

ALETLİ ANALİZ YÖNTEMLERİ

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Yrd. Doç. Dr. Gökçe MEREY

SIVI KROMATOGRAFİSİ

- Hareketli fazın sıvı olduğu bu kromatografi türünde sabit faz bir dolgu maddesi üzerine tutturulmuş sıvı film ise bu kromatografi türüne sıvı-sıvı kromatografisi denir.
- Hareketli ve sabit fazdaki sıvıların polarlıkları farklı olmalıdır. Genellikle hareketli faz olarak hegzan gibi apolar bir sıvı, dolgu maddesi olarak etilen glikol gibi polar bir sıvı kullanılır.
- Bunun tersi özellikte sıvılar kullanılırsa buna ters faz sıvı-sıvı kromatografisi denir.
- Sabit faz sıvı kaplanmamış katı dolgu maddesi ise sıvı-katı kromatografisi elde edilebilir. Bileşenler katı yüzeyinde farklı adsorpsiyon ilgilerinden dolayı tutulurlar.

HPLC

En yaygın olarak kullanılan analitik tekniklerden bir tanesidir. Bir karışımdaki bileşenlerin ayrılmasında sıvı hareketli faz kullanır. Bu bileşenler ilk olarak çözücüde çözülürler ve daha sonra yüksek basınç altında kromatografi kolonundan geçmeye zorlanırlar.

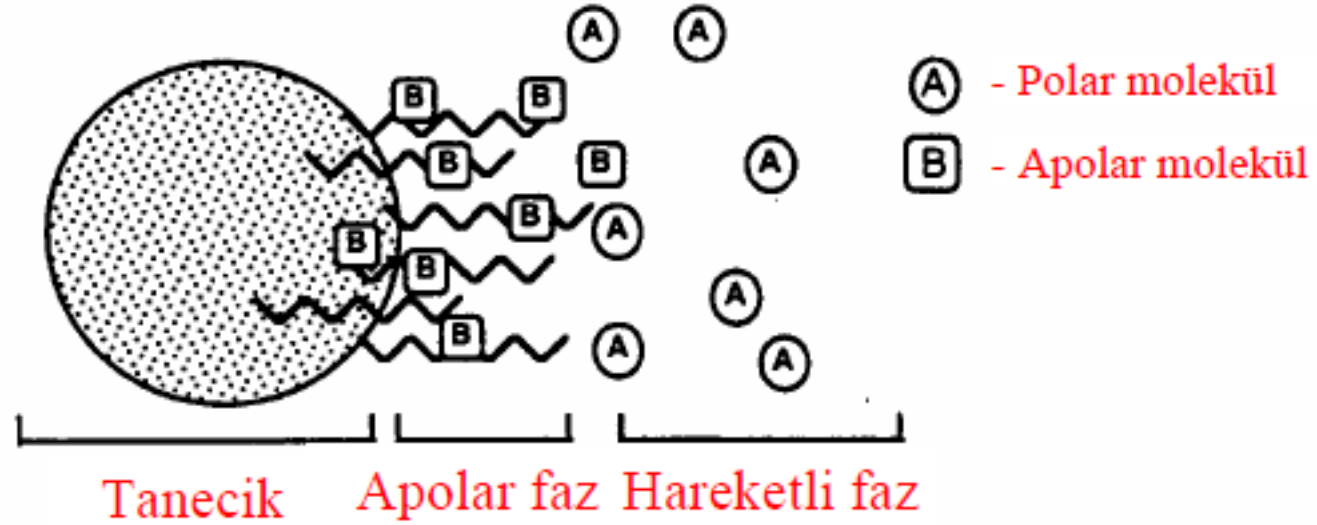
- ***Normal Faz Sıvı Kromatografisi:***

Polar sabit faz ve apolar veya düşük polariteye sahip hareketli faz

- ***Ters Faz Sıvı Kromatografisi:***

Sabit faz apolar, hareketli faz ise polardır

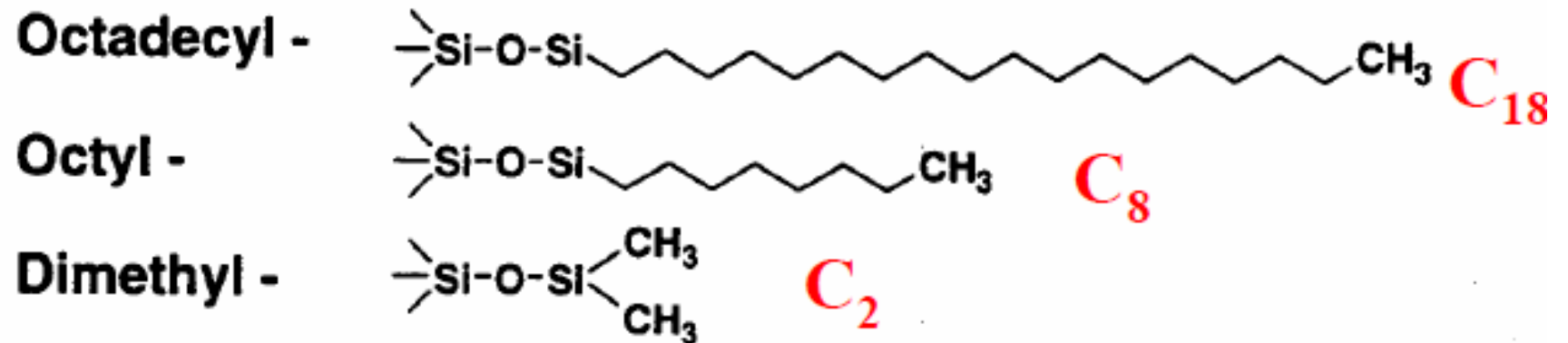
HPLC'DE FAZ SEÇİMİ



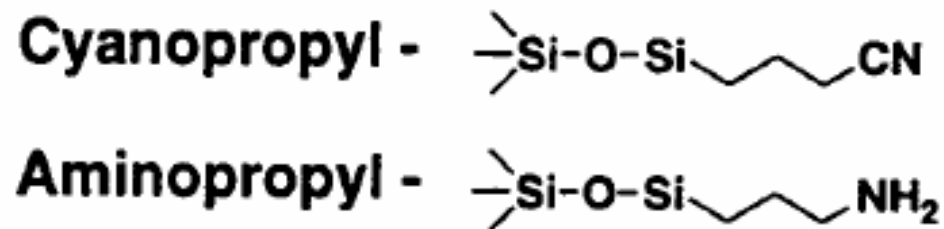
Kolon	Normal Faz	Ters Faz
Sabit Faz Polaritesi	Yüksekten ortaya	Ortadan düşüğe
Çözücü Polaritesi	Ortadan düşüğe	Yüksekten ortaya
Örnek Çıkış Yeri	Önce apolar	Önce polar

SABİT FAZ ÇEŞİTLERİ

Ters faz



Normal faz



TERS FAZ HPLC'NİN AVANTAJLARI

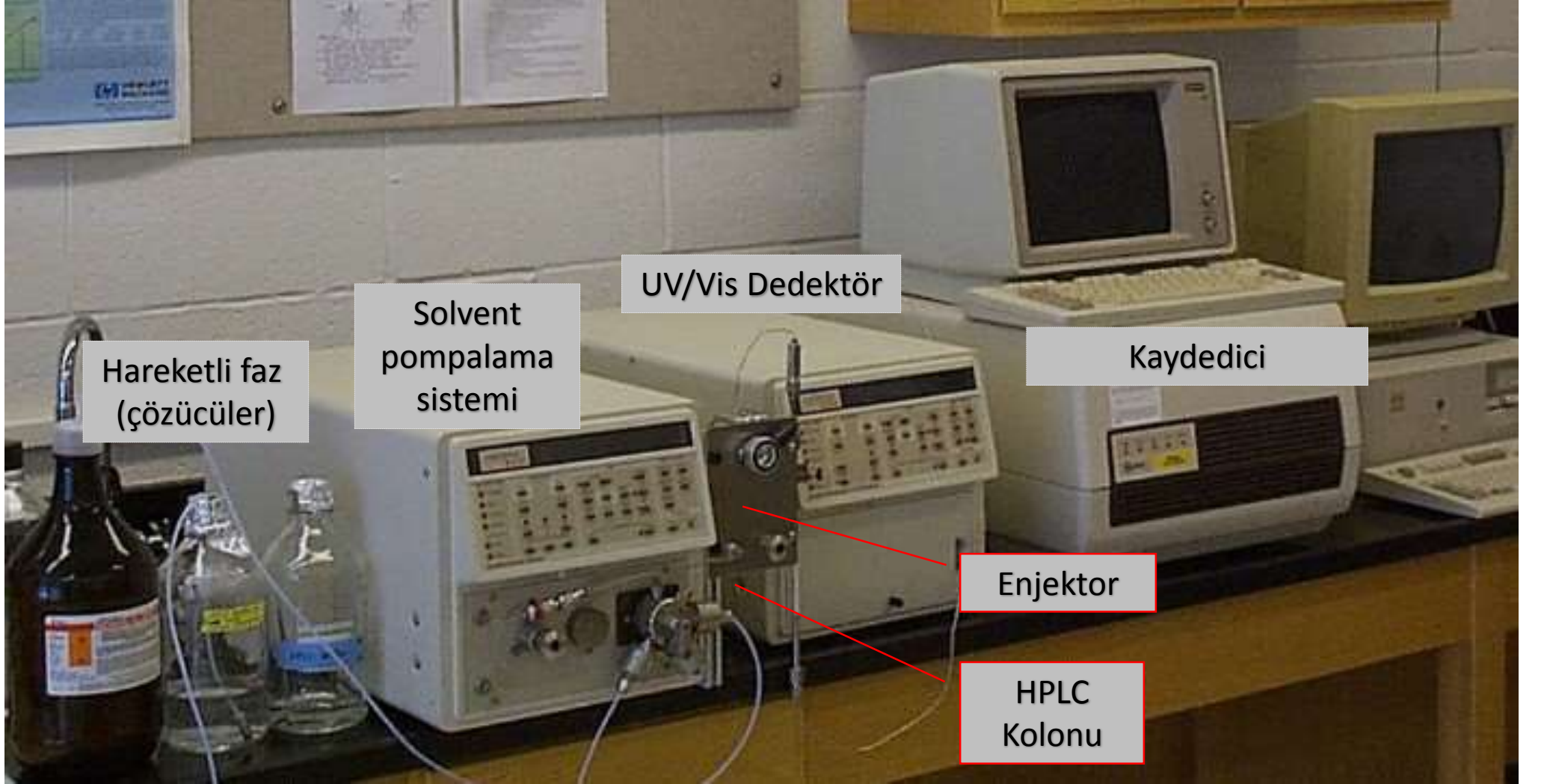
1. Normal faz kromatografide, sıvı fazın kontrolü çok önemli ve kritiktir. Hareketli faz bileşimindeki küçük değişiklikler kromatogramda belirgin farklılıklara neden olabilir.
2. Dengeye ulaşma normal faz kromatografide çok yavaştır.
3. Normal faz kromatografide polar maddelerin elüsyonu çok yavaştır ve yayvan piklere sebep olur.
4. Apolar çözücüler çok pahalıdır, ayrıca nemden uzak tutmak

PERFORMANS

- Sabit faz olarak kullanılan dolgu maddelerinin tanecik boyutunun küçültülmesi sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun etkinliği arttırılmış olur. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için basınç uygulanması gerekir.
- Cihazın performansında yalnız basınç değil bir çok faktör etkilidir:
 - Dar bir dağılım aralığında çok küçük partiküllerin kullanılması,
 - Uniform gözenek boyutu ve dağılımı,
 - Doğru, düşük hacimli örnek enjektörleri,
 - Duyarlı dedöktörler,
 - İyi pompalama sistemi kullanımı,

Bu nedenlerden dolayı **Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi** ismi kullanılmaktadır.

ENSTRÜMAN



HPLC'NİN KISIMLARI

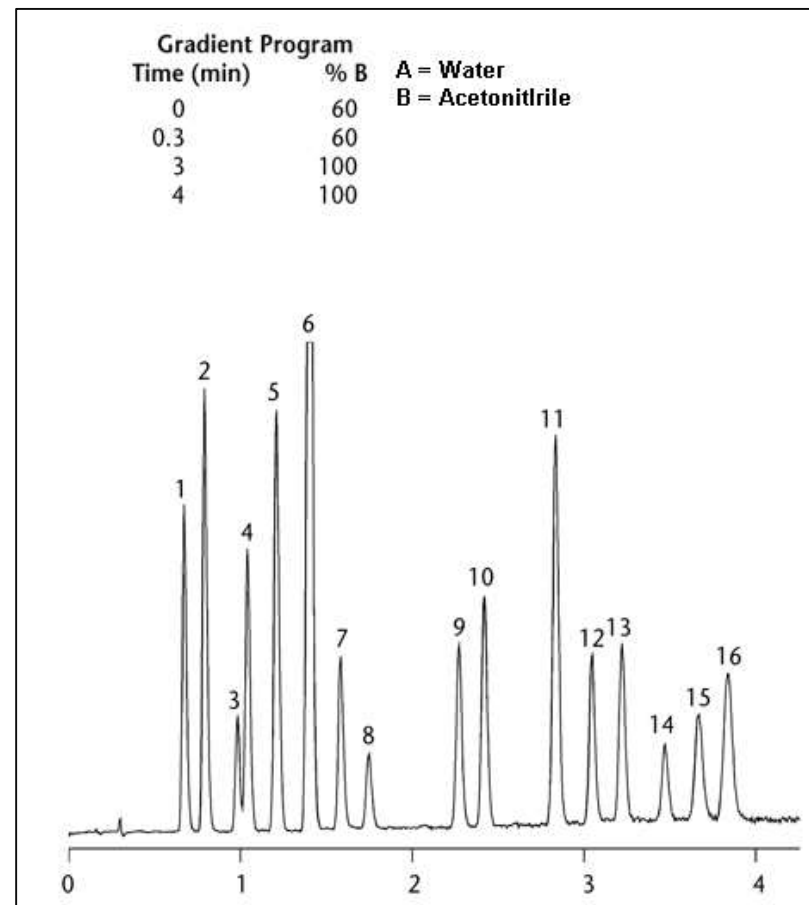
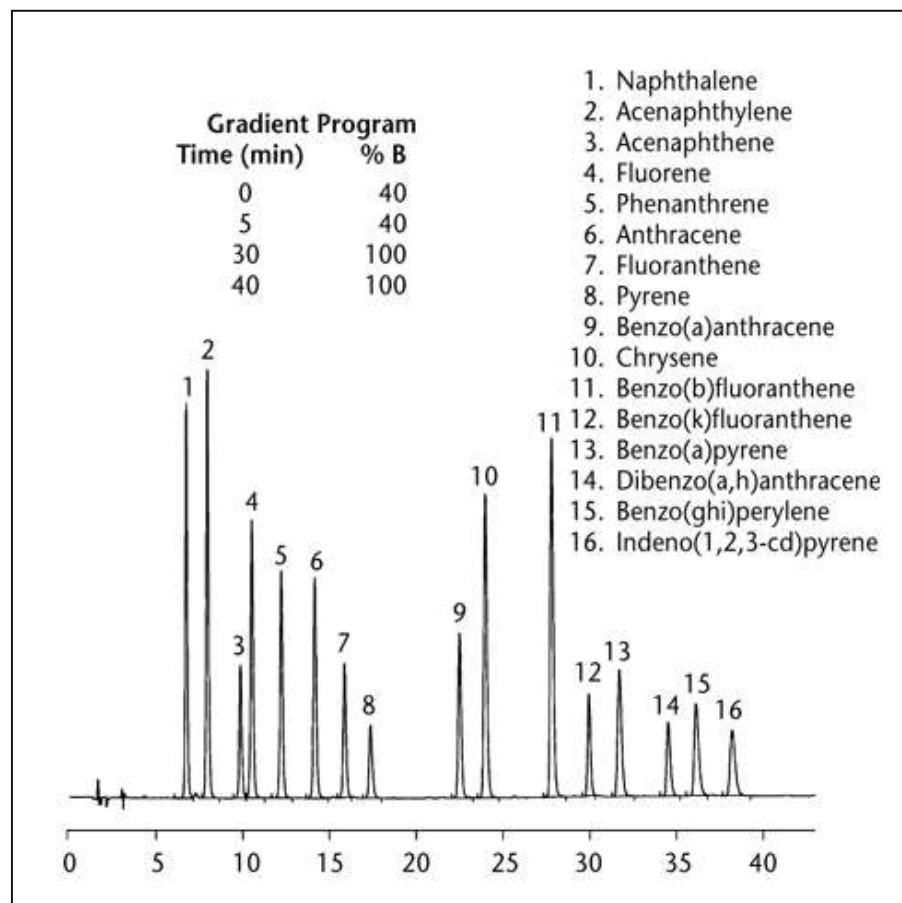
- Hareketli faz rezervuarı,
- Pompa,
- Enjektör,
- Kolon,
- Dedektör
- Kaydedici (veya veri sistemi)

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

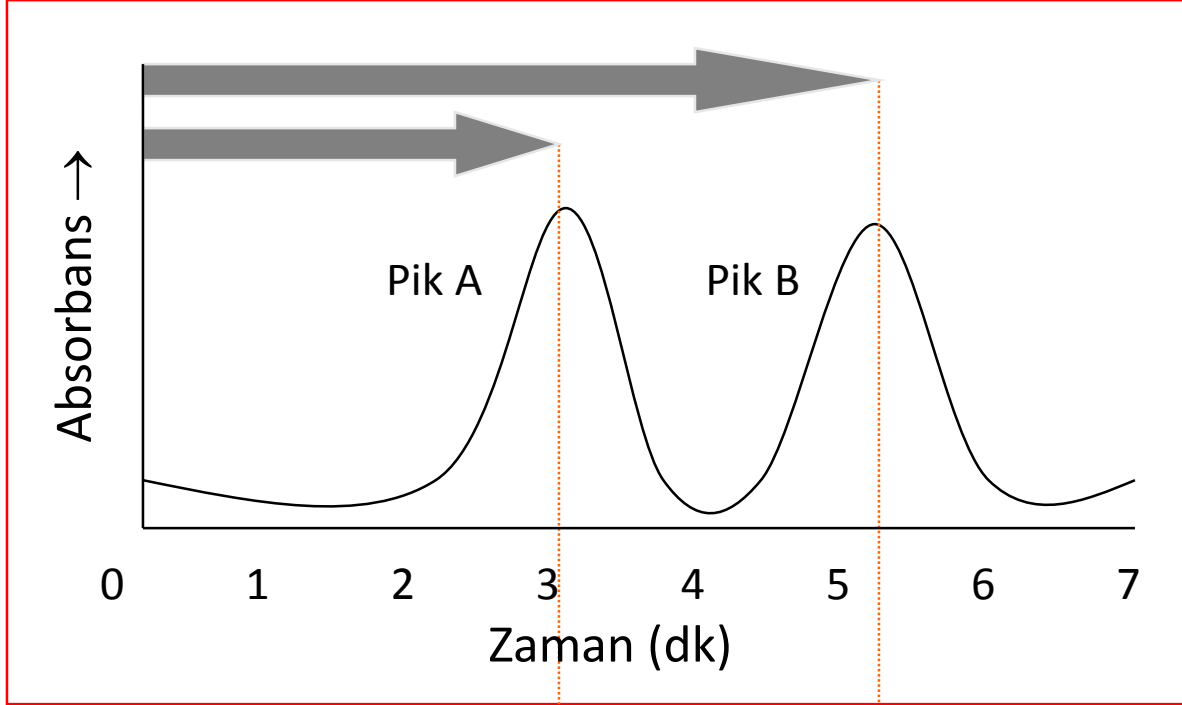
PROSES

- Kromatografik proses kolona örneğin enjeksiyonu ile başlar.
- Bileşenlerin ayrılması analit ve hareketli fazın kolona pompalanması ile devam eder.
- Ayrılarak sürüklenen olan her bir bileşenin pikleri kaydedilir.
- Her bir bileşen için alınan dedektör cevabı bir kaydedici veya bilgisayar ekranında kromatogram olarak görüntülenir.

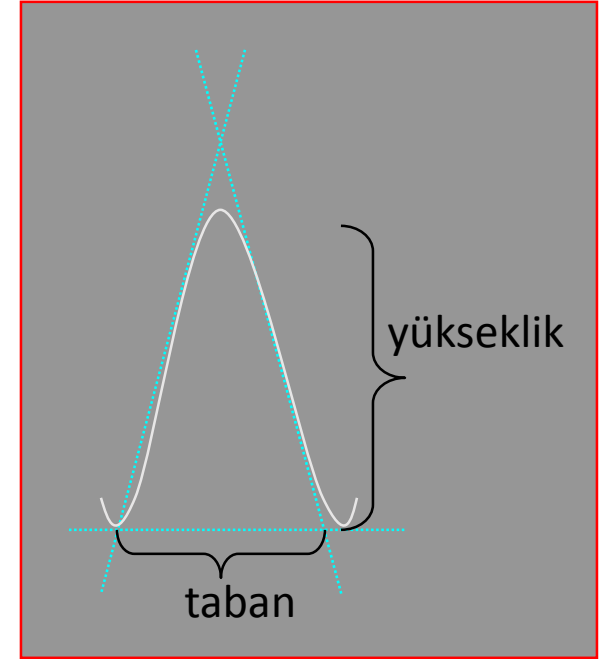
VERİ ANALİZİ



VERİ ANALİZİ



$R_t = 3.0$ min. $R_t = 5.2$ min.
önce çıkan, yavaş çıkan,
daha az tutulan daha çok tutulan



$$\text{Alan} = \frac{\text{taban} \times \text{yükseklik}}{2}$$

HPLC'DE ÇÖZÜCÜLER

- Modern bir HPLC cihazı en az 500 mL çözücü alacak kapasiteye sahiptir.
- ÇÖZÜCÜLER YÜKSEK SAFLIKTA OLMALIDIR.
- Sulu tamponlardan hidrokarbonlara kadar farklı polaritelerde çözücüler ya da çözücü karışımları kullanılabilir.
- Kullanılmadan önce tüm çözücülerin gazı alınmalıdır. Aksi takdirde pompa ve kolonda problemler oluşabilir. Pikler geniş çıkar.
- Gazın alınması için çözücünün ısıtılması, karıştırılarak vakuma altında tutulması, ultra sonifikasyon veya çözücü rezervuarına helyum gazı verilmesi gerekir.

HAREKETLİ FAZIN UYGULANMASI

Hareketli faz, örnek ve sabit faz arasındaki etkileşimlerin ayarlanabilmesi için farklı şekillerde uygulanabilir.

- **İzokratik Uygulama:** Bileşenler sabit bileşimli tek bir çözücü ile sürüklenir. Tüm bileşenler kolonda aynı anda, farklı hızlarda göç ederler.
- **Gradient Uygulama:** Polarlıkları birbirinden farklı iki (veya bazen daha fazla) çözücü sistemlerinin kullanıldığı tekniktir. Çözücü bileşimi sürekli veya basamaklı olarak değiştirilir.
- **Politipik Uygulama:** Karışık tip kromatografilerde tercih edilir. Çözücü sistemlerinin analiz sırasında değiştirildiği uygulama biçimidir.

POMPA SİSTEMLERİ

- HPLC pompası, sıvı kromatografi sisteminin en önemli kısımlarından bir tanesidir. Sistemde; çözücünün enjektör, kolon ve dedektör boyunca sürekli sabit akışını sağlar.
- HPLC analizlerinde kullanılan pompalar; emme basma piston pompalar, şırınga tipi pompalar ve sabit basınç pompalarıdır.
- Özellikleri:
 - 5000 psi (345 bar)'a 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.

KOLONLAR



- 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.
- Kolon dolgu materyalleri genellikle silika ve alümina esaslıdır; gözenekli (poröz), küresel, düzensiz, peliküler (film şeklinde) 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.

DEDEKTÖRLER

- 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.
- En çok kullanılan dedektörler, ultraviyole veya görünür ışığın absorpsiyonuna dayanırlar. Ayrıca kütle dedektörleri de kullanılır.

HPLC'NİN AVANTAJLARI

- Küçük boyutlu paslanmaz çelik kolonların kullanılması,
- Partikül boyutları çok küçük (3,5-10 μm) sabit faz 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

HPLC'NİN UYGULAMALARI

- Miktar tayini, bileşiklerin tanınması ve saflaştırma (Preparatif HPLC)

UYGULAMA ALANI	KARIŞIMLAR
İlaçlar	Antibiyotikler, sedafitler, steroidler, analjezikler
Biyokimyasallar	Antibiyotikler, sedafitler, steroidler, analjezikler
Gıda Maddeleri	Suni tatlandırıcılar, antioksidanlar, alfatoksinler
Endüstriyel Kimyasallar	Çok halkalı aromatikler, boyalar, yüzey aktif maddeler
Kirleticiler	Pestisitler, herbisitler, fenoller
Uyuşturucular	Uyuşturucu ilaçlar, zehirler, narkotikler
Klinik Tıp	Safra asitleri, ilaç metabolitleri, üre ekstraktları