




HPLC Tekniği ve Kullanım Alanları

HPLC Technique and Usage Areas

Aydın Şükrü BENGÜ¹ 

ÖZ

Sıvı kromatografinin yaygın kullanılan bir çeşidi olan HPLC sağlık ve fen alanında geniş kullanım alanlarına sahiptir. Son dönemde geliştirilen UHPLC tekniğinin birçok avantajı olmakla beraber pahalı olması kullanımını sınırlamaktadır. Bu derleme ile yeni başlayanlar için kullanıma yönelik pratik laboratuvar bilgileri verilmesi amaçlanmıştır.

Anahtar Kelimeler: HPLC, Metod seçimi Sıvı kromatografi, UHPLC.

ABSTRACT

HPLC, a widely used type of liquid chromatography, has a wide range of uses in health and science fields. Although the recently developed UHPLC technique has many advantages, it limits its use because it is expensive. With this review, it is aimed to give practical laboratory information for use for beginners.

Keywords: HPLC, Method selection, Liquid chromatography, UHPLC.

¹ Doçent Doktor, Aydın Şükrü BENGÜ, Biyokimya, Bingöl Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, abengu@bingol.edu.tr, ORCID No: 0000-0002-7635-4855

İletişim/Corresponding Author:
E-posta/E-mail:

Aydın Şükrü BENGÜ
abengu@bingol.edu.tr

Geliş Tarihi/Received : 10.05.2021
Kabul Tarihi/Accepted: 24.06.2021
Yayın Tarihi/Published: 30.06.2021

GİRİŞ

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi veya Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi olarak tanınan HPLC tekniği; sağlıktan ziraata kadar fen bilimlerinin birçok dalında kullanılan gelişmiş bir kromatografi tekniğidir. Bu derleme teknik bilgiden çok kullanım esnasında karşılaşılan sorunların aşılması, okunan bir makalenin daha iyi anlaşılabilmesi ve yeni kullanıcılara rehber olması amacıyla hazırlanmıştır.

Çözünür forma geçebilen tüm bileşikler (aminoasitler, şekerler, vitaminler, antibiyotikler, pestisitler, gıda tatlandırıcıları ve renklendiricileri ve bunların türevleri vb.) bu teknik ile kantitatif olarak hızlı ve güvenilir şekilde tespit edilebilmektedir. HPLC cihazını oluşturan başlıca bileşenler; mobil faz, pompa, kolon ve kolon fırını, degazör, otoörnekleyici ve enjektör, dedektörlerden oluşur. Bu elemanları kısaca açıklayalım.

Mobil faz; kullanılacak olan çözücüyü içeren hareketli fazdır. Hazırlanması basit gibi görünse de kolay bir örnekle hassasiyetini vurgulayalım. Örneğin mobil fazımız metanol/su (50:50) olsun. Bundan 1 litre hazırlayacak isek önce 500 mL metanol ile 500 mL saf suyu karıştırırsak son hacmin 1 litre değil 970 mL olduğunu fark ederiz. İşte bu karışımı mezürde birini ötekinin üzerine ilave ederek son hacmi ayarlamaya çalışarak yaparsak sonuç yanlış olacaktır. Ayrıca kullanılan suyun kalitesi mutlaka ultra saf su olmalı, karışım ultrasonik banyoda kabarcıklar bitene kadar bekletilmelidir. Pompa; mobil fazı örnekle beraber kolona ve dedektöre taşıyan sistemdir ve HPLC'nin kalbi diyebiliriz. Çünkü akışı istenilen sabit basınçta yapması lazım bunun içinde kullanıcının pompa bakımını ihmal etmemesi gereklidir. Tampon çözelti içeren mobil fazların kullanımından sonra pompanın temizlenmesi için 30-45 dakika saf çözücü geçirilmesi tavsiye edilir. Aksi takdirde bir sonraki kullanımda pompa tıkanacak ve sökülüp temizlenmesi kaçınılmaz olacaktır. Bu da zaman kaybı demektir.

Kolon; ayırımın gerçekleştiği esas yerdir ve seçimi bu yüzden önem taşır. Eğer sistemimizde kolon fırını da varsa sıcaklığı da kontrol edebiliriz ki bu çalışmamızın hassasiyetini arttıracaktır. Her yeni kolon ilk takıldığında üreticinin tavsiye ettiği gibi bir mobil faz geçirilerek şartlandırılmalıdır. Bu işlem yaklaşık 30-45 dakikadır. Ayrıca kolon değişimi yaparken de sökülen kolonlar uygun çözücü ile yıkanıp, her iki ucu kapatılıp saklanabilir.

Degazör; mobil fazın kolona gelene kadar sistemde oluşabilecek hava kabarcıklarının atılması görevini görür.

Oto örnekleyici ve enjektörler; örnekten istenilen miktarda çekilerek mobil fazla beraber kolona verilmesini sağlar. Eski HPLC cihazlarında manuel enjeksiyon kullanılıyordu, bu hem hata payını arttırıyordu hem de kullanıcının cihaz başında beklemesini mecbur bırakıyordu. Oysa oto örnekleyiciye (otosampler) sahip bir HPLC sisteminde 90 örneğe kadar yükleme yapıp çalıştırılabilir, burada sadece mobil fazın çalışma esnasında bitmeyeceğinden emin olmamız lazım. Hatta sisteme kapanma saatini ayarlayıp gitme imkanımız bile yazılımsal olarak mümkündür.

Dedektörler; örnekteki analitleri ölçülebilir sinyallere çevirerek kantitatif analize imkan sağlar. Absorbans (UV, DAD) dedektör, floresans dedektör, kırılma indisi dedektörü (RID), elektrokimyasal dedektör ve iletkenlik dedektörü gibi çeşitleri vardır. Hatta son zamanlarda HPLC ye kütle dedektörü (MS) bile eşzamanlı olarak entegre edilebilmektedir. HPLC sistemine takılı olunan dedektör yapmak istenilen çalışma için sınırlayıcı özelliğindedir. Mesela şekerli bileşikler (glukoz, früktoz, sakkaroz gibi) çalışabilmek için mutlaka RID dedektör gereklidir. Ama fenolik bileşikler, antibiyotik, pestisit gibi çalışmalar için UV veya DAD dedektör kullanılabilir. DAD dedektörün UV den daha hassas olduğunu vurgulamakta fayda var.

Mobil faz polar ve kullanılan kolon apolar ise **ters faz kromatografi** adını alır ki en sık kullanılan türü budur. Eğer mobil faz apolar ve kolon polar ise **normal faz kromatografi** adını alır.

Mobil faz tek çeşit ise izokrotik akış modu kullanılacaktır, ayrımı kolay olan bileşiklerde tercih edilir. Mobil fazdan birden fazla ve 2-4 arasında ise low pressure gradient veya high pressure gradient modu kullanılacaktır, ayrımı daha zor olan bileşiklerde tercih edilir. Low pressure gradientte karışım pompadan önce olurken high pressure gradientte pompadan sonra olmaktadır.

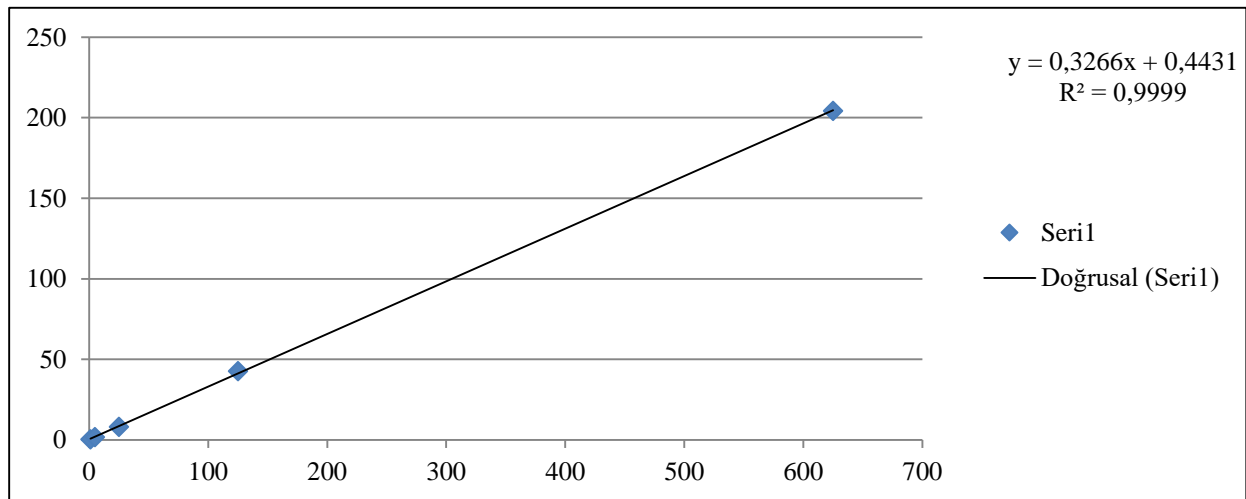
Kromatografide ayırım kolonda olduğu için kolon seçimi hayati öneme sahiptir. Piyasada çeşitli amaçlar için üretilmiş çok sayıda kolon mevcuttur. C8, C18, C amin, kiral kolon vb. Kolonların uzunluğu, genişliği ve dolgu maddesinin por çapı da değişkendir.

HPLC ye verilecek tüm örnekler hava kabarcığı ve partikül içermemelidir. Bu kolonun ömrü ve analizin hassasiyeti açısından önemlidir. Unutmayalım ki bir kolon ile 10 analizde yapılabilir, 500 analiz de yapmak mümkündür. Örnek hazırlamadaki gösterilen hassasiyet kolonun ömrünü belirleyecektir. Mobil faz içerisindeki hava kabarcığını ultrasonik banyoda gidermek ve örnekteki gözle görülemeyen partiküllerin giderilmesi için

0.22 veya 0.45 mikron enjektör ucu filtre kullanılması elzemdir.

İlgilendiğimiz bir bileşiği HPLC de analiz edebilmek için, o bileşiğe ait dalga boyu, akış hızı, kolonun cinsi, sıcaklık ve dedektör bilgilerine ihtiyaç vardır. Sayılan tüm bilgilere sahip isek ve laboratuvarımızdaki HPLC konfigürasyonu buna (dedektör, pompa, kolon açısından) uygun ise bu analiz yapabilir anlamına gelir. Bunun için aranan maddenin standardından en az 5 noktalı standart grafik çizmek gerekir. Standartlar ile aranan maddenin alıkonma zamanı (retention time- Rt) öğrenilir ve daha sonra aynı koşullar altında aynı dakikada gelen pik için aranan bileşik denilebilir. Son olarak örnekleri bu standart grafiğe karşı kıyaslayarak kantitatif olarak tespit edilir.

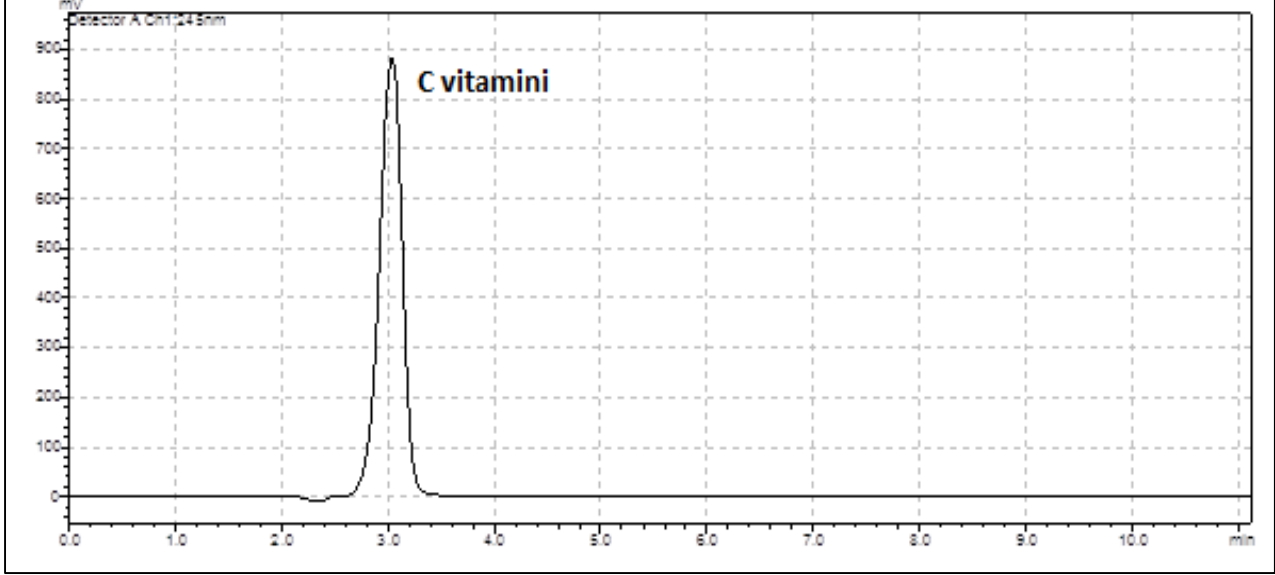
Örneğin 1, 5, 25, 125 ve 625 ppm lik C vitamini standartlarına karşılık gelen absorbans değerleri sırasıyla 0.36, 1.74, 8.21, 42.68 ve 204.33 olan bir çalışma verilerinin standart grafiği aşağıdaki gibi excelden çizdirilip R^2 değeri (0.9999) ve ilgili formül ($Y=0.3266X+0.4431$) elde edilebilir. Her ne kadar günümüz teknolojisinde bu grafikleri cihazların yazılımları tarafından çizdirilse de öğrenilmesinde fayda vardır. Daha sonra içerisinde C vitamini değeri aranan numunenin absorbans değeri bu formül kullanılarak hesaplanılır. Eğer çalışmanın ön hazırlık aşamasında seyreltme yapıldıysa seyreltme faktörü ile çarpılarak nihai sonuç ppm cinsinden elde edilir.



Şekil 1. Örnek bir standart grafik çizimi ve formül hesaplama

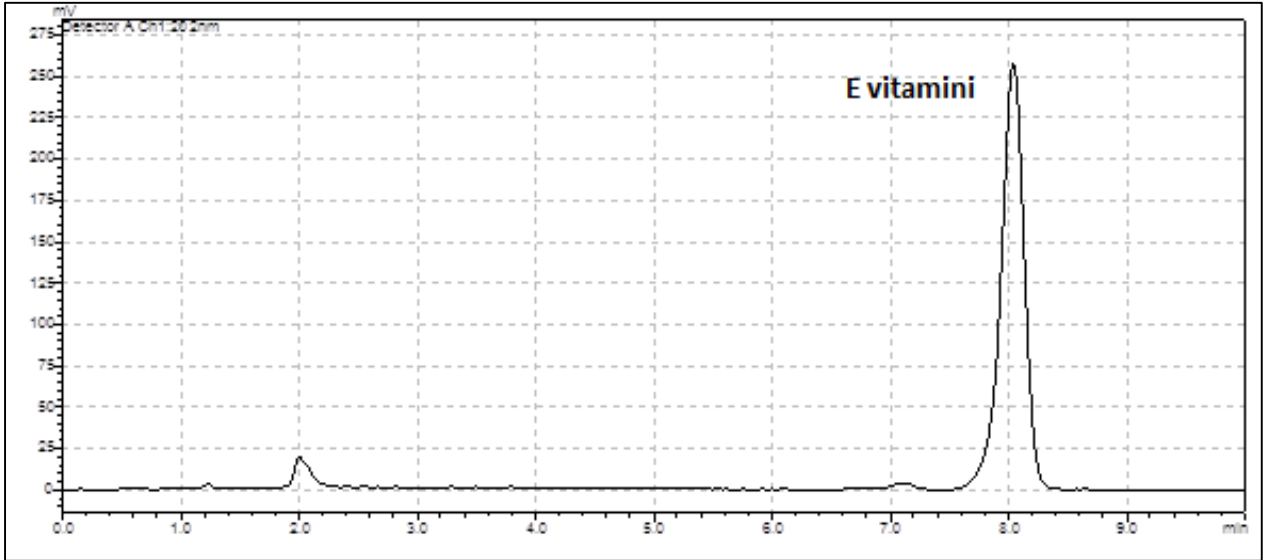
Aşağıda vitamin analizinde kullanılan HPLC koşulları ve kromatogramlarından bazı örnekler verilmiştir. Tüm örnekler C18 kolon 25 cm x 4.6 mm x 5.0, ters faz kolonu ile çalışılmıştır.

C vitamini için; dalga boyu 245 nm, akış hızı 1 mL/ dakika, kolon sıcaklığı 30 °C, mobil faz % 0.5 formik asit.

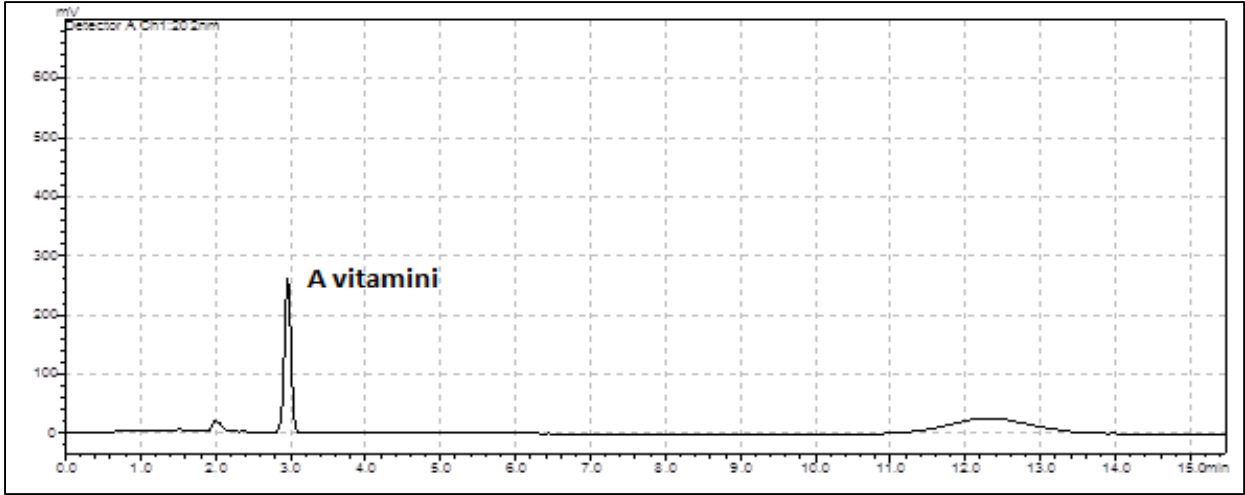


Şekil 2. C vitaminine ait HPLC kromatogramı

A ve E vitamini için; dalga boyu 202 nm, akış hızı 1 mL/ dakika, kolon sıcaklığı 30 °C, mobil faz % 75 acetonitril / %25 metanol.



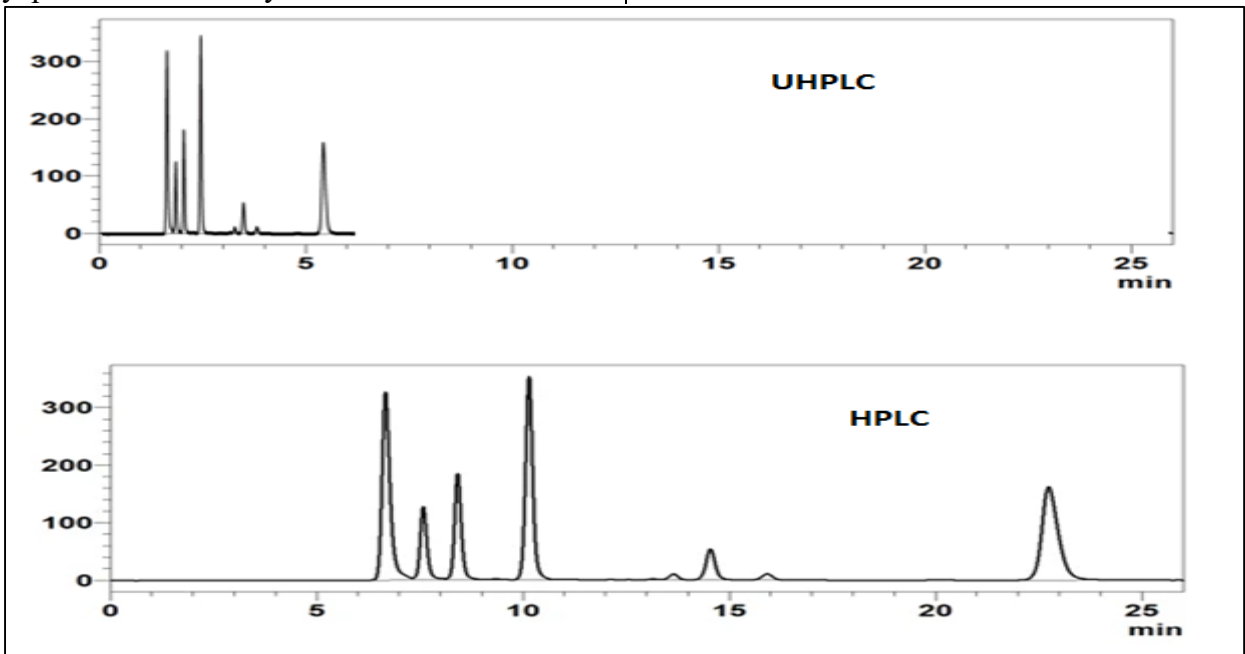
Şekil 3. E vitaminine ait HPLC kromatogramı



Şekil 4. A vitaminine ait HPLC kromatogramı

Son yıllarda HPLC cihazının pompasının daha güçlendirilerek, kolon ve bağlantı parçalarının da daha dayanıklı malzemeler ile güçlendirilmesi sayesinde UHPLC (ultra yüksek performanslı sıvı kromatografi) cihazları üretilebilmiştir. HPLC ile aynı prensiple çalışan UHPLC cihazları çok daha hızlı sonuç verdiği ve dolayısı ile çok daha az mobil faz harcadığı için gün geçtikçe popüler hale gelmektedir. Çünkü çok sayıda numune sahip çalışmalarda zaman daha da önem kazanmaktadır. Mesela HPLC ile 25 dakikalık bir analiz süresi ve 150 numune varsa UHPLC ile yaklaşık 6 dakikaya düşecektir (1). $25 \times 150 = 3750$ dakikalık bir analiz süresi $6 \times 150 = 900$ dakikaya düşecektir. Zamandan yapılan tasarrufun aynı oranda mobil fazdan

da yapıldığını ve dolayısı ile çok daha az kimyasal çözücünün kullanılarak analiz maliyetinin de düşeceğini belirtmekte fayda vardır. Burada daha az mobil faz giderinin beraberinde mobil faz şişesinin boşaldığında tekrar tekrar hazırlanıp, degazörden gazının kaçırılması işlemlerinden ötürü iş gücü ve zaman tasarrufu da olduğunu belirtmekte fayda görüyorum. Ayrıca UHPLC sisteminde numune injeksiyon hacmi de daha düşük olacağından numune miktarı az olan çalışmalar için avantaj sağlayacaktır. Aşağıdaki şekilde aynı numunenin UHPLC ve HPLC kromatogramları görülmektedir. Bazı analizlerde sistemin 10 kata kadar zamanı kısalttığı da olabilmektedir.



Şekil 5. UHPLC ile HPLC ayırımının farkını gösteren örnek bir analiz

UHPLC sisteminin tek dezavantajı pahalı olmasıdır. Birçok üniversite laboratuvarları, resmi kurum ve özel laboratuvarlar bu yüzden hala HPLC sistemlerini kullanmaya devam etmektedirler.

HLPC veya UHPLC sistemlerinin kullanımı sağlık ve fen bilimleri alanlarında oldukça yaygındır. Suda veya diğer çözücülerde (alkol ve türevleri gibi)

çözünebilen tüm bileşiklere bakılabilmektedir. Çeşitli proteinler, protein yapıdaki hormonlar, amino asitler ve türevleri, şekerler, vitaminler, kısa zincirli yağ asitleri, gıdalara katılan tatlandırıcı ve koruyucular, organik asitler, antibiyotik ve pestisitlerin bir kısmı hızlı ve hassas bir şekilde analizi yapılan ve ilk akla gelen örneklerdir.

SONUÇ

Sıvı kromatografinin en yaygın kullanılan ve güvenilen çeşidi olan HPLC ve onun yeni versiyonu diyebileceğimiz UHPLC hem araştırma hemde ticari laboratuvar analizlerinde geçerliliğini korumaktadır. Hızlı ve güvenilir olması sebebiyle geçmişte spektrofotometrik olarak yapılabilen bir çok analiz önce HPLC ye sonra da kademeli olarak UHPLC ye taşınmaktadır.

Son olarak kromatografi ve HPLC konusunda yeni araştırmacılar, beğenilen bir çalışmanın metodunu kendi imkanlarınız ile tekrar edebilmeniz için şu bilgilere ihtiyaç vardır; dedektör çeşidi, dalga boyu, kolon ve mobil faz. Ayrıca piklerin ayırım gücü ve

kalitesi için de sıcaklık ve akış hızı bilgileri gereklidir.

Örneğin balda glukoz/fruktoz tayini için RID dedektörlü HPLC sistemi gereklidir. Bu analizi diğer dedektörler ile yapamayız. Fakat RAD dedektörlü analizler UV dedektör ile kısmen yapılabilir.

İyi bir HPLC kullanıcısı günün birinde laboratuvarına UHPLC gelirse yeni sisteme çok hızlı adapte olabilir ve mevcut metodlarını yeni sisteme uyarlayabilir. İnternette cihaz ve kolon üretici firmalarının bu konudaki doküman ve linklerini bulmak mümkündür.

KAYNAKLAR

1. <https://www.ssi.shimadzu.com/products/liquid-chromatography/knowledge-base/hplc-vs-uhplc.html> erişim tarihi: 10.05.2021