

# HPLC ve Gıdalardaki Uygulama Alanları

Doç. Dr. Fevzi KELEŞ

Atatürk Üni., Ziraat Fak. Tarım Ürünleri Tekn. Zöl. — ERZURUM

## ÖZET

Bir karışım veya çözeltide bulunan ayrı ayrı maddelerin durgun gözenekli bir ortamda, hareketli bir çözücünün etkisiyle farklı hızlarda hareket etmeleri sonucu birbirinden ayrılması işlemine kromatografi denir. Birçok çeşidi olmakla beraber, kromatografi, genelde hareketli fazın gaz veya katı durumda oluşuna göre gaz kromatografisi (GC) veya sıvı kromatografisi (LC) diye iki ana bölüme ayrılabilir. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sıvı kromatografisi içinde yer almaktadır. Bu kromatografide örneği taşıyıcı sıvı, pnömatik veya mekanik pompalarla basınç altında kolondan geçirildiğinden, sıvı fazın kendi halinde kolondan geçişine göre çok daha yüksek hareketli faz hızı sağlanmakta ve ayrılma çabuk ve tam olmaktadır. Isıya duyarlı ve gaz haline getirilmeleri mümkün olmayan gıda bileşenlerinin analizinde HPLC'nin özel bir önemi vardır.

## SUMMARY

HPLC and its Recent Applications to Foods Chromatography is a separation technique. By means of this technique, compounds in the solutions can be separated individually as a result of their different movement by influence of moving phase on the porous stationary phase. There are many kinds of chromatography, but chromatographic methods, generally, falls into two main groups, depending on the state of moving phase. When moving phase is gas or liquid, chromatography is called gas (GC), or liquid chromatography (LC), respectively. High performance liquid chromatography (HPLC) is included in LC. Since liquid carrying the sample is eluted through column under pressure obtained by pneumatic or mechanic pump device, a more precise and quicker separation is carried out than usual chromatography. It is obvious that HPLC has great advantage in the analysis of heat-sensitive constituents of foods, because it is not necessary to vaporize the sample.

## GİRİŞ

Kromatografi bir karışımı meydana getiren bileşiklerin, durgun gözenekli (poröz) bir ortamda hareketli bir çözücünün etkisiyle farklı hızda hareket etmeleri sonucu birbirinden ayrılmasıdır. Kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın bileşikler en ileri kristallen-dirme veya damıtma metodlarıyla bile ayırmak imkânsızdır. Oysa, kromatografik metodlarla bunları kolayca ve kısa sürede ayırmak mümkündür. Genelde hareketli fazın gaz veya katı oluşuna göre gaz kromatografisi (GC) veya sıvı kromatografisi (LC) söz konusudur. Örneği taşıyıcı sıvı, pnömatik veya mekanik çalışan pompalarla kolondan geçirildiğinde, sıvı fazın kendi halinde kolondan geçişine göre çok daha yüksek hareketli faz hızı sağlanmakta ve ayırma çabuk ve tam olmaktadır. Ayrılan bileşikler kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tesbit edilerek kaydedilmektedir. Böyle yüksek hızda ve etkin bir şekilde gerçekleştirilen ayırmaların yapıldığı kromatografi sistemlerine yüksek performanslı sıvı kromatografisi veya yüksek basınçlı sıvı kromatografisi denir ve İngilizcedeki baş harflerin alınmasıyla kısaca HPLC diye belirtilir. Sıvı kromatografisi denilince bu yeni ve modern sıvı kromatografisi anlaşılmalıdır.

## HPLC

### (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi)

Sıvı kromatografisinin teorisi gaz kromatografisinininki ile aynıdır; ancak uygulama alanları farklıdır. Bununla beraber, birçok bileşik her ikisi ile de ayrılabilir. Kolondan çıkan bileşikler toplanarak başka işlemlere tabi tutulacaklarsa, yani preparatif kromatografisi gerekli ise gaz kromatografisi tercih edilir. Çünkü ayrılan bileşikler gaz fazının uçurulmasıyla kolayca elde edilebilmektedir. Ancak kullanılabilen her bir örneğin miktarı çok daha fazla olduğundan, bazen preparatif çalışmalarda da HPLC daha avantajlı olabilir. Ayrılabilecek bileşik ısıya duyarlı veya kolaylıkla uçucu hale getirilemeyecek kadar büyük moleküllü ise sıvı kromatografisi daha elverişlidir. Gaz kromatog-

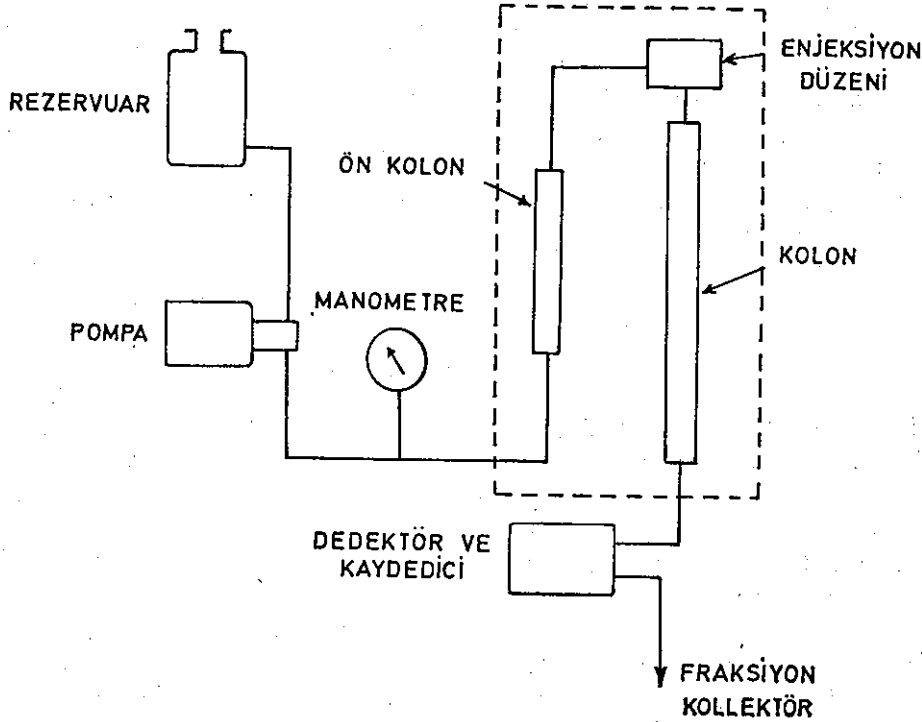
rafisinde kolon yüksek sıcaklıkta tutularak ayrılacak bileşikler gaz haline getirildiğinden, kaynama noktası 500°C ye kadar olan bileşikler ayrılabilir. Bu gün için daha yüksek sıcaklığa dayanabilecek durucu fazlar geliştirilememiştir. Bu nedenle, gaz kromatografisi ile molekül ağırlığı 500'e kadar olan bileşikler ayrılabilir. Ayrırma sıvı halde ısı ile gaz haline geçirilmeden gerçekleştirildiği için sıvı kromatografisi ile çok daha büyük moleküllü bileşikler ayrılabilir (Sherma, 1972; Krejci ve ark., 1975; Saunders, 1975; Obalı, 1981; Keleş, 1986).

Sıvı kromatografisi gelişmekte olan bir tekniktir ve giderek birçok alanda gaz kroma-

tografisinin yerini almaktadır. 1983 - 1985 yılları arasındaki 2 yıl içinde HPLC'ye ait 8000'in üzerinde makalenin abstraktlara geçtiği belirtilmektedir (Barth ve ark., 1986).

#### HPLC Sistemi

HPLC sistemi Şekil 1'de görüldüğü gibi (1) hareketli fazın tutulduğu rezervuar, (2) pompa, (3) sıvı faz programlayıcı, (4) Enjeksiyon düzeni, (5) kolon, (6) dedektör, (7) kolon ve dedektör kısımları için sıcaklık kontrolü, (8) kaydedici gibi ana kısımlardan oluşur (Saunders, 1975; Obalı, 1981). Başarılı bir ayırma bu kısımların uyum içinde çalışmasıyla mümkündür.



Şekil 1. Modern bir sıvı kolon kromatografisi cihazının şeması

Sıvı kromatografide su, asetonitril ve daha birçok çözücü hareketli sıvı faz olarak kullanılmakta ve pompalarla basınç altında kolondan geçirilmektedir. Pompalar darbesiz ve kesiksiz bir akış sağlayacak özellikte olmalıdır. Sıvı en fazla 400 atm (6000 psi) basınçla gönderilir. Hareketli fazlar ve bunlarda aranan özelliklerle ilgili ayrıntılı bilgi için Obalı (1981)'e başvurulabilir.

Ayrırma sırasında hareketli sıvı fazın bileşimini değiştirme işine sıvı programlama denir. Böylece kolonda büyük bir kuvvetle tutulan maddelerin çıkışları hızlandırılır, yani alıkonma süreleri kısaltılır. Bu işlem gaz kromatografisindeki ısı programlamasının karşılığıdır.

Örnek, enjeksiyon düzeninden kolona verilirken hareketli faz ya akış halindedir veya durdurulmuştur. Örnek hacmi kolon boşluk hac-

minin (tutulmayan bileşiğin yürüməsi için gereken boşluk) 1/50'sinden daha az olmalıdır.

Ayırmanın başarısı büyük oranda kolon seçimine bağlıdır. Kolonun uzunluğu oranında ayrılma iyi olur, ancak bu durumda nisbeten yüksek çalışma basıncı ve uzun süre gerekir. Sıvı kromatografi kolonlarının doldurulması kolay değildir; çoğunlukla hazır olarak satın alınır. Bu durum analiz maliyetini yükselten bir faktördür.

Sıvı kromatografide dedektörün görevi kolondan çıkan sıvının bileşimini izlemek (algılamak) ve meydana gelen değişikliği kaydediciye iletmektir. Tayin edilecek bileşiğe göre en çok kullanılan dedektör tipleri morötesi (UV) ve görünür bölge fotometre dedektörleri ile kırılma indisi, flüoresans, elektrokimyasal v.b. dedektörlerdir. Sıvı kromatografi kolon ve dedektörlerinin geliştirilmesi için yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu konuda Barth ve ark., (1986)'nın derlemesine göz atılabilir.

Sıvı kromatografide kaydetme gaz kromatografisindeki gibi kâğıtlı potansiyometrik kaydedicilerle yapılır. Girişi 1 - 10 mV olan ve sn'de bütün Y eksenini tarayabilen kaydediciler uygundur.

Sıcaklık kontrolü, kırılma indisi dedektörü kullanıldığında kolon ve dedektörde yapılması gereken bir durumdur. İyon değiştirme kromatografisinde sıcaklığın 25 - 80°C arasında artırılmasıyla ayırma hızı yükseltilebilir.

Sıvı kromatografi, kolonlardaki ayırmanın tipine göre sınıflandırılır. Buna göre başlıca 4 tip sıvı kromatografi vardır: Sıvı - sıvı (dağılma), sıvı - katı (adsorpsiyon), iyon değiştirme ve sterik seçicilik (eksklüzyon) kromatografisi (Obalı, 1981).

Sıvı - sıvı kromatografide durucu faz destek katısı ve bunun üzerine tutunmuş sıvıdan oluşmaktadır. Hareketli faz tabii ki sıvıdır. Ayırma, ayırma hunisi kullanılarak yapılan ekstraksiyon işleminin kromatografi kolonu boyunca tekrarlanmasıyla gerçekleştirilmektedir. Ayırmanın dayandığı ilke dağılma (partition)'dir. Ayrılacak bileşik durgun fazda çok, hareketli fazda az çözünmelidir.

Sıvı - katı kromatografisinde bileşikler katı durgun faz üzerinde farklı derecelerde tersinir olarak adsorplanarak ayrılırlar. Buna ince tabaka kromatografisinin kolonda yapısını olarak bakılabilir.

İyon değiştirme kromatografisinde durucu faz olan iyon değiştirici reçine veya zeolite kendi üzerindeki iyonun tersi yükte olan bir iyon ilave edilir ve böylece iyon çifti oluşarak dengeye ulaşır. Ayrılacak iyonik bileşik durucu faz üzerindeki iyon çiftinden ilave edilenin yerine geçerek tutulur. Böylece gerçek iyon değiştirme olmadığından, zamanla iyon değiştiriciyi rejenere etmeğe gerek yoktur. Bu kromatografi ile en çok amino asitler, nükleik asitler, anorganik bileşikler ve zayıf asit ve bazlar ayrılmaktadır.

Sterik seçicilik kromatografisinde, bileşikler moleküler büyüklük ve şekillerine göre ayrılırlar. Bileşiklerin fiziksel yapılarına bağlı bir çeşit süzmedir. Durucu faz gözenekli (poröz) yapıdadır. Gözeneklerin iç çapları ayrılacak bileşiklerin tanecik çaplarına eşittir. Hareketli faz önce kolondan geçirilir ve gözeneklerin içini doldurması sağlanır. Ayrılacak bileşikler kolona verilerek hareketli faz ile yürütüldüğünde, gözeneklere giremeyecek kadar büyük olanlar kolonu hemen terkederler; çok küçük olup porların diplerine yerleşenler en geç, porların hemen girişinde tutulanlar ise orta sürede kolondan çıkarlar. Bu tip kromatografide hareketli fazın polarlığı durucu fazından fazla olursa buna ters faz (reversed phase) kromatografi denir. Jel geçirgenlik (permeasyon) ve jel filtrasyon kromatografileri de sterik seçicilik kromatografisi içinde yer almaktadır. Bunlarla ısıya duyarlı büyük moleküllü biyokimyasal bileşikler birbirinden ayrılarak tayin edilmektedir.

#### HPLC'de Ayırma Tipinin Seçimi

Ayrılacak bileşiklerin 200 - 2000 arasında molekül ağırlıklı olanlara sıvı - katı, sıvı - sıvı ya da iyon değiştirme, 2000'inin üzerindekiyle ise seçicilik kromatografisi uygulanır. Ayrılacak karışım üzerinde basit bir çözünürlük testi yapılarak ayırma tipi seçilir. Genel olarak suda çözünenlere iyon değiştirme veya sıvı - sıvı kromatografisi uygulanır. Suda az çözünen iyon-

laşabilen bileşikler için iyon değiştirme, ben-zeh veya izo - oktanda çözünenler için ise sıvı - katı kromatografisi uygundur. En iyi tekniğin seçiminde şüpheye düşüldüğünde ayrıntılı ön deneme bilgisi toplamak yerine sınama-yanılma metoduna başvurmak daha iyidir.

Sıvı kromatografide iyi bir ayırma elde etmek için önce sistem tasarlanır, kısımlar bir araya getirilir ve denenir, sonuçlar değerlendirilir ve değişkenlerin optimize edilmesine çalışılır. İşe başlandığında ilk yapılan deneyle istenen sonucu almak nadiren mümkündür. Deney parametrelerinin optimizasyonu, teorik ve teknik bilgilerin ışığında birtakım teknik kriterlerin tesbiti ve bunlara ait hesaplamaların yapılmasıyla gerçekleştirilir. Sonuçların değerlendirilmesi inört alıkonma süresi, dağılıma oranı, ayrılma gücü (resolution), teorik plaka sayısı, teorik plaka eşdeğer yüksekliği, kolon geçirgenliği v.b. kriterlerle yapılır (Saunders, 1975).

#### HPLC'nin Gıdalardaki Uygulama Alanları

Son yıllarda HPLC'nin gıda analizlerinde kullanılması büyük boyutlara ulaşmıştır. Burada daha çok en yeni uygulamalar kaydedilecektir.

Gıdalardaki basit şekerler, giderek HPLC ile analiz edilmektedir. Şeker analizinde genelde duyarlılığı daha az olan kırılma indisi dedektörleri kullanılmakla beraber, dedektörlerde yapılan geliştirmeler sayesinde baklagil tanelerinde (Knudsen, 1986), sütte (Morowski, 1984) ve birçok gıdada, gaz kromatografisindeki gibi önceden türevlendirmeye gerek kalmadan, herbir şekerin 10 ng (10 g<sup>-9</sup>) kadar düşük miktarı bile bir analizde birarada tayin edilebilmektedirler (Macrae, 1981).

Vitamin analizinde HPLC büyük başarı sağlamıştır. Tiyamin riboflavin ve niyasin gibi su- da çözünen vitaminler, HPLC ve mikrobiyolojik ve kimyasal metodlardan daha kolay, daha

kısa sürede ve duyarlılıkla anali zedilmektedir (Macrae, 1981). Süt ürünlerinde D vitamininin 0.01 İ.Ü/g miktarları, E vitamininin izomerleri birarada belirlenebilmekte (Macrae, 1981; Morawski, 1984; Van den Berg ve ark., 1986), değişik gıdalardaki A vitamini ve karotenler kolay, hızlı ve güvenilir şekilde tayin edilmekte (Bureau ve Bushway, 1986; Bushway, 1986), 0.05 mikrogram seviyelerindeki askorbik asit ve dehidroaskorbik birarada tesbit edilebilmektedir (Hacem ve ark., 1986).

Uçuculuğu az olan tad maddelerinden biracılık ürünlerindeki alfa - ve beta asitleri ile palifenolier, çay ve alkolsüz içkilerdeki kafein, sakkarin ve benzoatlar HPLC ile birlikte tayin edilebilmekte (Macrae, 1981), baharatlardaki kapsaisinoid'ler gibi yakıcılık maddeleri, tabii yapı ve özelliklerine zarar verilmeden analizlenmektedir (Legu, 1984).

Meyve sularının ve diğer meyve ürünlerinin şeker, organik asit ve fenolik madde profilleri HPLC ile kolaylıkla ortaya konulmakta ve her meyve suyu için geliştirilen otentiklik matriksleri sayesinde her türlü hile ve tağşişler belirlenerek kalite kontrolünde ilerlemeler sağlanmaktadır (Coppola, 1984).

Toksik bileşiklerden mikotoksinler, nitrozo bileşenleri, pestisitler, aromatik hidrokarbonlar ile ilaç kalıntıları HPLC ile güvenilir bir şekilde belirlenmektedir (Macrae, 1981; Hışıl, 1982). Patates ve ürünlerinde glikoalkaloidler (Carman ve ark., 1986; Hellanas, 1986), çeşitli gıdalarda fitik asit (Cilliers ve ark., 1986), soya ve ürünlerinde saponinler (Ireland ve ark., 1986) HPLC ile daha güvenilir şekilde tayin edilmektedir.

Yukarıda bir kısmına değinilen uygulama alanları HPLC'nin çok yönlülüğünü göstermektedir. Tüm son gelişmeleri ayrıntılarıyla vermek mümkün olmadığından, bu makalede konuya belli bir bakış getirilmeye çalışılmıştır.

## KAYNAKLAR

- Barth, H.G., W.E. Barber, C.H. Lochmüller, R.E. Majors, F.E. Regnier, 1986. Column liquid chromatography Anal. Chem. 58 (5): 211R-250R.
- Bureau, J.L., R.J. Bushway, 1986. HPLC determination of carotenoids in fruits and vegetables in the United States. J. Food Sci. 51 (1): 128 - 130.
- Bushway, R.J., 1986. Determination of alpha- and beta- carotene in some raw fruits and vegetables by high-performance liquid chromatography. J. Agric. Food Chem. 34 (3): 409 - 412.
- Carman - A.S. Jr., S.S. Kuan, G.M. Ware, O.J. Jr. Francis, G.P. Kirshenheuter, 1986. Rapid high-performance liquid chromatographic determination of the potato glycoalkaloids alpha-solanine and alpha-chaconine. J. Agric. Food Chem. 34 (2): 279 - 282.
- Cilliers, J.J.L., van P.J. Niekerk, 1986. LC determination of phytic acid in food by post-column colorimetric detection. J. Agric. Food Chem. 34 (4): 680 - 683.
- Coppola, E.D. 1984. Use of HPLC to monitor juice authenticity. Food Technol. 38 (4): 88 - 91.
- Hellenäs, K. - E. 1986. A simplified procedure for quantification of potato glycoalkaloids in tuber extracts by h.p.l.c.; comparison with ELISA and a colorimetric method. J. Sci. Food Agric. 37 (8): 776 - 782.
- Hışıl, Y. 1982. Pestisit kalıntılarının analizleri II. Gıda 7 (6): 289 - 295.
- Ireland, P.A., S.Z. Dziedzic, M.W. Kearsley, 1986. Saponin content of soya and some soya products by means of high-performance liquid chromatography of the sapogenins. J. Sci. Food Agric. 37 (7): 694 - 698.
- Kacem, B., M.R. Marshall, R.F. Matthews, J.F. Gregory, 1986. Simultaneous analysis of ascorbic and dehydroascorbic acid by high-performance liquid chromatography with postcolumn derivatization and UV absorbance. J. Agric. Food Chem. 34 (2): 271 - 274. ...
- Keleş, F. 1986. Laboratuvar Tekniği (Öğrenci Teksiri), s. 179, Ziraat Fakültesi, Erzurum.
- Knudsen, I.M. 1986. High-performance liquid chromatographic determination of oligosaccharides in leguminous seeds. J. Sci. Food Agric. 37 (6): 560 - 566.
- Krejci, M., Z. Pechan, Z. Deyl, 1975. Techniques of liquid chromatography, p. 101, «Liquid Column Chromatography, Deyl, Z., Macek, K., Janak, J., eds., Elsevier Scientific Publ. Co., Amsterdam».
- Lego, M.C. 1984. HPLC in the flavor/spice industry. Food Technol. 38 (4): 84 - 87.
- Macrae, J. 1981. Recent applications of high pressure liquid chromatography to food analysis. J. Food. Technol. 16 (1): 1 - 11.
- Morawski, J. 1984. Analysis of dairy products by HPLC. Food Technol. 38 (4): 70 - 78.
- Obalı, M. 1981. Sıvı kromatografisi, s. 115, «Denel Organik Kimya, Erdik, E., ed., 2. baskı, A.Ü. Fen Fakültesi Organik Kimya Araştırma Enstitüsü Yayınları No. 1, Ankara».
- Saunders, D.L. 1975. Techniques of liquid column chromatography, p. 77, «Chromatography, Heftman, E., ed., 3th edition, Van Nostrand Reinhold Co., New York».
- Sherma J. 1972. Liquid column chromatography, p. 25, «CRC Handbook of Chromatography, vol. II, Zweig, G., Sherma, J. eds., CRC Press 18901 Cranwood Parkway, Cleveland, Ohio 44128».
- Van den Berg, H., P.G. Boshuis, W.H.P. Shreurs, 1986. Determination of vitamin D in fortified and nonfortified milk powder and infant formula using a specific radioassay after purification by high-performance liquid chromatography. J. Agric. Food Chem. 34 (2): 264 - 268.