

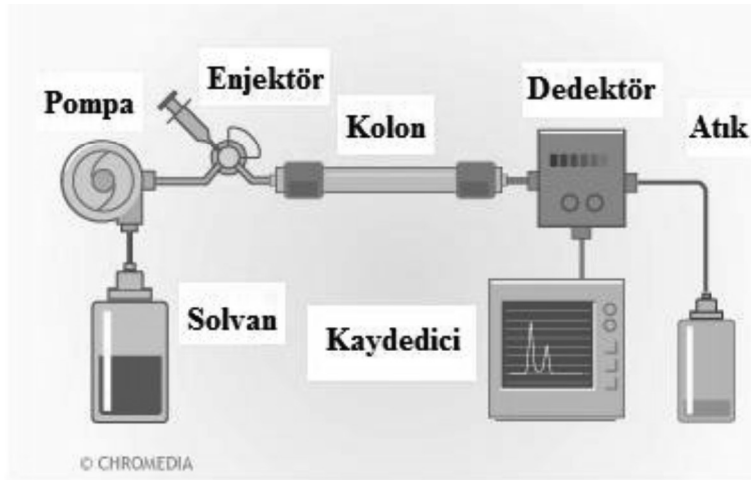
3.5. YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HIGH PRESSURE/PERFORMANCE LIQUID CHROMATOGRAPY) (HPLC)

Kromatografinin, bir karışım içindeki bileşenlerin biri sabit, diğeri hareketli iki faz arasındaki dağılım dengelerinin farklı oluşu esasına dayanan bir ayırma yöntemi olduğu daha önce belirtilmiştir.

HPLC esas olarak Gaz Kromatografisine (GK) benzer. Ancak GK'de kullanılan gazın ayırmayı etkileyici bir özelliğinin bulunmamasına karşın HPLC'de mobil faz olarak kullanılan çözücülerin ayırmayı etkileyici özelliklerinin bulunması, GK'de sadece uçucu ya da uçucu hale gelebilen maddelerin analizi sağlanabilirken, HPLC'nin daha geniş bir kullanım alanına sahip olmasına olanak verir.

3.5.1. Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi

HPLC Aleti Pompa, Örnek Giriş Sistemi (Enjektör), Kolon, Dedektör ve Kaydedici olmak üzere 5 ana bölümden oluşmaktadır (Şekil 3.1).



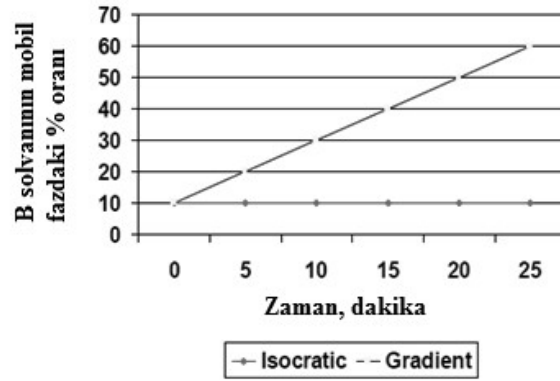
Şekil 3.1. HPLC aletinin şematik görüntüsü

3.5.1.1. Pompalar

Sıkıca doldurulmuş kolon içinde mobil fazın akışını sağlayan aletler olup, *sabit basınçlı* ve *sabit akışlı* olmak üzere ikiye ayrılırlar.

Sabit akışlı pompalar, kolondaki direnç ve mobil fazın viskozitesinden meydana gelebilecek basınç değişikliklerini düzeltmeleri nedeniyle daha fazla kullanılmaktadırlar. Bu pompalar, **Emmebasma** ve **Şırınga Pompalar** olmak üzere ikiye ayrılırlar. **Şırınga pompalar** çok düz bir akış sağlamalarına rağmen rezervuar kapasiteleri sınırlıdır. **Emmebasma pompalar** ise, küçük pistonlu olup atımlı bir akış sağlarlar, ancak dedektörler atımlı akışa karşı hassastır, bu nedenle düz bir akış 2 ya da 3 pistonlu pompalar yardımı ile elde edilmektedir.

HPLC sistemlerinde mobil faz akışı tek kaynaklı (isocratic) ve kademeli (gradient) olmak iki şekilde olmaktadır. Tekdüze akış olduğu durumlarda mobil faz olarak sistemden ya tek bir solvan ya da karışım oranları analiz boyunca sabit olan solvan karışımı (örn. asetonitril/su: 70/30 vs.) geçmektedir. Kademeli akış olduğu durumlarda mobil fazı oluşturan solvanların oranları zaman içerisinde değişmektedir. Bu durum Şekil 3.2’de yer alan, mobil faz içerisindeki “B” solvanının tekdüze akış ve kademeli akış-zaman grafiğinden de anlaşılmaktadır.



Şekil 3.2. Mobil faz içerisindeki “B” solvanının tekdüze akış (isocratic) ve kademeli (gradient) akış-zaman grafiği.

3.5.1.2. Enjektörler (Örnek Giriş Sistemleri)

Enjektörlerin 2 tipi bulunmaktadır. Bunlar Valf Enjektörler ve Şırınga Enjektörlerdir.

Valf Enjektörler; paslanmaz çelikten yapılmış boru şeklindeki bir üniteye bağlanan ve açılıp kapanabilen valflerden ibaret olup küçük bir boru yardımı ile kolon başına bağlanmıştır. Valf enjektörler dayanıklı olup daha az bakım gerektirirler ve bu nedenle rutin ilaç analizlerinde fazla kullanılırlar.

Şırınga Enjektörler; enjeksiyon aleti doğrudan kolon başına bağlanmıştır. Kolon başında 5-10 mm derinliğinde cam tanecikleri ile dolu bir bölüm bulunmaktadır. Kolondaki dolgu materyali ile bu cam tanecikler arasında paslanmaz çelikten yapılmış bir ağ tabakası yerleştirilmiştir. Örnek cam tanecik tabakası içine bir şırınga ile verilir. Valf enjeksiyondan biraz daha iyi bir kolon etkinliği verir.

3.5.1.3. Kolonlar

Dolgu Materyali ve **Taşıyıcı** olmak üzere iki kısımdan meydana gelir.

Dolgu Materyalinin **partikül yüzeyi ve partikül büyüklüğü,** **Taşıyıcı** kısmın ise uzunluğu, çapı ve üretildiği materyalin **ayırma üzerinde etkileri** vardır. Paslanmaz çelik ve plastikten yapılanları vardır.

HPLC kolonlarında en fazla kullanılan dolgu maddesi mikroporöz silikadır. Alumina ve Celite (diatom toprağı) de çok kullanılan maddelerdir.

Analitik amaçlar için kullanılan kolonların en küçüğü 5 cm, en büyüğü ise 150 cm uzunlukta olabilmekte, bunların çapları da 1-8 mm arasında değişmektedir. Kısa kolonlarda çalışmak retansiyon zamanını azaltacağından hızlı analiz gerektiren durumlarda tercih edilmektedirler.

Preparatif çalışmalarda kullanılan kolonların çapları daha geniş olabilmekte, örneğin; uzunluğu 30 cm, çapı 57 mm olan bir preparatif kolonla 1-1000 g arasında madde ayrılabilir.

Pahalı analitik kolonların ömrünü uzatmak için *iki tip koruyucu kolon* kullanılmaktadır (Şekil 3.1). Bu koruyucu kolonlardan ilki, pompa ile enjektör arasında yer almakta, dolgu materyali olarak silica içermekte ve *önkolon (precolumn)* adını almaktadır. Mobil fazın bu kolondan geçmesi silica ile doyurulmasını sağlar ve böylece analitik kolon içindeki dolgu materyalinin mobil fazdaki çözünürlüğü azalır. Koruyucu kolonların ikincisi ise enjektör ile analitik kolon arasına yerleştirilen ve iç çapı analitik kolona eşit olan 2-10 cm uzunluğundaki *koruyucu kolondur*. Bu kolon, örnek içindeki parçacıkları ve safsızlıkları tutmak suretiyle bunların analitik kolondaki dolgu materyaline bağlanmasına engel olur.

3.5.1.4. Dedektörler

Kolondan çıkan elüatın içindeki maddeleri saptamaya yarayan aletler olup ikiye ayrılırlar: Üniuersal Dedektörler ve Seçici Dedektörler.

Seçici dedektörlerden, *Fluoresans, Elektrokimyasal ve UV-Visibl Dedektörler*, üniuersal dedektörlerden de, *Refraktif İndex Dedektörleri* en fazla kullanılan dedektörler arasında yer almaktadır.

Üniuersal dedektörler kolondan çıkan bileşiklerin tümüne karşı duyarlı dedektörlerdir. Seçici dedektörler ise elüe edilen bileşiklerin sadece bir kısmına duyarlı ve bu nedenle de daha yüksek hassasiyete sahip dedektörlerdir.

Flouresans Dedektörler

Monokromatik UV ışınlarına maruz bırakılan bazı bileşikler bu ışınları absorbe ederek dalga boyu daha uzun olan farklı bir ışık yayarlar. Fotolüminesans olarak bilinen bu olay ışığın absorpsiyonu ile tekrar yayılması (emisyon) arasındaki sürenin 10^{-9} sn'den daha az olması durumunda fluoresans adını alır. Uyarma (Eksitasyon) kaynağı olarak döteryum ya da ksenon ark lambaları kullanılır. Kendiliğinden fluoresans

gösteren bileşiklerin sayısı az olduğundan bu tür dedektörlerle tayini yapılabilen bileşiklerin sayısı da azdır. Bununla birlikte, yapılarında uygun gruplar bulunan bazı bileşikler fluoresan hale getirildikten sonra bu dedektörlerle saptanabilirler. Floresans dedektörlerle 10-100 pikogram konsantrasyonlarda analiz yapılabilmektedir (1 pikogram= 10^{-12} g).

Elektrokimyasal Dedektörler

Kontrollü potansiyel koşullarda elektrokimyasal olarak değişikliğe uğrayabilen bileşikler, bir elektrod yüzeyinde elektrolitik oksidasyon ya da redüksiyon geçirebilir.

Bu dedektörlerle ayırım yapabilmek için mobil fazın elektriği iletebilmesi gerekir. Bu iletkenlik, *organik mobil fazlar* için; *tetraalkilamonyumperklorat*, *sulu fazlar* için ise; *potasyum nitrat* gibi inert elektrolitlerin 0.05-0.1 M konsantrasyonlarda ilavesi ile sağlanır. Bu dedektörler pek çok ilacın oksidatif yolla tayininde kullanılabilir(Örn; morfin, parasetamol, fenotiyazinler, trisiklik antidepresanlar, haloperidol, salisilik asid vb.). Redüktif yolla analiz ise mobil fazda çözülmüş olan oksijenin uzaklaştırılmasını gerektirdiği için daha zordur (Örn; kloramfenikol, benzodiazepinler vb.). Elektrokimyasal dedektörlerle 50-100 pikogram konsantrasyonlarda analiz yapılabilmektedir.

UV-Visibl Absorbans Dedektörleri

Küçük bir akış hücresi (flow-cell) taşıyan ve bu hücrenin içinden geçerken maddeler tarafından absorblanan UV radyasyonu ya da görünen ışığı saptayabilen dedektörlerdir. Akış hücresinin uzunluğu 5-10mm, hacmi 5-10 µl arasında değişmektedir. *Sabit* ve *değişken* dalga boylu dedektörler olmak üzere ikiye ayrılırlar.

Sabit dalga boylu dedektörlerin en basiti ışık kaynağı olarak 254 nm'de radyasyon veren cıva-ark lambalarının kullanıldığı dedektörlerdir. Ancak, 254 nm'de absorpsiyon göstermeyen bileşikler için 280-660 nm arasında (örn; 280 nm, 313 nm, 365 nm, 405 nm, 546 nm ve 660 nm) sabit dalga boylarında emisyon yapan uygun lambalar kullanılır.

Değişken dalga boylu dedektörler ise, 180-400 nm arasında sürekli radyasyon verebilen döteryum lamba ya da 400-700 nm arasında ışık verebilen tungsten lamba içeren ve istenilen dalga boyunu seçmek için monokromatör taşıyan fotometrelerdir. Maddenin maksimum absorpsiyon verdiği dalga boyunda çalışma olanağı sağlayan bu dedektörler hassasiyeti artırdıkları için son derece önemlidirler.

Refraktif İndeks Dedektörleri

Madde içermeyen mobil fazın refraktif indeksi ile madde içeren mobil fazın refraktif indeksi arasındaki farkın (+) ve ya (-) değişimlerini saptayan dedektörlerdir. Duyarlılıkları az olması nedeniyle ilaç analizlerinde sınırlı kullanıma sahip dedektörlerdir. Farmasötik preparatlarda, ancak UV'de uygun absorpsiyon vermeyen yardımcı maddelerin (örn; şekerler) analizleri için kullanılabilirler.

3.5.2. HPLC'nin Dayandığı Teorik Esaslar

Örnek çözeltinin, sıvı kromatografa enjekte edildikten sonra dedektörden çıkan sinyalin bir Gauss eğrisi şeklinde konsantrasyon/zaman grafiği olarak yapılan kaydına **kromatogram** denir (Şekil 3.3).

Kromatogram Parametreleri

b: Baseline: Kolondan yalnızca mobil faz geçerken oluşan kromatogramın taban çizgisidir.

a: Ölü nokta (Dead point): Kolonda tutulmamış solut pikinin kromatogramda görüldüğü nokta.

t_0 : Ölü Zaman (Dead time): Solutun kolona enjekte edilmesiyle ölü noktanın görülmesi arasında geçen süre.

V_0 : Ölü Hacim (Dead volume): Solutun kolona enjekte edilmesiyle ölü nokta arasında kolondan geçen mobil faz hacmidir.

t_R : Toplam Tutulma Zamanı (Retention time): Solutun enjekte edildiği zaman ile kaydedicide maksimum konsantrasyonda saptandığı zamana kadar geçen süre.

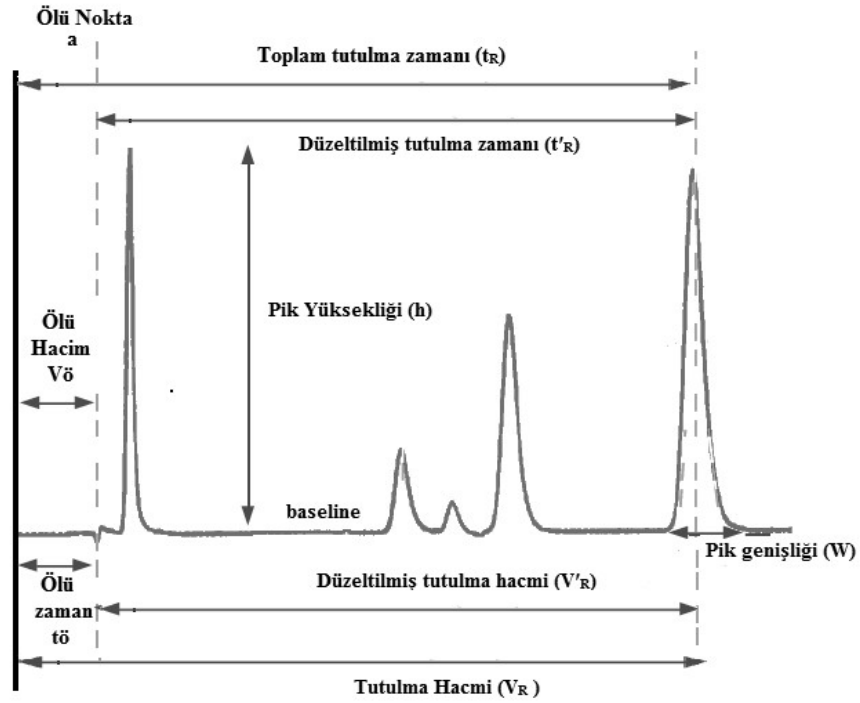
V_R : Tutulma Hacmi (Retention volume): Solutun enjekte edilip maksimum konsantrasyonda saptandığı zamana kadar kolondan geçen mobil faz hacmi.

t'_R : Düzeltmiş tutulma zamanı (Corrected retention time): Ölü nokta ile maksimum pik yüksekliğinin saptandığı zamana kadar geçen süre.

V'_R : Düzeltmiş Tutulma Hacmi (Corrected retention volume): Ölü nokta ile maksimum pik yüksekliğinin saptanana kadar kolondan geçen mobil faz hacmi.

h : Pik Yüksekliği: Pikin maksimum yüksekliği ile temel çizgi arasındaki uzaklık.

W : Pik genişliği



Şekil 3.3. Kromatogram Parametreleri

3.5.2.1. Kolon Verimliliği

Pik genişliğini kontrol eden ve kolonun ne kadar iyi doldurulduğunu gösteren bir parametredir (N değeri). Doğrudan doğruya kromatogramdan ölçülebilir.

N değeri, kolon uzunluğu, dolgu materyalinin partikül büyüklüğü ve çözücünün akış hızı ile ilgilidir. N değeri ne kadar büyük olursa, o kadar dar pik elde edilmektedir, pikler ne kadar dar olursa kolon verimliliği o ölçüde iyi olmaktadır.

$$N = a (v_R/w)$$

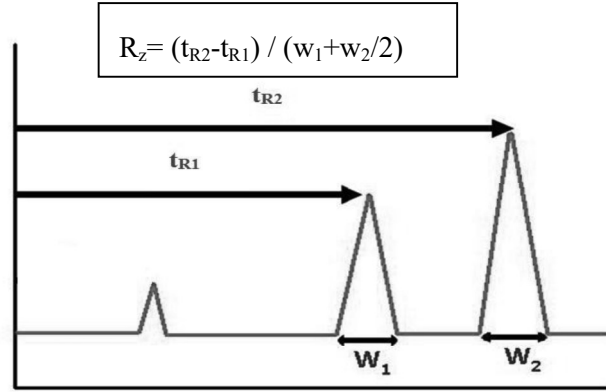
N: Teorik plaka sayısı

w: Pik genişliği

a: Pik genişliğinin ölçüldüğü yerden baseline'a olan yüksekliğe dayalı bir değişmez.

3.5.2.2. Rezolüsyon (Ayrılma) (R_z)

İki pikin birbirinden ayrılma derecesini tanımlayan bir parametredir. Matematiksel olarak iki pikin tepe noktaları arasındaki uzaklığın, her iki pikin baseline'daki genişliklerinin ortalamalarına oranıdır. İdeal bir rezolüsyon için R_z 'nin 1.5 olması gerekir.



Şekil 3.4. İki Bileşenin Birbirinden Ayrılması

3.5.2.3. Ters Faz ve Normal Faz HPLC

HPLCde mobil faz ve stasyoner faz seçimi verimli ve başarılı bir ayırımı etkileyen önemli bir faktördür. Stasyoner faz ve mobil fazın polaritelerine göre “Normal faz” ve “Ters faz” olmak üzere iki tip HPLC

mevcuttur. Normal faz HPLC’de polar stasyoner faz (silikajel, siyanopropil, aminopropil bağlı silikalar vs.) ve non-polar mobil faz (hekzan, kloroform, etilasetat vs.) kullanılmaktadır. Bu şartlarda apolar bileşikler kolondan en önce ayrılacaktır. Bu HPLC tipinden, suya hassas bileşiklerin, geometric izomerlerin ve kiral bileşiklerin ayırımında yararlanılmaktadır. Ters faz HPLC’de ise apolar stasyoner faz (C18, C8, C3 vs.) ve polar mobil faz (asetonitril, su, methanol vs.) kullanılmaktadır. Polar bileşikler kolondan önce ayrılır. Ters faz HPLC tekniği kullanılarak polar, apolar, iyonize olabilen ve iyonik bileşiklerin ayırma işlemi gerçekleştirilebilir.

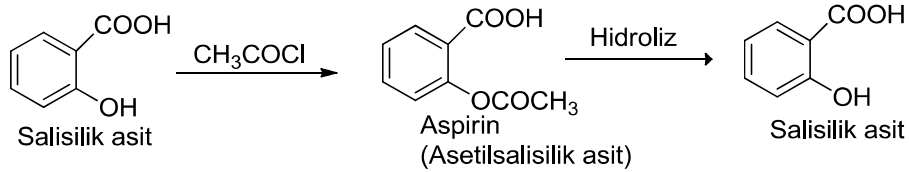
3.5.3. HPLC’nin Eczacılık Alanında Kullanımı

İlaç etken maddesinin hızlı, duyarlı ve güvenilir analizini yapmaya yarayan bir yöntemdir. Bu yöntemle saflık ve kalite kontrolü, stabilite tayini ve reaksiyon sırasında reaksiyon ara ve sonuç ürünlerinin saptanması ile enansiyomer ayırımları sağlanabilmektedir.

Biyolojik materyallerde ilaç ve ilaç metabolitlerinin analizine de olanak sağlayan bu yöntemde, plazmadaki ilaç düzeyinin saptanması, doz ayarlanması ve biyoyararlılık gibi konularda çalışmalar yapılabilmektedir.

HPLC Uygulaması:

Aspirinin HPLC ile saflık ve stabilite tayini



RAPOR DÜZENİ:

Deneyin Adı:

Deneyin Yapılışı:

a) Standart çözeltilerin hazırlanışı:

Asetilsalisilik asit standart çözeltisinin hazırlanışı

Salisilik asit standart çözeltisinin hazırlanışı