



Hakan Dibek

Yüksek Kimyager
Satış Mühendisi
Ant Teknik Cihazlar

Analitik Laboratuvarlarda Hplc Kolonu Seçimi

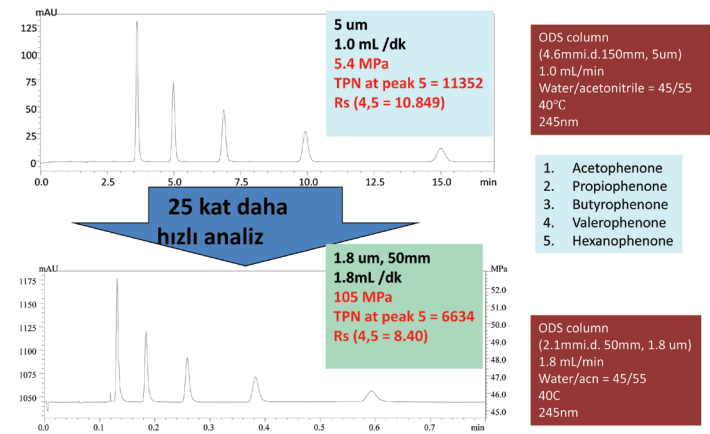
İlaç, gıda, kozmetik vb. endüstrilerde hammaddenin ve üretimin belirlenen standartlara uygun olup olmadığının kontrolü için birtakım analizlere ihtiyaç duyulmaktadır. Örnek olarak ilaç endüstrisinde, ilaçların kalitesini doğrudan etkileyen ilaç etken maddeler (APIs), koruyucu maddeler ve safsızlıkların miktar tayin analizleri için, gıda endüstrisinde ise koruyucu, tatlandırıcı, renklendirici, vitamin vb. analizlerde sıvı kromatografik yöntemler yaygın olarak kullanılmaktadır. Analitik laboratuvarlarda sıkça kullanılan ve sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) yönteminin temeli, uygun bir çözücü içerisinde çözünmüş maddelerin, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki durgun faz ile farklı etkileşimlere girerek, kolon içinde ilgi farklılığının sonucu olarak değişik hızlarda ilerlemesine dayanır. Bir HPLC sistemin performansı, kolonda gerçekleştirilen ayırma ile yani, doğru kolon dolgu maddesinin seçilmesi ve dolgu maddesinin verimiyle tayin edilir. Kromatografik kolonun verimliliğinin bir ölçüsü olarak teorik plaka yüksekliği, H ve teorik plaka sayısı, N terimleri kullanılmaktadır. Kolon verimliliğini doğrudan etkileyen parametreler ise kullanılan kolon dolgu maddesinin fiziksel özellikleri, parçacık boyutu ve kolonun uzunluğudur. Ayrıca, özellikle ilaç endüstrisinde HPLC analizlerinde hataları en aza indirmek için cihaz ve metot validasyonun yanı sıra valideli kolonların kullanımı tercih edilmektedir.



Parçacık Boyutu:

Kolon dolgu maddesinin boyutu (dp) genel olarak mikrometre (μm) cinsinden ifade edilir. Valide kolonlarda tüm parçacıkların boyutları eşleniktir ve boyutlar üretici firma tarafından kolon sertifikasında belirtilir. Parçacık boyutu ile kolon etkinliği arasında ters ilişki bulunmakta ve kullanılan dolgu maddesinin boyutu küçüldükçe ayırma etkinliği

o oranda artmaktadır. Kromatografik ayırma etkileyen diğer tüm parametreler sabit kalmak koşuluyla, $5\mu\text{m}$ kolon dolgu maddesinin yerine $3\mu\text{m}$ kolon dolgu maddesi kullanıldığında ayırmanın %60 oranında arttığı ve yine $3\mu\text{m}$ yerine ise $1.9\mu\text{m}$ boyutlu kolon dolgu maddesi kullanıldığında ayırmanın yine %60'lar oranında arttığı görülmüştür. Parçacık boyutu küçüldükçe sistem geri basıncı da karesi oranında artmaktadır. Uygun parçacık boyutunun seçimi ayırmanın etkinliğini ve analiz süresini kontrol etmenin en etkin yoludur. Parçacık boyutu seçimi mevcut sistemin basınca olan dayanımı ile sınırlıdır. Daha küçük parçacık boyutlu kolonların tercih nedenlerinden biri de analiz süresinin kısaltılmasıdır. Şekil 1'de konuya ilişkin bir örneğe yer verilmektedir.



Şekil 1. Ultra yüksek hızlı analize bir örnek.

Kolon Uzunluğu ve İç Çapı

Kullanılan kolonun boyu doğrudan verimliliği etkilemektedir. Kolon boyundaki artış verimliliği arttırmaktadır. Fakat resolüsyonu arttırmak için kolon boyunu uzatmak iyi bir yol değildir. Kolon boyundaki artış analiz süresinin uzamasına neden olurken, sistem geri basıncını da artırır. Kısa kolonlar hızlı gradiyent sistemler için uygunken, uzun kolonlar yüksek pik kapasiteli ve yavaş gradiyent sistemler için daha uygundur.

Kolon iç çapı (ID) kolon dolgu maddesi doldurulmuş olan yapının iç çapıdır ve milimetre (mm) cinsinden ifade edilir. Kolonun iç çapı van Deemter eşitliğinden dolayı doğrudan akış hızını etkilemekte ve doğrudan kolon verimliliğini etkilemektedir. Bu kromatografik kavrama göre kolon verimliliği

liği (bant genişlemesi) doğrusal akış hızına bağlıdır. Kolon iç çapı (ID) küçüldüğü zaman, doğrusal akışın devamı için akış hızı da o oranda azaltılmalıdır. Belirtmek gerekir ki, partikül boyutu küçüldüğü zaman, optimum akış hızı artmaktadır. 1.9, 2.2 μm gibi küçük parçacık boyutlu kolonlar kullanılarak daha iyi bir ayırım yapabilmek için akış hızının arttırılması gerekmektedir.

Fiziksel Özellikler:

Silika Türü:

Kolon dolgu maddesi olarak seçilen silika türü doğrudan alıkonma zamanı ve pik şekillerini etkilemektedir. Normal silika yüksek oranda ağır metal kalıntıları içerirken, bu ağır metal kalıntıları aminler, heterosiklik yapılar vb. gibi türler ile etkileşime girmektedir. Valide kolonlarda silikada bulunan ağır metallerin miktarları kolon sertifikalarında üretici firma tarafından belirtilir.

Silika tercihinde önemli olan diğer bir nokta ise silikanın gözenek yapısıdır. Gözenek boyutunun artışı ile yüzey alanı arasında ters orantı vardır. Küçük gözenek hacimleri daha yüksek yüzey alanı sağlarken, silika yüzeyine ligandların daha kontrollü şekilde bağlanmasına olanak verir.

Karbon yükü ya da karbon % ise silika yüzeyine bağlı olan durgun fazın bir ölçütüdür ve alıkonma süresini doğrudan etkiler. Karbon yükündeki artış hidrofobik türlerin kolonda daha uzun süre tutunmasını sağlarken, hidrofilik türler için ise çok kısa alıkonma süresi sağlar.

Silika bazlı kolonlar için maksimum sıcaklık limiti 80 °C'dir. Sıcaklıktaki artış kullanılan hareketli fazın viskozitesini azaltırken sistemin geri basıncısını da azaltır. Sıcaklık değişimi ile sistem geri basıncı değişeceğinden dolayı farklı bir seçicilik sağlanabilir. pH'da kolonun seçiciliğini ve iyonlaşabilen türlerin alıkonmasını değiştirmede kullanılan önemli bir parametredir. Birçok silika kolon için pH dayanıklılık aralığı 2-8'dir.

Durgun Fazın Yapısı:

Metot gelişimi için en önemli nokta spesifik kimyasal ligandlar bağlanmış silika destek yapısı yani kolon dolgu maddesinin seçimidir. Sıvı kromatografide ayırım durgun faz ile hareketli faz arasındaki polarite farkından gerçekleşir. Ters faz (RPC), normal faz (NP) ve HILIC sıvı kromatografinin en sık kullanılan türleridir.

Ters faz (RPC)'da durgun faz apolar iken kullanılan hareketli faz ise polardır. RPC sıvı kromatografinin en çok kullanılan türüdür ve hidrofobik türlerin ayırımı için kullanılmaktadır. RPC 'de en sık kullanılan kolonlar silika yüzeyine ODS olarak bilinen C18 gibi alkil grupların bağlanmış olduğu kolonlardır. Ters faz kromatografide genellikle End-capping olmuş kolonlar tercih edilir. End-capping silika yüzeyindeki açık silanol gruplarının kısa zincirli alkil grupları ile bloke edilmesidir. Özellikle bazik türler durgun fazda end-capping olmamış asidik silanol grupları ile etki-

leşerek pik kuyruklanmasına sebep olur. Bunun önüne geçilebilmesi ters faz çalışmalarda end-capping işlemi olmuş kolonlar tercih edilmelidir.

Normal faz (NPC)'da durgun faz polar iken kullanılan hareketli faz apolardır. Kolon dolgu maddesi olarak saf silika kullanılmaktadır. Kullanılan diğer durgun fazlar ise siyano ve aminodur. Genellikle yağda çözünen türlerin, pozisyonel izomerlerin ayırımı için kullanılır.

HILIC olarak bilinen hidrofilik etkileşim kromatografi türün de ise durgun faz polar yapıdayken, hareketli faz ise daha az polarlıktadır. Bu kromatografik tür normal faz ile ters faz türlerinin bir bileşimidir. Kullanılan durgun faz normal faz ile hareketli faz ise ters fazınki ile aynı türdedir. Bu kromatografik tür ile çok polar bileşiklerin ayırımı sağlanır.

Valide Kolonlar:

Kromatografik ayırımlarda en önemli nokta analizlerin tekrarlanabilirliğidir. Cihaz ve metod valide olsa bile tekrarlanabilirlik kullanıcıdan kullanıcıya ve kullanılan kolondan kolona değişkenlik göstermemelidir. Bu durumun önüne geçilemek için cihaz, metot ve kullanıcının validasyonu yanında kullanılan kolonların valide olması gerekir. Kolonun valideli kolon olması: Farklı seri numaralı kolonların kullanımında alıkonma zamanı, teorik plaka sayısı ve eşdeğer plaka yüksekliği gibi kolonun ayırım gücünü gösteren parametrelerin aynı olduğunun göstergesidir. Valide kolonlar için kolon dolgu maddesine ait tüm özellikler üretici firma tarafından sertifika halinde verilir (Şekil 1). Bu sertifikalar partikül boyutlarının eşlenik olduğunu, yüzey alanlarının net miktarını, kullanılan silika destek maddesinde bulunan ağır metal türlerini ve bu türlerin miktarlarını içerir. Bazı kolon üreticileri kolon dolgu maddesinin cinsi yanına V harfi (ODS-4V gibi) koyarak kolonun valideli kolon olduğunu vurgular.

Manufacturer's Validation Certificate

Inertsil ODS-4V 5 μm Lot.No.VF5-3134

Inspected by ootsuka

Analysis of Silica Gel

	Specification	Result
Median Particle Size [μm]	4.4 – 5.0	4.8
Surface Area [m^2/g]	420 – 450	446
Median Pore Diameter [Å]	94 – 102	101
Pore Volume [mL/g]	1.00 – 1.10	1.10
Atomic Emission [ppm]		
Fe	< 10	0.6
Na	< 10	< 0.5
Al	< 10	0.9
Ti	< 1	< 0.5

Analysis of Inertsil ODS-4V

	Specification	Result
USP Code	L1	
Carbon Content [%]	10.6 – 11.6	11.3

Şekil 2. Kolon performans raporu ve üretici validasyon sertifikası örneği