

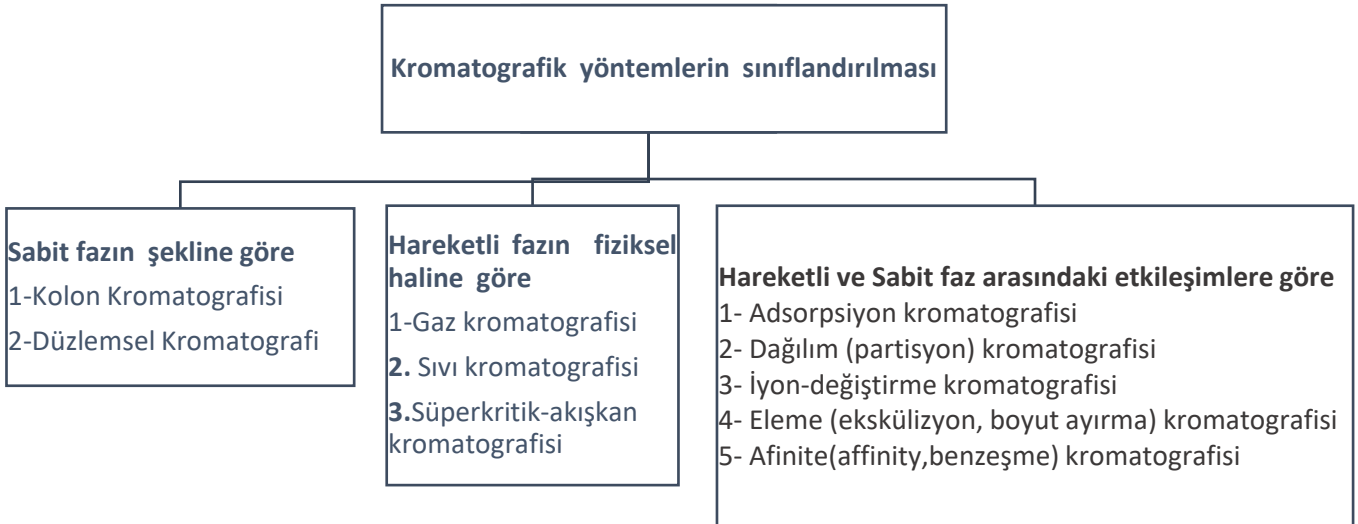
YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC) İLE KAFEİN TAYİNİ

A. KURAMSAL BİLGİ

Kromatografi, ayrılacak bileşenlerin biri sabit (**sabit faz**), diğeri belirli bir yönde hareket eden (**hareketli faz**) iki faz arasında dağıldığı fiziksel bir ayırma yöntemidir .

Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, sabit fazda farklı tutunma kuvvetlerine dayanarak hareketli faz yardımıyla ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir.

Bir ayırma yöntemi olarak kullanılan kromatografi, ayrılan bileşenlerin bir dedektör vasıtasıyla sinyalinin ölçülmesi yoluyla nicel, bileşenlerin farklı göç hızlarından yararlanarak da nitel analizde kullanılır. Kromatografik yöntemler genel olarak aşağıdaki gibi sınıflandırılır.



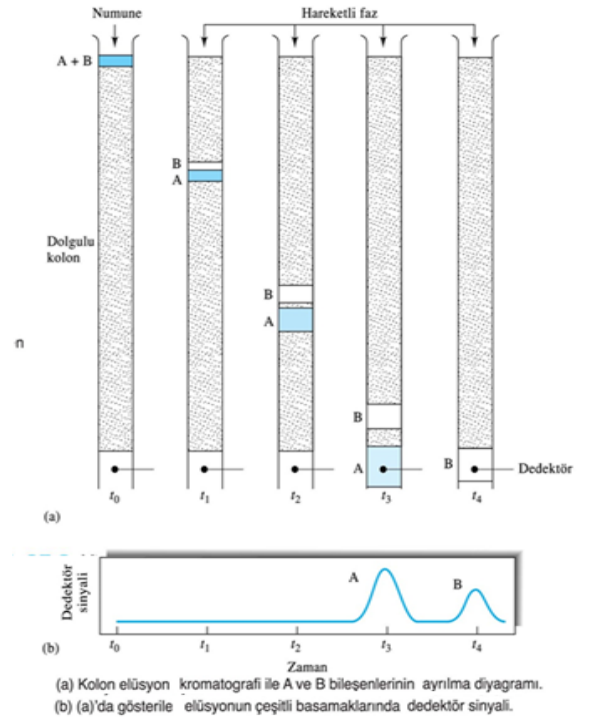
Kolon kromatografisi

Hareketli fazın ilerlemesiyle durgun fazda farklı kuvvetle tutunan maddelerin geri alınmasına elüsyon (geri alma) denir. Ayrılması istenen maddelerin kolondan çıkış süresine alıkonma süresi denir.

Kromatografide A ile gösterilen bir analit için dağılım dengesini sıklıkla, aşağıdaki basit denklemle tanımlayabiliriz:

$$A_{\text{hareketli}} \rightleftharpoons A_{\text{sabit}} \quad K = \frac{[A s]}{[A h]}$$

Bu dengeye ait sabit, K, **dağılım katsayısı** olarak adlandırılır. Bu denklemde C_s ve C_m analitin, sırasıyla sabit ve hareketli fazdaki molar derişimleridir. Kolonda farklı kuvvetlerle tutunan maddeler, farklı alıkonma zamanlarına sahiptir. A ve B maddesinin kolonda birbirinden net olarak ayrılması piklerin ayrılması ile gözlenir (Şekil 1). Bu ayırma işlemleri alıkonma süresine karşı dedektör sinyalinin ölçüldüğü “kromatogram” adı verilen grafiklerle gösterilir. Bu ayrılmanın başarısı ayırma gücü ile ifade edilir.



Şekil 1. Tipik bir kolon ve kromatogram ilişkisi

Ayrırma gücü; R_s

İki kromatografik pikin birbirinden ayrılma derecesini gösterir. Ayrırma gücü, piklerin birbirinden uzaklığının büyüklüğü ve de taban genişliklerinin küçüklüğü ile artar. İyi bir ayırma için bir pikin tamamlandıktan sonra diğerinin başladığı durumlar tercih edilir. (Şekil 2-f)

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

Burada; t_R : alıkonma zamanı, W , ise pikin taban genişliğini gösterir.

Kolon dolgusunun çok sayıda teorik tabakadan oluştuğu varsayılır. Kuramsal tabaka sayısı, kolon veriminin yani piklerin keskinliğinin nicel ölçüsüdür.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

Kolon dolgu yüksekliği (L), N tane, H kuramsal tabaka yüksekliğinden oluşur.

$$H = \frac{L}{N}$$

Alıkonma faktörü (kapasite faktörü) (k), Analitlerin kolonda göç etme hızlarını tanımlamak amacıyla yaygın olarak kullanılan önemli bir büyüklüktür. Kapasite faktörü (k)'nın 1-5 arasında bir değer göstermesi idealdir. t_M , hareketli, fazın kolondan çıkış süresidir.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Ayrırma Faktörü (seçicilik) (α), birbiri ile ilişkili iki pikin göreceli alıkonmalarıdır.

$$\alpha = \frac{t_{R(B)} - t_M}{t_{R(A)} - t_M} \quad \alpha = \frac{k_B}{k_A} = \frac{K_B}{K_A}$$

Burada K dağılma sabitidir.

Kolon Etkinliğinin(Performansının) Optimizasyonu

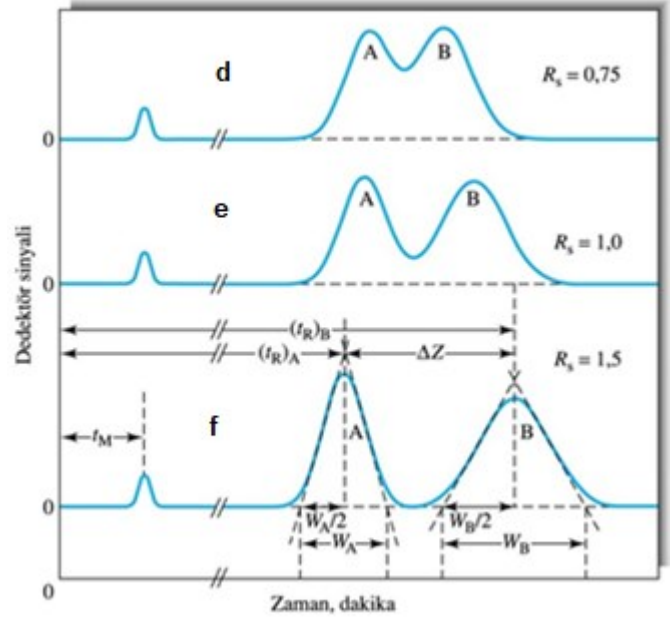
İyi bir ayırma için temel büyüklükler : α , k ve N (veya H) optimize edilir.

Ayırmayı iyileştirmenin en kolay yolu alıkonma faktörünü (k) optimize etmektir.

Alıkonma faktörünü (k) optimize etmek için hareketli faz bileşimi değişimi, farklı bir kolon dolgu maddesi kullanılması uygundur.

Tabaka sayısını optimize etmek için;

- kolon uzunluğunu,
- hareketli fazın akış hızını,
- dolgu maddesinin tanecik büyüklüğünü
- hareketli fazın viskozitesini değiştirmektir.



Şekil 2. Çeşitli ayırma güçlerinde elde edilmiş kromatogramlar

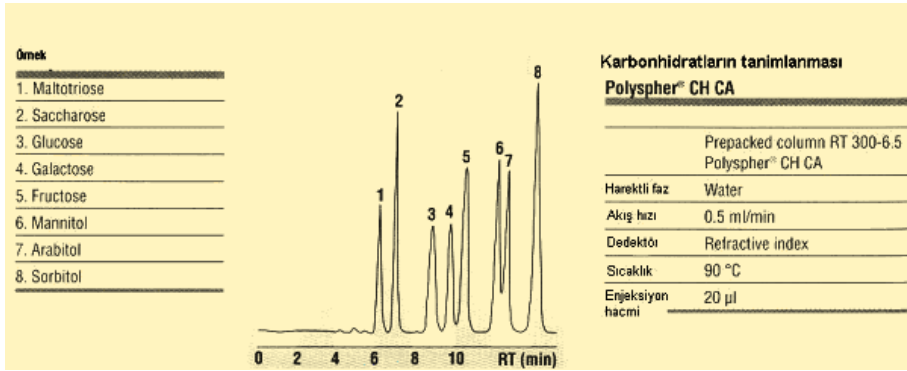
Ayırma faktörünü (α) optimize etmek için

- pH değişikliklerini de içeren hareketli faz bileşimini değiştirmek
- kolon sıcaklığını değiştirmek,
- özel kimyasal etkilerden yararlanma seçenekleri denenebilir.

Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan *yüksek performanslı sıvı kromatografisi* (HPLC) yönteminde, hareketli faz sıvı, durgun faz ise, katı parçacıklardan (alümina, silikajel vb.) oluşur.

Durgun (sabit) faz olarak kullanılan parçacık boyutlarının önemli ölçüde 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 bir **basınç** uygulanması gerekir. Bu yüksek verimdeki kolonların ve oldukça yüksek basınçların kullanıldığı HPLC, element ve organik molekül türlendirilmesinde ve tayininde yaygın biçimde kullanılan kromatografi türüdür.

HPLC günümüzde kimya, biyokimya, biyoteknoloji, farmakoloji, tıp kimyası, bitki kimyası, tarım alanlarında ayırma ve tayin için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle çevre sıcaklığında termal olarak kararsız bileşikler ve yüksek polarlıktaki bileşikler herhangi bir türevlendirme olmaksızın ayırmak ve analiz etme mümkündür (Şekil 3).



Şekil 3. 8 karbonhidratın HPLC kromatogramı

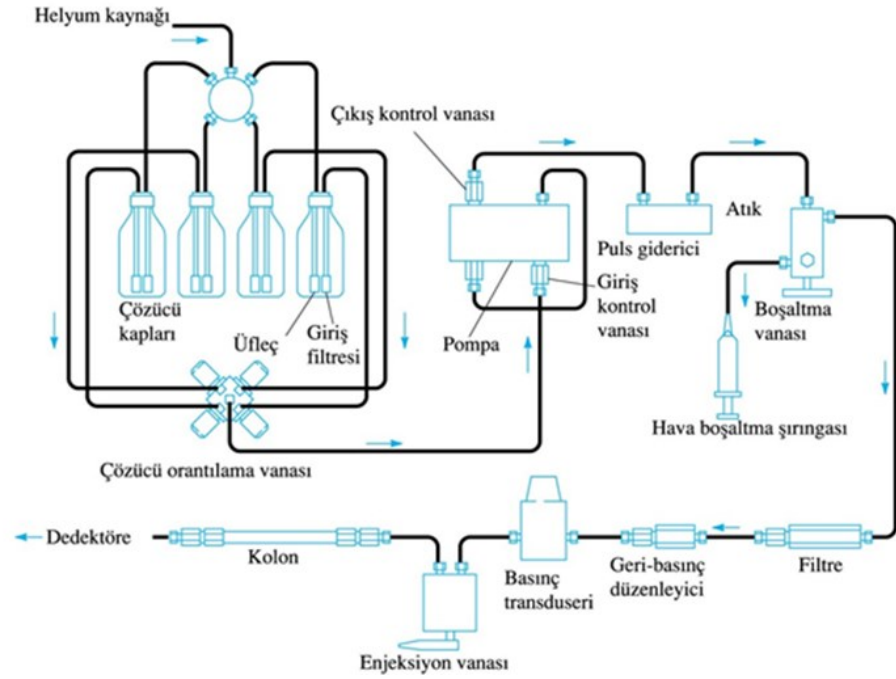
HPLC'nin diğer kromatografi türlerinden üstünlükleri :

- HPLC kolonu, rejenerasyon olmaksızın pek çok kez kullanılabilir.
- Böyle kolonlarda gerçekleştirilen ayırma, eski yöntemlerle elde edilenden çok daha çeşitlidir.
- Bu teknik kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir.
- Nicel analiz için de kullanılabilir.
- Analiz süresi çok kısadır.
- Duyarlık çok yüksektir, 10 µg lık bir örnek bile, floresans veya elektron yakalama dedektörleri kullanılarak tayin edilebilir.

B. HPLC KROMATOĞRAFI CİHAZI

Şekil 4'te görülen HPLC cihazı başlıca üç bölümden oluşur:

- Çözücü dağıtma sistemi
- Kolon
- Dedektör ve kaydedici sistem



Şekil 4 HPLC cihazının şematik gösterilişi

Çözücü Dağıtma Sistemi

HPLC cihazı, diğer sıvı kromatografisi cihazlarından, daha önce de belirtildiği gibi, kolon giriş ve çıkışı arasında oluşturulması gereken yüksek basınç nedeni ile farklılık gösterir. Bu basınç farkı, kolon girişine bir pompa yoluyla uygulanan basınç ile sağlanır. Pompanın performansı, analitik sonuçlardaki tekrarlanabilirliği, nicel değeri, gözlenebilme sınırı vb. değerleri büyük ölçüde etkiler. Ticari olarak mevcut pompalama sistemlerinin farklı tipleri şunlardır:

- Doğrudan gaz basınç pompaları
- Pnömatik hızlandırıcı pompalar
- Pistonlu pompalar
- Şırınga tipi pompalar

Sıvı kromatografisinde, iki farklı örnek enjeksiyon sistemi kullanılır.

1. Hareketli faz akışı olurken; Septum yoluyla kolon başına mikroiğne ile enjeksiyon,
 - a) Hareketli faz akışının durdurulmasıyla septum yoluyla enjeksiyon,
 - b) Kolonun hemen başında hareket eden faza septum yoluyla enjeksiyon.
2. Dış ilmek subabı (valfi) yoluyla enjeksiyon.

Kolon

HPLC cihazında kullanılan kolonlar, yüksek basıncı korumak için paslanmaz çelikten yapılmışlardır. Bunlar baştan başa düzgün bir iç çapa sahiptirler ve ticari olarak değişik büyüklüklerde mevcuttur.

Bir kromatografik sistemin performansı, kolonda gerçekleştirilen ayırma ile yani, kolon dolgu maddesinin seçilmesi ve kullanılmasıyla tayin edilir.

İyi bir kolon dolgu maddesi kararlı olmalıdır ve hem hareketli faz çözücülerine hem de örnek çözeltilere karşı eylemsiz olmalıdır. Geniş yüzey alanına, düzgün olarak dağılmış ve hareketli faza kolay erişebilir açık yapısal yüzeye sahip olmalıdır. Yüksek basınç ve yüksek akış hızlarından etkilenmemelidir.

Kolon verimi; kolon dolgu maddesi, ortalama parçacık çapı, kolonu doldurmak için kullanılan teknikler, kolonun iç çapı ve kolonun iç yüzeyinin geometrisi gibi pek çok faktör tarafından tayin edilir. Paslanmaz çelik kolonların, malzeme

özellikleri açısından en uygun kolonlar olduğu ortaya çıkmıştır. Analitik uygulamalarda, 2,1 mm, 3,2 mm ve 4,5 mm iç çapa sahip kolonlar 10-30 cm arasındaki uzunluklarda kullanılırlar.

Enjeksiyon sistemi-kolon ve kolon-dedektör arasındaki bağlantı borularının uzunluğunun mümkün olduğu kadar kısa tutulması istenir. Kolon çıkışına ve dedektör sistemine bağlanmış boruların en iyisi, hareketli fazla önemsiz ölçüde seyreilmeye izin veren en düşük ölü hacme sahip olanıdır. Bu örnek seyreilmesini engelleyen, 0,025-0,05 cm iç çapa sahip (çelik ve teflon) bağlantı borularının kullanılmasıyla başılır.

HPLC çalışmalarında sabit faz olarak genellikle silika jel kullanılır. İçerdiği SiOH grupları nedeniyle zayıf asidik özellik gösteren silikajel, bazik özellik gösteren bileşikler bazlık kuvvetlerine göre tutar. Yani, kuvvetli bazlar silika jel kolonlarda zayıf bazlara oranla daha kuvvetli tutulurlar. Silika jel doğrudan dolgu maddesi olarak kullanıldığı gibi bir katı yüzeyine film halinde kaplanabilir. Bu katının cam boncuk olması durumunda bu ince tabaka, yüzeye kimyasal bağlarla bağlanır. Asidik özellik gösteren bileşiklerin ayrılmasını sağlayan, yani bazik özellik taşıyan bir kolon dolgu maddesi de aluminadır. Bu dolgu maddesi de katı bir yüzeye film halinde kaplanarak kullanılır.

Dedektör

Örnek, hareketli faz ile birlikte kolon boyunca sürüklenerek dedektöre taşınır. HPLC cihazlarında kullanılan dedektörler, diğer sıvı kromatografisi cihazlarında kullanılan dedektörlerle aynıdır. Analizin amacına göre UV absorpsiyon, kırılma indisi, floresans ve elektrokimyasal dedektörler kullanılır. İdeal bir dedektör şu özelliklere sahip olmalıdır:

- * Düşük gürültü seviyesine sahip olmalıdır. Böylece ayrılan bileşenlerin küçük miktarları bile gözlemlenebilir.
- * Hızlı ayrılan pikleri kaydetmek için süratli cevap zamanına sahip olmalıdır.
- * Hareketli fazdaki akış hızı, sıcaklık ve fazın bileşimindeki değişimlere karşı bir dereceye kadar duyarsız olmalıdır.
- * Bütün çözünenlere cevap vermeli veya en azından tahmin edilebilir, tatmin edici bir seçiciliğe sahip olmalıdır.
- * Kolay çalışır olmalı ve kararlılığı fazla olmalıdır.
- * Oluşan pikte nitel bilgi de sağlamalıdır.

HPLC dedektörlerinin iki tipine rastlamak mümkündür.

1. Genel dedektörler
2. Seçici dedektörler

Genel dedektörler, hareketli faz ve örnek çözeltisinin özelliklerindeki değişimi ölçer.

Seçici dedektörler ise yalnız örnek çözeltisi için duyarlık ve seçicilik gösterir. Genel özellikli dedektörlere örnek olarak kırılma indisi ölçen dedektörler ve kütle spektrofotometreleri verilebilir. Seçici dedektörlere örnek olarak da UV, FT-IR, floresans, elektrokimyasal, radyokimyasal, iletkenlik dedektörleri verilebilir.

UV absorpsiyon dedektörü, kolondan ayrılarak dedektöre ulaşan bileşenlerin ultraviyole bölgede yaptığı absorbansın ölçümüne dayanır. Tek bir dalga boyunda çalışan dedektörler kullanılabildiği gibi bir monokromatör ile çeşitli dalga boylarını seçerek çalışan dedektörler de vardır. Tek dalga boyunda çalışan dedektörlerde ışık kaynağı olarak genellikle 254 nm'de ışımaya yapan Hg lambası, çeşitli dalga boylarını ölçebilen dedektörlerde ise döteryum lambası kullanılır. Spektrofotometrik ölçüm temeli ile çalışan bir başka dedektör türü ise fotodiyot dizisidir. Ölçümlerin çok hızlı bir biçimde yapılmasının gerektiği analizlerde genellikle bu dedektör kullanılır. UV dedektörün özellikleri şunlardır:

- * Örneklerin UV- görünür bölgede absorpsiyon yapması gerekir.
- * Hareketli faz akış hızı ve sıcaklık değişimlerinden etkilenmez.
- * Band genişletme etkisi küçüktür.
- * Çok güvenilirdir, çalıştırılması kolaydır.
- * Örnek çözeltiyi bozmaz.

Kromatografide Örneğin hazırlanması

Katı örnekler: Bir örneği HPLC sistemine vermek için, bu örneğin, hareketli faz olarak kullanılan çözücünde çözünmesi gerekir. Örneğin, metanol/su karışımı bir hareketli fazla ile analiz yapılacaksa, örnek metanolde, suda veya metanol/su

karışımında çözölmelidir. Eğer örnek böyle bir çözöcöde çözönmüyorsa, diğör bir çözöcöde çözönmeli, fakat bu durumda kullanılan çözöcö kesinlikle hareketli fazla karışabilir olmalıdır. Örnek bileşenlerinin, hareketli faz çözöcösünde çökmemesine de dikkat edilmelidir.

Sıvı örnekler: Sıvı örneklerde çözöcö, sistem ile uyumluysa, doğrudan enjekte edilebilir. Eğer örnekler istenen çözöcöde değöllerse veya enjekte edilecek kadar derişik değöllerse, deriştirilmelidir.

Örneklerin süzölmesi: Hareketli faz akışında azalmaya, geri basıncında artmaya, kolon veriminde azalmaya ve istenmeyen piklere neden olabilecek çözönmeyen maddelerin kolona girmesini önlemek için, örneğın enjeksiyondan önce süzölmesi tavsiye edilir.

Dedeksiyon sisteminin korunması

Dedeksiyon hücresinde gaz kabarcıkları oluşursa, tayinde problemler ortaya çıkar. Gaz kabarcığının oluşumunu önlemek için şu önlemler alınmalıdır:

- * Sistemde sızıntı olmamalıdır.
- * Çözöcö HPLC sisteminde kullanılmadan önce gaz uzaklaştırılmalıdır.
- * Eter, pentan gibi uçucu çözöcöler sistemde buharlaşacağından, bunları kullanmaktan kaçınılmalıdır.

C) DENEY: HPLC ile Çayda Kafein Tayini

Cihaz ve Malzemeler:

HPLC cihazı

C-18 kolonu

UV dedektörü

Şırınga (10 µL)



Kimyasal Maddeler

Kafein (194,19 g/mol d= 1,2 g/cm³)

Şekil 5 HPLC cihazı

İŞLEM

1) Numunenin hazırlanması: 1,80 gram siyah çay 150 mL kaynatılmış suda 10 dakika özütlenir. Özütlenen numune soğuması için beklenir. Çözelti 1000 devir/min de 5 dakika santrifüj edilir. Çözelti kolona yüklenmeden önce 0,45 mikrometrelik filtreden süzölür ve kolona yüklenir, analiz edilir.

2-) Kafein için 2, 4, 6, 8 mg/L standart çözötiler hazırlanarak bunların kromatogramları alınarak derişime karşı – pik alanı cinsinden kalibrasyon grafiğı çizilir

3) Hazırlanan numuneden alınan örnek kolona enjekte edilir.

Çizilen kalibrasyon grafiğinden yararlanarak bilinmeyen kafein numunesinde kafein derişimi hesaplanır. Alınan çay numunesi ve seyrelmeler de kullanılarak çaydaki kafein değeri mg kafein/g çay cinsinden ve mg kafein/100 mL çay demi cinsinden hesaplanır.



D) HESAPLAMALAR

1) Kalibrasyon standart çözeltilerinin derişimlerini hesaplanması

30 mg/L'lik stok kafein çözeltilisinden 10 mL 2 mg/L standart çözeltilinin hazırlanması;

2 ppm çözeltili hazırlanışı:

$$M_1 \times V_1 = M_2 \times V_2$$

$$30 \times V_1 = 2 \times 10$$

$V_1 = 0,67$ mL standart kafein çözeltilisinden alınılır ve saf su ile 10 mL'ye tamamlanılır.

Diğer derişimlere (4, 6 ve 8 mg/L) ait hesaplamalar da aynı şekilde yapılır.

2) Derişimlere karşı ölçülen alan değerleri kayıt edilir.

3) Okunan alan değerleri düşey ekseninde (y ekseninde), derişim değerleri yatay ekseninde (x ekseninde) olacak şekilde grafik çizilir.

4)

Derişim (ppm)	Alan
2	42407
4	82118
6	112126
8	148875

Bilinmeyen numune için ölçülen alan değerinden yararlanarak ya doğrudan kalibrasyon grafiğinden ya da kalibrasyon grafiği doğru denkleminde bilinmeyen derişimi hesaplanır. Örneğin; pik alan değeri 135478 br² olan bilinmeyen numunenin derişim değerinin bulunması için;

Doğru denkleminde yerine koyma:

$$y = 19,275x + 5,2875$$

$$135,478 = 19,275x + 5,2875$$

$$x = 6,75 \text{ mg/L}$$

Grafikten okuma:

$$X = 6,6 \text{ mg/L}$$

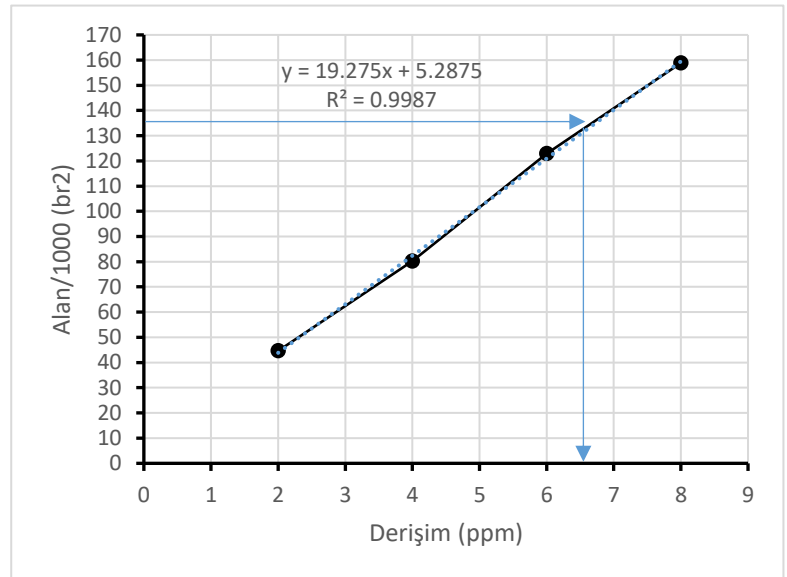
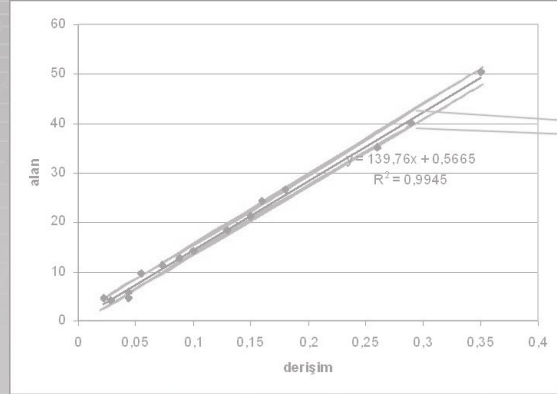
İşlemleri yapılabilir.

E) ÇALIŞMA SORULARI:

1. Benzen ve toluen içeren organik bir karışımın analizi, HPLC ile yapılacaktır. Yapılan analiz sonucunda benzen ve toluenin alıkönma süreleri 32,0 ve 42,5 dakikadır. Benzen ve toluene ait pik taban genişliği sırasıyla 2,54 ve 2,46 dakikadır. Bu analiz sonuçlarına göre ortalama kuramsal tabaka sayısını hesaplayınız?
2. Bir çay örneğinin içerisindeki kafein miktarını belirlemek amacıyla %100'lük kafein standart çözeltilisinden bir seri derişimde hazırlanan çözeltilerin HPLC ile tespit edilen alan değerleri aşağıdaki çizelgede verilmiştir. Buna göre çaydaki kafeine ait alan değeri 57600 br² bulunduyorsa, örnek içerisindeki kafein derişimi kaç mg/L?

F) KAYNAKLAR

Örnek , HPLC Kalibrasyonu



- [1] D. A. Skoog, D. M. West, F. J. Holler, S. R. Crouch, Fundamentals of Analytical Chemistry, 8. Edition, 2004. Çeviri editörleri: E. Kılıç, H. Yılmaz. Analitik Kimya Temel İlkeler. 8. Baskı. 2011, Ankara.
- [2] D.C. Harris, Nicel Kimyasal Analiz, 8. Baskı, Çeviri Editörü: A. R. TÜRKER, Palme Yayıncılık. 2015, Ankara.
- [3] D.A. Skoog, F.J. Holler, S.R. Crouch Enstrümental Analiz, 2007, 6. Edition, Çeviri editörleri: E. Kılıç, H. Yılmaz, Bilim Yayıncılık, 2013, Ankara.