

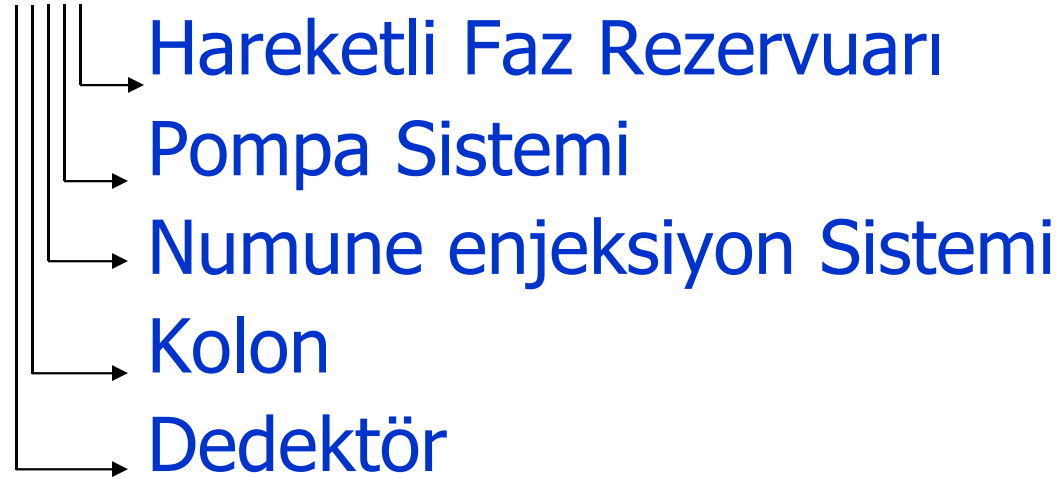
HPLC

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi



★ HPLC Nedir?

★ HPLC'nin Kısımları:



★ HPLC Çeşitleri

★ HPLC Uygulamaları

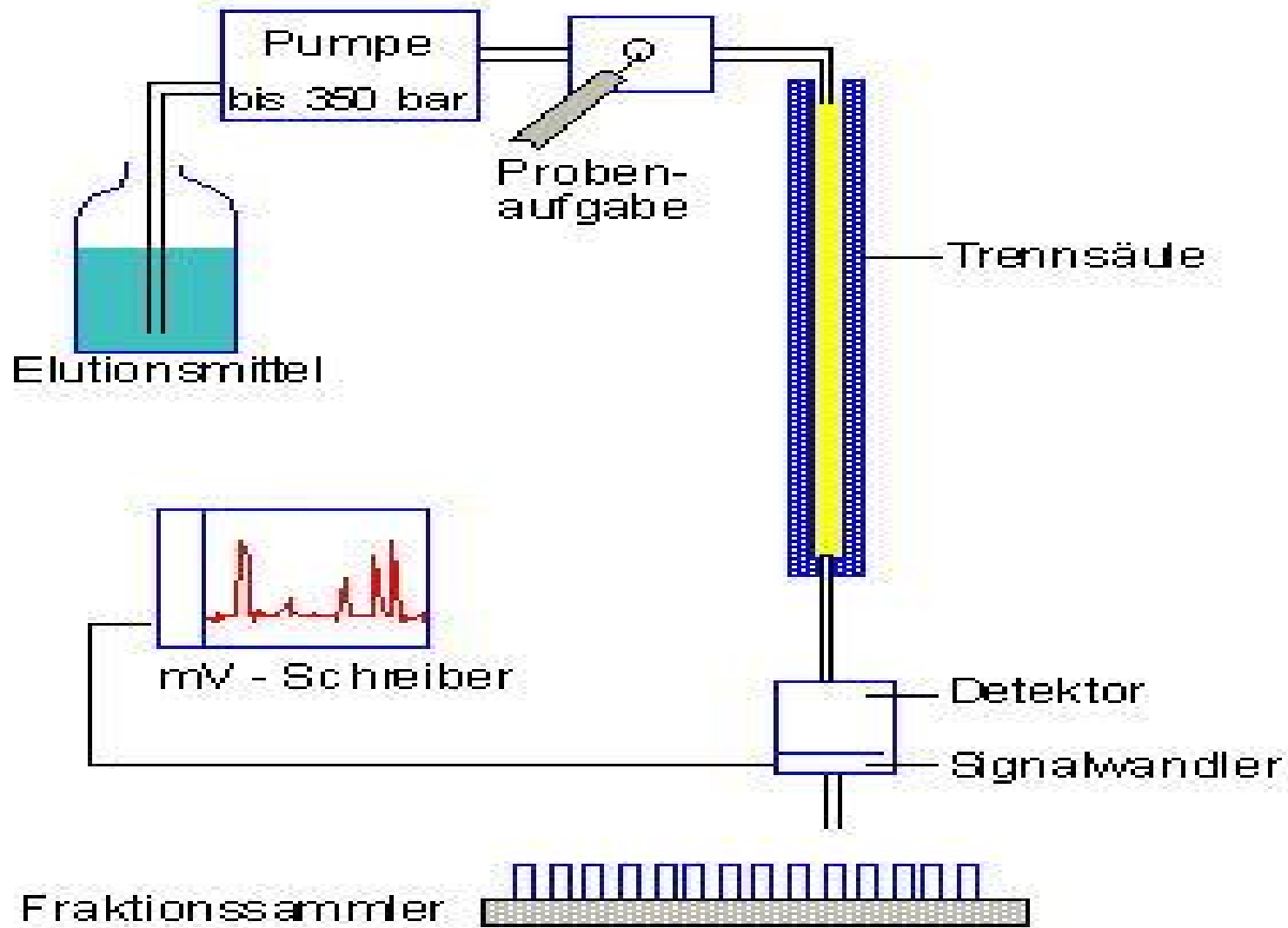
HPLC

Yüksek performans sıvı kromatografisi (High Performance Liquid Chromatography : HPLC) ; en yaygın olarak kullanılan analitik tekniklerden bir tanesidir.

Kromatografik prosesler, durgun ve hareketli fazlar arasında kütle transferini kapsayan ayırma teknikleri olarak tanımlanırlar.

HPLC; bir karışımdaki bileşenlerin ayrılmasında sıvı hareketli fazı kullanır. Bu bileşenler ilk olarak çözümlenir ve daha sonra yüksek basınç altında kromatografi kolonundan geçmeye zorlanırlar.





Başlangıçta basınç; modern sıvı kromatografisinin temel kriteri olarak düşünülmekteydi ve bu nedenle "Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisi" olarak adlandırılmaktaydı.

Ancak bu günümüzde geçersiz kabul edilmektedir. Çünkü yüksek performans yalnız basıncın değil bir çok faktörün birleşmesiyle ortaya çıkmaktadır.

Bu faktörler ;

- Dar bir dağılım aralığında çok küçük partiküllerin kullanılması,
- Uniform gözenek boyutu ve dağılımı,
- Yüksek basınçta kolon paketleme,
- Doğru, düşük hacimli örnek enjektörleri,
- Duyarlı dedektörler,
- İyi pompalama sistemi kullanımı,

olarak sınıflandırılır. Bu nedenlerden dolayı Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi terimi kullanılmaktadır.

HPLC'nin diğerk klasik tekniklerle kıyaslandığında;

- Küçük boyutlu paslanmaz çelik kolonların kullanılması,
- Partikül boyutları çok küçük (3,5-10 μm) matrikslerin kullanılması,
- Yüksek iç basınç ve kontrollü akış hızı sağlanabilmesi,
- Örnek gereksinimlerinin az olması,
- Sürekli akış dedektörleri ile küçük miktarların tayinine olanak sağlaması,
- Otomasyona müsait olması,
- Hızlı analiz imkanı ve yüksek ayırma gücüne sahip olması

nedeniyle çok yönlü uygulamalara daha açık olduğu görülmektedir.

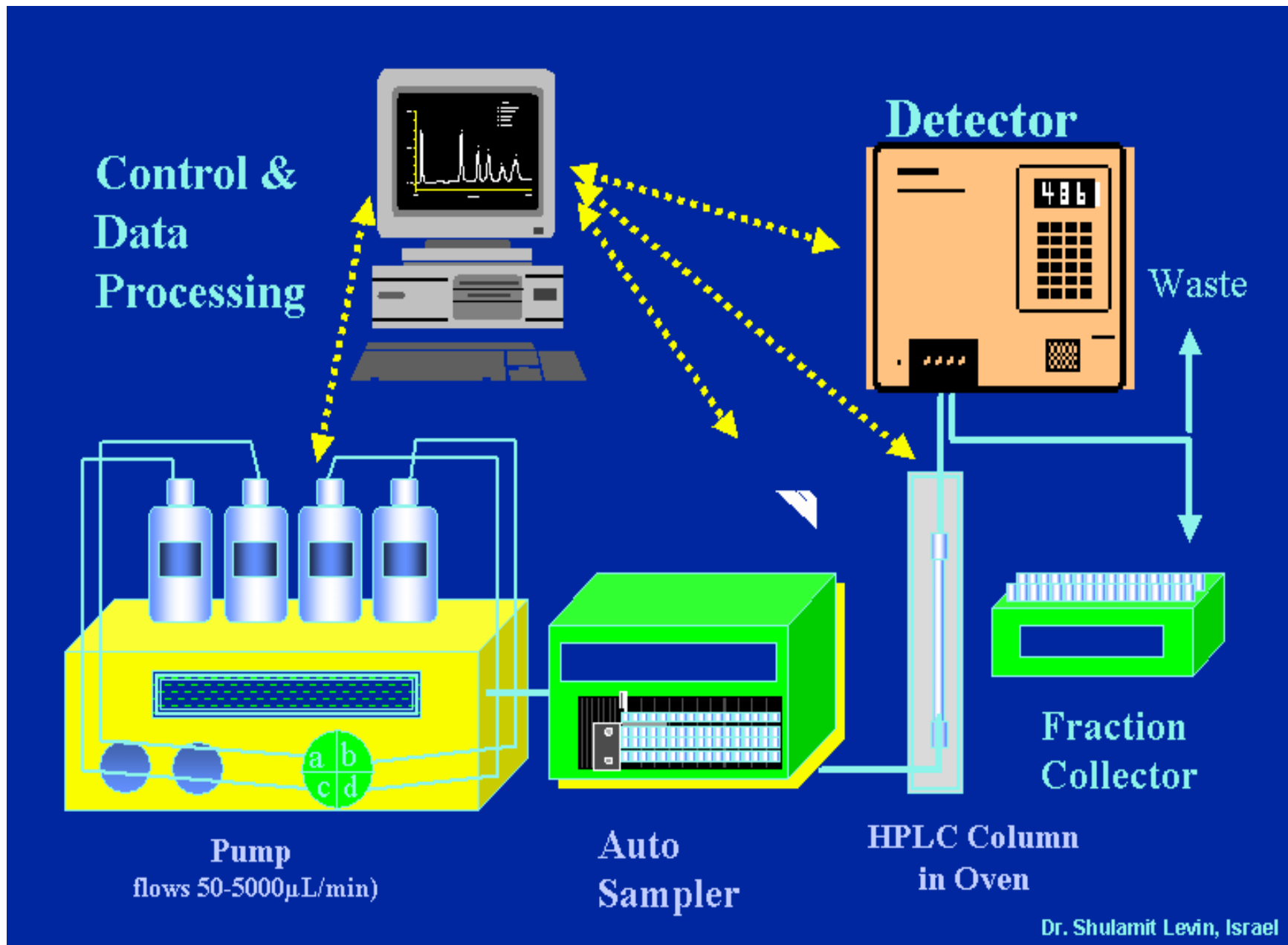
Bu gelişmelerin; adsorbsiyon, dağılım, iyon değişim, moleküler elek ve affinite kromatografi tekniklerine de yansımalarıyla hızlı ve daha iyi ayırım gücü sağlanmıştır.

HPLC'nin KISIMLARI

HPLC aletleri genelde;

- hareketli faz rezervuarı,
- pompa,
- enjektör,
- kolon,
- dedektör ve kaydedici (veya veri sistemi) içerirler.

Ayırma kolonda gerçekleşir. Durgun faz μm boyutlu poröz partiküllerden oluşur, bu nedenle hareketli fazın kolondan geçişi için yüksek basınç pompalarına ihtiyaç vardır.



Kromatografik proses kolona örneğin enjeksiyonu ile başlar.

Bileşenlerin ayrılması analit ve hareketli fazın kolona pompalanması ile devam eder.

Ayrılarak elue olan her bir komponentin pikleri kaydedilir.

Her bir komponent için alınan dedektör cevabı bir kaydedici veya bilgisayar ekranında kromatogram olarak görüntülenir.

1- Hareketli Faz Kapları ve Çözücü Muamele Sistemleri

Modern bir HPLC cihazında bir veya daha çok cam veya paslanmaz çelik kaplar bulunur. Bunların her biri 500 mL'den daha fazla çözücü alacak kapasiteye sahiptir.

Sistemde kullanılan hareketli fazın seçimi uygulanan ayırma tipine bağlıdır. Bu nedenle sulu tamponlardan hidrokarbonlara kadar farklı polaritede çözücüler kullanılır. HPLC sistemlerinde kullanılacak tüm çözümler çok saf olmalıdır. İz miktardaki safsızlıklar kolonu etkileyerek dedeksiyon sisteminde girişime neden olabilirler.

Tüm solventlerin gazının alınması (degassing) zorunludur, aksi takdirde çözümlerde hava kabarcıklarının bulunması pompa ve kolonda problemlere neden olmaktadır. (Örneğin; kolonda kabarcık oluşturarak pik genişlemesine yol açar.)

Gazın alınması farklı şekillerde gerçekleştirilebilir; solventlerin ısıtılması, karıştırarak vakuma maruz bırakma, ultra sonifikasyon veya çözümlenmiş rezervuarına helyum gazı verilmesi.

Sonuç olarak hareketli fazda bulunması gereken özellikler; saflık, dedektöre uyumluluk, örneğin çözünürlüğü, düşük viskozite, kimyasal inertlik ve uygun fiyat olarak sıralayabiliriz.

Hareketli faz , örnek ve sabit faz arasındaki etkileşimlerin ayarlanabilmesi için değiştirilmektedir.

Hareketli faz tipleri; **izokratik**, **gradiyent** ve **politipik** olmak üzere üç formda uygulanabilir.

İzokratik elüsyonda bileşenler sabit bileşimli tek bir çözücü ile elüe edilirler. Tüm bileşenler kolonda aynı anda, farklı hızlarda göç ederler.

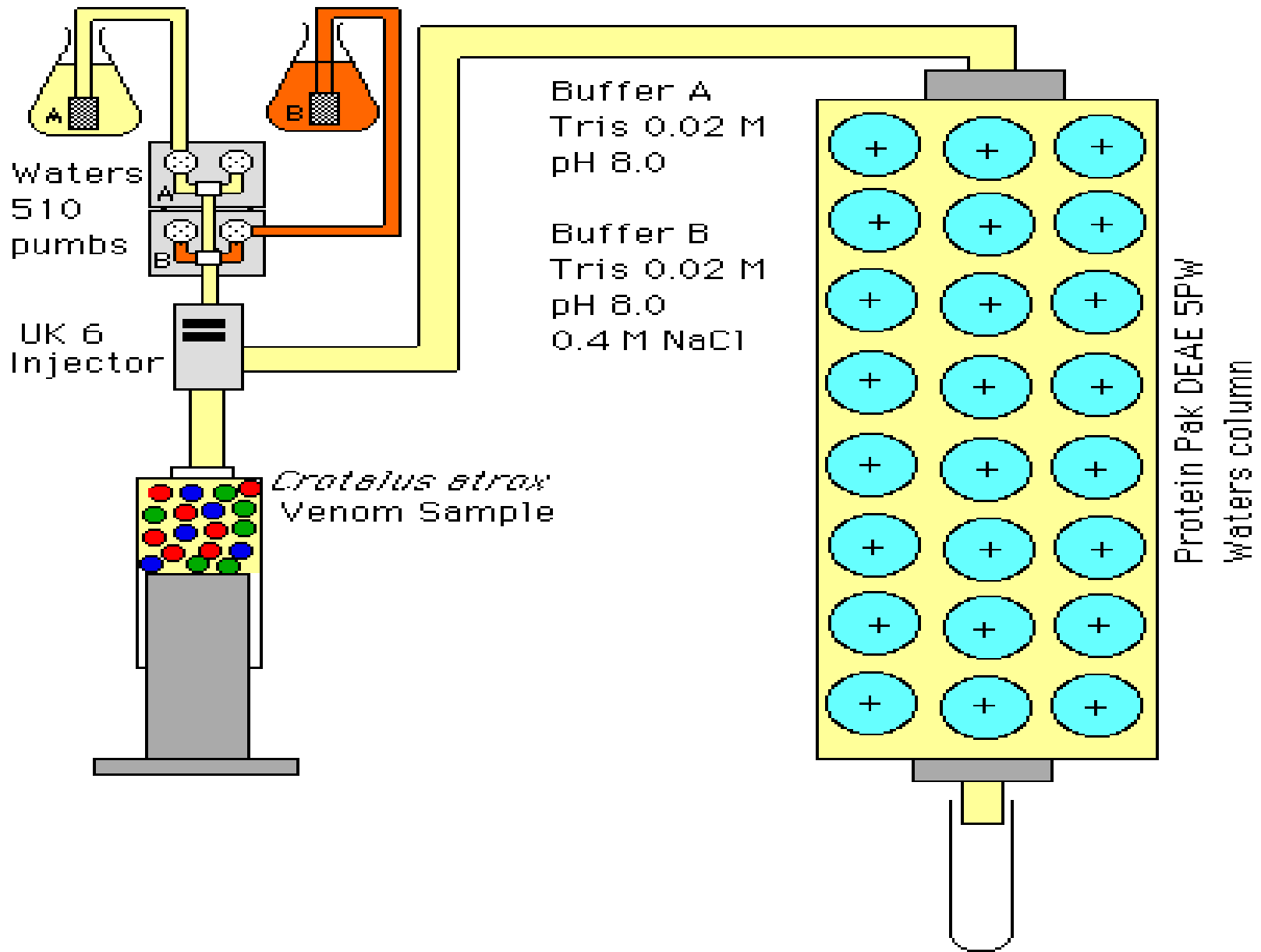
Gradiyenet elüsyon; polarlıkları birbirinden farklı iki (veya bazen daha fazla) çözücü sistemlerinin kullanıldığı tekniktir. Çözücü bileşimi sürekli veya basamaklı olarak değiştirilir.

Politipik hareketli faz, karışık tip kromatografilerde tercih edilebilir. Aynı kolonu kullanarak birçok kromatografik teknik için uygulanabilir.

Pompa sistemleri

HPLC pompası, sıvı kromatografi sisteminin en önemli kısımlarından bir tanesidir. Sistemde; elüent'in; enjektör, kolon ve dedektör boyunca sürekli sabit akışını sağlayan kısımdır.

HPLC analizlerinde kullanılan bir çok tip pompa mevcuttur. Bunlar; Emme Basma Piston Pompalar, Şırınga Tipi Pompalar ve Sabit Basınç Pompalarıdır.



Sıvı kromatografide kullanılan pompaların şu özellikleri bulunmalıdır:

- 5000 psi (1b/in²) ye kadar basınçlar oluşturabilmeli,
- Pulssuz sıvı çıkışı bulunmalı
- Akış hızı 0,1'den 10mL/dakika'ya kadar ayarlanabilmeli,
- Sıvı akış hızlarının tekrarlanabilirliği %0,5 veya daha iyi olmalı,
- Çok sayıda çözücünün korozyon etkisine karşı dayanıklı olmalıdır.

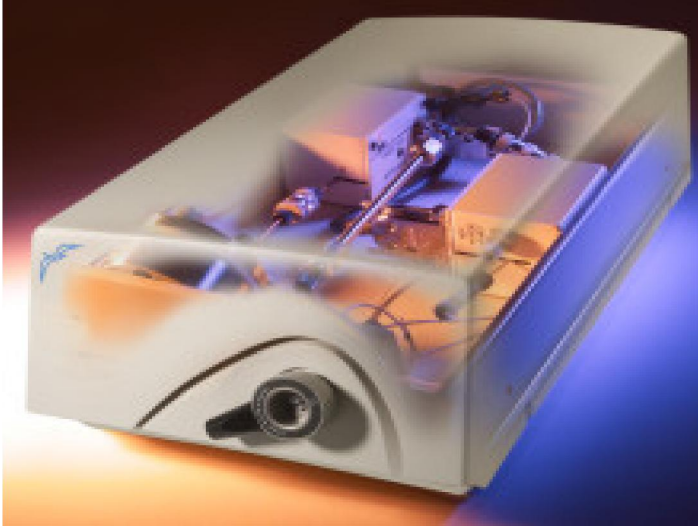
Numune Enjeksiyon Sistemi

Örnekler; HPLC'ye enjeksiyon ünitesinden enjekte edilir. Enjeksiyon ünitesi basit olarak bir enjeksiyon valfi ve örnek haznesinden oluşur.

Örnek Enjeksiyon öncesi hareketli fazda çözülerek bir şırınga ile valften enjekte edilir.



Kolon



HPLC'de kullanılan ayırma kolonları genellikle paslanmaz çelik olup yüksek basınçlara dayanıklıdır. Sıklıkla kullanılan kolonlar 4.5-5.0 mm iç çaplı ve 10-30 cm uzunluğundaki kolonlardır. Ancak araştırmanın ihtiyacına göre çok farklı boyutlarda kolonları ticari firmalardan temin etmek mümkündür.

Durgun Faz; Kolon Dolgu Materyali:

HPLC durgun fazı kolon içindeki katı destek maddesidir. Örnek solüsyonunun, kolona enjeksiyonu ile non-kovalent etkileşim olmaksızın durgun fazda bileşenlerin göçü söz konusudur.

Durgun faz ve örneğin hareketli faz ile kimyasal etkileşimleri, göç derecesi ve örnek bileşenlerin ayrılmasını belirler.

Uygulanacak kromatografi türünün prensibine göre kolon dolgu maddeleri farklıdır. (Kromatografi tipleri; sıvı-katı adsorpsiyon, normal faz, zıt- faz, iyon değişimi vb.)

Kolon dolgu materyalleri genellikle silika ve alümina esaslıdır; gözenekli (poröz), küresel (spherical), düzensiz (irregular), pelliküler (pellicular) ve mikro tiplerinde olmaktadır.

Dolgu maddesinin seçiminde tanecik biçimi, büyüklüğü, tanecik büyüklüğünün dağılımı, gözenek hacmi ve yüzey alanı gibi özellikler rol oynar. Yapılacak çalışmanın cinsine göre seçim yapılmalıdır.

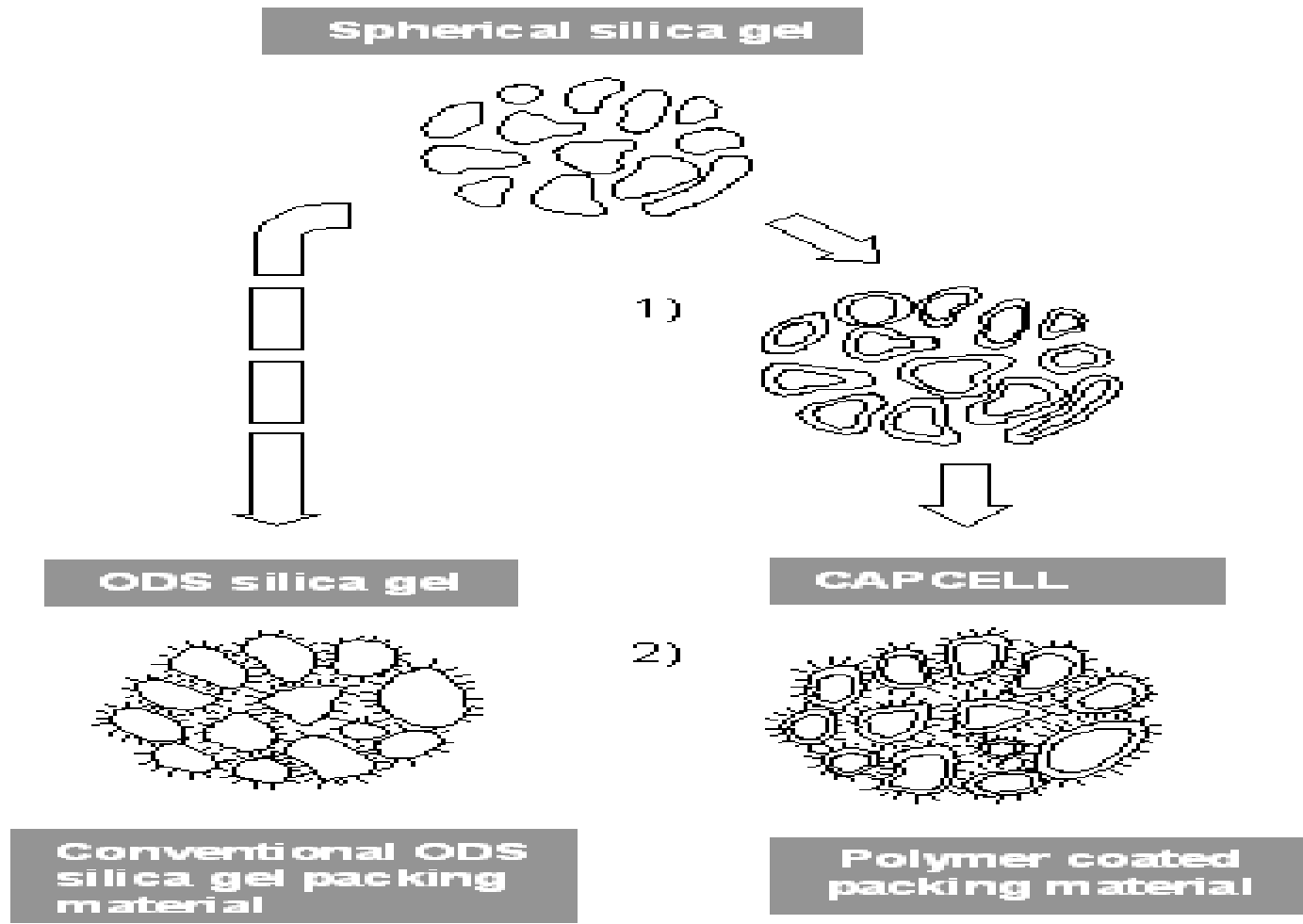


Fig. 1

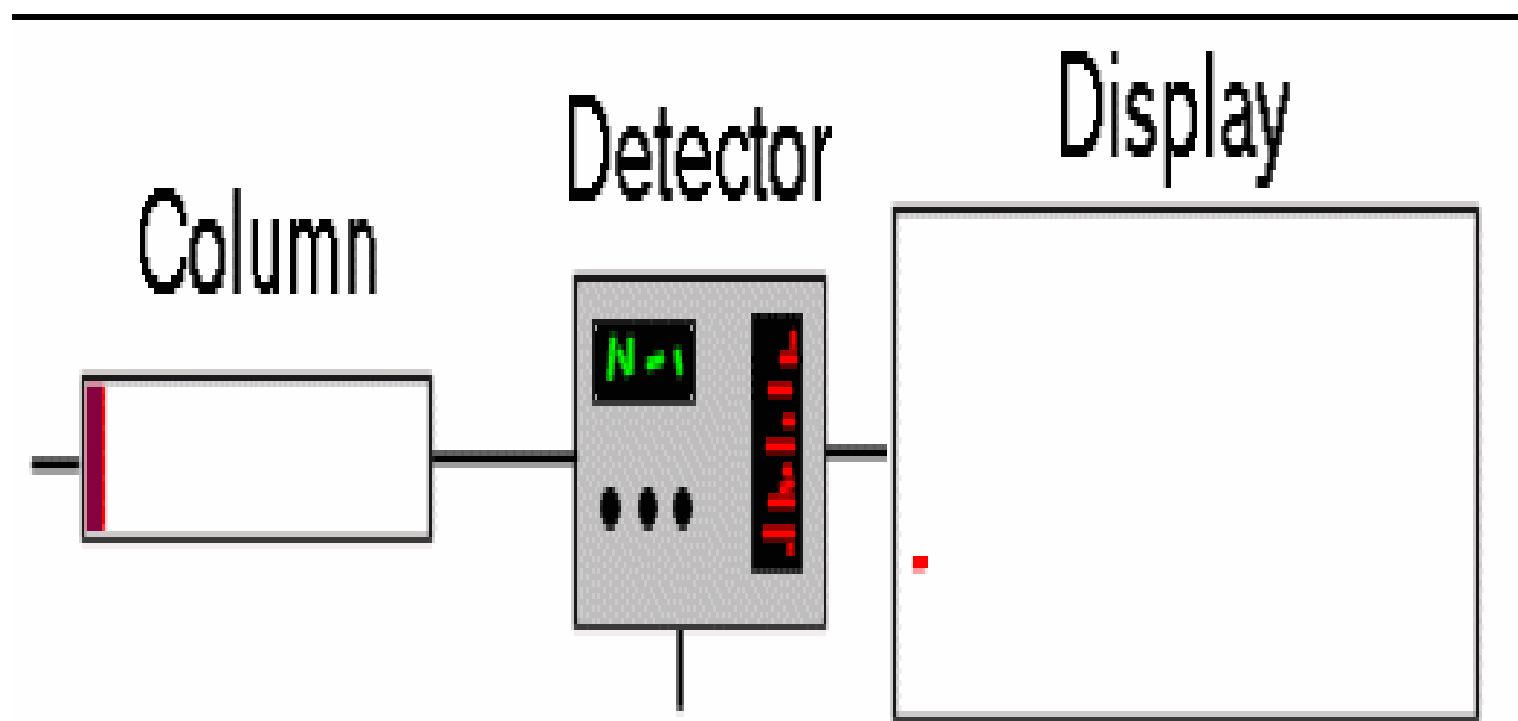
Kolonların doldurulması

HPLC kolonları; değişik dolgu materyali yapılarında ve boyutlarda ticari firmalardan temin edilebilirler. Ancak birçok araştırıcı ucuz olması nedeniyle kendi kolonlarını doldurmayı tercih eder. Kolon doldurulmasında kullanılacak metot, dolgu materyalinin tabiatına ve partikül büyüklüğüne bağlıdır.

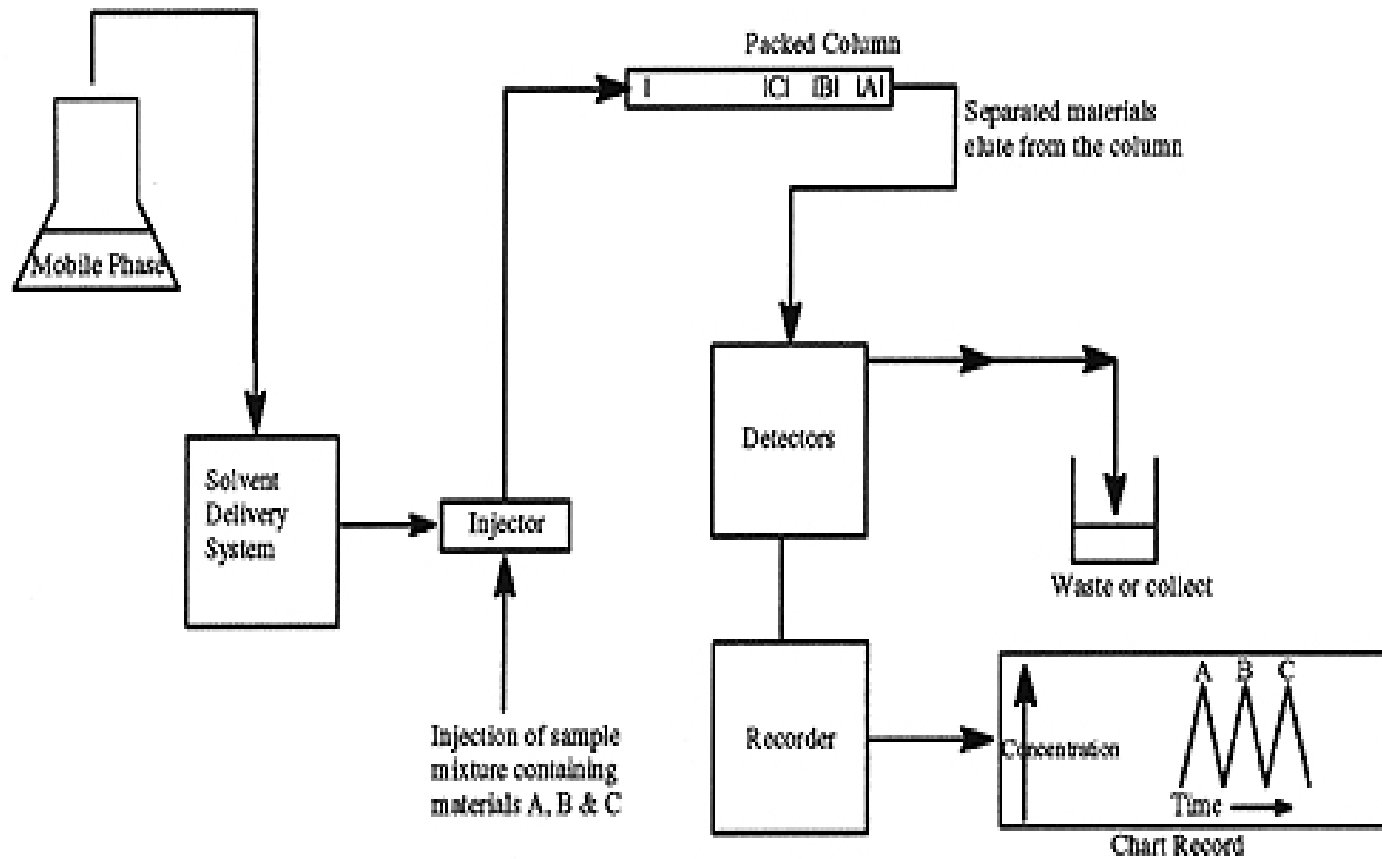
Dedektör

Dedektörler, kolondan elüe olan örnek bileşeninden alınan cevap doğrultusunda sinyallerin kromatogram üzerinde pik olarak ifade edilmesini sağlayan alettir. Dedektörler kolon sonrasına monte edilir.





Block diagram showing the components of an HPLC instrument



HPLC için ideal bir dedektör; geniş konsantrasyon aralığında; yüksek duyarlılığa, düşük gürültü seviyesine, bilinen seçiciliğe sahip olmalı ve kromatografik rezolüsyona kötü etki yapmaksızın kolon akıntısındaki bileşiklere duyarlı olmalıdır. Böyle bir dedektör sıcaklık ve basınçtaki değişmelere de duyarsız olmalıdır.

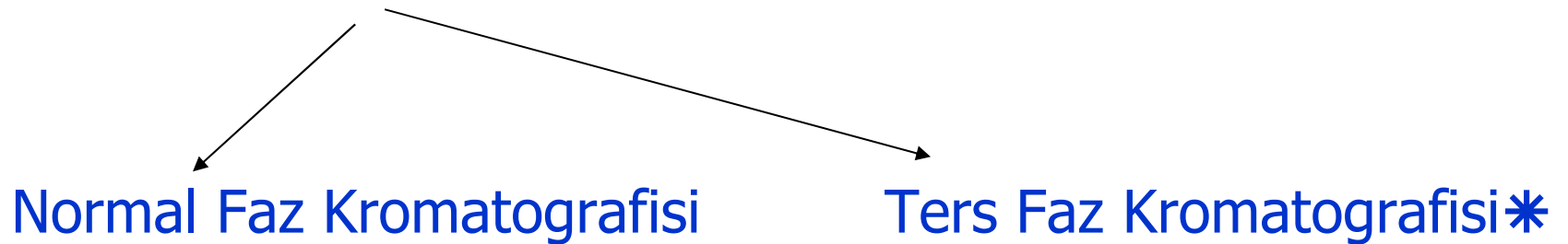
Kullanılacak dedektör sistemi, analizi yapılacak numunenin cinsine uygun olmalıdır.

Sıvı kromatografisinde en çok kullanılan dedektörler, ultraviyole veya görünür ışığın absorpsiyonuna dayanırlar.

HPLC ÇEŞİTLERİ

Sıvı kolon kromatografisinin sınıflandırılması durgun faz ve ayırma prosesinin tabiatı üzerine yapılıyorsa bu durumda dört sınıftan bahsedilebilir.

- 1) İyon değişim kromatografisi
- 2) Moleküler elek kromatografisi (Jel Filtrasyon)
- 3) Affinite kromatografisi
- 4) Adsorbsiyon kromatografisi



* RP-HPLC (Ters Faz Kromatografisi) :

Çok sayıda organik bileşiği ayırabilme yeteneğinden dolayı tercihen sıklıkla kullanılan HPLC türüdür. Durgun faz apolardır, hareketli faz ise polar bir sıvıdır. Apolar materyallerin kolonda tutulması söz konusudur.

HPLC UYGULAMALARI

- **Preparatif HPLC**, bileşiklerin izolasyonu ve saflaştırılması için kullanılır.
- **Kimyasal ayırmalar**, bir kolon ve hareketli fazda bileşiklerin farklı güç hızlarına göre ayrılması temeline dayanır.
- **Saflaştırma**; hedef bileşiğin diğer bileşikler veya kontaminantlardan ayrılması ve ekstraksiyonudur. Her bir bileşik belirli kromatografik koşullar altında karakteristik bir pike sahiptir. Ayrılması istenen bileşenin ihtiyaçlarına göre araştırmacının koşulları optimize etmesi gerekmektedir.

- **HPLC ile bileşiklerin identifikasyonu** yapılır.
- **Miktar tayini;** konsantrasyonu bilinmeyen bir örneğin solüsyonda tayin edilmesi; genelde örneğin standart çözeltisinin bilinen farklı miktarlarının kolona verilmesi ve elde edilen değerlerin korelasyonunun yapılması ile mümkün olabilmektedir. Genelde korelasyon pik alanları veya pik yüksekliklerinin kullanılması ile yapılır.

Yüksek Performanslı Dağılım Kromatografisinin Tipik Uygulamaları

Uygulama Alanı	Karışımlar
İlaçlar	Antibiyotikler, sedafitler, steroidler, analjezikler
Biyokimyasallar	Amino asitler, proteinler, k.hidratlar, lipitler
Gıda maddeleri	Suni tatlandırıcılar, antioksidanlar,alfatoksinler
Endüstriyel kimyasallar	Çok halkalı aromatikler, boyalar, yüzey aktif mad.
Kirleticiler	Pestisitler, herbisitler, fenoller, PCB'ler
Uyuşturucular	Uyuşturucu ilaçlar, zehirler, narkotikler
Klinik Tıp	Safra asitleri, ilaç metabolitleri, üre ekstraktları