

## Son Gelişmeler Işığında Teorik ve Uygulamalı HPLC Eğitimi (FÖY)

### HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)

#### Teori

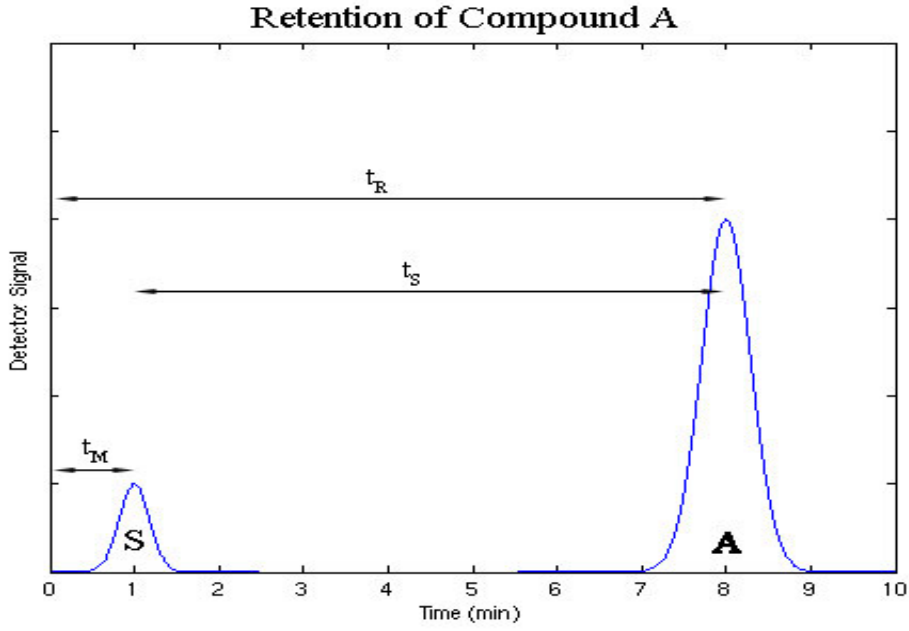
Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir. Çeşitli maddelerin hareketli faz yardımıyla, sabit faz üzerinde, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanır. Tüm kromatografik ayırmalar bu prensipe dayanmaktadır. Her bileşen karakteristik bir şekilde diğerkimyasal türlerle etkileşmektedir. Kromatografi, bir örneği oluşturan bileşenleri, bu bileşenlerin mobil (hareketli) ve sabit faza olan eğilimlerindeki (afiniteleri) farklılıklarından dolayı ayırmaktadır. Sabit faz kolon içindeki kolon dolgu maddesi olup hareketli faz ise genellikle bir ya da bir den fazla çözücü sistemdir.

Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan *yüksek performanslı sıvı kromatografisi* (HPLC) yönteminde, sabit faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin tanecik boyutunun küçültülmesi sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun etkinliği artırılmış olur. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için basınç uygulanması gerekir.

#### **HPLC'nin avantajları:**

- HPLC kolonu, rejenerasyon gerekmeksizin pek çok kez kullanılabilir.
- HPLC tekniği kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir.
- Nicel analiz kullanılabilir.
- Analiz süresi kısadır.
- Duyarlılık yüksektir.

A ve B den oluşan bir örnek olduğunu düşünelim. A ya da B ne kadar sabit fazda adsorplanıyor ise kolonu terk etmesi için geçen süre de bununla doğru orantılı olacaktır. Bir örneğin enjeksiyonu ile kolondan elüsyonu arasında geçen süreye *alikonma zamanı* denmektedir ve  $t_R$  ile gösterilir.



Sabit fazla etkileşmeyen bir bileşimin kolonu terk etmesi için geçen süre ölü zaman ya da hareketli fazın alıkonma zamanı olarak ( $t_M$ ) bilinir, çünkü genellikle bu bileşik hareketli fazdır. Hiçbir bileşik bu süreden daha kısa sürede elue olamaz, yani sürüklenemez.

### Seçicilik

İki bileşimi ayırmak için alıkonma faktörleri birbirinden farklı olmalıdır. Aksi takdirde, her iki bileşen de aynı anda sürüklenirler. Seçicilik faktörü alıkonma faktörlerinin oranıdır.

$$\alpha = k_B/k_A$$

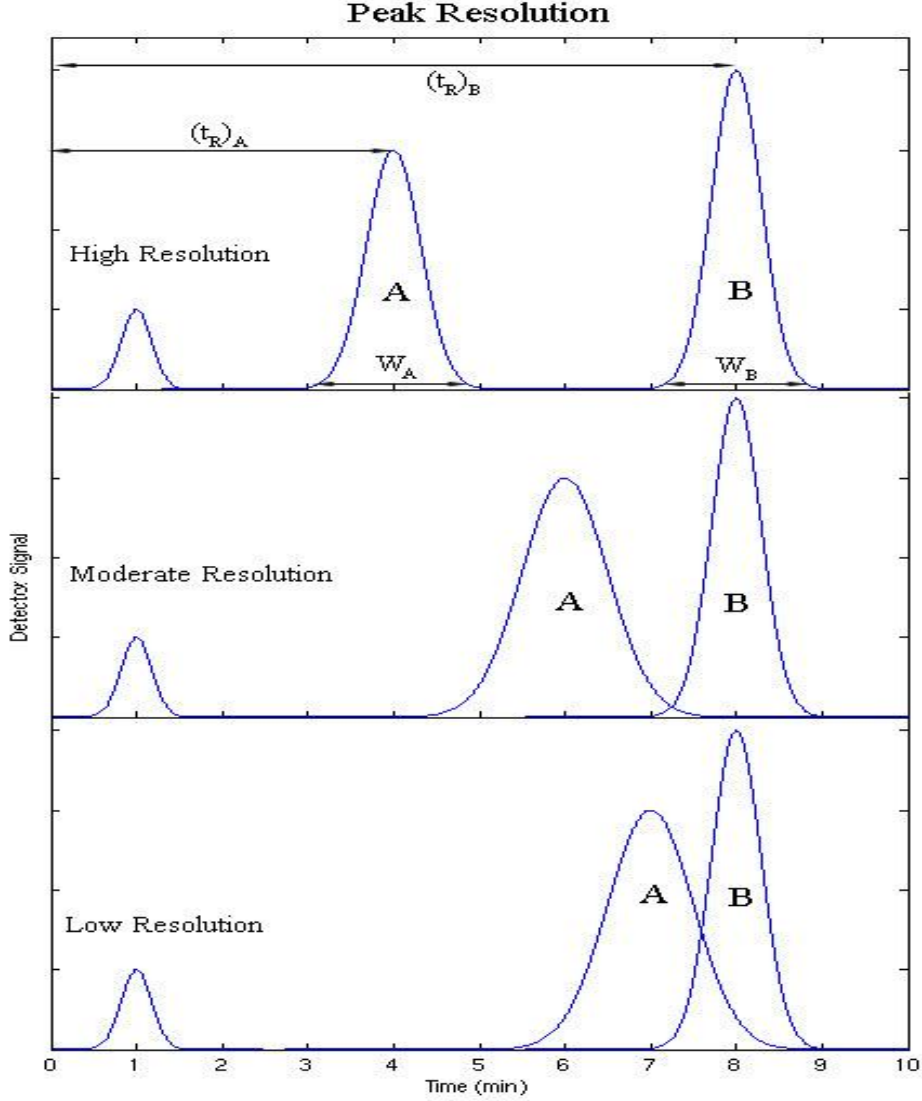
B, kolon tarafından daha güçlü tutulan bileşen, A ise daha hızlı sürüklenen bileşendir.

### Çözümleme (Ayrılma, Resolution)

Bir elüsyonun çözülmesi, bir kromatografik ayırmada iki elüsyon pikinin ne derece farklılaştığının yani ayrıldığıının kantitatif bir ölçüsüdür. Aşağıdaki şekilde ifade edilir:

$$R_S = \frac{2 [(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_B + W_A}$$

Burada B daha uzun alıkonma süresine sahip tür,  $t_R$  alıkonma zamanı ve  $W$  de elüsyon piki genişliğidir. Çözümleme 1 den büyük olduğu zaman genellikle pikler başarılı bir şekilde çözümlenmiş, yani ayrılmış demektir.



### Ayırma problemlerine bir çözüm olarak HPLC

Yukarıda bahsedilen temel prensipler tüm kromatografik ayırmalar için geçerli olsa da, HPLC, standart sıvı kromatografisinin sınırlamalarına bir çözüm olarak geliştirilmiştir. Klasik sıvı kromatografisi bir ayırma metodu olarak pek çok sınırlamalara yol açmaktadır. Çözücü yer çekimi ile sürüklenirken, ayırma çok yavaş olmaktadır ve eğer çözücü standart olarak doldurulmuş bir kolonda vakum ile sürükleniyorsa tabaka yüksekliği artmaktadır ve vakumun etkisi olumsuz hale gelebilmektedir. Sıvı kromatografideki sınırlayıcı faktör ilk olarak kolon dolgu maddesinin boyutu idi. Kolonlar 3  $\mu\text{m}$  kadar küçük partiküllerle doldurulabilir hale

gelince, daha hızlı ayırmalar daha küçük ve dar kolonlarda gerçekleştirilebildi. Bu tip kolonlardan mobil faz ve örneği geçirebilmek için yüksek basınç gerekiyordu. Dar kolonlarda yüksek basınçların kullanımı daha etkili ayırmaların çok daha kısa sürelerde gerçekleştirilmesini mümkün kılmıştır

## **Aparat**

Ayırmaların gerçekleştiği yüksek basınçlar ve düşük toleranslardan dolayı bir HPLC ayırması için özel aparatlar gerekmektedir. Eğer sonuçların tekrarlanabilir olması gerekiyorsa, ayırmanın şartlarının da tekrarlanabilir olması gerekmektedir. Bu sebeple, HPLC ekipmanı yüksek kalitede olmalıdır.

## **Çözücü**

HPLC de çözücü veya mobil faz genellikle örneğin bileşimine dayalı olarak konsantrasyonlarının değiştiği polar veya apolar sıvı bileşenlerin bir karışımıdır. Çözücü dar bir kolondan geçirilince, herhangi bir kontaminasyon en kötü olarak kolonu tıkayabilir ya da en azından tekrarlanan farklı denemeler sırasında alıkonma sürelerinde farklılığa yol açabilir. Bu yüzden, HPLC çözücüsü çözünmüş gazlardan arınmış olmalıdır.

## **Kolon**

HPLC kolonunda örneğin bileşenleri kolon dolgu maddesiyle olan farklı etkileşimlerine dayanarak ayrılır. Eğer bir tür, kolondaki sabit fazla daha güçlü olarak etkileşiyorsa kolonun adsorbanına adsorplanmış olarak daha çok zaman geçirecektir ve bu nedenle daha büyük bir alıkonma zamanına sahip olacaktır. Kolonlar silika ya da alumina gibi katılarla doldurulabilir; bu kolonlara homojen kolonlar denir. Eğer kolondaki sabit faz bir sıvı ise kolon bir bağlı (bonded) kolon olarak farzedilir. Bağlı kolonlar katı bir desteğe bağlanmış sabit bir sıvı fazı içermektedir. Katı destek yine genellikle silika ya da aluminadır.

## **Pompa**

HPLC pompası çözücü ve örneği kolonun içine sürükler. Elüsyonda varyasyonu azaltmak için pompa sabit bir akış hızı sağlamalıdır. Bu ise multi-piston pompalarla başarılmaktadır.

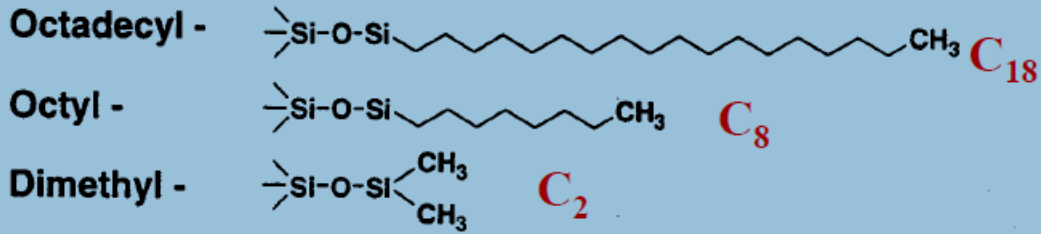
## Dedektör

Kolonun sonuna yerleştirilen HPLC dedektörü örneğin farklı komponentlerinin varlığını kaydetmeli, fakat çözünücü dedekte etmemelidir. Bu sebepten dolayı, tüm ayırmalar için kullanılabilecek tek bir evrensel dedektör yoktur. Molekül boyutu ortadan büyüğe doğru değişen pek çok molekül UV radyasyonunu absorpladığı için UV dedektörü yaygın olarak kullanılan bir dedektördür. Floresansı ve kırılma indisini ölçen dedektörler de özel uygulamalar için kullanılmaktadır.

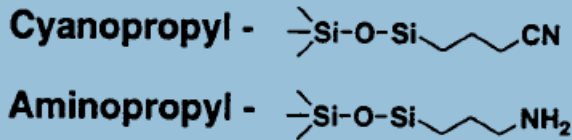
## Normal faz ve ters faz kromatografi

Sabit faz mobil fazdan daha polar ise ayırma normal faz kromatografi olarak isimlendirilir. Eğer sabit faz mobil fazdan daha az polar ise ayırma işlemi ters faz kromatografi olarak bilinir. Ters faz HPLC de bir bileşiğin alıkonma zamanı türlerin azalan polaritesi ile artar. Etkili ve verimli bir ayırma için anahtar, mobil fazdaki polar ve apolar bileşenler arasındaki uygun oranı belirlemektir. Hedef, piklerin tek tek çözülmesi yanında en kısa sürede tüm bileşenlerin sürüklenbilmesidir. Normal faz ayırma için tipik kolonlar alumina ve silika ile doldurulur. Alkil, alifatik ya da fenil bağlı fazlar ise ters faz ayırma için kullanılır.

### Ters faz



### Normal faz



## **İzokratik ve Gradiyen Elüsyon**

HPLC ayırması sırasında mobil fazın kompozisyonu sabit kalıyorsa ayırma izokratik elüsyonla gerçekleşiyor demektir. Sıklıkla, kabul edilebilir bir zaman içinde bir örnekteki tüm bileşenleri elue etmek için tek yol (yine pik çözümlenmesini sağlayarak) örneğin sürüklenmesi sırasında mobil fazdaki polar-apolar bileşenlerin oranını değiştirmektir. Bu tip bir elüsyon, gradiyen elüsyon olarak isimlendirilir. Gradiyen elüsyon genellikle ayrılacak örnek geniş bir polarite aralığına sahip bileşenleri içerdiği zaman seçilen bir tekniktir. Ters faz gradiyen elüsyonda çözücü sistemi genellikle polar olarak başlayıp apolar karaktere doğru değişmektedir.

## **Uygulamalar**

HPLC hem kalitatif hem de kantitatif uygulamalarda kullanılabilir. Günümüzde normal faz kromatografi nadiren kullanılmakta olup hemen hemen tüm HPLC ayırmaları ters faz olarak gerçekleştirilmektedir. Ters faz HPLC (RP-HPLC) sadece birkaç ayırma tipi için etkili değildir. Örneğin inorganik iyonları ayıramaz. Bunlar, iyon değişimi kromatografisi ile ayrılabilir. Polisakkaritleri (herhangi bir katı faz adsorpsiyonunun gerçekleşmesi için çok hidrofiliktirler) ve polinükleotidleri (ters faz dolgusuna tersinmez olarak adsorplanırlar) ayıramaz. Son olarak, oldukça hidrofobik bileşikler RP-HPLC ile etkili olarak ayrılamazlar, çünkü bu durumda seçicilik çok azdır. Bu birkaç istisna dışında, RP-HPLC tüm diğer bileşik tiplerinin ayrılması için kullanılmaktadır. RP-HPLC etkili olarak basit ve aromatik hidrokarbonların (sadece tek bir metilen grubu ile birbirlerinden farklılaşsalar bile) ayrılması için kullanılabilir. RP-HPLC bunun yanında basit aminleri, şekerleri, lipidleri ve farmasötik olarak aktif bileşikleri bile ayırabilmektedir. Aynı zamanda aminoasitlerin, peptitlerin ve proteinlerin ayrılmasında da kullanılır. Biyolojik orijinli bileşiklerin ayrılmasında da kullanılmaktadır. Kahve ürünlerinde kafein tayini ticari uygulamalarda, öğütülmüş kahvenin saflığı ve kalitesini garantilemek için rutin olarak RP-HPLC ile yapılmaktadır. HPLC bir örneğin daha ileri analiz edilmesinden önce ayrılması için sıklıkla kullanılmaktadır.

## **HPLC-eğitimi kapsamında kullanılacak HPLC cihazının özellikleri-kolonlar:**

### HPLC cihazının zellikleri:

Agilent 1100 Series, autosampler, termostatlı kolon bölümü, UV-DAD ve FLD (floresans) dedektör, quaternary pump

### Mevcut kolonlar:

- Zorbax SB-C8 Analytical, 4.6x150 mm, 5 m, P.N.: 883975-906 (Agilent)
- Zorbax C8 Analytical, 4.6x250 mm, 5 m, P.N.: 880952-706 (Agilent)
- Hypersil BDS-C18, 4.0x100 mm, 3 m, P.N: 799260B-354 (Agilent)
- Zorbax Eclipse AAA Rapid resolution, 4.6x150 mm, 3.5 m, P.N.: 963400-902 (Agilent)
- Bondapak C18, 3.9X300 mm, 10 m, Part no: WAT027324 (Waters)
- MOS-1 Hypersil, 200x2.1, 5 m, P.N.: 79916MO-572 (Thermo)
- Hypersil ODS-C18, 4.6x250 mm, 5 m, P.N.: 7992618-585 (Agilent)

### **Deneysel kısım- Uygulanacak denemeler:**

- A) Bazı fenolik bileşikleri içeren bir standart karışımın ODS-C18 kolonda gradiyen elüsyonla sürüklenmesi, UV-DAD ile dedeksiyon yapılması. Gradiyen elüsyonun şartları: %5 ACN (asetonitril) ve %95 5ml/100 ml konsantrasyonunda asetik asit içeren sulu mobil faz sistemiyle başlayıp %100 ACN ile biten bir elüsyon (zltilinin içinde bulunan bileşikler ferulik asit, p-kumarik asit, kafeik asit, rosmarinik asit...gibi fenolik asitlerdir).
- B) A daki standart karışımın içinde bulunan bileşiklerin saf haldeki farklı konsantrasyonlarda bulunan zltilerinin yine A daki aynı koşullarda kolona enjekte edilmesi ve çıkarılan kalibrasyon eğrilerinden A daki zltilinin içinde bulunan bileşenlerin konsantrasyonunun bulunması, programla kalibrasyon eğrilerinin oluşturulması

- C) A daki kromatografik koşullarda bir bitki ekstraktının yine C18 kolonla gradiyen elüsyonu, piklerin ayrılmasının gözlenmesi (gradiyen elüsyonun koşulları A dakinin aynısıdır).
- D) C de kolona enjekte edilen çözeltilinin yine aynı kolonla izokratik elüsyonu, izokratik mobil faz bileşimi: %95 5ml/100 ml asetik asit içeren sulu çözeltili ve %5 ACN. Böylelikle gradiyen ve izokratik elüsyon arasındaki farklar gözlenmiş olacaktır. Gradiyen elüsyonla kompleks bir karışımında bulunabilecek pek çok pikin aynı kolon üzerinde çözümlenmesi görülebilecektir.
- E) A daki çözeltilinin 5 µm lik kolon yerine elüsyon hızının farkını gözlemek amacıyla 3 µm lik kolonla sürüklenmesi, pik ayrılmasının daha kısa sürede gözlemlenmesi