

HPLC

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC) bir sıvıda çözülmüş bileşenlerin, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile değişik etkileşimlere girmesi, kolon içinde değişik hızlarla hareket etmeleri sonucu, farklı zamanlarda bileşenlerin kolonu terk ederek birbirlerinden ayrılması temeline dayanır. HPLC, genellikle ayırma mekanizmasına veya durgun fazın tipine göre sınıflandırılır. Bunlar arasında dağılma ya da sıvı-sıvı kromatografisi, adsorpsiyon yada katı-sıvı kromatografisi, iyon-değişimi kromatografisi, boyut ayırıcı kromatografisi, afinite kromatografisi ve kiral kromatografisi sayabiliriz.

HPLC günümüzde bir çok alanda vazgeçilmez bir araç olarak kabul edilmekte ve *çeşitli organik, inorganik ve biyolojik numunelerdeki türleri ayırmak ve tayin etmek için kullanılmaktadır.*

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi'nin başlıca kullanıldığı alanlar;

1. –İlaçlar(Antibiyotikler, sedatifler, steroidler, analjezikler),
2. –Biyokimyasallar(Amino asitler, proteinler, karbonhidratlar, lipidler),
3. –Gıda maddeleri(Suni tatlandırıcılar, antioksidanlar, aflatoksinler, katkı maddeleri),
4. –Endüstriyel kimyasallar(Çok halkalı aromatikler, yüzey aktif maddeleri, iticiler, boyalar),
5. –Kirleticiler(Pestisitler, herbisitler, fenoller, PCB'ler),
6. –Klinik tıp(Safra asitleri, ilaç metabolitleri, üre özütleri, östrojenler),
7. –Uyuşturucular(Uyuşturucu ilaçlar, zehirler, kan alkolü, narkotikler)'dir.

HPLC analitik ayırma teknikleri amacı ile en yaygın kullanılan cihazdır. Yaygın kullanılma sebepleri duyarlılığı, kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen bileşiklerin ayrılmasına uygunluğudur. En önemlisi ise sanayinin birçok bilim dalının ve toplumun birinci derecede ilgilendiği maddelere geniş bir şekilde uygulanabilirliğidir. Bu tip bileşiklere örnek olarak amino asitler, proteinler, nükleik asitler, karbonhidratlar, ilaçlar ve pestisitler verilebilir. HPLC ünitesi: Degasser, pompa, autosampler, kolon ve dedektör olmak üzere dört kısımdan oluşmaktadır. Degasser; mobil fazlarda mevcut çözülmüş gazların giderilmesini sağlar.

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi kısaca HPLC olarak adlandırılır.

Yüksek performans; yüksek resolüsyonu (ayırımı) ifade eder. Mobil fazın yüksek basınçla ilerlemesi sağlandığı için de Yüksek basınçlı Sıvı Kromatografi olarak da adlandırılır.

Mobil Faz :

Analiti taşıyan (Analiz ettiğimiz maddeler) hareketli fazdır, Mobil faz genellikle su ve sulu tampon çözeltiler, bunların metanol ve/veya asetonitril ile oluşturulan çözeltileri veya organik solvanlardan oluşur. Mobil fazın bileşimi ve pH değeri ayırımı direk etkiler, kullanılan tekniğe, numune tipi ve kolona göre mobil faz seçilmelidir.

Degazör :

Mobil faz şişesinden taşınan hareketli fazdaki hava kabarcıklarının ve çözünmüş havanın giderilmesini sağlar, kullanılan mobil faz adedi ve pompa tiplerine göre uygun degazörler bulunmaktadır.

Pompa :

Temel olarak pompa mobil fazın yüksek basınçla HPLC sistemi içinde hareket etmesini sağlar, degazörden mobil fazı çekip, örnekleme ve kolon ünitesine gönderir, bu işlemi akış hızını ve basınç değerini ayarlayarak gerçekleştirir. Akış hızı aralıklarına göre pompalar Analitik, Analitik-Preparatif ve Preparatif olarak gruplandırılabilir. Analitik pompalar genellikle 0.1 – 5ml akış değerleri arasında kullanılır. Mobil faz adedi ve karıştırma kabiliyetlerine göre İzokratik (Tek Kanallı) , Binary Gradient (Çift Kanallı Mikserli) ve Quaternary Gradient (Dört Kanallı Mikserli-Miksersiz) olarak dizayn edilir. Bazı üreticiler (Örnek : LabAlliance) isteğe bağlı olarak Sekiz kanala kadar kullanıcıya özel dizayn yapabilmektedir. İzokratik çalışmalarda mobil faz önceden karıştırılıp hazırlanır, Gradient çalışmalarda karışım değişik zamanlarda değişik oranlarda yapılabilir. Bu sayede analiz kalitesi artırılıp, analiz süreleri azaltılabilir. Pompa ünitesi genellikle iki pistonlu başlık, basınç dengeleyici (damper), işlemci, inlet ve outlet check valflerden oluşur. Günümüzde Nano ve Ultra Basınçlı pompaların kullanılmaya başlamasıyla, HPLC sistemleri UHPLC ve nHPLC gibi isimlendirilmektedir. Uzun süreli kullanım ve tekrarlanabilir sonuçlar için pompa temizliği ve bakımına dikkat edilmelidir.

Örnekleyci :

Örnekleyici Analitlerin (Numunelerin) kolon ve detektöre gönderilmesini sağlar. Örnekleyici temel olarak iki tiptedir; Manuel (El tipi) ve Otoörnekleyici (Otomatik) modeller. Manuel örnekleyicilerde numune bir şırıngaya çekilip valf yardımıyla sisteme gönderilir. Otoörnekleyicilerde ise bu işlemleri cihaz kendisi yapabilmektedir. Bazı ünitelerde soğutma, ısıtma, seyreltme ve karıştırma özellikleri vardır. 10 vialden 1000 vial kadar değişik kapasitede olanları bulunabilir. Otoörnekleyiciye numune verirken en önemli konu numunenin temiz olmasıdır, aksi halde sistme çabuk kirlenir veya tıkanır. Numuneleri cihaza göndermeden önce muhakkak şırınga filtresinden veya kartuştan geçirmek gerekir, numunenin mümkün olduğunca berrak ve renksiz olmasını tercih ederiz. Şırınga filtresi, kartuş ve numune vialleri seçimi ve kullanım alanları için www.labhut.com sitesinden daha fazla bilgi alabilirsiniz.

Kolon- Kolon Fırını :

Kolon (Sabit Faz) maddelerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden yararlanarak birbirlerinden ayırt edilmesini sağlar. Genellikle Çelik, PEEK ve Camdan imal edilir, içi belli ölçülerde sabit fazla doldurulur (Silika veya polimer gibi). Kolon Fırını kolonu saklamak ve sabit sıcaklıkta tutmak için kullanılır. Blok ısıtıcı, Fanlı ve Peltier kolon fırınları mevcuttur. Peltier sistemler çok çabuk ısıtılıp soğutulabildiği ve daha stabil sıcaklık sağladığı için tercih edilir. Kaçak sensörlü ve multi kolon teknolojili olanları da mevcuttur.

Kolonlar genellikle fonksiyonel grup eklenmiş silika veya polimer bazlı dolguludur. HPLC nin hayata geçmesiyle kullanılmaya başlanan silika bazlı kolonlar artık yerini yavaş yavaş hızlı analiz yapabilen mikro ve nano gözenekli polimer bazlı kolonlara bırakmaya başlamıştır. Polimer kolonlar silika bazlı olanlara göre ortalama 3 kat daha uzun ömürlüdür ve rejenere edilebilir. Kullanılan mobil faz, sabit faz (kolon) ve moleküler etkileşim türlerine göre HPLC teknikleri aşağıdaki temel gruplarda toplanabilirler;

Normal faz kromatografi:

Sabit faz polar (Silikajel-Polimer ve üzerine bağlanmış –CN, -NO₂ veya NH₂ dolgu maddeleri)

Mobilfaz non-polar yada düşük polariteye sahip(Etiler, Kloroform, Hekzan vb. çözücüler ve karışımları)

Düşük polariteye sahip analit kolondan ilk çıkar. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği yüksek olduğu için düşük polariteye sahip analit mobil fazda çok iyi çözünür ve kolondan ilk önce çıkar. Ayrıca yine aynı özellik sebebiyle apolar analit polar sabit fazla az etkileştiğinden dolayı kolonda kısa süre tutunabilir.

Alıkonma zamanını kısaltmak için mobil fazın polaritesi azaltılır. Alıkonma zamanını arttırmak için mobil fazın polaritesi artırılır.

Ters faz kromatografi:

- Sabit faz apolar (Silikajel-Polimer ve üzerine bağlanmış C18, oktil veya fenil grupları, metil, etil ve -NH₂ gruplu dolgu maddeleri)
- Mobilfaz polar (Metanol, Asetonitril, Tetrahidrofuran gibi güçlü organik çözücülerin zayıf çözücü olan sulu veya tamponlanmış, pH ayarı yapılmış karışımları)
- Yüksek polariteye sahip analit kolondan ilk çıkar. Benzer özelliklere sahip maddelerin birbiri içinde dağılma özelliği olduğu için yüksek polariteye sahip analit mobilfazda çok iyi çözünür ve kolondan ilk önce çıkar. Ayrıca yine aynı özellik sebebiyle polar analit apolar sabit fazla az etkileştiğinden dolayı kolonda kısa süre tutunabilir.
- Alıkonma zamanını kısaltmak için mobil fazın polaritesi azaltılır. Alıkonma zamanını arttırmak için mobil fazın polaritesi artırılır.

Normal Faz Kromatografide düşük polariteye sahip mobil fazda alıkonma zamanları uzun, polaritesi arttırılmış mobil fazda alıkonma zamanları kısadır.

Ters Faz Kromatografide yüksek polariteye sahip mobil fazda alıkonma zamanları uzun, polaritesi azaltılmış mobil fazda alıkonma zamanları kısadır.

İyon Değiştirme:

- İyonik bileşikleri ayırmak için kullanılan bir tekniktir. Ayrıca suda çözünen organik maddelerin analizinde de kullanışlıdır.
- Katyonlar için negatif yüklü fonksiyonel gruplu dolgu maddeli kolonlar, Anyonlar için pozitif yüklü fonksiyonel gruplu dolgu maddeli kolonlar kullanılır.
- İyonun molekül ağırlığı arttıkça kolonda tutunma gücü de artar.

Size Exclusion (Eleme):

- Moleköl ağırlıkları farkı çok büyük olan analitlerin bir arada analiz leneceği karışımlar için kullanılan bir tekniktir.
- Bu teknikte analitler ve kolon dolgu maddesinde kimyasal değil fiziksel bir etkileşim vardır. Büyük moleköl ağırlığı olan analit kolon dolgu maddesindeki porlara sığmadığı için kolonu önce terk eder.
- Genellikle polimer, şeker ve protein analizlerinde kullanılır.
- Eleme tekniğinde kullanılan mobilfaz organik çözücü ise GPC (Gel Permeation Chromatography) , sulu çözelti ise GFC (Gel Filtration Chromatography) adını alır.

Chiral Ayırma:

Fiziksel özellikleri aynı olan izomerlerin sabit fazla etkileşime girip izomer çifti olan diastereomere dönüştürülerek özel chiral kolonlar kullanılarak yapılan bir tekniktir.