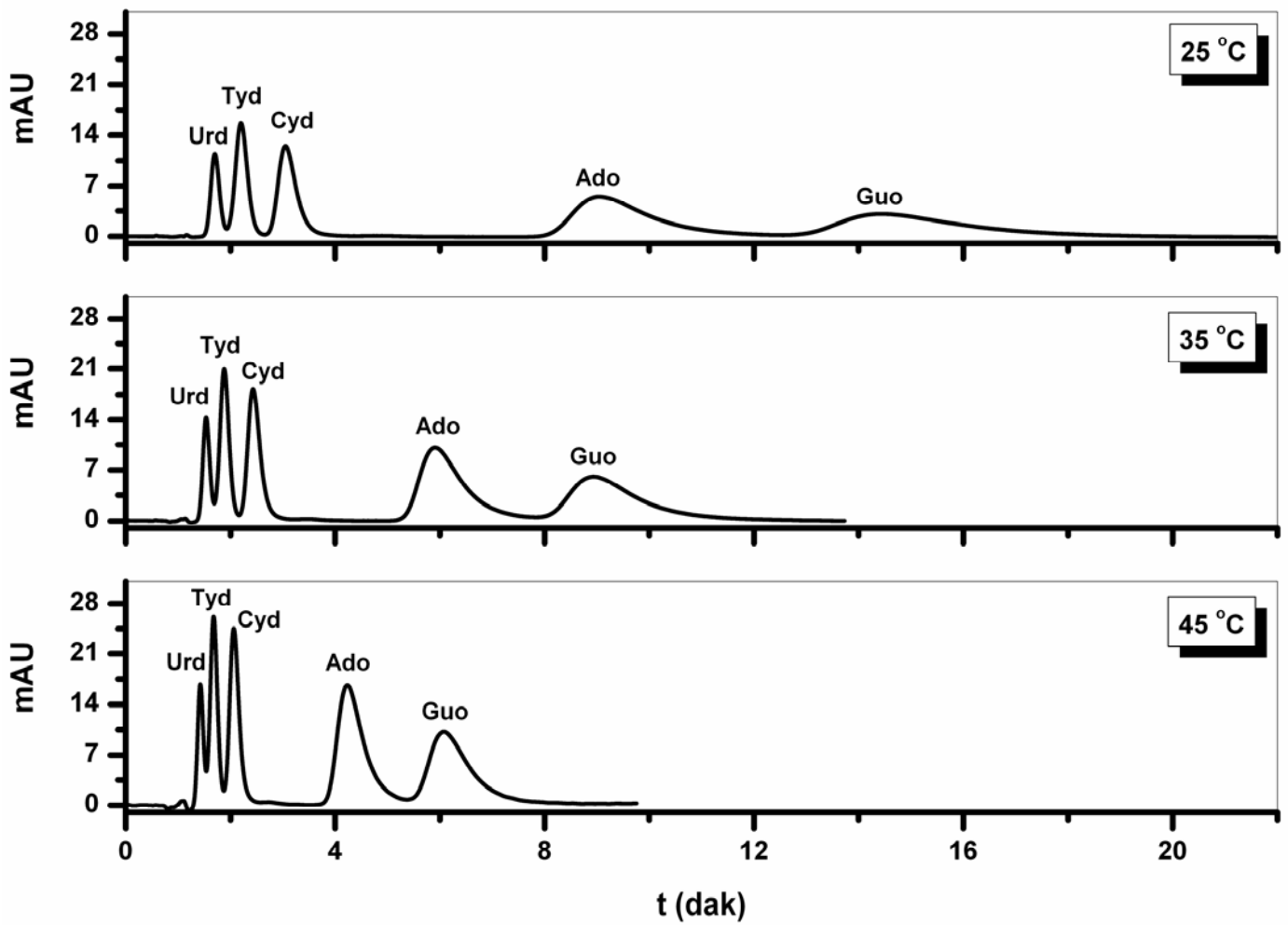
Şekil 4.68. *Co*-EC-HA-APS üzerindeki tekrarlanabilirliğin bazı nükleositler için gün-içi (a-c) ve diğer bir Co(II) yükleme işleminden sonra (d) kaydedilen kromatogramlarla değerlendirilmesi

Hareketli faz: MeOH-Su (1:3; v/v); Akış hızı: 1,75 mL/dak; Sıcaklık: 25 ^{o}C; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Kolon: *Co*-EC-HA-APS (4,6x150); Enjeksiyon hacmi 2 µL

4.3.2.2. Sıcaklığın etkisi

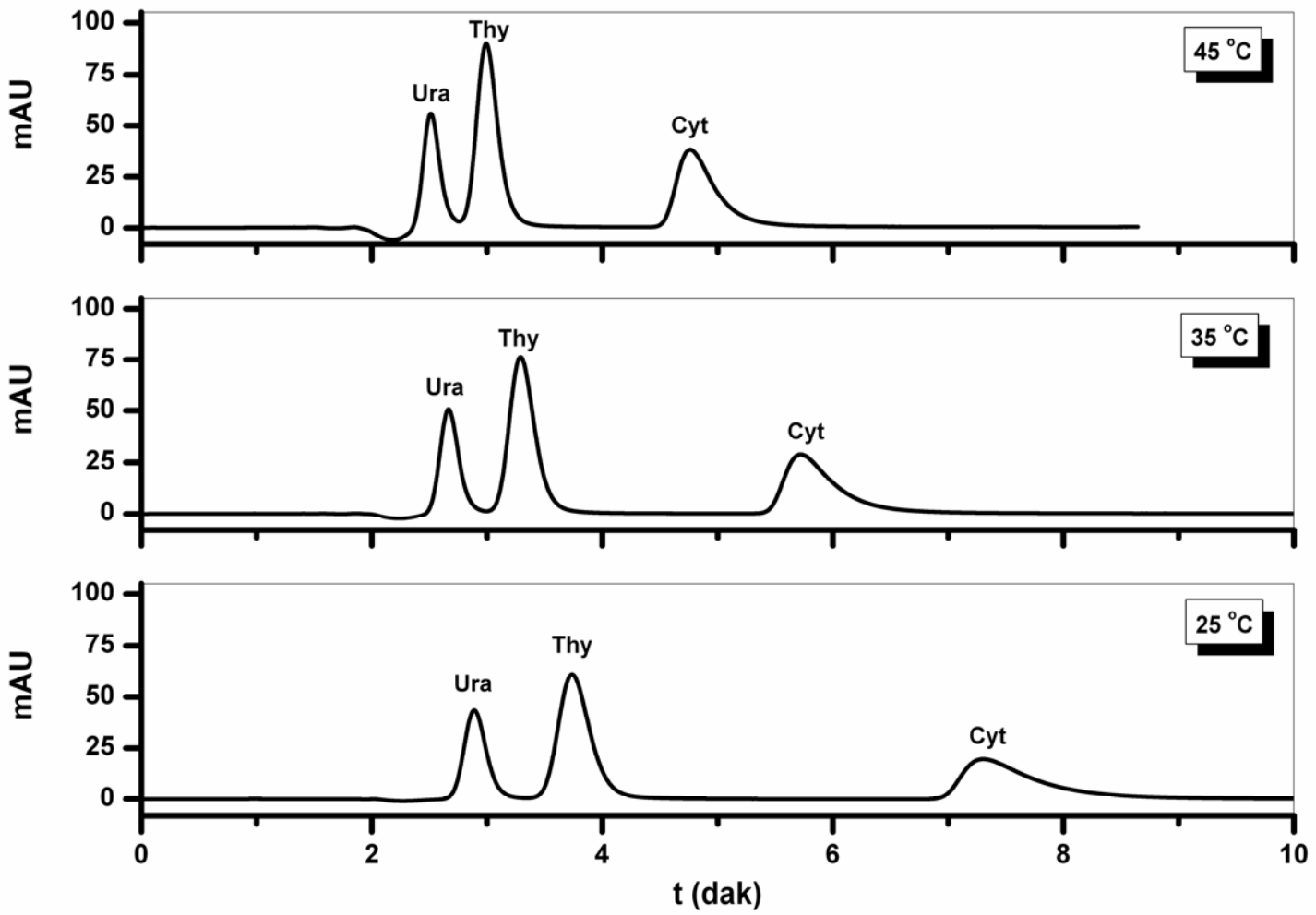
Co-EC-HA-APS sabit fazı kullanılarak, bazı nükleosit ve nükleobazlar için kromatografik ayrımalar üzerine sıcaklığının etkisi de incelenmiştir. Nükleosit ve nükleobazlarda gözlenen genel bir eğilim olarak; sıcaklık arttıkça türler daha kısa sürede kolondan elue olmuş ve türlerin resolüsyonlarında iyileşmeler gözlenmiştir (Şekil 4.69 ve Şekil 4.70). Özellikle; Ado ve Guo türlerinin kromatografik ayrılmalarının yüksek sıcaklıklarda iyileştirilebildiği görülmüştür. Yani; *Co*-EC-HA-APS üzerinde, yüksek sıcaklıklarda hem türlerin daha kısa bir sürede elue olduğu, hem de ayırma gücünün iyileştirilebildiği görülmüştür. Nitekim; çalışılan 10 nükleosit ve nükleobazı içeren bir numunedeki türlerden büyük bir kısmı *Co*-EC-HA-APS sabit fazı üzerinde 45 ^{o}C'de birbirinden başarılı bir şekilde ayrılabilmiştir (Şekil 4.71). Sıcaklık ve akış hızında uygun gradyent programları uygulanarak ve hareketli fazda organik çözücü olarak MeOH yerine MeCN kullanarak bu ayırmanın iyileştirilebildiği görülmüştür (Şekil 4.72). Bu nedenle; sıcaklık gradyenti ve MeCN'nin kromatografik ayırmaların iyileştirilmesinde olumlu etkiye sahip deneysel parametreler olduğu anlaşılmıştır.

Kromatografik ayırmalarda sıcaklık gradyentinin etkisini daha açık bir şekilde ortaya koymak amacıyla, nükleositlerle bazı denemeler yürütülmüş ve elde edilen kromatogramlar Şekil 4.73'te karşılaştırmalı olarak verilmiştir. Uygulanan sıcaklık gradyenti de Şekil 4.74'te şematik olarak gösterilmiştir. Şekillerden görüldüğü üzere; uygulanan sıcaklık gradyentinin etkisiyle resolüsyon ve pik simetrisi önemli düzeyde iyileştirilebilmiş ve analiz süresinde yaklaşık %50 oranında bir azalma kaydedilmiştir. Elde edilen veriler; sıcaklık gradyentinin, EC-HA-APS ile yürütülen kromatografik analizlerde son derece önemli bir deneysel parametre olduğunu teyit etmiştir. Söz konusu denemelerde, hareketli fazda organik çözücü olarak MeCN kullanılmış olup, MeOH'ya kıyasla daha düşük oranlarda MeCN kullanılarak daha iyi kromatografik ayırmaların sağlanabildiği de görülmüştür.



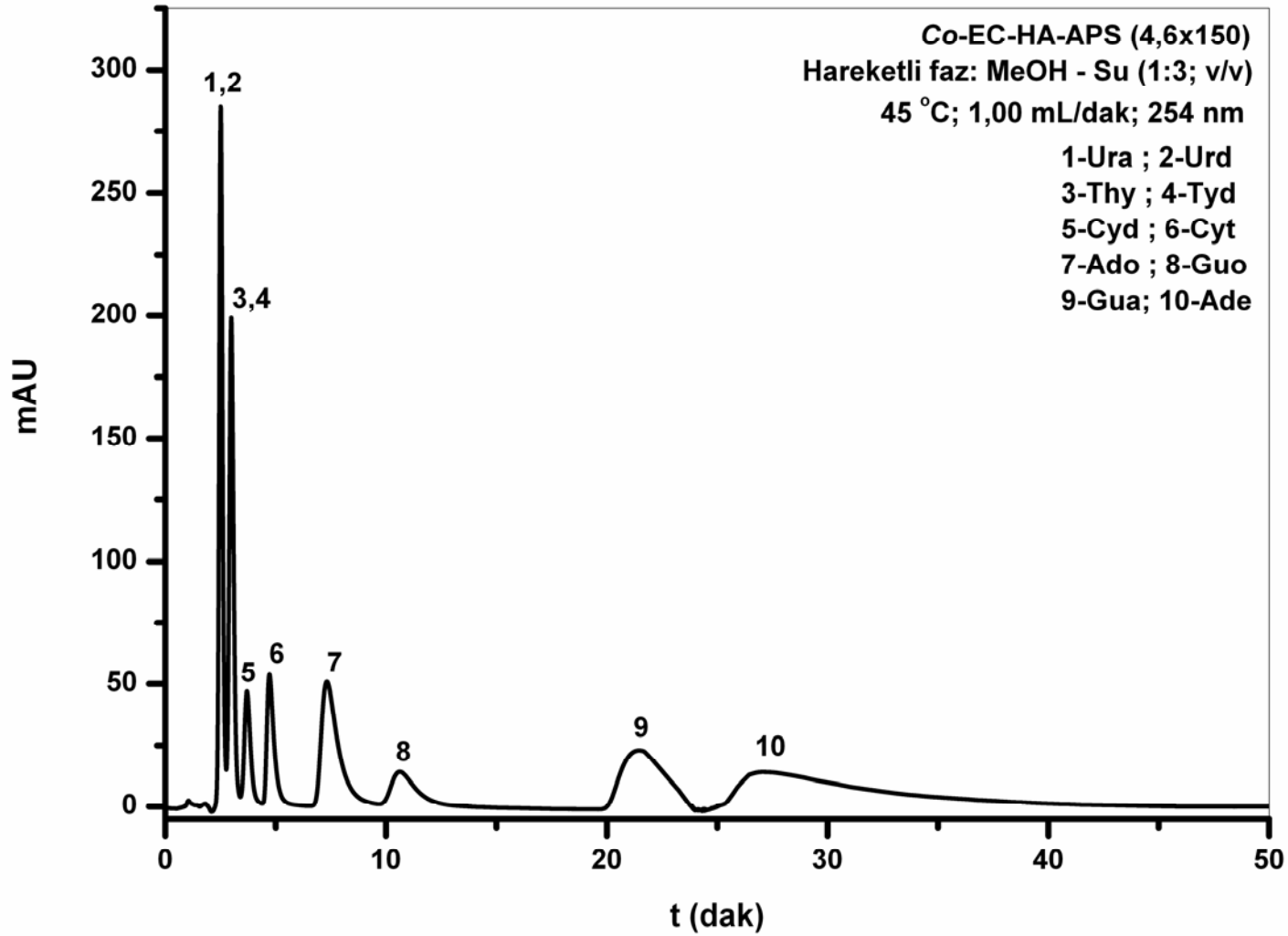
Şekil 4.69. Bazı nükleositler için *Co*-EC-HA-APS üzerinde farklı sıcaklıklarda kaydedilen kromatogramlar

Hareketli faz: MeOH-Su (1:3; v/v); Akış hızı: 1,75 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Kolon: *Co*-EC-HA-APS (4,6x150); Enjeksiyon hacmi: 2 µL



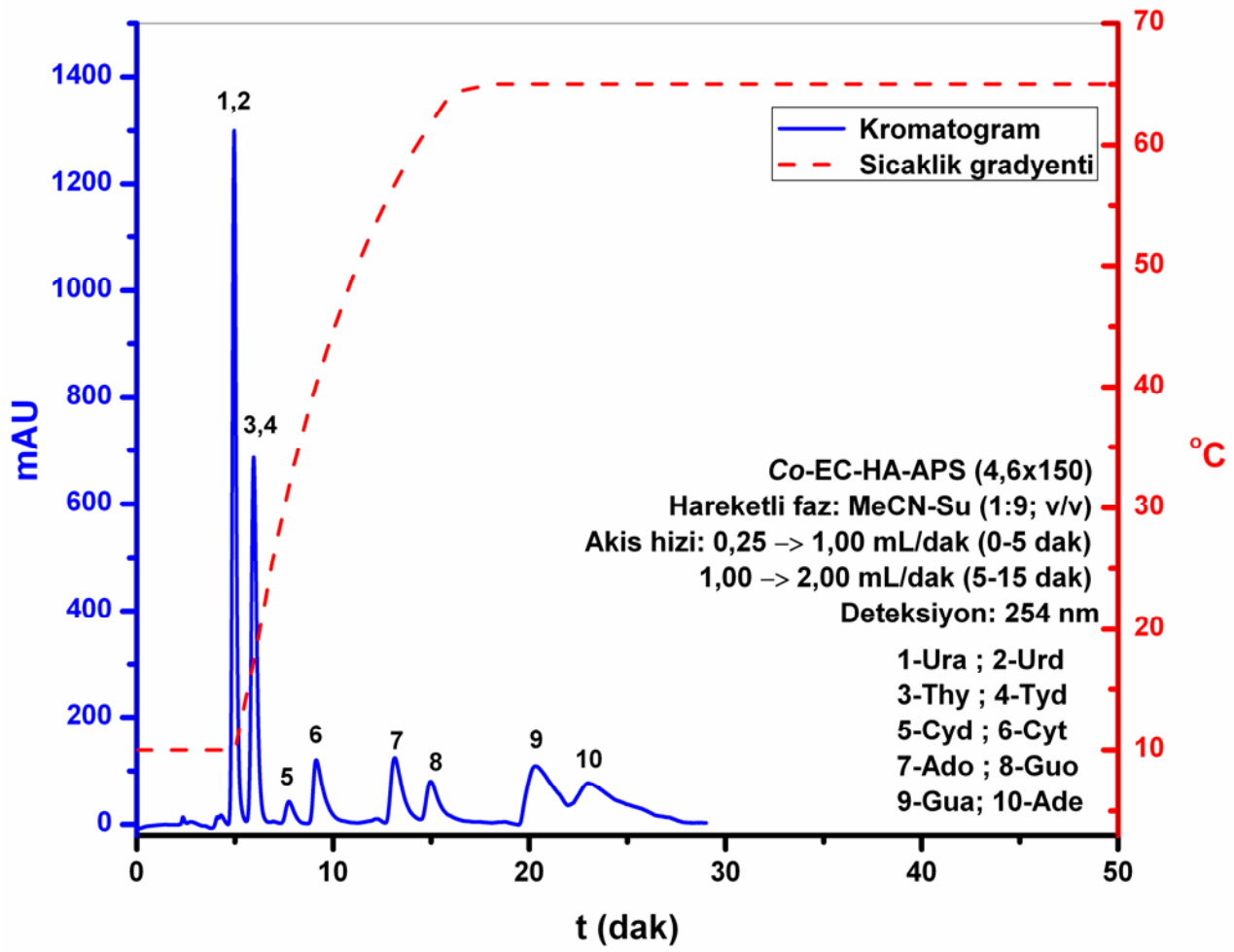
Şekil 4.70. Bazı nükleobazlar için *Co*-EC-HA-APS üzerinde farklı sıcaklıklarda kaydedilen kromatogramlar

Hareketli faz: MeOH-Su (1:3; v/v); Akış hızı: 1,00 mL/dak; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Kolon: *Co*-EC-HA-APS (4.6x150); Enjeksiyon hacmi: 2 µL



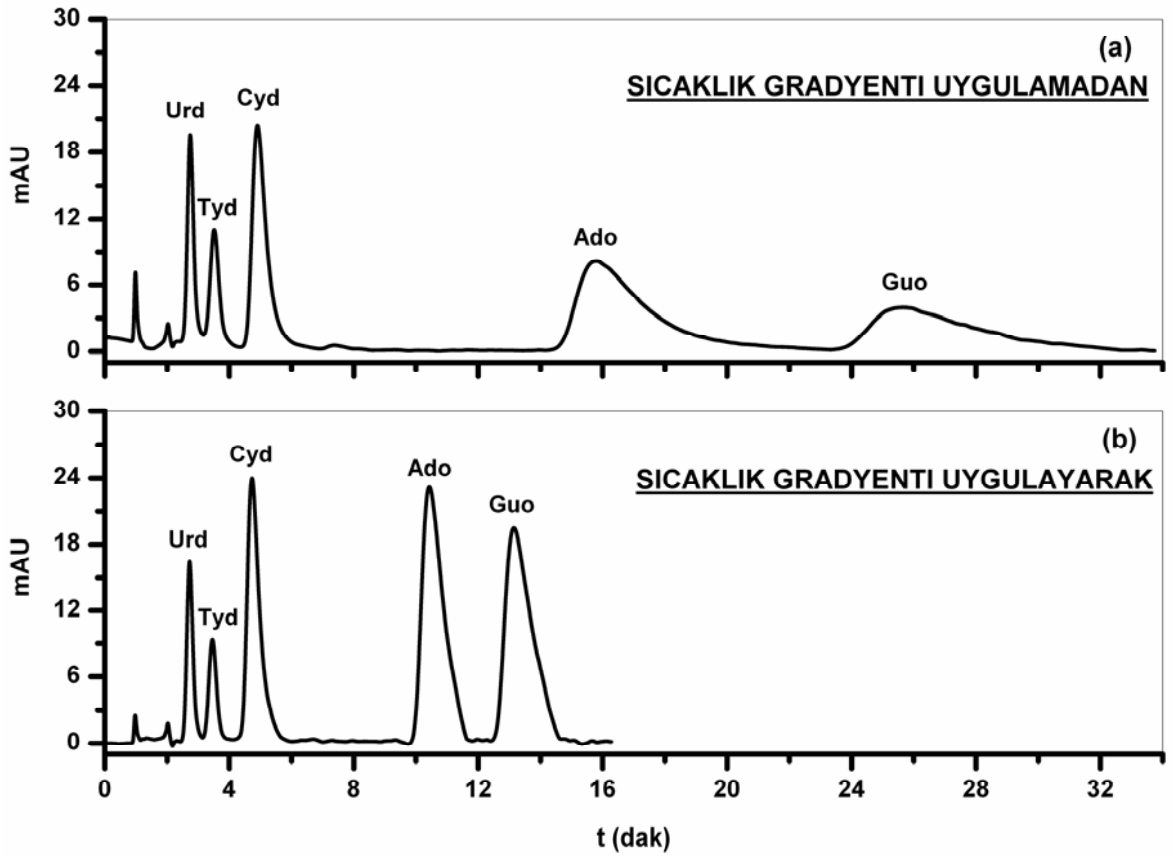
Şekil 4.71. Bazı nükleosit ve nükleobazlar için *Co*-EC-HA-APS üzerinde yüksek sıcaklıkta kaydedilen kromatogram

Enjeksiyon hacmi 2 µL; diğer deneysel şartlar şekil üzerinde belirtilmiştir



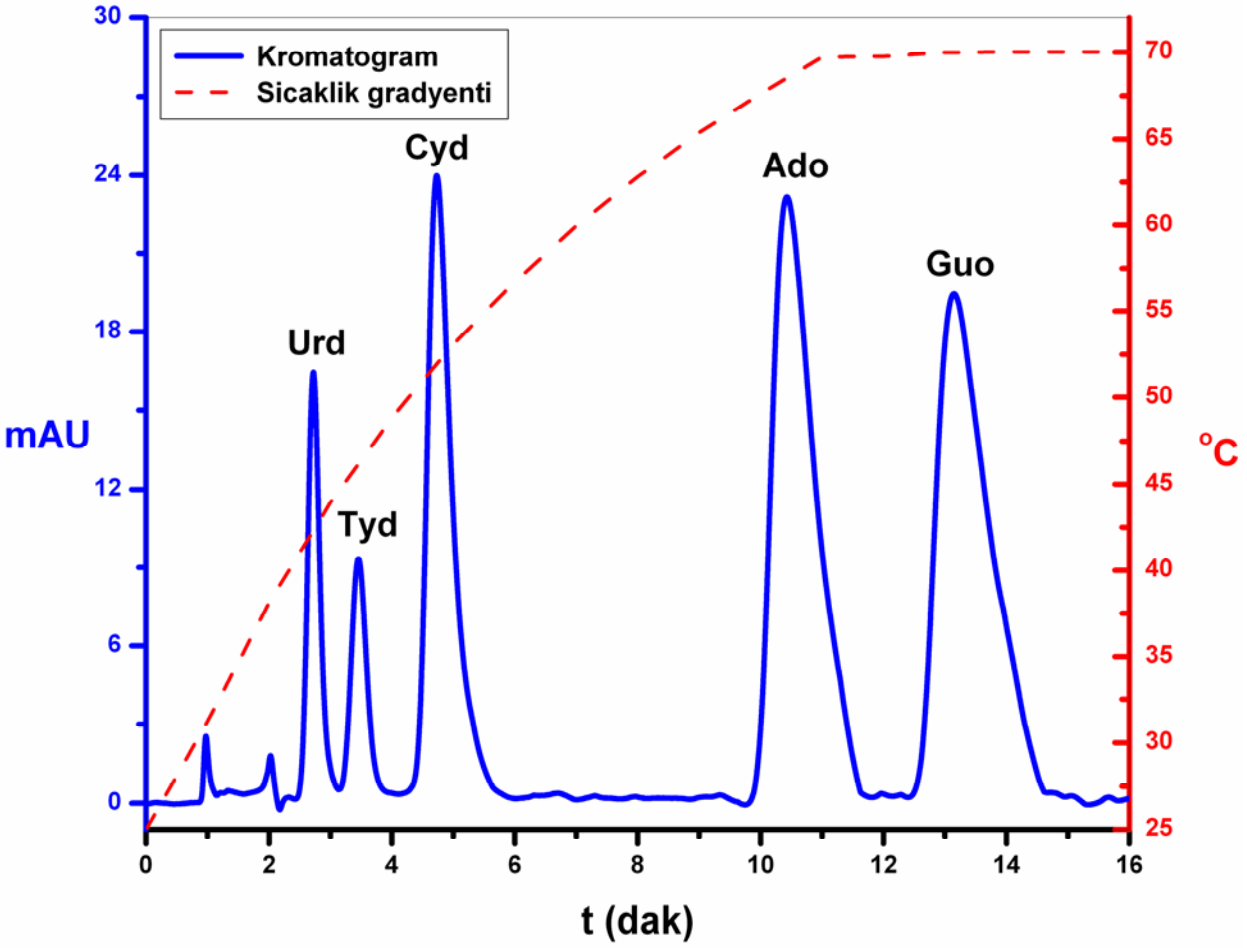
Şekil 4.72. Nükleosit ve nükleobazlar için *Co*-EC-HA-APS üzerinde sıcaklık ve akış hızında gradyent uygulanarak ve hareketli fazda MeCN kullanılarak kaydedilen ayırma

Kolon: 4,6x150; Deteksiyon: 254 nm; Enjeksiyon hacmi: 2 µL; Diğer deneysel şartlar şekil üzerinde belirtilmiştir



Şekil 4.73. Bazı nükleositler için *Co*-EC-HA-APS üzerindeki kromatografik ayırmaların sıcaklık gradyenti temelinde iyileştirilmesi

(a) Sıcaklık gradyenti uygulamadan kaydedilen kromatogram: Sıcaklık: 25 ^{o}C; Hareketli faz: MeCN-Su (1:9; v/v); Akış hızı: 1,00 mL/dak; Kolon: 4,6x150; Deteksiyon: 254 nm; Enjeksiyon hacmi: 2 µL; (b) Sıcaklık gradyenti uygulanarak kaydedilen kromatogram: Sıcaklık: 25 ^{o}C →70 ^{o}C; Hareketli faz: MeCN-Su (1:9; v/v); Akış hızı: 1,00 mL/dak; Kolon: 4,6x150; Deteksiyon: 254 nm; Enjeksiyon hacmi: 2 µL



Şekil 4.74. Bazı nükleositlerin kromatografik ayırmalarını iyileştirmek için uygulanan sıcaklık gradyenti ve kaydedilen kromatogram

Sıcaklık: 25 ^{o}C →70 ^{o}C; Hareketli faz: MeCN-Su (1:9; v/v); Akış hızı: 1,00 mL/dak; Kolon: 4,6x150; Deteksiyon: 254 nm; Enjeksiyon hacmi: 2 µL

LEC şartlarında elde edilen sonuçları şu şekilde özetlemek mümkündür:

Nükleositler için *Cu*-EC-HA-APS ve *Co*-EC-HA-APS üzerinde elde edilen *k'* değerlerine bakıldığında; metal yükleme işleminin etkisiyle türlerin *k'* değerlerinde artış meydana geldiği görülebilir. Özellikle; Cu(II) iyonu yüklendiğinde gözlenen artışın daha yüksek olduğu görülmüştür. Yapısında $–NH_2$ grubu bulunduran türlerin (Cyt, Cyd, Ade, Ado, Gua, Guo) *k'* değerlerindeki artışın daha fazla olduğu ve bu türlerin *Cu*-EC-HA-APS üzerindeki *k'* değerlerinin (*Co*-EC-HA-APS'ye kıyasla) daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

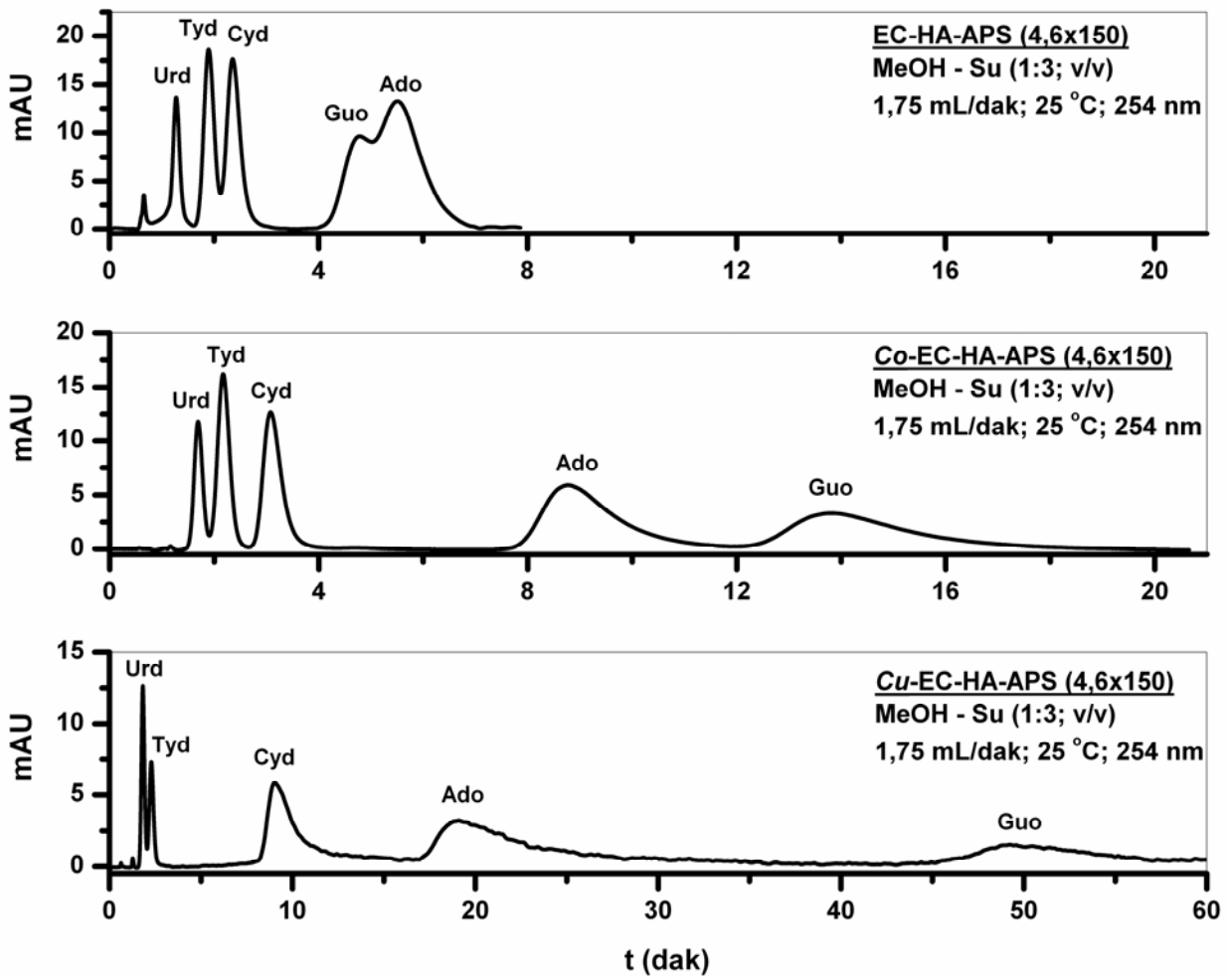
Kuvvetli elektron-donör gruplar içeren bazı nükleosit ve nükleobazların (ör. Cyt, Cyd) *Cu*-EC-HA-APS üzerinde, hareketli fazdaki MeOH oranı %50'ye kadar çıkarıldığında bile yüksek *k'* değeri sergilemeleri (Bkz. Şekil 4.57), ligand-değiştirme işleminin etkin bir şekilde rol aldığını düşündürmüştür. Ayrıca; EC-HA-APS'ye Cu(II) yerine Co(II) yüklendiğinde bu türlerin görece daha düşük *k'* değeri sergilemeleri, metal iyonu türüne bağlı olarak etkileşme düzeylerinde farklılaşmaların meydana geldiğini göstermiştir.

Metal iyonu çözeltilerinin kolona basamaklı bir şekilde yüklenmesiyle sabit fazın türlerle etkileşebilecek daha uygun bir geometrik yapıya kavuştuğu düşünülmektedir Yani; düşük konsantrasyonlarda beslenen metal iyonlarının EC-HA-APS'ye kuvvetli bir şekilde bağlandığı ve bu bağlanmaların etkisiyle sabit fazın yüzeyindeki HA makromoleküllerinin daha açık bir geometrik yapıya kavuştuğu söylenebilir. Dolayısıyla; basamaklı yükleme işlemiyle hem metal iyonlarının sonraki basamaklarda sabit faza daha kolay bağlandığı, hem de çalışılan türlerin zayıf etkileşmeler temelinde etkileşebileceği hidrofobik, aromatik ve diğer bazı yapıların da etkileşme için uygun bir pozisyona kavuştuğu düşünülmektedir. Fakat; metal yükleme işleminden sonra ligand-değiştirme mekanizmasının diğer zayıf etkileşmelere göre çok daha baskın bir karakter sergilediği ve kromatografik davranışların büyük oranda bu mekanizma ile ilişkili olduğu sonucuna varılmıştır.

4.3.3. *M*-EC-HA-APS kolonu için performans parametreleri

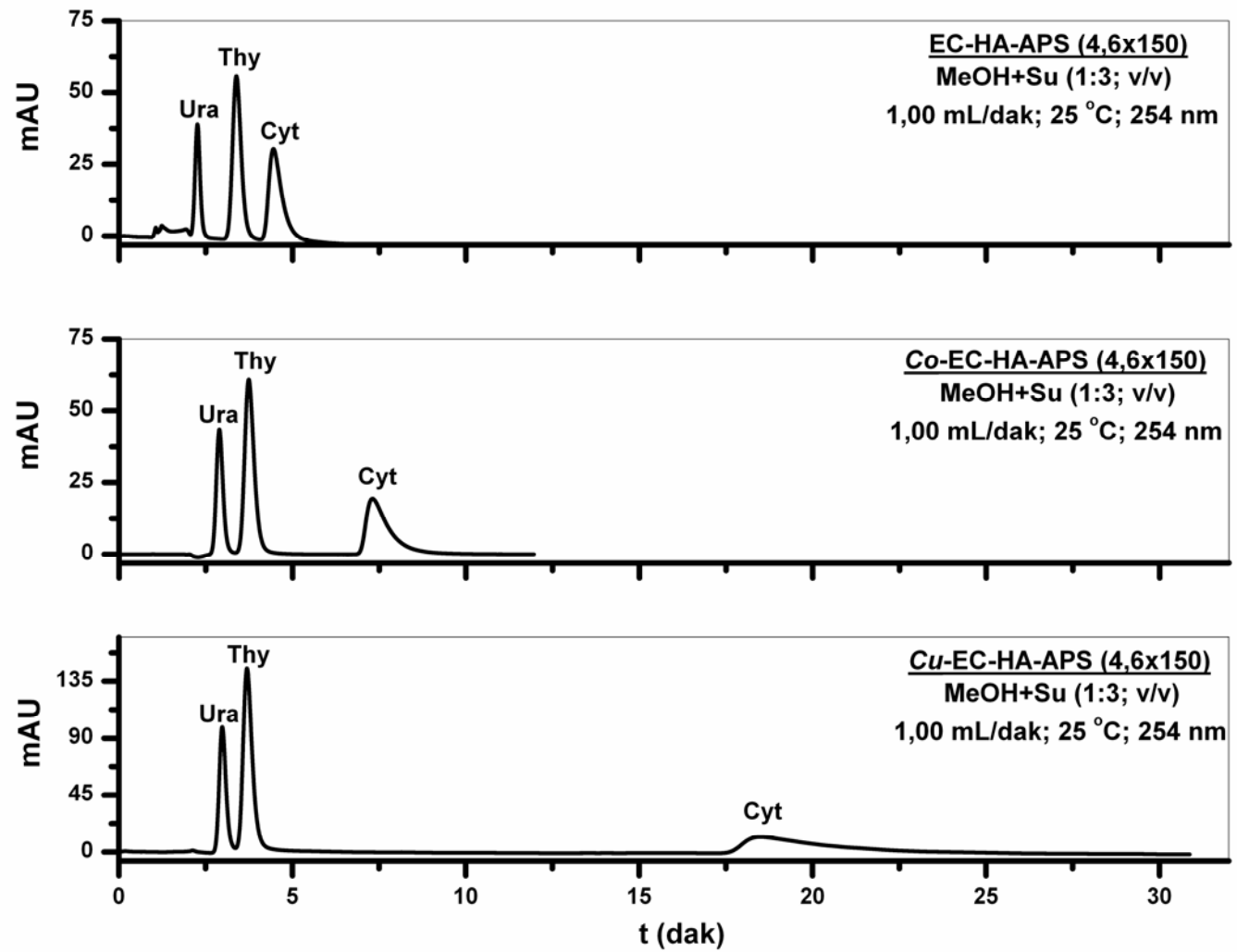
Metal iyonu yüklenmiş EC-HA-APS'nin (*M*-EC-HA-APS) EC-HA-APS'ye göre çalışılan türlere karşı daha yüksek seçicilik ve kapasite sergilediği görülmüştür. Bu durum; EC-HA-APS'ye yüklenen metal iyonlarının etkisiyle sabit fazın ligand

değiştirici bir karakter kazanması ile ilişkilendirilmiştir. Türlerin EC-HA-APS, *Cu*-EC-HA-APS ve *Co*-EC-HA-APS üzerindeki elüsyon-sıralamasının birbirine benzediği; fakat *M*-EC-HA-APS üzerinde Guo'nun Ado'dan sonra elue olduğu görülmüştür (Şekil 4.75). Elde edilen veriler; sabit faza metal iyonu yükleme işleminin kromatografik ayırmaların verimliliğini belirgin bir şekilde arttırdığını ve metal türüne bağlı olarak kapasite ve seçicilikte farklılaşmaların meydana geldiğini göstermiştir (Şekil 4.75 ve Şekil 4.76).



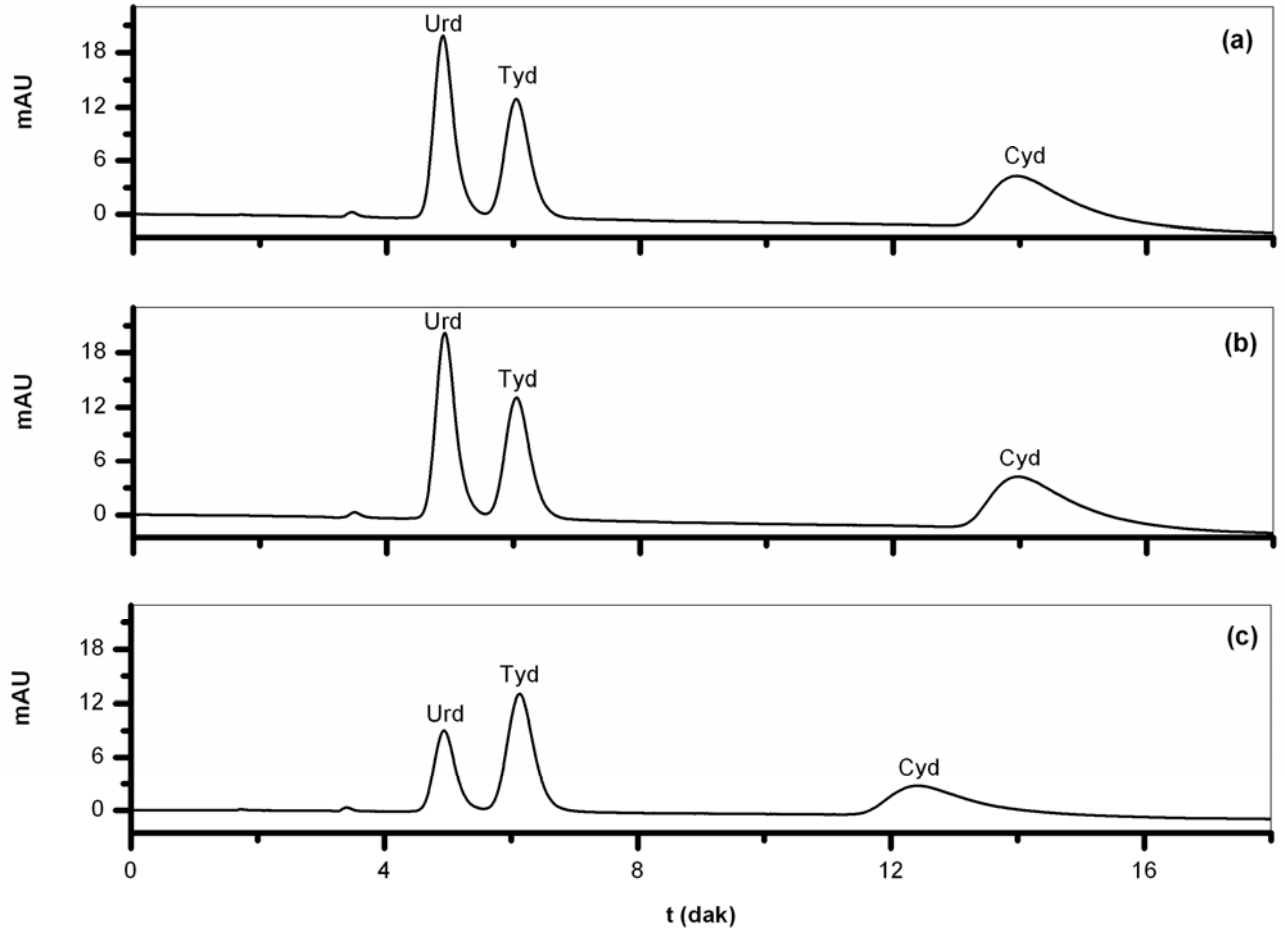
Şekil 4.75. Bazı nükleositler için EC-HA-APS, *Cu*-EC-HA-APS ve *Co*-EC-HA-APS sabit fazları üzerinde aynı şartlarda kaydedilen kromatogramların karşılaştırmalı olarak gösterimi

Enjeksiyon hacmi: 2 µL; diğer deneysel şartlar şekil üzerinde belirtilmiştir.



Şekil 4.76. Bazı nükleobazlar için EC-HA-APS, *Cu*-EC-HA-APS ve *Co*-EC-HA-APS üzerinde aynı şartlarda kaydedilen kromatogramların karşılaştırmalı olarak gösterimi
Enjeksiyon hacmi: 2 µL; diğer deneysel şartlar şekil üzerinde belirtilmiştir

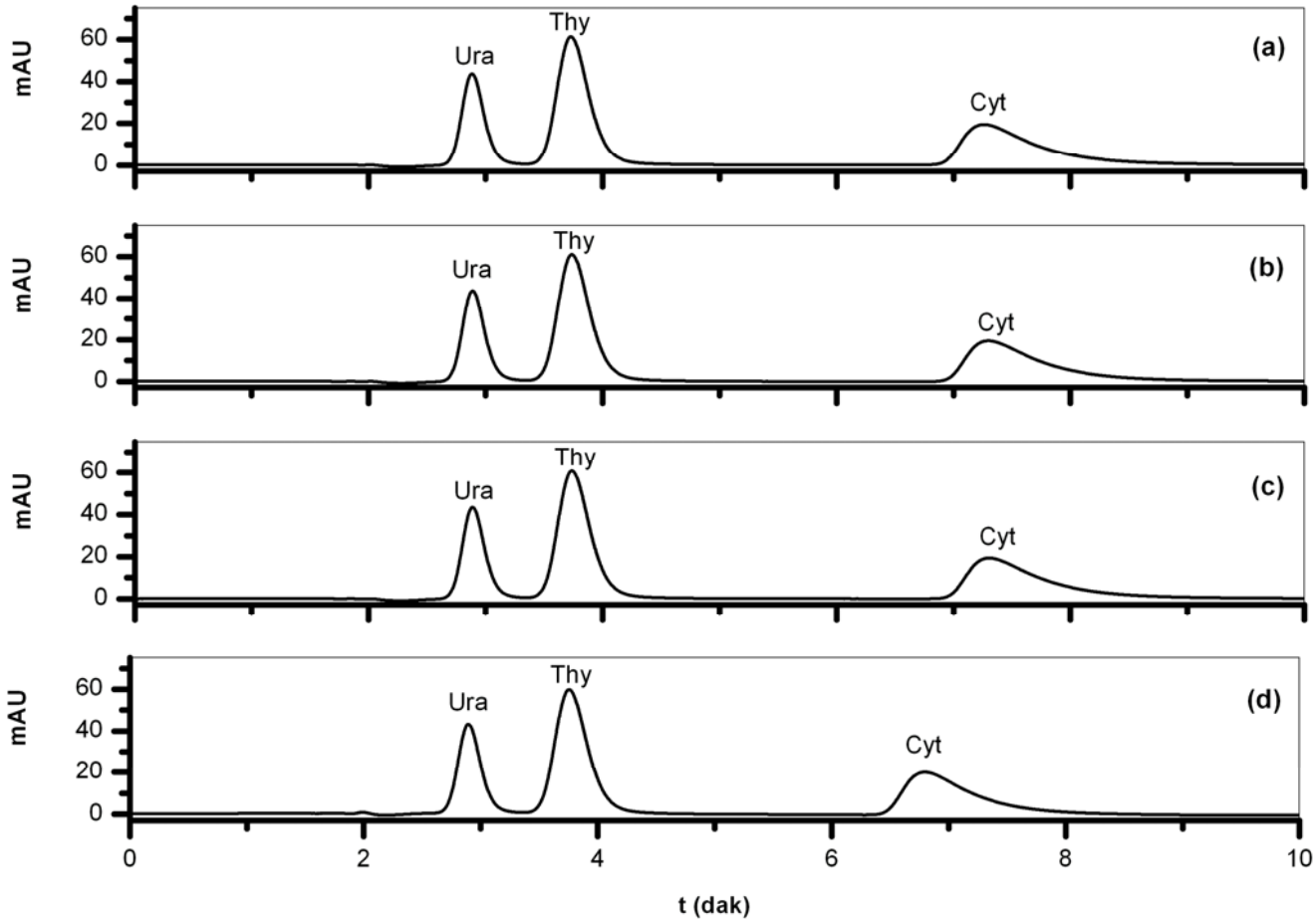
EC-HA-APS'ye metal iyonu yükleme aşamasında, basamaklı yüklemenin kromatogramlar üzerindeki etkisini değerlendirmek amacıyla yürütülen analizlerden elde edilen kromatogramlar Şekil 4.77'de verilmiştir. Şekilden; Cu(II) iyonunun sabit faza ardıl iki basamaklı yükleme işlemiyle yüklenmesinden sonra yürütülen analizlerden elde edilen kromatogramlardaki tekrarlanabilirliğin yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Yükleme ve kromatografik analizlerden sonra sıyırma işleminin de yapıldığı düşünülürse; hem metal yükleme hem de sıyırma işlemlerindeki tekrarlanabilirliğin yüksek olduğu ve bunun kromatografik ayırmalardaki tekrarlanabilirliğe yansıdığı söylenebilir. Diğer taraftan; Cu(II) iyonunun kolona 0,10 M'lık çözeltisi halinde yüklenmesinden sonra kaydedilen kromatogramda, Cyd türünün alıkonma süresinde bir düşüş gözlenmiştir. Bu durum; basamaklı yüklemeyle ligand değiştirici şekle dönüştürülen sabit fazın daha yüksek miktarda metal iyonu bağlaması ve bunun da sabit fazın ligand değiştirme kapasitesini arttırmış olmasıyla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Cyd'nin (Urd ve Tyd'ye göre) ligand değiştirici şekle dönüştürülen sabit fazla daha yüksek düzeyde etkileşmeye girmiş olması nedeniyle, belirtilen etki Cyd'de daha belirgin bir şekilde gözlenmiştir. Benzer sonuçlar *Co*-EC-HA-APS üzerinde yürütülen analizlerde de gözlenmiş olup, kaydedilen kromatogramlar Şekil 4.78'de verilmiştir. Bazı nükleobazların kullanıldığı bu analizlerden, metal yükleme işleminin şeklinden en çok etkilenen türün Cyt olduğu görülmüştür. Ayrıca; basamaklı yükleme işleminin Ade, Ado, Gua ve Guo türlerinin alıkonma süreleri üzerinde daha yüksek düzeyde bir etkiye sahip olacağı da dikkate alınmalıdır. Sonuç olarak; sabit faza basamaklı bir şekilde metal iyonu yükleme işleminin tek basamakta yapılan yüklemelere göre daha verimli olduğu görülmüş olup; basamaklı yüklemelerden sonra sabit fazın *Cu*-EC-HA-APS ve *Co*-EC-HA-APS şekilleri üzerinde türler için alıkonma sürelerindeki standart sapma düzeyinin $\leq$0,03 olduğu gözlenmiştir. Bu durum; sabit faz ile LEC şartlarında da yüksek düzeyde tekrarlanabilirliğin elde edilebildiğini göstermektedir. Kullanılan metal iyonu çözeltisinin sabit faza her gün basamaklı bir şekilde yüklenmesiyle, LEC şartlarında yürütülen analizlerden yüksek düzeyde verim alındığı görülmüştür.



Şekil 4.77. Sabit faza Cu(II) iyonu yükleme işleminde izlenen yöntemin kromatografik ayırmalar üzerindeki etkisi

(a) ve (b) Basamaklı bir şekilde iki farklı Cu(II) yüklemesinden sonra; (c) Tek basamakta 0,10 M Cu(II) yükleme işleminden sonra kaydedilen kromatogramlar

Hareketli faz: MeOH-Su (1:3; v/v); Akış hızı: 0,50-1,25 mL/dak (0-15 dak); Sıcaklık: 25 ^{o}C; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Kolon: *Cu*-EC-HA-APS (4,6x150); Enjeksiyon hacmi: 2 µL



Şekil 4.78. Sabit faza Co(II) yükleme işleminde izlenen yöntemin kromatografik ayırmalar üzerindeki etkisi

(a), (b) ve (c) Basamaklı bir şekilde üç farklı Co(II) yüklemesinden sonra; (d) Tek basamakta 0,10 M Co(II) yükleme işleminden sonra kaydedilen kromatogramlar

Hareketli faz: MeOH-Su (1:3; v/v); Akış hızı: 1,00 mL/dak; Sıcaklık: 25 ^{o}C; Deteksiyon dalga boyu: 254 nm; Kolon: *Co*-EC-HA-APS (4,6x150); Enjeksiyon hacmi 2 µL

EC-HA-APS ile ligand-değiştirme şartlarında yürütülen analizler, kolona farklı metal iyonları yükleyerek kolonun kapasitesinde ve seçiciliğinde önemli değişikliklerin kolayca yapılabileceğini göstermiştir. EC-HA-APS'nin sergilediği bu özelliğin, farklı kimyasal özelliklere sahip türler için kolona uygun bir metal iyonu yüklenerek aynı kolon üzerinde çeşitli kromatografik tasarımların yapılabilmesini mümkün kılabileceği düşünülmektedir. Yani; kromatografik ayrılmaların kapasite faktörü ve seçicilik faktörü temelindeki optimizasyonunda, aynı kolon üzerinde sabit faza farklı metal iyonları yüklenerek sabit fazın özelliklerinin kolayca değiştirilebileceğini ve bunun da türlerin kromatografik ayrılmalarının optimizasyonunda faydalı olacağı görülmüştür. Yüklenen metal iyonlarının 0,1 F Na_2H_2Y+0,1 F NH_3 (pH=7,5) karışımı ile yüksek verimle sıyrılabilmesi, aynı kolon üzerinde farklı kromatografik modlar arasında kolayca geçiş yapabilmeyi de olası kılmaktadır.

4.4. Akış Enjeksiyon-Kromatografik Analizler

Çalışılan türlerin EC-HA-APS ve *M*-EC-HA-APS üzerindeki elüsyon özellikleri hakkında fikir edinmek amacıyla akış enjeksiyon analizleri yürütülmüştür. Bu amaçla; çalışılan her bir türün bilinen konsantrasyonlardaki çözeltileri önce kromatografik kolona, sonra da akış enjeksiyon tekniğiyle doğrudan detektöre gönderilmiştir. Bu analizlerden kısa sürede sonuç alabilmek amacıyla, türlerin sabit faz üzerinden RPLC, HILIC ve LEC şartlarında kolayca elue edilebildiği %40 Su-%60 MeOH (v/v) hareketli faz sistemi seçilmiştir. FIA ve HPLC analizlerinden kaydedilen piklerin alanları arasındaki oranlar Tablo 4.19'da verilmiş olup; türlerin tümü için pik alanlarının çalışılan her üç HPLC modunda da %95'in üzerinde birbiriyle örtüştüğü görülmüştür. Böylece; türlerin sabit faza tersinmez bir şekilde tutunmasıyla ilgili herhangi bir bulguya rastlanmamış ve sabit fazın her üç HPLC modunda yürütülecek işlemler için uygun bir karakter sergilediği anlaşılmıştır. Diğer taraftan; çalışılan deneysel şartlarda, Ade ve Gua'nın *Cu*-EC-HA-APS üzerinde 90 dakikalık bir süre zarfında elue olmadığı görülmüş ve bu nedenle söz konusu türler için ilgili veriler sunulamamıştır.

Tablo 4.19. HPLC ve FIA teknikleriyle kaydedilen pik alanlarının karşılaştırılması [a]

Sabit Faz ↓	**Pik Alanlarının Oranı (HPLC/FIA)**									
	Ura	**Thy**	**Cyt**	**Ade**	**Gua**	**Urd**	**Tyd**	**Cyd**	**Ado**	**Guo**
EC-HA-APS	0,95	1,01	1,06	1,18	1,25	0,99	1,02	1,10	1,03	1,01
***Cu*-EC-HA-APS**	0,96	0,98	1,02	- [b]	- [b]	1,10	1,05	1,05	0,99	0,98
***Co*-EC-HA-APS**	0,95	1,13	0,96	0,95	0,95	1,15	1,10	1,12	0,96	0,95

[a] Deneysel şartlar: Hareketli faz: MeOH-Su (3:2; v/v); Akış hızı: 1,00 mL/dak; Sıcaklık: 25 ^{o}C; Deteksiyon: 254 nm; Kolon: 4,6x150 mm ölçülerinde

[b] Belirtilen deneysel şartlarda, 90 dakika süreyle elue edilememiştir

5. TARTIŞMA

5.1. EC-HA-APS'nin Literatürdeki Bazı Sabit Fazlarla Karşılaştırılması

C18 ve kaliks[8] aren bağlı silika esaslı sabit fazlar üzerinde nükleosit ve nükleobazların RPLC şartlarındaki kromatografik davranışlarını inceleneyen Li ve ark. (2004), hareketli fazdaki MeOH yüzdesi arttırıldıkça türlerin daha hızlı bir şekilde elue olabildiğini belirtmiştir. Hareketli fazda MeOH-NaH_2PO_4 (0,01 F; pH=3,5) (1:9; v/v) kullanıldığında, nükleositlerin kaliks[8] aren bağlı silika esaslı sabit faz üzerindeki *k'* değerlerinin Cyd<Urd<Guo<Tyd<Ado sırasında arttığı görülmüş olup, bu sıranın EC-HA-APS üzerinde MeOH–NH_3 (0,1 F, pH=3,5) (1:99; v/v) şartlarında elde edilen sıradan (Urd<Tyd~Cyd<Guo<Ado) önemli şekilde farklı olduğu görülmüştür. Kaliks[8] aren bağlı sabit faz üzerinde Cyd'nin hızlı bir şekilde elue olması, protonlanabilen amin gruplarının etkisiyle Cyd'nin su bakımından zengin hareketli fazda çözünürlüğünün artmasıyla ilişkilendirilmiştir (Li ve ark., 2004). EC-HA-APS sabit fazı üzerinde bu türün üçüncü elue olan tür olması, EC-HA-APS ile Cyd arasında sadece hidrofobik etkileşmelerin değil, aynı zamanda başka tür etkileşmelerin de rol alabildiğini göstermektedir. Yukarıda adı geçen çalışmada (Li ve ark. 2004); 4,6x150 mm'lik ebatta kolon (ve 5 μm'lik parçacık boyutuna sahip sabit fazlar; kaliks aren ve C18) kullanılarak sodyum dihidrojenfosfat (0,01 M; pH=3.5) ve metanol karışımıyla türleri birbirinden başarılı bir şekilde ayırabilmiştir. 4,6x100 mm'lik ebatta kolona doldurulan EC-HA-APS ile MeOH-Su karışımı kullanılarak elde edilen ayırmaların (Şekil 4.28), kaliks aren ve C18 üzerinde elde edilenlerle kıyaslanabilir düzeyde olduğu görülmüştür. Adı geçen çalışmada (Li ve ark. 2004), C18 üzerinde elde edilen ayırmalarda elde edilen elüsyon sıralamasının EC-HA-APS üzerinde elde edilenlerden farklı olması, EC-HA-APS üzerinde ayrılmada rol alan mekanizmanın sadece hidrofobik etkileşmeler temelinde olmadığını göstermektedir.

HILIC karakteri sergileyen silika esaslı farklı sabit fazlar üzerinde Ura, Cyt, Ado, Cyd, Guo ve Urd'nin kromatografik ayrılmalarının incelendiği bir çalışmada (Gou ve Gaiki, 2005); aminopropil grubu içeren silika esaslı sabit faz üzerinde Urd, Cyd, Ado ve Guo'nun Ado=Urd<Cyd<Guo sırasında ayrılabildiği belirtilmiştir (hareketli faz: 10 mM amonyum asetat içeren MeCN-Su karışımı, 85:15 (v/v); 30 ^{o}C; 1,5 mL/dak). Aynı çalışmada, farklı fonksiyonel gruplar içeren silika esaslı farklı HILIC sabit fazlarıyla da benzer bir elüsyon sıralamasının elde edildiği görülmektedir. Bu ayırmalarda kullanılan

sabit fazlar üzerinde Ado ve Urd'nin elüsyon sıralamaları kullanılan sabit fazlara göre değişiklik göstermiştir. Örneğin; *aminopropil* (YMC-Pack NH_2; 5 µm; 4,6x250) ve alifatik bir karbon zinciriyle *karbamoil* (carbamoyl) gruplarının bağlandığı (TSKgel Amide-805 µm; 4,6x250) silika esaslı HILIC sabit fazları üzerinde yukarıda belirtilen şartlarda Ado ve Urd birbirinden ayrılamamış; HILIC karakterine sahip silika (HILIC Silica; normal faz şartlarında kullanılan silikadan farklı) ve sülfobetain grubunun silikaya kovalent bağlarla bağlanmış olduğu zwitter-iyonik karaktere sahip ZIC-HILIC (5 µm; 4,6x250) sabit fazlarıyla belirtilen dört nükleosit birbirinden ayrılabilmiş, fakat her iki sabit fazda Urd ve Ado'nun elüsyon sıralaması değişmiştir. Ticari olarak temin edilebilen bu sabit fazlar üzerinde nükleositler için elde edilen ayrımalar, HILIC şartlarında (MeCN-NH_3; 90:10, v/v; 25 ^oC; 0,5 mL/dak) EC-HA-APS (15-35 µm; 4,6x100) ile pH=3,0; 5,0 ve 6,0'da elde edilen ayırmalarla (Bkz. Şekil 4.36, Şekil 4.37 ve Şekil 4.38) kıyaslandığında (parçacık ebadı daha büyük ve kolon uzunluğu daha küçük olmasına rağmen) EC-HA-APS ile HILIC şartlarında elde edilen ayrımaların çok daha başarılı olduğunu söylemek mümkündür. Ayrıca; bu şartlarda, sıcaklık arttırıldığında, herhangi bir gradyente gerek kalmadan, resolüsyon değerlerinin iyileştirilebildiği de görülmüştür. EC-HA-APS üzerinde hareketli fazda herhangi bir tampon kullanmadan da beş nükleositin birbirinden başarılı bir şekilde ayrılabildiği görülmüştür (Şekil 4.29). Türlerin, hareketli fazda tampon kullanmadan birbirinden ayrılabilmesi, kütle spektrometresi ile yapılabilecek tayinlerde büyük avantaj sağlayacaktır. Ticari olarak temin edilebilen kolonlarla elde edilen elüsyon-sırasının EC-HA-APS üzerinde elde edilenlerle benzerlik göstermesi, ayrımaların, HILIC şartları için daha önce bahsedilen mekanizmaya dayandığını destekler nitelikte olup, ayırmaların sabit fazın türünden ziyade, su bakımından zengin bir ara yüzey ile hareketli faz arasındaki dağılma esasına dayandığını göstermektedir.

Yukarıda belirtilen sabit fazlarla karşılaştırıldığında; immobilize hümik asit esaslı sabit fazın üstün özelliklere sahip olduğu söylenebilir. Adı geçen çalışmalarda kullanılan sabit fazlar tek bir HPLC modunda kullanılmışken; immobilize hümik asit esaslı sabit faz üç farklı HPLC modunda başarılı bir şekilde kullanılabilmiştir.

5.2. EC-HA-APS'nin Farklı HPLC Modlarında Kullanılabilirliği

RPLC şartlarında hareketli faz olarak MeCN–Su sisteminin kullanıldığı (MeCN oranı %1-10 (v/v) aralığında tutulduğu) şartlarda nükleosit ve nükleobazlar için elüsyon-sırasının Urd<Tyd<Cyd<Guo<Ado ve Ura<Thy<Cyt<Gua<Ade şeklinde olduğu; HILIC şartlarında (MeCN–Su; MeCN: %80-90, v/v) ise Tyd<Urd<Ado<Cyd<Guo ve Thy~Ura<Ade<Cyt<Gua sırasında değiştiği gözlenmiştir. RPLC ve HILIC şartlarında EC-HA-APS üzerinde gözlenen sıralamalar incelendiğinde, her iki kromatografik moddaki elüsyon sıralamalarının birbirinden farklı olduğu görülebilir: Örneğin; RPLC modunda en son elue olan Ado, HILIC modunda üçüncü sırada elue olmuştur. Bu nedenle; EC-HA-APS'nin nükleosit ve nükleobazlara karşı hem RPLC hem de HILIC karakteri sergileyebilen bir sabit faz olduğu düşünülmüştür. Ayrıca; metal iyonu yüklendikten sonra bazı türlerin *k'* değerlerinde önemli farklılaşmaların gözlenmiş olması, LEC sabit fazı karakteri sergilediğini de düşündürmüştür.

Günümüzde özellikle proteomiks çalışmalarında yüzlerce (hatta binlerce) protein içeren çok karmaşık numunelerle karşılaşılmaktadır. Sıvı kromatografisindeki yeniliklere rağmen, bu tür kompleks numunelerdeki proteinleri tek bir analizle birbirinden ayırmak ve tayin etmek oldukça zordur. Bu nedenle, kimyasal türlerin aynı kromatografik kolon üzerinde farklı kromatografik modlarda ayrılmasının esas alındığı iki boyutlu sıvı kromatografisi (2D-LC) araştırmacıların ilgisini çekmektedir.

2D-LC ayırmalarında genellikle uygun gradyent programları uygulanarak kolonun pik kapasitesi arttırılmaya çalışılır. Pik kapasitesi (*P*), belirlenen bir gradyent süresinde birbirinden teorik olarak ayrılan maksimum pik sayısı olarak ifade edilir. 2D-LC ayrımalarında pik kapasitesi tek boyutlu kromatografi (1D-LC) şartlarında elde edilenden daha yüksektir. Örneğin; "A" kromatografik modunda 50 dakikalık bir analiz için pik kapasitesi 50, "B" modu için de 100 olsun. A ve B modlarının birleştirilmesiyle yürütülecek bir 2D-LC analizinde pik kapasitesi teorik olarak 50x100=5000 olacaktır. A ve B modları arasında, "ortogonallik" olarak ifade edilen nicelik ne kadar yüksek ise 2D-LC şartlarında pratikte elde edilen pik kapasitesi teorik değere o kadar yakın olacaktır.

Ortogonalliğin kantitatif olarak değerlendirilebilmesi için önerilen "geometrik yaklaşım", analiz edilen türler için alıkonma sürelerinin, $t_{R,i}$, normalize alıkonma süreleri, $t_{R,i(norm)}$, cinsinden aşağıdaki eşitlikle ifade edilmesini kapsar:

$$t_{R,i(norm)} = \frac{t_{R,i} - t_{R,\min}}{t_{R,\max} - t_{R,\min}}$$

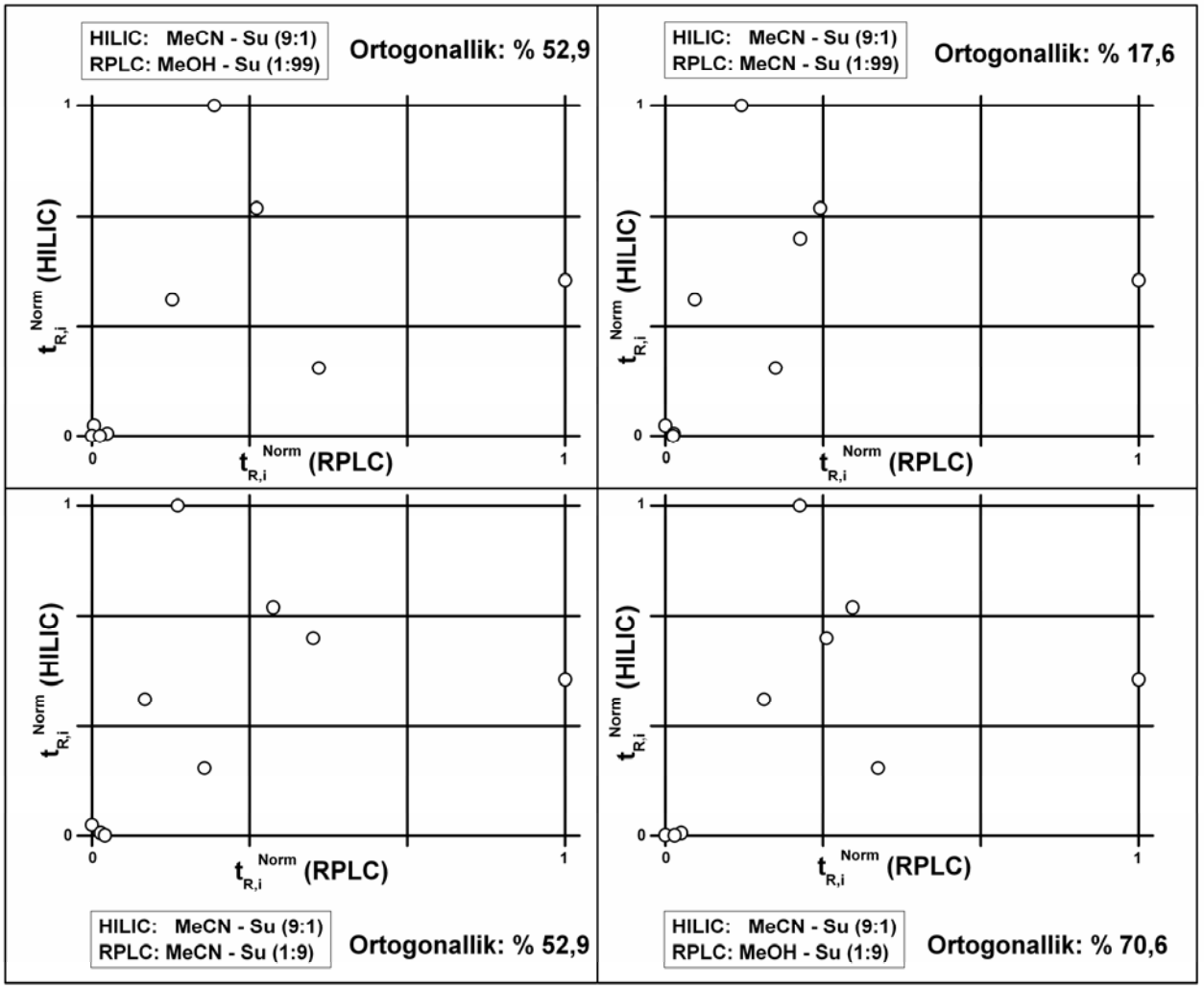
Burada; $t_{R,min}$ ve $t_{R,max}$ sırasıyla ilk ve son elue olan pikler için alıkonma sürelerini göstermektedir. Böylece; herhangi bir *i* türü için alıkonma süresi, $t_{R,i}$, normalize alıkonma süresi cinsinden ifade edilebilir. 0 ile 1 arasında değerler alabilen $t_{R,i(norm)}$, farklı kromatografi modlarında elde edilen kromatografik verilerin karşılaştırılabilmesine ve bu modlar arasındaki ortogonalliğin kantitatif olarak belirlenebilmesine olanak tanır. Bunun için; çalışılan iki kromatografi modu için hesaplanan $t_{R,i(norm)}$ değerleri, incelenen analit sayısına eşit sayıda "kare" içeren iki boyutlu bir yüzeyde karşılıklı olarak grafiğe geçirilir. Bu yüzeyde, noktalar (pikler) tarafından işgal edilen kare sayısının toplam "kare" sayısına oranı ortogonallikle ilişkilendirilir. Örneğin; 10x10=100 kare içeren bir yüzeyde 10 kare noktalar tarafından işgal edilmişse ortogonalliğin "%0" (ortogonallik yoktur); 63 kare işgal edilmişse ortogonalliğin "%100" olduğu kabul edilir. Yani ortogonallik %0–100 aralığında değişebilmektedir. Bu yaklaşım, ortogonalliğin görsel olarak değerlendirilebilmesi noktasında pratik öneme sahip olmakla birlikte, ortogonalliğin kantitatif olarak ifade edilebilmesi için uygun matematiksel yaklaşımlara ihtiyaç duyulmuştur. Bu amaçla, Gilar ve ark. (2005; 2008) ortogonalliğin kantitatif olarak (%*O*) hesaplanması için aşağıdaki ifadeyi önermiştir:

$$\%O = \frac{\sum kare - \sqrt{P_{\max}}}{0.63 \times P_{\max}}$$

Burada; $\sum kare$, pikler (veri noktaları) tarafından işgal edilmiş kare sayısını ve $\sqrt{P_{max}}$, yüzeydeki toplam kare sayısını karekökünü göstermektedir.

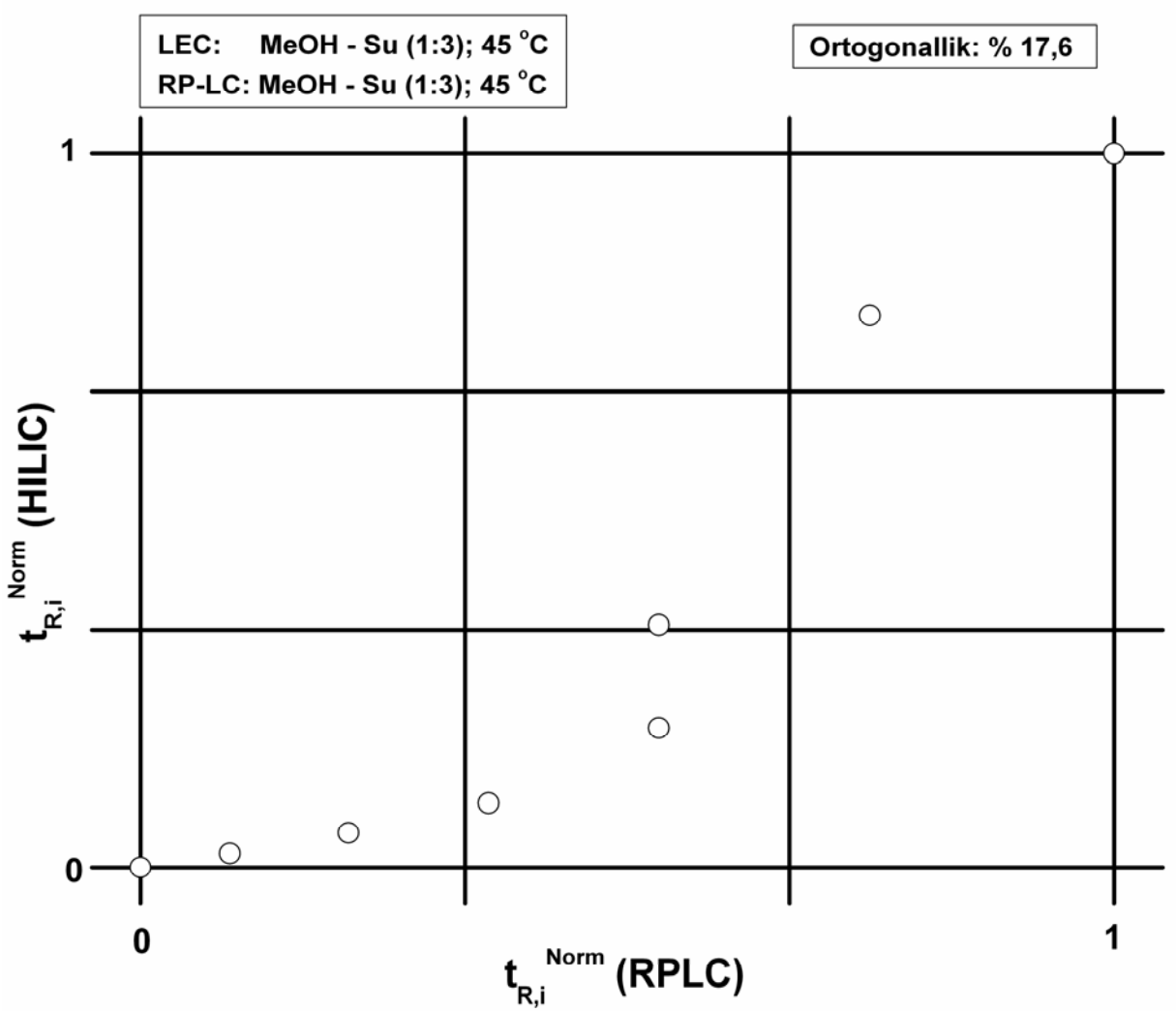
EC-HA-APS'nin RPLC ve HILIC modlarının her ikisi için de kullanılabilirliğini değerlendirmek amacıyla yukarıda izah edilen geometrik yaklaşım temelinde bazı değerlendirmeler yapılmıştır. Bu değerlendirmelerdeki en büyük kısıtlama; çalışılan analit sayısının yeterince fazla olmamasıydı; ortogonalliğin geometrik yaklaşım temelinde değerlendirilmesinde analit sayısının fazla olması arzu edilen bir durum olup, ortogonalliğin makul bir şekilde hesaplanmasına olanak tanır. Fakat bu çalışmada; aynı bileşiğe ait farklı iki kromatografi modunda elde edilen piklere karşılık gelen normalize edilmiş alıkonma sürelerinin grafiğe geçirilmesi kaydıyla ortogonalliğin az sayıda analit

için de makul bir şekilde hesaplanabileceğini düşünülmüştür. Diğer taraftan; incelenen analit sayısının 9'dan daha az olmasının uygun olmadığı düşünülmektedir. Bu kısıtlamalardan ötürü, ortogonalliğin geometrik yaklaşım temelinde değerlendirilebilmesi için literatürde önerilen yaklaşımdan farklı bir yaklaşım izlenmiştir. Yukarıda da belirtildiği gibi; literatürde önerilen yöntemde, incelenen tüm analitleri içeren numuneler her iki kromatografi modunda ayrılır ve alıkonma sürelerinden normalize edilmiş alıkonma süreleri hesaplanır. Bu değerlerden de % ortogonallik hesaplanır. Bu çalışmada izlenen yöntemde ise; incelenen 9 bileşik için tek bileşenli numunelerin analiziyle elde edilen alıkonma süreleri temel alınmıştır. RPLC ve HILIC modlarında, 9 bileşiğin birbirinden tamamen veya kısmen ayrılabileceği deneysel şartlar için % ortogonallik ayrı ayrı hesaplanmış ve elde edilen değerlerin ortalaması % ortogonallik olarak değerlendirilmiştir. Hesaplamalarda, HILIC şartları için %90 MeCN sabit tutulmuş ve RPLC şartlarında kullanılan farklı hareketli faz bileşimlerinde elde edilen verilere karşı grafiğe geçirilmiştir. Çeşitli şartlar için verilerin iki boyutlu bir yüzeydeki dağılımları Şekil 5.1'de verilmiştir. Yapılan hesaplamalardan, nükleosit ve nükleobazların EC-HA-APS üzerindeki kromatografik ayırmalarında RPLC ve HILIC modları arasında ortalama %48,5'lik bir ortogonalliğin olduğu görülmüştür. Elde edilen bu değerin, literatürde RPLC ve HILIC modları arasındaki ortogonallik için verilen değerlerle kıyaslandığında biraz düşük olduğu söylenebilir. Fakat; literatürde verilen değerlerin genellikle büyük moleküler yapıya sahip türler (ör. proteinler) için hesaplanmış olduğu göz önünde bulundurulursa, EC-HA-APS'nin nükleosit ve nükleobazların her iki kromatografik modda ayrılması için makul bir ortogonallik sergilediği söylenebilir. Nitekim; küçük moleküler yapıya sahip nükleosit ve nükleobazlar için hesaplanan %48,5'lik bir değerin, daha büyük moleküler yapıya sahip türler için daha yüksek olabileceği kanısındayız.



Şekil 5.1. RPLC ve HILIC modları için normalize edilmiş alıkonma süreleri ve farklı durumlar için hesaplanan ortogonallik düzeyleri

RPLC ve LEC modları arasındaki ortogonalliği değerlendirmek amacıyla yürütülen denemelerden elde edilen veriler Şekil 5.2'de verilmiştir. Bu iki mod arasındaki ortogonalliği değerlendirmek için birden fazla şartta elde edilen veriler temelinde bir değerlendirmeye gidilmeyip, hesaplamalar her iki modda çok bileşenli numunelerle kaydedilen kromatogramlar temelinde yapılmıştır. Sonuçlar; RPLC ve LEC modları arasında yaklaşık %18'lik bir ortogonalliğin olduğunu göstermiştir. Hesaplanan bu değer, RPLC ve HILIC modları için hesaplanan ortogonallikten daha düşük olup, literatürdeki veriler de RPLC ve HILIC modları arasındaki ortogonalliğin genellikle daha yüksek olduğunu göstermektedir (Gilar ve ark., 2005; 2008). Diğer taraftan; metal iyonlarıyla daha yüksek düzeyde kompleksleşme özelliğine sahip türlerle çalışılması durumunda, daha yüksek düzeyde ortogonalliğin elde edilebileceği düşünülmektedir.



Şekil 5.2. RPLC ve LEC modları için normalize edilmiş alıkonma süreleri ve hesaplanan ortogonallik düzeyi

5.3. Sabit Faz Olarak EC-HA-APS'nin Gözlenen Diğer Bazı Üstün Özellikleri

HPLC'de sabit faz olarak kullanılacak materyallerin türlere karşı seçicilik sergilemesinin yanı sıra, kromatografik işlemlerin uygulanabilirliğini kolaylaştırabilecek bazı fizikokimyasal özelliklere sahip olması da arzu edilir.

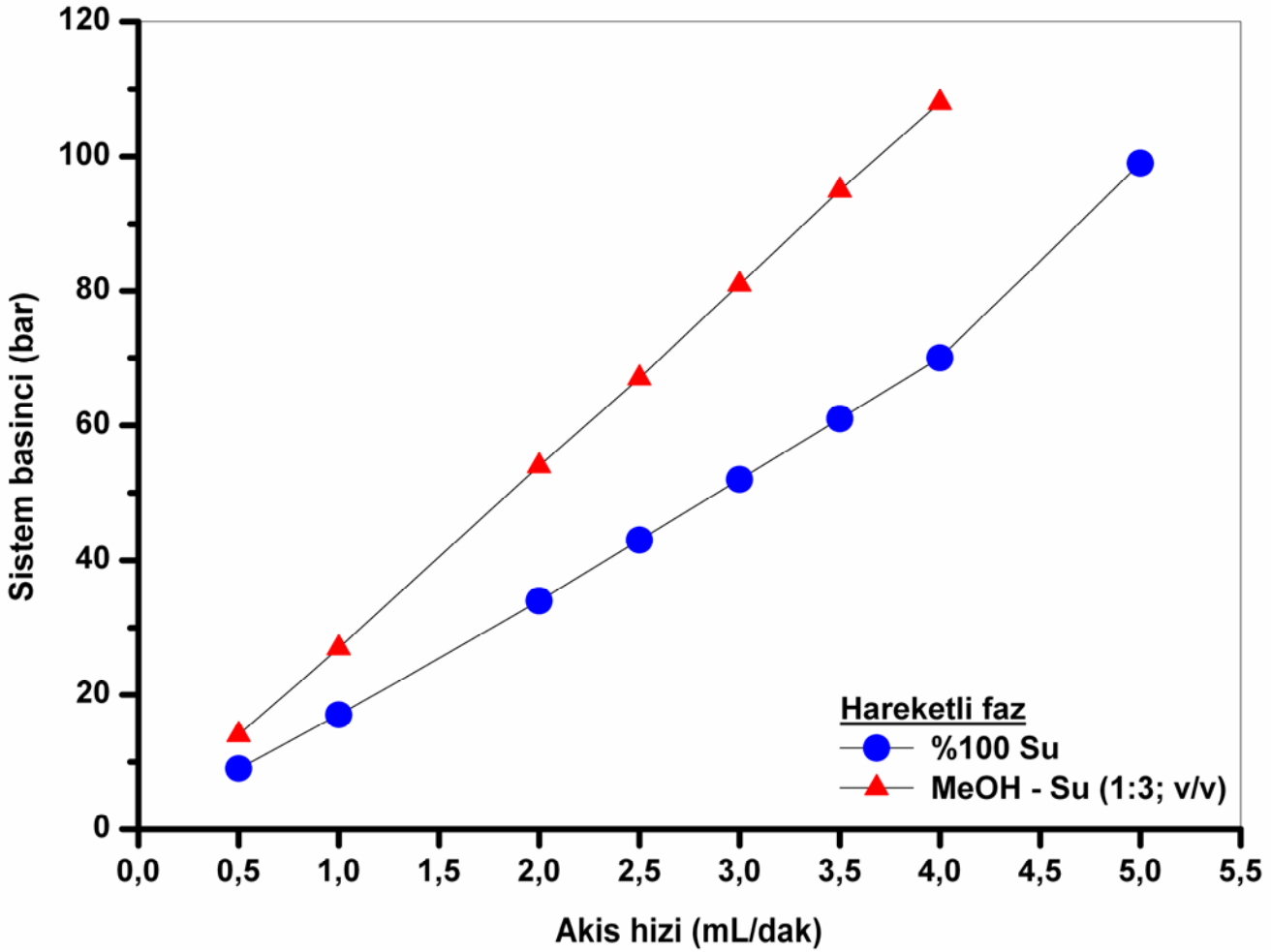
Sistem basıncı; sabit faz ile doldurulmuş bir kolondan hareketli faz geçirilirken sistemin akışa karşı gösterdiği direncin bir ölçüsüdür. Sistem basıncı; HPLC sisteminde kullanılan ekipmanlara, kromatografik kolonun ebadına, sabit fazın fizikokimyasal özelliklerine ve kullanılan hareketli fazın cinsine bağlı olarak değişir. HPLC ile yürütülen analizlerde sistem basıncının düşük olması arzu edilen bir durumdur. Çünkü; uzun süre yüksek basınç altında çalıştırılan HPLC sistemlerindeki bazı ekipmanlar yüksek basıncın etkisiyle aşınmaya uğramakta ve kısa süre içerisinde işlev göremez hale gelebilmektedir. Ayrıca; günümüzde HPLC analizlerinin, küçük parçacık ebadına sahip sabit fazlar kullanılarak yürütülmesine yönelik bir eğilim söz konusudur. Yeni bir teknik olan UFLC (*ultra fast liquid chromatography)* sistemlerinde birkaç mikrometrelik partikül büyüklüğüne sahip sabit fazlar kullanılmakta olup, partikül ebadının daha da düşürülmesi (ve böylece kolon verimliliğinin daha da arttırılabilmesi) yönünde çalışmalar devam etmektedir. Fakat bu noktada gözlenen en büyük kısıtlama; yüksek sistem basıncıdır.

Farklı hareketli faz bileşimlerinde gözlenen sistem basıncını değerlendirmek amacıyla *Co*-EC-HA-APS kullanılarak bazı analizler yürütülmüştür. Denemelerde; önce hareketli faz olarak Su ve MeOH-Su (1:3; v/v) sistemleri kullanılmış ve farklı akış hızlarında sistemde gözlenen basınç kaydedilmiştir (basınç, ilgili kromatografik şartta base-line gözlendikten sonra kaydedilmiştir). Elde edilen veriler Şekil 5.3'te verilmiş olup, 4,6x150 ebadındaki bir kolon kullanılarak 5,00 mL/dak'lık bir akışta bile sistem basıncının çok yüksek olmadığı gözlenmiştir. MeOH-Su (1:3; v/v) hareketli faz sisteminin kullanıldığı durumda ise sistem basıncının biraz daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

İkinci aşamada yürütülen denemelerde ise aynı ebattaki kolondan 2,00 mL/dak'lık bir akış hızında farklı bileşimlere sahip MeOH-Su hareketli faz sistemleri geçirilmiş ve gözlenen sistem basıncı kaydedilmiştir (Şekil 5.4). Şekilden görüldüğü gibi, hareketli faz olarak yalnızca su kullanıldığında sistem geri basıncı 35 bar dolayında olup, hareketli fazdaki MeOH oranı %50'ye doğru arttırıldığında basınçta artış gözlenmektedir. MeOH oranı %50'den daha fazla arttırıldığında ise basıncının

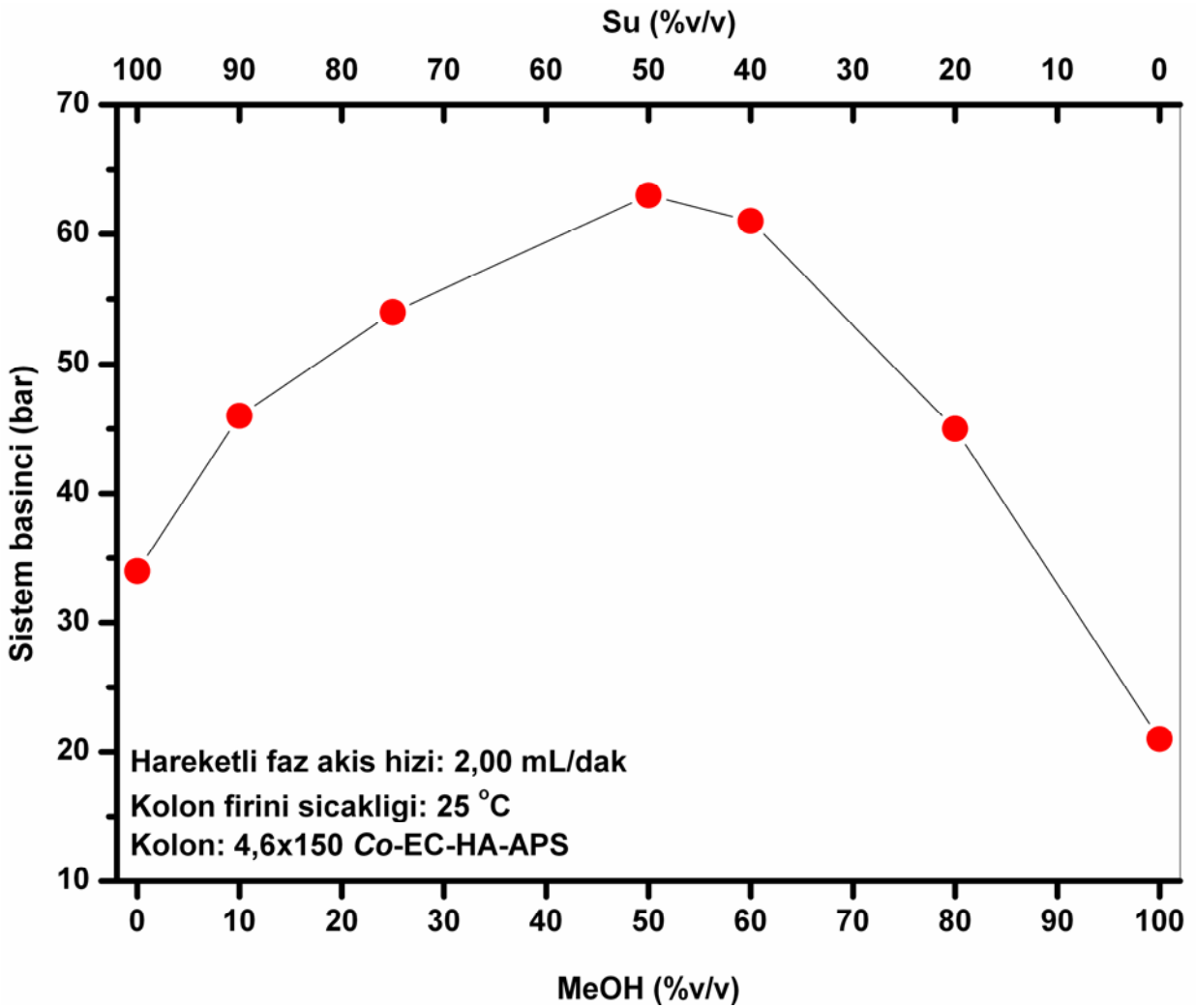
tekrar düşme eğilimine girdiği ve hareketli fazda %100 MeOH kullanıldığında minimum değerine (yaklaşık 18 bar) ulaştığı görülmüştür. Elde edilen bu veriler, EC-HA-APS'nin farklı hareketli faz kombinasyonlarında kullanılmaya elverişli bir sabit faz olduğunu göstermiştir. MeOH-Su (1:1; v/v) hareketli faz sistemi kullanıldığında sistem basıncının (çalışılan şartlarda) gözlenen en yüksek değerine ulaşmasının, MeOH'nın etkisiyle açık bir yapı sergileyen hidrofobik yapıların su moleküllerine karşı sergilediği dirençle ilişkili olduğu düşünülmektedir. MeOH oranı daha da arttırıldığında, hareketli fazdaki su oranındaki azalmanın bir sonucu olarak hidrofobik yapıların su moleküllerine karşı sergilediği düşünülen bu dirençte azalma meydana geldiği ve dolayısıyla sistem basıncının düşme eğilimine girmiş olduğu kanısındayız. MeCN-Su hareketli faz sistemleri kullanıldığında gözlenen basıncın çok daha düşük olduğu da belirtilmelidir. EC-HA-APS ve *Cu*-EC-HA-APS'nin kullanıldığı durumlarda gözlenen sistem basınçlarının yukarıdakilerle hemen hemen benzer olduğu da görülmüştür. Diğer taraftan, 4,6x100 ebadında APS kolon kullanıldığında gözlenen basıncın çok daha yüksek olduğu tespit edilmiştir.

Yüksek akış hızlarında, 4,6x150 mm ebadındaki bir kolon üzerinde gözlenen sistem basıncının çok düşük olması, sabit fazın çok yüksek düzeyde gözenekli bir yapıya sahip olduğunu ve dolayısıyla yüksek akış hızlarında sabit fazın türlerle düşük düzeyde etkileşmeye girebileceğini düşündürmüştür. Yüksek akış hızlarında EC-HA-APS'nin türlere karşı sergilediği kapasite ve seçiciliği test etmek amacıyla, *Co*-EC-HA-APS üzerinde bazı nükleobazlar için kromatografik ayırmalar incelenmiştir. Hareketli faz olarak sadece suyun kullanıldığı bu denemelerde 5,00 mL/dak'lık bir akış hızında bile üç türün birbirinden başarılı bir şekilde ayrılabildiği ve sabit fazın türlere karşı seçicilik sergilediği gözlenmiştir (Şekil 5.5). Dolayısıyla; immobilize hümik asit esaslı sabit fazların UFLC sistemlerinde sabit faz olarak kullanılabilirliğinin incelenmeye değer olduğu kanısındayız.



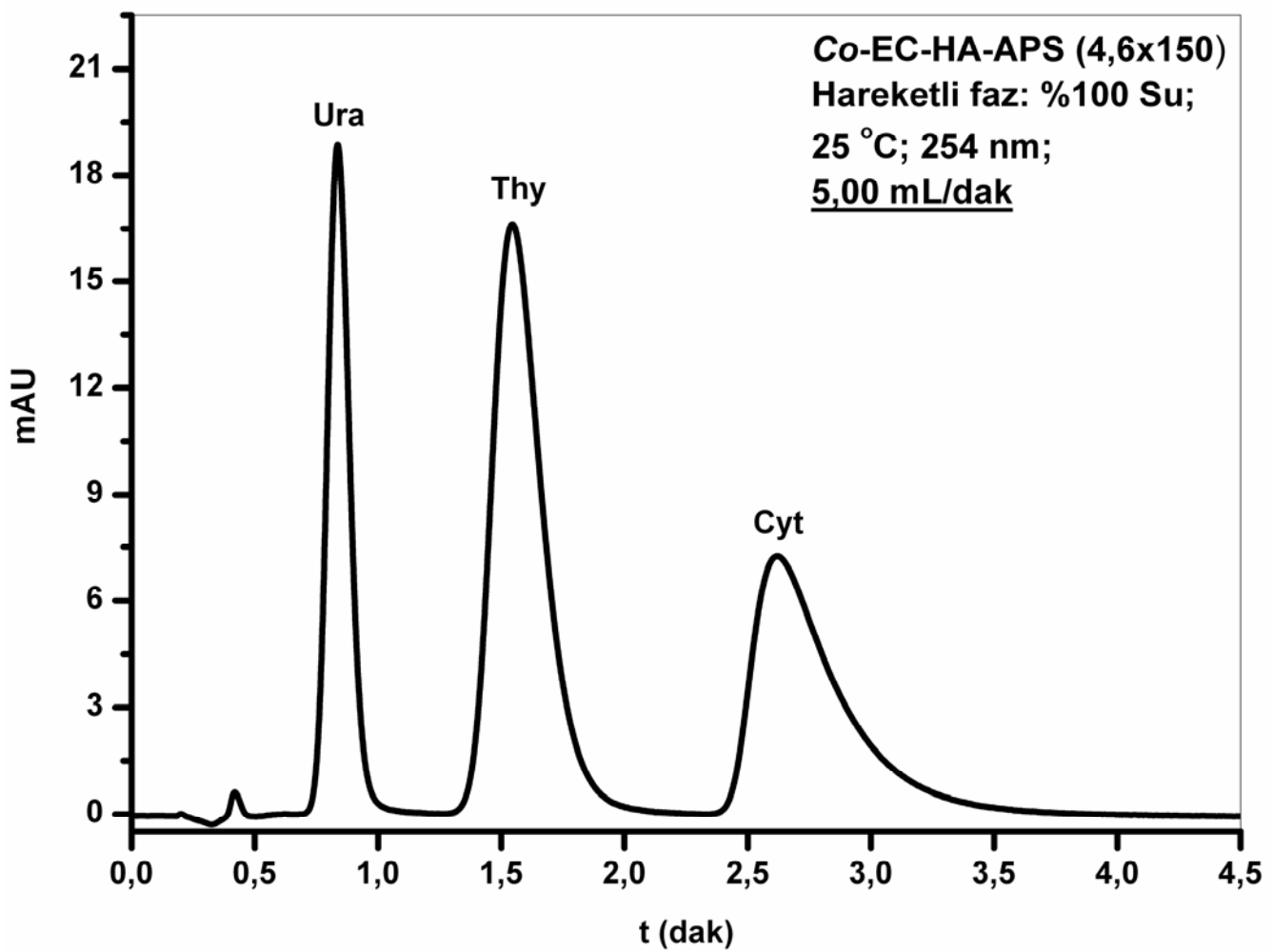
Şekil 5.3. İmmobilize hümik asit esaslı sabit faz üzerinde, çeşitli hareketli faz bileşimlerinde ve akış hızlarında gözlenen sistem basıncı

Kolon: *Co*-EC-HA-APS (4,6x150); Sıcaklık: 25 ^{o}C



Şekil 5.4. İmmobilize hümik asit esaslı sabit faz üzerinde, farklı hareketli faz bileşimlerinde gözlenen sistem basıncı

Deneysel şartlar şekil üzerinde belirtilmiştir



Şekil 5.5. İmmobilize hümik asit esaslı sabit faz üzerinde bazı nükleobazlar için yüksek akış hızında kaydedilen kromatogram
Deneysel şartlar şekil üzerinde belirtilmiştir

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Farklı özelliklere sahip çok sayıda fonksiyonel grubu yapısında bir arada bulunduran HA'nın APS destek katısına immobilizasyonuyla elde edilen sabit fazın, farklı HPLC modlarında kullanılmaya elverişli bir özellik sergilediği görülmüştür. Sabit faz özelliklerini kapsamlı bir değerlendirmeye tabi tutabilmek için RPLC, HILIC ve LEC şartlarında çeşitli analizler yürütülmüş olup; elde edilen verilerden aşağıdaki sonuçlar çıkarılmıştır:

- HA'nın APS katı destek maddesine immobilizasyonuyla elde edilen sabit faz elemental analiz, FTIR, TGA, pH_{pzc} analizleri, katı-sıvı temas açısı ölçümleri, SEM analizleri ve çözünürlük testleri gibi yöntemlerle/tekniklerle karakterize edilmiş ve HA'nın APS yüzeyine kimyasal bağla bağlanmış olduğu sonucuna varılmıştır. Bu durum; immobilizasyon işleminden sonra FTIR spektrumlarında 1655 cm^{-1} dolaylarında açığa çıkan bantla teyit edilmiştir. Elemental analiz sonuçlarından, APS'ye bağlanan HA miktarının 170 mgHA/gAPS olduğu tespit edilmiştir. İmmobilizasyon işleminden sonra yapılan asetilleme işleminin sabit faz özellikleri üzerinde olumlu etkilere sahip olduğu görülmüştür.

- Asetilleme işleminden sonra Su ve MeOH kullanılarak gözlenen düşük temas açıları (sırasıyla 14,6^{o} ve 11,7^{o}), sabit fazın Su ve MeOH içeren hareketli fazlarla yüksek düzeyde ıslanabilme karakteri sergilediğini göstermiştir. Yüksek akış hızlarında gözlenen düşük sistem basıncının, sabit fazın bu karakteri ile ilişkili olduğu düşünülmüştür.

- EC-HA-APS'nin APS'den daha üstün sabit faz özellikleri sergilediği görülmüş ve molekül ağırlığı düşük polar bileşiklerin farklı HPLC modlarında (ör. RPLC, HILIC ve LEC) ayrılmasını mümkün kılmıştır. Farklı kromatografik modlarda türlerin elüsyon-sıralamasında gözlenen farklılaşmalar, aynı sabit faz üzerinde farklı tür mekanizmalara dayalı çeşitli kromatografik işlemlerin yürütülebileceğini göstermiştir.

- EC-HA-APS'nin (özellikle RPLC şartlarında) çalışılan türlere karşı sergilediği sabit faz karakterinin zaman içerisinde değiştiği görülmüştür. Diğer taraftan; uygun miktarda sulu hareketli fazlarla şartlandırılan sabit faz üzerinde yürütülen kromatografik işlemlerin çok verimli olduğu görülmüş ve *k'* değerlerindeki tekrarlanabilirlik düzeyinin (standart sapma≤0,03) yüksek olduğu tespit edilmiştir. Bu nedenle; EC-HA-APS'nin

kolona doldurulmadan önce birkaç gün Su-MeOH karışımlarıyla etkileştirilmesinin uygun olacağı düşünülmektedir.

- EC-HA-APS'yi ligand değiştirici şekle dönüştürmek için metal iyonu çözeltisi kolona basamaklı bir şekilde beslenmiş ve basamaklı besleme işleminin EC-HA-APS'ye tutulan metal iyonu miktarı ve stabilitesi bakımından tek basamaklı yüklemeye üstünlük sergilediği görülmüştür. Basamaklı yükleme, metal iyonları için denge adsorpsiyon verilerinin kolayca türetilebilmesini de mümkün kılmıştır. Cu(II) ve Co(II) için yapılan Scatchard eğri analizi, her iki metal iyonunun da EC-HA-APS'ye farklı afiniteye sahip iki farklı bağlanma tipi üzerinden bağlandığını göstermiştir. Scatchard eğrilerinden türetilen afinite sabitlerinden; sabit fazın Cu(II) iyonuna karşı sergilediği afinitenin Co(II) iyonuna göre daha yüksek olduğu anlaşılmıştır. İzoterm analizinden; sabit fazın Cu(II) ve Co(II) için sergilediği toplam maksimum kapasiteler (q_m) sırasıyla 0,584 ve 0,734 mmolM^{n+}/g EC-HA-APS olarak hesaplanmıştır. 0,1 M'lık denge konsantrasyonunda gözlenen kapasitelerin ise Cu(II) ve Co(II) için sırasıyla; 0,278 ve 0,297 mmolM^{n+}/g EC-HA-APS olduğu tespit edilmiştir.

- EC-HA-APS'ye uygun bir metal iyonunun yüklenmesiyle sabit fazın ligand değiştirici bir karakter kazandığı; çalışılan türlere karşı sergilediği kapasite ve seçicilikte belirgin değişimlerin meydana geldiği tespit edilmiştir. Cu(II) ve Co(II) iyonları yüklenerek *Cu*-EC-HA-APS ve *Co*-EC-HA-APS şekillerine dönüştürülen sabit fazın, $Na_2H_2Y+NH_3$ karışımı kullanılarak (pH=7,5) %98±2'lik metal sıyırma verimliliğiyle tekrar EC-HA-APS şekline dönüştürülebildiği görülmüştür. Bu özellik, aynı sabit faz üzerinde farklı kromatografik modlar arasında kolaylıkla geçiş yapabilmeyi mümkün kılmıştır.

- LEC kromatografisi şartlarında yürütülen analizler, EC-HA-APS'ye farklı metal iyonları yüklenerek sabit fazın türlere karşı sergilediği kapasite ve seçiciliğin değiştirilebileceğini göstermiştir. Örneğin; *Cu*-EC-HA-APS sabit fazının, yapısında $-NH_2$ grubu bulunduran türlere karşı daha yüksek afinite sergilediği görülmüştür.

- Çalışılan türler için RPLC, HILIC ve LEC şartlarında türetilen van't Hoff eğrilerinden, çalışılan sıcaklık aralığı için, ayırmada rol mekanizmalarda sıcaklık değişimlerine bağlı bir farklılaşmanın meydana gelmediği anlaşılmıştır. Çalışılan türler, her üç kromatografik modda da negatif bir alıkonma entalpisi sergilemiştir. Ayrıca;

sıcaklığın kromatografik ayırmaların iyileştirilmesi amacıyla kullanılabilecek önemli bir deneysel parametre olduğu tespit edilmiştir.

- EC-HA-APS ile RPLC ve HILIC modlarında yürütülen analizlerden elde edilen verilerin ışığında, RPLC ve HILIC modları arasındaki ortogonallik, "geometrik yaklaşım" temelinde değerlendirilmiş ve her iki HPLC modu arasında ortalama %48,5'lik ortogonalliğin olduğu bulunmuştur. Hesaplanan bu ortogonallik düzeyi; EC-HA-APS'nin RPLC ve HILIC modlarında kullanılabilirliği ile ilgili önemli bilgiler sunmuştur. Ayrıca; EC-HA-APS ve *Co*-EC-HA-APS ile yürütülen analizler, RPLC ve LEC modları arasında %18'e yakın bir ortogonalliğin olduğunu göstermiştir. RPLC ve HILIC modları arasındaki ortogonalliğe kıyasla daha düşük çıkan bu ortogonalliğin, kompleksleşme eğilimi daha yüksek olan türlerle çalışıldığında daha yüksek çıkabileceği düşünülmüştür.

- Çalışılan türlerin sabit fazın farklı şekilleri üzerindeki elüsyon derecelerini değerlendirmek ve türlerin sabit fazla etkileşme derecesini incelemek amacıyla akış enjeksiyon (FIA) ve HPLC analizleri yürütülmüştür. Çalışılan tüm türler için FIA ve HPLC şartlarında kaydedilen pik alanlarının %95'in üzerinde birbiriyle örtüştüğü görülmüştür. Bununla birlikte; aynı şartlarda Ade ve Gua'nın *Cu*-EC-HA-APS üzerinde 90 dakika süreyle bile elue edilemediği tespit edilmiş ve bu türlerin farklı hareketli fazlarla ve/veya daha yüksek sıcaklıklarda daha kolay elue edilebileceği düşünülmüştür.

- Günümüzde HPLC analizlerinde, kromatografik işlemlerde organik çözücünün çok az veya hiç kullanılmamasına yönelik bir eğilim söz konusudur. İncelenen türlerin EC-HA-APS ile RPLC ve LEC modlarında çok düşük oranlarda organik çözücü veya sadece Su kullanılarak bile birbirinden ayrılabildiği görülmüştür. Bu da; immobilize hümik asidin çevreyle dost, ucuz ve verimli bir sabit faz olarak çeşitli kromatografik işlemlerde yaygın bir kullanım alanı bulabileceğini düşündürmüştür.

- İmmobilize hümik asit esaslı sabit fazlarla yürütülen analizlerde; çeşitli hareketli faz kombinasyonlarında ve yüksek akış hızlarında bile gözlenen düşük sistem basıncı, immobilize hümik asit esaslı sabit fazların *ultrafast liquid chromatography* sistemlerinde de uygulama alanı bulabileceği fikrini vermektedir. Bu noktada; HA'nın, parçacık ebadı birkaç mikrometre olan ve küresel bir şekle sahip katı destek

maddelerine immobilize edilerek kapsamlı çalışmalar yapılmasının uygun olacağı düşünülmektedir.

Sonuç olarak; bu çalışma ile immobilize HA esaslı bir materyalin sabit faz özellikleri ilk defa bu kadar kapsamlı bir şekilde incelenmiş olup; farklı kromatografik modların aynı sabit faz üzerinde yürütülebildiği gösterilmiştir. Sabit fazın sergilediği bu multifonksiyonel özelliğin sıvı kromatografisiyle ilgilenen araştırmacılar için yeni ufuklar açabileceği düşünülmektedir. Önerilen sabit fazın doğal olarak oluşmuş bir makromolekülün immobilizasyonuyla elde edilmiş olmasının, HPLC için daha ucuz, daha verimli ve çevreyle dost sabit fazların tasarlanmasına da ön-ayak olabileceği kanısındayız. Bu nedenle; farklı özelliklere sahip kimyasal türlerin immobilize hümik asit esaslı sabit fazlar üzerindeki kromatografik davranışlarının da değerlendirilmesi gerekmektedir. Ayrıca; immobilize HA esaslı sabit fazların NPLC, adsorpsiyon kromatografisi ve başka kromatografik modlardaki sabit faz karakterinin de incelenmeye değer olduğu düşünülmektedir. Buna ilaveten; HA'nın moleküler kütle temelinde fraksiyonlanması ve farklı ortalama moleküler kütleye sahip bu fraksiyonların katı destek maddesine immobilizasyonuyla, immobilize HA'nın sabit faz karakteri hakkında daha kapsamlı bilgiler edinilebilir.

Son olarak; bir numunedeki bileşenlerin "karmaşık" bir ortamdan ayrılabilmesi noktasında, "karmaşık" bir yapıya sahip hümik asidin hayal gücümüzü zorlayabilecek kadar fazla rol üstlenebileceğine yönelik düşüncemizi ve kromatografik işlemlerin hümik asit esaslı sabit fazlar ile yeni bir üslup kazanacağına olan inancımızı belirtmek isteriz.

7. KAYNAKÇA

Alpert, A.J., 1990, "Hydrophilic-Interaction Chromatography for The Separation of Peptides, Nucleic Acids and Other Polar Compounds", *J. Chromatogr. A*, 499, 177–196.

Alvarez-Puebla, R.A., Goulet, P.J.G. and Garrido, J.J., 2005, "Characterization of the Porous Structure of Different Humic Fractions", *Colloid. Surf. A*, 256, 129–135.

Alvarez-Puebla, R.A., Garrido, J.J., Valenzuela-Calahorro, C., Goulet, P.J.G., 2005, "Retention and induced aggregation of Co(II) on a humic substance: sorption isotherms, infrared absorption, and molecular modeling", *Surface Science*, 575, 136–146.

Ayar, A., Gezici, O. And Küçükosmanoğlu, M., 2007, "Adsorptive Removal of Methylene Blue and Methyl Orange from Aqueous Media by Carboxylated Diaminoethane Sporopollenin: On the Usability of an Aminocarboxilic Acid Functionality-Bearing Solid-Stationary Phase in Column Techniques", *J. Hazard. Mater.*, 146, 186–193.

Baker, H. and Khalili, F., 2003, "Comparative Study of Binding Strengths and Thermodynamic Aspects of Cu(II) and Ni(II) with Humic Acid by Schubert's Ion-Exchange Method", *Anal. Chim. Acta*, 497, 235–248.

Baker, H. and Khalili, F., 2004, "Analysis of the Removal of Lead(II) from Aqueous Solutions by Adsorption onto Insolubilized Humic Acid: Temperature and pH Dependence", *Anal. Chim. Acta*, 516, 179–186.

Bloom, P.R. and Leenheer, J.A., 1989. "Vibrational, Electronic and High-Energy Spectroscopic Methods for Characterizing Humic Substances. In: Humic Substances II. In Search of Structure", Hayes, M.H.B. (Ed.), MacCarthy, P. (Ed.), Malcolm, R.L. (Ed.), Swift, R.S. (Ed.), pp. 409–446, *Chichester: Wiley*.

Buffle, J., 1988, "Complexation Reactions in Aquatic Systems: An Analytical Approach", *Chichester: Ellis-Horwood*.

Buffle, J., 1990, "The Analytical Challenge Posed by Fulvic and Humic Compounds", *Anal. Chim. Acta*, 232, 1–2.

Bulman, R.A., Szabó, G., Clayton, R.F. and Clayton, C. R., 1997, "Investigations of The Uptake of Transuranic Radionuclides by Humic and Fulvic Acids Chemically Immobilized on Silica Gel and Their Competitive Release by Complexing Agents", *Waste Management*, 17, 191 – 199.

Cameron, R.S., Thornton, B.K., Swift, R.S. and Posner, A.M., 1972, "Molecular Weight and Shape of Humic Acid from Sedimentation and Diffusion Measurements on Fractionated Extracts", *J. Soil Sci.*, 23, 394–408.

Campitelli, P.A., Velasco, M.I. and Ceppi, S.B., 2006, "Chemical and Physicochemical Characteristics of Humic Acids Extracted From Compost, Soil and Amended Soil", *Talanta*, 69, 1234–1239.

Casadei, N., Thomassin, M., Guillaume, Y.C. and André, C., 2007, "A Humic Acid Stationary Phase for the High Performance Liquid Chromatography Separation of Buckminsterfullerenes: Theoretical and Practical Aspects", *Anal. Chim. Acta*, 588, 268–273.

Celebi, O., Kilikli, A. and Erten, H.N., 2009, "Sorption of Radioactive Cesium and Barium Ions onto Solid Humic Acid", *J. Hazard. Mater.*, 168, 695–703.

Chen, Y., Mao, X. and Zhu, D., 1985, Polym. Commun. (China), 6, 408.

Chester, T.L. and Coym, J.W., 2003, "Effect of Phase Ratio on van't Hoff Analysis in Reversed-phase Liquid Chromatography, and Phase-Ratio-Independent Estimation of Transfer Enthalpy", *J. Chromatogr. A*, 1003, 101–111.

Choppin, G.R., 1999, "Roles of Humics in Actinide Behavior in Ecosystems, In: Chemical Seperation Technologies and Related Method of Nuclear Waste Management: Applications, Problems, and Research Needs", Choppin, G.R. (Ed.), Khankhasayev, M.Kh. (Ed.), pp. 247-260, *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht.

Cohn, W.E., 1949, "The Separation of Purine and Pyrimidine Bases and of Nucleotides by Ion Exchange", *Science*, 109:377–378.

Cole, L.A. and Dorsey, J.G., 1992, "Temperature Dependence of Retention in Reversed-Phase Liquid Chromatography. 2. Stationary Phase Considerations", *Anal. Chem.* 64, 1317–1323.

Davankov, V.A., Navratil, J.D. and Walton, H.F., 1988, "Ligand Exchange Chromatography", *CRC Pres Inc.*, USA.

Davies, G., Fataftah, A., Cherkasskiy, A., Ghabbour, E.A., Radwan, A., Jansen, S.A., Kolla, S., Paciolla, M.D., Sein Jr., L.T., Buermann, W., Balasubramanian, M., Budnick, J., and Xing, B., 1997, "Tight Metal Binding by Humic Acids and Its Role in Biomineralization", *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* 4047–4060.

Durmaz, F., 2008. "Akış Enjeksiyon-Kayı Faz Ekstraksiyon Sistemi ile Bazı Metal İyonlarının Tayin Edilmesi", Doktora Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya.

Durmaz, F., Kara, H., 2010, "α-novel determination method of Cu(II) ions on the immobilized humic acid by SPE–FIA hyphenated technique", *Desalination*, 256, 1-8.

Engelhardt, H. and Jungheim, M., 1990, "Comparison and characterization of reversed phases", *Chromatographia*, 29, 59–68.

Engelhardt, H., Arangio, M. and Lobert, T.,1997, "A Chromatographic Test Procedure for Reversed-Phase HPLC Column Evaluation", *LC/GC*, 15(9), 15:856–866.

Eprahim, J.H., Szabo, Gy. and Bulman, R.A., 1994, "Potentiometric Titrations of Chemically Immobilized Humic Acid and Salicylic Acid and Their Uptake of Eu(III) as a Function of pH and Ionic Strenght", *Environ. Int.*, 20, 121–125.

Filella, M., Buffle, J., and Van Leeuwen, H.P., 1990, "Effect of Physico-chemical Heterogeneity of Natural Complexants: Part I. Voltammetry of Labile Metal-fulvic Complexes", *Anal. Chim. Acta*, 232, 209–223.

Fong, S.S. and Mohamed, M., 2007, "Chemical Characterization of Humic Substances Occurring in the Peats of Sarawak, Malaysia", *Organic Geochemistry*, 38, 967–976.

Gezici, O., 2004. "Hümik Asitlerin Katı Faz Ekstraksiyon Sisteminde Kullanımı", Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya.

Gezici, O., Kara, H., Ersöz, M. and Abali, Y., 2005, "The Sorption Behavior of a Nickel-Insolubilized Humic Acid System in a Column Arrangement", *J. Colloid Interf. Sci.*, 292, 381–391.

Gezici, O., Tabakci, M., Kara, H. and Yilmaz, M., 2006a, "Synthesis of p-tert-Butylcalix[4]arene Dinitrile Bonded Aminopropyl Silica and Investigating Its Usability as a Stationary Phase in HPLC", *J. Macromol. Sci. Part A: Pure and Applied Chemistry*, 43, 221–231.

Gezici, O., Küçükosmanoğlu, M. and Ayar, A., 2006b, "The Adsorption Behavior of Crystal Violet in Functionalized Sporopollenin-Mediated Column Arrangements", *J. Colloid Interf. Sci.*, 304, 307–316.

Gezici, O., Kara, H., Ayar, A. and Topkafa, M., 2007, "Sorption Behavior of Cu(II) Ions on Insolubilized Humic Acid under Acidic Conditions: An Application of Scatchard Plot Analysis in Evaluating the pH Dependence of Specific and Nonspecific Bindings, *Sep. Purif. Technol.*, 55, 132–139.

Gezici, O. and Ayar, A., 2009, "Stepwise Frontal Analysis to Derive Equilibrium Sorption Data for Copper and Aniline on Functionalized Sporopollenin", *Clean*, 37(4–5), 349–354.

Gilar, M., Olivova, P., Daly, A.E. and Gebler, J.C., 2005, "Orthogonality of Separation in Two-Dimensional Liquid Chromatography", *Anal. Chem.*, 77, 6426–6434.

Gilar, M., Olivova, P., Daly, A.E. and Gebler, J.C., 2008. "Development of Orthogonal 2DLC Methods for Separation of Peptides", In: "Multidimensional Liquid Chromatography: Theory and Applications in Industrial Chemistry and the Life Sciences", Cohen, S.A. (Ed.), Schure, M.R. (Ed.), *John Wiley & Sons*.

Gregor, J.E. and Powell, H.K.J., 1986, "Acid Pyrophosphate Extraction of Soil Fulvic Acids", *J. Soil Sci.*, 37, 577-585.

Guiochon, G., Golshan-Shirazi, S. and Katti, A.M., 1994. "Fundamentals of Preparative and Nonlinear Chromatography", *Academic Press*, Boston, MA.

Guo, Y. and Gaiki, S., 2005, "Retention Behavior of Small Polar Compounds on Polar Stationary Phases in Hydrophilic Interaction Chromatography", *J. Chromatogr. A*, 1074, 71–80.

Harvey, D., 2000. "Modern Analytical Chemistry", *The McGraw-Hill Companies*, DePauw University, USA.

Hayes, M.H.B., 1985. Extraction of Humic Substances from Soil. In: Humic Substances in Soil, Sediment, and Water: Geochemistry, Isolation and Characterization, G. Aiken ve ark. (Ed.), pp. 329-362, *Wiley*, New York.

Heitkamp, D. and Wagner, K., 1982, "New Aspects of Uranium Recovery from Seawater", *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.*, 21, 781–784.

Helfferich, F., 1961, "Ligand Exchange. A Novel Separation Technique", *Nature*, 189, 1001–1002.

Ho, C.H. and Miller, N.H., 1985, "Effect of Humic Acid on Uranium Uptake by Haematite Particles", *J. Colloid Interface Sci.*, 106(2), 281–288.

Horváth, C.G., Preiss, B.A. and Lipsky, S.R., 1967, "Fast Liquid Chromatography: An Investigation of Operating Parameters and The Separation of Nucleotides on Pellicular Ion Exchangers", *Anal. Chem.*, 39, 1422–1428.

Janoš, P., 2003, "Separation Methods in the Chemistry of Humic Substances", *J. Chromatogr. A*, 983, 1–18.

Kimata, K., Iwaguchi, K., Onishi, S., Jinno, K., Ekstern, R., Hosoya, K., Araki, M. and Tanaka, N., 1989, "Chromatographic Characterization of Silica C18 Packing Materials. Correlation Between a Preparation Method and Retention Behavior of Stationary Phase", *Journal of Chromatographic Science*, 27, 721–728.

Klavins, M. and Eglite, L., 2002, "Immobilisation of humic substances", *Colloid. Surf. A*, 203, 47–54.

Klavins, M., Eglite, L. and Zicmanis, A., 2006, "Immobilized Humic Substances as Sorbents", *Chemosphere*, 62, 1500–1506.

Kollist-Siigur, K., Nielsen, T., Grøn, C., Hansen, P.E., Helweg, C., Jonassen, K.E.N., Jørgensen, O. and Kirso, U., 2001, "Sorption of Polycyclic Aromatic Compounds to Humic and Fulvic Acid HPLC Column Materials", *J. Environ. Qual.*, 30, 526–537.

Koopal, L.K., Yang, Y., Minnaard, A.J., Theunissen, P.L.M. and Van Riemsdijk, W.H., 1998, "Chemical Immobilisation of Humic Acid on Silica", *Colloid Surf. A*, 141, 385–395.

Kowalska, S., Krupczyńska, K and Buszewski, B., 2006, "Some Remarks on Characterization and Application of Stationary Phases for RP-HPLC Determination of Biologically Important Compounds", *Biomed. Chromatogr.*, 20, 4–22.

KSV instruments web sayfası; "Contact Angle", http://www.attension.com/contact-angle.aspx

Küçükosmanoğlu, M., Gezici, O. and Ayar, A., 2006, "The Adsorption Behaviors of Methylene Blue and Methyl Orange in a Diaminoethane Sporopollenin-Mediated Column System", *Sep. Purif. Technol.*, 52, 280–287.

Langmuir, I., 1916, "The Constitution and Fundamental Properties of Solids and Liquids", *J. Am. Chem. Soc.*, 38, 2221.

Li, L.S., Liu, M., Da, S.L., Feng, Y.Q., 2004, "Studies on the Chromatographic Behavior of Nucleosides and Bases on p-tert-Butyl-Calix[8]Arene-Bonded Silica Gel Stationary Phase by HPLC", *Talanta*, 63, 433–441.

Luo, D., Yu, Q.W., Yin, H.R. and Feng, Y.Q., 2007, "Humic Acid-bonded Silica as a Novel Sorbent for Solid-phase Extraction of Benzo[a]pyrene in Edible Oils", *Anal. Chim. Acta*, 588, 261–267.

Ma, H., Allen, H.E. and Yin, Y., 2001, "Characterization of Isolated Fractions of Dissolved Organic Matter from Natural Waters and a Wastewater Effluent, *Wat. Res.*, 35(4), 985–996.

Montgomery, D.C., 2005, "Design and Analysis of Experiments", *John Wiley & Sons*.

Nederlof, M.M., De Wit, J.C.M., Van Riemsdijk, W.H. and Koopal, L.K., 1993, "Determination of Proton Affinity Distributions for Humic Substances", *Environ. Sci. Technol.*, 27, 846–856.

Neves, E.A., Benedetti, E., Souza, D.C. and Javaroni, R., 2003, "Hydrogen Ion Affinity in Humic Acids: A Coordination Approach", *J. Coord. Chem.*, 56(7), 623–633.

Olsen, B.A., 2001, "Hydrophilic Interaction Chromatography Using Amino and Silica Columns for the Determination of Polar Pharmaceuticals and Impurities, *J. Chromatogr. A*, 913, 113–122.

Pack, B.W. and Risley, D.S., 2005, "Evaluation of a monolithic silica column operated in the hydrophilic interaction chromatography mode with evaporative light scattering detection for the separation and detection of counter-ions", *J. Chromatogr. A*, 1073, 269–275.

Pandey, A., Pandy, S., Misra, V. and Viswanathan, P.N., 1999, "Formation of Soluble Complexes of Metals with Humic Acid and Its Environmental Significance" *Chem. Ecol.*, 16, 269–282.

Perminova, I.V., Karpiouk, L.A., Shcherbina, N.S., Ponomarenko, S.A., Kalmykov, St.N. and Hatfield, K., 2007, "Preparation and Use of Humic Coatings Covalently Bound to Silica Gel for Np(V) and Pu(V) Sequestration", *J. Alloys and Compounds*, 444–445, 512–517.

Prado, A.G.S., Miranda, B.S. and Jacintho, G.V.M., 2003, "Interaction of Indigo Carmine Dye with Silica Modified with Humic Acids at Solid/Liquid Interface", *Surf. Sci.*, 542, 276–282.

Prado, A.G.S., Miranda, B.S. and Dias, J.A., 2004, "Attachment of Two Distinct Humic Acids onto a Silica Gel Surface", *Colloid. Surf. A*, 242, 137–143.

Prado, A.G.S.,Miranda, B.S. and Zara, L.F., 2005, "Adsorption and Thermochemical Data of Divalent Cations onto Silica Gel Surface Modified with Humic Acid at Solid/Liquid Interface", *J. Hazard. Mater.*, B120, 243–247.

Reymond, J.P. and Kolenda, F., 1999, "Estimation of The Zero Point Charge of Simple and Mixed Oxides by Mass Titration", *Powder Technol.*, 103, 30–36.

Ritchie, J.D. and Perdue, E.M., 2003, "Proton-binding Study of Standard and Reference Fulvic Acids, Humic Acids, and Natural Organic Matter", *Geochim. Cosmochim. Acta*, 67(1), 85–96.

Scatchard, G., 1949, "The Attractions of Proteins for Small Molecules and Ions", *Ann. NY Acad. Sci.*, 51, 660-672.

Skoog, D.A., West, D.M. and Holler, F.J., 1996. "Fundamentals of Analytical Chemistry", 7. Baskı, "Analitik Kimya Temelleri", 1999. Kılıç, E. (Çev. Ed.), Köseoğlu, F. (Çev. Ed.), *Bilim Yayıncılık*, Ankara.

Seki, H., Suzuki, A. and Kashiki, I., 1990, "Adsorption of Lead Ions on Immobilized Humic Acid", *J. Colloid Interf. Sci.*, 134(1), 59–65.

Seki, H. and Suzuki, A., 1995, "Adsorption of Heavy Metals Ions onto Insolubilized Humic Acid", *J. Colloid Interf. Sci.*, 171, 490-494.

Shin, H.S., Monsallier, J.M. and Chopin, G.R., 1999, "Spectroscopic and Chemical Characterizations of Molecular Size Fractionated Humic Acid", *Talanta*, 50, 641–647.

Stevenson, F.J., 1994. "Humus Chemistry: Genesis, Composition and Reactions", *John Wiley & Sons*, New York.

Swift, R.S. 1989. "Molecular Weight, Size, Shape, and Charge Characteristics of Humic Substances: Some Basic Considerations". In: Humic Substances II (Ed: Hayes, M.H.B., MacCarthy, P., Malcolm R.L., Swift, R.S.), pp. 449–465. *John Wiley & Sons*, New York..

Szabo, G., Prosser, S.L. and Bulman, R.A., 1990, "Determination of the Adsorption Coefficient (K_{OC}) of Some Aromatics for Soil by RP-HPLC on Two Immobilized Humic Acid Phases", *Chemosphere*, 21, 777–788.

Szabo, G., Farkas, G. and Bulman, R.A., 1992, "Evaluation of Silica-Humate and Alumina-Humate HPLC Stationary Phases for Estimation of The Adsorption Coefficient, K_{OC}, of Soil for Some Aromatics", *Chemosphere*, 24, 403–412.

Thurman, E.M. and Malcolm, R.L., 1981, "Preparative Isolation of Aquatic Humic Substances", *Environ. Sci. Technol.*, 15, 463–466.

Tipping, E., 2002. "Cation Binding by Humic Substances", *Cambridge University Press*, West Nyack, NY, USA.

Vik, E.A. and Eikebrokk, B., 1989. Coagulation Process for Removal of Humic Substances from Drinking Water. In: "Aquatic Humic Substances. Influence on Fate and Treatment of Pollutant" Suffet, I.H. (Ed.), McCarthy, P. (Ed), *American Chemical Society*, pp. 386, Washington.

Yang, Y.H. and Koopal, L.K., 1999, "Immobilisation of Humic Acids and Binding of Nitrophenol to Immobilised Humics", *Colloid. Surf. A*, 151, 201–212.

Yu, Q.W., Lin, B., Feng, Y.Q. and Zou, F.P., 2008, "Application of Humic Acid Bonded-Silica as a Hydrophilic-interaction Chromatographic Stationary Phase in Separation of Polar Compounds", *J. Liquid Chromatography and Related Technologies*, 31, 64–78.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Orhan GEZİCİ
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Kulu-Konya / 1980
Telefon :
Faks :
e-mail : ogezici@gmail.com; ogezici@yahoo.com

EĞİTİM

Derece		Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	:	Kulu Lisesi, Kulu/Konya	1997
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi / Konya	2002
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi, Fen Bil. Enst. Kimya ABD	2004
Doktora	:	Selçuk Üniversitesi, Fen Bil. Enst. Kimya ABD	2010

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2006	Niğde Üniversitesi	Arş. Gör.
2006-2010	Selçuk Üniversitesi	Arş. Gör.

UZMANLIK ALANI

HPLC ve HPLC için yeni sabit fazların tasarlanması, Adsorpsiyon, Hümik maddeler

YABANCI DİLLER

İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

Evli ve 1 çocuk babası

YAYINLAR

Gezici, O., Kara, H., Ersöz, M. and Abali, Y., 2005, "The Sorption Behavior of a Nickel-Insolubilized Humic Acid System in a Column Arrangement", *J. Colloid Interf. Sci.*, 292, 381–391. (Yüksek Lisans)

Gezici, O.,Kara,H, Yanık, S., Ayyildiz, H.F., Kucukkolbasi, S., 2007, "Investigating Sorption Characteristics of Copper Ions onto Insolubilized Humic Acid by Using a Continuously Monitored Solid Phase Extraction Technique", *Colloid. Surf. A*, 298: 129–138. (Yüksek Lisans)

Gezici, O. and Kara, H., "Study on The Chromatographic Behavior of Some Nuclosides and Nucleobases on Immobilized Humic Acid Stationary Phase by HPLC", Book of Abstracts, P109-B2, *Euroanalysis*, 2009, Innsbruck, Austria. (Poster Sunumu; Doktora).