

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

HPLC, bir sıvıda çözülmüş bileşenlerin, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile değişik etkileşimlere girerek kolon içinde değişik hızlarla hareket etmeleri sonucu, farklı zamanlarda bileşenlerin kolonu terk ederek birbirlerinden ayrılması temeline dayanır. Yüksek performans; yüksek çözünürlüğü (ayrımı) ifade eder. Bileşenler çözücüde çözüldükten sonra yüksek basınç altında analitik kolondan geçmeye zorlanırlar. Mobil fazın yüksek bir basınç uygulanması ile ilerlemesi sağlandığı için de Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi olarak da adlandırılır.

Karışımdaki her maddenin hareket hızı, maddenin hareketli veya mobil faza olan ilgisine göre belirlenir. Hareketli faza daha çok ilgisi olan maddeler daha hızlı hareket ederler. Kolondan çıkan her maddenin konsantrasyon profili, pik olarak adlandırılır. Piklerin oluşturduğu çıktıya da kromatogram adı verilir.

HPLC sistemi genel olarak 6 kısımdan oluşur:

1-Mobil Faz: kromatografik ayırmada maddeler birbiriyle karışmayan iki faz arasında dağılırlar. Fazlardan birine hareketli (mobil) faz, diğerine ise durgun faz (stationary faz) denir. Analiti taşıyan hareketli fazdır, Mobil faz genellikle su ve sulu tampon çözeltiler, bunların metanol ve/veya asetonyitril ile oluşturulan çözeltileri veya organik solventlerdir. Mobil fazın bileşimi ve pH değeri ayrımı direk etkiler, kullanılan tekniğe, numune tipi ve kolona göre mobil faz seçilmelidir.

2- Degazör (Degasser): Mobil faz şişesinden taşınan hareketli fazdaki hava kabarcıklarının ve çözülmüş havanın giderilmesini sağlar. Degazör mobil fazlarda mevcut çözülmüş gazların giderilmesini sağlar.

3-Manuel Enjektör veya otoörnekleyici (autosampler): Örnekleyici analitlerin kolon ve detektöre gönderilmesini sağlar. HPLC cihazında temel olarak iki farklı çeşitte bulunur: Manuel (El tipi) ve Otoörnekleyici (Otomatik). Manuel örnekleyicilerde numune bir şırıngaya çekilip valf yardımıyla sisteme gönderilir. Otoörnekleyicilerde ise bu işlemleri cihaz kendisi verilen komutlar ile otomatik yapabilmektedir.

3-Pompa: Temel olarak pompa mobil fazın yüksek basınçla HPLC sistemi içinde hareket etmesini /dolaşımını sağlar. HPLC ünitesi: Degasser, pompa, autosampler, kolon ve dedektör olmak üzere dört kısımdan oluşmaktadır. Pompa mobil fazı değişik akış hızlarında (ml/dk vb) iletebilir. Akış hızı bu anlamda izokratik veya gradient olabilir. İzokratik akışta tüm analiz süresince aynı sürede ve aynı akış uygulanır. Gradient akışta ise değişik zamanlarda değişen oranlarda akış uygulanabilir.

4-Kolon: Sabit (durgun) fazı içeren kısımdır. Kromatografik sistemin kalbi olarak nitelendirilir. Kolonda bileşenlerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinden yararlanarak birbirlerinden ayrılması sağlanır. Özetle; ayırma kolonda gerçekleşir.

Sabit faz çok çok küçük boyutlu (mikro veya nano) poröz partiküllerden oluşur, bu nedenle hareketli fazın kolondan geçişi için yüksek basınç pompalarına ihtiyaç vardır.

Kullanılan mobil faz, sabit faz ve moleküler etkileşim türlerine göre HPLC ikiye ayrılır: Normal faz ve Ters-faz kromatografisi.

Normal faz kromatografisi; Mobil faz apolar* (etileter, kloroform, hekzan gibi) veya düşük polariteye sahip bir bileşen, **sabit faz ise polar*** (Silikajel-Polimer ve üzerine bağlanmış – CN, –NO₂ veya NH₂ dolgu maddeleri) bir bileşendir. 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. Normal Faz Kromatografide düşük polariteye sahip mobil fazda alıkonma zamanları uzun, polaritesi arttırılmış mobil fazda alıkonma zamanları kısadır.

Ters faz kromatografisi: Sabit faz apolar (Silikajel-Polimer ve üzerine bağlanmış C18, oktil veya fenil grupları, metil, etil ve –NH₂ gruplu dolgu maddeleri), **mobil faz ise polardır** (Metanol, Asetonitril, Tetrahidrofuran). Ters Faz Kromatografide yüksek polariteye sahip mobil fazda alıkonma zamanları uzun, polaritesi azaltılmış mobil fazda alıkonma zamanları kısadır. Alıkonma zamanını kısaltmak için mobil fazın polaritesi azaltılır. Alıkonma zamanını arttırmak için mobil fazın polaritesi artırılır.

5-Dedektör: Kolonu terk eden bileşenleri görebilmemizi ve ayrılan moleküllerin miktarını belirlememizi sağlar. Dedektörden geçen maddeler bir kaydedici yardımıyla kaydedilerek, zamana karşı dedektör cevabına ait bir grafik oluştururlar buna kromatogram denir . Dedektör çeşitleri; UV, floresans, refaktif index, diode array şeklindedir.

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

HPLC'nin başlıca kullanım alanları;

1. İlaç analizler (Antibiyotikler ve diğer..)
2. Biyokimyasallar (Amino asitler, proteinler, karbonhidratlar, lipidler),
3. Gıda katkı ve kalıntıları (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.

***Moleküllerin polar ya da apolar olması ne demektir?**

Bir molekülün polar ya da apolar olması molekül üzerindeki yük dağılımının simetrisiyle ilgilidir. Dağılım simetrik ise molekül apolar, bileşke kuvvet sıfırdan büyükse molekül polar olur.

Polar molekül

Eğer yük dağılımı simetrik değilse molekül polardır, Yani, polar moleküllerde bir kutuplaşma söz konusudur. HCl, NH₃, H₂O gibi moleküllerin yapısında yükler simetrik dağılmadığı için molekül üzerinde negatif ve pozitif yük yoğunlukları oluşur. Bu yüzden molekül polar olur.

Apolar molekül

Bir molekülün sahip olduğu bütün bağların oluşturduğu bileşke kuvvet sıfırsa bu molekül apolar, yani kutupsuz olur. Apolar moleküllerde bağ elektronları eşit kuvvetle çekildiği için kutuplaşma olmaz. H₂, N₂, O₂, CO₂, CH₄, BF₃ apolar moleküllerdir.