



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HILIC ŞARTLARINDA, İMMOBİLİZE HÜMİK ASİTLERİN, BAZI SABİT FAZ ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

POLAT KILIÇ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Ekim-2013
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

HILIC ŞARTLARINDA, İMMOBİLİZE HÜMİK ASİTLERİN, BAZI SABİT FAZ ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Polat Kılıç

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. Hüseyin KARA

2013, 103 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Hüseyin KARA
Doç. Dr. Mustafa TABAKCI
Yrd. Doç. Dr. Fatih DURMAZ

Sunulan bu çalışmada, HPLC analiz sistemleri için yeni bir sabit faz geliştirilmiş, HILIC (Hidrofilik Etkileşim Sıvı Kromatografi) ve RPLC (Ters Faz Sıvı Kromatografi) şartlarında ayırma özellikleri incelenmiştir.

15-35 μm boyutundaki aminopropilsilika üzerine immobilize edilen hümik asit, yüksek basınçta kolonlara doldurulmuş, HILIC ve RPLC şartlarında PTH-amino asitlerinin ayrımı için kullanılabilirliği araştırılmıştır.

Optimum bir ayırma sağlamak amacıyla akış hızı, sıcaklık ve % su gibi önemli ayırma parametreleri dikkate alınarak beş seviyeli ve üç faktörlü bir kısmi deneysel tasarım yapılmış, yüzey ve normal dağılım grafikleri incelenmiştir. % Su miktarı ayırmaya etki eden en etkili parametre olarak bulunmuş ve % 0,1 su; 10^{o}C sıcaklık; 0,2 mL/dk akış hızı optimum ayırma şartları olarak tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Hidrofilik Etkileşim Sıvı Kromatografisi/(HILIC), Hümik Asit, Kemometri, Optimizasyon

ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATION OF SOME STATIONARY PHASE PROPERTIES OF IMMOBILIZED HUMIC ACIDS AT HILIC CONDITIONS

Polat KILIÇ

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY

THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN CHEMISTRY

Advisor: Prof. Dr. Hüseyin KARA

2013, 103 Pages

Jury
Prof. Dr. Hüseyin KARA
Doç. Dr. Mustafa TABAKCI
Assoc. Prof. Dr. Fatih DURMAZ

In the present study, in the HPLC analysis systems has been developed a new stationary phase, HILIC (Hydrophilic Interaction Liquid Chromatography) and RPLC (Reverse Phase Liquid Chromatography) at their conditions was examined separation properties.

A high pressure was used to fill the column with humic acid immobilized on aminopropylsilica solid support (15 to 35 μm in size). It was investigated for the separation of some PTH-amino acids in HILIC and RPLC conditions

A five-level fractional factorial experimental design with three factors (flow rate, temperature and % water) was made to obtained the optimum condition for better separation through surface graphics and normal distribution plot.

Water percentage was found to be the most effective parameter for separation. It was found 0.1% of water, 10^{o}C temperature and 0.2 mL / min flow rate as optimum separation conditions.

Keywords: Hydrophilic interaction liquid chromatography, humic acid, chemometrics, optimization

ÖNSÖZ

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

Bu çalışmanın hazırlanmasında, kaynak araştırmasında ve seminerinin sunulmasında her türlü bilgi ve önerileriyle bana yol gösteren danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Hüseyin KARA' ya teşekkür ederim.

Desteklerinden ötürü Analitik Kimya Araştırma Grubumuzda yer alan, Yrd. Doç Dr. Fatih DURMAZ, Arş. Gör. Dr. Hamide Filiz AYYILDIZ, Uzman Dr. Mustafa TOPKAFA, Arş. Gör. Fatma Nur ARSLAN, Arş. Gör. İsmail TARHAN, yüksek lisans öğrencisi Huriye ÇAKIR, postdoktora öğrencisi M. Younis Talphur ve doktora öğrencisi Saba NAZ, olmak üzere, tüm arkadaşlarıma da teşekkür ederim.

Polat KILIÇ
KONYA-2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xi**

1. GİRİŞ **1**

2. HÜMİK MADDELER **4**

2.1. Humus ve Hümik Maddeler 4
2.2. Hümik Asit, Fülvik asit ve Hümin 5
2.3. Hümik Asidin Yapısal Özellikleri 6
2.4. Hümik Asidin Yapısı ile İlgili Teoriler 7
2.5. Hümik Asidin Etkileşim Türleri 10
2.6. Hümik Asitlerin Fizikokimyasal Özellikleri 10
2.6.1. Hümik asitlerin maddelerle etkileşme mekanizmaları 10
2.6.2. Sulu ortamda çözünebilme özellikleri 11

3. AMİNO ASİTLER **13**

3.1. Amino Asit Tanımı 13
3.2. Standart Amino Asitler 13
3.3. D- ve L-Amino Asitler 17
3.4. Amino Asitlerin HPLC de Analizi 17
3.4.1. Post kolon türevlendirme 18
3.4.2. Türevlendirilmiş amino asitlerin analizi 18
3.4.3. HPLC de Amino Asit Ayrımının Avantajları 19

4. KROMATOGRAFİ **20**

4.1. Kromatografi Sınıflandırılması 21
4.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC) 23
4.2.1. Sıvı kromatografinin uygulamaları 24
4.2.1.1. Dağılma kromatografisi 25
4.2.1.2. Adsorpsiyon kromatografisi 28
4.2.1.3. İyon-değiştirme kromatografisi 28
4.2.1.4. İyon-çifti kromatografisi 31
4.2.1.5. Ligand-değiştirme kromatografisi 31
4.2.1.6. Boyut-eleme kromatografisi 32

5. HİDROFİLİK ETKİLEŞİM SIVI KROMATOGRAFİSİ (HILIC) 34

5.1. HILIC Tekniğinin Tarihi Gelişimi 34
5.2. HILIC Tekniği Nedir? 34
5.3. HILIC Şartlarında Polar Sabit Fazda Su Tabakasının Oluşumu 35
5.4. HILIC Tekniğinin Mekanizması 36
5.5. HILIC Tekniğinin Hareketli Faz Özellikleri 36
5.6. HILIC Tekniğinde Genellikle Kullanılan Sabit Fazlar 37
5.7. HILIC ve RPLC Karşılaştırılması 38
5.8. Ters Faz/ İyon Değişimi Özelliği Gösteren Karma Mod Kolonların HILIC Davranışı 39

6. KAYNAK ARAŞTIRMASI 41

7. MATERYAL VE YÖNTEM 47

7.1. Kullanılan Kimyasallar, Çözeltiler ve Cihazlar 47
7.2. Hümik Asidin Saflaştırılması 48
7.3. Hümik Asidin İmmobilizasyonu 49
7.4. İmmobilize Hümik Asidin FT-IR ile karekterizasyonu 50
7.5. Sabit Fazının Kolona Doldurulması 51
7.6. Kromatografik Şartlarda Yürütülen İşlemler 51
7.6.1. Amino Asitlerin PTH formuna türevlendirilmesi 52
7.6.2. Ters faz/iyon değişimi/ligand değişimi çoklu modda yürütülen analizler 53
7.6.3. HILIC şartlarında yürütülen analizler 54

8. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 56

8.1. FT-IR Analizleri 56
8.3. Ters Faz/İyon değişimi/Ligand Değişimi Karma Modda Yürütülen Analizler 59
8.3.1 EC-HA-APS sabit fazına HILIC şartlarında yürütülen analizler 64
8.3.2 EC-HA-APS sabit fazına Pb^{+2} iyonu yüklenme ve denemeler 65
8.4. Hidrofilik Etkileşim Sıvı Kromatografi Şartlarında Yürütülen Analizler 66
8.4.1. Kısmi faktöriyel tasarım 67
8.4.2. Normal dağılım grafiklerinin değerlendirilmesi 69
8.4.3. Yüzey grafiklerinin değerlendirilmesi 70
8.4.4. İkinci deneysel tasarım ve yüzey grafiklerinin değerlendirilmesi 74
8.4.5. Gradient denemeleri 83

9. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 85

9.1 Sonuçlar 85
9.2 Öneriler 86

KAYNAKLAR 87

ÖZGEÇMİŞ 92

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2. 1. Hümik Asit Yapısı 6
Şekil 2. 2. Hümik Asidin SEM görüntüsü..... 6
Şekil 2. 3. Hümik asidin 2 boyutlu yapısı (Andosol 1994) 7
Şekil 2. 4. Hümik Asidin Molekül Yapısı (Stevensen 1982) 8
Şekil 2. 5. Hümik Asidin Molekül Yapı 9

Şekil 4. 1. Karışımların ayrılması 20
Şekil 4. 2. Örnek bir kromatogram..... 22
Şekil 4. 3. Klasik sıvı kromatografi Cihazı (Chrome academy) 24
Şekil 4. 4. Sıvı kromatografide uygulanan ayırma modları (Skoog ve ark.,)..... 24
Şekil 4. 5. Normal faz şekli..... 26
Şekil 4. 6. RPLC Ayırma Mekanizması..... 27
Şekil 4. 7. Hidrofobik yüzey 27
Şekil 4. 8. İyon değiştirici sabit faz yüzeyleri..... 30
Şekil 4. 9. İyon çifti özelliği gösteren bir molekül..... 31
Şekil 4. 10. Boyut eleme Mekanizması..... 32

Şekil 5. 1. HILIC' ın yeri..... 35
Şekil 5. 2. Sabit fazda su tabakasının oluşumu 35
Şekil 5. 3. Maddelerin iki faz arasında polariteye göre dağılması 36
Şekil 5. 4. Sabit fazın tutunan su miktarının hareketli fazda ki su miktarına göre değişmesi..... 37
Şekil 5. 5. HILIC da genel olarak kullanılan sabit fazlar..... 37
Şekil 5. 6. RPLC ve HILIC karşılaştırılması..... 38
Şekil 5. 7. RPLC ve HILIC da nükleositlerin ayrılması..... 39
Şekil 5. 8. Ters faz/ İyon Değişimi Özelliği Gösteren Karma Mod Kolonların Sabit Fazlarının Yapıları..... 40

Şekil 7. 1. Kullanılan HPLC sistemi..... 48
Şekil 7. 2. APS ye hümik asidin bağlanması 50
Şekil 7. 3. HA-APS açık uçların asetilklorürle kapatılması 50
Şekil 7. 4. Kolon doldurma pompası 51

Şekil 8. 1. Hümik asit FT-IR spektrum..... 56
Şekil 8. 2. APS ve HA-APS FT-IR spektrumu 57
Şekil 8. 3. HA-APS ve EC-HA-APS FT-IR farkı..... 58
Şekil 8. 4. Cu-EC-HA-APS ve EC-HA-APS FT-IR sonuçları arasındaki fark..... 58
Şekil 8. 5. EC-HA-APS sabit fazına 0,1 M Cu^{2+} metali yüklem ve sıyırma On-line SPE sistem kromatogramı 59
Şekil 8. 6. PTH amino asitlerin k' göre tahmini ayrımı..... 61
Şekil 8. 7. Bazı PTH amino asitlerin ayrımını gösteren kromatogram 61
Şekil 8. 8. Bazı PTH amino asitlerin ayrımını gösteren kromatogram 62
Şekil 8. 9. Bazı PTH amino asitlerin ayrımını gösteren kromatogram 62
Şekil 8. 10. Bazı PTH amino asitlerin ayrımını gösteren kromatogram 63
Şekil 8. 11. Bazı PTH amino asitlerin HILIC şartlarında ayrımını gösteren kromatogram..... 64
Şekil 8. 12. Bazı PTH amino asitlerin HILIC şartlarında ayrımını gösteren kromatogram..... 64
Şekil 8. 13. PTH-Leu ve PTH-İle ayrımını gösteren kromatogram..... 65
Şekil 8. 14. Normal dağılım grafiği 69
Şekil 8. 15. Üç faktörün etkisini gösteren yüzey grafikleri..... 70

Şekil 8. 16. Hız ve sıcaklığı etkisini gösteren yüzey grafikleri 71
Şekil 8. 17. % Su ve sıcaklığı etkisini gösteren yüzey grafikleri 72
Şekil 8. 18. % Su ve Hız etkisini gösteren yüzey grafikleri 73
Şekil 8. 19. Üç faktörün etkisini gösteren yüzey grafiği 76
Şekil 8. 20. % su ve hızın etkisini gösteren yüzey grafiği 77
Şekil 8. 21. Hız ve Sıcaklık etkisini gösteren yüzey grafiği 78
Şekil 8. 22. % Su ve Sıcaklık etkisini gösteren yüzey grafiği 79
Şekil 8. 23. Optimum deney şartları da yapılan ayrım 80
Şekil 8. 24. Optimum deney şartları da yapılan ayrım 81
Şekil 8. 25. Sıcaklık ve akış hızı değiştirilerek yapılan ayrım 83
Şekil 8. 26. % Su miktarı değiştirilerek yapılan ayrım 84

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2. 1. Hümik Asit Etkileşim Türleri 10

Çizelge 3. 1. Standart Amino Asitler 15
Çizelge 3. 2. Türevlendirilmiş Amino Asitler ve türevlendirme reaktifleri 18

Çizelge 4. 2. Hesaplamalarda kullanılan eşitlikler 22
Çizelge 4. 3. İyon değiştiriciler 29

Çizelge 7. 2. Kullanılan cihazlar 47
Çizelge 7. 3. Kullanılan HPLC Sistemi 48
Çizelge 7. 4. Kullanılan PTH Amino Asitler 52
Çizelge 7. 5. Faktörlerin kodlanmış seviye değerleri 54
Çizelge 7. 6. Optimizasyon çalışmaları için kullanılan kısmi deneysel tasarım 55

Çizelge 8. 1. Hümik Asit FT-IR spektrum değerleri 56
Çizelge 8. 2. PTH-Amino asitlerin kapasite değerleri 60
Çizelge 8. 3. HILIC şartlarında yürütülen ön denemeler 66
Çizelge 8. 3. İlk yapılan deneysel tasarım 67
Çizelge 8. 4. Kodlama sistemine göre deney parametrelerinin oluşturulması 67
Çizelge 8. 5. Bir parametre sabitlenerek oluşturulan deney sıralaması 68
Çizelge 8. 6. Normal dağılım grafiğinin değerleri 69
Çizelge 8. 7. İkinci deneysel tasarım 74
Çizelge 8. 8. Kodlama sistemine göre deney parametrelerinin oluşturulması 75
Çizelge 8. 9. Yukarıdaki ayrımın kromatografik hesaplama sonuçları 80
Çizelge 8. 10. Yukarıdaki ayrımın kromatografik hesaplama sonuçları 81
Çizelge 8. 11. Kromatografik hesaplama sonuçlarının karşılaştırılması 82
Çizelge 8. 12. Yukarıdaki ayrımın kromatografik hesaplamam sonuçları 83
Çizelge 8. 13. Yukarıdaki ayrımın kromatografik hesaplama sonuçları 84

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

N	:	Tabaka Sayısı
k'	:	Kapasite Faktörü
Rs	:	Ayırma Faktörü
α	:	Seçicilik Faktörü

Kısaltmalar

PTH	:	Phenylthiohndantoin
mAU	:	Mili Absorbans ünit
HA	:	Hümik Asit
APS	:	Aminopropilsilika
HA-APS	:	Hümik Asit Bağlı Aminopropilsilika
EC-HA-APS	:	End-Capping Yapılmış Aminopropilsilika
NPLC	:	Normal Faz Sıvı Kromatografi
RPLC	:	Ters Faz Sıvı Kromatografi
LEC	:	Ligand Değişim Sıvı Kromatografi
HILIC	:	Hidrofilik Etkileşim Sıvı Kromatografi
HPLC	:	Yüksek Performaslı Sıvı Kromatografi
CEC	:	Katyon Değişim Kapasitesi
DNA	:	Deoksiribonükleik Asit
GC	:	Gaz Kromatografi
TLC	:	İnce Tabaka Kromatografi
MS	:	Kütle Spektroskopisi
AmAc	:	Amonyum Asetat
NaAc	:	Sodyum Asetat
EDTA	:	Etilediamintetraasetikasit
TEA	:	Trietilenamin
TFA	:	Trifloraasetikasit
ACN	:	Asetonitril
DMF	:	Dimetilformamid
OPT	:	Ortho-Phthalaldehyde
Ala	:	Alanin
Phe	:	Fenilalanin
Tyr	:	Tiyrozin
Thr	:	Tihronin
Pro	:	Prolin
Leu	:	Lösin
İle	:	İzolösin
Ser	:	Serin
Asn	:	Asparajin
min	:	dakika

1. GİRİŞ

HPLC, kimyasal türlerin geniş bir aralıkta kalitatif ve kantitatif analizinde kullanılan en yaygın tekniklerden birisidir. Bu tekniğin performansı teknikte kullanılan sabit ve hareketli fazın fiziksel ve kimyasal özelliklerine bağlıdır. Sıvı kromatografisi yüz yıldır bilimin her alanına uygulanan ve sürekli gelişme kaydeden güçlü bir metottur. Sıvı kromatografide 1930'lu yıllarda baskın olarak polar bileşiklerin ayrılmasında normal faz sıvı kromatografisi kullanılmakta ve günümüzde de devam etmektedir.

Normal faz sıvı kromatografisinde sabit faz olarak polar özellik gösteren silika, alümina gibi maddeler, hareketli faz olarak da polaritesi düşük organik çözücüler kullanılmıştır. Bu yöntem gönümüzde yağ analizleri gibi apolar çözücüde çözünen maddelerin ayrımında yaygın olarak kullanılmaktadır. Daha sonra apolar sabit fazların yapılmaya başlanması ve C1, C8, C18 gibi sabit fazların sentezlenmesi ve hareketli fazda su ve diğer polar bileşiklerin kullanılma imkanının da oluşması ile ters faz sıvı kromatografi tekniği, kromatografi de kullanılan en yaygın metot olmuştur. Bu metotla polar ve apolar bileşikler ayrılmaktadır. Fakat apolar bileşiklerin ayrılmasında iyi sonuçlar elde edilmesine rağmen bu sistemde suda çözünen hidrofilik ve polar bileşiklerin ayrılması verimli bir şekilde yapılamamaktadır. Günümüzde en yaygın metotun ters faz sıvı kromatografi olmasına rağmen polar ve hidrofilik bileşiklerin iyi bir şekilde ayrılamaması sonucu yeni metotlar denenmiştir. Dr. Adrew Alpert 1990'da karbonhidratların ayrılması için polar bir sabit faz ve hareketli faz olarak da su ve polaritesi sudan küçük olan bir hareketli faz kullanmış ve istediği ayırmayı başarmıştır. Bunun sonucunda ise hidrofilik etkileşim sıvı kromatografisi (HILIC) ortaya çıkmıştır. Bu metot 1990 da mekanizması iyi anlaşılamadığı için göz ardı edilse de günümüzde kromatografide en çok araştırılan alan olmuş, bir çok araştırmalar yapılmış ve makaleler yazılmıştır. HPLC için kolon üreten bir çok firma HILIC için yeni bir çok ticari sabit faz geliştirerek piyasaya sürmüştür.

HILIC' da polar ve hidrofilik bileşiklerin çok iyi ayrılması ve ters faz sıvı kromatografiye tamamlayıcı bir özellik göstermesi dikkate alındığında araştırmacıların ilgi alanı haline gelmiştir. Bu ilgi son 10 yılda artarak devam etmektedir.

HILIC' da temel etkileşim, sabit faz olarak polar bir türün kullanılması ve hareketli faz olarak da asetonitril miktarı her zaman fazla olan asetonitril-su karışımı kullanılmasıdır. Sabit faz üzerinde hareketli organik fazdan daha yavaş hareket eden bir

su tabakası oluşmaktadır. Bu iki tabaka arasında bileşikler, polaritelerine göre dağılmakta ve polar olan türler kolondan daha geç çıkmaktadır. Polar olan bileşikler sabit fazın doğasına uygun olarak su tabakasının içerisinde iyonik etkileşimlerle de bulunarak birbirlerinden ayrılmaktadır.

Hümik asitler, milyonlarca yıl önce tropik ve yarı-tropik bitkilerin, karasal canlı organizmaların çökelmesi, basınç ve sıcaklık altında jeolojik aktiviteler ve yataklanması sonucu oluşmuştur. pH değeri 3-5 arasındadır. Siyah-kahverengi görünümlü, elle kolaylıkla ufalanabilecek sertliktedir. Toprağın solunum ve su tutma kabiliyetini artırmaktadır.

Hümik asitler yaklaşık olarak ; % 40-60 karbon, % 30-50 oksijen, % l-3 azot ve % 0,l-2 kükürt ihtiva etmektedir. Bu elementler; çok sayıda alifatik ve aromatik halkadan meydana gelen yapıda bir arada bulunurlar. Hümik asitler Ca, Mg, Cu ve Zn gibi metal iyonlarını da bünyesinde ihtiva etmektedir. Bu iyonlar, doğal ortamda hümik asit ile şelatlaşmış olarak bulunurlar.

Doğadaki organik maddelerin önemli bir kısmını teşkil eden hümik maddeler; bitkisel kalıntıların mikrobiyal ve/veya enzimatik etkilerle bozuşması ve açığa çıkan yeni yapıların kondensasyonu ile oluşmuş, molekül kütlesi yüksek makromoleküllerdir. Doğal olarak oluşan ve suda çözünme özelliklerine göre genellikle fülvik asit, hümik asit ve hümin gibi alt sınıflarda incelenen hümik maddeler, metal iyonlarının doğada taşınımı ve bitkiler tarafından kullanımı ve toprağın nem tutma kabiliyetinin arttırılması gibi önemli roller üstlenir. Literatürde immobilize edilmiş hümik asitler metal iyonları, aminobenzen, fenoller, ağır metal iyonları gibi çeşitli bileşikleri, sorpsiyonu üzerine odaklanmaktadır.

Hümik asitlerin katı taşıyıcılar üzerine immobilizasyonu ve çeşitli maddelerle etkileşimi, araştırmacılar için bir ilgi odağı olmuştur. Hümik asit immobilizasyonu nükleik asitlerin, proteinlerin ve çeşitli makromoleküllerin yapısal özelliklerinin incelenmesi için faydalı bir metot olduğu görülmüştür.

İmmobilizasyon amacıyla kullanılacak hümik asidin doğal yollarla oluşmuş olması, aynı yapı üzerinde hidrofobik, hidrofilik, aromatik, iyonlaşabilir ve elektron verici fonksiyonel grupları barındırması, sabit faz olarak kullanımını önemli kılmaktadır.

Amino asitler, peptitlerin ve proteinlerin yapı taşı olarak bilinmektedir ve tüm yaşayan organizmalarda yapısal, enerjik ve düzenleyici rol oynamaktadırlar.

Hemen hemen bütün gıdalar amino asit içermektedir. Amino asitler hem amino hem de karboksil grubuna sahip küçük organik moleküllerdir ve değişen R gruplarına göre asit-baz özellikleri göstermektedirler. Amino asitlerin dipolar (zwitterion) özellikleri herhangi bir ayırma yaklaşımında temel faktör oluşturmaktadır. Dipolar özellik göstermelerinden dolayı birbirlerinden ayrılmaları zor olmaktadır. Bu amaçla iyi bir ayrım sağlayabilmek için farklı türevlendirme metotları kullanılmaktadır.

Tıp, ilaç ve gıda sanayi gibi bir çok alanda amino asit analizleri yaygın olarak yapılmakta ve bu amaçla uzun süre kullanılan kolonlarda tekrarlanabilirlik açısından iyi sonuçlar elde edilememektedir. Ticari HILIC kolonlarla bile iyi bir ayrım gerçekleştirilememekte ve sorunlar yaşanmaktadır.

Bu çalışmanın amacı; HILIC ve RPLC şartlarında PTH amino asitlerinin ayrımı için geliştirilen immobilize hümik asitlerin sabit faz olarak kullanılabilirliğinin araştırılması, etkili, verimli ve tekrarlanabilirliği yüksek bir sabit fazın geliştirilmesidir.

Bu amaçla hümik asitler aminopropilsilika üzerine kimyasal olarak immobilize edilerek ayrım özellikleri sıcaklık, akış hızı ve % su gibi önemli parametreler kullanılarak kısmi faktöriyel kemometrik çalışmalarla ayırmaya etki eden kromatografik parametrelerin optimum şartları tespit edilecektir.

2. HÜMİK MADDELER

Humusun tanımlanması Romalılar dönemine kadar gitmektedir. Ancak bilim adamları 18. yüzyılda hümik asitleri keşfetmiştir. 1870 yılında ise Justus Von Liebig bitkilerin besinleri sadece inorganik formda alabildiklerini ve bitki besinlerinin önce mineral tuzlarına dönüşmesi gerektiğini açıklamıştır. Justus Von Liebig, organik maddece fakir bir toprağa suda çözünür formda azot, fosfor ve potasyum uygulamanın üretimi arttırdığını bulmuş ve humus teorisine şiddetle karşı çıkmıştır. Bu açıklamasından 10 yıl sonra Von Liebig büyük bir hata yaptığını fark etmiş olsa da itirafı kabul görmemiş ve humusun önemi ile ilgili yeni bulguları kaybolup gitmiştir. Bu olay tarımdaki dönüm noktalarından biridir. O zamandan beri dev kimya endüstrisinin de teşviki ile inorganik gübre kullanımı artmıştır. Dünya çapındaki tüm çiftçiler suni gübrelerin verimi kısa zamanda arttırmak için en iyi yol olduğuna inanmışlardır. Ancak kimyasal gübre uygulayıcıları inorganik gübrelerin organik maddelere ek olabileceğini ama asla yerlerini alamayacağını gözden kaçırmışlardır.

Toprakta hazırda bulunan kimyasal elementler her zaman yeterli miktarda değildir ve/veya yeterli miktarda olsalar bile bitkiler tarafından alınabilecek formda olmayabilirler. Bitkiler için optimum büyüme sağlamadaki en önemli problem, bitkinin ihtiyaç duyduğu zamanlarda kullanabileceği gerekli elementlerin toprakta bulunmamasıdır. Topraktaki organik maddelerin ana içeriği humustur. Humusun en aktif biyokimyasal maddesi ise hümik asittir. Ne yazık ki modern tarım uygulamalarındaki gelişmeler kimyasal gübre kullanımını arttırırken bu gübrelerin alınımını kolaylaştıran humusun hızla tükenmesine neden olmuştur. Bunun sonucunda da verim için her yıl gübre kullanılması ihtiyacı doğmuştur. Ancak son yıllarda modern tarımda toprak organik madde miktarını arttırmak için hümik madde uygulamalarının önemi anlaşılmaya başlanmıştır.

2.1. Humus ve Hümik Maddeler

Toprak organik maddesi; canlı, cansız ya da çürümüş (dekompoze) olan tüm organik maddeleri içeren bir terimdir. Tamamen çürümüş organik yapılar HUMUS olarak adlandırılır. En iyi humus kaynağı dekompoze olmuş bitki ya da kompost materyalleridir. Yüksek hümik asit içeriğine sahip hümatlar da uzun süreli ve iyi bir humus kaynağıdır. Hümik maddeleri görüldüğü gibi üç ana gruba ayırmak mümkündür.

2.2. Hümik Asit, Fülvik asit ve Hümin

Humus: Toprağın % 65-75'ini oluşturan temel maddesidir. Tamamen çürümüş organik maddelerden oluşur. Toprak verimliliğinde önemli rol oynar.

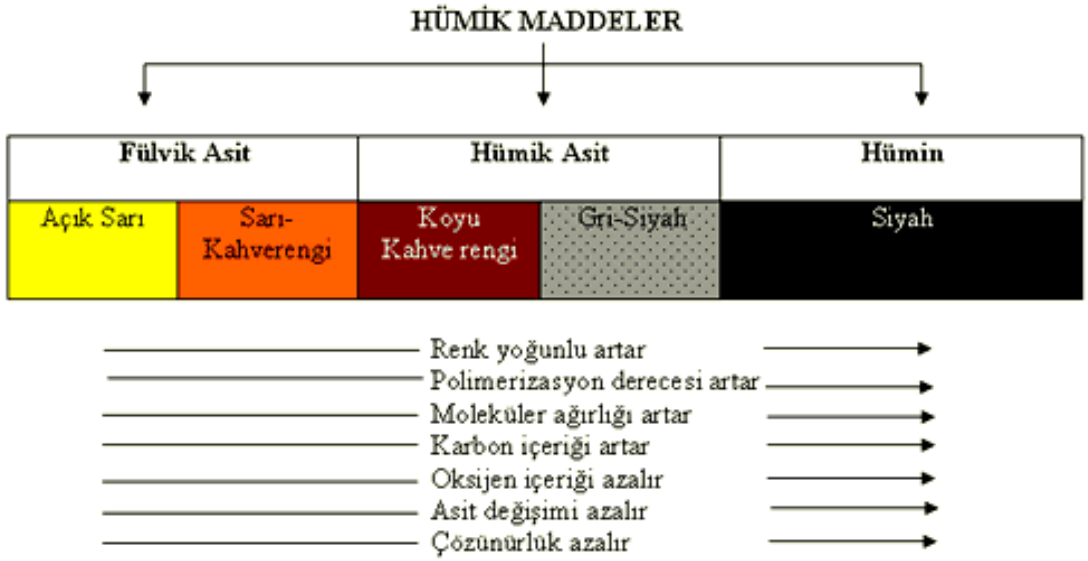
Hümik maddeler: Üç organik kalıntı olan hümin, fülvik asit ve hümik asitten oluşan kimyasal bir gruptur.

Hümik olmayan maddeler: Reçine, bal mumu ve organik asitler gibi çözünmez ve dekompoze olmamış organik maddelerdir.

Hümatlar: Hümik asit tuzlarıdır.

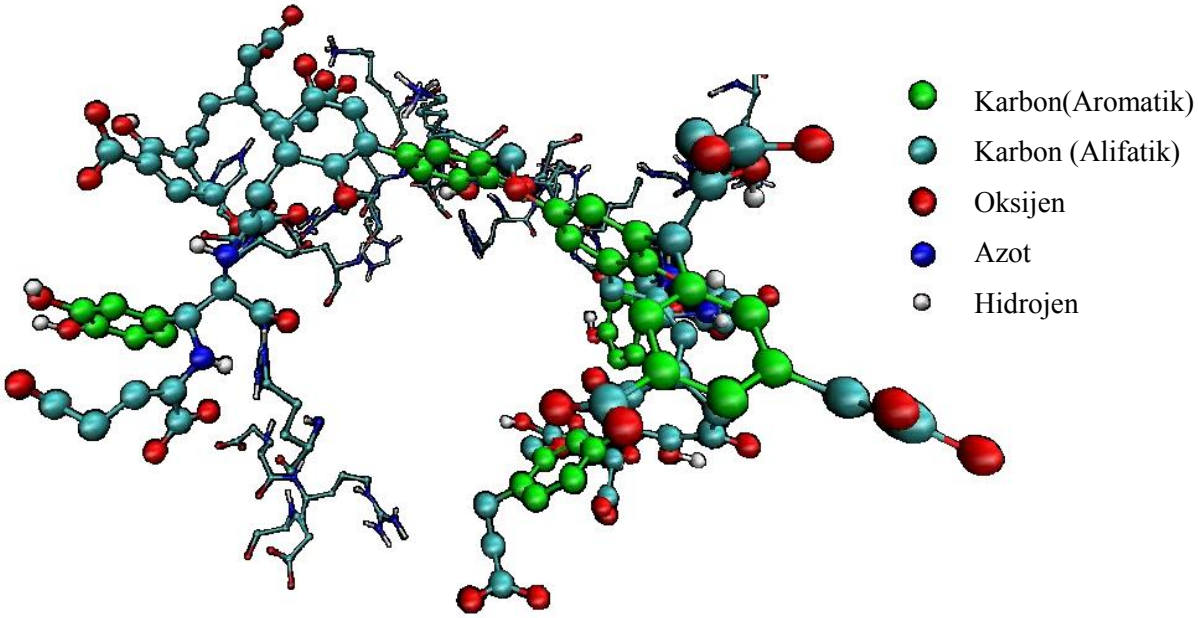
Fülvik asitler: Tüm pH koşulları altında suda çözünür formda olan hümik maddelerin bir bölümüdür. Fülvik asitlerin renkleri açık sarı kahverengidir. Hümik Asitler: Hümik asitler topraktan elde edilen ana bileşiklerdir. Koyu kahve-siyah renklidirler. Doğal olarak oluşan hümik asit moleküllerine bağlı 60'ı aşan farklı iz element çeşitli canlı organizmaların kullanımına hazır olarak bulunmaktadır.

Hümin: Hümik maddelerin asit yada alkali her hangi bir pH değerinde suda çözünemeyen bir bölümüdür. Moleküller yapıları çok büyüktür. Hümik maddeler içinde parçalanmaya en dayanıklı olandır.



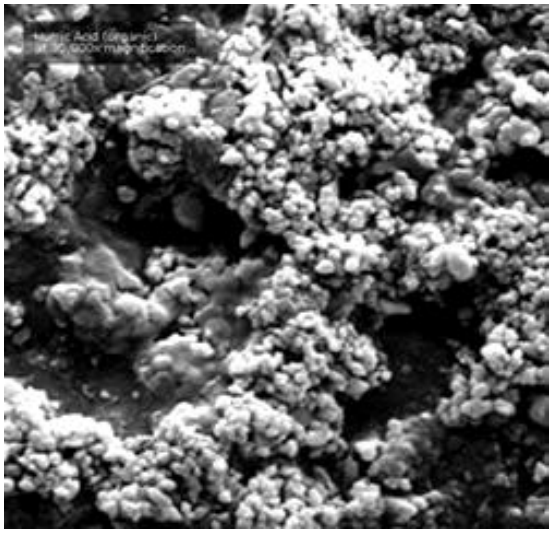
Şekil 1.1. Hümik Maddelerin Kimyasal Özellikleri

2.3. Hümik Asidin Yapısal Özellikleri



Şekil 2. 1. Hümik Asit Yapısı

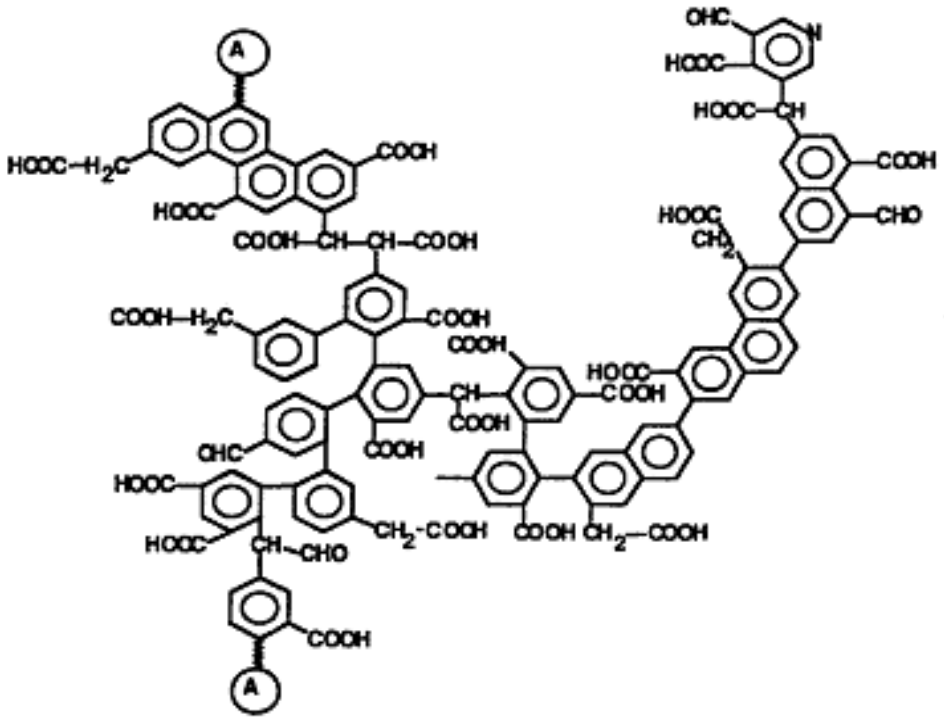
Yukarıda da bahsedildiği gibi bitki kalıntıları çürüdükleri zaman fülvik ve hümik asitlerin her ikisi de oluşur. Her iki asitte toprak ve topraktaki mikro organizmalar için yaralıdır. Fülvik asit hümik aside göre daha küçük bir moleküler yapıya sahiptir. Bunun sonucu olarak kalıcılığı daha azdır ve daha kolay parçalanır. Fülvik aside göre daha büyük bir moleküler yapıya sahip olan hümik asit ise toprakta uzun süre kalır ve zaman içerisinde yavaş yavaş parçalanır. Genel olarak toprak organik madde miktarını arttırmada uzun süreli etkilerinden dolayı hümik asitlerden faydalanılır.



Şekil 2. 2. Hümik Asidin SEM görüntüsü

2.4. Hümik Asidin Yapısı ile İlgili Teoriler

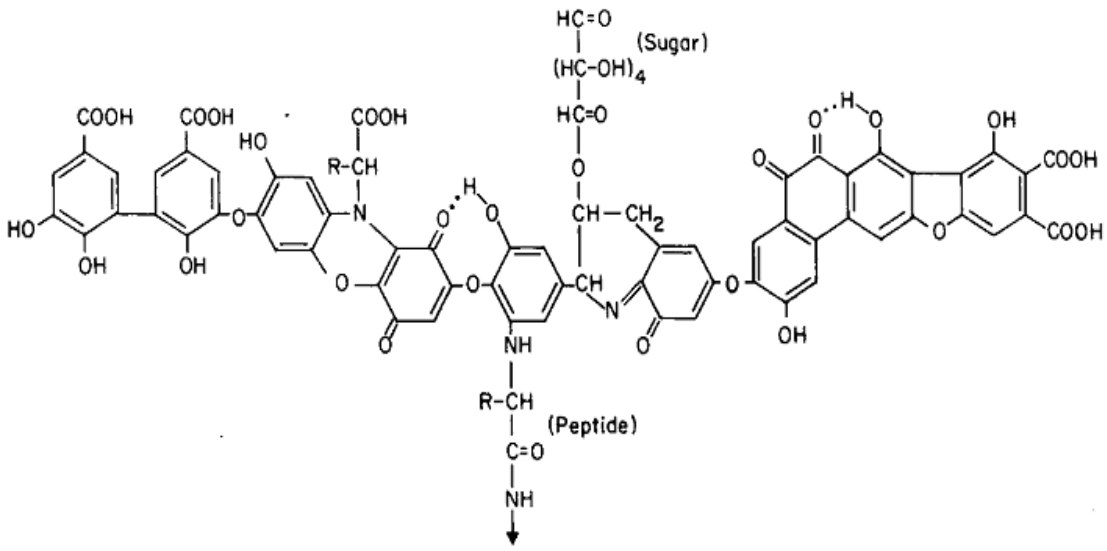
Hümik Asit Modeli (Andosol)



Şekil 2. 3. Hümik asidin yapısı (Andosol 1994)

Andosol'un iki boyutlu hümik asit ile ilgili teoremi hümik asit yapısında aromatik halkaların ve -COOH gruplarının çoğunlukta olduğuna ifade eder. Andosol bu yapıyı tasarlarken hümik asidin yapısını aromatik ve karboksilik bir temele dayandırmıştır.

Hümik Asit Molekül Yapısı Modeli (Stevensen)

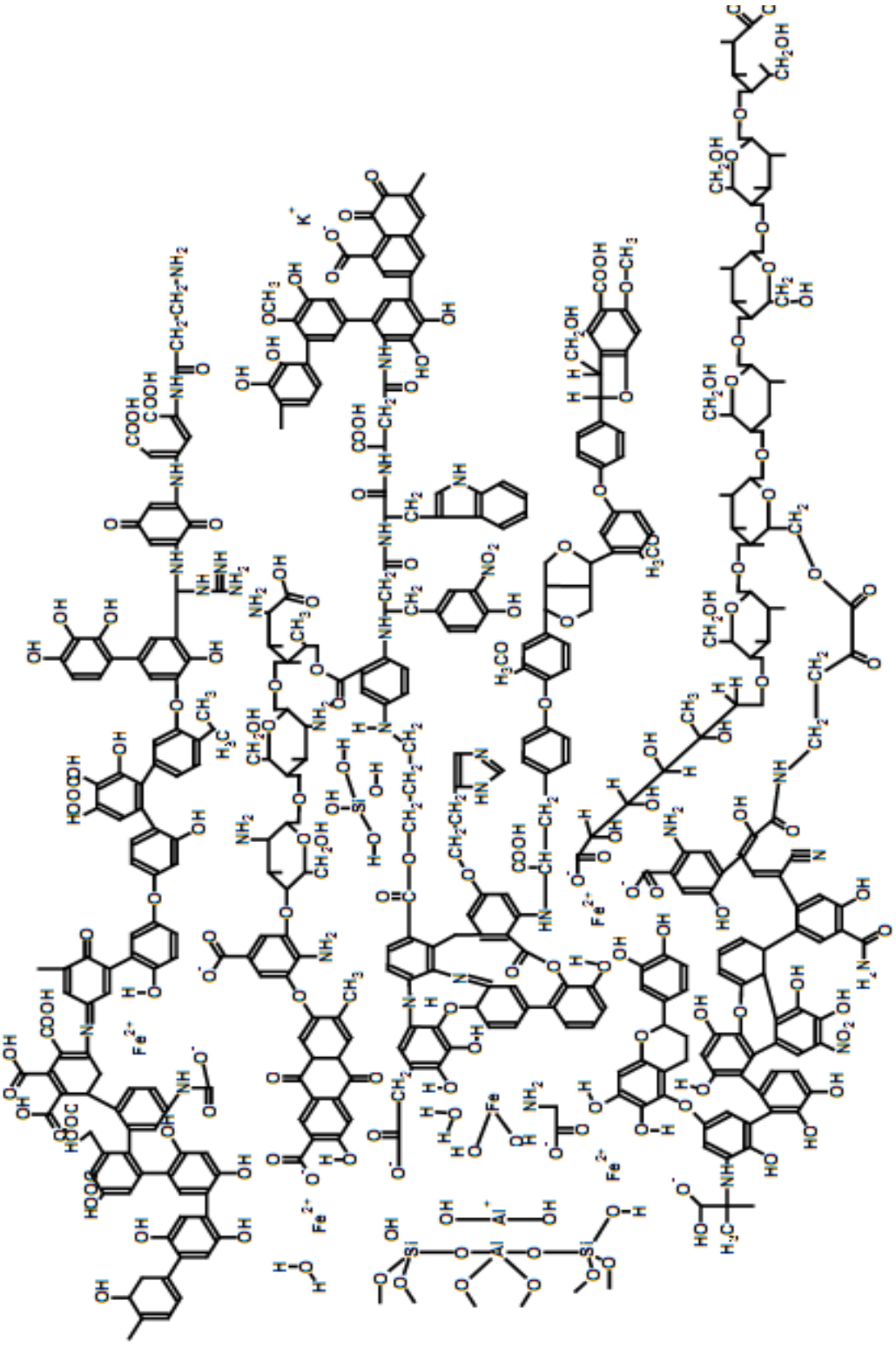


Şekil 2. 4. Hümik Asidin Molekül Yapısı (Stevensen 1982)

Stevensen; Hümik asit modeli de bol miktarda aromatik halkalardan oluşmaktadır. Bu modelde -COOH ve -OH gruplarının sayısı birbirine yakın miktarda olduğu gözükmektedir. Peptit ve şeker gruplarına da sahip olduğu belirtilmektedir.

Aşağıdaki Kleinhempel Hümik asit modeli de incelendiğin de hümik asidin bünyesindeki ortak yapılar olarak aromatik yapılara sahip olduğu -COOH ve -OH sahip olduğu ayrıca diğerlerinden farklı olarak alifatik grupların bulunduğu bünyesinde silika ve alümina kısımlarının varlığı, N ve aldehit kısımların olduğu amin, amid, peptit, şeker uçlarına sahip olduğu, metal iyonları ile kompleks oluşturabildiği ve doğal bir makromoleküler yapıya sahip olduğu düşünülmektedir.

Hümik Asit Modeli (Kleinhempel)



Şekil 2. 5. Hümik Asidin Molekül Yapı (Kleinhempel)

2.5. Hümik Asidin Etkileşim Türleri

Çizelge 2. 1. Hümik Asit Etkileşim Türleri

Yapısal Kısım	*Etkileşim Tipi*
-COOH	İyon değişimi, kompleks oluşturma
-OH >C=O	Kompleks, hidrojen bağlama, indirgeme-oksidasyon
	Verici-alıcı reaksiyonlar (Şarj-transfer kompleksleri)
CH_n	Hidrofobik etkileşim

2.6. Hümik Asitlerin Fizikokimyasal Özellikleri

Hümik asitlerin fizikokimyasal özellikleri iki başlık altında incelenebilir:

- Maddelerle Etkileşme Mekanizmaları,
- Sulu Ortamda Çözünme Özellikleri,
- Katyon Değişim Kapasitesi (CEC): Pozitif yüklü iyonların (katyonların) tutulması ve bırakılmasıdır,
- Metal iyonları ile kompleks yaparak ligand değişim özelliği..

2.6.1. Hümik asitlerin maddelerle etkileşme mekanizmaları

Hümik asitlerin yapılarında çok sayıda fonksiyonel grup bulunmaktadır. Bu grupların sayesinde maddelerle etkileşebilme olanağına sahiplerdir. Yapılarındaki bu gruplarla hümik asitler maddelerle aşağıdaki türde etkileşim yaparlar:

- İyon Değişimi:-COOH ve kısmen -OH grupları
- Kompleks Oluşumu: -COOH, -OH, $-NR_2$, -SH, heterosiklik yapılar
- Adsorpsiyon: Polar ve apolar yapılar

Redoks Tepkimeleri; Kinon ve hidrokinon yapıları, iyon değişiminde maddelerle hümik asitlerin etkileşiminde, metal iyonu polielektrolitteki aynı yüklü iyonla yer değiştirir. Bu işlemdeki başlıca yürütücü güç, elektorstatik etkileşmeler ve metal iyonlarının dehidrasyonudur. Hümik asitlerdeki asidik karboksil grupları, metal

iyonlarının elektrostatik olarak bağlanabileceği bölgelerdir. Karboksil grupları, hümik asit molekülünde zayıf, orta kuvvette ve kuvvetli katyon iyon değiştirici bölgeleri teşkil eder.

Metallerin hümik asitlere tutunabileceği bir diğer yol ise kompleks oluşumudur. Metaller hümik asidin yapısında bulunan gruplarla o-fitalat da olduğu gibi iki -COOH grubu arasına ya da salisilatta olduğu gibi bir -COOH ve bir -OH grupları arasına bağlanabilirler. Metal iyonları bu bölgelere koordine kovalent bağlarla bağlanırlar. Yine metaller hümik asitlere karboksil ve fenolik hidroksil grupları arasında metal iyonunun şelatlaşması, bir karboksil grubuyla metal iyonunun kompleksleşmesi veya fenolik hidroksil ve fenolik eter grupları ile metal iyonunun kompleksleşmesi şeklinde de bağlanabilirler (Pandey, A., 1999), (Sahu, S., 1996).

Metal-hümat kompleksinin dayanıklılığını sorgulamak için, durum kararlılık sabitleri hesaplanır. Bunun için de, toplam ligand konsantrasyonunun bilinmesi gereklidir. Fakat hümik asidin heterojenliği nedeniyle bu değerin deneysel olarak tespit edilmesi oldukça zordur. İlk yaklaşım olarak standart metotlara göre - COOH, fenolik ve enolik - OH gruplarından elde edilmiş bir değerlendirme yapılmıştır. Toplam asitlik değerini kullanmak mümkündür ama toplam asitlik değeri uygulanan metoda bağlıdır. (Stevenson, F. J., 1982), (Senkyr, J., 1999).

2.6.2. Sulu ortamda çözünebilme özellikleri

Sulu çözelti ortamında metal iyonlarına tutabilmeleri, tutulan iyonları yüksek pH' lar da bırakabilmesi, rejenere edilebilme özellikleri hümik asitleri önemli kılmaktadır. Fakat bütün hümik madde kaynaklarından alkali ekstraksiyonu yoluyla elde edilen hümik ve fulvik asitler, pH>3 olan bütün sulu çözeltilerde az veya çok çözünürler ve bu özelliklerinden dolayı doğrudan adsorban madde olarak kullanılmaları mümkün değildir. Bu nedenle sulu ortamda hümik asidin adsorban/iyon değiştirici katı madde olarak kullanılması zordur.

Sulu ortamdan, özellikle metal iyonlarının geri kazanılması, giderilmesi, ön-deriştirilme gibi işlemlerde hümik asidin özelliklerinden faydalanabilmek için uygun bir işleme tabi tutularak çözünürlüğünün azaltılması gerekir. Bunun için uygulanan başlıca iki yöntem aşağıdaki gibidir.

- Hümik asidin çözünürsüzleştirilmesi.

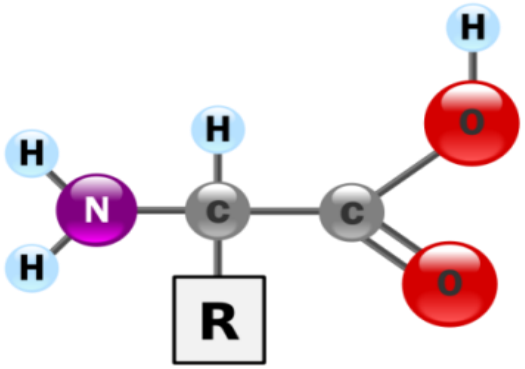
- Hümik asidin katı bir destek maddesine immobilize edilmesi.

Hümik asitler bu yöntemler denenerek klasik analitik yöntemler veya bir HPLC kolonuna doldurularak kullanılmaktadır. Bu şekilde metal tutma kapasiteleri değerlendirilmektedir. Son yıllarda HPLC de sabit faz olarak ve katı faz ekstraksiyon sistemlerinde de kullanılmaya başlanmıştır.

3. AMİNO ASİTLER

3.1. Amino Asit Tanımı

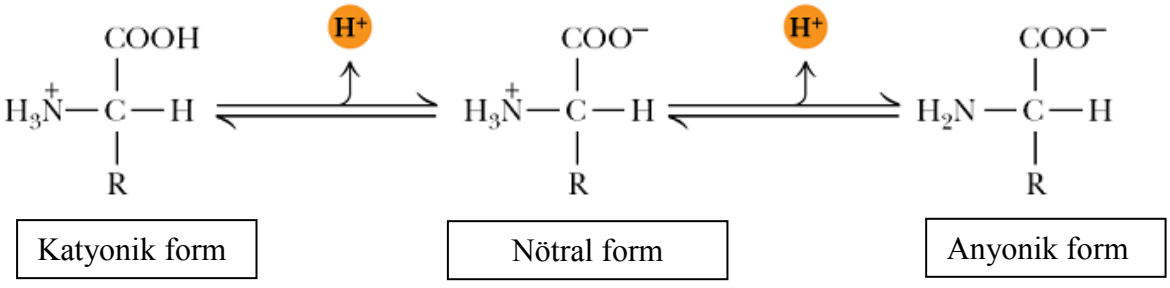
Amino asitler, yapılarında hem amino grubu ($-NH_2$) hem de karboksil grubu ($-COOH$) içeren bileşiklerdir. Doğada 300 kadar farklı amino asit bulunmaktadır. Amino asitlerin standart amino asitler diye bilinen 20 tanesi, karakteristik sayı ve diziliş sırasında bir düz zincirde birbirlerine kovalent olarak bağlanarak proteinleri oluştururlar. Standart amino asitler, DNA tarafından kodlanan ve proteinleri oluşturan birimlerdir.



Şekil 3. 1. Bir amino asidin genel yapısı

3.2. Standart Amino Asitler

Standart amino asitler, aynı karbon atomuna bağlanmış bir amino grubu ve bir karboksil grubu içerirler. Fizyolojik pH'da, amino grubu proton taşır ve pozitif yüklüdür; karboksil grubundan ise proton ayrılmıştır ve negatif yüklüdür.



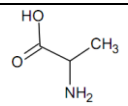
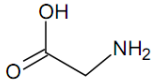
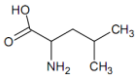
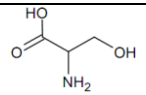
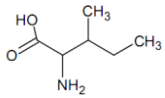
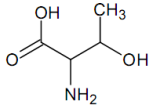
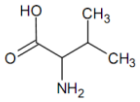
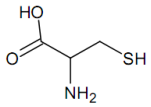
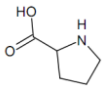
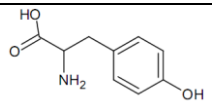
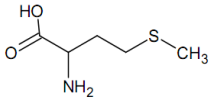
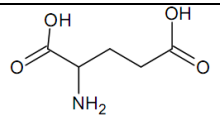
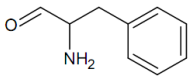
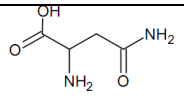
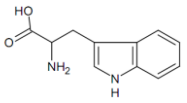
Şekil 3. 2. Amino asitlerin katyonik, anyonik ve nötral formu

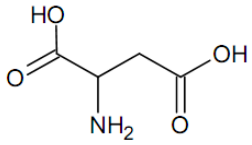
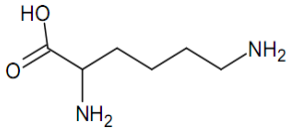
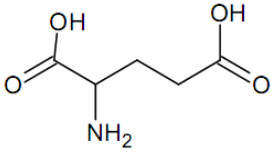
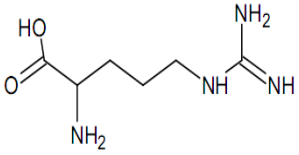
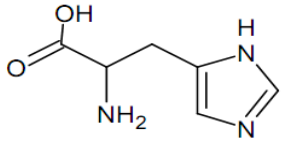
Standart amino asitlerde amino ve karboksil gruplarının bağlı olduğu karbon atomu α-karbon atomu diye anılır. R grubu bir zincirde ek karbonlar içeriyorsa bu karbonlar β, γ, δ, ε gibi harflerle belirtilirler.

Standart amino asitler birbirlerinden yan zincirlerindeki yani R gruplarındaki yapı, büyüklük, elektrik yükü, amino asidin sudaki çözünürlüğüne etkisi bakımından farklıdırlar. Bazı amino asitler, fizyolojik pH'da, amino grubundaki pozitif yüke ve karboksil grubundaki negatif yüke ek olarak yan zincirde de bir yük taşımaktadırlar. Bazı yan gruplar polar iken bazı yan gruplar apolardır. Amino asitlerin fonksiyonları ve protein yapısındaki rolleri yan zincirlerinin kimyasal özellikleri ile bağlantılıdır.

Standart amino asitler, kimyasal özelliklerinin kolay anlaşılması için, R yan gruplarının özellikle polarite veya biyolojik pH'da su ile etkileşmeye eğilim özelliklerine göre de dört sınıfta değerlendirilirler.

Çizelge 3. 1. Standart Amino Asitler

Hidrofobik Amino Asitler				Hidrofilik Amino Asitler			
Amino asit	**pH=6-7 yapısı**	**MA**	**pKa**	**Amino asit**	**pH=6-7 yapısı**	**MA**	**pKa**
Alanin (Ala)		89	2.35, 9.69	Glisin (Gly)		75	2.35, 9.69
Lösin (Leu)		131	2.36, 9.60	Serin (Ser)		105	2.36, 9.60
İzolösin (İle)		131	2.36, 9.68	Tironin (Thr)		119	2.36, 9.68
Valin (Val)		117	2.36, 9.68	Sistein (Cys)		121	2.36, 9.68
Proline (Pro)		115	1.99, 10.60	Tiyrosin (Tyr)		181	1.99, 10.60
Methionin (Met)		149	2.28, 9.21	Gulutamin (Gln)		146	2.28, 9.21
Fenilalanin (Phe)		165	1.83, 9.13	Asparajin (Asn)		132	1.83, 9.13
Triptofan (Trp)		204	2.38, 9.39				

Asidik Amino Asitler				Bazik Amino Asitler			
Amino asit	**pH=6-7 yapısı**	**MA**	**pKa**	**Amino asit**	**pH=6-7 yapısı**	**MA**	**pKa**
Aspartik Asit (Asp)		133	2.09, 3.86, 9.86	Lisin (Lys)		133	2.18, 8.95, 10.53
Glutamik Asit (Glu)		147	2.19, 4.25, 9.67	Arginin (Arg)		133	2.17, 9.04, 12.48
				Histidin (His)		155	1.82, 8.95, 10.53

3.3. D- ve L-Amino Asitler

D ve L simgeleri amino asitlerin polarize ışığı sağa ya da sola çevirdikleri anlamına gelmez, sadece D- ve L-gliseraldehide benzerliklerine göre amino asitlerin D ve L serisine dahil olduklarına işaret eder.

Amino asitlerin doğal olanları L serileridir. Canlı organizmalar daima L-amino asitleri kullanırlar. Bitkisel ve hayvansal proteinlerin yapımında sadece L-amino asitler katılırlar. D-amino asitleri ise genellikle bakterilerin hücre duvarlarında bulunurlar (D-glutamik asit vb). Bazı insekt larvalarından ya da krizalitlerinden elde edilen D-alanin ve yer solucanından elde edilen D-serin diğer örnekleri oluştururlar.

3.4. Amino Asitlerin HPLC de Analizi

Standart amino asitleri ayırmak için dağılma kromatografisi, iyon-değişim kromatografisi ve elektroforez gibi teknikler kullanılmıştır. Bunun için amino asitlerin asit-baz özellikleri, polariteleri ve çözünürlüklerindeki farklarından faydalanılmıştır. Analit ile sabit faz arasında ki iyonik etkileşimler, grupları ayırmak için en önemli faktörlerdendir. Ancak, hidrofobik Van der Walls ve π-π aromatik etkileşimler ise gruplar içerisindeki ayrımdan sorumludur. HPLC de en baskın sabit faz, modifiyeli silika sabit fazlar ve oktadesil silikadır. Bu sabit fazlarla ayrımlarda hidrofobik etkileşim en baskın etkendir.Tipik oktadesil silika dolgu maddesine sahip kolonlarda polar amino asitler zayıf tutunmakta apolar amino asitler ise güçlü tutunmaktadır. Polar amino asitlerin ayrımı için en çok tavsiye edilen iki strateji vardır.

- Türevlendirme
- Mobil faza iyon çifti reaktiflerin katılması

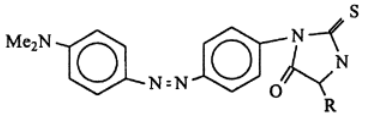
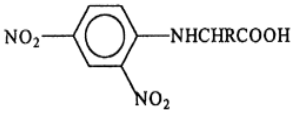
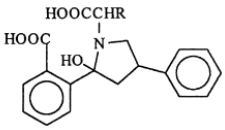
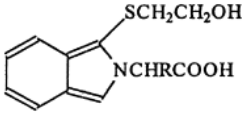
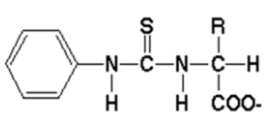
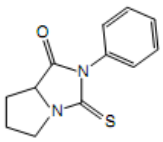
Alkil sülfat/sülfonatlar mobil faza katılarak mobil faz form miseller tabaka etkileşimi ile sabit faz ve amino asitler arasında karma bir mekanizma iyon çifti ve dinamik iyon değişimi gözlenmektedir. Sodyumdodesilsülfat en çok kullanılan iyon çifti reaktifidir. Türevlendirilmemiş amino asit tayini en yaygın olarak UV dedektör ile 200-210 nm yapılmaktadır. Bunlardan başka elektrokimyasal ve floresans dedektörler kullanılmaktadır. Son olarak ELSD dedektörün keşfi türevlendirilmemiş amino asitlerin analizine daha kolay bir alternatif oluşturmaktadır.

3.4.1. Post kolon türevlendirme

Türevlendirilmemiş amino asitlerin kromatografik ayrımı on-line türevlendirilme ya da post kolon türevlendirme ile direkt olarak yapılabilir. Ninhidrin ile türevlendirme ilk rapor edilen amino asit türevlendirme metodudur. Modern post kolon türevlendirme metotları gelişmiş aletlerle yüksek çözünürlükte ve hassaslıkta başarılmaktadır. Böyle sistemler pompa ve valf sistemi gerektirir ve bu sistemler tamamen bir bilgisayar ile otomatik olarak kontrol edilmektedir. Bu metodun en büyük dezavantajı gelişmiş ve karmaşık sistemlere ihtiyaç duyulmasıdır. OPT en yaygın post kolon türevlendirme reaktifidir. Post kolon türevlendirme genel olarak amino asit tayininde kullanılmaktadır. Çünkü arttırılmış tayin hassaslığı, gelişmiş ayırma verimliliği gibi önemli avantajlar sunmaktadır.

3.4.2. Türevlendirilmiş amino asitlerin analizi

Çizelge 3. 2. Türevlendirilmiş Amino Asitler ve türevlendirme reaktifleri

Türevlendirme reaktifi	Türevlendirilmiş amino asidin yapısı
Dimetilamino Azobenzen izotiyosiyanat (DABITC)	
Florodinitrobenzen (DNP)	
Fluorescamine	
Orto-pthaldialdehyde (OPA)	
Phenyisothiocyanate (PITC/PTC)	
Phenylthiohydantoin (PTH)	

En yaygın olarak kullanılan türevlendirme ajanları (dansyl, DNP, PTH) hazır bir şekilde kitlerde HPLC analizinde referans standart olarak kullanılmaktadır. PTH türevi özel bir değer sunar. Çünkü bu teknik peptitlerin ve proteinlerin temel yapısının tayininde çoğunlukla kullanılmaktadır. PTH türevlendirmeleri normal ve ters faz gibi bir çok farklı sabit fazda 254 nm de ayrılabilmektedir. Ters faz ayırmalar çoğunlukla uygun tamponların ilavesi ile asidik şartlarda yürütülmektedir. Bu metodun avantajları keskinlik, tekrarlanabilirlik ve geniş araştırma literatürdür. PTH türevlendirmenin alternatifi MTH formuna türevlendirmedir. Bu metot katı faz sıralımı için uygun bir metoddur. Dabsyl chloride, DABITC' e manuel sıralanma için kullanılacak türevlendirme ajanı bakımından bir alternatifdir. Bu türevlendirilmiş yapı aylarca bozunmadan kalabilir. Bu metot bize seçicilik, kolaylık, hazırlanma hızı ve yüksek çözünürlük yetenekleri sunar. DNP türevli amino asitler hem normal hem de ters fazda analiz edilmektedir. Bu metodun dezavantajları düşük tayin hassaslığı ve düşük ayırım gücüdür.

3.4.3. HPLC de Amino Asit Ayrımının Avantajları

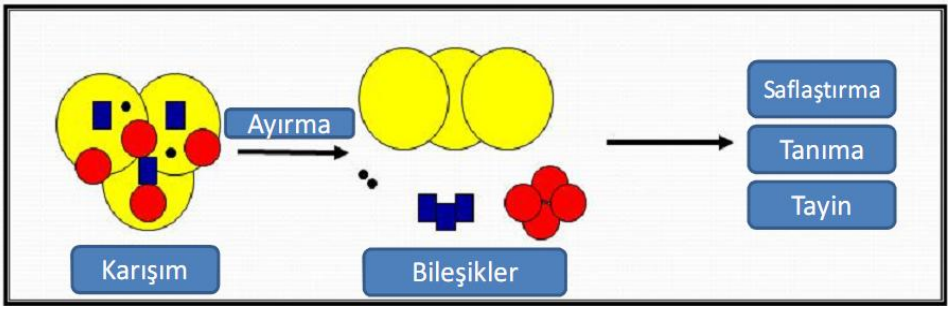
HPLC, GC ve TLC ile kıyaslandığında yüksek ayrım gücü, yüksek hassaslık, düşük maliyet, kısa analiz zamanı, çok yönlü optimizasyon şeması ve esneklik gibi önemli avantajlar sunar. HPLC de kütle spektroskopisinin kullanımı ona avantaj sağlamaktadır. HPLC de ayırmalarda uygulanacak metot ayrımını yapılacak maddelerin fiziksel ve kimyasal özellikleri ile yakından ilgilidir. Çok yönlü dinamik sistemlerde seçilen metodun hassas, kesin ve doğrusallığı çok önemli bir faktördür. Türevlendirme sisteminde otosampler kullanılması metodun takrarlanabilirliğini büyük oranda arttırabilir. Bu sistemlerde otosampler ile çok düşük oranlarda çalışılmakta ve daha kesin sonuçlar elde edilmektedir. HPLC ile ayırmalarda yeni kolonlar geliştirilmekte ve sabit fazlar üretilmektedir Ayrıca yeni metotların geliştirilmesi ve yeni sabit fazların sentezlemesi bu tekniğin devamını ve uygulama alanını genişletmekte ve arttırmaktadır. Bu sayede tüm amino asitler çok düşük miktarlarda tek bir enjeksiyonla aynı kolonda ayrılmakta, zamandan ve çözücüden tasarruf sağlanmaktadır. Kolonlarda kullanılan dolgu maddelerinin mikrometre boyutunun küçülmesi ile kolon verimliliği daha da artmakta ve sonuçlar daha kısa zamanda elde edilmektedir.

4. KROMATOGRAFİ

Genellikle, kimyasal tayin yöntemleri seçici olup çok azı spesifiktir. Analitik işlemlerde analitin girişim yapabilecek maddelerden ayrılması çoğu zaman zorunludur. Yirminci yüzyılın ortalarına kadar analitik ayırmalar, çöktürme, damıtma, ekstraksiyon gibi klasik yöntemlerle yapılıyordu. Günümüzde analitik ayırmalar, özellikle numune çok bileşenli ve karmaşık ise, çoğunlukla kromatografi ve elektroforez ile yapılmaktadır.

Kromotografi, bilimin tüm dallarında uygulaması bulunan güçlü bir ayırma yöntemidir. Yirminci yüzyılın başında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından bulunmuş ve onun tarafından isimlendirilmiştir. Tswett bu tekniği, toz kalsiyum karbonat doldurulmuş bir cam kolondan bitki pigmentleri çözeltisini geçirerek klorofil ve ksantrofil gibi birçok bitki pigmentini ayırmada kullanmıştır. Ayrılan maddeler kolonda renkli bantlar şeklinde gözüktüğünden, yöntem için kromatografi adını kullanmıştır. Chroma-renk Graphein-yazma anlamına gelmektedir. Son on yılda, birçok yeni kromatografik teknik gelişmekte ve araştırmacıların karmaşık karışımları ayırmak için daha iyi tekniklere gereksinimleri arttığı için, kromatografik uygulamalar çok büyük oranda artmaktadır.

Kromatografi, karışımlarda bulunan birbirine yakın özellikteki maddeleri ayırmak için kullanılan birçok farklı yöntem içerir. Bütün kromatografik ayırmalarda numune gaz, sıvı veya bir süperkritik akışkan olan hareketli faz ile taşınır. Bu hareketli faz bir kolonda veya bir katı yüzeyde sabitleştirilmiş kendisi ile karışmayan bir durgun faz içinden geçmeye zorlanır. Bu iki faz, numune bileşenlerinin hareketli ve durgun fazlarda farklı oranlarda dağılacağı şekilde seçilir. Durgun faz tarafından kuvvetli tutulan numune bileşenleri, hareketli fazın akışıyla çok yavaş hareket ederler. Buna karşılık, durgun faz tarafından zayıfça tutulan bileşenler hızlı hareket ederler. Bu hareket hızlarının farklılığı sonucu, numune bileşenleri birbirlerinden kalitatif ve/veya kantitatif olarak analizlenebilen farklı bantlar veya bölgeler şeklinde ayrılırlar.



Şekil 4. 1. Karışımların ayrılması

Kromatografi: Bir karışımı oluşturan bileşenlerin hareketli bir faz yardımıyla sabit bir faz üzerinde değişik hızlarda hareket etmeleri ve fiziksel ve kimyasal özelliklerindeki farklılıkların faydalanılarak birbirlerinden ayrılması esasına dayanan güçlü bir ayırma yöntemidir.

4.1. Kromatografi Sınıflandırılması

4.1.1. Uygulanan Metoda Göre

- *Kolon kromatografi*
- *Kağıt Kromatografisi*

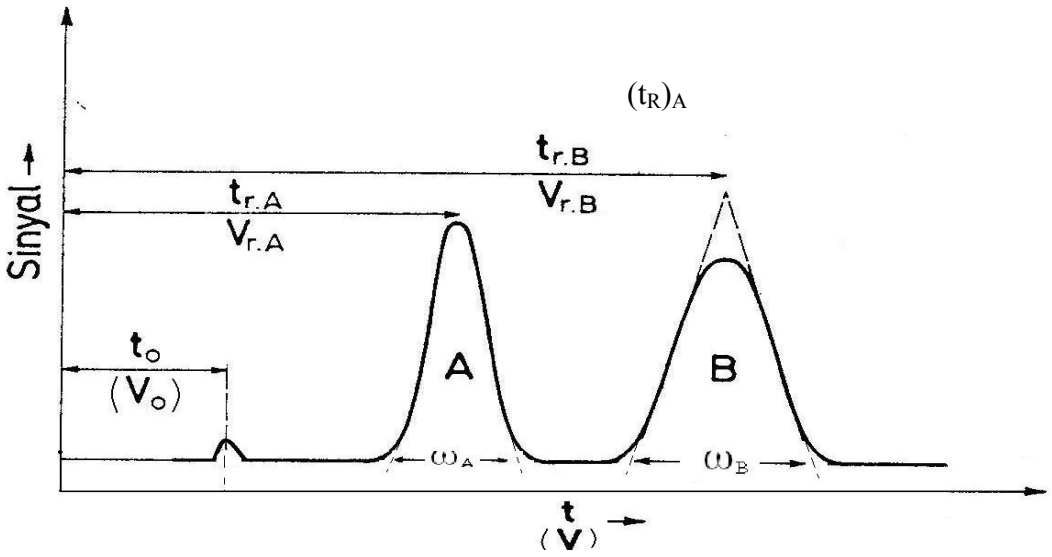
4.1.2. Hareketli Faza Göre

- *Sıvı Kromatografi*
- *Gaz kromatografi*
- *Süperkritik Akışkan Kromatografi*

4.1.3. Sabit Faza Göre

- *Adsorpsiyon Kromatografi*
- *Dağılma Kromatografi*
- *İyon Değişimi Kromatografi*
- *Boyut Eleme Kromatografi*

Kromatogram: Çözünen maddenin derişimlerine cevap veren bir detektör, kolon çıkışına yerleştirilirse ve detektör sinyali zamanın (veya kullanılan hareketli faz hacminin) bir fonksiyonu olarak kaydedilirse, Kromatogram adı verilen bir seri pik elde edilir.



Şekil 4. 2. Örnek bir kromatogram

Alıkonma Zamanı (t_R): Numune Enjeksiyonundan sonra analit pikinin dedektöre ulaşması için geçen zamana denir.

Ölü Zaman (t_M): Kolonda tutunmayan maddenin dedektöre ulaşması için geçen zamandır.

Kapasite Faktörü(k'): Kolonda çözünenin göç hızını açıklamak için kullanılan önemli bir terimdir.

Seçicilik Faktörü (α): Kolonun iki piki ayırabilme kabiliyetini gösterir.

Ayırma Gücü (Rs): İki pikinin birbirinde ayrılma derecesini gösterir.

Tabaka Sayısı (N): Kromatografik kolon verimliliğinin bir ölçüsüdür.

Çizelge 4. 1. Kromatografik hesaplamalarda kullanılan eşitlikler

Kapasite faktoru	$k' = (t_R - t_M)/t_M$	$k' = \frac{KV_S}{V_M}$
Dagilma katsayisi	$K = \frac{k'V_M}{V_S}$	$K = \frac{c_S}{c_M}$
Secicilik faktoru	$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$	$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} = \frac{K_B}{K_A}$
Ayirma gucu	$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$	$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4}\left(\frac{\alpha - 1}{\alpha}\right)\left(\frac{k'_B}{1 + k'_B}\right)$
Tabaka sayisi	$N = 16\left(\frac{t_R}{W}\right)^2$	$N = 16R_s^2\left(\frac{\alpha}{\alpha - 1}\right)^2\left(\frac{1 + k'_B}{k'_B}\right)^2$
Tabaka yuksekligi	$H = L/N$	
Alikonma zamani	$(t_R)_B = \frac{16R_s^2H}{u}\left(\frac{\alpha}{\alpha - 1}\right)^2\frac{(1 + k'_B)^3}{(k'_B)^2}$	

4.2. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)

Sıvı haldeki hareketli fazın düşük parçacık ebatına sahip kromatografik kolona doldurulan sabit faz üzerinden yüksek akışlarda geçirilmesini özel teçhizatlarla mümkün kılan bir kromatografik tekniktir.

Bu bölüm, hareketli fazın sıvı olduğu dört ayrı temel kromatografi tipi ile ilgilidir. Bunlar; dağılma kromatografisi; adsorpsiyon kromatografi veya sıvı-katı kromatografisi; iyon değiştirme kromatografisi; ve boyut eleme veya jel kromatografisi. Bu bölümün büyük bir kısmı, bu dört önemli kromatografi tipinin kolon uygulamaları ile ilgilidir.

Bu teknoloji, klasik yer çekimi-akışlı sıvı kromatografinin basit cam kolonlardaki durumun aksine, yüksek basınçta çalışan, gelişmiş cihazlara ihtiyaç gerek duymaktadır. Yüksek performanslı sıvı kromatografi bütün analitik ayırma teknikleri arasında, bir milyar dolara yaklaşan yıllık satışıyla, en yaygın kullanılanıdır.

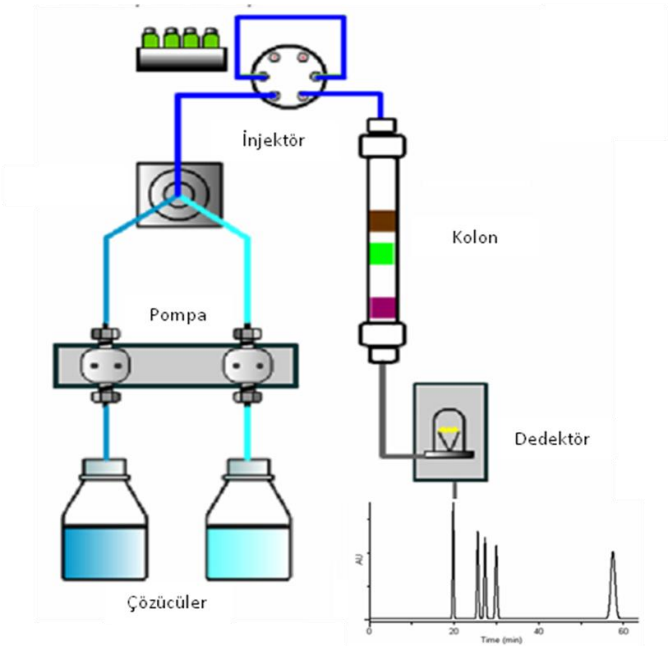
Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri:

- duyarlılığı
- doğru kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması
- uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması
- sanayinin, birçok bilim dalının ve halkın birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliği

Bu gibi maddelere örnek olarak:

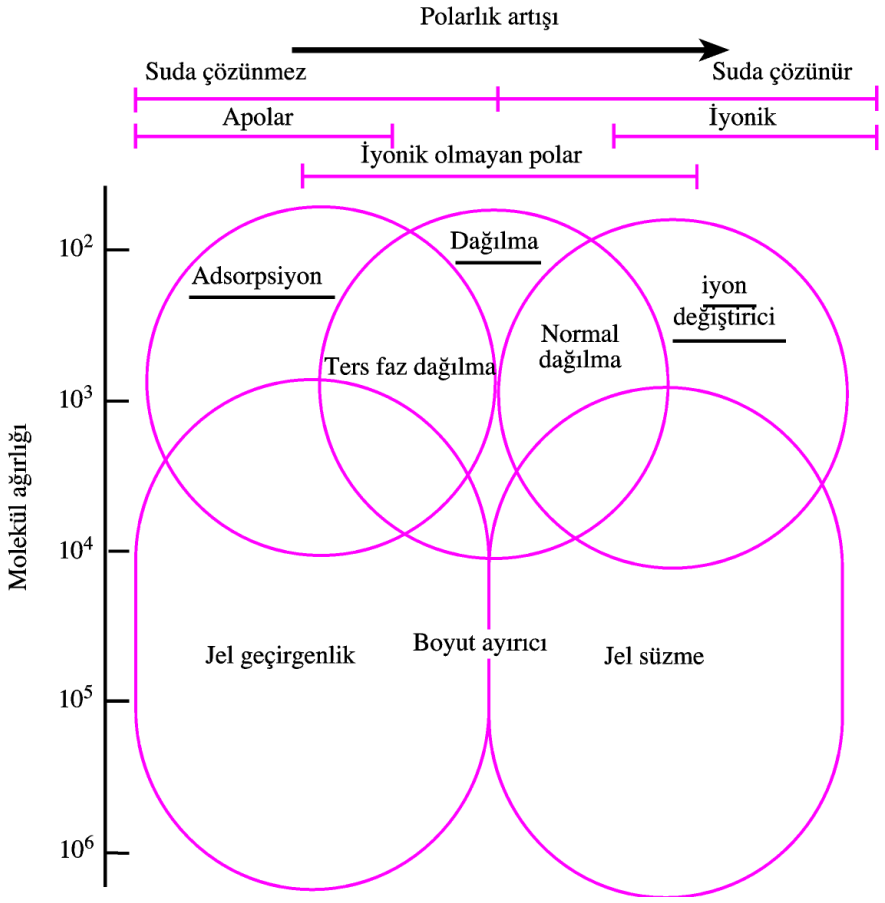
Amino asitler, Proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, terpenoidler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal-organik türler ve çeşitli inorganik bileşikler sayılabilir.

Sıvı kromatografi işlemlerinin, uygulama alanları bakımından birbirini tamamlama eğiliminde olduğu göstermektedir.



Şekil 4. 3. Klasik sıvı kromatografi cihazı (Chrome academy)

4.2.1. Sıvı kromatografinin uygulamaları



Şekil 4. 4. Sıvı kromatografide uygulanan ayırma modları (Skoog)

4.2.1.1. Dağılma kromatografisi

Dağılma kromatografisi en çok kullanılan sıvı kromatografi uygulamalarını kapsamakta ve genellikle sıvı-sıvı ya da bağlı-faz olarak iki alt kısma ayrılır.
Sıvı-Sıvı kromatografi: Bir sabit faz üzerine gerekli sıvının fiziksel olarak tutturulmasına dayanan ve ilk kullanılan tekniklerdendir.
Bağlı-Faz kromatografi: Kolon dolgu maddesinin yüzeyine kimyasal olarak istenilen fonksiyonel gruplara sahip maddelerin bağlanmasıdır.
Sabit faz ile hareketli fazın polaritesine göre Normal-Faz ve Ters-Faz olarak iki kısma ayrılır.

Sıvı kromatografi ile ayırma tekniğinde maddelerin sabit faza ve hareketli faz olan ilgilerinden faydalanılarak ve bu ilgi sayesinde değişik hızlarda hareket etme esasına dayalı bir ayırma yapılmaktadır.

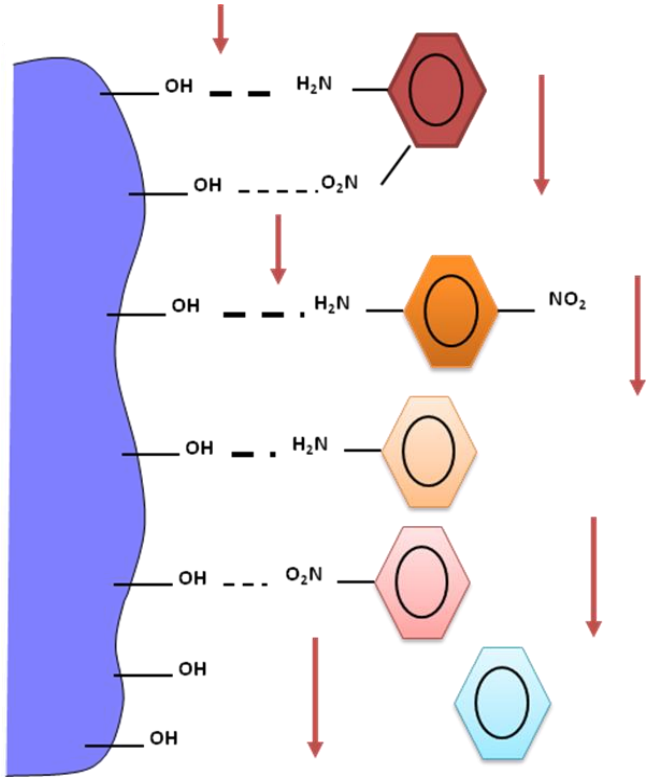
Polar türlerin ayrılması amaçlanıyorsa sabit faz polar özellikte seçilmekte ve hareketli faz da apolar özellikte olmaktadır, polar maddelerin polar sabit faza olan ilgilerinden faydalanılarak ayırma işlemi yapılmaktadır.

Apolar maddeler için ise destek maddesine uzun karbon zincirleri bağlanarak maddeler polar hareketli faz kullanılarak bu sabit faz üzerinde geçirilmekte ve apolar maddeler ile uzun karbon zincirleri arasında oluşan zayıf Van der Walls etkileşimleri ile ayırma işlemi gerçekleştirilmektedir.

Normal Faz Sıvı Kromatografi:

- Sabit Faz (Polar): Silika jel, Silika-NH_2, Silika-CN...
- Hareketli Faz (Apolar): n-Hekzan/CH_2CI_2, izo-oktan/IPA, izo-oktan/AcOEt...

Bu teknik sıvı kromatografide uygulanan ilk tekniklerden biridir ve polar bileşiklerin ayrılmasında etkin bir şekilde kullanılmadır. Sabit faz polar özellikte olur ve hareketli faz apolar özellikte olmaktadır.

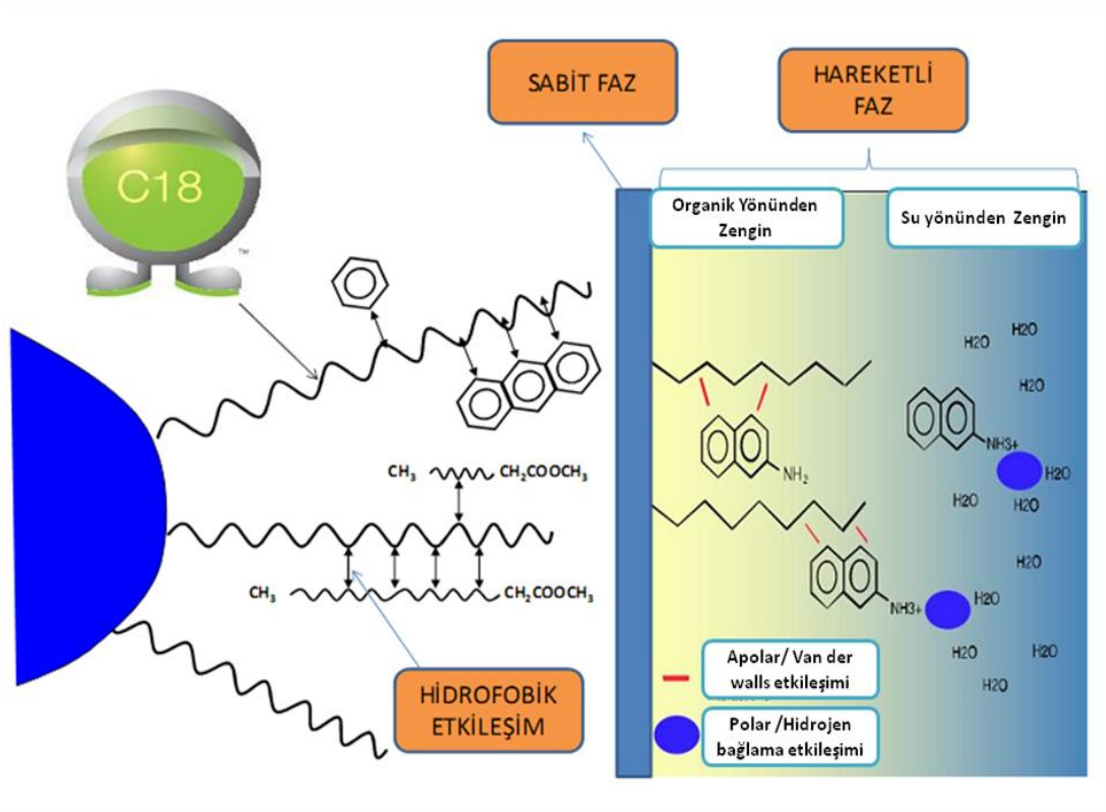


Şekil 4. 5. Normal faz şekli

Ters Faz Sıvı Kromatografi:

- Sabit Faz (apolar): Silika-C18, Silika-C8, Polimer...
- Hareketli Faz (polar): MeOH/H_2O, CH_3CN/H_2O, MeOH/Tampon...

Ters faz sıvı kromatografi, apolar maddelerin ayrılmasında yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu özellikteki maddeleri ayırmak için sabit fazı apolar özellikte seçilmektedir ve hareketli faz da polar özellikte olmaktadır. Sıvı kromatografide kullanılan en yaygın metoddur. Bu metotta polar ve hidrofilik türlerin ayrımı mobil fazda apolar özellikte olduğu için yeterli düzeyde değildir.



Şekil 4. 6. RPLC Ayırma Mekanizması

Hidrofobik Etkileşim Kromatografisi: Hidrofobik maddeler suyu iter ve onların yüzeyi su tarafından ıslatılmaz. Bu kromatografi, genellikle protein saflaştırma işlemlerinde kullanılır. En yaygın sabit faz, hidrofobik fenil alkil gruplara sahip sabit fazlardır. Sülfat ve fosfatların amonyum, sodyum, potasyum tuzları proteinlerin suda çözünürlüğünü azaltır. Proteinler yüksek konsantrasyonlarda (1M) amonyum sülfat çözeltisinde çözülerek kolona uygulanır. Tuz, proteinlerin hidrofobik sabit fazın yüzeyine bağlanmasına neden olur.



Şekil 4. 7. Hidrofobik yüzey

4.2.1.2. 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 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.

4.2.1.3. İyon-değiştirme kromatografisi

İyon değiştirici reçinelerini kullanımına dayanan iyonların ayrılması ve tayini için modern ve etkili bir yöntemdir. İyon kromatografi ilk olarak anyon-değiştirici veya katyon-değiştirici reçine ile doldurulmuş HPLC kolonlarında anyon ve katyon karışımlarının kolaylıkla ayrılabileceğinin farkedildiği 1970'li yılların ortalarında geliştirilmiştir. O zamanlar belirleme genellikle iletkenlik ölçümleriyle yapılıyordu.

İyon-değiştirme kromatografi, birbiriyle çok benzer olan nadir toprak katyonlarının katyon değiştirici reçinelerle ayrılması için geliştirilen Manhattan projesi sırasında ortaya çıkan iyon-değiştirme kromatografinin gelişmişidir. İyon-değiştirme

ayırmaları için teorik temelleri ortaya koyan bu muazzam çalışma, II. Dünya Savaşından sonra, başka pek çok maddelere uygulanabilecek şekilde genişletildi, sonunda karmaşık karışımlardaki amino asitler ve diğer iyonik türlerin ayrılması ve belirlenmesi için otomatikleştirilmiş yöntemlere kadar yayıldı. Modern HPLC'nin gelişmesi 1960'lı yılların sonunda başladı, ancak bu yöntemlerin iyonik türlere uygulanmaları, alkali katyonlar, toprak alkali katyonlar, halojenürler, asetat, nitrat gibi iyonik türlerin belirlenmesi için genel bir yöntemin eksikliği sebebiyle gecikti. Bu duruma, 1975 yılında, Dow Kimya Sanayi çalışanları tarafından, iyonların kondüktometrik özelliklerinin belirlenmesini mümkün kılan bir "çözücü sinyali baskılama" tekniği ile çare bulundu.

İyon-değiştirme olayları, çözeltideki iyonlar ve çözünmeyen yüksek molekül ağırlıklı bir katının yüzeyindeki benzer yüklü iyonlar arasındaki iyon değiştirme dengesi temeline dayanmaktadır.

- *Sabit Faz:* Killer ve zeolitler gibi doğal iyon-değiştiriciler. Anyon ve Katyon iyon değiştirici reçineler kullanılmaktadır. Sabit faza bağlanmış iyon değişimi özelliği olan sabit fazlar.
- *Hareketli Faz:* Makul oranlarda metanol veya su ile karışabilen diğer organik çözücüleri içeren sulu çözeltilerdir.

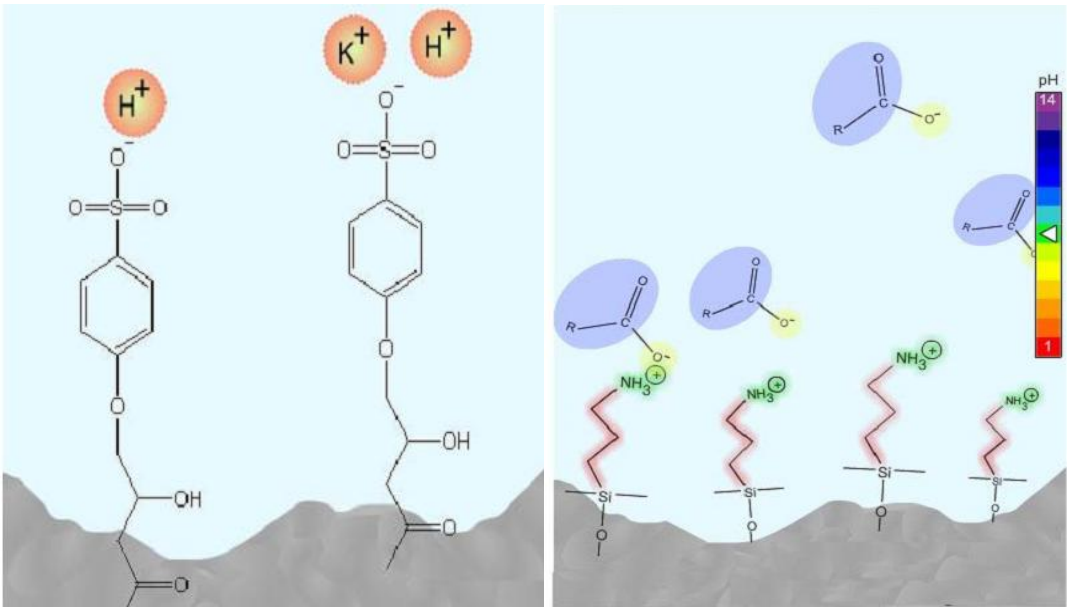
İyon Değişim Kromatografisi sabit faz olarak kullanılan reçinelerdeki iyonik grupların taşıdığı yükün işaretine göre katyon-değiştirme ve anyon-değiştirme kromatografisi isimleri altında farklı şekillerde uygulanabilmektedir.

Çizelge 4. 2. İyon değiştiriciler

Kuvvetli Asidik Katyon Değiştiriciler	Aril-$SO_3^-H^+$
Zayıf Asidik Katyon Değiştiriciler	R-COO^-Na^+
Kuvvetli Bazik Anyon Değiştiriciler	Aril-$CH_2N(CH3)_3^+CI^-$
Zayıf Bazik Anyon değiştiriciler	Aril-$NH(R)_2^+CI^-$

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 kuarterner 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.



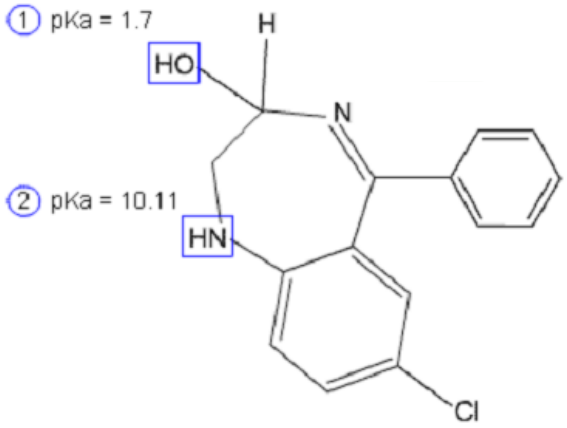
Katyon Değişimi Anyon Değişimi

Şekil 4. 8. İyon değiştirici sabit faz yüzeyleri

İyon Değişimi Kromatografisi sabit fazında katyon değişimi ya da anyon değişimi reçinelerinin olduğu ve maddelerin bu reçinelerin elektrostatik duruma göre ilgi göstermesi ile ayırım gerçekleşir.

4.2.1.4. İyon-çifti kromatografisi

Hareketli fazda iyonizasyonu önlemek için pH kullanma tekniği olarak bilinir. Ters fazda zayıf asidik ve zayıf bazik özelliğe sahip iyonize olabilen analitler için kullanılır. Zayıf asit ve zayıf bazların bir karışımı ters fazda ayrılmak isteniyorsa iyonlaşmayı önlemek için pH ayarlanmakta ve ayırma da iyonizasyonun etkisi düşürülerek ayrım gerçekleştirilmektedir.



Şekil 4. 9. İyon çifti özelliği gösteren bir molekül

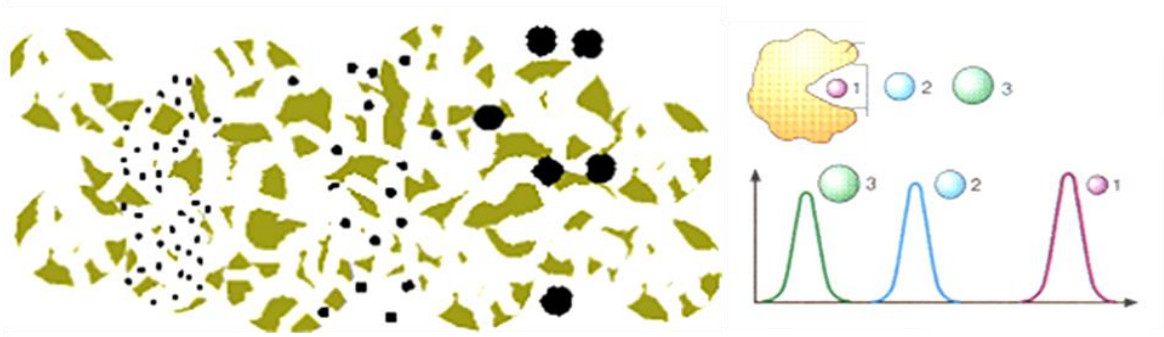
4.2.1.5. Ligand-değiştirme kromatografisi

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-hidroksipropanı 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 çözelti ile kolonu 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 kolonu 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 metalle kompleks yapma eğilimi yüksek olan en son çıkar. Burada türlerin metal iyonu ile kompleksleşme eğilimlerine göre ayrım gerçekleştirilir.

4.2.1.6. Boyut-eleme kromatografisi

Jel-geçirgenlik veya jel-süzme kromatografi adı verilen boyut-eleme kromatografisi, özellikle yüksek molekül kütleli türlere uygulanabilen güçlü bir tekniktir. Boyut-eleme kromatografisi için dolgu maddeleri, çözünen madde ve çözücü moleküllerinin içine difüzlenebileceği düzgün bir gözenek ağı içeren küçük boyutlu (≈10-µm) silis veya polimer partiküllerden meydana gelmiştir.



Şekil 4. 10. Boyut eleme Mekanizması

Gözenekler içinde moleküller, etkin bir şekilde yakalanır ve hareketli faz akımı ile uzaklaştırılır. Gözenek içinde ortalama kalma süresi, analit molekülün etkin büyüklüğüne bağlıdır. Dolgu maddesinin ortalama gözenek açıklığından daha büyük olan moleküller dışarıda tutulur ve böylece hiç alıkonmazlar. Bu gibi türler ilk olarak elue edilirler. Gözeneklerden önemli derecede küçük çapa sahip olan moleküller, labirent şeklindeki gözeneklere nüfuz edebilir veya geçebilir. Böylece en uzun süre tutulmuş olurlar. Bunlar en son elue edilirler.

Bu iki uç arasında orta boyuttaki moleküllerin dolgu maddesinin gözenekleri içine ortalama nüfuz etme özellikleri yarıçaplarına bağlıdır. Bu grup bileşikler, doğrudan molekül boyutu ve bazen molekül şekli ile ilgili olarak fraksiyonlara ayrılır. Boyut-eleme ayırmaları diğer ayırmalardan farklıdır: Analit ve durgun faz arasında kimyasal ve fiziksel etkileşimler yoktur. Aslında, bu gibi etkileşimler kolon veriminin azalmasına sebep olduğundan, bu etkileşmelerden korunmak için her türlü gayret gösterilmektedir.

5. HİDROFİLİK ETKİLEŞİM SIVI KROMATOGRAFİSİ (HILIC)

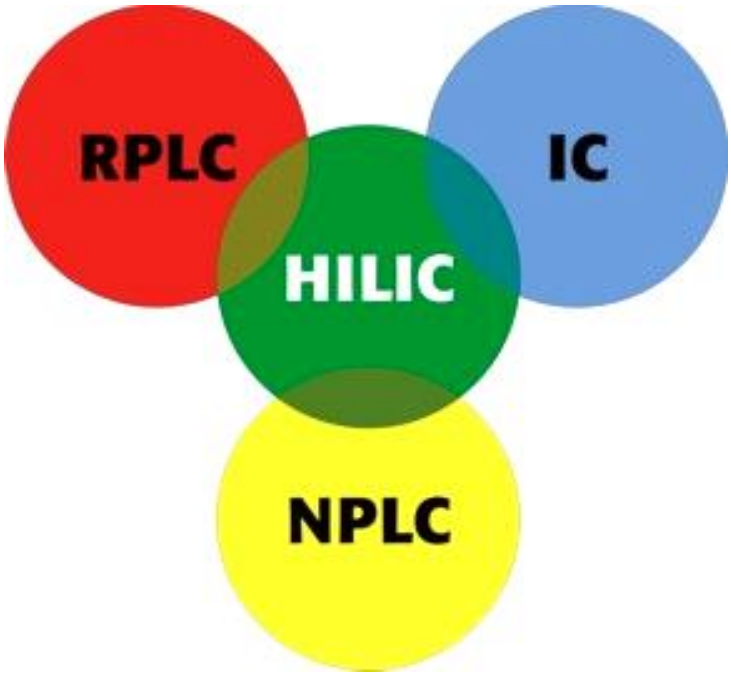
5.1. HILIC Tekniğinin Tarihi Gelişimi

HILIC ilk defa 1990 da Dr. Andrew Alpert tarafından isimlendirilmiştir. İlk defa karbonhidratların ayrılmasında pratiğe uygulanmıştır. Bu teknik 1950' lerde de şeker ve oligosakkaritlerin ayrılmasında kullanılmakta idi. Refraktif index dedektör kullanıldığı ve sadece izokritik şartlarda çalışıldığı için kısıtlı bir uygulama alanına sahipti. HILIC modu ayırma ayrıca serumda kokain tayini için kullanılmaktaydı ve normal fazın bir çeşidi olarak bilinmekte ve sulu normal faz olarak adlandırılmaktaydı. Son yıllarda artan bir ilgi ile bir çok uygulamada ortaya çıkmakta ve polar ve hidrofilik maddelerin ayrılmasında kullanılmaktadır. HILIC normal fazın bir çeşididir fakat hareketli fazda metanol, aseton, asetonitrilin yanında suda kullanılır. Polar sabit fazlar kullanılmakta ve sabit fazın yüzeyinde su yönünden zengin bir tabaka oluşmakta ve maddeler polarite ve suya olan ilgilerine göre ayrımı yapılmaktadır.

5.2. HILIC Tekniği Nedir?

Hidrofilik ve yüksek polarite değerine sahip türlerin ayırımı için hareketli faz olarak sudan daha düşük bir polarite indisine sahip, su ile karışabilen ve genellikle % 55 (v/v)'ın üzerinde bir organik çözücü ve suyun kullanıldığı yeni bir sıvı kromatografi tekniğidir. Hidrofilik Etkileşim Sıvı Kromatografisi (HILIC), genelde ters faz kolonlarda az ya da hiç tutulmayan, oldukça polar ve hidrofilik bileşiklerin ayırımı için kullanılan bir sıvı kromatografisi tekniğidir.

Basitçe söylemek gerekirse HILIC normal-fazın ayrı bir türüdür ancak ters-faz tipi hareketli fazlarda kullanılır ve İyon kromatografisinin özelliklerini de ayırma mekanizmasında bulundurmaktadır. Sabit fazı normal faz özelliği gösterirken hareketli faz ters faz mod özelliği gösterir. Sabit fazın sulu tabakasında iyonize olan uçları ile iyon değişimi özelliği de göstermektedir.

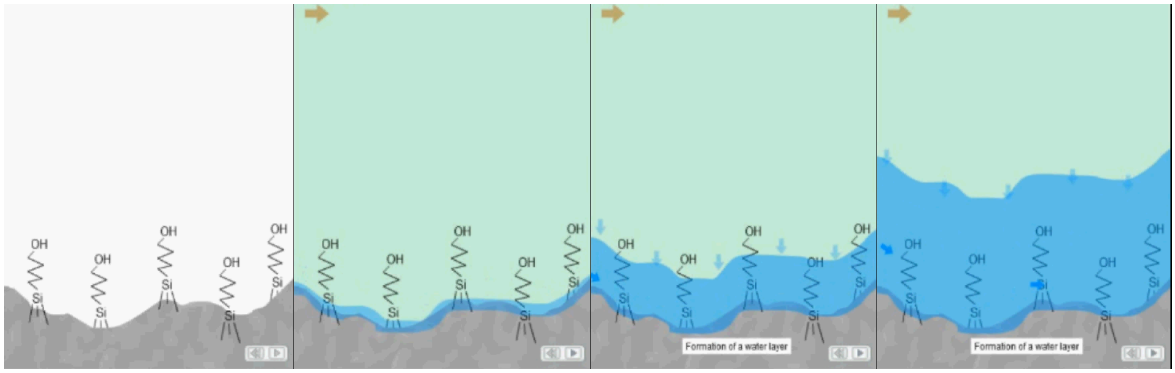


Şekil 5. 1. HILIC' ın kromatografik kesişim grafiği

- RPLC de sorun olan polar ve hidrofilik bileşikleri ayırmak HILIC la çok daha kolaydır.
- Kütle spektroskopisinde RPLC' ye göre daha yüksek hassaslık sağlar.
- Daha kolay ve kısa örnek hazırlama süresi vardır.
- Birçok sabit faz mevcut olması ve yeni sabit fazların sürekli geliştirilmesi.
- Polar ve Hidrofilik bileşiklerin analizinde çok tercih edilen ve araştırılan bir teknik olmasını sağlamıştır.

5.3. HILIC Şartlarında Polar Sabit Fazda Su Tabakasının Oluşumu

Mobil fazda az miktarda bulunan su, polar sabit fazın yüzeyinde toplanarak yüzeyi su yönünden zengin bir tabaka oluşturur.



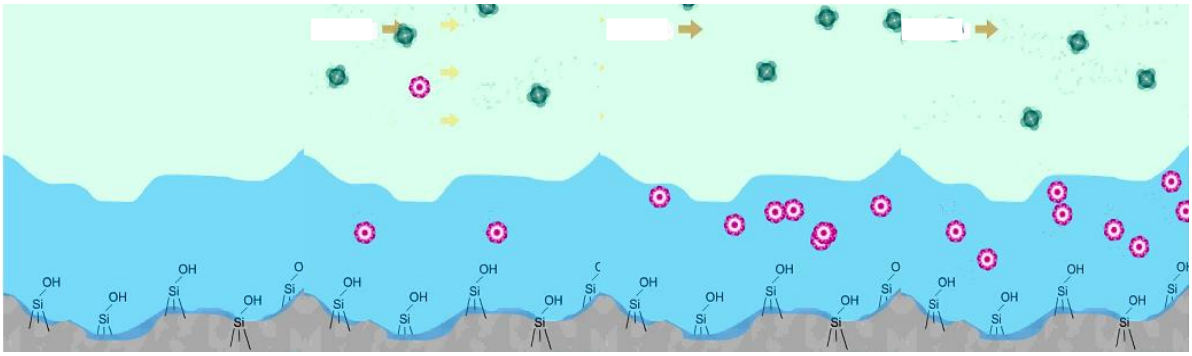
Şekil 5. 2. Sabit fazda su tabakasının oluşumu

Sabit faz üzerinde oluşan su yönünden zengin tabaka artık sabit faz gibi düşünülmektedir ve su miktarındaki değişiklik ile sabit fazın polaritesini değiştirme imkanı sağlamaktadır. Hem katı destek maddesi hem de su tabakası ayırmaya etki etmektedir. Sabit fazın yüzeyi iyonlaşabilen yapılara sahip ise iyon kromatografisinin özelliklerini de görülmektedir.

5.4. HILIC Tekniğinin Mekanizması

Sabit fazın polar özellikte olması ile hareketli fazdaki su sabit fazın yüzeyinde toplanmakta ve su yönünden zengin ama hareketli fazdan daha yavaş hareket eden bir tabaka oluşmaktadır. Bu su tabakası sabit faz olarak kabul edebilir ve hareketli fazdaki su miktarını değiştirerek sabit fazın polaritesini değiştirebilmektedir.

Maddeler, su açısından zengin tabaka ve zengin organik faz arasında dağılır. Polariteye dayalı bir ayırma yapılır. Örnek suda ne kadar iyi çözünüyorsa, o kadar güçlü alıkonur. Hareketli fazın organik içeriği ne kadar yüksekse analit o kadar iyi iyonize olur. HILIC mekanizmasında sabit fazın türüne göre anyon ve katyon değişimi özellikleride göstermektedir. HILIC tekniğin de çok çeşitli sabit fazların olması ve RPLC tamamlayıcı özellik göstermesi ile her alana uygulanmaktadır.



Şekil 5. 3. Maddelerin iki faz arasında polariteye göre dağılması

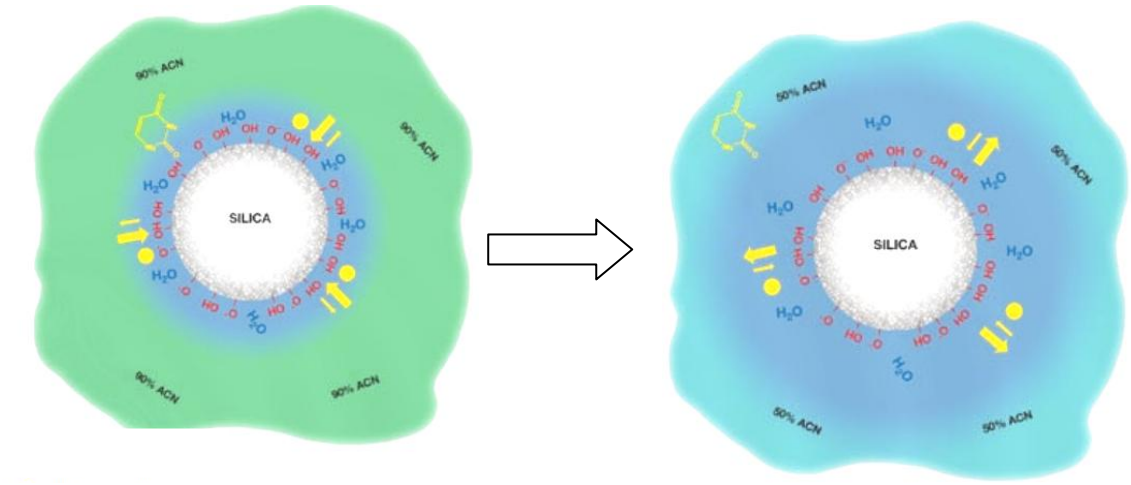
5.5. HILIC Tekniğinin Hareketli Faz Özellikleri

- H_2O miktarı %1-%45 arasında değişir.
- Sudan daha düşük bir polarite indisine sahip, su ile karışabilen bir organik çözücü seçilir.

$$H_2O > MeOH > EtOH > ACN$$

- Amonyumformat ve Amonyumasetat gibi tamponlar hareketli faz olarak kullanılabilir.

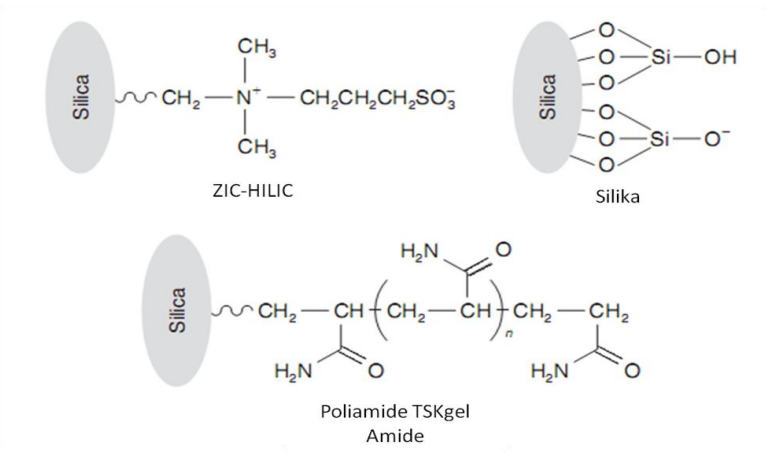
NPLC ve RPLC kıyasla HILIC modunun hem sabit fazı hem de hareketli fazı polar özellik göstermektedir. Sabit fazın polaritesi hareketli fazın polaritesinden yüksek olmaktadır.



Şekil 5. 4. Sabit fazın tutunan su miktarının hareketli fazda ki su miktarına göre değişmesi

HILIC mod ayırmalarda hareketli fazdaki su miktarı az seçildiğinde polar ve hidrofilik maddelerin kolondan çıkış süreleri artmaktadır. Sabit faz üzerinde maddelerin tutunması ve etkileşimi ve sabit fazın polaritesi bu şekilde arttırılmaktadır. Su miktarı arttırıldığın da ise **şekilde 5.4.** de gösterildiği gibi sabit faz yüzeyinde tutunan su miktarı artmakta maddelerin bu su yönden zengin tabakaya giriş ve çıkış kolaylaşmaktadır. Ayrıca su miktarının artması ile hareketli fazın polaritesi artmakta ve maddelerin kolondan çıkış süreleri azalmaktadır.

5.6. HILIC Tekniğinde Genellikle Kullanılan Sabit Fazlar



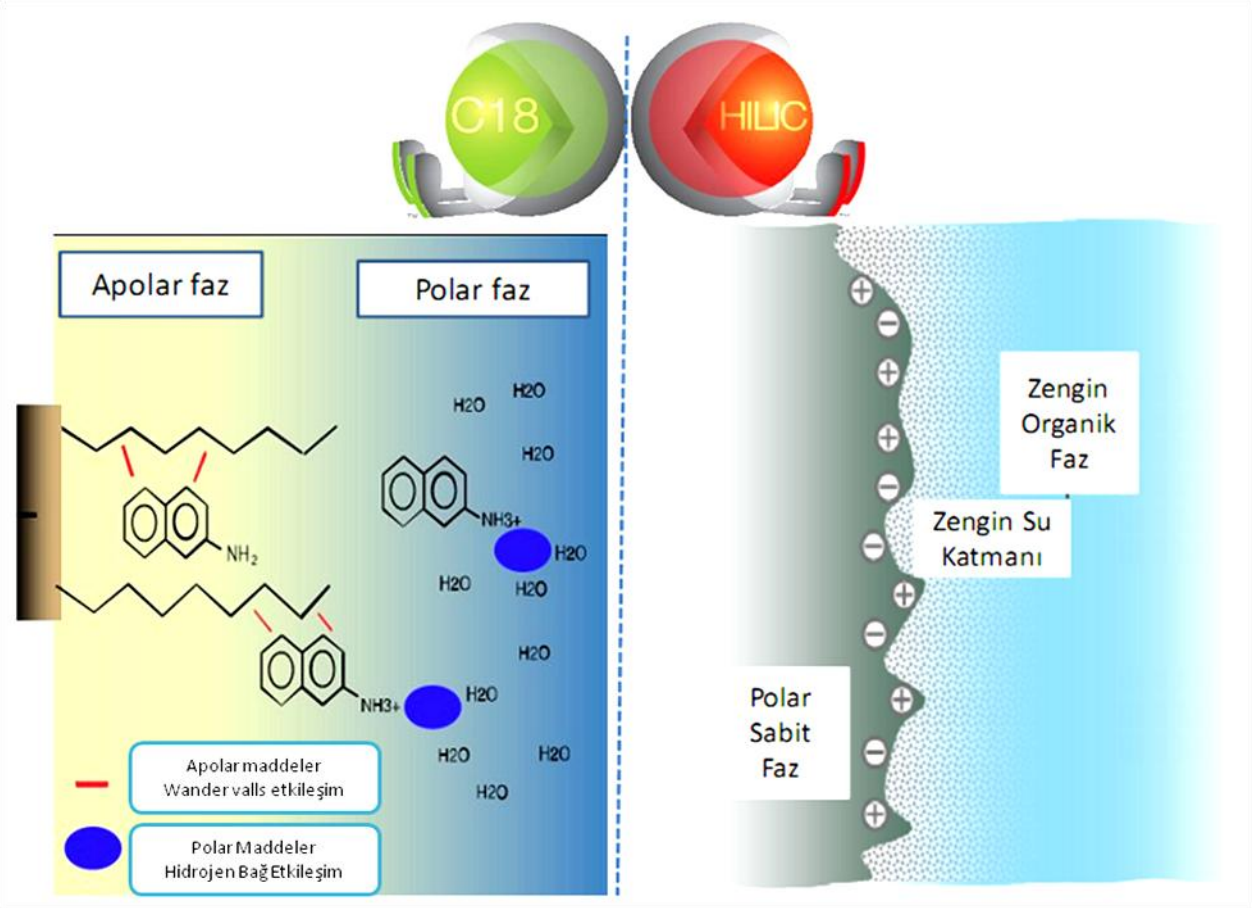
Şekil 5. 5. HILIC da genel olarak kullanılan sabit fazlar

Şekil 5.5. de gösterilen bu sabit fazlar HILIC modu ayırmalarda kullanılan en yaygın sabit fazlardır. HILIC'a son yıllarda artan ilginin bir sebebi de çok sayıda farklı

sabit faza sahip olması ve bir çok araştırmacının adsorpsiyon, dağılma, iyon değişimi ve ligand değişimi gibi özellikleri bünyesinde barındıran yeni sabit fazları geliştirme konusuna odaklanmasıdır.

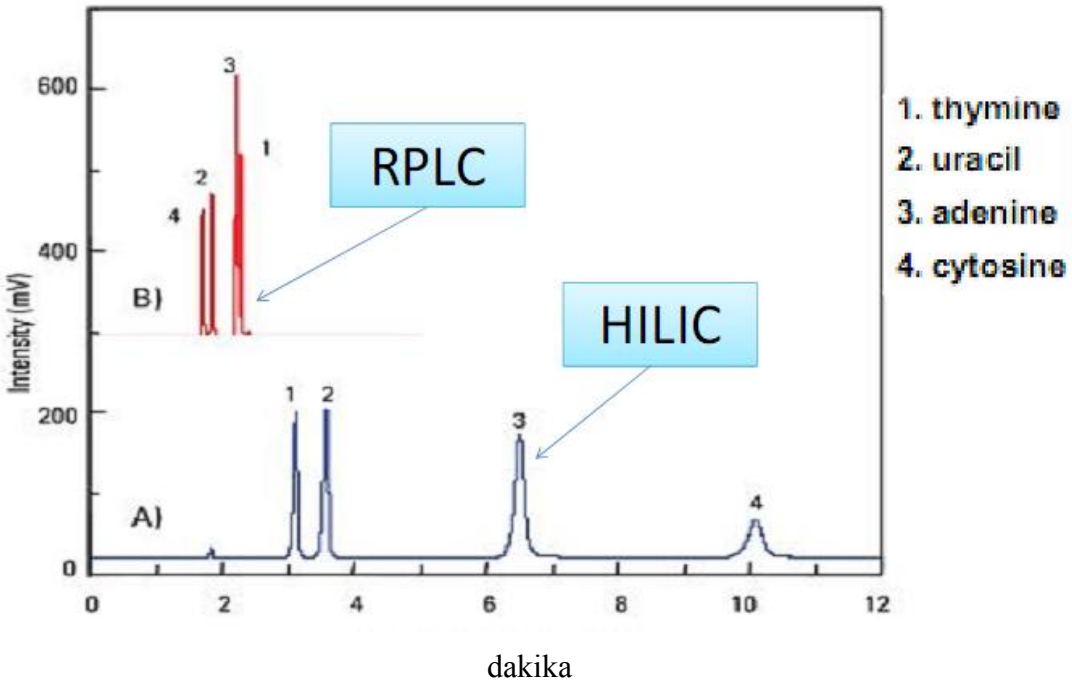
HILIC mod ayırmalarda ters faz da ayrılamayan polar ve hidrofilik maddeler kolay bir şekilde ayrılmakta ve ters faz modla tamamlayıcı bir özellik göstermektedir. Asenonitrilin ağırlıklı olarak kullanılması ile de MS dedektörde daha fazla hassaslık sağlanmaktadır.

5.7. HILIC ve RPLC Karşılaştırılması



Şekil 5. 6. RPLC ve HILIC karşılaştırılması

Ters faz sıvı kromatografi HPLC de kullanılan en baskın ayırma tekniği olarak bilinmektedir. Ters faz sistemde sabit faz apolar karakterde ve hareketli faz da su, tampon ve organik çözücülerin polar bir karışımından oluşmaktadır. Genel olarak organik çözücünün miktarının azalması ile maddelerin tutunması artmakta iken polar maddeler daha az tutunmak ta ya da artan su miktarı ile topluca kolondan çıkmaktadır. Bu durum ters faz da az polar ve apolar türlerin ayrılmasını mümkün kılmakta ama çok polar ve hidrofilik türlerin ayrımı verimli bir şekilde yapılamamaktadır.



Şekil 5. 7. RPLC ve HILIC da nükleositlerin ayrılması

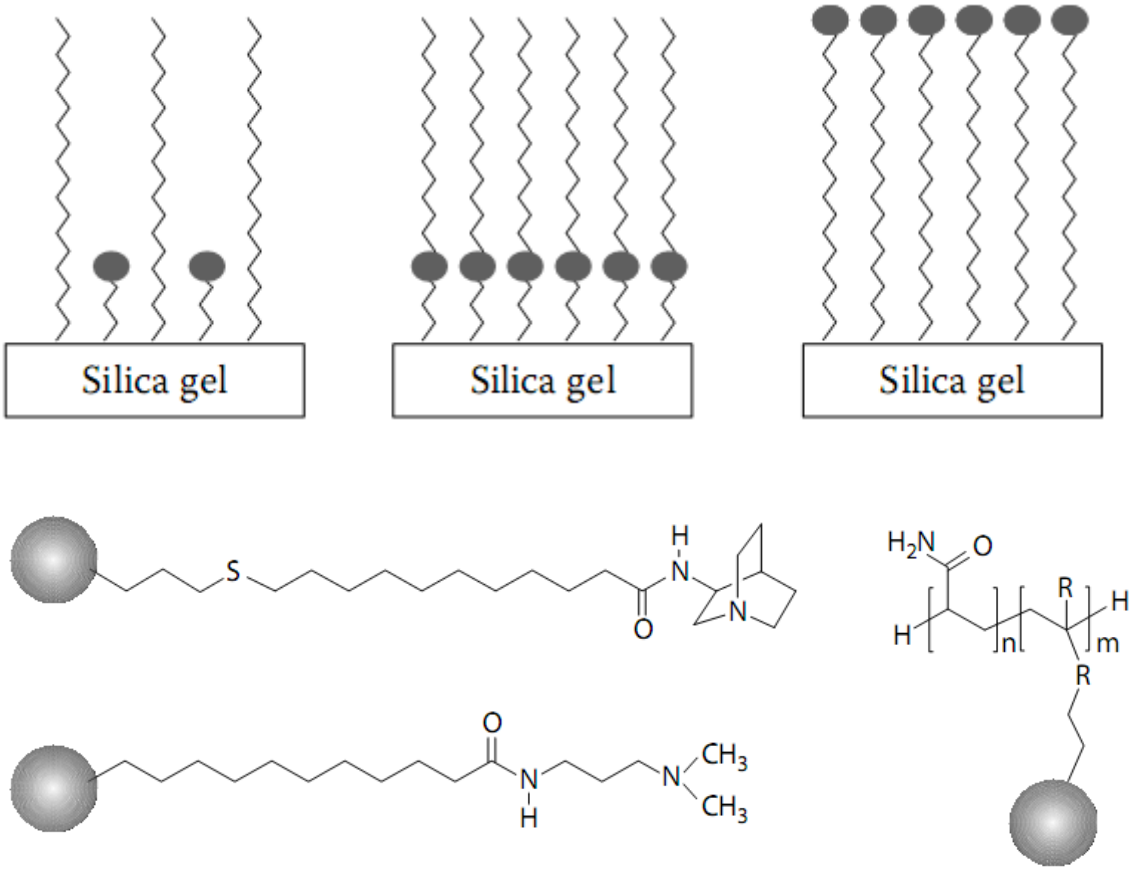
HILIC modu ayırma ise sabit fazın yüzeyinde oluşan su molekülleri yönünden zengin tabaka sayesinde polar ve hidrofilik türlerin ayrımını ters fazın ayırma mekanizmasının tam tersi özellikte gerçekleşmektedir. Ters faz da polar moleküller kolondan ilk önce çıkarken HILIC ta en son çıkmaktadır. Bu özelliği sayesinde ters faz sıvı kromatografiyi tamamlayıcı bir özellik göstermekte, analiz ve araştırmalar da birlikte kullanılmaktadır. Organik çözücü (ACN) miktarının hareketli fazda fazla olması sayesinde maddelerin daha iyi iyonize olması ile LC-MS'le iyi uyum sağlamaktadır ve tercih edilmektedir.

5.8. Ters Faz/ İyon Değişimi Özelliği Gösteren Karma Mod Kolonların HILIC Davranışı

RPLC tekniğinde polar ve hidrofilik türlerin ayrılmasında sorunlarla karşılaşılmasından dolayı alternatif karma mod sabit fazlar geliştirilmiştir. Bu sabit fazların içine iyonize olabilen yapılar eklenerek polar özellik ve iyon değişimi özelliği kazandırılmaktadır.

Bu sayede C-18 ya da C-8 kolonlara da polar türlerin ayrılması da verimlilik arttırılmaktadır. Ters faz/iyon değişimi özelliğini birlikte barındıran karma mod sabit fazlara son yıllar da dikkatler artmaktadır ve üzerinde araştırmalar yapılmaktadır.

Bu sabit fazlar hem ters fazın hem de iyon değişimi modunun özelliklerini aynı sabit fazda barındırmakta ayrıca kolon değiştirmeden hareketli faz değiştirilerek HILIC ve RPLC modu uygulanabilmektedir.



Şekil 5. 8. Ters faz/ İyon Değişimi Özelliği Gösteren Karma Mod Kolonların Sabit Fazlarının Yapıları

6. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Yeni sabit fazların geliştirilmesi sıvı kromatografinin uygulama alanının genişletilmesinde ki en önemli faktörlerden biridir ve önemli bir ayırma tekniği olarak kullanılmasından sorumludur. Sabit fazın bir kromatografi kolonundan çözünüp ayrılması kolon kanaması olarak adlandırılır ve ayırmaların tekrarlanabilirliği konusunda tutarsızlıklar ortaya çıkarır. Bu sorunu ortandan kaldırmak için katı bir destek maddesi üzerine sabit fazın kimyasal olarak bağlanması gerekmektedir. Bu şekilde deney şartlarında sabit fazın tekrarlanabilirliği sağlanmaktadır. Sıvı kromatografi deneylerinde en yaygın olarak kullanılan destek maddesi silikadır. Silika silisik asidin bir polimeri olarak düşünülebilir. Silikanın yüzeyinde ki -OH grupları ,silikaya asitlik ve polarlık özelliği kazandırır. Silikanın en çok tercih edilmesi yüzeyinde ki silanol grupların olması ve destek maddesi olarak çok fazla bilgi ve deneyin mevcut olmasıdır. Destek maddesi ve sabit faz olarak kullanılan en eski sabit fazlardan biride aminopropil silikadır. (joseph J. Pesek and al.)

Çok çeşitli organik, metaloorganik ve inorganik maddelerin kantitatif tayini ve ayrımı için sıvı kromatografik teknikleri eşsiz bir tekniktir. Bu tekniğin bir çok alan uygulanabilmesinin nedeni çok sayıda farklı özelliğe sahip kolonlara sahip olunmasıdır. Sürekli yeni kolon geliştirme deneylerinin devem etmesi ve yeni ayırma tekniklerinin geliştirilmesidir.

Çeşitli maddelerin verimli bir şekilde ayrımı; seçilen ayırma metoduna, sabit faza, mobil faza ve diğer parametrelere bağlı olarak değişmektedir ve mobil fazın karakteri, sabit fazın yüzey kimyası ve ayrılan maddelerin moleküler karekteristikleri ile ilgili derin bir bilgi gerektirmektedir. Bu alanda destek maddesi olarak silika, aminopropil silika, alümina ve polimerik destek maddeleri gibi bir çok madde yüzey kimyalarının özelliklerine göre çeşitli alanlarda kullanılmaktadır. Bu alanda ki çalışmalar farklı sıvı kromatografi modlarını aynı kolonda çalışabilme ve destek maddesine faklı özellikler kazandırarak çoklu ayırma modu ile ayrımları yapabilecek şekilde çalışılmakta ve deneyler yapılmaktadır.

Amino asitler her molekülde değişen R grubuna göre asit ve baz özelliği gösterir ve bu değişen R grupları amino asitlerin polarite, hidrofobik ve hidrofiliklik gibi özelliklerini belirlemekte ve dört farklı grupta kategorize edilmektedir. Amino asitlerin dipolar (zwitterionic) özellikleri ayırmalarda temel faktördür.

Ön kolon türevlendirme amino asitlerin tayininde en genel yaklaşım olarak kullanılmaktadır. Arttırılmış tayin hassaslığı, geliştirilmiş seçicilik gibi özellikleri sunması onu yaygın olarak uygulanan metotlardan biri yapmıştır. Modern HPLC cihazlarında türevlendirme otomatik enjektörlerde yapılmakta ve tayin limiti femtomol seviyelerine kadar inmektedir. En yaygın türevlendirme ajanları dansyl, DNP, PTH dır ve bir kit içerisinde hazır bir şekilde sağlanmaktadır. Bu güne kadar PTH türevleri normal faz, ters faz gibi faklı sabit fazlarda ayrılmıştır ve 254 nm ve 269 nm de dedekte edilmiştir. (Ioannis and al.)

Protein, peptit ve amino asitlerin HPLC de analizinde edman bozunma modeli en yaygın olarak kullanılan metotlardan biridir. Amino asitlerin ayrımında sorun oluşturan -NH_2 ve -COOH uçlarının fenilizotiyosiyanat ile kapatılarak polaritelerini belirleyen kısımlarından ayrılmasını sağlayan bir yöntemdir. Bu yöntemin takibinde PTH formunda amino asitler RP-HPLC modunda ayrılmaktadır. Son yıllarda PTH-AAs ayrımı için bir çok çalışma yayınlanmaktadır. Izokrotik ve gradient sistemlerde sodyum asetat, trifloraasetikasit ve asetik asitli tamponlar kullanılarak ayrımı ve tayini yapılmaktadır.(Ibolya Molnar and al.)

B.Boros ve ark. PTH-Amino asit tayinini gözenekli olmayan ticari bir sabit faz kullanarak 20 amino asidi 7 dakikada ayırarak RP-HPLC şartların da iyi bir ayrım elde edilmiştir. Gradient programda pH= 3.8 ve 5.8 de sodyum asetat ve asetik asit tamponu kullanılmıştır.

Michael W. Hunkapiller oktadesil silika, ciyanopropil silika ve fenil silika gibi kolonlar kullanarak % 5 sulu tetrahidrafuran, asetonitril kullanarak ve sodyum asetat tamponu kullanarak HPLC de bir analiz metodu geliştirmiştir.

Ravi Bhushan ve ark.(2000) İnce tabakada kromatografisinde normal faz ve ters faz modlarını kullanarak pH=4 de sodyum asetat tamponu, kloroform ve tetrahidrafuran gibi çözücüleri kullanarak PTH amino asitlerin analiz için hızlı ve ekonomik bir şekilde tayini için yeni bir çalışma yürütmüşlerdir.

Gregory A. Grant ve ark.(1998); PTH amino asitlerin HPLC ayrımı ve kromatografik olarak tayininde kapsamlı bir çalışma yürütmüşlerdir. Bu çalışma yaygın olarak kullanılan sodyum asetat tamponu ve asetonitril kullanılarak HP sekuenser sisteminde amino asitlerin ayrımı gerçekleştirilmiştir.

R.W.A.Oliver ve ark.(1980); RP C18 kolonda 1980 yılında yürütülen deneylerde PTH-amino asitlerin ayrımı mikrobor kolonlar kullanılarak yürütülmüştür.

Doğadaki organik maddelerin önemli bir kısmını teşkil eden hümik maddeler bitkisel kalıntıların mikrobiyal ve/veya enzimatik etkilerle bozuşması ve açığa çıkan yeni yapıların kondensasyonu ile oluşmuş, molekül kütlesi yüksek makromoleküllerdir. Doğal olarak oluşan ve suda çözünme özelliklerine göre genellikle fulvik asit, hümik asit ve hümin gibi alt sınıflarda incelenen hümik maddeler, metal iyonlarının doğada taşınımı ve bitkiler tarafından kullanımı ve toprağın nem tutma kabiliyetinin arttırılması gibi önemli roller üstlenir.

Araştırmacılar hümik asit ve katı destek maddesine kimyasal olarak bağlı formu üzerine yoğunlaşmaktadır. Çok farklı metotlar önerilmektedir. Örneğin hümik asit yapısında bulunan diazonyum fonksiyonelleri sayesinde katı destek maddesine kimyasal olarak bağlanmaktadır. Hümik asidin amin grupları katı destek maddesinin aldehit grupları arasında amid bağlı formu oluşturulmaktadır. Amid bağlı formu immobilizasyonu yapılan aminopropil silikanın amin grupları ve hümik asidin karboksil grupları arasında kimyasal reaksiyonu gerçekleştirilmektedir. Son zamanlarda Klevins ve Eglite: hümik asidin faklı epoksit fonksiyonellerine immobilizasyonunu rapor etmektedir.

Literatürde immobilize edilmiş hümik asitler metal iyonları, aminobenzen, fenoller, ağır metal iyonları gibi çeşitli bileşikleri sorpsiyonu üzerine odaklanmaktadır. Yu et al.(2004); bazı alkoloitlerin ayırımı için HILIC şartlarında sabit faz olarak kullanmıştır. Kollist-Siigur et al.(2002); Bazı polisiklik aromatik bileşiklerin tutunma üzerine deneysel parametrelerin etkisini araştırmış ve hümik asit bağlı meteryaller üzerine gözlemlediği bağlanma karakteristiklerini ve organik karbon dağılım katsayısı ile ilgili olduğunu araştırmıştır.

Kara ve ark.(2004); Hümik asidi bir destek maddesi üzerine immobilize ederek HPLC sistemlerinde kolonda katı faz olarak kullanmış ve on-line olarak incelemiştir. Bu sistemde metallerle olan etkileşimi on-line olarak incelenmiş ve adsorpsiyon grafiklerini kullanarak metal tutma kapasitesi hakkında sonuçlar elde etmişlerdir. Başka bir çalışmalarında hümik asidi çözünürsüzleştirerek boş kolona doldurup HPLC sistemlerinde katı faz olarak kullanmışlardır. Gezici ve Kara(2008-2010) Hümik asidi nükleosit ve nükleobazların ayrımında sabit faz olarak kullanmıştır.

Hümik asit bir çok metal iyon ve organik maddeler için sorbent olarak kullanılmaktadır. Adsorpsiyon verimlilikleri kullanılan hümik madde ve taşıyıcının karakterine göre değişmektedir. İmmobilize hümik asit farklı metal iyonlarının ve organik moleküllerin su ortamında giderilmesinde yaygın bir sorbent olarak kullanılmaktadır. Hümik asitlerin katı taşıyıcılar üzerine immobilizasyonu ve hümik asitlerin çeşitli maddelerle etkileşimi araştırmacılar için bir ilgi noktası olmuş ve bunun üzerine bir araştırma yapıldığı çeşitli deneylerden anlaşılmaktadır. Hümik asit immobilizasyonu makromoleküllerin, nükleik asitlerin, proteinlerin yapılarının, katalitik özelliklerinin ve diğer özelliklerinin araştırılması için faydalı bir araç olduğu değişik araştırmalardan anlaşılmaktadır. Ayrıca immobilize hümik asitler organik ve inorganik maddeler için sorbent olarak kullanılabilir. İmmobilize-hümik asitler faklı ksenobiyotiklerin akibetinde de önemli rol oynamaktadır.

HILIC tekniği: Prensipte bu ayırma modu polar kolonlar üzerine normal faz kromatografi olarak karakterize edilebilir ve sulu-organik mobil faz kullanılır. Bu tekniğin popülaritesinde ki diğer bir neden peptitlerin, proteinlerin, oligosakkaritlerin, ilaçların, metabolitlerin, çeşitli nötral bileşiklerin ayrılmasında bir çok sabit faz kullanılma imkanının olmasıdır. Silika, silika-bazlı amino, amido, siyano, diol, zwitterionic sülfobetaine gibi katı destek maddelerine kimyasal olarak bağlı kolonlar. Ayrıca iyon değiştiriciler ya da zwitterion metaryaller HILIC-iyon etkileşim tutunma mekanizması gösterirler. Bazı sabit fazlar karma mod tutunma karakteri artışı göstermesi için dizayn edilmektedir. HILIC modu ayırmalar diğer iki boyutlu ayırmalara tam bir tamamlayıcı görevi görür.

HILIC tekniği ters faz mobil faz ile normal faz sabit fazının kullanıldığı karakterize edilmektedir. Polar ve hidrofilik maddelerin analizinde kullanılmaktadır. Hareketli faz olarak sudan daha düşük bir polarite indisine sahip, su ile karışabilen ve genellikle %55 (v/v)'ın üzerinde bir organik çözücü ve suyun kullanıldığı yeni bir sıvı kromatografi tekniğidir. Mobil faz da az miktar da bulunan su polar sabit fazın yüzeyinde toplanarak yüzeyi su yönünden zengin bir tabaka oluşturur. Sabit faz üzerinde oluşan su yönden zengin tabaka artık sabit faz gibi düşünülmektedir ve bize sabit fazında polaritesini değiştirme imkanı vermektedir. Hem katı destek maddesi hem de su tabakası ayırmaya etki etmektedir. Katı destek maddesi yüklü ise iyon kromatografisinin özellikleride görülmektedir.

Orjinalde, HILIC çoğunlukla karbonhidratların, aminoasitlerin, peptitlerin tayini için kullanılmaktadır. HILIC tekniğine olan ilgi son on yılda giderek artmaktadır. Bu artan talebin sebebi polar ilaçların, biyolojik olarak önemli bileşiklerin, protemiklerin, glikomiklerin, klinik analizlerinde iyi bir teknik olarak uygulanabilirliğidir. HILIC dereceli olarak çeşitli polar bileşiklerin analizinde faydalı bir araç olarak kullanılmaktadır. HILIC üzerine çıkan yayınların çoğu polar sabit fazların sentezi ve uygulamalarını kapsamaktadır. Diğer yayınlar ise HILIC mekanizmasını anlamak ve kromatografik ayırmalardaki operasyon şartları üzerine yoğunlaşmaktadır. HILIC şartlarında ki mobil faz, sıcaklık, gibi parametrelerin etkisi çeşitli kolon tiplerinin ayırma verimliliği, HILIC metot geliştirme, MS ve MS/MS ile HILIC sistemlerini eşleşmesi, iki boyutlu ayırmalara HILIC mekanizmasının katkısı gibi konuları araştırılmaktadır. (Petrus Hemström and al.)

Kemometri kelime olarak, 1970'li yıllarda istatistik ve matematiksel yöntemler ile birlikte bilgisayar ve yazılımların kullanıldığı kimyadaki uygulamaları için sözü edilmeye başlanmıştır. Kemometri kavramı, 1972 yılında İsveçli Svante Wold ve Amerikalı Bruce R. Kowalski tarafından ileri sürüldü ve 1974 yılında uluslararası kemometri derneği tarafından bu disiplinin ilk resmi açıklaması yapıldı. İzleyen yıllarda, dünyada, ulusal ve uluslararası kemometri konferanslarının da organize edildiği gözlenmektedir. Kemometri içerik olarak, tanımlayıcı ve açıklayıcı istatistik, sinyal işleme, deneysel tasarım, modelleme, kalibrasyon, optimizasyon, yapı tanıma, sınıflandırma, yapay akıl yöntemleri, resim işleme, bilgi ve sistem kuramı gibi kavram ve uygulamaları kemometrinin konularını oluşturmaktadır. Bu kemometrik yöntemlere rağbet edilmesi, kimya ve de analitik kimyada kompleks numunelerin analizinde hızlı, doğru, kesin ve güvenilir sonuçlara ulaşmak için esnek ve çok yönlü çözümler sunmasına bağlanabilir. Yapılan bilimsel çalışmaların sonucu yayınlanan makaleler göstermiştir ki son 15 yıl içinde analitik problemlerin çözümü için gelişmiş analitik cihazlardan elde edilen çok değişkenli ve çok boyutlu ölçüm verilerinin işlenmesi için kemometrik yöntemlerin en büyük kullanıcısı analitik kimyacılardır. Bu alan da spektroskopi ve diğer analitik yöntemler için kemometrinin kullanımı hakkında onlarca kitap yazılmakta ve yüzlerce makale yayınlamaktadır. Bu istatiksel yöntem sayesinde kromatografide deneyler belirli bir prosedürde yapılmakta faktörler ve deney aralığı genişletilip daraltılarak deneyler belirli bir çerçevede yapılmaktadır. Dahası ayırmalar

etki eden faktörlerin etkisini yüzey grafiklerinden çok daha iyi yorumlaya bilmekte ve optimum ayırma şartları hakkında daha kesin bilgiler elde etmektedir.

7. MATERYAL VE YÖNTEM

7.1. Kullanılan Kimyasallar, Çözeltiler ve Cihazlar

Deneylerde kullanılan kimyasal maddeler Merck, Sigma-Aldrich, Fluka, Labscan ve VWR gibi farklı firmalardan temin edilmiş olup analizler için uygun saflıktadırlar. İmmobilizasyon işlemi için sodyum tuzu formunda temin edilen hümik asit (Sigma Aldrich) numunesi saflaştırma işlemine tabi tutulduktan sonra kullanılmıştır. Hümik asidin, 15-35µm parçacık ebatına sahip aminopropil silikaya (APS, Fluka) immobilizasyonu, N,N-dimetilformamid ortamında gerçekleştirilmiştir. End-capping yapılacak kısımlar için asetil klorür (Merck) kullanılmıştır.

İmmobilize hümik asitler, 4,6x150 mm ebatında iki adet boş HPLC kolonu (CromTech) LabAlliance marka (max 18000 psi) kolon doldurma cihazı kullanılarak doldurulmuştur. HPLC analizlerinde; mobil faz olarak metanol (VWR) ve asetonitril (VWR), tampon oluşturmak için sodyum asetat (Merck), amonyum asetat (Merck), trifloraasetikasit (Merck), trietilenamin (Merck), bakır nitrat trihidrat (Merck), sodyumnitrat (Merck), etilendiamintriasetikasit (Merck), amonyak (Merck) gibi kimyasallar kullanılmıştır.

Kromatografik özellikleri incelenecek amino asitler (Sigma-Aldrich) PTH türevi formunda hazır olarak alınmıştır. % 0,1 TFA + % 0,015 TEA su tamponunda ve % 0,1 TFA + % 0,015 TEA asetonitril tamponunda (1:1) çözülerek amino asit standart çözeltileri hazırlanmıştır. Analizler süresince 0,055 µS cm^{-1} iletkenliğe sahip ultra saf su kullanılmıştır. Sabit faz olarak, üzerine hümik asit immobilize edildikten sonra açık amin uçları kapatılmış aminopropilsilika (EC-HA-APS) ve üzerine hümik asit immobilize edilmiş aminopropil silika (HA-APS) kullanılmıştır.

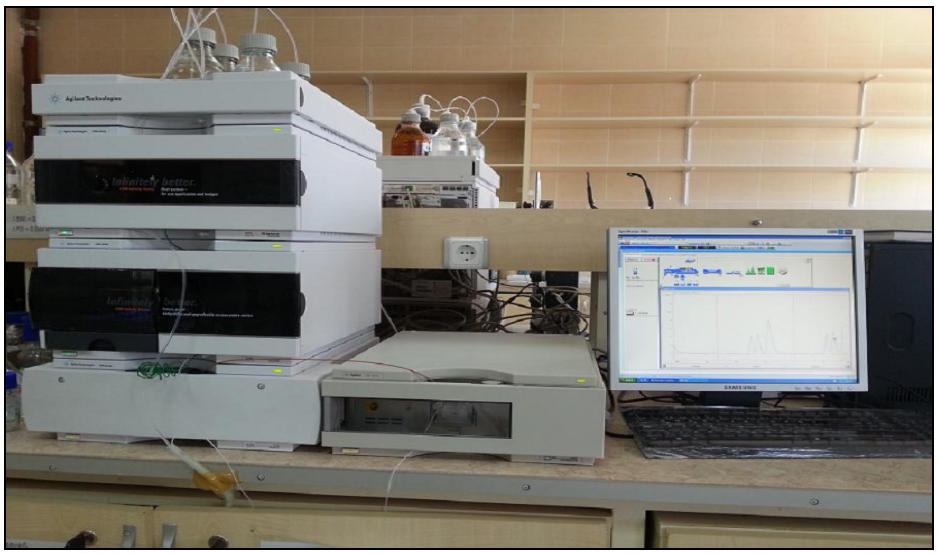
Çizelge 7. 1. Kullanılan cihazlar

Cihazın Adı	Markası ve Modeli
Manyetik Karıştırıcı	IKA RCT Classic, Termostatlı ve Isı Kontrollü
pH Metre	Orion, SA 720
Mikropipet	Medispec Plus, 100-1000 µL
Analitik Terazi	GEC AVERY
Ultrasonik Banyo	KUDOS, SK06GT
Ultra Saf Su Cihazı	TKA-GenPure
IR Spektrofotometresi	Perkin Elmer FT-IR Spectrum 100
Kolon doldurma pompası	LabAlliance (18000 psi)

Kullanılan HPLC sistemini oluşturan parçalar ve birimler aşağıdaki çizelgede verilmiştir.

Çizelge 7. 2. Kullanılan HPLC Sistemi

Cihazın Adı	**Markası ve Modeli**
Quarterny (dörtlü) Pompa/Degazör	Agilent 1260 Series quarterny Pompa
Otomatik Enjektör	Agilent 1260 Series Auto Sampler
Kolon Fırını + 4,6x15cm kolon	Agilent 1100 Series Column Oven
Dedektör	Agilent 1100 Series UV- Detector (269 nm)



Şekil 7. 1. Kullanılan HPLC sistemi

7.2. Hümik Asidin Saflaştırılması

Sodyum tuzu formunda ticari olarak alınan (Aldrich) hümik asit, içerisinde safsızlıklar ve fülvik asit karakterine yakın özellikler gösteren ve sulu ortamda çözünen maddeler olduğu düşünülerek saflaştırma işlemi yapılmıştır. Saflaştırma için (Koopal ve ark. 1998) literatürde kullanılan metot uygulanmıştır. Buna göre;

1. Aşama:

Katı sodyum formundaki hümik asitten 10g alınmış ve 0,1 M 1 L NaOH çözeltisinde oda sıcaklığında 24 saat boyunca karıştırılmıştır. Daha sonra bu çözelti 3000 rpm de 30 dk santrifüjlenmiştir. Katı kısımlar atılmış ve santrifügat saklanmıştır.

2. Aşama:

İmmobilizasyon için kullanılacak hümik asidin yapısında bulunan -COOH gruplarının dissosiasyona uğramamış olması, aminopropilsilikanın yüzeyinde bulunan -NH_2 grupları ile amid bağı oluşumuna dayandığı için çok önemlidir. Bunun için 1 M HCI santrifügata ilave edilir ve bu asidik karışım 24 saat boyunca oda sıcaklığında karıştırılır. Daha sonra 3000 rpm de 30 dk santrifüjlenir ve sulu faz atılır. Katı kısım 0,05 M HCI asit ile bir kaç defa yıkanır. Bu işleme santrifügat berraklaşıncaya kadar devam edilir.

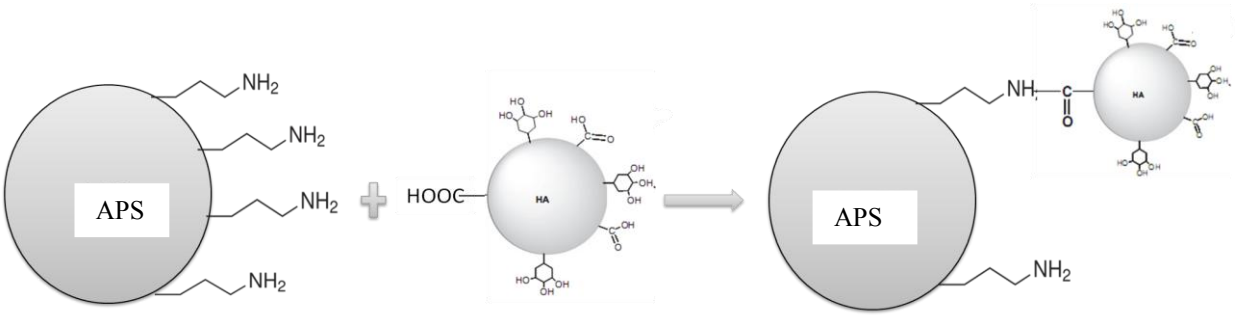
3. Aşama:

Son olarak bulamaç halde elde edilen karışım 105^oC da 5 saat kurutularak kullanıma uygun hale getirilir.

7.3. Hümik Asidin İmmobilizasyonu

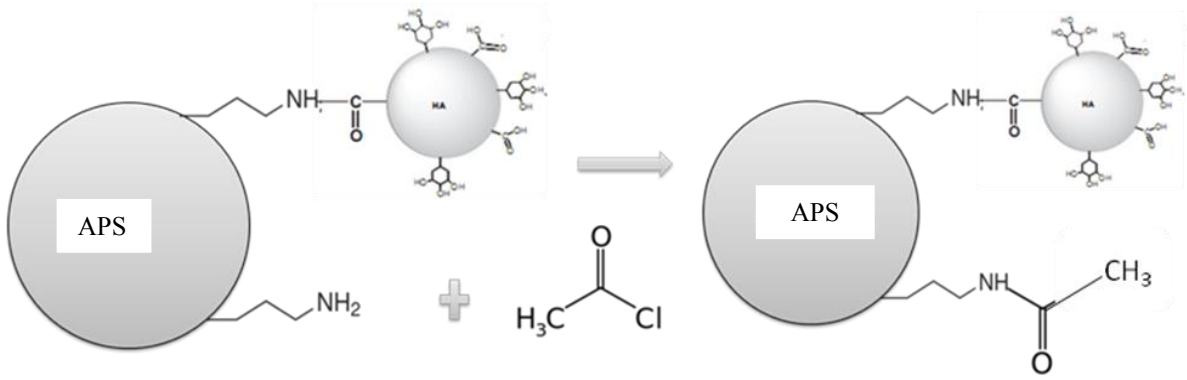
Ön saflaştırma işlemi uygulanmış hümik asit aminopropil silikaya (Koopal ve ark., 1998) litaretürde belirtilen metoda göre immobilize edilir. Hümik asidin -COOH grupları ile aminopropilsilikanın yüzeyindeki -NH_2 grupları arasındaki amid bağı oluşumuna dayanan kimyasal bağlanma ile HPLC için kullanılacak sabit faz oluşturulur. Hümik asit DMF ile çözülür. 10 g hümik asit 1L DMF de çözündürülür ve ortama 32 g kurutulmuş aminopropilsilika ilave edilir. Bu karışım bir müddet bekletilir ve daha sonra ortama 600 mL DMF ilave edilerek geri soğutucu düzeneği altında 120^oC da 24 saat süreyle karıştırılır. Bu işlem tamamlandıktan sonra karışım santrifüjlenerek santrifügat atılır ve katı kısım süzüntü berraklaşıncaya kadar DMF ile yıkanır.

HA-APS üzerindeki DMF' yi uzaklaştırmak için sırasıyla diklorometan ve aseton ile üçer kez yıkanır. Elde edilen katı 100^oC da etüvde kurutularak kullanıma hazır hale getirilir. Burada elde edilen yapı hümik asidin yapısındaki uçları kullanabiliceğimiz bir sabit fazdır.



Şekil 7. 2. APS ye hümik asidin bağlanması

Aminopropilsilika üzerindeki açık -NH_2 uçları kapatmak ve sadece hümik asidin sahip olduğu özelliklerin kullanılabileceği bir sabit faz oluşturmak için literatürde (end-capping) kapatma diye ifade edilen asetilleme işlemi yapılmış ve bu kapatma işlemi için asetilklorür kullanılmıştır. 5 g HA-APS katı maddesine 250 mL DMF ilave edilerek 5 dakika karıştırılır. Daha sonra karışıma 12,5 mL asetilklorür damla damla ilave edilerek oda sıcaklığında 5 saat etkileştirilir. Daha sonra bu karışım santrifüjlenerek katı kısım (EC-HA-APS) santrifügattan ayrılarak DMF ile yıkama işlemine geçilir.



Şekil 7. 3. HA-APS açık uçların asetilklorürle kapatılması

EC-HA-APS yüzeyinde kalan DMF gidermek için diklorometan ve aseton ile üçer kez yıkama işlemi yapılır. Elde edilen ürün 105^{o}C da üç saat kurutulur.

7.4. İmmobilize Hümik Asidin FT-IR ile karekterizasyonu

İmmobilizasyonun sonuçlarını değerlendirmek ve meydana gelen yapısal değişimleri izlemek amacıyla FT-IR (Perkin-Elmer) spektrumları alınmıştır. Aminopropilsilika, hümik asit, HA-APS, EC-HA-APS, Cu-EC-HA-APS' in FT-IR spektrumları kıyaslanarak immobilizasyon işleminin verimliliği ve meydana gelen değişiklikler değerlendirildi.

7.5. Sabit Fazının Kolona Doldurulması

Elde edilen EC-HA-APS ve HA-APS sabit fazları 4,6x150 mm ebatlarına sahip HPLC kolonlarına yüksek basınçlarda (max. 18000 psi) doldurularak sabit fazın kolona doldurulması ve sıkıştırılması yapılacaktır. Doldurulan bu kolonlar kolon doldurma pompasında 1,0 - 12,0 mL/min aralığın da akışlarda şartlandırılarak kullanıma hazır bir hale hızlı bir şekilde getirilecektir. Sabit fazı sıkıştırmak için 15000 psi basınç uygulanmıştır.

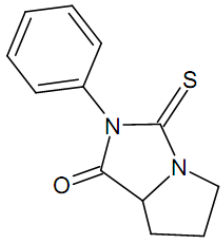
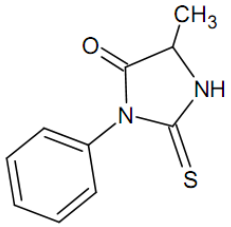
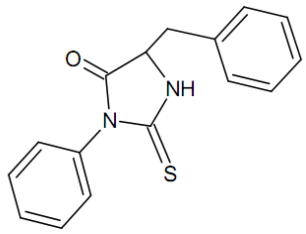
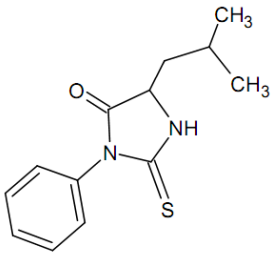
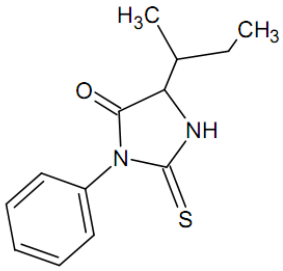
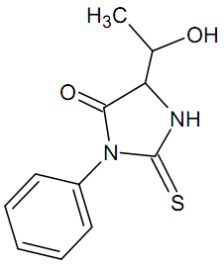
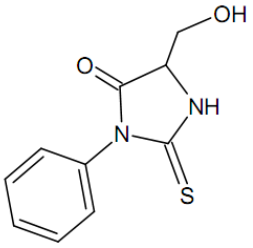
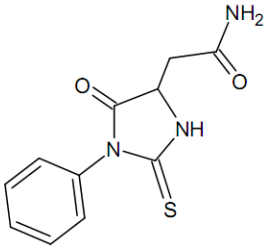
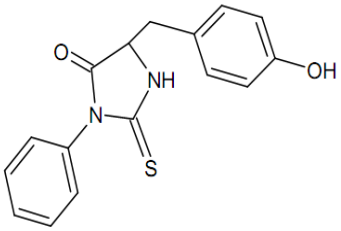


Şekil 7. 4. Kolon doldurma pompası

7.6. Kromatografik Şartlarda Yürütülen İşlemler

EC-HA-APS sabit fazının ters faz şartlarında kullanımı sayesinde, karboksil uçlarına sahip olan, zayıf katyon değişimi özelliği gösteren ve metal yüklenmesiyle ligand değişimi özelliğine dönebilen karma modlu bir sabit faz elde edilmiştir. Bu şekilde PTH-amino asitlerinin ayrımı için daha etkili bir metot kullanılmış olacaktır. HILIC şartlarında sabit fazın polar özellikte olması istendiğinden, EC-HA-APS'ye göre daha polar özellikte olan HA-APS sabit fazının kullanılmasının daha verimli olacağı düşünülmektedir. HA-APS sabit fazı ile HILIC şartlarında gerçekleştirilen deneyler kısmı deneysel tasarım kullanılarak yürütülmüştür.

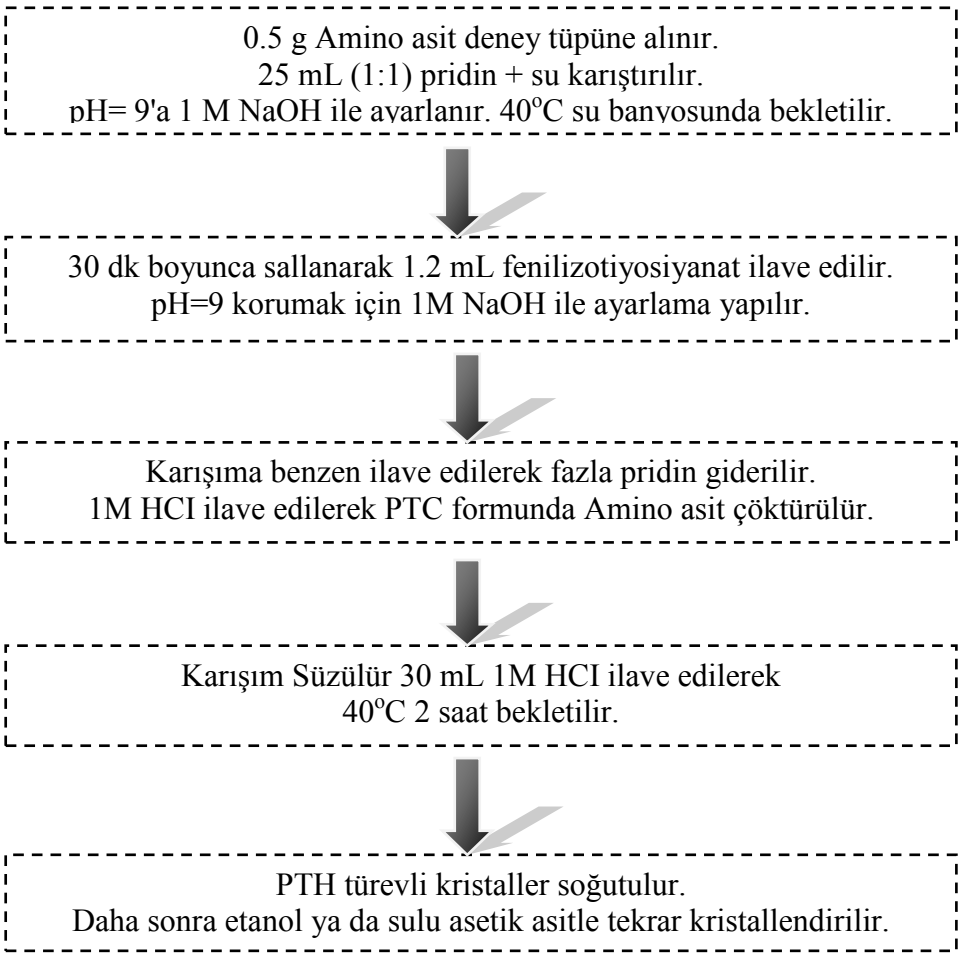
Çizelge 7. 3. Kullanılan PTH-Amino Asitler

PTH-Prolin	PTH-Alanin	PTH-Fenilalanin
		
PTH-Lösin	PTH-İzolösin	PTH-Tihronin
		
PTH-Serin	PTH-Asparajin	PTH-Tiyrozin
		

Yukarıdaki çizelgede verilen PTH-amino asitler, sentezlenen sabit fazın ayırmadaki etkinliğini incelemek amacı ile kullanılacaktır. PTH amino asitleri, otomatik enjektör ile tek veya karışımları halinde kolona gönderilerek sabit fazla etkileşimi HILIC ve RPLC şartlarında araştırılacaktır. Analizlerde 269 nm dalga boyuna ayarlı UV dedektör kullanılacaktır.

7.6.1. Amino Asitlerin PTH formuna türevlendirilmesi

Bu prosedür peptitlerin, proteinlerin ve amino asitlerin tayininde Edman prosedürü olarak bilinir. Sıklıkla proteinlerin, peptitlerin ve amino asitlerin tayininde kullanılan metotlardan biridir.



7.6.2. Ters faz/iyon değişimi/ligand değişimi çoklu modda yürütülen analizler

EC-HA-APS sabit fazına 0,1 M Cu^{2+} iyonu çözeltisi yüklenerek ligand değişim özelliği kazandırılacaktır. Buna göre;

1 Aşama: EC-HA-APS sabit fazına öncelikle 0,1 M $NaNO_3$ çözeltisi gönderilerek 312 nm de hümik asidin metallerle kompleks yapacak uçları aktive edilecek ve bu yükleme işlemi sabit faz doygunluğa ulaşana kadar yapılacaktır. Daha sonra pH=7 de ultra saf su ile dedektör piki temel çizgiye inene kadar yıkanmıştır.

2.Aşama: 0,1 M Cu^{+2} çözeltisi 595 nm dalga boyunda EC-HA-APS sabit fazına doygunluğa ulaşana kadar yüklenecek ve bu işlemden sonra tutulmayan metal iyonları pH=7 ultra saf su ile temel çizgiye kadar yıkanacaktır.

3 Aşama: pH=8.5 de 0,1 M EDTA + 0,1 M NH_3 karışımı ile EC-HA-APS sabit fazının tuttuğu bütün metal iyonları sıyrılacaktır.

Ters faz şartlarında; sabit faz olarak apolar özellikte bir sabit faz, hareketli faz olarak da polar bir hareketli faz kullanılmaktadır. Bu ayırma modunda polar ve hidrofilik türlerin ayrımı zor olmakta ve bu yüzden ters faz ve iyon değişim karma mod sabit fazlar kullanılmaktadır. EC-HA-APS sabit fazı 4.6x150 mm ebatına sahip kolona dolduracak ve metal yükleme işlemi yapıldıktan sonra ters faz şartlarında PTH amino asitlerin ayrımında kullanılacaktır.

7.6.3. HILIC şartlarında yürütülen analizler

HA-APS sabit fazı EC-HA-APS'ye göre daha polar sabit faz özelliği gösterdiğinden 4,6x150 mm ebatına sahip bir kolona doldurulacak ve HILIC şartlarında PTH amino asitlerin ayrımında kullanılacaktır.

Bu şartlarda yapılan ayrımlarda üç faktörlü beş seviyeli bir deneysel tasarım yapılacaktır. Bu tasarım sayesinde sıcaklık, akış hızı ve % su miktarı gibi parametrelerin optimum değerleri ve ayrımlara etkisi incelenecektir. Bu denesel tasarım sonucunda elde edilen yüzey grafikleriyle zaman ve malzame kaybını en aza indirgeyerek daha kısa sürede en iyi ayırma şartları belirlenecektir.

Çizelge 7. 4. Faktörlerin kodlanmış seviye değerleri

	-2	-1	0	1	2
Hız (mL/min)	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
% Su	0,2	0,6	1,0	1,5	2,0
Sıcaklık (^{o}C)	10	17,5	25	32,5	40

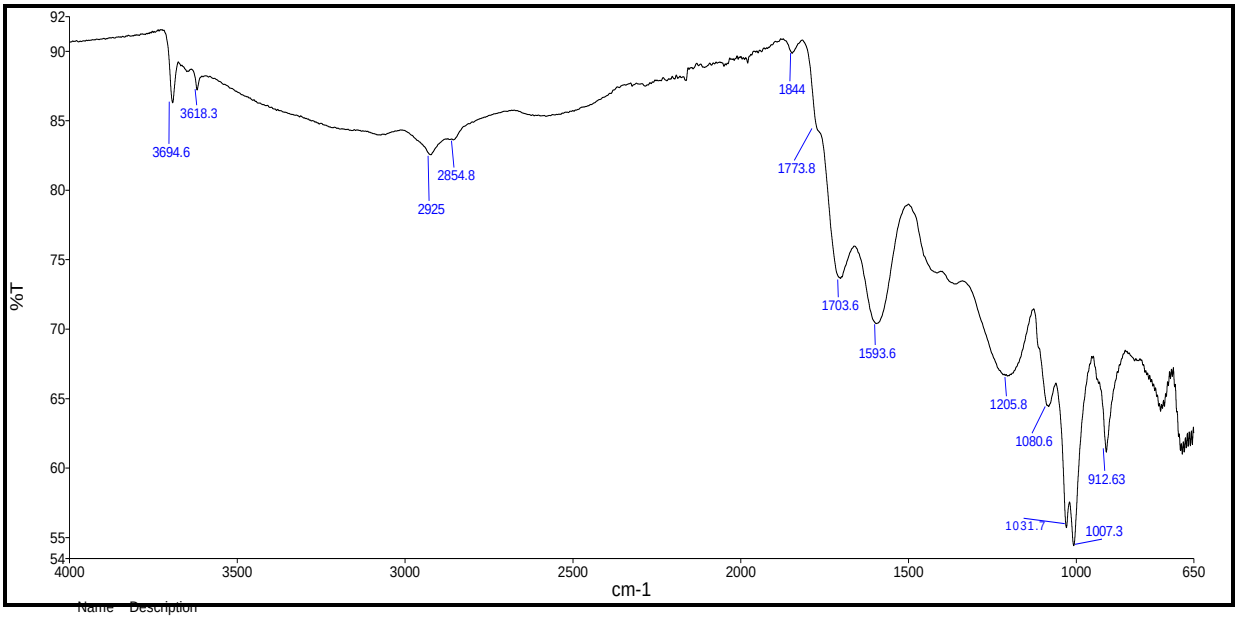
Yapılan ayırmalar sonucunda elde edilen Rs değerleri, cevap değeri kabul edilerek üç boyutlu yüzey grafikleri çizilecektir. Bu grafikler değerlendirilerek ayırmaya etki eden parametrelerin etkisi incelenecek ve grafiklerin tepe noktası optimum ayırma şartları olarak kabul edilecektir.

Çizelge 7. 5. Optimizasyon çalışmaları için kullanılan kısmi deneysel tasarım

Analiz Sırası	Akış Hızı (mL/min)	Hareketli Faz %Su	Sıcaklık (^{o}C)
1	0	0	0
2	0	-2	-2
3	-2	-2	2
4	-2	2	-1
5	2	-1	2
6	-1	2	0
7	2	0	-1
8	0	-1	-1
9	-1	-1	1
10	-1	1	2
11	1	2	1
12	2	1	0
13	1	0	2
14	0	2	2
15	2	2	-2
16	2	-2	1
17	-2	1	-2
18	1	-2	0
19	-2	0	1
20	0	1	1
21	1	1	-1
22	1	-1	-2
23	-1	-2	-1
24	-2	-1	0
25	-1	0	-2

8. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

8.1. FT-IR Analizleri

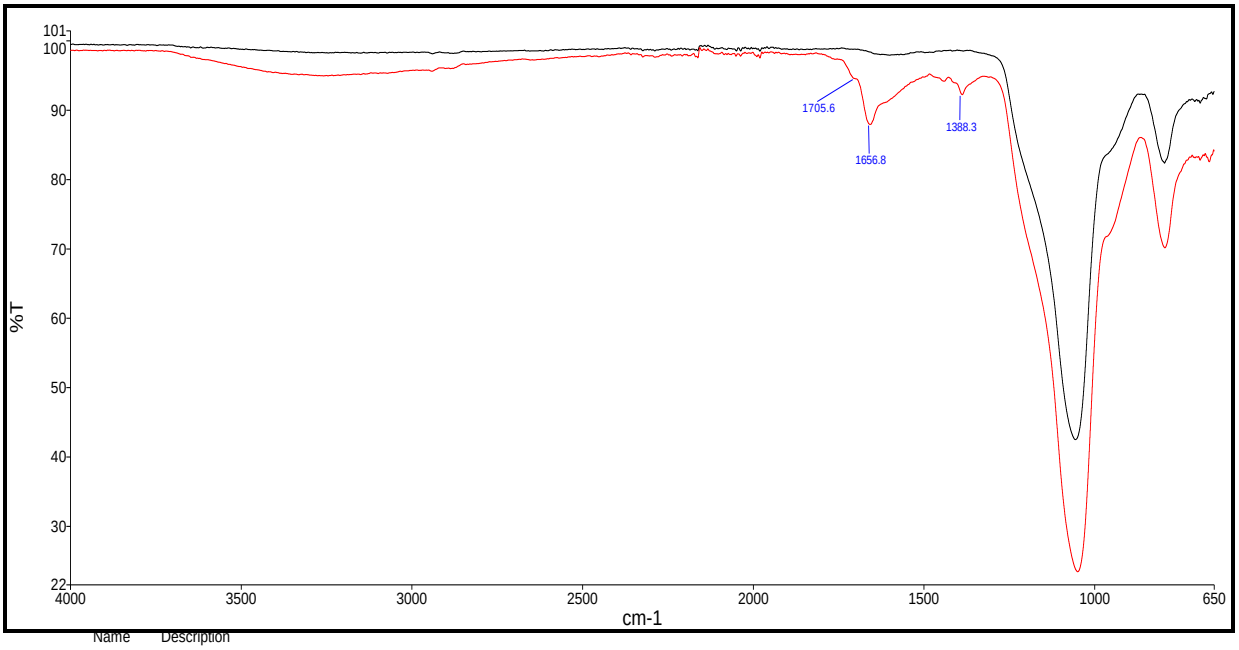


Şekil 8. 1. Hümik asit FT-IR spektrum

Çizelge 8. 1. Hümik Asit FT-IR spektrum değerleri

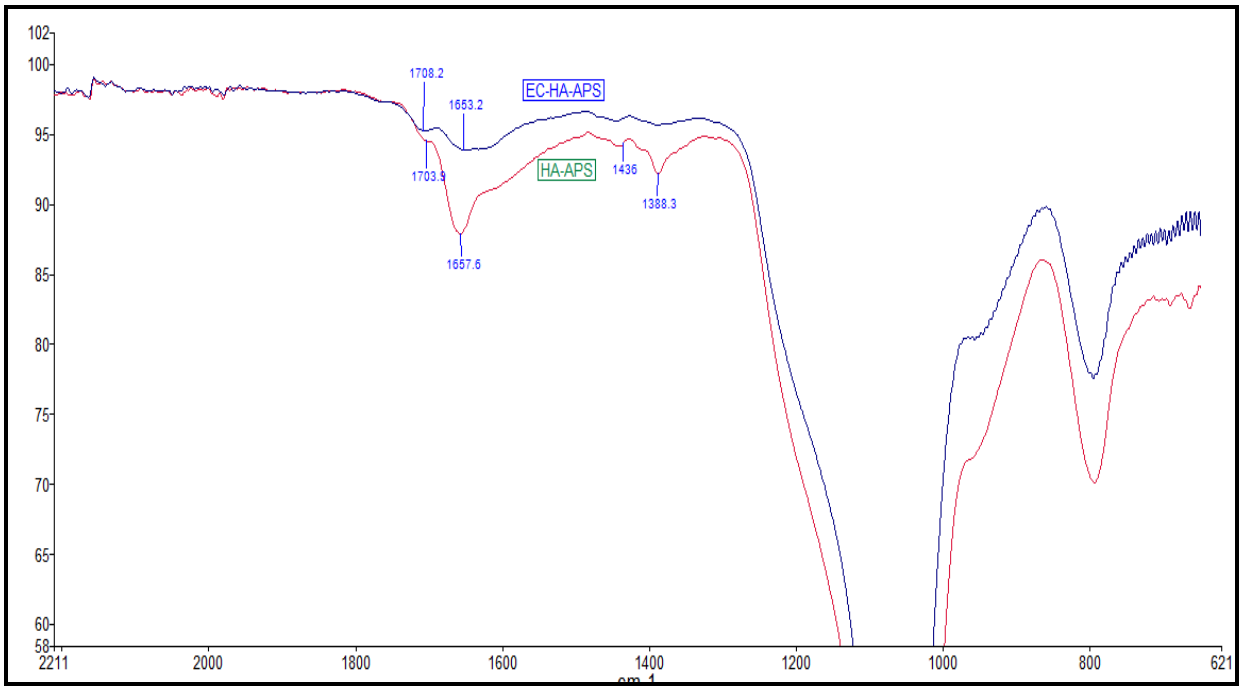
***Bölge* (cm^{-1})**	***Gerilim***
3400-2200	-OH ve -NH_3^+, -NH_2^+, -CO-NH_2, -CO-NH-, -S-H, -P-H gruplarından gelen küçük katkılar.
3050	Aromatik gruplar,
2920-2850	Alifatik gruplar, metoksi grupları,
1700	Karboksil gruplarının karbonil titreşimleri, aldehitler ve ketonlar, ve esterlerin karbonil gruplarından geldiği varsayılan katkılar.
1650	Amit gruplarının -C=O ve kinon ketonlarının -C=O titreşimleri, nitrat (R-O-NO_2) ve nitritlerden (R-O-NO) katkılar.
1550	-COO^-, -C-NO_2 ve -C=C-,
1500	-N-H, -C=N- ve -C=C-,
1450	Alifatik -C-H,
1420	Primer amitlerin -C=N titreşimleri, -COO^- tarzı gruplardan geldiği varsayılan katkılar.
1360	-CO-CH_3 ve nitrattan geldiği varsayılan titreşimler,
1315	Sülfone grupları (SO_2), 1330-1050 arasındaki bir alanda bulunan esterlerde görülmesi gereken iki banttan biri,
1270	Nitratlar (R-O-NO_2), =C-O-C- grupları ve -P=O ve fenolik grupların -C-

	O titreşimlerinden geldiği tahmin edilen katkılar.
1210	-COOH'ın -OH ve -C-O titreşimleri, fenol ve aril eterlerinin -C-O grupları, tersiyer alkol ve P-O-arilden geldiği tahmin edilen titreşimler,
1120	Alifatik OH-gruplarının -C-OH titreşimleri, sülfoneler,
1075	Alkollerin -C-O grupları ve alifatik eterlerin C-O grup titreşimleri,
1020	Polisakkaritlerin ya da benzer maddelerin -C-O grupları ve silikatlardan gelen Si-O, S=O, P-O-alkil ya da =C-O-C'dan geldiği varsayılan katkılar
900	$R_2C=CH_2$ grupları,
873-728	Aromatik C-H, daha az subsitüte olmuş halkalar daha düşük dalga boylarında görülür.
794	2 ya da 3 komşu H ve/veya izole H içeren benzen halkaları, $R_2C=CRH$ grup ve nitratlar,
766	Sp^3-CH_2 grupları ve 4 ve/veya 5 komşu H içeren benzen halkaları,



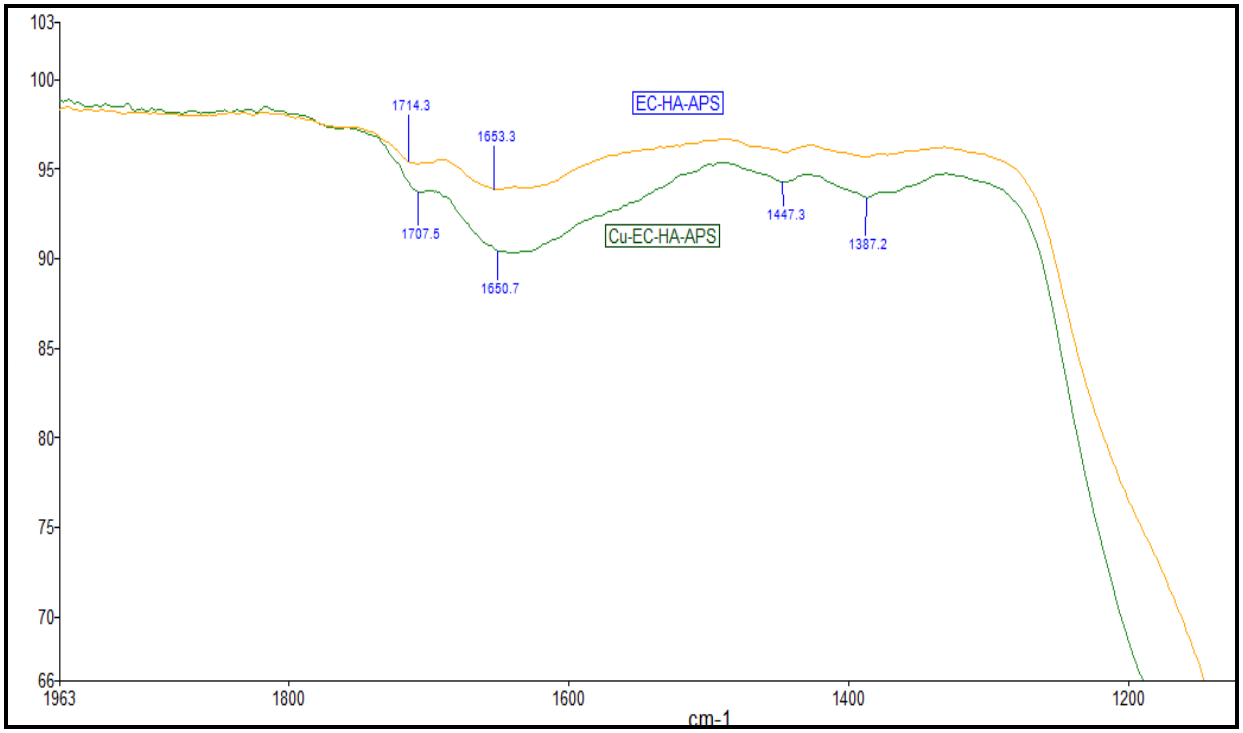
Şekil 8. 2. APS ve HA-APS FT-IR spektrumu

Hümik asidin aminopropilsilikaya kimyasal olarak bağlandığını kanıtlamak için FT-IR analizleri yürütülmüştür. Hümik asidin aminopropilsilika üzerindeki aminopropil uçlarına kimyasal olarak bağlandığını kanıtlayacak bant aralıkları 1630-1691 cm^{-1} aralığındaki belirgin bir şekilde ortaya çıkan piklerdir. Ayrıca 1708 cm^{-1} de ortaya çıkan -COOH bantları, aminopropil silikayla kıyaslandığında hümik asidin aminopropil uçlarına -COOH ile amid bağı oluşturarak bağlandığını ispatlamaktadır.



Şekil 8. 3. HA-APS ve EC-HA-APS FT-IR farkı

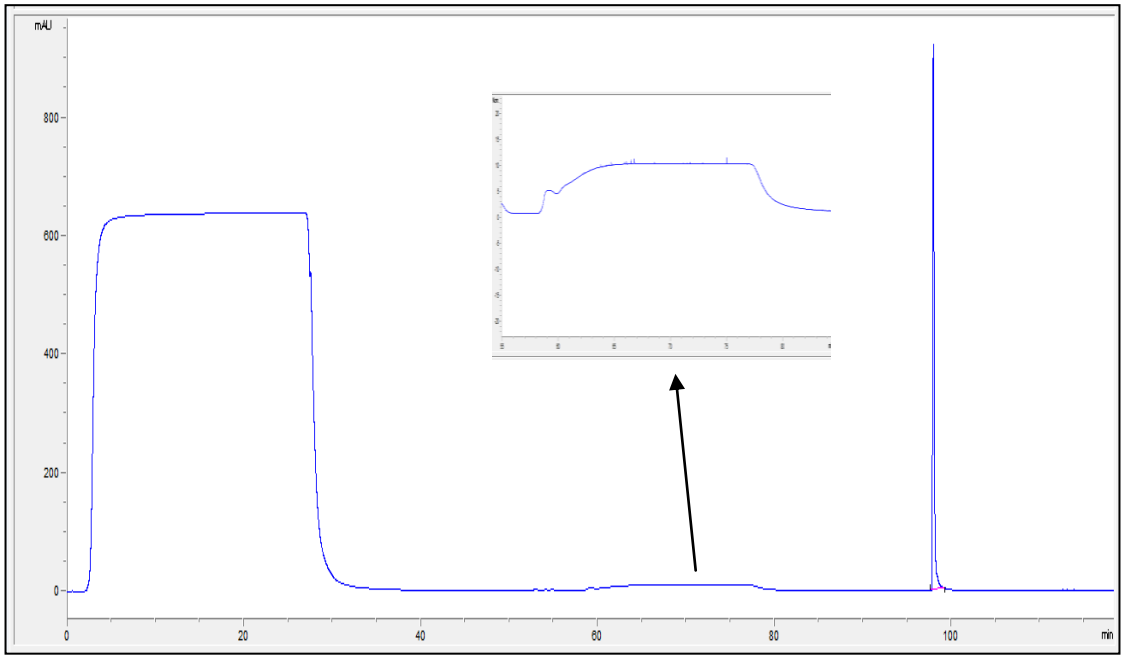
1476-1723 cm^{-1} aralığındaki bant değişimleri, end-capping işlemi ile aminopropilsilika üzerindeki amin uçlarının asetil klorür ile kapatılmasından sonra -COOH piklerinin HA-APS'ye oranla daha fazla belirginleşmesi ile ilişkilendirilmiştir.



Şekil 8. 4. Cu-EC-HA-APS ve EC-HA-APS FT-IR sonuçları arasındaki fark

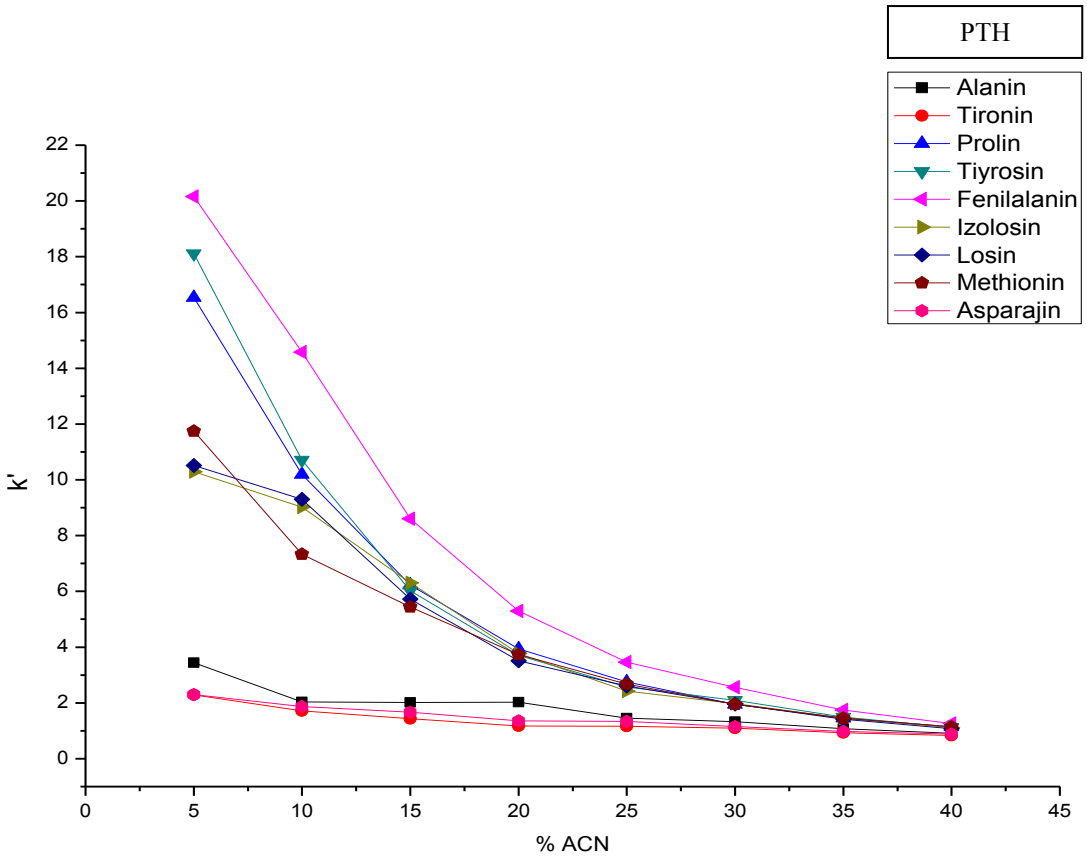
1491-1735 cm^{-1} aralığındaki bantlarda görülen belirgin değişim, bu aralıklardaki -COOH grupları ile Cu^{2+} metali arasındaki kompleksleşmeden dolayı ortaya çıkan yeni bağlardan kaynaklandığına yorumlanmıştır.

8.3. Ters Faz/İyon değişimi/Ligand Değişimi Karma Modda Yürütülen Analizler



Şekil 8. 5. EC-HA-APS sabit fazına 0,1 M Cu^{2+} iyonu yükleme ve sıyırma on-line SPE sistem kromatogramı

EC-HA-APS kolonunu ligand değişim formuna dönüştürmek için 0,1 M Cu^{2+} bulunan çözelti on-line olarak sabit faza yüklenmiştir. Bu şekilde sabit faza ligand değişim özelliği kazandırılmış ve PTH amino asitlerinin ayrımında bu özellikten faydalanılmıştır.



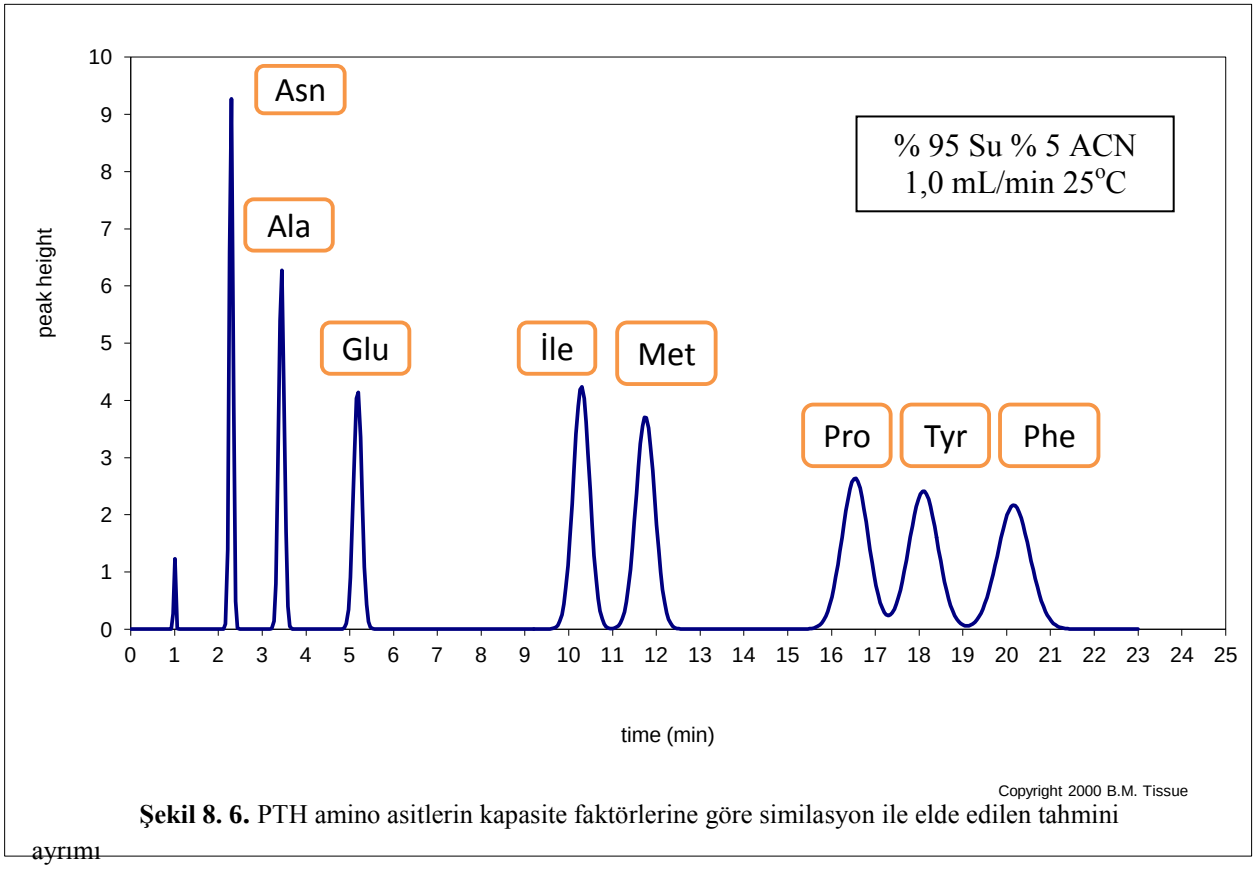
Çizelge 8. 2. PTH-Amino asitlerin kapasite değerleri

Kapasite Faktörü (k')

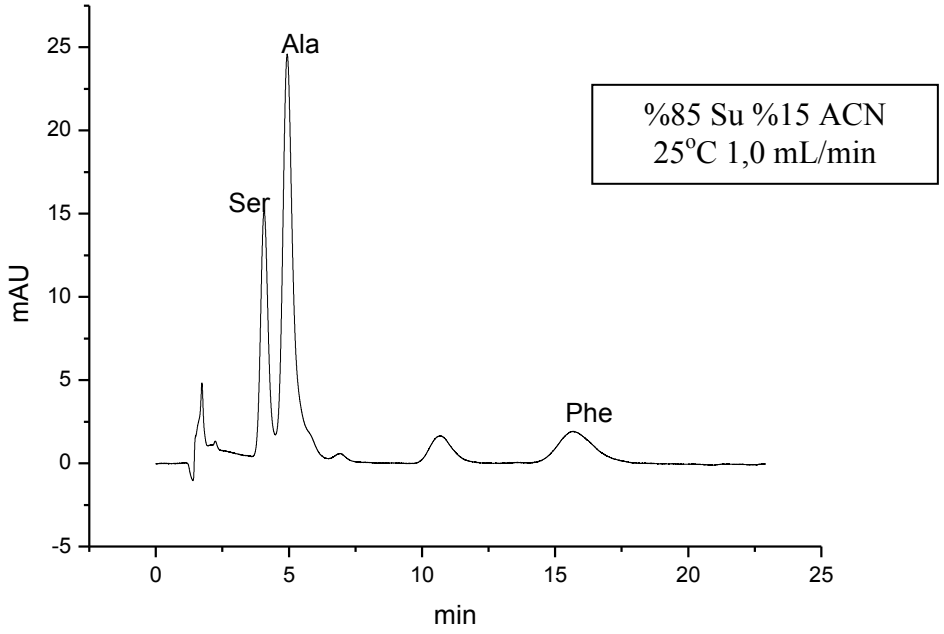
% ACN	Asn	Ala	Gln	Thr	Pro	Tyr	Phe	İle	Leu	Met
40	0,88	0,91	0,94	0,83	1,14	1,12	1,26	1,12	1,07	1,14
35	0,98	1,07	1,09	0,93	1,45	1,49	1,74	1,46	1,42	1,46
30	1,15	1,33	1,28	1,10	1,95	2,09	2,56	1,98	1,96	1,95
25	1,34	1,45	1,58	1,16	2,75	2,57	3,46	2,43	2,61	2,68
20	1,36	2,03	1,73	1,17	3,94	3,71	5,29	3,77	3,51	3,73
15	1,67	2,02	2,66	1,44	6,23	6,02	8,60	6,31	5,72	5,44
10	1,87	2,03	3,57	1,72	1,19	10,71	14,58	9,03	9,31	7,34
5	2,29	3,44	5,18	2,29	16,54	18,10	20,16	10,29	10,52	11,75

Ters faz sıvı kromatografi şartlarında sabit fazın apolar olması ve hareketli fazın polaritesinin yüksek olması maddelerin çıkış zamanlarını etkilemekte ve polar özellik gösteren maddeler önce çıkarken apolar özellik gösteren maddelerin ise daha sonra çıkmasını sağlamaktadır. Bu ters faz özelliği EC-HA-APS sabit fazında alifatik ve aromatik uçlar tarafından gösterilmektedir. Sabit fazın apolar özelliği end-capping işlemi ile arttırılmakta ve bu modda daha kolay kullanılmaktadır.

Bu sabit faza Cu^{2+} iyonunun yüklenmesi ile sabit faz, ligand değişim özelliği kazanmakta ve bu sayede kromatografik ayrımlara yeni bir boyut gelmektedir. Zayıf iyonik etkileşimleri ve ligand değişimi de kullanılarak çoklu mod ayırma işlemi yapılmaktadır. EC-HA-APS sabit fazı ticari olarak kullanılan karma mod sabit fazların

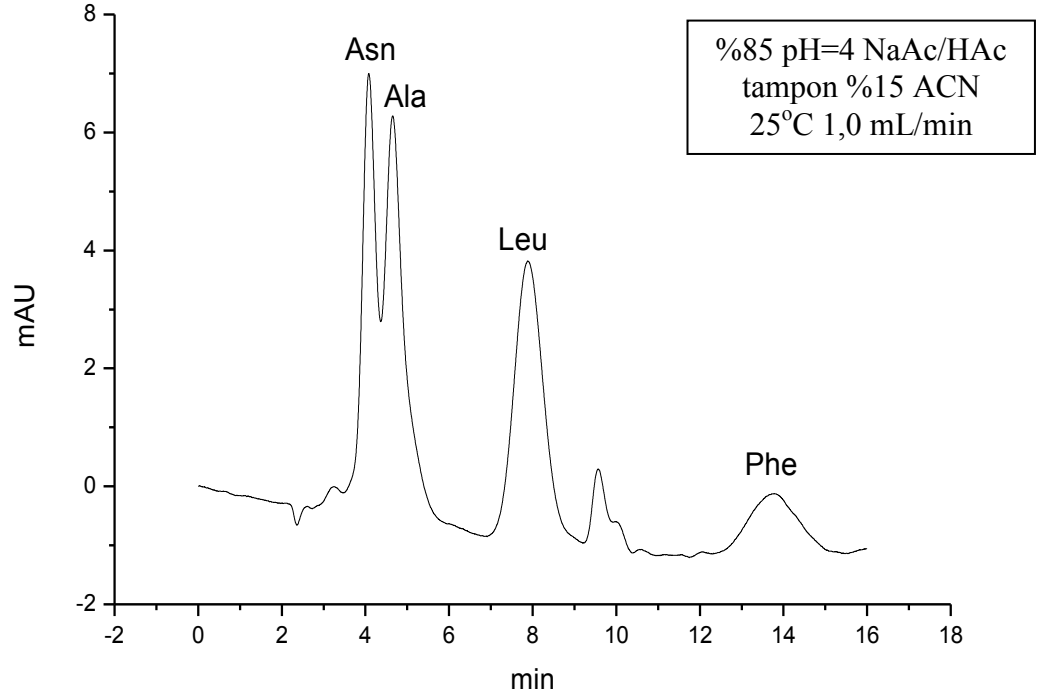


Şekil 8. 6. PTH amino asitlerin kapasite faktörlerine göre similasyon ile elde edilen tahmini ayrımı



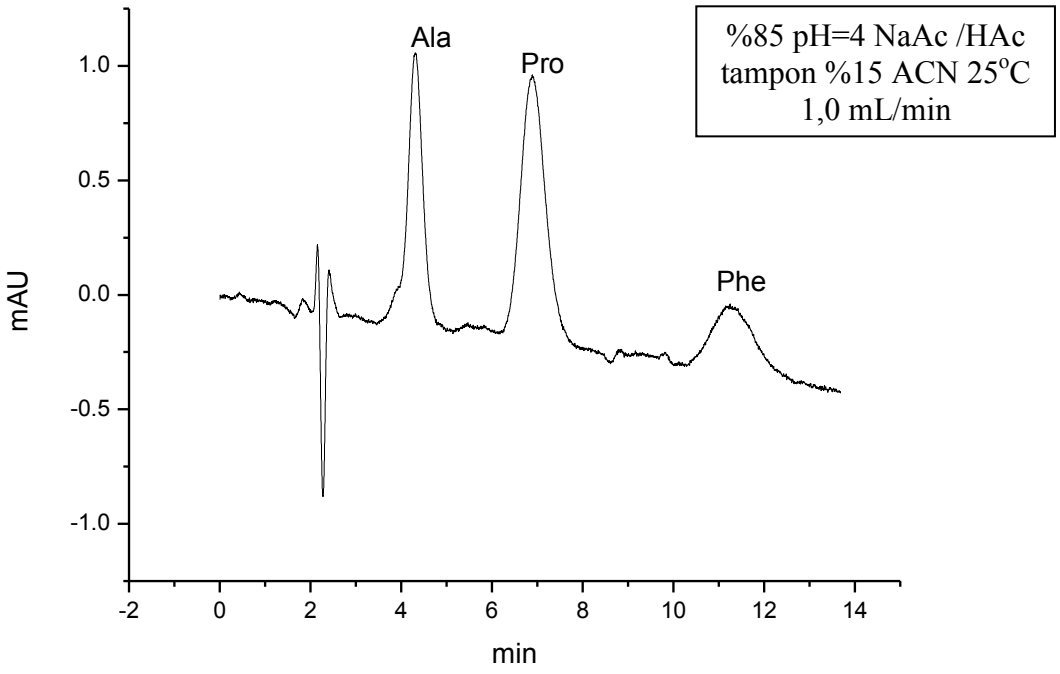
Şekil 8. 7. Bazı PTH amino asitlerin ayrımını gösteren kromatogram

PTH-serin amino asidi, polar özellik gösterdiği ve hareketli fazın su yüzdesi fazla olduğu için yukarıdaki kromatogramda ilk çıkan pik olmuştur. PTH-fenilalanin ise polaritesi en düşük olduğu için sabit fazla daha çok etkileşime girmiş ve en geç çıkan pik olmuştur.



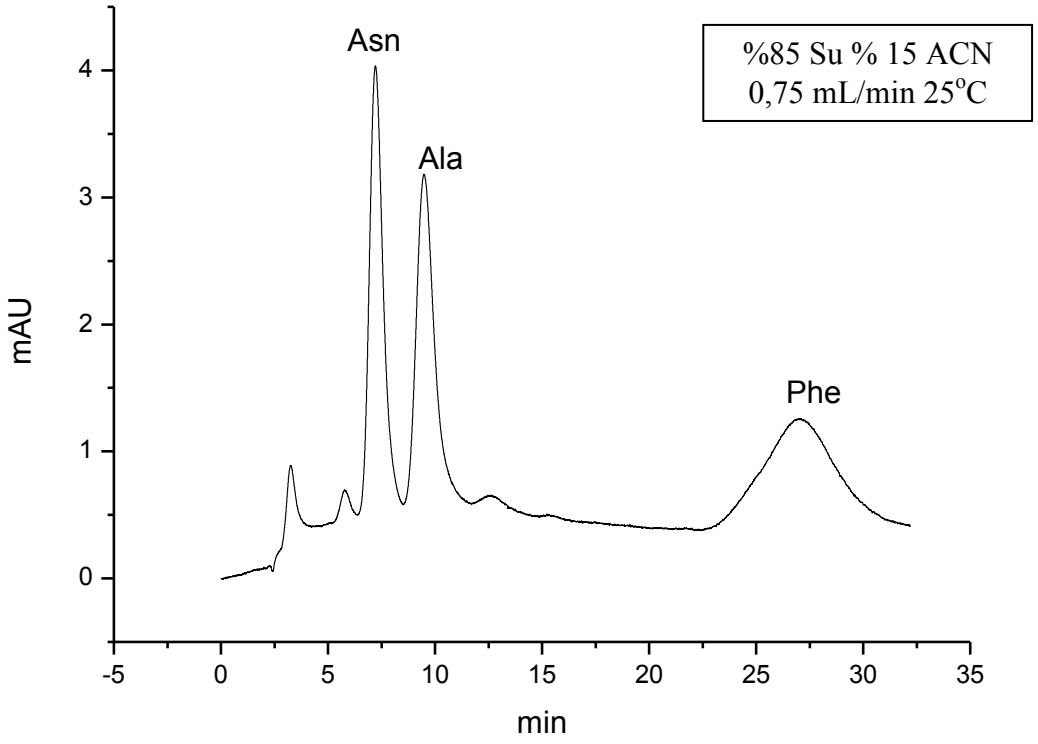
Şekil 8. 8. Bazı PTH amino asitlerin ayrımını gösteren kromatogram

PTH amino asitlerinin dörtlü karışımının ayrımı NaAc/HAc tamponu ile de denenmiştir.



Şekil 8. 9. Bazı PTH amino asitlerin ayrımını gösteren kromatogram

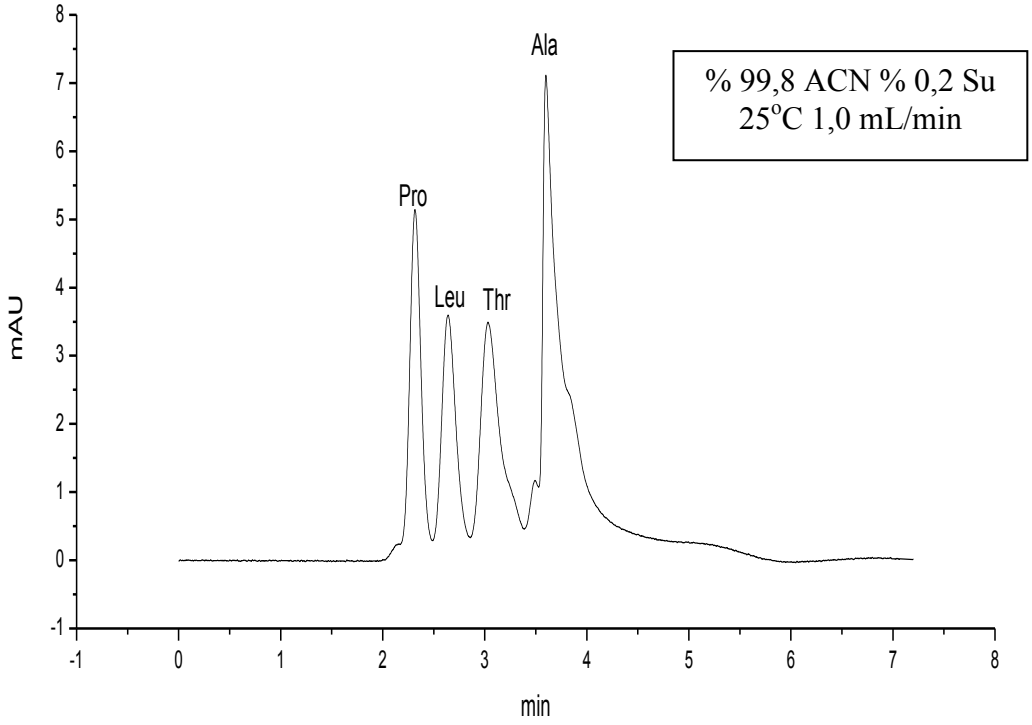
Ters faz modda amino asitlerin ayrımı NAc/HAc tamponu kullanılarak denenmiştir ve hidrofobik türlerin ayrımı daha kolay olmuştur. Çünkü sabit ve hareketli fazın etkisi ile bu türlerin, hümik asit sabit fazı ile etkileşimi daha fazla olmuş ve Cu^{2+} iyonunun etkisi ile bu ayrım gerçekleşmiştir.



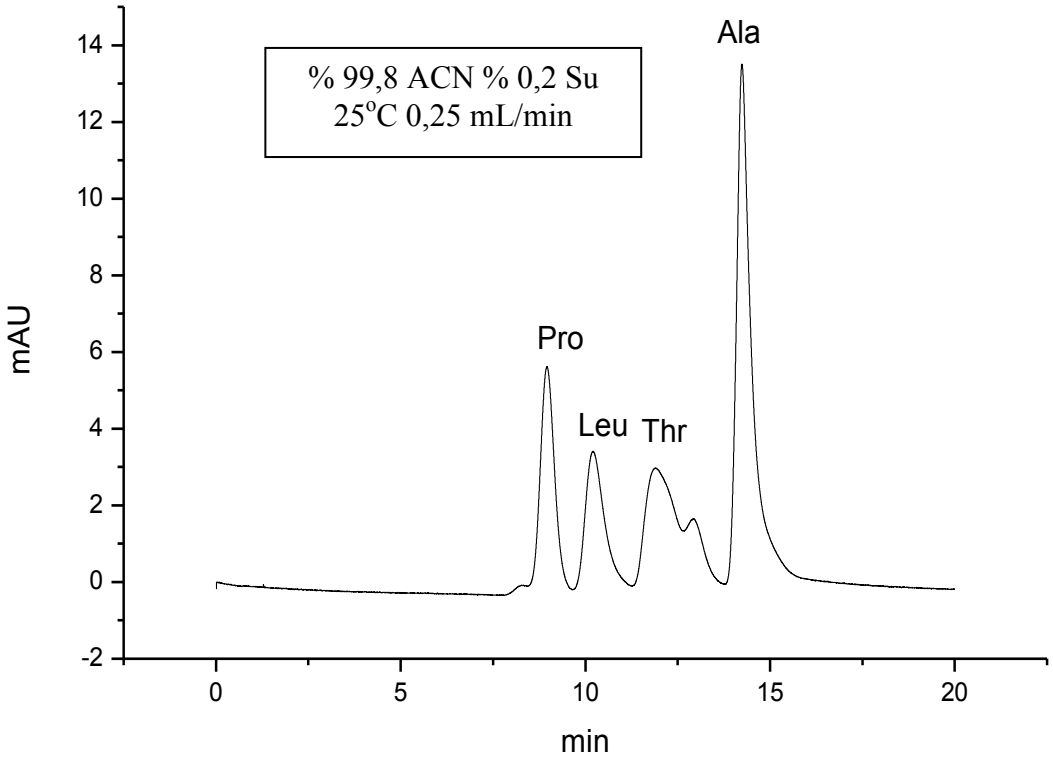
Şekil 8. 10. Bazı PTH amino asitlerin ayrımını gösteren kromatogram

Yukarıda yapılan ayırmalar, EC-HA-APS sabit fazının ters faz modunda da uygulanabilirliğini kanıtlamakta ve karma mod sabit faz özelliği gösterdiğini ispatlamaktadır. Hümik asidin yapısında bulunan -COOH ve -OH grupları polar özellik gösterirken; içerisinde barındırdığı alifatik ve aromatik gruplar da apolar özellik göstermektedir. Sabit fazla analit arasındaki Van der Walls etkileşimleri ile maddeler ayrılmakta ve polar türler apolar türlerden önce çıkmaktadır. Birbirine yakın türlerin ayrımı ligand değişim özelliği kullanılarak yapılmıştır. Bu şekilde ters faz ayırma modunda çoklu mod bir ayrım yapılmaktadır.

8.3.1 EC-HA-APS sabit fazına HILIC şartlarında yürütülen analizler



Şekil 8. 11. Bazı PTH amino asitlerin HILIC şartlarında ayrımını gösteren kromatogram



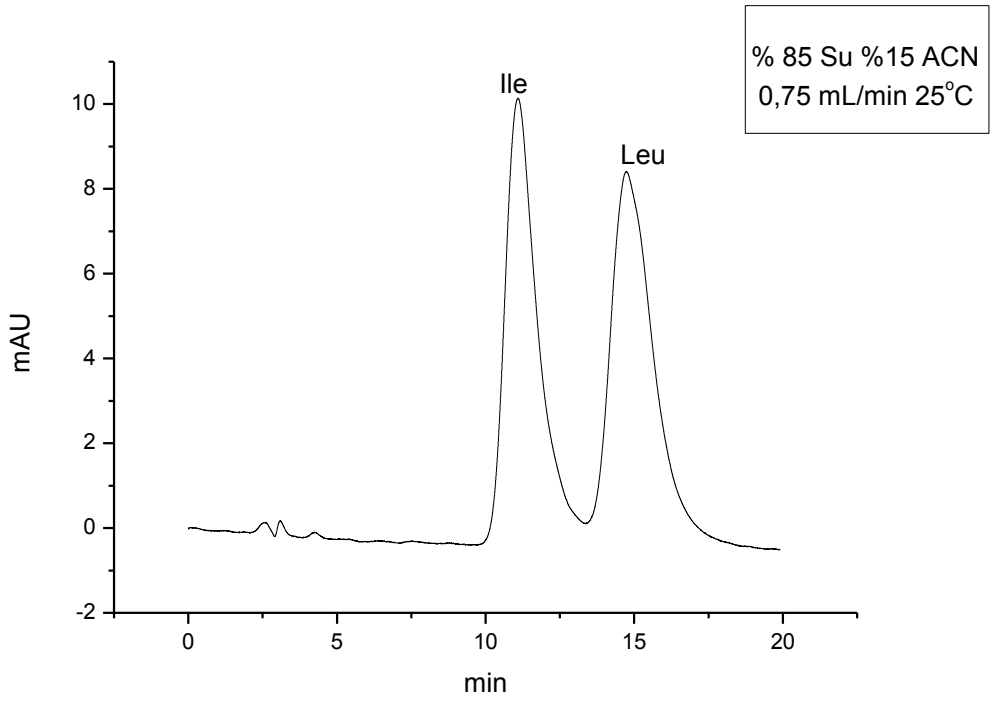
Şekil 8. 12. Bazı PTH amino asitlerin HILIC şartlarında ayrımını gösteren kromatogram

EC-HA-APS sabit fazı ile HILIC şartlarında yapılan ayrımlarda, HILIC tekniğinin mekanizmasından da beklendiği gibi, polaritesi düşük olan maddeler sabit fazdaki su yüzeyinde kalmadan daha erken çıkmış ve polaritesi yüksek olanlar ise sabit faz su yüzeyi ile daha çok etkileşerek daha sonra çıkmışlardır. Asparagin bu maddeler arasında polaritesi en yüksek olan olduğu için sabit faz yüzeyinde en fazla tutunmuş ve pik vermemiştir. PTH-Asparajin'in düzgün bir pik vermesi için su miktarının daha fazla olması gerekmektedir. Pik verebilmesi için ya hareketli faz hızını arttırmak ya da su miktarını arttırmak gerekmektedir.

8.3.2 EC-HA-APS sabit fazına Pb^{+2} iyonu yüklenme ve denemeler

Literatürde hümik asit ve metal kompleksleri üzerine çok sayıda araştırma bulunmaktadır. Bu araştırmalara göre, Pb^{+2}, hümik asidin aktif uçlarına en fazla bağlanan metal iyonu olduğu için EC-HA-APS sabit fazına Pb^{+2} metal iyonu çözeltisi yüklenmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalarda Pb^{+2} ile gerçekleştirilen ayırmaların, PTH amino asitleri üzerine Cu^{+2} metal iyonu çözeltisi yüklenen sabit fazla yapılan ayırmalar kadar pek iyi olmadığı gözlenmiştir.

PTH-Leu, PTH-Ile birbirine yakın özellik gösteren ve ayrımı Cu^{+2} yüklü kolonla yapılamayan iki amino asittir. Pb^{+2} iyonu yüklü sabit fazla bu amino asitlerin ayrımı yapılmıştır.



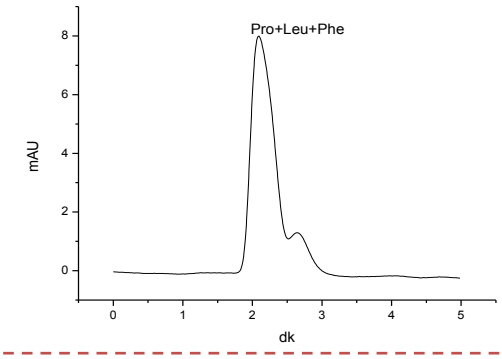
Şekil 8. 13. PTH-Leu ve PTH-İle ayrımını gösteren kromatogram

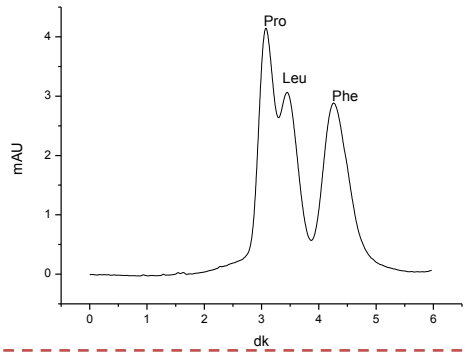
PTH-Ile ve PTH-Leu birbirine yakın özellik gösteren ve ayrılması zor olan maddelerdir. Bu maddelerin bir kolonda bu kadar iyi bir şekilde ayrılıyor olması bize kolonun ayırma gücünün verimliliği hakkında iyi bir bilgi vermektedir.

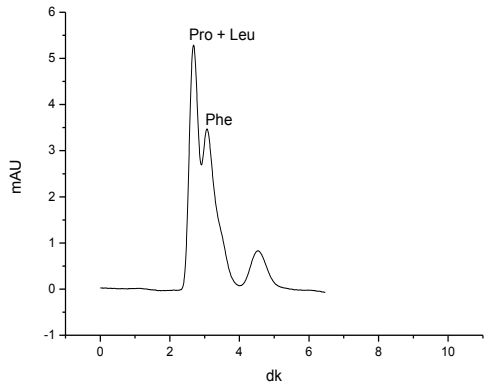
8.4. Hidrofilik Etkileşim Sıvı Kromatografi Şartlarında Yürütülen Analizler

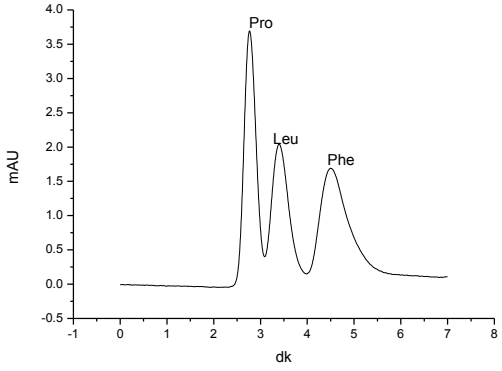
HILIC şartlarında PTH amino asitlerin polariteye ve hidrolik özelliklerine göre ayrılmalarını araştırmak için değişik şartlarda PTH-Pro, PTH-Leu, PTH-Phe karışımı kolona gönderilmiş ve sonuçlar dikkate alınarak bir deneysel tasarım oluşturulmuştur. HILIC şartlarında ayrım için EC-HA-APS'den daha polar bir sabit faz olan HA-APS kullanılmıştır.

Çizelge 8. 3. HILIC şartlarında yürütülen ön denemeler

<table>
<tr>
<td>

% 5 Su % 95 ACN 10°C 1,0 mL/min</td>
<td>

%2 Su % 98 ACN 25°C 0,8mL/min</td>
</tr>
<tr>
<td>

% 0,6 Su % 99,4 ACN 17,5°C 0,8 mL/min</td>
<td>

% 0,2 Su % 99.8 ACN 32,5°C 0,8 mL/min</td>
</tr>
</table>

Su miktarının azalması ile ayırımların arttığı gözlenmiştir ve ayırma üzerine sıcaklık ve hareketli faz hızının etkisi olduğu gözlemlenmiştir. Sıcaklık, akış hızı ve hareketli faz kompozisyonu gibi üç kromatografik parametrenin etkisinin de gözlemleneceği ve optimum ayırma şartlarına yaklaştıracak bir deneysel tasarım yapılmıştır.

8.4.1. Kısmi faktöriyel tasarım

Çizelge 8. 4. İlk yapılan deneysel tasarım

	-2	-1	0	1	2
Hız(mL/min)	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
% Su	0,2	0,6	1,0	1,5	2,0
Sıcaklık (^{o}C)	10	17,5	25	32,5	40

Yukarıdaki üç kromatografik faktörün Rs değerine olan etkisini ve sınırları tarafımızca belirlenen şartlar arasındaki optimum ayırma şartlarını bulmak için üç faktörlü ve beş seviyeli bir deneysel tasarım yapılmıştır.

Çizelge 8. 5. Kodlama sistemine göre deney parametrelerinin oluşturulması

Deney No	**Akış Hızı**	**HF %Su**	**Sıcaklık(^{o}C)**
1	0,6	1,0	25,0
2	0,6	0,2	10,0
3	0,2	2,0	40,0
4	0,2	0,2	17,5
5	1,0	1,5	40,0
6	0,4	0,2	25,0
7	1,0	1,0	17,5
8	0,6	1,5	17,5
9	0,4	1,5	32,5
10	0,4	0,6	40,0
11	0,8	0,2	32,5
12	1,0	0,6	25,0
13	0,8	1,0	40,0
14	0,6	0,2	40,0
15	1,0	0,2	10,0
16	1,0	2,0	32,5
17	0,2	0,6	10,0
18	0,8	2,0	25,0
19	0,2	1,0	32,5
20	0,6	0,6	32,5
21	0,8	0,6	17,5
22	0,8	1,5	10,0
23	0,4	2,0	17,5
24	0,1	1,5	25,0
25	0,4	1,0	10,0

Çizelge 8.5 deki deney sırası göz önünde bulundurularak, % su miktarı oranının düşük olması ve hata oranının azaltılması için hareketli faz % su oranı sabit tutulmuş ve deney sıralaması tekrar bir düzene konularak deneyler yürütülmüştür.

Çizelge 8. 6. Bir parametre sabitlenerek oluşturulan deney sıralaması

Deney No	Akış Hızı (mL/min)	HF %Su	Sıcaklık(^{o}C)
4	0,2	0,20	17,5
6	0,4	0,20	25,0
11	0,8	0,20	32,5
14	0,6	0,20	40,0
15	1,0	0,20	10,0
10	0,4	0,60	40,0
12	1,0	0,60	25,0
17	0,2	0,60	10,0
20	0,6	0,60	32,5
21	0,8	0,60	17,5
1	0,6	1,00	25,0
7	1,0	1,00	17,5
13	0,8	1,00	40,0
19	0,2	1,00	32,5
25	0,4	1,00	10,0
5	1,0	1,50	40,0
8	0,6	1,50	17,5
9	0,4	1,50	32,5
22	0,8	1,50	10,0
24	0,2	1,50	25,0
2	0,6	2,00	10,0
3	0,2	2,00	40,0
16	1,0	2,00	32,5
18	0,8	2,00	25,0
23	0,4	2,00	17,5

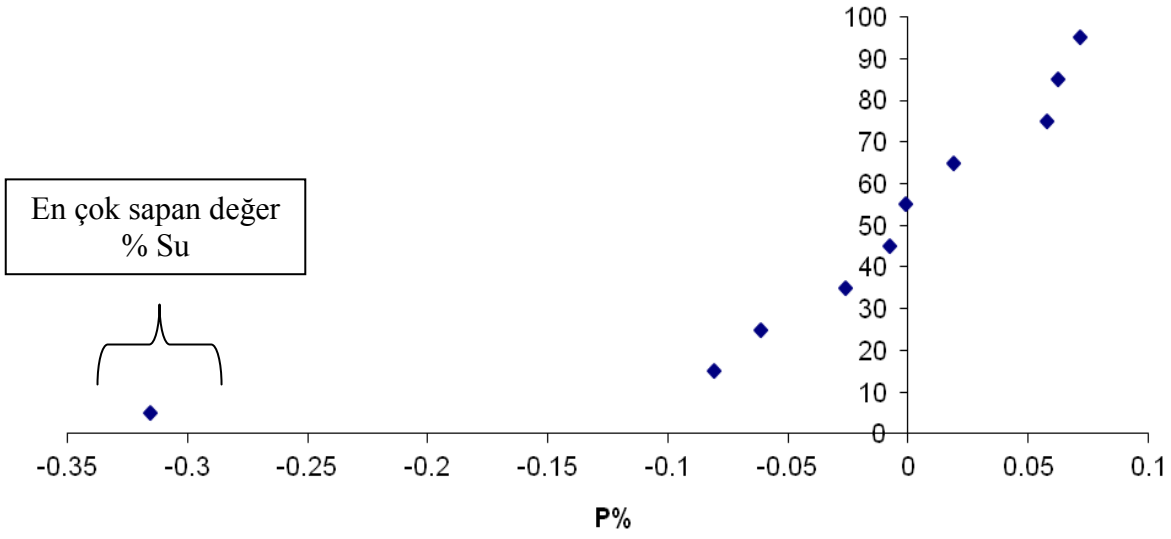
Bu listedeki sıraya göre deneyler dörder tekrarlı yapılmıştır. Sonuçlar dan PTH-Pro, PTH-Leu Rs değerleri ve PTH-Leu, PTH-Phe Rs değerleri hesaplanmıştır. Bu iki Rs değerinden küçük olanı cevap değeri olarak kabul edilmiştir. Bu değerler kullanılarak yüzey grafikleri çizilmiştir.

8.4.2. Normal dağılım grafiklerinin değerlendirilmesi

Normal dağılım grafiği, ayırmalarda hangi kromatografik parametrenin çok etkili olduğunu anlamamıza yardımcı olan önemli bir grafiktir. Bu amaçla normal dağılım grafikleri çizilmiş en çok sapma gösteren parametre bulunmaya çalışılmıştır.

Çizelge 8. 7. Normal dağılım grafiğinin değerleri

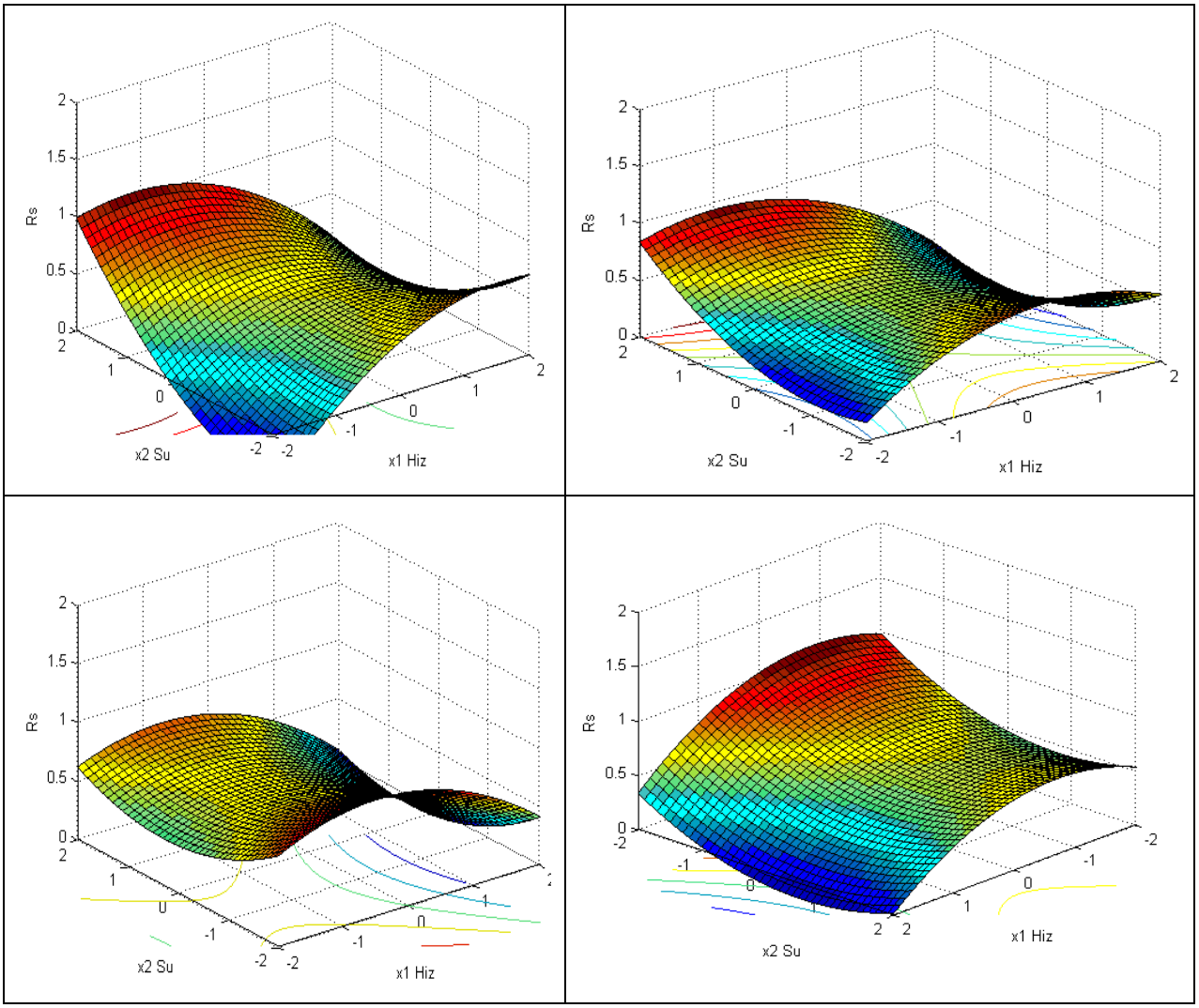
Sıra	Etki	Cevap	% P
1	% Su	-0,31563	5
2	Hız	-0,08084	15
3	T Hız	-0,06128	25
4	% Su T	-0,02609	35
5	$Hız^2$	-0,00784	45
6	T^2	-0,00098	55
7	% Su Hız T	0,019062	65
8	T	0,057936	75
9	% Su Hız	0,062291	85
10	% Su^2	0,071519	95



Şekil 8. 14. Normal dağılım grafiği

Yukarıdaki normal dağılım grafiğinde en çok sapan değer % su miktarını değeri olmuştur. Bu sonuçtan ayırmalar üzerinde en etkili parametrenin % su miktarının olduğu anlaşılmaktadır.

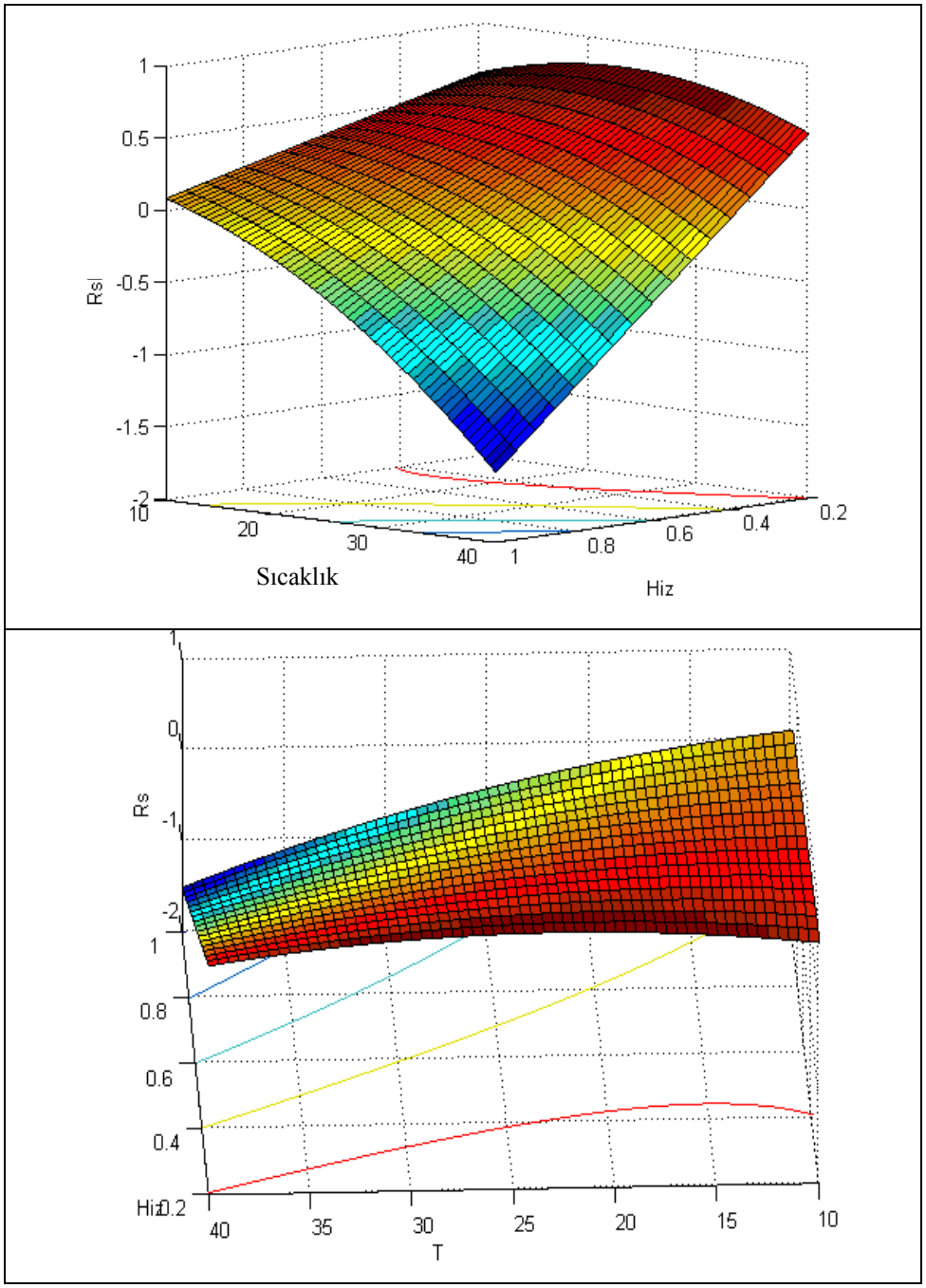
8.4.3. Yüzey grafiklerinin değerlendirilmesi



Şekil 8. 15. Üç faktörün etkisini gösteren yüzey grafikleri

Yukarıdaki grafikler Rs değeri cevap değeri kabul edilerek Sıcaklık, akış hızı ve hareketli faz % su miktarı etkilerinin hep birlikte ele alındığı ve üç parametrenin değişimine karşı Rs değerindeki değişimi göstermektedir. Rs değeri grafikte görüldüğü gibi her üç faktör için -2 değerine yaklaştıkça artmaktadır. Bu artış aradığımız optimum şartların belirlenmesi için iyi bir göstergedir. Bu işlem belirlendikten sonra %Su-Sıcaklık, %Su-Hız, Hız-Sıcaklık grafikleri çizilerek ayırmaya etki eden parametreler değerlendirilmiştir. Yüzey grafiğinde kırmızı alan ve z ekseni Rs değerlerinin arttığı ve dolayısıyla ayrımların daha iyi olduğu bölgeyi göstermektedir.

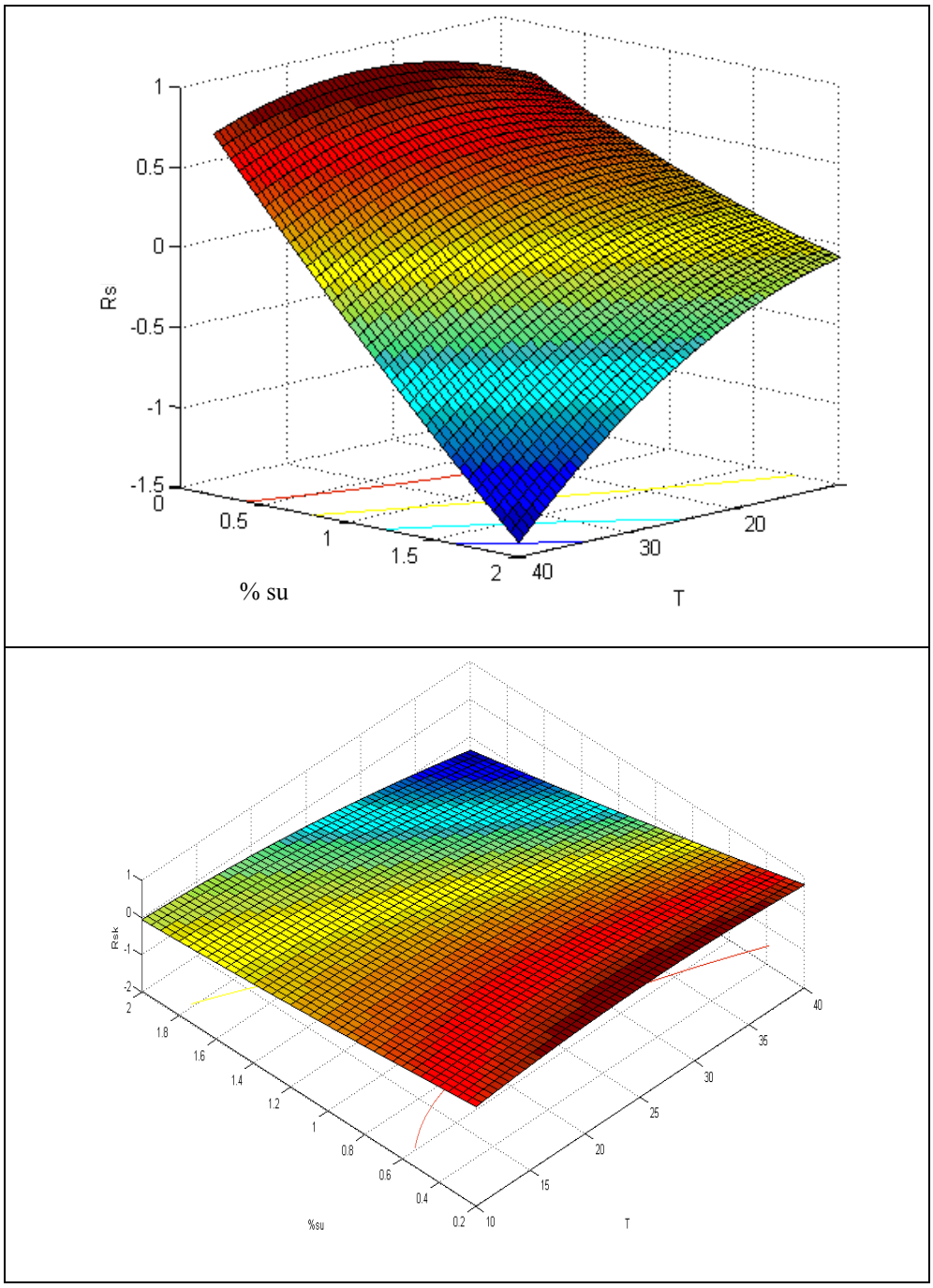
Hız - Sıcaklık



Şekil 8. 16. Hız ve sıcaklığı etkisini gösteren yüzey grafikleri

Hız-Sıcaklık grafiği çizildiğinde bu grafikten, hareketli fazın hızı ve sıcaklık değeri azaldıkça Rs değerinin arttığı görülmektedir. Sıcaklık değerinin 10^{o}C ile 25^{o}C arasında olduğu durum da Rs değerinin daha da arttığı görülmektedir. Bu grafikten; optimum şartlara, akış hızının azaltılması ve sıcaklık değerinin düşürülmesi ile yaklaşılacağı anlaşılmaktadır.

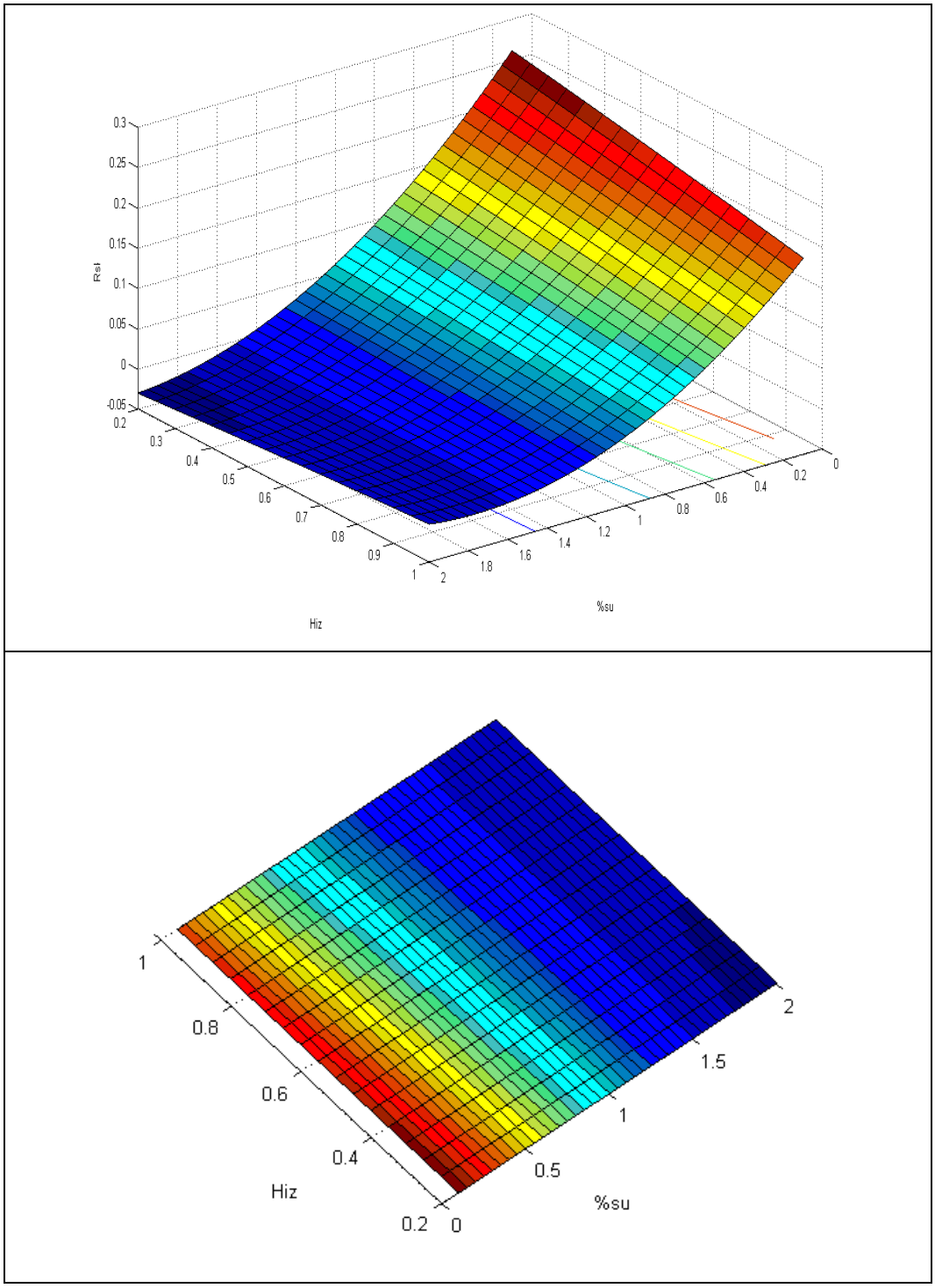
%Su - Sıcaklık



Şekil 8. 17. % Su ve sıcaklığı etkisini gösteren yüzey grafikleri

Yukarıdaki % su ve sıcaklık yüzey grafiğinde, ayırmaların; sıcaklık ve % su miktarının azalması ile daha iyi olduğu anlaşılmasına rağmen. Bu grafikten % su miktarının düştükçe ayrımların daha iyi olduğu sonucu çıkmaktadır. Net bir sıcaklık değeri görülememektedir.

% Su - Hız



Şekil 8. 18. % Su ve Hız etkisini gösteren yüzey grafikleri

Yukarıdaki grafik, Rs değerinin hareketli faz akış hızının ve % su miktarının azalması ile artacağını göstermektedir. Rs değeri en büyük 0,2 mL/min akış elde edilmektedir. Buradan akış hızının 0,2 mL/min ve % su miktarının % 0,1 de daha iyi olduğu görülmektedir.

8.4.4. İkinci deneysel tasarım ve yüzey grafiklerinin değerlendirilmesi

Çizelge 8. 8. İkinci deneysel tasarım

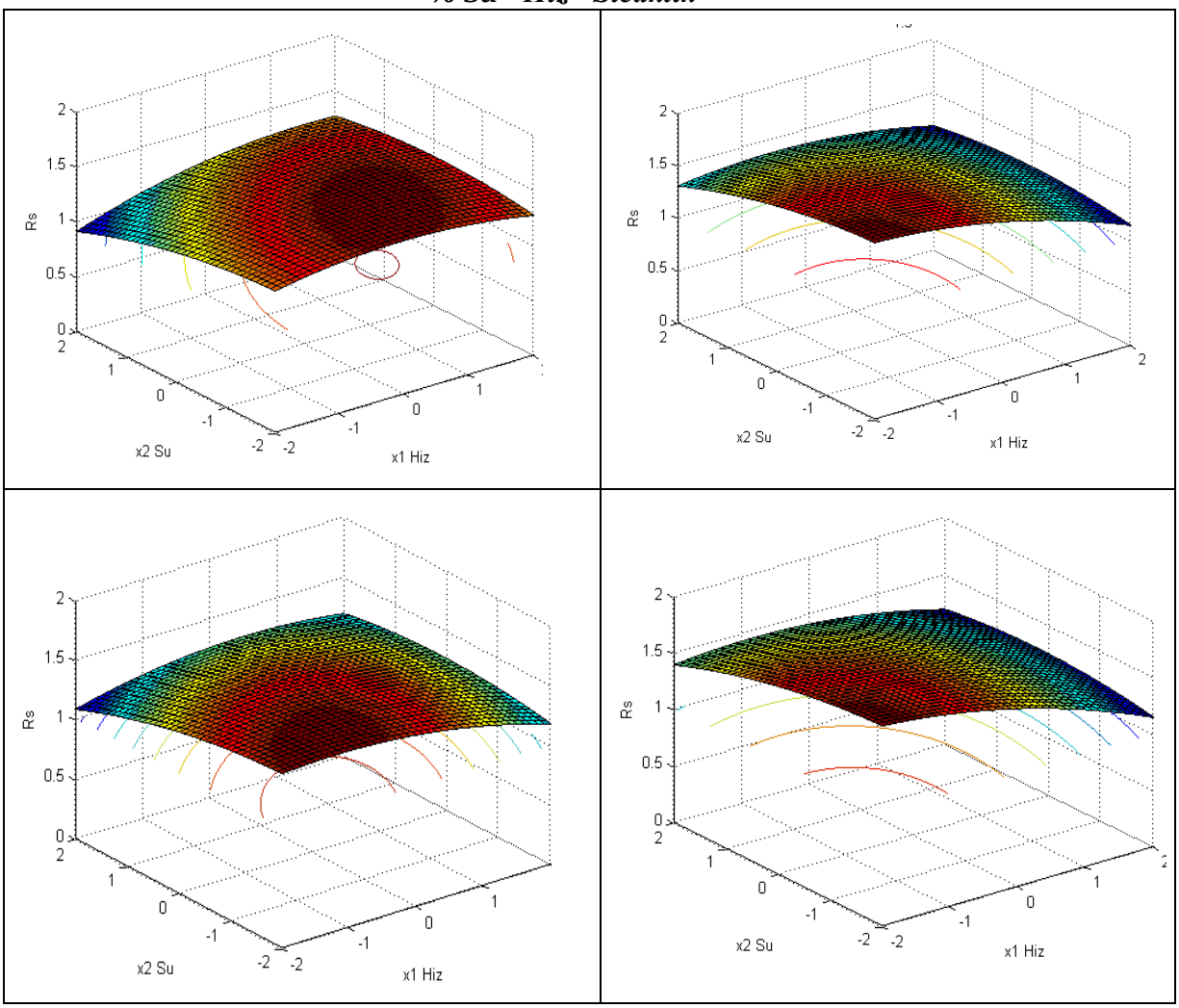
	-2	-1	0	1	2
Hız (mL/min)	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0
% Su	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Sıcaklık (^{o}C)	10	17,5	25	32,5	40

İlk yapılan deneysel tasarımda optimum şartlar hakkında elde edilen bilgilerden % su miktarı, sıcaklık ve akış hızının azalması ile ayırmaların daha iyi olduğu anlaşılmıştır. Normal dağılım grafiklerinden % su miktarını ayırmalar üzerinde en etkili faktör olduğu görülmüştür. İlk tasarımda % su miktarı değeri (0.2-2.0 mL/min) aralığında tutulmuştu. Bu sebeple sıcaklık ve akış hızının ayırmalar üzerine etkisi iyi anlaşılamamaktadır. Bundan dolayı % su miktarı % 0.1-% 0.5 aralığında değişen yeni bir deneysel tasarıma ihtiyaç duyulmuştur. Bu deneysel tasarımda; % su miktarının aralığı daha dar tutularak diğer faktörlerin ayırmalar üzerinde etkisi daha iyi anlaşılacağı ve değerlendirileceği düşünülmüştür.

Çizelge 8. 9. Kodlama sistemine göre deney parametrelerinin oluşturulması

Deney No	Akış Hızı	HF %Su	Sıcaklık(^{o}C)	Deney No	Akış Hızı	HF %Su	Sıcaklık(^{o}C)
1	0.6	0.3	25	4	0.20	0.50	17.5
2	0.6	0.1	10	6	0.40	0.50	25.0
3	0.2	0.1	40	11	0.80	0.50	32.5
4	0.2	0.5	17.5	14	0.60	0.50	40.0
5	1.0	0.2	40	15	1.00	0.50	10.0
6	0.4	0.5	25	10	0.40	0.40	40.0
7	1.0	0.3	17.5	12	1.00	0.40	25.0
8	0.6	0.2	17.5	17	0.20	0.40	10.0
9	0.4	0.2	32.5	20	0.60	0.40	32.5
10	0.4	0.4	40	21	0.80	0.40	17.5
11	0.8	0.5	32.5	1	0.60	0.30	25.0
12	1.0	0.4	25	7	1.00	0.30	17.5
13	0.8	0.3	40	13	0.80	0.30	40.0
14	0.6	0.5	40	19	0.20	0.30	32.5
15	1.0	0.5	10	25	0.40	0.30	10.0
16	1.0	0.5	32.5	5	1.00	0.20	40.0
17	0.2	0.4	10	8	0.60	0.20	17.5
18	0.8	0.1	25	9	0.40	0.20	32.5
19	0.2	0.3	32.5	22	0.80	0.20	10.0
20	0.6	0.4	32.5	24	0.20	0.20	25.0
21	0.8	0.4	17.5	2	0.60	0.10	10.0
22	0.8	0.2	10	3	0.20	0.10	40.0
23	0.4	0.1	17.5	16	1.00	0.10	32.5
24	0.2	0.2	25	18	0.80	0.10	25.0
25	0.4	0.3	10	23	0.40	0.10	17.5

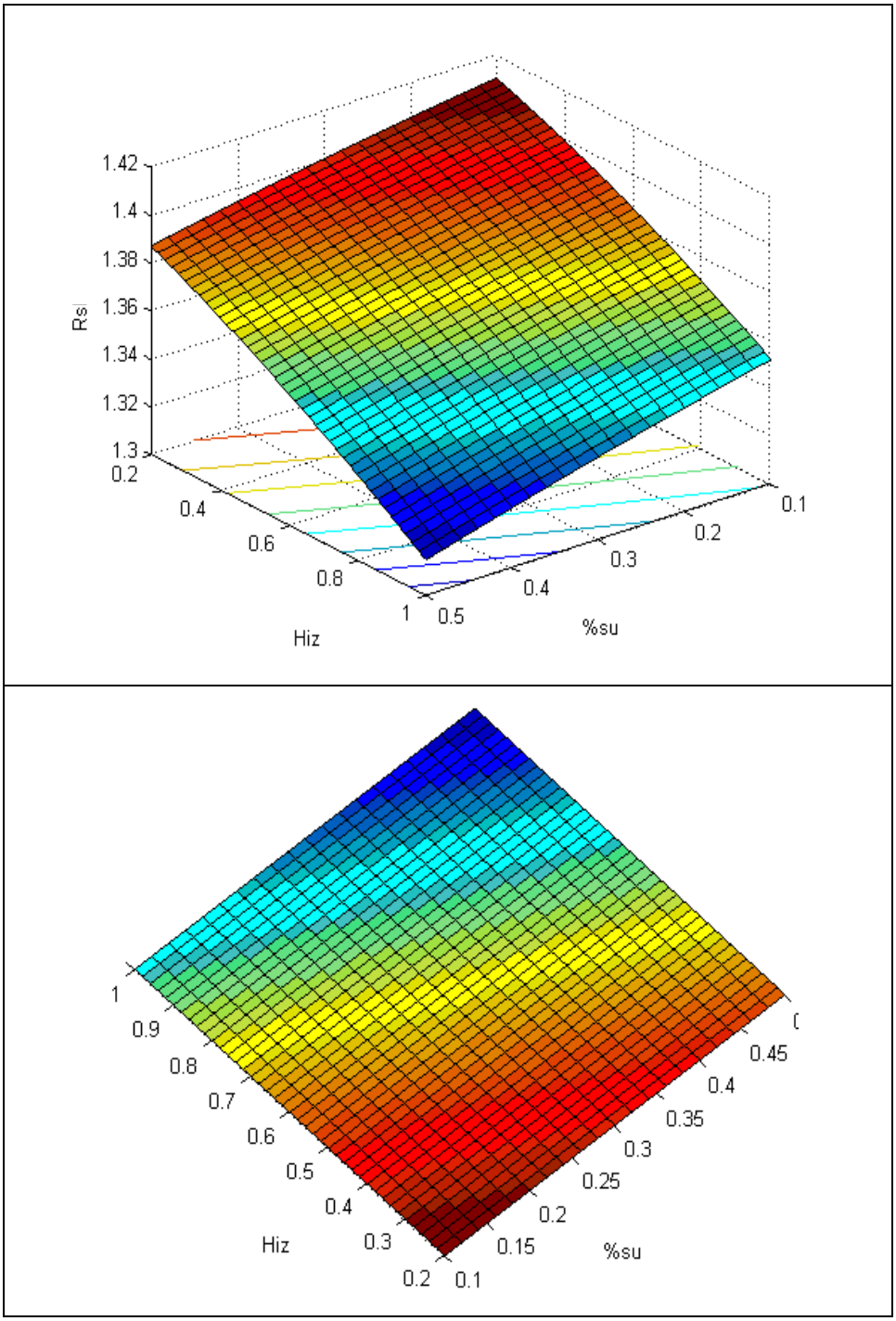
% Su - Hız - Sıcaklık



Şekil 8. 19. Üç faktörün etkisini gösteren yüzey grafiği

% Su miktarı aralığının daha dar aralıklı olması ile yüzey grafiklerinde akış hızı ve % su miktarının sıcaklığa göre değişiminde, Rs değerinde, çok fazla bir değişim olmadığı görülmüştür. Bu yeni tasarımın, tüm parametrelerin etkisini anlamamızda daha uygun olduğu görülmüştür.

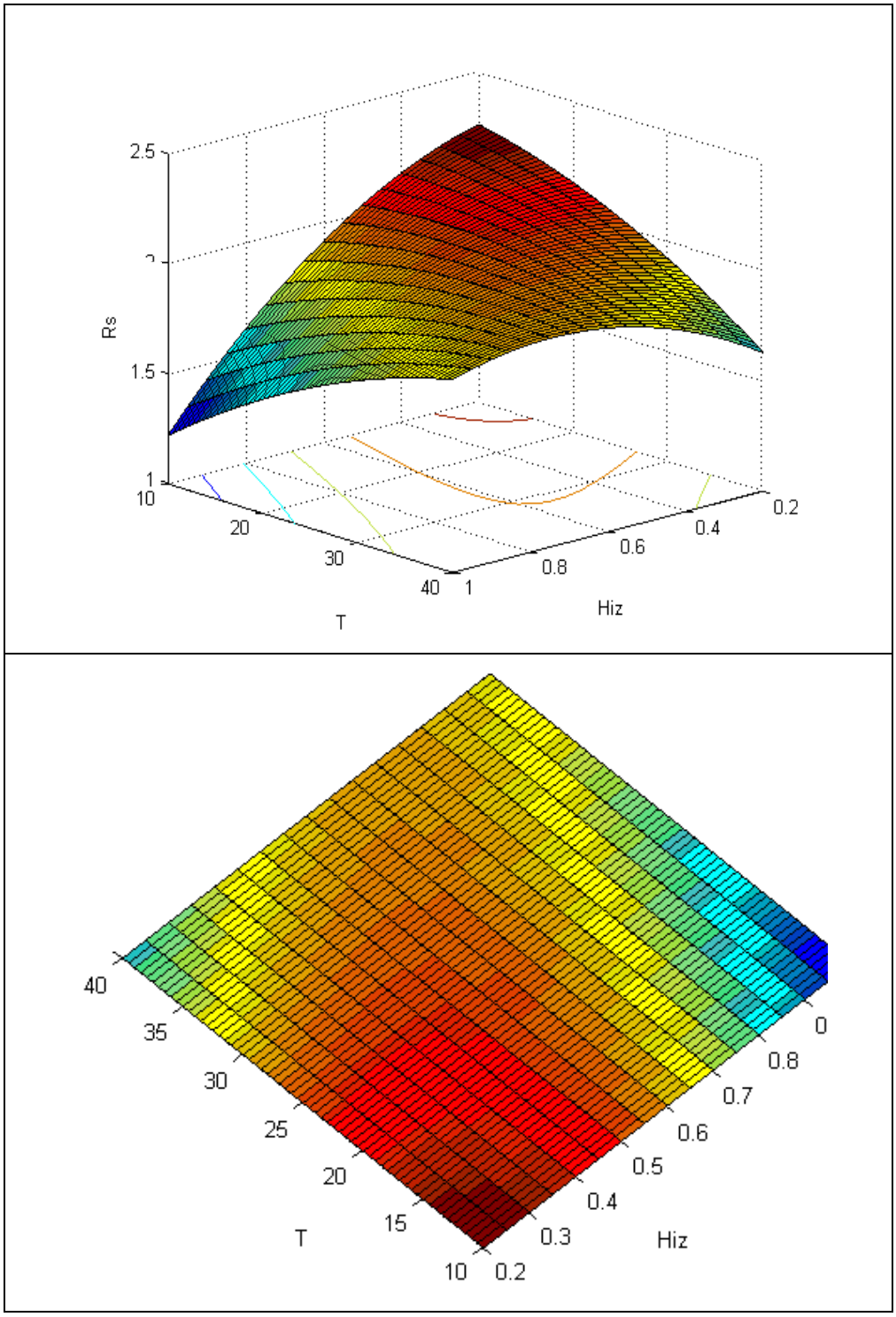
% Su - Hız



Şekil 8. 20. % su ve hızın etkisini gösteren yüzey grafiği

% Su miktarı % 0,1 olduğu akış hızındaki değişme Rs değerinde büyük değişiklikler oluştururken 0,2 mL/min akışta olduğu noktada % su miktarında ki değişmesi ile Rs daha az değişme olmaktadır. Bu grafikte hız, % su dan daha etkilidir.

Hız - Sıcaklık

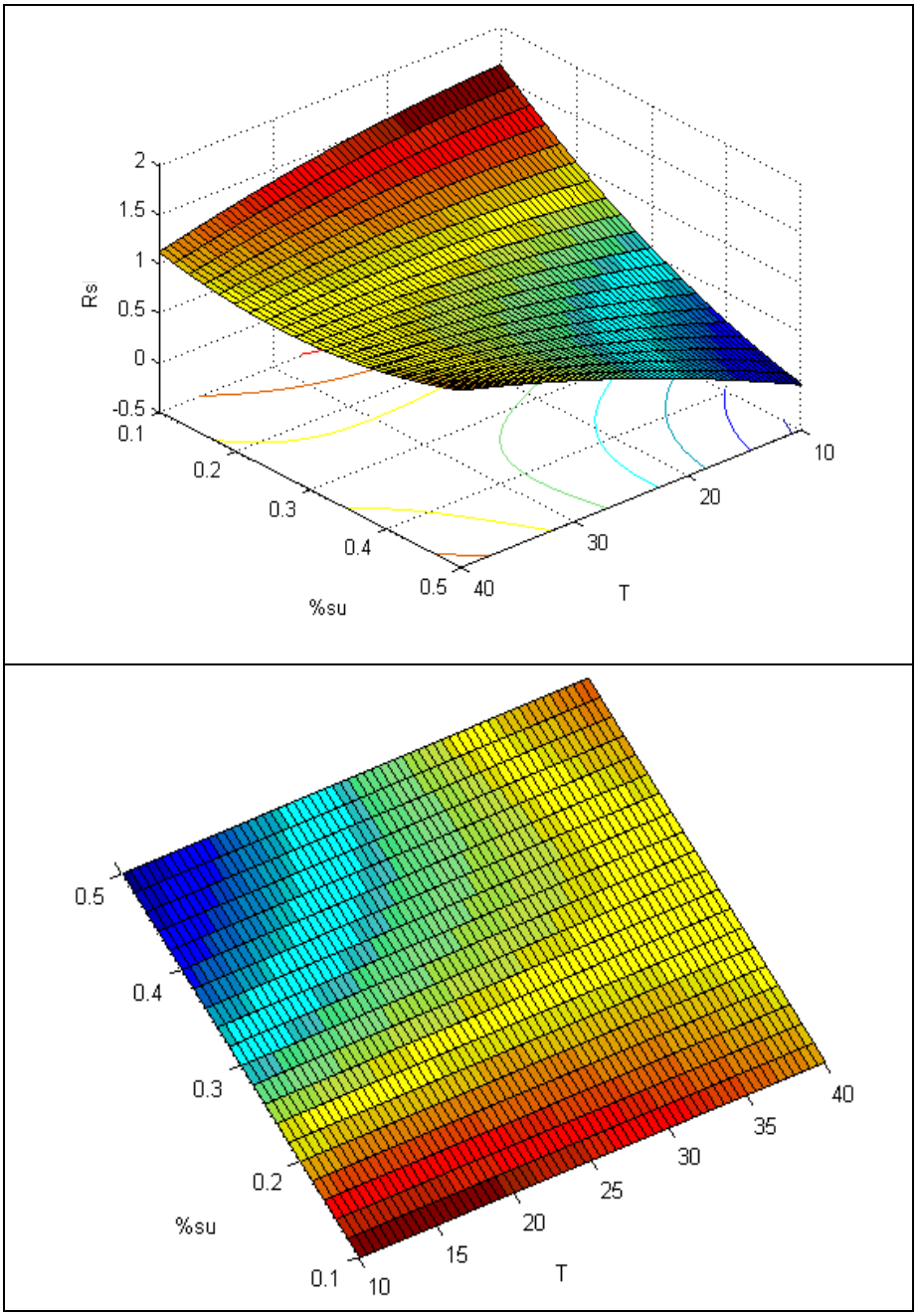


Şekil 8. 21. Hız ve Sıcaklık etkisini gösteren yüzey grafiği

İkinci tasarımda sıcaklık ve akış hızının ayırmalar üzerine etkisi Şekil 8. 21 den anlaşıldığı üzere bu grafikte sıcaklık etkeninin etkisi, akış hızı etkeninin den daha fazladır.

Bu grafikten; Sıcaklığın 10^{o}C de akış hız değerinin ise 0,2 mL/min da daha iyi olduğunu anlaşılmaktadır.

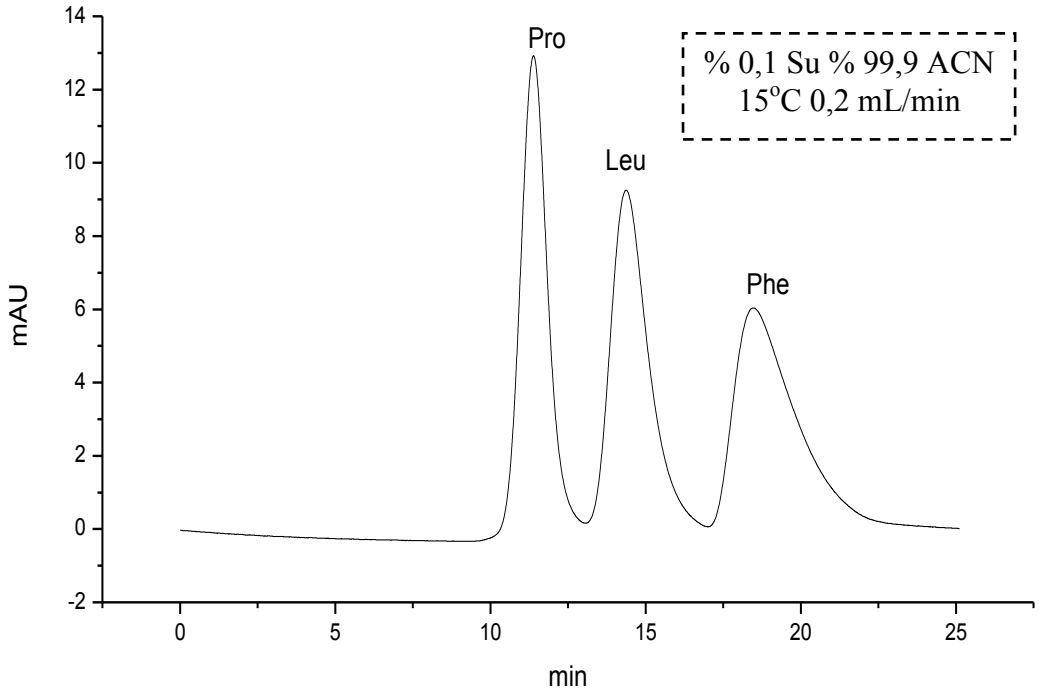
%Su - Sıcaklık



Şekil 8. 22. % Su ve Sıcaklık etkisini gösteren yüzey grafiği

Görüldüğü üzere ikinci deneysel tasarımdan elde edilen grafikler optimum şartların belirlenmesinde daha kesin bilgiler vermektedir. Sıcaklık değeri ve akış hızının Rs değerine olan etkileri daha iyi anlaşılmaktadır. Bu grafikler değerlendirilerek aşağıdaki seviyeler elde edilmektedir.

- % 0,1 ACN % 99,9 Su 15^{o}C 0,2 mL/min
- % 0,1 ACN % 99,9 Su 10^{o}C 0,2 mL/min

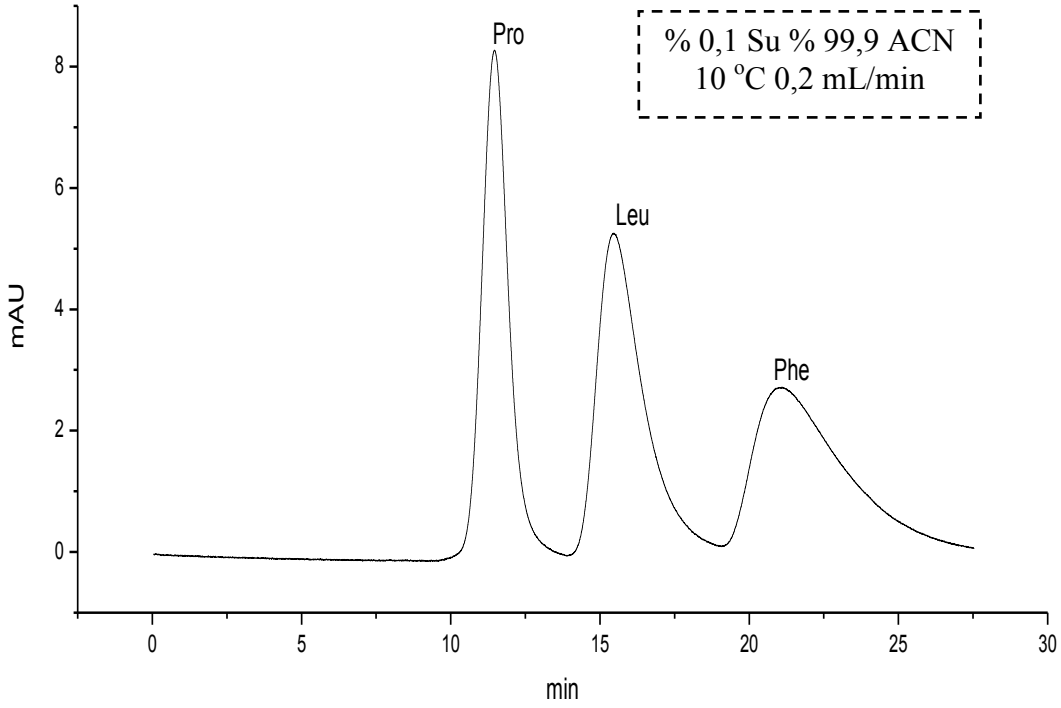


Şekil 8. 23. Optimum deney şartları da yapılan ayrım

Çizelge 8. 10. Yukarıdaki ayrımın kromatografik hesaplama sonuçları

$Rs_{(Pro\text{-}Leu)}$	1,59
$Rs_{(Phe\text{-}Leu)}$	1,67
$\alpha_{(Pro\text{-}Leu)}$	1,35
$\alpha_{(Phe\text{-}Leu)}$	1,40
$k'_{(Pro)}$	8,47
$k'_{(Leu)}$	11,77
$k'_{(Phe)}$	16,42

Şekil 8.23. deki kromatogram, birbirine yakın polaritedeki Prolin, Lösin, Fenilalanin amino asitlerinin HILIC şartlarında sabit faz ile etkileşiminin sonucunda elde edilen çıkış sürelerini göstermektedir. İlk çıkan Prolin amino asidi olmuştur ve bu amino asit sabit fazla en az etkileşen ve polaritesi en düşük olan amino asittir. Fenilalanin ise en son çıkmıştır ve HILIC şartlarında polaritesi en yüksek olan amino asittir.

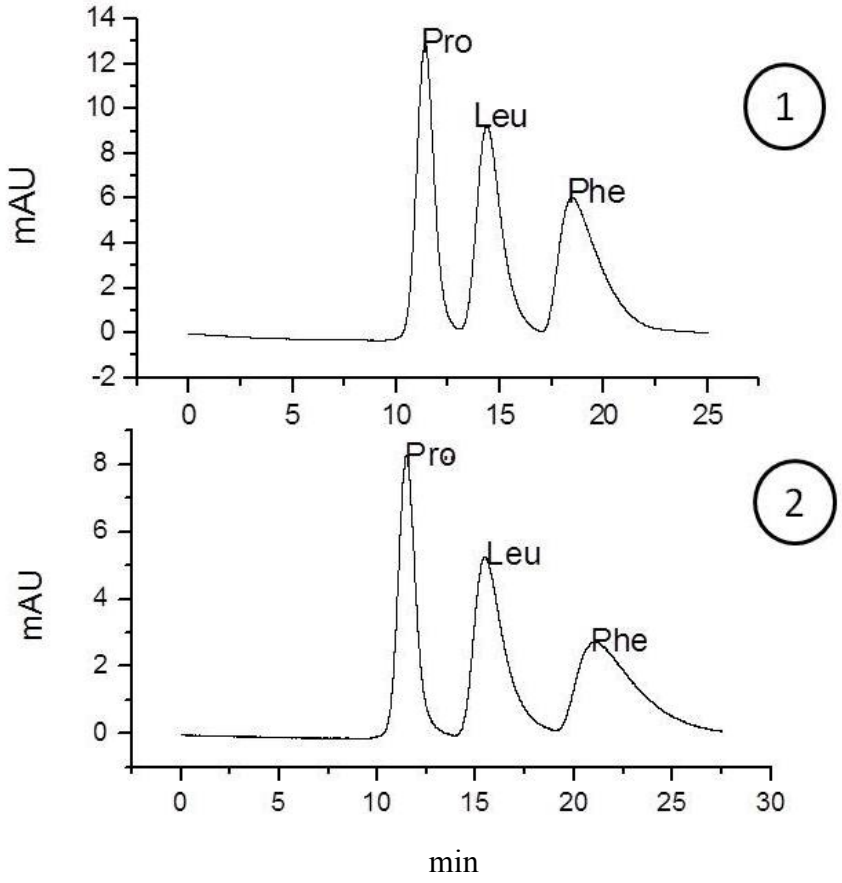


Şekil 8. 24. Optimum deney şartları da yapılan ayrım

Çizelge 8. 11. Yukarıdaki ayrımın kromatografik hesaplama sonuçları

$Rs_{(Pro-Leu)}$	2,45
$Rs_{(Phe-Leu)}$	2,05
$\alpha_{(Pro-Leu)}$	1,29
$\alpha_{(Phe-Leu)}$	1,31
$k'_{(Pro)}$	8,41
$k'_{(Leu)}$	10,87
$k'_{(Phe)}$	14,25

Yüzey grafiklerinde çıkan sonuçlarda Rs değerinin en yüksek olduğu değerler % 0,1 su, 10^{o}C, 0,2 mL/min şartlarında elde edilmiştir. Bu kromatogramda Rs değeri daha büyüktür. HILIC modu ayırmanın mantığını kanıtlamaktadır. HILIC şartlarında polar özellikli maddelerin ayrıldığı gibi apolar özellik gösteren PTH amino asitlerin ayrımı da polaritelerinde ki farklılıktan yararlanılarak yapılabiliceğini göstermektedir.

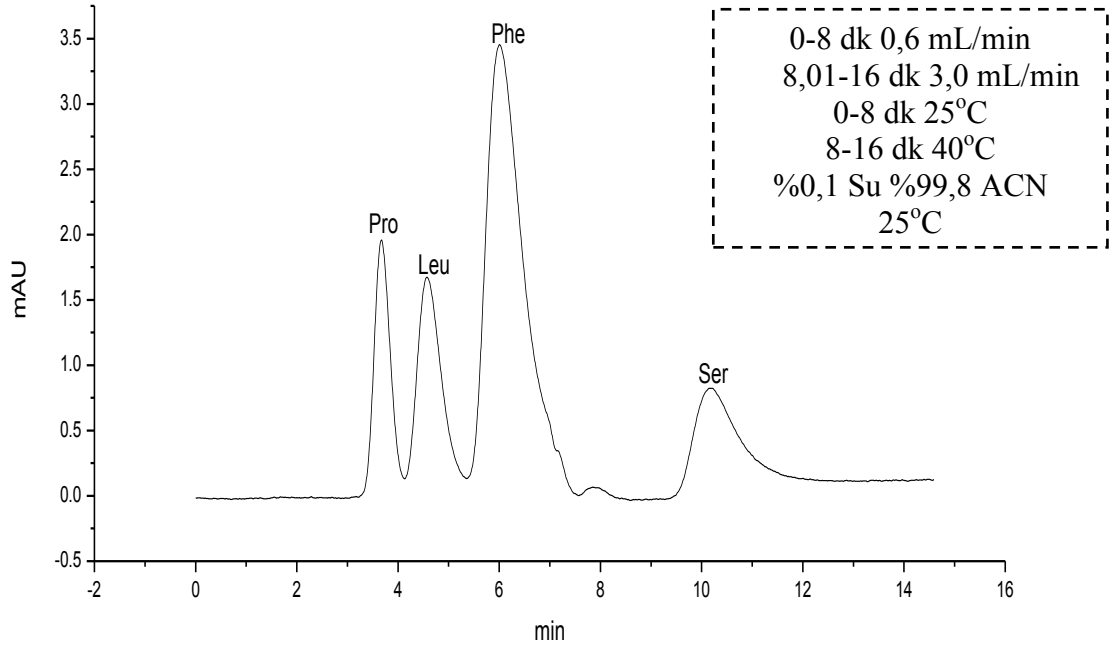


Çizelge 8. 12. Kromatografik hesaplama sonuçlarının karşılaştırılması

1.) 15°C % 0.1 Su 0.2 mL/min		**2.)** 10°C % 0.1 Su 0.2 mL/min	
$Rs_{(Pro-Leu)}$	1,59	$Rs_{(Pro-Leu)}$	2,45
$Rs_{(Phe-Leu)}$	1,67	$Rs_{(Phe-Leu)}$	2,05
$\alpha_{(Pro-Leu)}$	1,35	$\alpha_{(Pro-Leu)}$	1,29
$\alpha_{(Phe-Leu)}$	1,40	$\alpha_{(Phe-Leu)}$	1,31
$k'_{(Pro)}$	8,47	$k'_{(Pro)}$	8,41
$k'_{(Leu)}$	11,77	$k'_{(Leu)}$	10,87
$k'_{(Phe)}$	16,42	$k'_{(Phe)}$	14,25

8.4.5. Gradient denemeleri

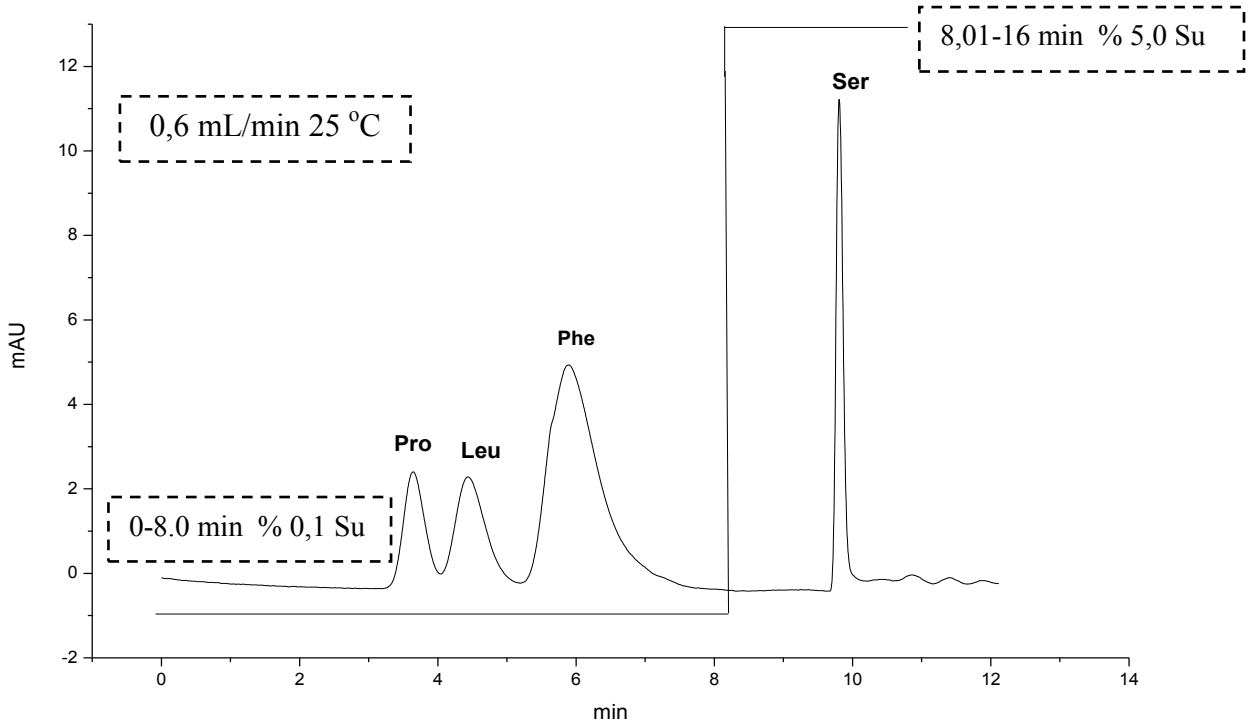
Yukarıdaki kısmı deneysel tasarımlar yapılarak, PTH-Amino asitlerin hidrofobik özelliğe sahip olanları çalışılmış ve polarite değerleri birbirine yakın olduğu için su miktarı çok düşük tutulmuştur. Polar ve apolar amino asitler birlikte ayrılmak istendiğinde ilk önce su miktarının düşük tutularak apolar türlerin ayrılması sağlanmıştır. Polar türlerin çok geç çıkacağı düşünülerek, sıcaklık, akış hızı ve % su miktarı arttırılarak polar türlerin daha erken çıkması sağlanmıştır. Bu çalışmada bu amaç için karışıma PTH-Serin de katılmıştır.



Şekil 8. 25. Sıcaklık ve akış hızı değiştirilerek yapılan ayrım

Çizelge 8. 13. Yukarıdaki ayrımın kromatografik hesaplamam sonuçları

$Rs_{(Pro\text{-}Leu)}$	1,19
$Rs_{(Phe\text{-}Leu)}$	1,24
$Rs_{(Ser\text{-}Phe)}$	2,75
$\alpha_{(Pro\text{-}Leu)}$	1,31
$\alpha_{(Phe\text{-}Leu)}$	1,38
$\alpha_{(Ser\text{-}Phe)}$	1,80
$k'_{(Pro)}$	3,58
$k'_{(Leu)}$	4,71
$k'_{(Phe)}$	6,50
$k'_{(ser)}$	11,70



Şekil 8. 26. % Su miktarı değiştirilerek yapılan ayrım

Çizelge 8. 14. Yukarıdaki ayrımın kromatografik hesaplama sonuçları

$Rs_{(Pro\text{-}Leu)}$	0,95
$Rs_{(Phe\text{-}Leu)}$	1,35
$Rs_{(Ser\text{-}Phe)}$	5,19
$\alpha_{(Pro\text{-}Leu)}$	1,27
$\alpha_{(Phe\text{-}Leu)}$	1,40
$\alpha_{(Ser\text{-}Phe)}$	1,77
$k'_{(Pro)}$	3,57
$k'_{(Leu)}$	4,55
$k'_{(Phe)}$	6,36
$k'_{(ser)}$	11,26

Bu ayrımda PTH-serin polar özellik gösterdiği için en son çıkmakta ve çok dağınık bir pik vermektedir. PTH-serinin daha erken çıkmasını sağlamak için % su miktarı arttırılmıştır ve % 5 su kullanılarak PTH-serin daha erken ve daha dik çıkması sağlanmıştır. PTH amino asitlerin kromatografik ayrımları bize HA-APS sabit fazının polar karekterde olduğunu ve HILIC şartlarında kullanılabilirliğini göstermektedir.

9. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

9.1 Sonuçlar

Hümik asitlerin, bünyesinde bulundurduğu hidrofilik, hidrofobik, iyonlaşabilir ve elektron verici grupları sayesinde etkili ve geniş kullanımlı bir sabit faz özelliği sergilediği görülmüştür. Metal ile kompleks oluşturma özelliği sayesinde sabit faza metal iyonu bağlanarak ligand değişim özeliği de kazandırılmıştır. Hümik asidin bu geniş kapsamlı özellikleri aminopropilsilika üzerine kimyasal olarak bağlanması ile kolonda kullanılabilir hale getirilmiştir. HPLC de kullanılan bu sabit fazın polar sabit fazlar ile apolar sabit fazlar arasında bir polariteye sahip bir karma sabit faz özelliği gösterdiği görülmüştür. Karma sabit fazlar hem ters faz sıvı kromatografide hem de normal faz sıvı kromatografide ve HILIC şartlarında da kullanılmaktadır. EC-HA-ASPS sabit fazı diol sabit fazlara benzemektedir. Hümik asidin ters faz sıvı kromatografide kullanılabilirliği, PTH amino asitlerin % 85 su % 15 ACN kullanılarak polar bir hareketli fazla ayrılması ile kanıtlanmıştır.

Hümik asidin polar uçlara sahip olması onun HILIC şartlarında da uygulanabileceğini düşündürmüş ve literatürde yapılan çalışmalardan yola çıkılarak HA-APS sabit fazında prolin, lösin ve fenilalanin gibi hidrofobik özellik gösteren maddelerin % 0,1 su % 99,9 ACN hareketli faz kompozisyonunda ayrılmasını sağlamıştır. Hidrofilik özellik gösteren serin amino asidi % 0,1 su değerinde çok büyük k' değerine sahipken % su miktarının arttırılması ile çıkış değeri daha da küçültülerek hidrofobik ve hidrofilik amino asit ayrımı daha kısa sürede yapılmıştır. Bu ayrım HILIC mekanizmasının temelinde yer alan hidrofibik ve hidrofilik türlerin ayrımın çok kısa sürede yapıldığını kanıtlamaktadır.

HILIC ve RPLC modları birbirini tamamlayıcı özellik göstermektedir. EC-HA-APS sabit fazında kolon değiştirmeden hareketli fazı değiştirerek HILIC ve RPLC de kullanma imkanı sağlamaktadır.

Ayırmaya etki eden parametrelerin etkileri üç boyutlu yüzey grafiklerine aktarılarak değerlendirilmiş ve çeyrek kısmı yapılmış, sonuçlar üç boyutlu yüzey grafiklerinde değerlendirilerek optimum ayırma şartları hakkında bilgiler elde edilmiştir.

Bu grafiklerden elde edilen sonuçlar, cihazda tekrarlı yapılan deneylerle karşılaştırılmış ve deneysel tasarımla optimum şartlara ulaşma metodunun doğruluğu değerlendirilmiştir.

Bu işlemde ayırmalar üzerine en fazla etki eden parametre hakkında bilgi normal dağılım grafikleri çizilerek ve yorumlanarak elde edilmiştir. Normal dağılım grafiğinden yola çıkarak en fazla sapan değerin % su miktarı olduğu sonucu elde edilmiştir. Bu değerler % su miktarı, hız ve sıcaklık şeklinde sıralanmıştır. Kolon sıcaklığı, hareketli faz akış hızı ve hareketli faz su yüzdesinin temel parametre olarak ele alındığı, üç faktörlü, beş seviyeli bir deneysel tasarım yardımıyla, 15-35 µm boyutuna sahip aminopropilsilika üzerine immobilize edilmiş olan hümik asidin, HILIC ve RPLC şartlarında iyi bir sabit faz olarak kullanılabilirliği kanıtlanmış ve PTH aminoasitlerin ayrılması gerçekleştirilmiştir.

9.2 Öneriler

15-35 µm boyutuna sahip aminopropilsilika üzerine immobilize edilmiş hümik asit sabit fazının, HILIC ve RPLC şartlarında kullanılabilirliği yapılan deneyler ve sonuçlar ile kanıtlanmıştır. Destek maddesinin boyutlarının 15-35 µm arasında olması ayırma verimliliğini düşürmektedir. Hümik asidin, daha verimli bir ayırma sağlamak amacıyla 5 µm boyutuna sahip ticari olarak kullanılan destek maddelerine benzer bir destek maddesine bağlanması ile daha etkili bir sabit faz olarak kullanılacağı düşünülmektedir.

Hümik asit sabit fazı çok farklı sıvı kromatografi ayırma modlarına uygulanabilicek ve kullanılabilecek etkili, verimli ve tekrarlanabilirliği yüksek bir sabit fazdır.

KAYNAKLAR

Tanaka, N., Horie, K., Takubo, H., Ikegami, T., 2008, *Separation efficiencies in hydrophilic interaction chromatography, Journal of Cromatography A, 184 (2008) 474–503*

Jandera, P., 2011, *Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography, Analytica Chimica Acta, 692 (2011) 1–25*

Waters, 2004., *Understanding (and Creating) Retentionof Polar Compounds in Reversed-Phase HPLC,*

Waters, 2003., *Understanding (and Creating) Polar Retention Using Reversed-Phase HPLC and Hydrophilic Interaction Chromatography*

Merck, Sequant., *The novelty of zwitterionic stationary phases for hydrophilic interaction chromatography (HILIC)*

Sigma-Aldrich, Bell, D., 2010, *Retention and Selectivity in Aqueous Normal Phase/HILIC Separations*

Tomasek, Cara., Morıyama, H., Yamasaki, H., Sakıma, E., Kawaı, Y., Sakata, M., 2008, *Basic Properties of Novel Amino-Type HILIC Column and Separation of Hydrophilic Compounds*

Hand, C., 2009, *An introduction to the retention of polar analytes by hidrohilic interaction cromatography (HILIC)*

Andrew, A., 2008, *Electrostatic Repulsion Hydrophilic Interaction Chromatography for Isocratic Separation of Charged Solutes and Selective Isolation of Phosphopeptides, Anal. Chem. 2008, 80, 62 76*

Gezici, O., 2010, *Akış Enjeksiyon – Kromatografik Yöntemlerle İmmobilize Hümik Asidin Sabit Faz Özelliklerinin İncelenmesi*

YMC Co., Ltd., *HILIC Columns for Polar Analytes*

Champion, B., 2010, *Hydrophilic Interaction Chromatography*

Wang, G., P., Weixuan, H., 2011, *Hydrophilic İnteraction Liquid Chromatography and advanced Applications, CRC press*

Dionex Corporation, 2007, *Acclaim® Mixed-Mode HILIC-1 Column*

Dionex Corporation, 2010, *Acclaim HILIC-10 Column for Separating Highly Hydrophilic Molecules*

Yoshida, T., 2004, *Peptide separation by Hydrophilic-Interaction Chromatography J. Biochem. Biophys. Methods 60 (2004) 265–2*

Qiong -Wei Yu, Bo Lin, Yu-Qi Feng, and Feng-Ping Zou *Application of Humic Acid Bonded-Silica as a Hydrophilic-interaction Chromatographic Stationary Phase in Separation of Polar Compounds*

Brereton, G, R,; *Multilevel Multifactor Designs for Multivariate Calibration*,The Analyst 1997, Vol. 122 (1521-1529)

Dinç, E, *Kemometri Çok Değişkenli Kalibrasyon Yöntemleri*, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi Cilt 27 / Sayı 1 / Ocak 2007 / ss. 61-92

G. Orhan, *"Hümik Asitlerin Katı Faz Ekstraksiyon Sistemlerinde Kullanımı",*S.Ü. Y.L. Tezi, (2004), Konya.

Gheshlaghi, R., Scharer, J. M., Moo-Young, M., Dougles, P.L., *Application of stastical design for the optimization of amino acid separation by reverse-phase HPLC*, Analytical Biochemistry 383 (2008) 93-102

Jandera, P., *Stationary and mobil phase in hydrohilic interaction chromatography*, Analitica Chimica Acta 692 (2011) 1-25

Gezici, O., Kara, H., *Towards multimodal HPLC separations on humic acid-bonded aminopropyl silica: RPLC and HILIC behavior*

Gezici.O., Kara, H., Towards multimodal HPLC separation on humic acid-bonded aminopropyl silica: RPLC and LEC behavior, Talanta, 2011, 2405-2410

Guo, Y., Srinivasan, S., Gaiki, S., *İnvestigating the effect of chromatographic Conditions on retention of Organic Acids in Hydrohilic İnteraction Chromatography Using a Design of Experimen*t, Chromatographia, 2007, 66, 223-229

Hemström, P., Irgum, K., *Hydrophilic intereraction cromatography* J.Sep.sci. 2006, 29, 1784-1821

Helal, A., A., *Characterization of diffrent humic materials by various analytical techniques*, Arabian Journal Chemistry, 2011, 4, 51-54

Molnar, I., Horvath, C., *Separation of amino acids and peptides on non-polar stationary phase by high performance liquid chromatography*, Journal of Chromatografphy, 142 (1977) 623-640

shman, K., Wittmann-Liebold, B., *A new isocratic HPLC separation for Pth-amino acids based on 2-propanol,* 1985

Luciano, L., Alessandra, C., Amino acids ve derivatives: Analysis byTLC, Encyclopedia of Chromatography, 2002

Bhushan, R., Ali, I., Sharma, S., *A comparative study of HPLC and TLC separation of amino acids using Cu(II) ıon*, Biomedical Chromatography, 1996, 10, 37-39

Papadoyannis, I., N., Theodoridis, G., A., *HPLC Analysis of amino acids*, encyclopedia of ,chromatography, 2002,

Bhushan, R., Reddy, G., P., *Thin-layer Chromatography of Phenyl Thiohydantoin Derivatives of Amino Acids on Silica Gel Thin Layers Impregnated with Zinc Salts and Some Metal Sulphates, Analyst, October 1987, vol. 112*

Halpine, S., M., Amino acids analysis by HPLC, Encyclopedia of Chromatography, 2002

Grant G., A., Crankshaw, M., W., *Identification of PTH-Amino Acids by High-Performance Liquid Chromatography*

Hunkapiller, M., W., *PTH amıno acid analysıs* , 1985

Bhushan, R., Agarwal, R., *Liquid Chromatographic Separation of Some PTH-Amino Acids,* Biomed. Chromatogr. 12, 322–325 (1998)

Guo, Y., Gaiki, S., *Retention behavior of small polar compounds on polar stationary phases in hydrophilic interaction chromatography*, Journal of Chromatography A, 2005, 1074, 71-80

Liu, Y., Xingya, X., Zhimou, G., Qing, X., Feifang, Z., Liang, X., *Novel two-dimensional reverse-phase liquid chromatography/hydrophilic interaction chromatography an excellent orthhogonal system for practical analysis*, Journal of Chromatography A, 2008, 1208, 133-140

Chauve, B., Guillarme, D., Cleon, P., Veuthey, J., L., *Evluation of various HILIC materials for the fast separation of polar compounds*, J., Sep., Sc., 2010, 33, 752-764

Chirita, R., L., West, C., Zubrzycki, S., Finaru, A., L., Elfakir, C., *İnvestigation on the chromatographic behaviour of zwitterionic stationary phase used in hydrophilic interaction chromatography*, Journal of Chromatography A, 2011, 1218, 5939-5963

Molnar-Perl, I., *HPLC of amino acids as phenylthiocarbamoyl derivatives*, Journal of Chromatography Library, Volume 70, 2005

Martyniuk, H., Wieckowska, J., *Adsorption of metal ions on humic acids extracted from brown coals,* Fuel Processing Technology, 2003, 23-36

Stathi, P., Deligiannakis, Y., *Humic acid-inspired hybrid materials as heavy metals absorbents,* Journal of Colloid and Interface Science, 351 (2010) 239–247

Stalikas, D., C., Fiamegos, Y., C., Karatapanis, A., E., *Study of the Behavior of Water-Soluble*

Vitamins in HILIC on a Diol Column, 2010, 71, 751–759

Koopal, L., K., Yang, Y., Minnaard, A., J., Theunisen, P., L., M., Van Riemsdijk, W., H., *Chemical immobilisation of humic acid on silica, Colloids and Surfaces*

A: Physicochemical and Engineering Aspects 141 (1998) 385–395

Klavins, M., Eglite, L., *Immobilisation of humic substances,* Colloids and Surfaces

A: Physicochemical and Engineering Aspects 203 (2002) 47–54

Casadei N., Thomassin, M., Guillaume, Y., C., Andre, C., *A humic acid stationary phase for the high performance liquid chromatography separation of buckminsterfullerenes:*

Theoretical and practical aspects, Analytica Chimica Acta 588 (2007) 268–273

Luo, D., Yu-Wei, Q., Yin, Hong-Rui, Feng, Ye-Qi, *Humic acid-bonded silica as a novel sorbent for solid-phase extraction of benzo[a]pyrene in edible oils*, Analytica Chimica Acta 588 (2007) 261–267

Kara, H., Ayyildiz, H., F., Topkafa, M., *Use of aminoprophyl silica-immobilized humic acid for Cu(II) ions removal from aqueous solution by using a continuously monitored solid phase extraction technique in a column arrangement,* Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects 312 (2008) 62–72

Dinç, E, *Kemometri Çok Değişkenli Kalibrasyon Yöntemleri*, Hacettepe Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Dergisi Cilt 27 / Sayı 1 / Ocak 2007 / ss. 61-92

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Polat Kılıç
Uyruğu : T.C
Doğum Yeri ve Tarihi : Aksaray / 15.03.1985
Telefon : 05063724913
Faks :
e-mail : polatkilictr@gmail.com

EĞİTİM

Derece		Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	:	**Selçuklu Atatürk Lisesi, Selçuklu, Konya**	**2005**
Üniversite	:	**Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya**	**2010**
Yüksek Lisans	:	**Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya**	**2013**
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
2009-2009	Konya Ticaret Borsası	Satış Elemanı

UZMANLIK ALANI

- Kromatografik (HPLC, GC) ayırma, tayin teknikleri ve uygulamaları
- HPLC sabit faz geliştirme ve kolon doldurma teknikleri
- Humus, hümik asit ve fülvik asit ekstraksiyon teknikleri

YABANCI DİLLER

- İngilizce

YAYINLAR

TEZLER

Kılıç, P., Pınar, H., "*Hümik Asit Ekstraksiyon Verimliliğinin Araştırılması* "Lisans Mezuniyet Tezi, Selçuk Üniversitesi, 2010