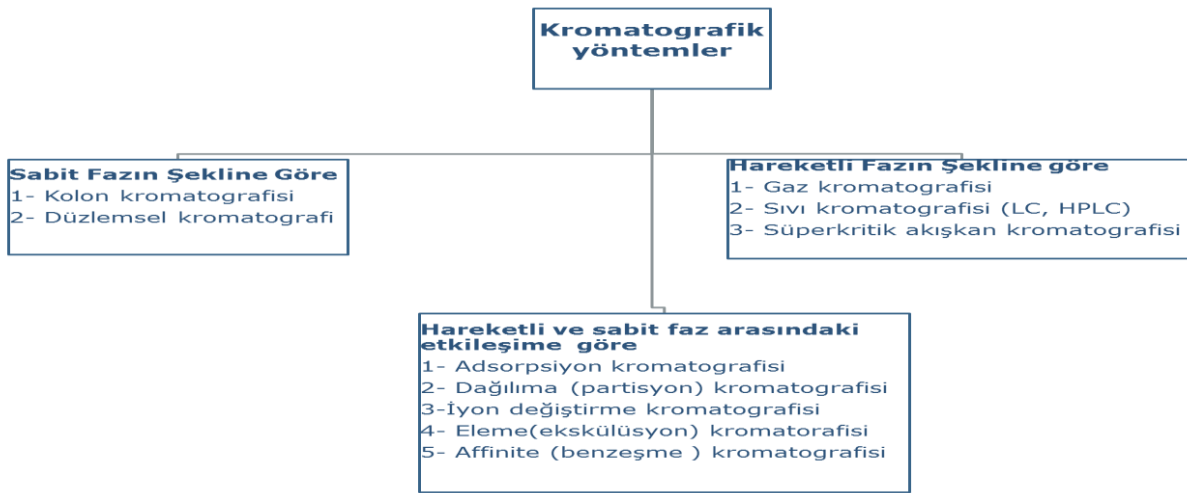


YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)

Kromatografi, ayrılacak bileşenlerin biri sabit(**sabit faz**), diğeri belirli bir yönde hareket eden(**hareketli faz**) iki faz arasında dağıldığı fiziksel bir ayırma yöntemidir (IUPAC).

Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, sabit fazda farklı tutunma kuvvetlerine dayanarak hareketli faz yardımıyla ayrılması ve saflaştırılması yöntemidir.

Bir ayırma metodu olarak kullanılan kromatografi ayrılan bileşenlerin bir dedektör vasıtasıyla sinyalinin ölçülmesi yoluyla nicel, bileşenlerin farklı göç hızlarından yararlanarak nitel analizde de kullanılır. Kromatografik yöntemler genel olarak aşağıdaki gibi sınıflandırılır.



Kolon kromatografisi

Pek çok kromatografi tekniği gibi HPLC de kolon kromatografisinin bir uygulamasıdır.

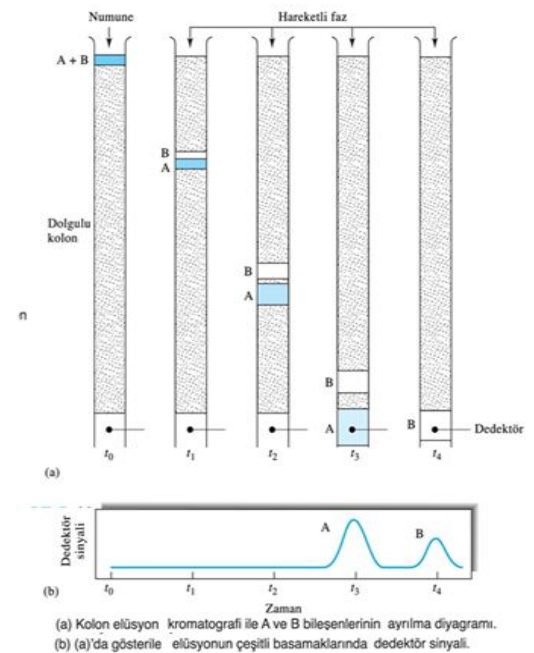
Hareketli fazın ilerlemesiyle durgun fazda farklı kuvvetle tutunana maddelerin geri alınmasına elüsyon (geri alma) denir. Ayrılması istenen maddelerin kolondan çıkış süresine alıkonma süresi denir.

Kromatografide A ile gösterilen bir analit için dağılım dengesini sıklıkla, aşağıdaki

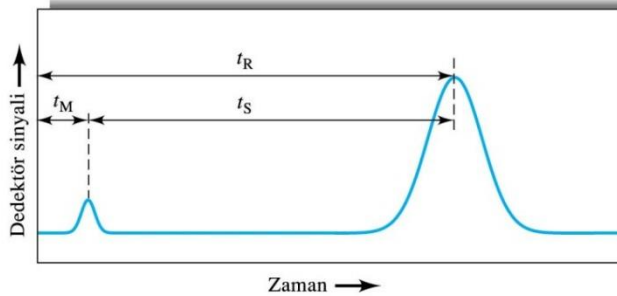
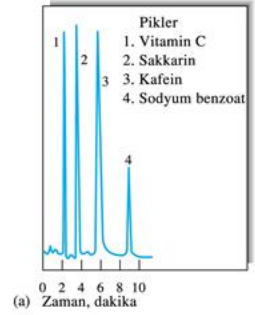
basit denklemle tanımlayabiliriz:

$$A_{\text{hareketli}} \rightleftharpoons A_{\text{sabit}} \quad K = \frac{C_s}{C_M}$$

Bu dengeye ait sabit, K, **dağılım katsayısı** olarak adlandırılır.

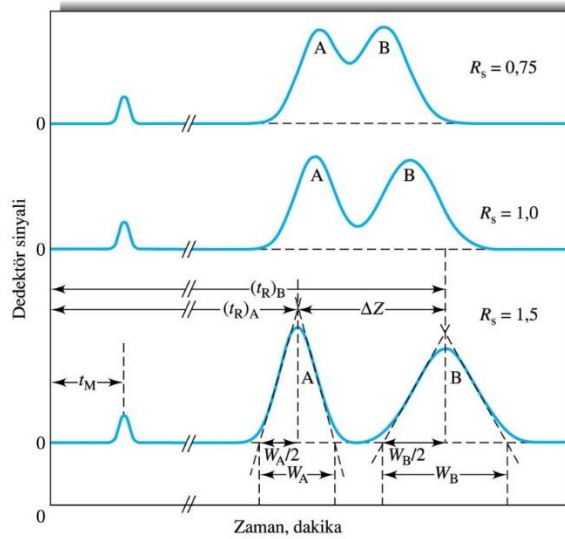


Bu denklemde C_S ve C_M analitin, sırasıyla sabit ve hareketli (mobil) fazdaki molar derişimleridir. Kolonda farklı kuvvetlerle tutunan maddeler, farklı alıkonma zamanlarına sahiptir. A ve B maddesinin kolonda birbirinden net olarak ayrılması piklerin ayrılması ile gözlenir. Bu ayrılmanın başarısı ayırma gücü ile ifade edilir.



ŞEKİL 26-4 İki bileşenli bir karışım için tipik bir kromatogram. Soldaki küçük pik kolonda tutulmayan türe aittir ve bu tür elüsyon başladıktan hemen sonra dedektöre ulaşır. Bu nedenle bu türün alıkonma süresi (t_M) hareketli fazın bir molekülünün kolondan geçmesi için gereken süreye yaklaşık olarak eşittir.

ŞEKİL 26-12 Üç ayrı ayırma gücündeki kromatogramlar: Ayırma gücü $R_s = 2\Delta Z/(W_A + W_B)$ olarak verilmiştir. Her kromatogramda pik yükseklikleri yaklaşık eşit alınmıştır.



$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

Ayırma gücü, R_s

İki kromatografik pikin birbirinden ayrılma derecesini gösterir.

Kolon dolgusunun çok sayıda teorik tabakadan oluştuğu varsayılır.

Kuramsal tabaka sayısı, kolon veriminin yani piklerin keskinliğinin nicel ölçüsüdür.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2$$

Kolon dolgu yüksekliği (L), N tane, H kuramsal tabaka yüksekliğinden oluşur.

$$H = \frac{L}{N}$$

Kapasite faktörü(k) , Analitlerin kolonda göçetme hızlarını tanımlamak amacıyla yaygın olarak kullanılan önemli bir büyüklüktür.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Kapasite faktörü (k)'nın 1-5 arasında bir değer göstermesi idealdir.

Ayırma Faktörü (α), birbiri ile ilişkili iki pikin göreceli alıkonmalarıdır.

$$\alpha = \frac{t_{R(B)} - t_M}{t_{R(A)} - t_M} \quad \alpha = \frac{k_B}{k_A} = \frac{K_B}{K_A}$$

Kolon Etkinliğinin(Performansının) Optimizasyonu

İyi bir ayırma için temel büyüklükler : α , k ve N (veya H) optimize edilir.

Ayırmayı iyileştirmenin en kolay yolu kapasite faktörü(k)'nü optimize etmektir.

k için mobil faz bileşimi değişimi, farklı bir kolon dolgu maddesi kullanılması (daha az uygun)

N için;

kolon uzunluğunu,

mobil fazın akış hızını,

dolgu maddesinin tanecik büyüklüğünü

mobil fazın viskozitesini değiştirmek

α için azalan tercih edilebilirlik sırasıyla

pH değişikliklerini de içeren mobil faz bileşimini değiştirmek

kolon sıcaklığını değiştirmek,

özel kimyasal etkilerden yararlanmaktır

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Sıvı kromatografisi, hareketli faz olarak sıvının kullanıldığı kromatografik yöntemlerin genel adıdır. Sıvı kromatografinin özel bir uygulaması olan *yüksek performanslı sıvı kromatografisi* (HPLC) yönteminde, hareketli faz sıvı durgun faz ise, katı parçacıklardan (alümina, silikajel vb.) oluşur.

Durgun (sabit) faz olarak kullanılan parçacık boyutlarının önemli ölçüde küçültülmesi sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun etkinliği artırılmış olur. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için bir **basınç** uygulanması gerekir. Bu yüksek verimdeki kolonların ve oldukça yüksek basınçların kullanıldığı HPLC, element ve organik molekül türlendirilmesinde ve tayininde yaygın biçimde kullanılan kromatografi türüdür.

HPLC günümüzde kimya, biyokimya, biyoteknoloji, farmakoloji, tıp kimyası, bitki kimyası, tarım alanlarında ayırma ve tayin için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle çevre sıcaklığında termal olarak kararsız bileşikler ve yüksek polarlıktaki bileşikler herhangi bir türevlendirme olmaksızın ayırmak ve analiz etme mümkündür.

Prof..Dr. Mehmet Sayım Karacan, G.Ü. Fen F. Kimya Bl.

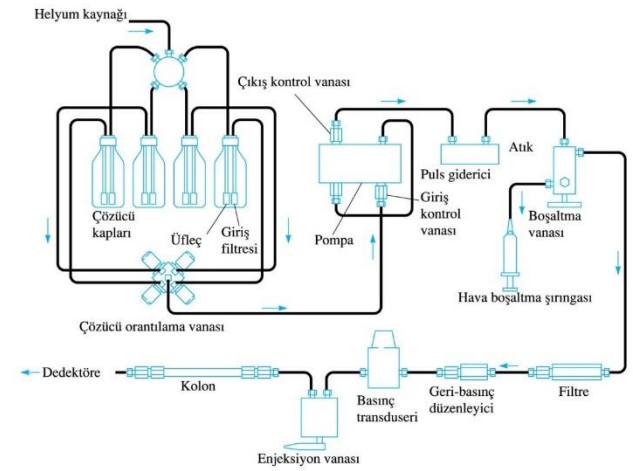
Şekilde görülen HPLC cihazı başlıca üç bölümden oluşur:

- *Çözücü dağıtma sistemi
- *Ayırma kolonu
- *Dedektör ve kaydedici sistem

1. Çözücü Dağıtma Sistemi

HPLC cihazı, diğer sıvı kromatografisi cihazlarından, daha önce de belirtildiği gibi, kolon giriş ve çıkışı arasında oluşturulması gereken yüksek basınç nedeni ile farklılık gösterir. Bu basınç farkı, kolon girişine bir pompa yoluyla uygulanan basınç ile sağlanır. Pompanın performansı, analitik sonuçlardaki tekrarlanabilirliği, nicel değeri, gözlenebilme sınırı vb. değerleri büyük ölçüde etkiler. Ticari olarak mevcut pompalama sistemlerinin farklı tipleri şunlardır:

- * Doğrudan gaz basınç pompaları
- * Pnömatik hızlandırıcı pompalar
- * Pistonlu pompalar
- * Şırınga tipi pompalar



SEKİL 28-3 Yüksek performanslı sıvı kromatografisi cihazının şematik görünüşü (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT'ın izniyle).

Sıvı kromatografisinde, iki farklı örnek enjeksiyon sistemi kullanılır.

1. Hareketli faz akışı olurken; Septum yoluyla kolon başına mikroşırınga ile enjeksiyon,
 - a)Hareketli faz akışının durdurulmasıyla septum yoluyla enjeksiyon,
 - b)Kolonun hemen başında hareket eden faza septum yoluyla enjeksiyon.
2. Dış ilmek subabı (valfi)yoluyla enjeksiyon.

2. Ayırma Kolonları

HPLC cihazında kullanılan kolonlar, yüksek basıncı korumak için paslanmaz çelikten yapılmışlardır. Bunlar baştan başa düzgün bir iç çapa sahiptirler ve ticari olarak değişik büyüklüklerde mevcuttur.

Bir kromatografik sistemin performansı, kolonda gerçekleştirilen ayırma ile yani, kolon dolgu maddesinin seçilmesi ve kullanılmasıyla tayin edilir.

İyi bir kolon dolgu maddesi kararlı olmalıdır ve hem hareketli faz çözücülerine hem de örnek çözeltilere karşı inert olmalıdır. Geniş yüzey alanına, düzgün olarak dağılmış ve hareketli faza kolay erişebilir açık yapısal yüzeye sahip olmalıdır. Yüksek basınç ve yüksek akış hızlarından etkilenmemelidir.

Kolon verimi; kolon dolgu maddesi, ortalama parçacık çapı, kolonu doldurmak için kullanılan teknikler, kolonun iç çapı ve kolonun iç yüzeyinin geometrisi gibi pek çok faktör tarafından tayin edilir. Paslanmaz çelik

kolonların, malzeme özellikleri açısından en uygun kolonlar olduğu ortaya çıkmıştır. Analitik uygulamalarda, 2,1 mm, 3,2 mm ve 4,5 mm iç çapa sahip kolonlar 10-30 cm arasındaki uzunluklarda kullanılırlar.

Enjeksiyon sistemi-kolon ve kolon-dedektör arasındaki bağlantı borularının uzunluğunun mümkün olduğu kadar küçük tutulması istenir. Kolon çıkışına ve dedektör sistemine bağlanmış boruların en iyisi, hareketli fazla önemsiz ölçüde seyrelmeye izin veren minimum ölü hacme sahip olanıdır. Bu örnek seyrelmesini engelleyen, 0,025-0,05 cm iç çapa sahip (çelik ve teflon) bağlantı borularının kullanılmasıyla başılır.

HPLC çalışmalarında sabit faz olarak genellikle silikajel kullanılır. İçerdiği SiOH grupları nedeniyle zayıf asidik özellik gösteren silikajel, bazik özellik gösteren bileşikler bazlık kuvvetlerine göre tutar. Yani, kuvvetli bazlar silikajel kolonlarda zayıf bazlara oranla daha kuvvetli tutulurlar. Silikajel doğrudan dolgu maddesi olarak kullanıldığı gibi bir katı yüzeyine film halinde kaplanabilir. Bu katının cam boncuk olması durumunda bu ince tabaka, yüzeye kimyasal bağlarla bağlanır. Asidik özellik gösteren bileşiklerin ayrılmasını sağlayan, yani bazik özellik taşıyan bir kolon dolgu maddesi de aluminadır. Bu dolgu maddesi de katı bir yüzeye film halinde kaplanarak kullanılır.

3. Dedektörler

Örnek, hareketli faz ile birlikte kolon boyunca sürüklenerek dedektöre taşınır. HPLC cihazlarında kullanılan dedektörler, diğer sıvı kromatografisi cihazlarında kullanılan dedektörlerle aynıdır. Analizin amacına göre UV absorpsiyon, kırılma indisi, floresans ve elektrokimyasal dedektörler kullanılır. İdeal bir dedektör şu özelliklere sahip olmalıdır:

Düşük gürültü seviyesine sahip olması nedeniyle ayrılan bileşenlerin küçük miktarları gözlenebilir.

- * Hızlı ayrılan pikleri kaydetmek için süratli cevap zamanına sahiptir.
- * Hareketli fazdaki akış hızı, sıcaklık ve fazın bileşimindeki değişimlere karşı bir dereceye kadar duyarsızdır.
- * Bütün çözünenlere cevap verir veya en azından tahmin edilebilir bir seçiciliğe sahiptir.
- * Kolay çalışır ve güvenilirliği fazladır.
- * Oluşan pikte kalitatif bilgi de sağlar.

HPLC dedektörlerinin iki tipine rastlamak mümkündür.

1. Genel dedektörler
2. Seçici dedektörler

Genel dedektörler, hareketli faz ve örnek çözeltisinin özelliklerindeki değişimi ölçer.

Seçici dedektörler ise yalnız örnek çözeltisi için duyarlık ve seçicilik gösterir. Genel özellikli dedektörlere örnek olarak kırılma indisi ölçen dedektörler ve kütle spektrofotometreleri verilebilir. Seçici dedektörlere örnek olarak da UV, FT-IR, floresans, elektrokimyasal, radyokimyasal, iletkenlik dedektörleri verilebilir.

UV absorpsiyon dedektörü, kolondan ayrılarak dedektöre ulaşan bileşenlerin ultraviyole bölgede yaptığı absorbansın ölçümüne dayanır. Tek bir dalga boyunda çalışan dedektörler kullanılabildiği gibi bir monokromatör ile çeşitli dalgaboylarını seçerek çalışan dedektörler de vardır. Tek dalgaboyunda çalışan dedektörlerde ışık kaynağı olarak genellikle 254 nm'de ışımaya yapan Hg lambası, çeşitli dalgaboylarını ölçebilen dedektörlerde ise döteryum lambası kullanılır. Spektrofotometrik ölçüm temeli ile çalışan bir başka

dedektör türü ise fotodiyot dizisidir. Ölçümlerin çok hızlı bir biçimde yapılmasının gerektiği analizlerde genellikle bu dedektör kullanılır. UV dedektörün karakteristikleri şunlardır:

- * Örneklerin UV- görünür bölgede absorpsiyon yapması gerekir.
- * Hareketli faz akış hızı ve sıcaklık değişimlerinden etkilenmez.
- * Band genişletme etkisi küçüktür.
- * Çok güvenilirdir, operasyonu kolaydır.
- * Örnek çözeltiyi bozmaz.

Kromatografide Örneğin hazırlanması

Katı örnekler: Bir örneği HPLC sistemine vermek için, bu örneğin, hareketli faz olarak kullanılan çözücüde çözünmesi gerekir. Örneğin, metanol/su karışımı bir hareketli fazla ile analiz yapılacaksa, örnek metanolde, suda veya metanol/su karışımında çözünmelidir. Eğer örnek böyle bir çözücüde çözünmüyorsa, diğer bir çözücüde çözünmeli, fakat bu durumda kullanılan çözücü kesinlikle hareketli fazla karışabilir olmalıdır. Örnek bileşenlerinin, mobil faz çözücüsünde çökmemesine de dikkat edilmelidir.

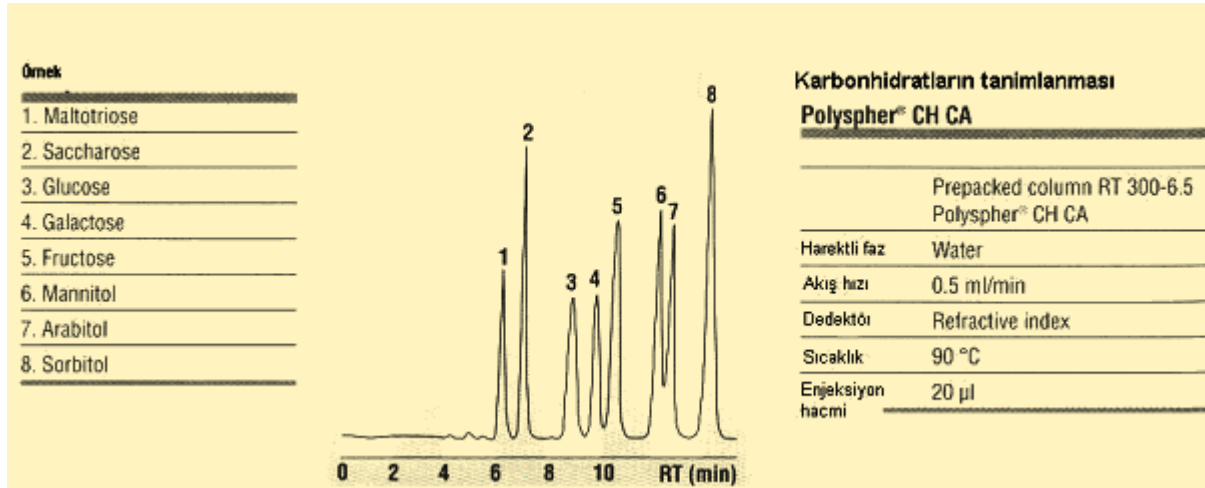
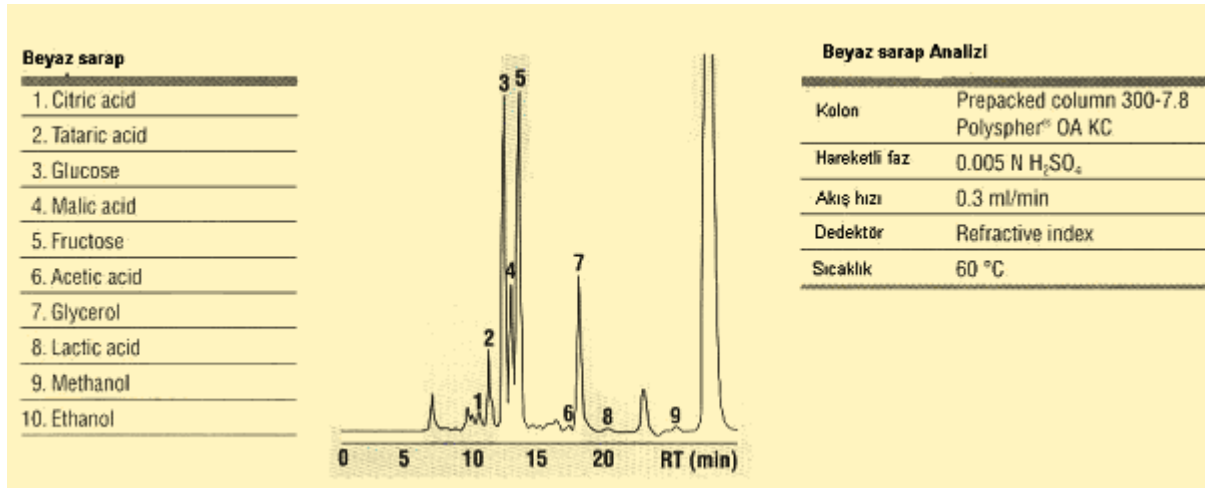
Sıvı örnekler: Sıvı örneklerde çözücü, sistem ile uyumluysa, doğrudan enjekte edilebilir. Eğer örnekler istenen çözücüde değillerse veya enjekte edilecek kadar derişik değillerse, kurutulmalıdır veya deriştirilmelidir. Daha sonra hareketli fazda tekrar çözünmelidir.

Örneklerin süzülmesi: Hareketli faz akışında azalmaya, geri basıncında artmaya, kolon veriminde azalmaya ve istenmeyen piklere neden olabilecek çözünmeyen maddelerin kolona girmesini önlemek için, örneğin enjeksiyondan önce süzülmesi tavsiye edilir.

HPLC'nin diğer kromatografi türlerinden üstünlükleri şunlardır:

- * HPLC kolonu, rejenerasyon olmaksızın pek çok kez kullanılabilir.
- * Böyle kolonlarda gerçekleştirilen ayırma, eski yöntemlerle elde edilenden çok daha çeşitlidir.
- * Bu teknik kullanıcının becerisine daha az bağımlıdır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir.
- * Nicel analiz için de kullanılabilir.
- * Analiz süresi çok kısadır.
- * Duyarlık çok yüksektir, 10 µg lık bir örnek bile, floresans veya elektron yakalama dedektörleri kullanılarak tayin edilebilir.

Örnek Grafikler



DENEY: Çayda Kafein Tayini

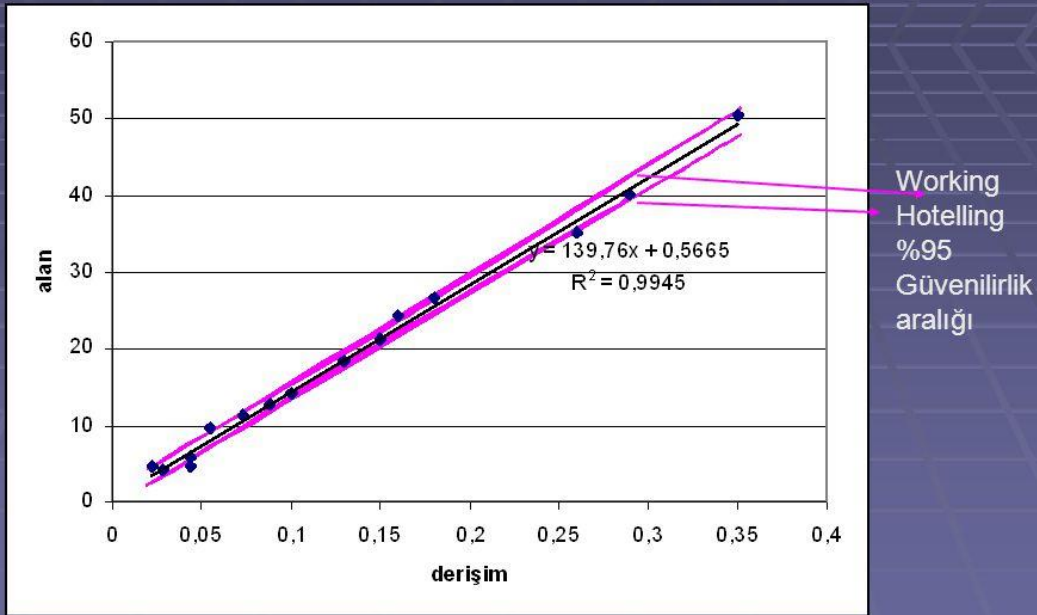
Kafein için; Mol Kütlesi: 194,19 g/mol d:1.2 g/cm³

Deneyde, 5µm çaplı, dolgulu, 4,6 mm iç çaplı 25 cm lik ters faz kolonu kullanılmıştır.

1-)Numunenin hazırlanması: 1,80 gram siyah çay 150 ml kaynatılmış su içerisinde oda sıcaklığında 10 dakika ekstrakte edilir. 20 ml alınır ve üzerine 0,1 M 10 ml hidroklorik asit ve 8 ml doymuş sodyum asetat çözeltisi eklenir. Çözelti 2500 devir/min devirde 5 dakika santrifüj edilir. Yaklaşık 10 ml süzöntü alınır ve üzerine 0.1 gram NaHCO₃ eklenir ve tekrar santrifüj edilir. Daha sonra çözelti 50 ml'ye seyreltilir.



Örnek , HPLC Kalibrasyonu



2-) Kafein için bilinen derişimlerde standart çözeltiler hazırlanarak bunlar için kromatogramları alınarak derişim-alan cinsinden kalibrasyon grafiğı çizilir.

3) Hazırlanan numuneden alınan örnek kolona enjekte edilir.

Çizilen kalibrasyon grafiğınden yararlanarak bilinmeyen kafein numunesinin derişimi hesaplanır. Alınan çay numunesi ve seyrelmeler de kullanılarak çaydaki kafein miktarı mg kafein/ g çay cinsinden ve mg kafein/ 100 ml çay demi cinsinden hesaplanır.