



HPLC/YPSK

HIGH PERFORMANCE
LIQUID CHROMATOGRAPHY

YÜKSEK PERFORMANSLI
SIVI KROMATOĞRAFİSİ

Kromatografi:

Kimyasal bir karışımı oluşturan farklı yapıdaki maddelerin birbiriyle karışmayan biri hareketli, diğeri sabit iki faz arasındaki dağılım dengelerine dayanarak ayrımını sağlayan, aynı zamanda bu maddelerin kalitatif ve kantitatif analizine olanak tanıyan ayırım yöntemidir.

Kromatografinin sınıflandırılması

Ayırma mekanizmalarına göre;

- ❖ Adsorbsiyon Kromatografisi
- ❖ Partisyon Kromatografisi
- ❖ İyon deęiřtirme Kromatografisi
- ❖ Jel geçirgenlięi Kromatografisi

Kromatografinin sınıflandırılması

Faz çeşitlerine göre;

- Sıvı kromatografisi

Sıvı-Katı

Sıvı-Sıvı

- Gaz kromatografisi

Gaz-Katı

Gaz-Sıvı

Mobil faz

SIVI

Gaz

Sabit faz katı
SIVI-katı
kromatografi (LSC)

Sabit faz sıvı
SIVI-SIVI kromatografi
(LLC)

Sabit faz katı
Gaz-katı
kromatografi (GSC)

Sabit faz sıvı
Gaz-SIVI
kromatografi (GLC)

Kromatografinin sınıflandırılması

Uygulama şekillerine göre;

Düzlemsel Kromatografi

TLC-İnce Tabaka Kromatografisi

Kağıt Kromatografisi

Kolon Kromatografisi

HPLC-Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi

GC-Gaz Kromatografisi

HPLC/YPSK

- ❖ Sabit fazı içeren kolonda analzi yapılacak madde ya da karışımın yüksek bir basınçta hareketli faz(sıvı) ile sürüklenmesi prensibine dayanan kromatografik analiz yöntemidir.
- ❖ Analiz örneğini içeren sıvı çözelti sisteme enjeksiyon yoluyla uygulanır ve kolona hareketli fazın akışında çözünerek sürüklenir.
- ❖ Kolondan geçen madde ya da maddelerin çıkışı özel kimyasal ve/veya fiziksel etkileşimler neticesinde belli bir gecikme ile gerçekleşir. Bu gecikmeye retansiyon denir.
- ❖ Maddelerin kimyasal ve fiziksel davranış farkları retansiyon farkı oluşturur ve ayrımı sağlar.

Kalitatif ve kantitatif çalışmalarda en yaygın kullanılan analitik tekniklerden biridir.

- Doęal kaynakların fitokimyasal analizinde
- Biyoloji ve Kimya alanlarında
- Adli Bilimler ve dięer alanlarda
- İlaç sanayinde

HPLC Sistemi

rezervuar
hareketli faz

pompa

enjksiyon ünitesi

kolon
sabit faz

dedektör

kaydedici



Pompa

- ❖ Modern LC pompaları en az 6000' den 10000 p.s.i. 'ye kadar basınç kapasitesine sahip olmalıdır. Parçalı çok çeşitli çözücülere karşı inert ve dayanıklı olmalıdır. Bu amaçla piston, valf gibi parçaları paslanmaz çelikten, safirden yapılmış ya da bu malzemelerle güçlendirilmiştir.
- ❖ Analitik kullanımda pompalar 0-10 ml/dak. akış hızına, preparatif kullanımda ise 100 ml/dak. aşan akış hızları gerekebilmektedir.
- ❖ İki tip akış gerçekleştirebilirler:
 - ✓ izokratik akış
hareketli faz bileşimi sabittir
 - ✓ gradient akış
zamana göre değişen solvan bileşimi kullanılır.

Enjeksiyon Ünitesi

Analizi yapılacak çözeltilerin sisteme verildiği kısım.

- Manuel enjeksiyon
- Autosampler enjeksiyonu

Kolon

- ❖ YPSK kolonlarının çoğu paslanmaz çelikten yapılmaktadır. American Iron and Steel Institute (AISI) standartlarına uygun olarak kimyasal korozyon ve normal YBSK basıncına dayanıklıdır.
- ❖ Cam tüpler, tantal ve esnek polietilen tüpler de kolon yapı malzemesi olarak bulunmaktadır.
- ❖ Kolon dolgu materyali olarak; silika, alumina, polimerik yapılar kullanılabilir.

Kolon çapı

2-5 *mm* olanlar genellikle analitik amaçlarla kullanılmaktadır. 10 *mm* ila 1 *inç* (24.5 *mm*) arası çaptaki daha geniş kolonlar ise preparatif çalışmalarda kullanılır.

Uzunluğu 5,10,15 ya da 25 *cm* olan kolonlar, 10 μ m ve altı mikropartikül sabit faz kullanıldıysa tercih edilir.

Kolon uzunluğu

Artınca retansiyon hacmi de artar bu da elüattaki pik konsantrasyonunu düşürüp tespit limitini zayıflatır.

Ancak preparatif amaçlarla 1 *m* ve üzeri kolonlar ile çalışılır.

Dedektörler

- Dedektörün görevi, örnekteki bileşenlerden biri ayrılıp kolondan çıktığında tespit etmektir.
- Hareketli faz kompozisyonundaki değişimi farkeder, bunu elektriksel bir sinyale dönüştürür ve bu sinyallerden kromatogramı oluşturur.

Dedektör Tipleri

- UV Dedektörler
 - Sabit dalga boyunda
 - Değişken dalga boylarında
 - Diod-Array Dedektörler*
- Refraktif İndeks Dedektörler
- Floresans Dedektörler
- Elektrokimyasal Dedektörler
- Işık Saçılım (evaporative light scattering) Dedektörleri
- Kondüktivite Dedektörü

Normal Faz YBSK

- Normal faz YBSK (NP-HPLC) esası polarite farkı ile ayırım ve analiz olan ilk sistemdir.
- Bu yöntem polar sabit faz ve non-polar hareketli fazdan meydana gelmektedir.

Ters Faz YPSK

- Adından da anlaşılacağı gibi; non-polar sabit faz ve polar hareketli fazdan oluşan YPSK sistemidir.
- *Sabit faz* olarak en çok kimyasal olarak bağlanmış oktadesilsilan(ODS), 18 karbon atomlu *n*-alkan(C-18) kullanılır.

Ters-faz YPSK

- **Hareketli faz** genellikle su ya da sulu tampon çözeltilerinin, suyla karışabilen çeşitli çözücülerle oluşturduğu karışımdan oluşur. Aşağıda bu çözücülere ait örnekler aşağıya doğru azalan polariteye artan elüsyon gücüne göre verilmiştir.
- Metanol
- Asetonitril
- Etanol
- İzopropanol
- Dimetilformamid
- Propan-1-ol
- Dioksan
- Tetrahidrofuran

HPLC ve Spektroskopi

- HPLC aşağıdaki spektroskopik yöntemlerle birleştirilmiş olarak kullanılabilir.
- UV spektrometresi(HPLC-UV/DAD)
- HPLC-NMR(nükleer manyetik rezonans)
- LC-MS(kütle spektrometresi)

YPSK ne Amaçla Kullanılır?

- ❖ İlaç etken ve yardımcı maddelerinin saflık ve kalite kontrollerinde,
- ❖ Preparatların hazırlanış esnasında ve sonrasında içerdikleri etken maddelerin miktar tayininde,
- ❖ İlaç etken maddelerinin sentezi ve sonrasındaki analizler ve reaksiyon yürürlüğünün saptanması,
- ❖ Biyolojik materyallerden ilaç ve metabolitlerinin saptanması.

Farmakognozideki Kullanım

- Standardize ekstre hazırlanmasında,
- Bitki materyalerindeki maddelerin kalitatif ve kantitatif analizleri,
- İzolasyon sonrası saflık kontrolü,
- Bitkisel preparatların stabilite analizi.

YPSK'nın diđer kromatografik yöntemlere göre üstünlükleri;

- Analizin çok kısa sürede tamamlanması
- Ayırımın yeterince iyi ve etkili olması
- Az miktarda maddeye ihtiyaç duyulması
- Sonuçların kolay ve tekrarlanabilir olması

