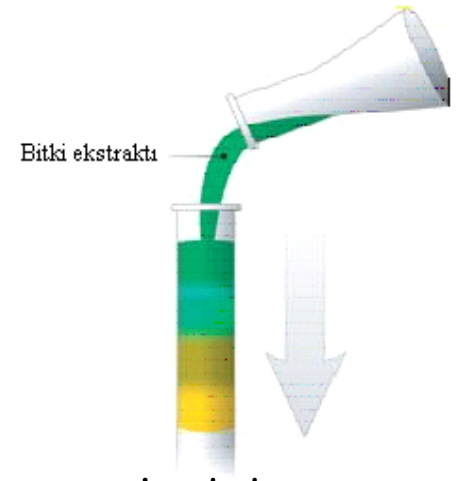


Yarıyıl	Eğitim ve Öğretim Yöntemleri							Krediler		
	Teori	Uyg.	Lab.	Proje/Alan Çalışması			Diğer	Toplam	Kredi	AKTS Kredisi
Dersin İçeriği	Kromatografinin tanımı, Kromatografinin teorisi, , Kolon kromatografisi, Düzlemsel kromatografisi , gaz kromatografisi, sıvı kromatografisi, yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, İyon değiştirme kromatografisi									
Dersin Amacı	Kromatografi de geçen kavramlar ve kromatografik teknikler hakkında bilgilendirme,									
Öğrenme Çıktıları ve Yeterlilikler	Öğrencinin, kromatografi ve kromatografik teknikler hakkında bilgi sahibi olması									
Ders Kitabı ve/veya Kaynaklar	[1] D. A. Skoog, D. M: West, F. J. Holler, S. R. Crouch, Fundamentals of Analytical Chemistry, 8. Edition, 2004. Çeviri editörleri: E. Kılıç, H. Yılmaz. Analitik Kimya Temel İlkeler. 8. Baskı. [2] D.C: Harris, Nicel Kimyasal Analiz, 8. Baskı, 2015, Çeviri Editörü : A. R. TÜRKER, Palme Yayıncılık.									
Değerlendirme Ölçütleri						Varsa (X) olarak işaretleyiniz			Yüzde(%)	
	Ara Sınavlar					x			40	
	Projeler									
	Dönem Ödevi									
	Laboratuvar									
	Diğer									
	Dönem Sonu Sınavı					x			60	
Ders Sorumluları	Prof. Dr. Mehmet Sayım KARACAN									
Hafta	Konular									
	1. Kromatografiye giriş, Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması, 2. Kolon kromatografisi 3. Kromatografide temel kavramlar 4. Düzlemsel Kromatografi 5. Kromatografide kalitatif ve kantitatif analiz 6. Kantitatif analiz uygulamaları 7. Ara Sınav 8. Gaz kromatografisi, 9. Gaz kromatografisi 10. Sıvı Kromatografisi ,Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) 11. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) 12. İyon değiştirme kromatografisi, 13. Süper kritik akışkan kromatografisi									
Prof.Dr. Mehmet Sayım KARACAN										1

KROMATOGRAFI

1903 Yılında Rus botanikçi Michail Semenovitch Tswett tarafından bulunmuştur.

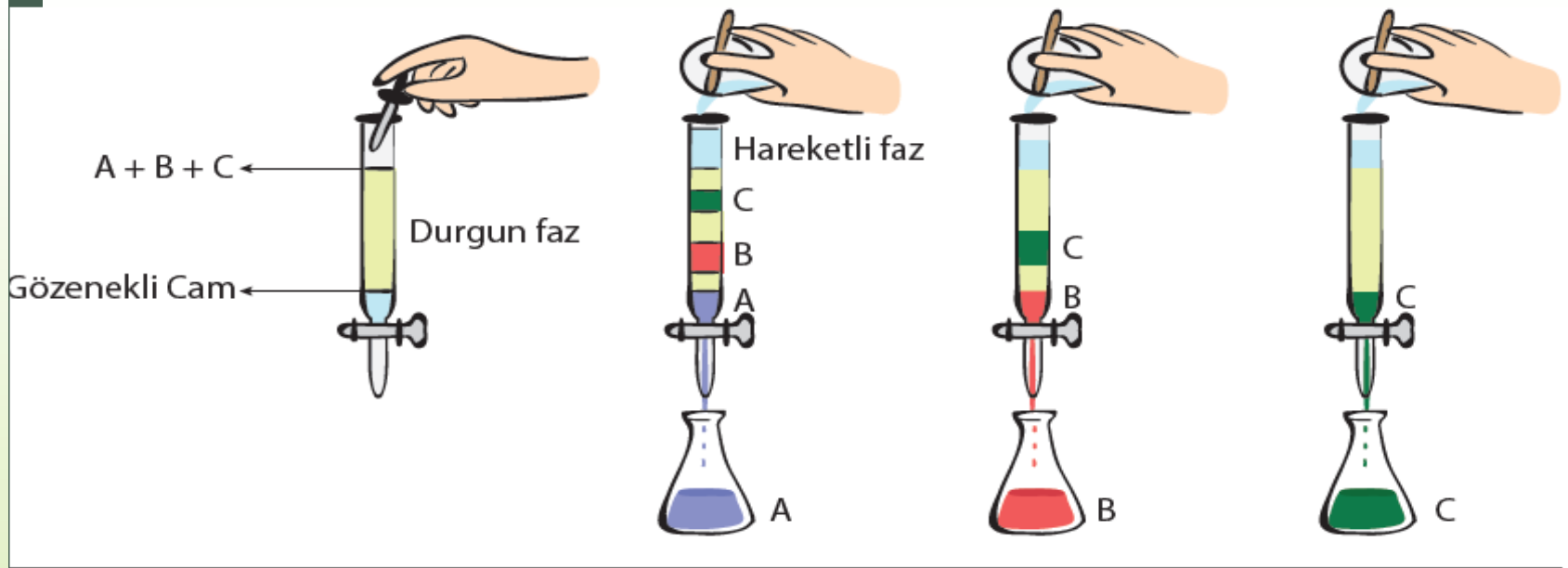
chroma (renk) + *graphein* (kaydetmek) → *kromatografi*



Kromatografi yaygın olarak kullanılan birçok ayırma tekniğinin genel adıdır. İlk defa 1906 yılında Rus botanikçi Mikhail Tsvett tarafından uygulanmıştır. Tsvett, bitkilerden elde ettiği özütü petrol eteri ve etanolde çözerek bu çözeltiyi toz halde CaCO_3 ile doldurulmuş bir kolona uyguladı. Aynı çözücü ile bu karışımı kolonda yürütmeyi deneyen Tsvett, bitki pigmentlerinin (A,B,C) kolonda farklı hızlarla ilerlediğini ve birbirinden ayrıldığını görmüştür.

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.



Genel olarak **kromatografi**, bir karışımdaki bileşenlerin durgun bir katı yüzeyi ile hareketli bir akışkan (sıvı veya gaz) arasında dağılması esasına dayanır.

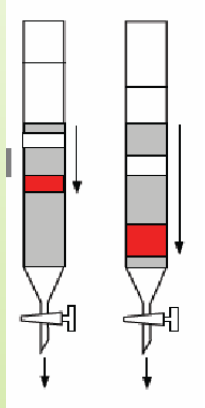
Maddenin katı yüzeyine tutunması ya adsorpsiyon ya da yüzeydeki bir sıvı filmi içinde çözünmesi sonucu gerçekleşir. Başka bir deyişle durgun faz ya bir katı yüzeydir ya da katı yüzeyini kaplamış bir sıvı filmidir. Akışkan katı yüzeyinde akarken dağılma işlemi art arda binlerce kez tekrarlanır. Yani yüzeye tutunmuş bileşen akışkan ortama geçer. Sonra akışkan ortamdan yüzeye tekrar tutunur. Bu süreç bileşen kolonu terk edene kadar devam eder.

Her bileşenin durgun ve akışkan fazlar arasında dağılma oranları farklıdır. Bazı bileşenler durgun fazda daha uzun süre tutunurken bazıları akışkan ortama geçme eğilimi taşır. Sonuçta akışkanın farklı bileşenleri taşıma hızı farklı olur. Kromatografide ayırma işleminin esası budur.

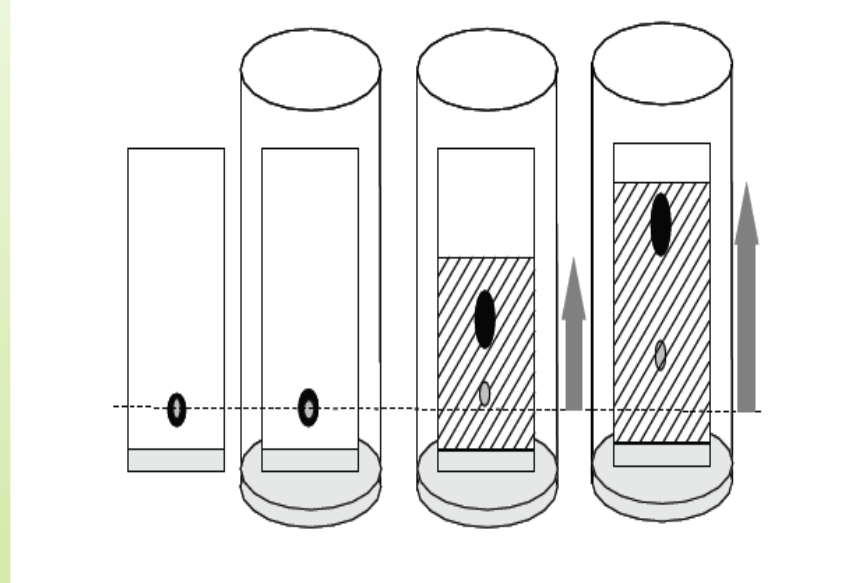
Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Sabit fazın şekline göre aşağıdaki gibi sınıflandırılır.

1. Kolon kromatografisi



2. Düzlemsel kromatografi



Hareketli (mobil) fazın fiziksel haline göre aşağıdaki gibi sınıflandırılır.

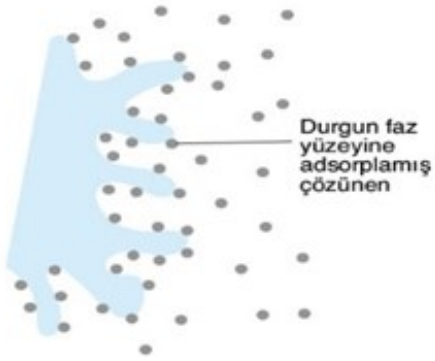
1. Gaz kromatografisi (GC)
2. Sıvı kromatografisi (LC) (HPLC)
3. Süperkritik-akışkan kromatografisi (SFC)

Hareketli ve Sabit faz arasında gerçekleşen işlemlere göre aşağıdaki gibi sınıflandırılır.

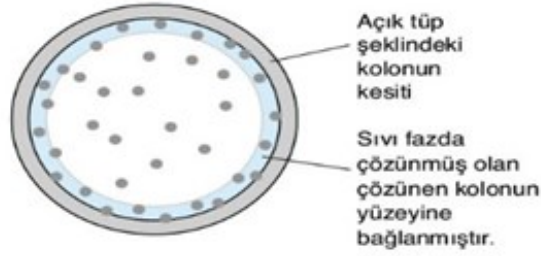
1. Adsorpsiyon kromatografisi
2. Dağılım (partisyon) kromatografisi
3. İyon-değiştirme kromatografisi
4. Eleme (ekskülizyon, boyut ayırma) kromatografisi
5. Afinite (affinity, benzeşme) kromatografisi

Kolon Kromatografik yöntemlerin Sınıflandırılması

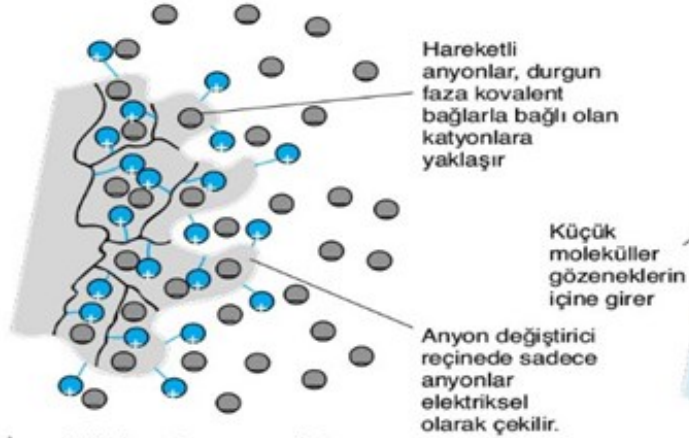
Genel Sınıflandırma	Kromatografi tekniği	Durgun Faz	Denge türü
Gaz Kromatografisi	Gaz-sıvı	Bir katı yüzeye bağlanmış sıvı	Gaz veya sıvı arasında dağılma
	Gaz-katı	Katı	Adsorpsiyon
Sıvı Kromatografisi	Sıvı-sıvı (dağılma)	Bir katı yüzeye bağlanmış sıvı	Birbiri ile karışmayan iki sıvı arasında dağılma
	Sıvı-katı	katı	Adsorpsiyon
	İyon değiştirme	İyon değiştirici reçine	İyon değiştirme
	Boyut ayırma	Bir polimer katının gözeneklerindeki sıvı	Dağılma/eleme
	Afinite (Etkileşim)	Bir katı yüzeye bağlanmış sıvı	İki sıvı arasında dağılma
Süper kritik akışkan Kromatografisi		Bir katı yüzeye bağlı organik türler	Süper kritik akışkan ile bağlı yüzey arasında dağılma



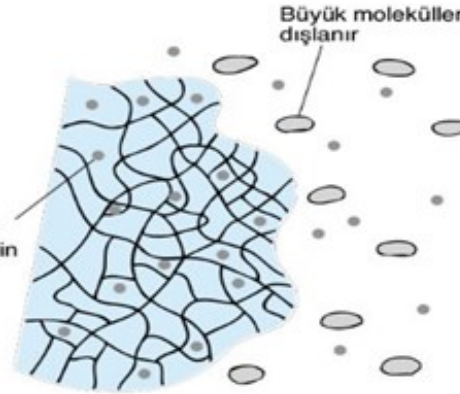
Adsorpsiyon kromatografisi



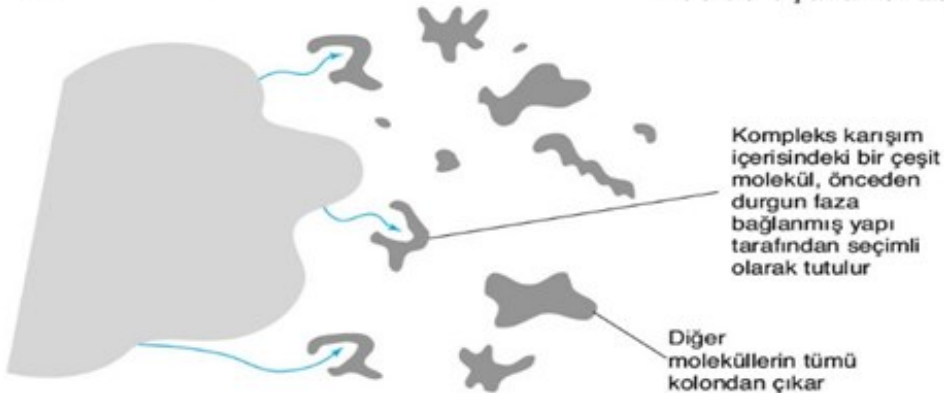
Dağılma kromatografisi



İyon değiştirme kromatografisi



Moleküler dışlama kromatografisi



Etkileşim (afinite) kromatografisi

Yaygın
kromatografik
yöntemlerin tanecik
bazında işleyişleri

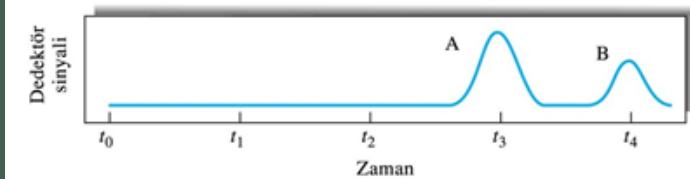
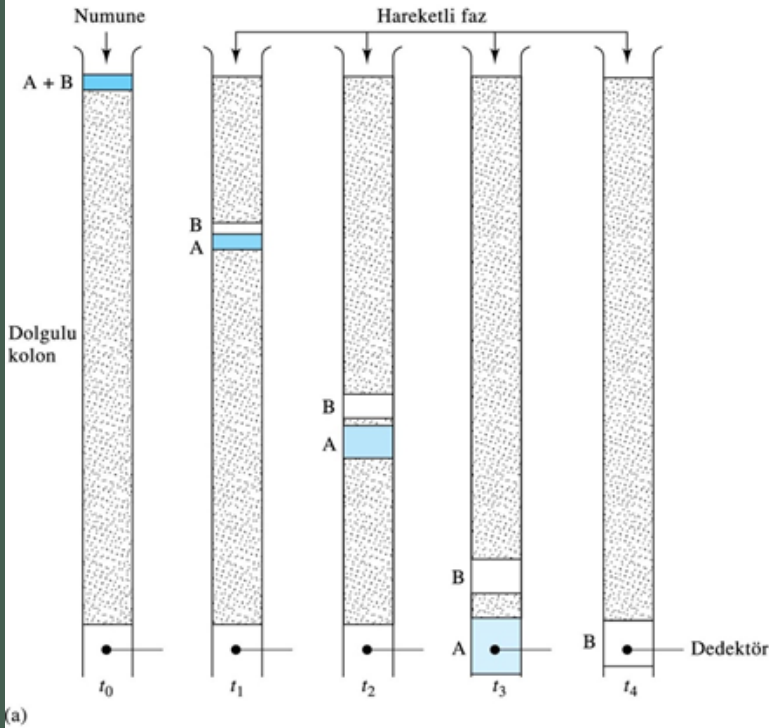
Kolon Kromatografisi

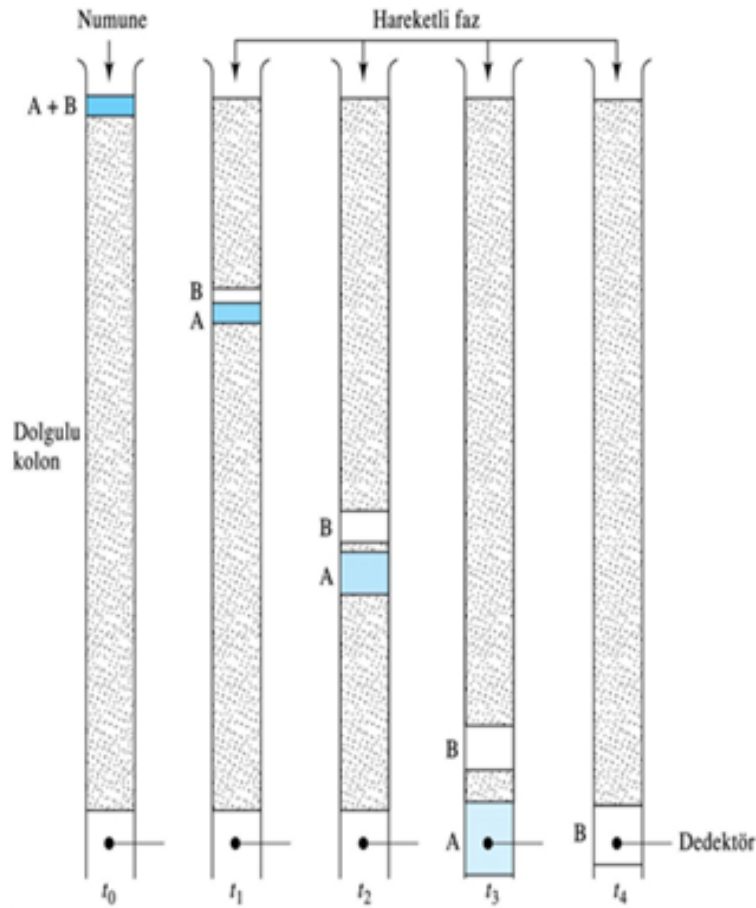
GC, HPLC ve SFC yöntemlerinin her üçü de kolonda gerçekleştirilir.

Hareketli fazın ilerlemesiyle durgun fazda tutunan maddelerin yıkanarak alınmasına **elüsyon (geri alma) denir.**

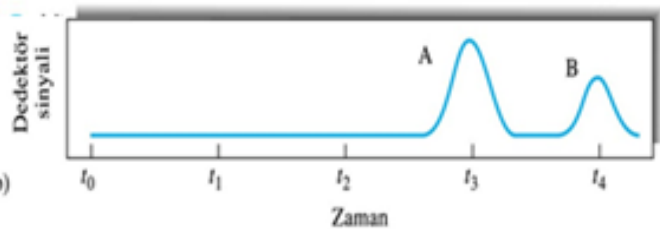
(a) A ve B bileşenlerinden oluşan bir karışımın kolonda ayrılmasının gösterimi

(b) (a)'da görülen elüsyonun farklı basamaklarına karşılık gelen dedektör sinyalleri (kromatogram)



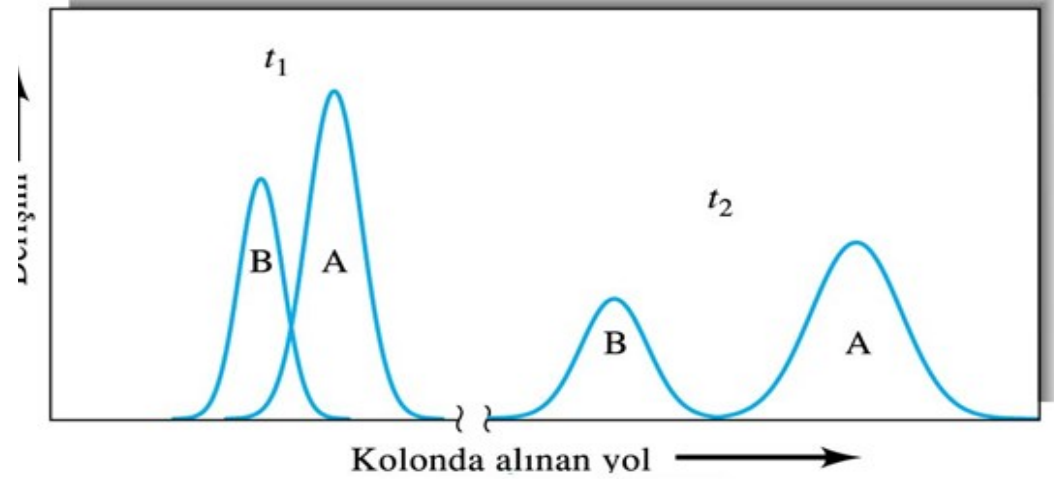


(a)



(b)

(a) Kolon elüsyon kromatografisi ile A ve B bileşenlerinin ayrılma diyagramı.
(b) (a)'da gösterile elüsyonun çeşitli basamaklarında dedektör sinyali.

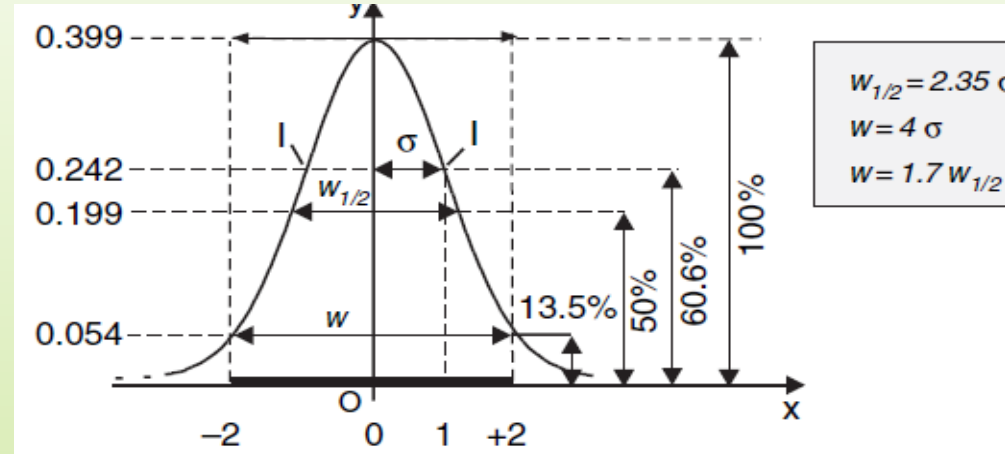
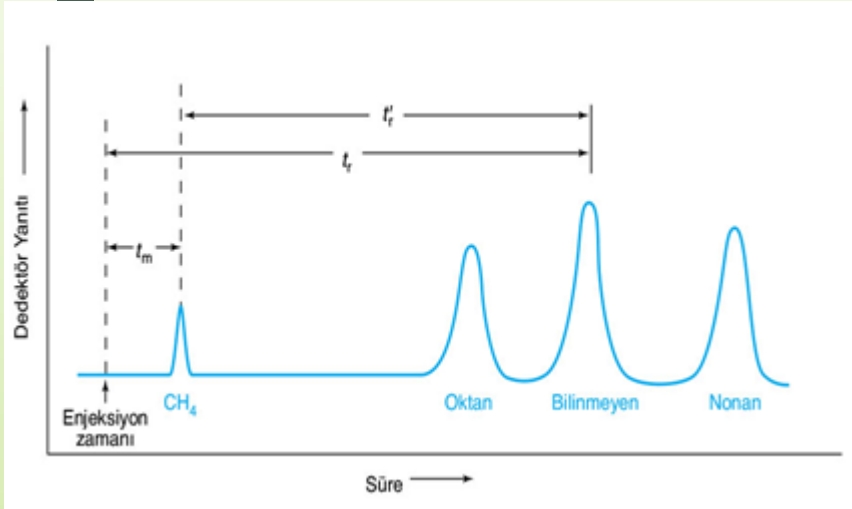


A ve B bileşen bantlarının kolonda iki değişik göç zamanındaki derişim profilleri.

Soldaki Şekilde, bir kromatografik kolonda A ve B maddeleri karışımı bir örneğin, sıyırma işleminin kısa ve uzun olması halinde verdiği konsantrasyon profili görülmektedir. A'nın ayrılma katsayısı B'ninkinden daha büyüktür; bu nedenle göç işlemi sırasında A geride kalır. Kolonun buyu uzadıkça iki pik arasındaki uzaklık artar. Aynı zamanda iki bantta da genişleme olur; bu durum kolonun ayırma verimini düşürür. Ancak göç mesafesi uzadıkça görülen bu band genişlemesi, aynı koşullarda bantların birbirinden ayrılma etkinliğine göre daha zayıftır. Böylece sağdaki şekildeki gibi iyi bir ayırım elde edebilmek için yeteri kadar uzun bir kolona gerekir.

Kromatogram

Bir kromatografi kolonundan geri alınan çözünen madde, dedektörler tarafından algılanır. **Kromatogram**, dedektör yanıtını alıkonma (geri alma) süresinin bir fonksiyonu olarak gösteren grafikdir. Aşağıdaki Şekilde, oktan, nonan ve bilinmeyen bir türün gaz kromatografi tekniği ile ayrılmasında elde edilen kromatogram gösterilmektedir.



Her bir bileşen için **alıkonma süresi**, t_r , söz konusu bileşenin kolona enjeksiyonundan dedektöre varışına kadar geçen süredir. Hareketli faz veya kolonda alıkonmayan herhangi bir çözünen, kolonu mümkün olan en kısa sürede (t_M) terk eder. Kolonda tutulan herhangi bir çözünen için **düzeltilmiş alıkonma süresi**, (t_R') çözücünün çıkışından sonra geçen süredir.

$$t'_{R(A)} = t_{R(A)} - t_M$$

Gaz kromatografisinde t_M genellikle taşıyıcı gazın kolon boyunca hareketi için geçen süredir.

Alıkonma Faktörü (Kapasite Faktörü, k)

Kromatogramdaki her pik için **alıkonma faktörü** k , söz konusu pikin geri alma süresinden hareketli fazın geri alma süresinin t_M çıkartılarak, t_M 'nin katları cinsinden bulunur. Kapasite faktörü (k)'nün 1-5 arasında bir değer göstermesi idealdir.

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

Örnek: Benzen, toluen ve metandan oluşan bir karışım bir gaz kromatografi kolonuna enjekte ediliyor.

Metan 42 s'de keskin bir pik verirken benzen 251 ve toluen de 333 s'de geri alınıyor. (Metan taşıyıcı gazla birlikte hareket etmektedir)

Her bir çözünen için düzeltilmiş alıkonma süresi ve alıkonma faktörünü hesaplayınız.

Benzen için

$$t_R' = 251 - 42 = 209 \text{ s}$$

$$k = (251 - 42) / 42 = 5,0$$

Toluen için

$$t_R' = 333 - 42 = 291 \text{ s}$$

$$k = (333 - 42) / 42 = 6,9$$

Örnek :

Düşük molekül kütleli asitlerin kromatografik analizinde bütirik asit 7,63 min alıkonma zamanıyla elüe edilmektedir. Hareketli faz için ölü zaman ise 0,31 dakikadır. Bütirik asit için kapasite faktörünü hesaplayınız.

$$k_b = (7,63 \text{ min} - 0,31 \text{ min}) / 0,31 \text{ min} = 23,6$$

Ayırma (seçicilik) Faktörü (α)

Bir kolonun iki bileşeni birbirinden ayırmasını derecelendirir.

İki bileşen, için ayırma faktörü α , (aynı zamanda **bağıl alıkonma** olarak da bilinir), düzeltilmiş alıkonma sürelerinin birbirine oranıdır:

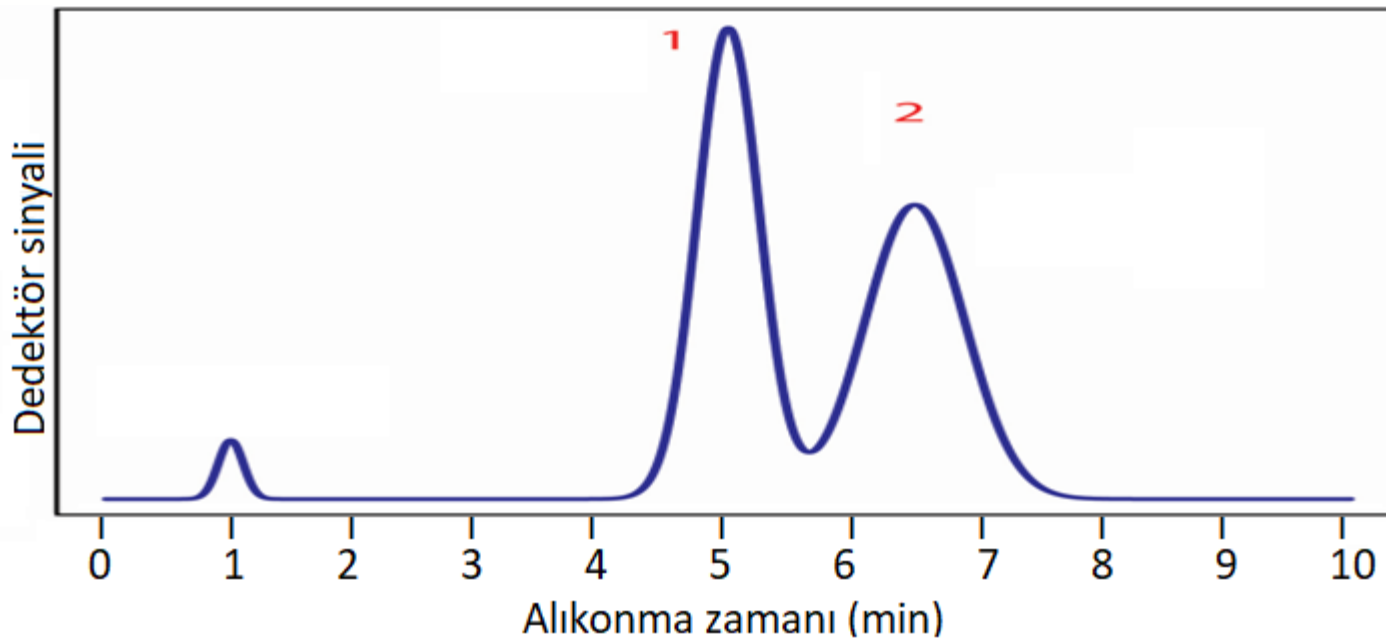
$$\alpha = \frac{t_{R(B)} - t_M}{t_{R(A)} - t_M} = \frac{t'_{R(B)}}{t'_{R(A)}}$$

$\alpha = 1$ ise pikler ayrılmamıştır. Mobil faz bileşimini değiştirerek veya çalışma sıcaklığını ayarlayarak α , 2'den büyük yapılabilir ve böylece iyi bir ayırma sağlanır.

Örnek:

Bir asit karışımında alıkonma zaman izobütirik asit için 5,98 min, bütirik asit için 7,63 min, hareketli faz için (ölü zaman) ise 0,31 min dir. Buna göre izobütirik asitle bütirik asit arasında seçicilik faktörü nedir.

$$\alpha = \frac{t_{R(B)} - t_M}{t_{R(A)} - t_M} = \frac{7,63 - 0,31}{5,98 - 0,31} = 1,29$$



Örnek : Yukarıdaki kromatogram iki bileşenli bir karışıma aittir. Her bileşen için;

- Alıkonma zamanını okuyunuz
- Düzeltilmiş alıkonma zamanını hesaplayınız
- Alıkonma faktörünü hesaplayınız.
- Ayırma faktörünü hesaplayınız.

a) Kromatogramdan t_M 'yi 0,8 t_{R1} 'i 5, t_{R2} 'yi 6,7 olarak okuruz.

a) $t_{R1}' = 5 - 0,8 = 4,2 \text{ min}$

b) $t_{R2}' = 6,7 - 0,8 = 5,9 \text{ min}$

c) $k_1 = \frac{t_{R(1)} - t_M}{t_M} = \frac{5 - 0,8}{0,8} = 5,25$

$k_2 = \frac{t_{R(2)} - t_M}{t_M} = \frac{6,7 - 0,8}{0,8} = 7,38$

d) $\alpha = \frac{t_{R(B)} - t_M}{t_{R(A)} - t_M} = \frac{t_{R(B)}'}{t_{R(A)}'} = \frac{5,9}{4,2} = 1,4$

$$A_{(M)} \rightleftharpoons A_{(S)} \quad K = \frac{C_{AS}}{C_{AM}}$$

Alıkonma faktörü

$$k = \frac{t_{rA} - t_M}{t_M} = \frac{\text{çözünenin sabit fazda geçirdiği zaman}}{\text{çözünenin hareketli fazda geçirdiği zaman}}$$

- Eğer çözünen zamanının hepsini hareketli fazda geçirirse ve durgun fazda hiç kalmazsa t_M zamanında geri alınır.
- $t_R = t_M$ yazılırsa $k = 0$ olur.
- Çünkü çözünen durgun fazda hiç kalmamıştır. Çözünenin durgun fazda ve hareketli fazdaki 2 katı sürede kaldığını düşünelim. Bu durumda alıkonma süresi
- $t_R = 2t_M$ ve $k = (2t_M - t_M) / t_M = 1$ olacaktır. Eğer çözünen durgun fazda, hareketli fazda kaldığının dört katı fazla süre kalırsa,
- $t_R = 4t_M$ ve $k = (4t_M - t_M) / t_M = 3$ olur.

Çözünenin sabit ve hareketli fazda geçirdiği zaman mol sayısı ile doğru orantılıdır.

$$k = \frac{\text{çözünenin sabit fazda geçirdiği zaman}}{\text{çözünenin hareketli fazda geçirdiği zaman}} = \frac{\text{Çözünenin sabit fazdaki mol sayısı}(n_s)}{\text{Çözünenin hareketli fazdaki mol sayısı}(n_m)} = \frac{C_s V_s}{C_M V_M}$$

Burada C_s çözünenin durgun fazdaki, C_M çözünenin hareketli fazdaki derişimi, V_s , durgun fazın hacmi, V_M , hareketli fazın hacmidir. Dağılım sabiti, K ise $K = \frac{C_s}{C_M}$

$$k = \frac{n_s}{n_M} = \frac{C_s V_s}{C_M V_M} = K \frac{V_s}{V_M} \quad k = K \frac{V_s}{V_M}$$

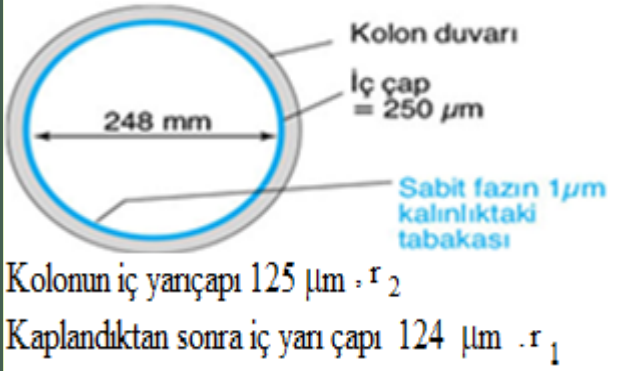
C_s/C_M oranı çözünenin sabit ve hareketli fazlardaki derişimlerinin oranıdır ve **dağılım katsayısı (K)** adını alır.

Örnek: 20 m'lik bir açık borulu kolonla benzen toluen karışımı gaz kromatografisiyle ayrılmak isteniyor. Benzenin alıkınma zamanı 251 s, tolüenin ise alıkınma zamanı 333 s, hareketli fazın alıkınma zamanı ise 42 s dir. Açık borulu kolonun iç çapı 250 μm olup, iç yüzeyi 1 μm durgun fazla kaplanmıştır.

- Benzen için alıkınma faktörünü
- Benzen için Dağılma sabitini
- Benzenin hareketli fazda geçirdiği zaman kesrini bulunuz.
- Benzenin durgun fazda geçirdiği zaman kesrini bulunuz.

a)

$$k = \frac{t_{rA} - t_M}{t_M} = \frac{\text{çözünenin sabit fazda geçirdiği zaman}}{\text{çözünenin hareketli fazda geçirdiği zaman}} = \frac{t_s}{t_m} = \frac{251 \text{ s} - 42 \text{ s}}{42 \text{ s}} = 5$$



b) Durgun faz hacmi $V_s = (\pi r_2^2) - (\pi r_1^2) h = \pi (r_2^2 - r_1^2) h = 3,14 \cdot (125^2 - 124^2) h = 7,8 \cdot 10^2 \times h \mu\text{m}$

Hareketli faz hacmi $V_m = \pi \cdot r_1^2 h = 3,14 \cdot (124 \mu\text{m})^2 = 4,83 \cdot 10^4 \times h \mu\text{m}$

$$\frac{V_s}{V_m} = \frac{7,8 \cdot 10^2 \times h}{4,83 \cdot 10^4 \times h} = 0,0161$$

$$k = K \frac{V_s}{V_M} \quad K = k \frac{V_M}{V_S} = 5 \cdot 1/0,0161 = 310,6$$

c) Hareketli fazda geçirdiği zaman kesri = $\frac{\text{hareketli fazda geçirdiği zaman}}{\text{toplam geçirdiği zaman}} = \frac{t_M}{t_s + t_m} = \frac{t_M}{k t_m + t_m} = \frac{1}{k + 1} = \frac{1}{5 + 1} = 0,17$

d) Benzenin durgun fazda geçirdiği zaman kesri = $1 - 0,17 = 0,83$

Ayrırmanın Etkinliği

Kromatografide bileşiklerin ne kadar iyi ayrılacağı konusunda iki faktör etkilidir. Birincisi pikler arasındaki geri alma sürelerinin farkıdır: Pikler ne kadar ayrı olursa, ayrılmaları o kadar iyidir. İkinci faktör bantların genişliğidir: Bantlar genişledikçe ayırma daha kötü olur.

Ayrırma Gücü (R_s) Bir kromatografi kolonunda

hareket eden çözünen, standart sapması σ olan bir Gauss eğrisi şekline gelme eğilimindedir. Bir çözünen kolonda ne kadar uzun süre kalırsa bant da o kadar geniş olur. Bant genişliği;

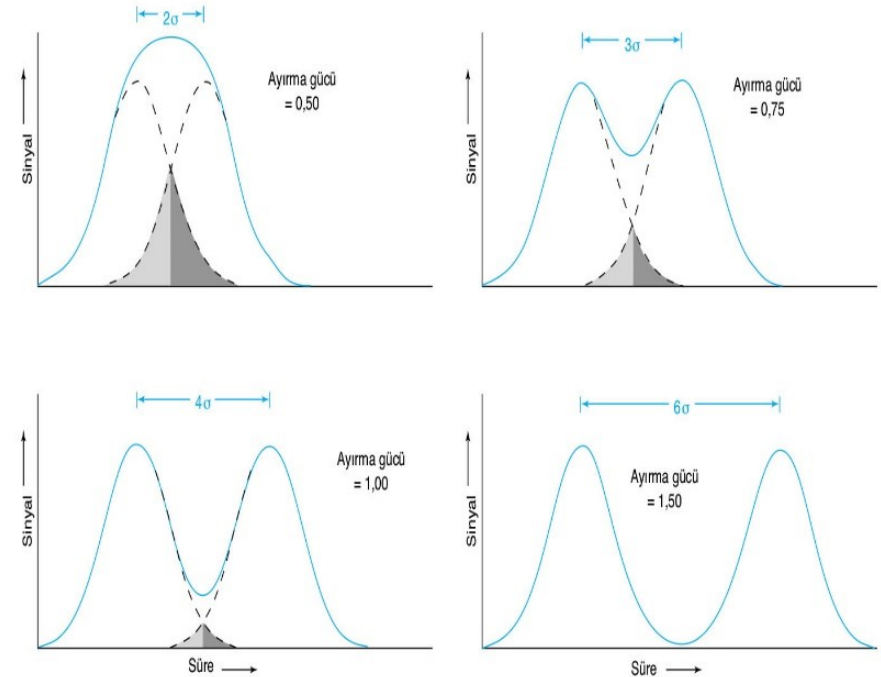
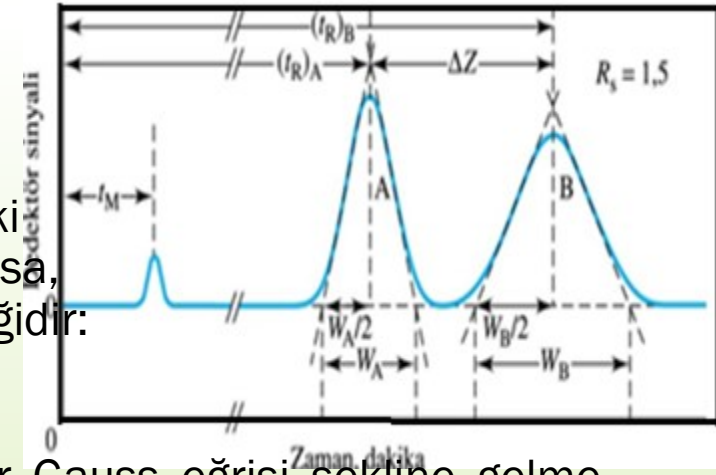
1) pik yüksekliğin yarısında ölçülen $w_{(1/2)}$

($w_{(1/2)} = 2,35 \sigma$, $w = 1,7 w_{(1/2)}$)

2) zemin çizgisinde pikin en dik kısımlarına çizilen teğetler arasındaki genişlik, w ile ifade edilir. Yaygın olarak w kullanılır. ($w = 4\sigma$)

$$R_s = \frac{2[t_{R(B)} - t_{R(A)}]}{W_A + W_B} = \frac{2\Delta t_R}{(W_A + W_B)/2}$$

$$\frac{\Delta t_R}{W_{ort}} = \frac{\Delta t_R}{1,7w_{(1/2)ort}} = \frac{0,589\Delta t_R}{W_{1/2(ort)}}$$



ŞEKİL 22-10 Eşit alan ve genlikteki Gauss piklerinin ayrılması. Kesikli çizgiler her bir piki, sürekli çizgiler iki pikin toplamını göstermektedir. Üst üste binen alanlar taranmıştır.

Ayırma gücü, iki kromatografik pikin birbirinden ayrılma derecesini tanımlayan bir büyüklüktür.

Örnek:

Limon yağında limonenin kromatografik tayininde limonen piki için alıkonma zamanı 8,36 min , pik taban genişliği 0,96 min olarak ölçülmüştür. Limon yağındaki terpinen ise 9,54 min da geri alınmış ve pik taban genişliği 0,64 min olarak ölçülmüştür. Bu iki piki ayırma gücü nedir.

$$R_s = \frac{2(9,54 - 8,36)}{0,64 + 0,96} = 1,48$$

ÖRNEK

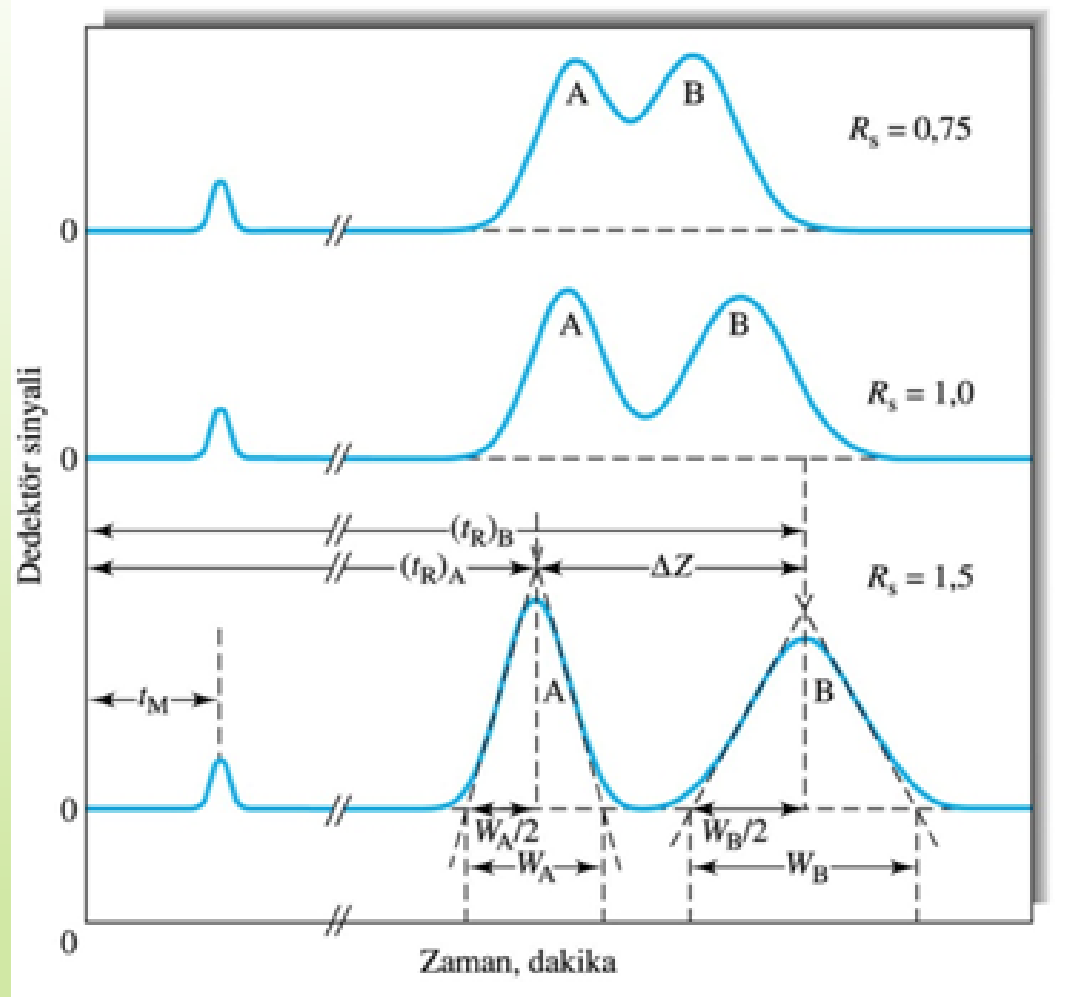
Ayırma Gücünün Ölçülmesi

Alıkonma süresi 407 s olan bir pikin yarı yüksekliğindeki pik genişliği 7,6 s olsun. Ona komşu olan ve $w_{1/2} = 9,4$ s olan pikin de 17 s sonra geldiğini düşünelim. Bu iki bileşen için ayırma gücünü bulunuz.

Çözüm

$$\text{Ayırma gücü} = \frac{0,589 \Delta t_r}{w_{1/2av}} = \frac{0,589(17 \text{ s})}{\frac{1}{2}(7,6 \text{ s} + 9,4 \text{ s})} = 1,18$$

Deneme Sorusu 1,5 düzeyindeki yeterli bir ayırma gücü için piklerin alıkonma süreleri arasındaki fark ne kadar olmalıdır? (**Yanıt:** 21,6 s)

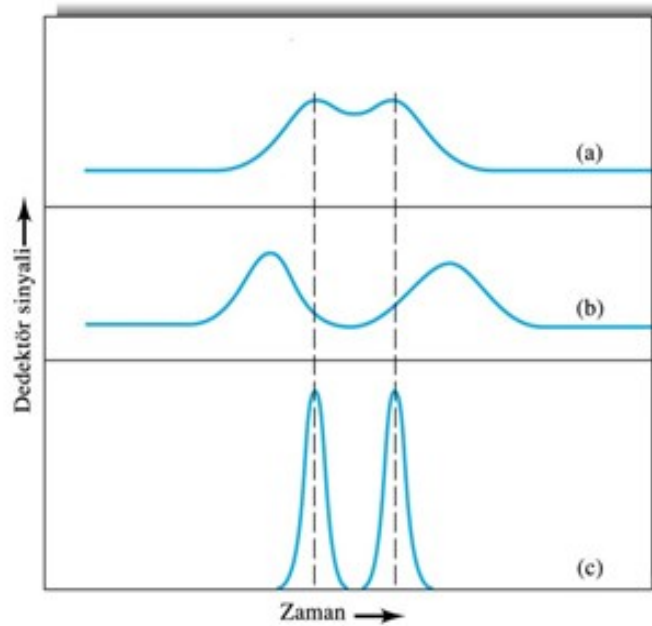


Üç farklı ayırma gücündeki kromatogramlar.

İyi bir kromatografik ayırmada,

(a) maddelerin göç etme hızı, ve

(b) madde piklerinin genişlemeye başladığı bölgenin (uzaklık) tanımlanması önemlidir.



Ayırmayı iyileştirici iki yöntemi gösteren iki bileşenli kromatogram:

(a) pikleri örtüşen orijinal kromatogram;

(b) bant mesafesi artırılarak ayırmanın iyileştirilmesi;

(c) bantlar daraltılarak ayırmanın iyileştirilmesi.

Kromatografik “tabaka teorisi

Kromatografideki ayırma “tabaka teorisi”ne dayanır ve göç hızını kantitatif anlamda tarif eder.

Kromatografi tabaka teorisini Martin ve Syngge geliştirmiştir. Buna göre bir kromatografik kolonun ayrı ayrı, fakat birbirine bitişik dar, yatay bir seri tabakadan (teorik plaka denen) oluştuğu varsayılır. Burada ayırmanın tabaka adı verilen ayrı ayrı plakalarda yapıldığı varsayılır.

Tabaka yüksekliği aynı zamanda *kuramsal bir tabakanın yüksekliği* olarak da bilinir. Yaklaşık olarak herhangi bir çözünen için durgun faz ile hareketli faz arasındaki dağılma dengesinin bir kez kurulabilmesi için gereken kolon uzunluğudur. Her tabakada maddenin hareketli ve sabit fazlar arasında dengeye ulaştığı kabul edilir. Madde ve çözücünün hareketi, bir tabakadan diğerine kademeler halinde hızlı geçiş şeklindedir.

Kromatografik bir kolonun bir ayırma sistemi olarak verimi, denge sayısının artmasıyla yükselir, yani teorik tabaka sayısı arttıkça kolonun verimi de artar. Buna göre yukarıda belirtilen "teorik tabaka sayısı, N " kolon veriminin bir ölçüsüdür.

Daha küçük tabaka yüksekliği, daha dar bant genişliğine yol açar.

Bir kolonun karışım içerisindeki bileşenleri ayırma yeteneği tabaka yüksekliğinin azalması ile artar. Etkinliği iyi olan bir kolonun tabaka sayısı, daima etkinliği düşük olanıkinden daha fazladır. Aynı kolondan geçen farklı çözünenler, farklı tabaka yüksekliklerine sahiptirler.

Bunun nedeni farklı difüzyon katsayılarına sahip olmalarıdır. Tabaka yükseklikleri, gaz kromatografide 0,1 – 1 mm, HPLC’de yaklaşık olarak 10 µm dir.

Tabaka yüksekliği, σ^2/x olup, σ Gauss eğrisi şeklindeki bandın standart sapması, x ise kat ettiği uzaklıktır. L uzunluğundaki bir kolona verilen çözünen için tabaka sayısı kolon uzunluğunun (L) tabaka yüksekliğine bölünmesi ile bulunur

Bunun nedeni, $x = L$ ve $\sigma = w/4$ olmasıdır. Bu eşitlikte, w ’nin birimi uzunluk ölçüsü iken tabaka sayısı birimsizdir. Her L ve w ’yi (veya σ) uzunluk yerine zaman ile birimi ile ifade edersek, N yine birimsiz olacaktır.

$$N = \frac{L}{H} = \frac{Lx}{\sigma^2} = \frac{L^2}{\sigma^2} = \frac{16L^2}{w^2} = \frac{16t_R^2}{w^2}$$

Kromatografik hız teorisi

Tek bir taneciğinin davranışı incelenirse, tanecik göç etme sırasında sabit ve hareketli fazlar arasında binlerce defa gidip gelir. Fazlardan birinde, bir geçişteki kalma süresi düzensizdir ve çevresinden tesadüfen aldığı termal enerji yeterli düzeye ulaştığında diğer faza geçer. Böylece bir fazda kalma süresi bazen çok kısa bazen da çok uzun olabilir.

Tanecik sadece hareketli fazda kalış süresince kolonda ilerleyebilir. Buna göre, kolondaki ilerlemesi de düzensizdir. Fazlarda kalış süresinin kararlı olmayışı her taneciğin hareketli faza geçişindeki ortalama hızın da değişik olmasına yol açar.

Bir kolondaki çalışma şekli, çözünen maddenin durağan ve hareketli faz arasında dengelenmesi için geçen zamana bağlıdır (plaka modelinde ise durgun faz ile hareketli faz arasındaki denge çok hızlıdır). Bundan dolayı, bir kromatografik pikin oluşturduğu bant şekli, elüsyon hızından etkilenir.

Taneciklerin sabit fazdan hareketli faza geçişleri farklıdır. Kolonda göç aşağı doğru sadece tanecik hareketli fazda iken mümkün olur. Bazı tanecikler hareketli fazda daha fazla zaman geçirirken bazıları durgun fazda diğerlerinden fazla vakit geçirirler. Böylece taneciklerin kolondan geçiş hızı bir ortalama değerle ifade edilir.

Bantlar Niçin Genişler

- Kolonun alt bölgelerine inildikçe alınan kromatografi eğrisindeki bantların genişliği artar; çünkü taneciklerin bir fazda kalma zamanı dolayısıyla göç etme süresi uzar. Buna göre bölgesel bant genişlemesi kolondaki kalma süresi ile bağıntılıdır ve hareketli fazın akış hızıyla ters orantılıdır.
- Kolon içi davranışlarla bant genişlemesine katkıda bulunan çeşitli mekanizmalar, plaka yüksekliği için Van Deemter denkleminde aşağıdaki gibi ifade edilir.

$$H = A + \frac{B}{u} + Cu$$

Burada u ortalama hız,

A: çoklu akış yolları (eddy difüzyonu)

B: uzunlamasına difüzyon

C: kütle transferine direnç

Ayrıca, kolona yüklenme esnasında da bant genişlemesi olur.

Kolon Dışında Genişleme

Çözünen hiçbir zaman kolona sonsuz küçük bir bölge halinde uygulanamaz, bu nedenle kolona girmeden önce bile bandın belirli bir genişliği vardır.

Kapasite faktörünün Ayırma gücüyle ilişkisi

Analitlerin kolonda göç etme hızlarını tanımlamak amacıyla yaygın olarak kullanılan önemli bir büyüklüktür. Kapasite (alıkonma) faktörü (k)'nın 1-5 arasında bir değer göstermesi idealdir. Uygun bir kolonun seçilmiş olması halinde k değeri mobil fazın bileşimi değiştirilerek ayarlanabilir. Kapasite faktörünün ayırma gücü ile ilişkisi aşağıdaki bağıntıyla verilir.

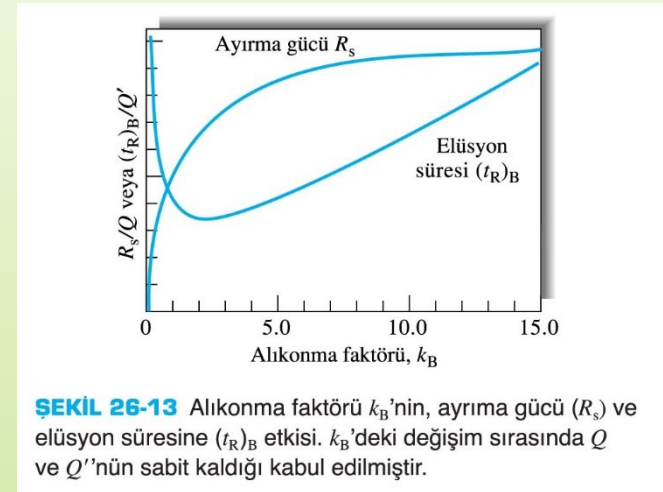
$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left\{ \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right\} \left\{ \frac{k_B}{1 + k_B} \right\}$$

Denkleminde, ilk iki terime Q dersek, denklem,

$$\frac{R_s}{Q} = \frac{k_B}{1 + k_B}$$

Olur, bunun da k_B ye karşı grafiği şekildeki gibidir.

Şekilden de görüldüğü k değeri için 1- 5 aralığında hem Ayırma gücü en fazla hem de elüsyon süresi en azdır.

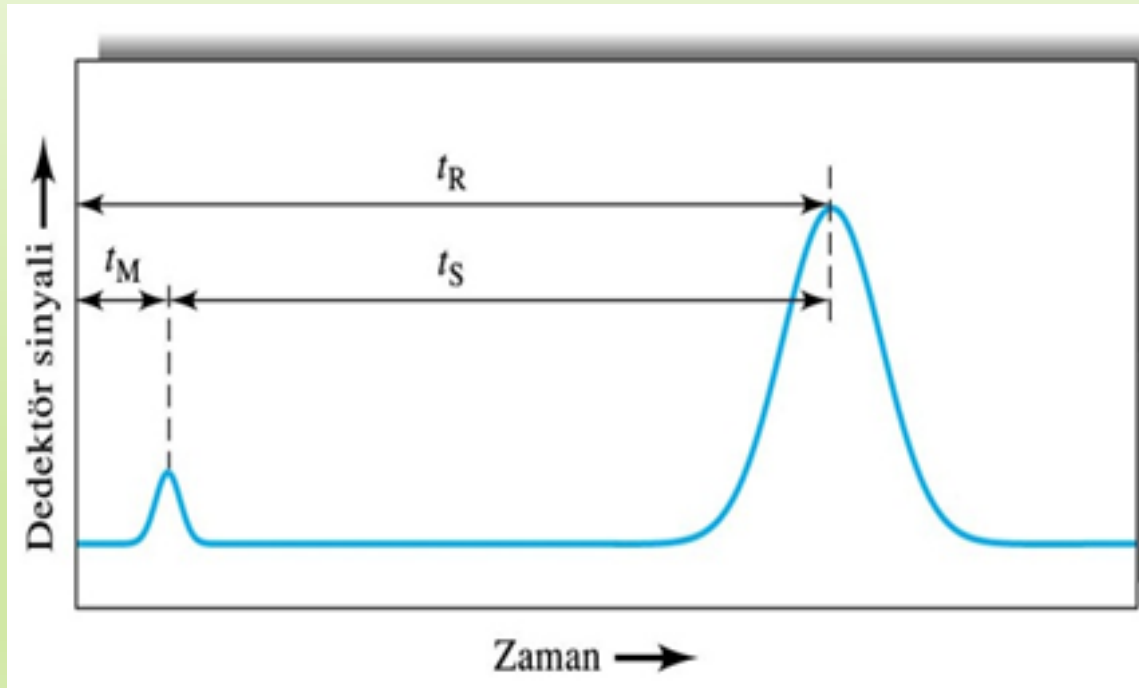
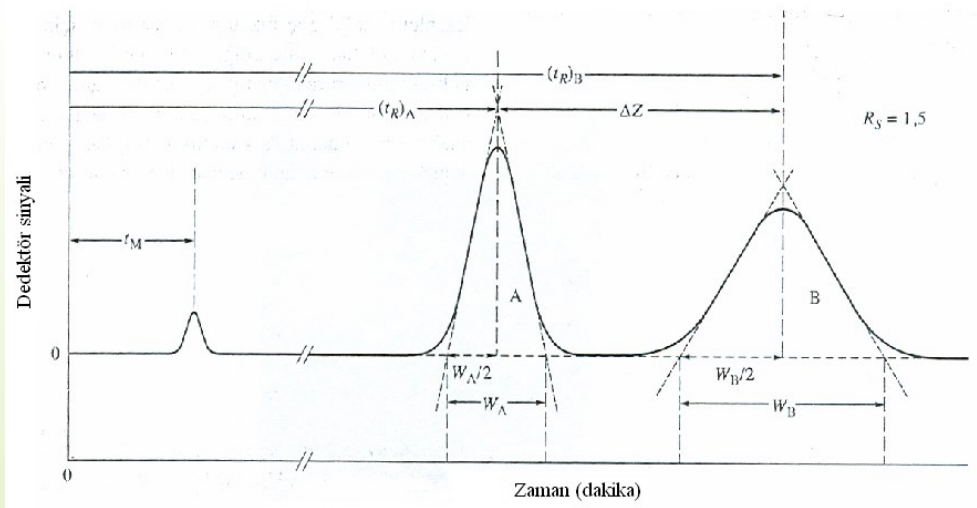


- **Örnek:** Bir kromatogramda klorlanmış pestisit olan dieldrinin alıkonma zamanı 8,68 dakika pik taban genişliği ise 0,29 dakika olarak okunuyor. 2 m uzunluğunda bir kolon için teorik tabaka yüksekliği nedir.

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

$$N = 16 (8,68 \text{ dakika} / 0,29 \text{ dakika})^2 = 14300 \text{ tabaka}$$

$$H = L/N = 2,0 \text{ m} / 14300 \text{ tabaka} = 0,14 \text{ mm/tabaka}$$



Örnek:

30,0 cm 'lik bir kolonda A ve B maddelerin alıkonma süreleri sırasıyla 16,40 ve 17,63 dakikadır. Tutulmayan kısımlar kolondan 1,30 dakikada çıkmaktadır. Piklerin taban genişlikleri sırasıyla 1,11 ve 1,21 dakika olduğuna göre aşağıdaki ;

- (a) kolonun ayırma gücünü
- (b) kolondaki ortalama tabaka sayısını,
- (c) tabaka yüksekliğini,
- (d) Ayırma gücünün $R_s=1,5$ olması için gerekli kolon uzunluğunu,
- (e) $R_s= 1,5$ olan kolonda B maddesinin çıkması için gerekli zamanı hesaplayınız.
- f) 30 cm'lik kolonda ve 1,5 ayırma gücü elde etmek için gerekli tabaka yüksekliğini hesaplayınız.

- (a) Kolon ayırma gücü (R_s) aşağıdaki denklemden hesaplanır

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

$$R_s = 2(17,63 - 16,40) / (1,11 + 1,21) = 1,06$$

- (c) Tabaka yüksekliği

$$\text{denklemleriyle hesaplanır.} \quad H = \frac{L}{N}$$

$$H = 30,00 \text{ cm} / 3445 = 8,7 \cdot 10^{-3} \text{ cm.}$$

- (b) Ortalama tabaka sayısı aşağıdaki denklemden bulunur.

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

- $N_1 = 16(16,40/1,11)^2 = 3493$
- $N_2 = 16(17,63/1,21)^2 = 3397$
- $N_{ort} = (3493 + 3397) / 2 = 3445$

- (d) $R_s = 1,5$ olması için gerekli kolon uzunluğu
- N ve L nin artması ile k' ve α değişmez. Denklem^a N_1 ve N_2 cinsinden yazılır ve iki denklem birbirine bölünerek aşağıdaki denklem elde edilir.

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k_B}{1 + k_{ort}}$$

- $\frac{R_{s1}}{R_{s2}} = \frac{\sqrt{N_1}}{\sqrt{N_2}} \quad \frac{1,06}{1,5} = \frac{\sqrt{3445}}{\sqrt{N_2}} \quad N_2 = 6900$
- $L = 6900 \cdot 8,7 \cdot 10^{-3} = 60 \text{ cm}$

$$(t_R)_B = \frac{16R_s^2 H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right)^2 \frac{(1+k_{ort})^3}{(k_B)^2}$$

- (e)
- Denklem birinci ve ikinci kolona göre yazılıp oranlanırsa aşağıdaki eşitlik elde edilir.
- $\frac{t_{r1}}{t_{r2}} = \frac{R_{s1}^2}{R_{s2}^2}$ değerler yerine konursa,
- $17,63/t_{r2} = 1,06^2/1,5^2$
- $t_{r2}=35$ dakika

$$(t_R)_B = \frac{16R_s^2 H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right)^2 \frac{(1+k_{ort})^3}{(k_B)^2}$$

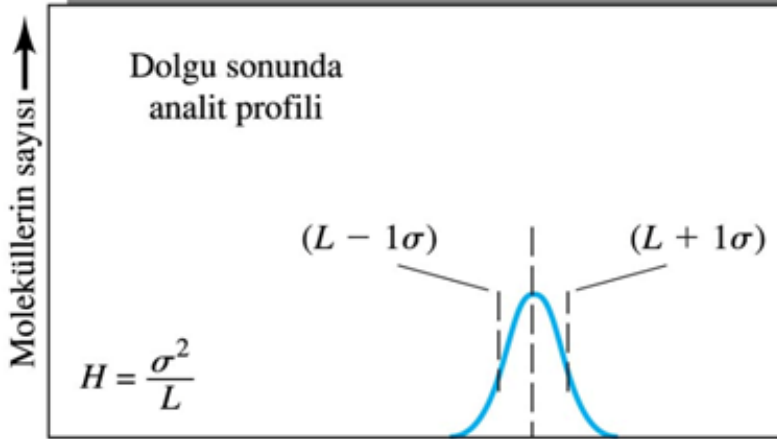
f)

Denklemini H1 ve H2 için yazıp oranlarsak

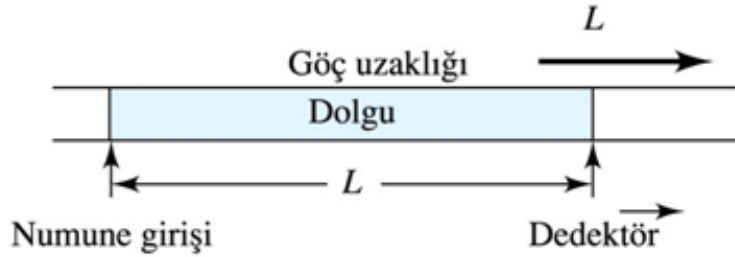
$$\frac{t_{rB}}{t_{rB}} = \frac{R_{s1}^2}{R_{s2}^2} \times \frac{H_1}{H_2} \quad \frac{H_2}{H_1} = \frac{R_{s1}^2}{R_{s2}^2}$$

$$H_2 = 8,07 \cdot 10^{-3} \text{ cm. } 1,06^2/1,5^2 = 4,3 \cdot 10^{-3} \text{ cm.}$$

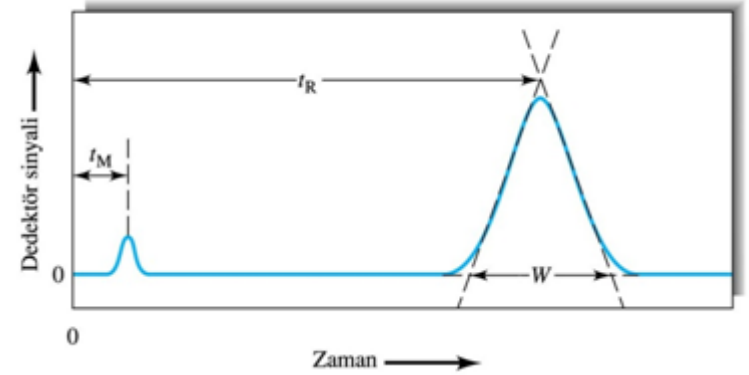
(b)



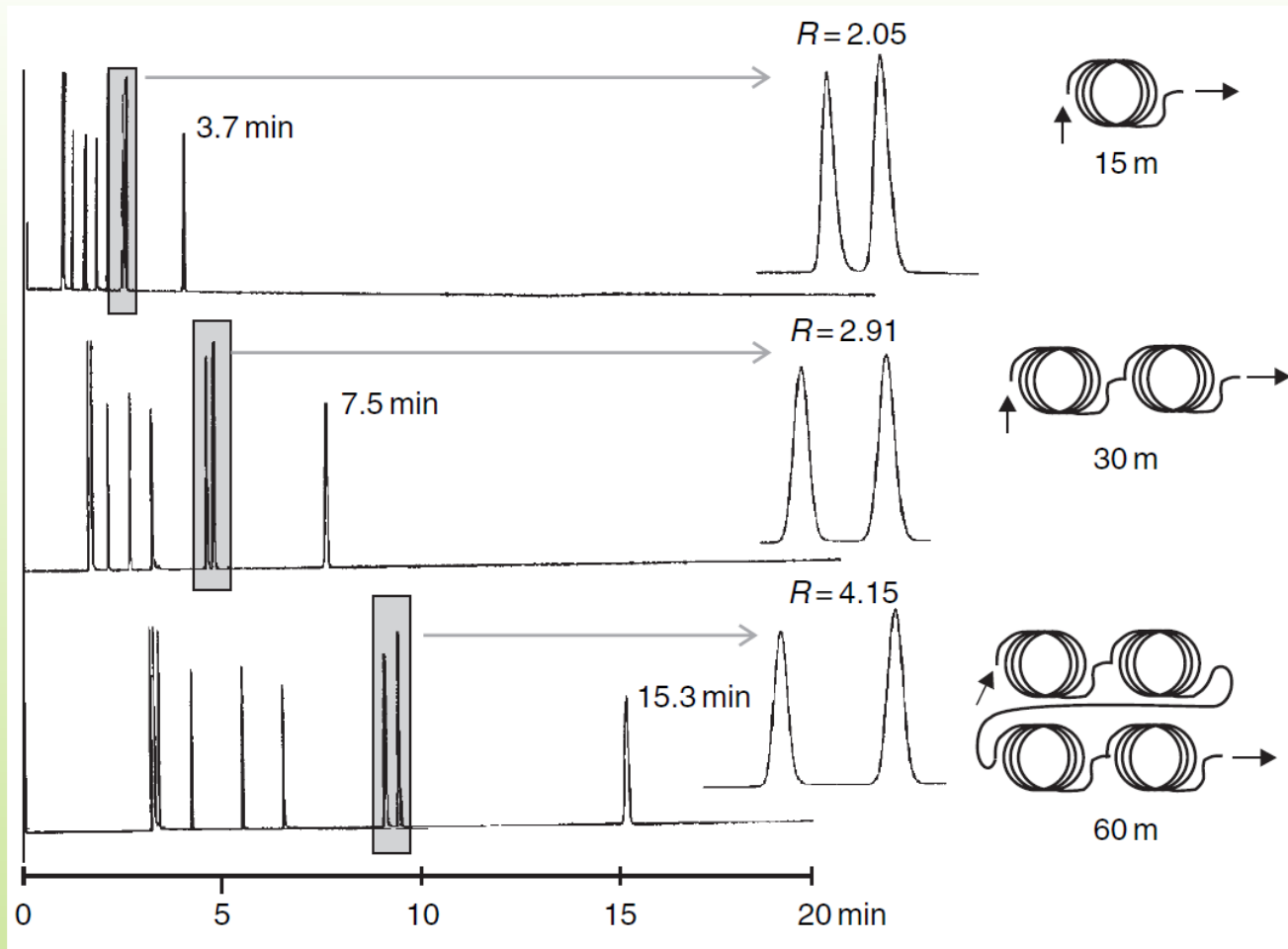
(a)



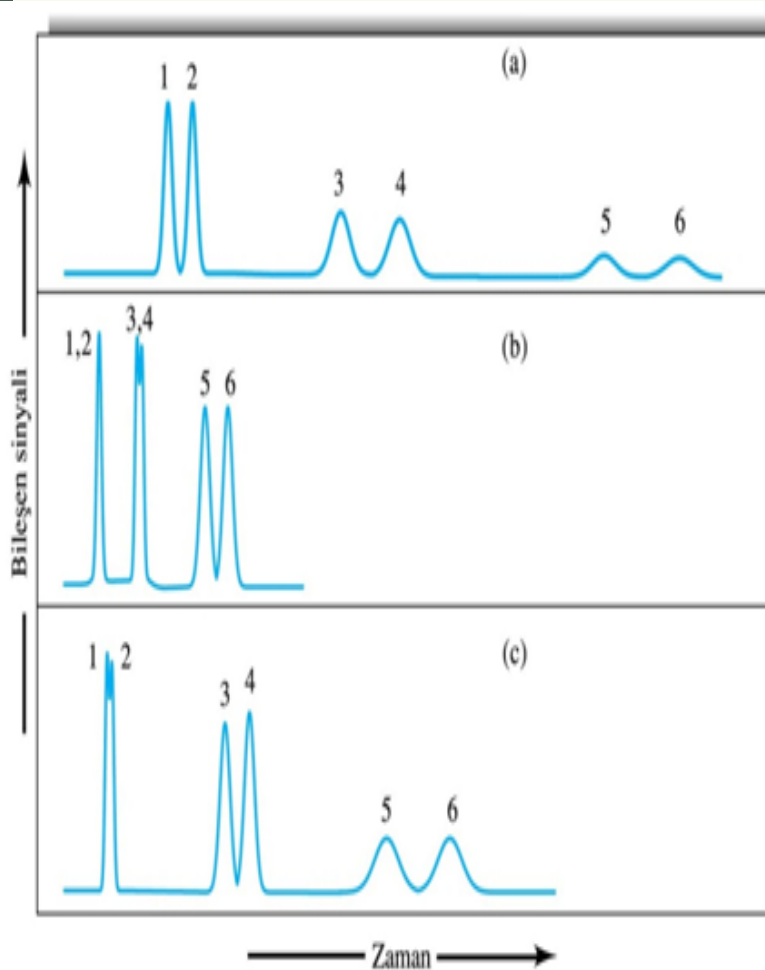
$H = \sigma^2/L$ şeklinde verilen tabaka yüksekliğinin tanımı. (a) Kolon uzunluğu, numune girişinden dedektöre kadar olan mesafedir. (b) Numune moleküllerinin dağılımı Gauss eğrisine uyar.



Tabaka Sayısının tayini



Kromatografide genel geri alma (elüsyon) problemi



Kromatografide genel elüsyon problemi.

- Alıkonma faktörü farklı bileşenlerin kromatogramlarında
- a kromatogramında sadece 1 ve 2 maddesi k değerleri optimumdur (1-5)
- b kromatogramında şartlar sadece 5 ve 6 maddesini ayırmak için uygundur.
- c kromatogramında ise k değerleri sadece 3 ve 4 maddesini ayırmak için uygundur.
- Bu problem, ayırma sürerken şartları (çözücü, hızı, sıcaklığı, vb) değiştirmek suretiyle giderilebilir.
- 1 ve 2 yi ayırdıktan sonra şartları 3 ve 4 için o da ayrıldıktan sonra şartları 5 ve 6 için uygun hale getirmek genel elüsyon problemini çözer.

Kolon Etkinliğinin(Performansının) Optimizasyonu

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

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

k için hareketli 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

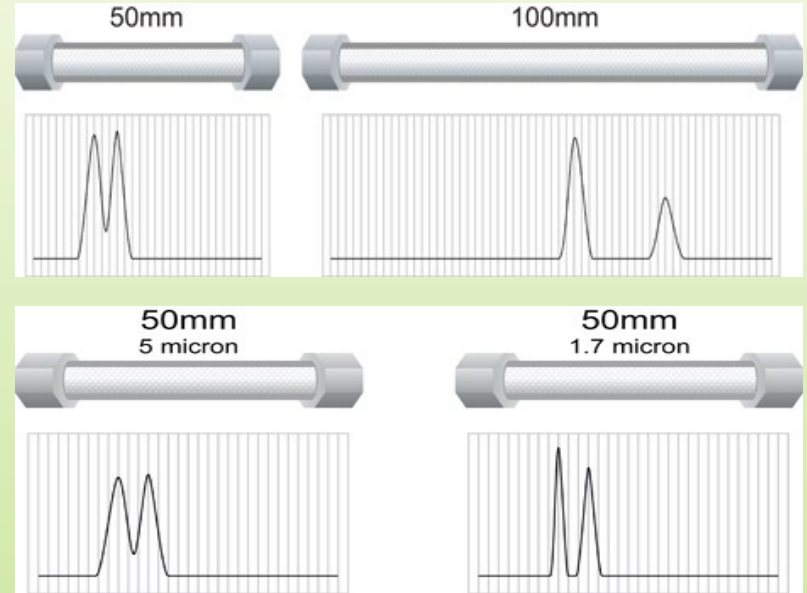
α için azalan tercih edilebilirlik sırasıyla;

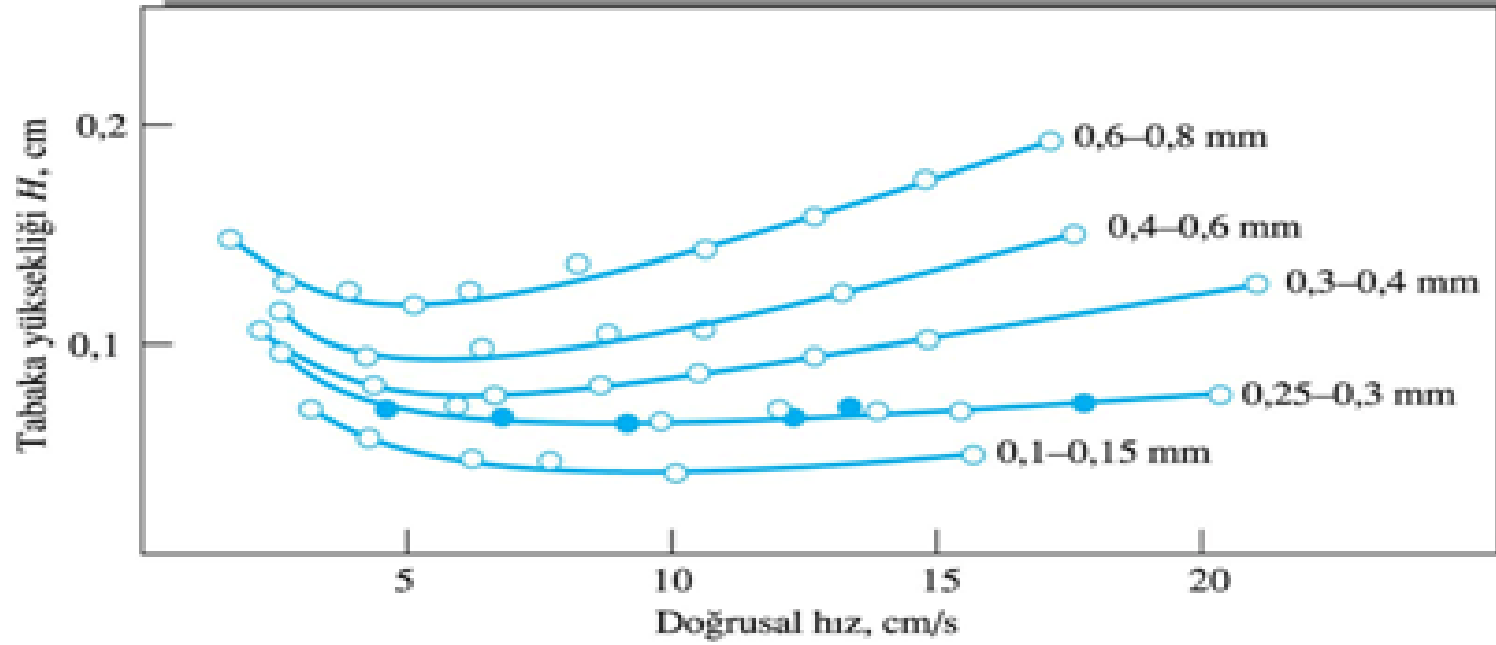
pH değişikliklerini de içeren mobil faz bileşimini değiştirmek,

kolon sıcaklığını değiştirmek,

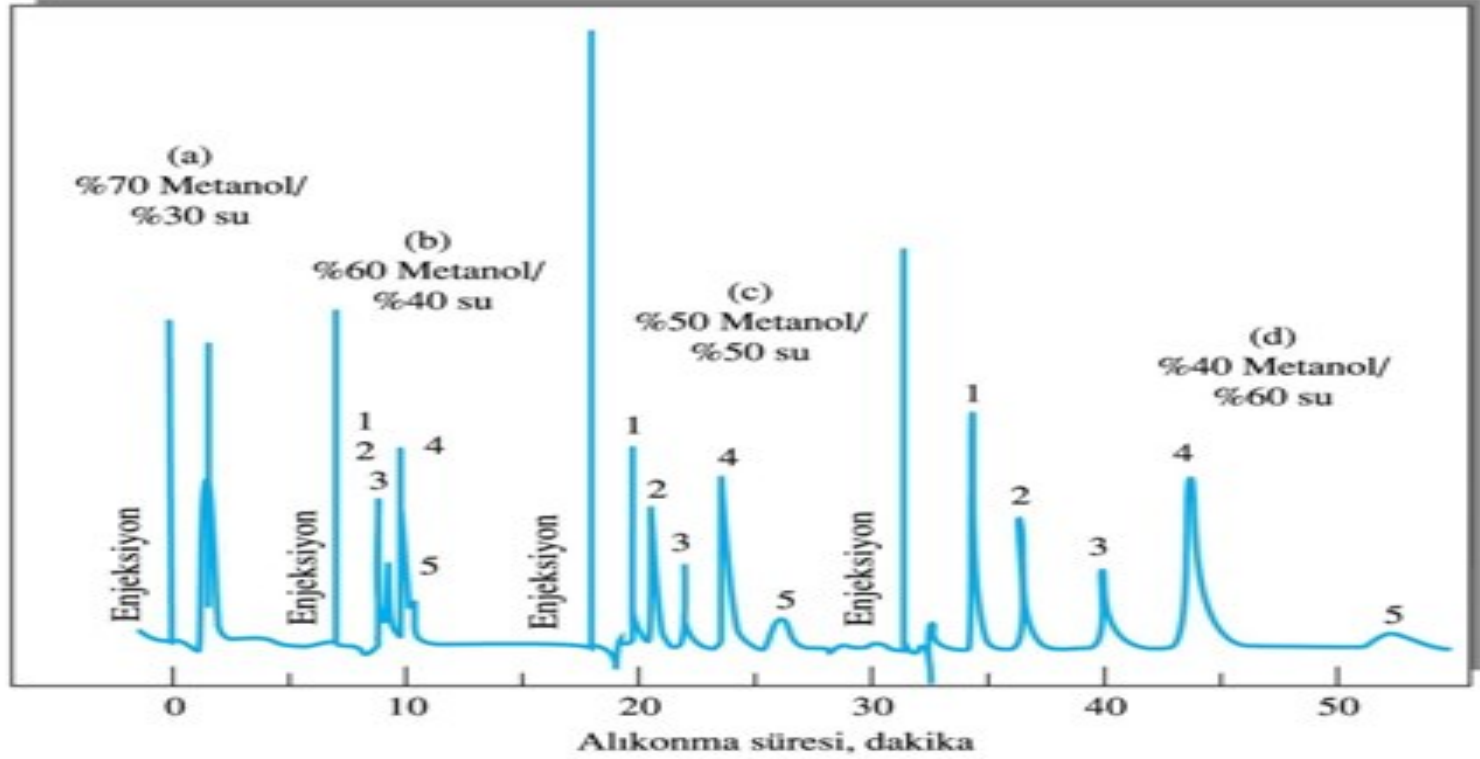
sabit fazın bileşimini değiştirmek,

özel kimyasal etkilere yararlanmaktır.





Tabaka yüksekliğine tanecik boyutunun etkisi



Çözücü değişikliğinin kromatogramlara etkisi. .

Analitler:

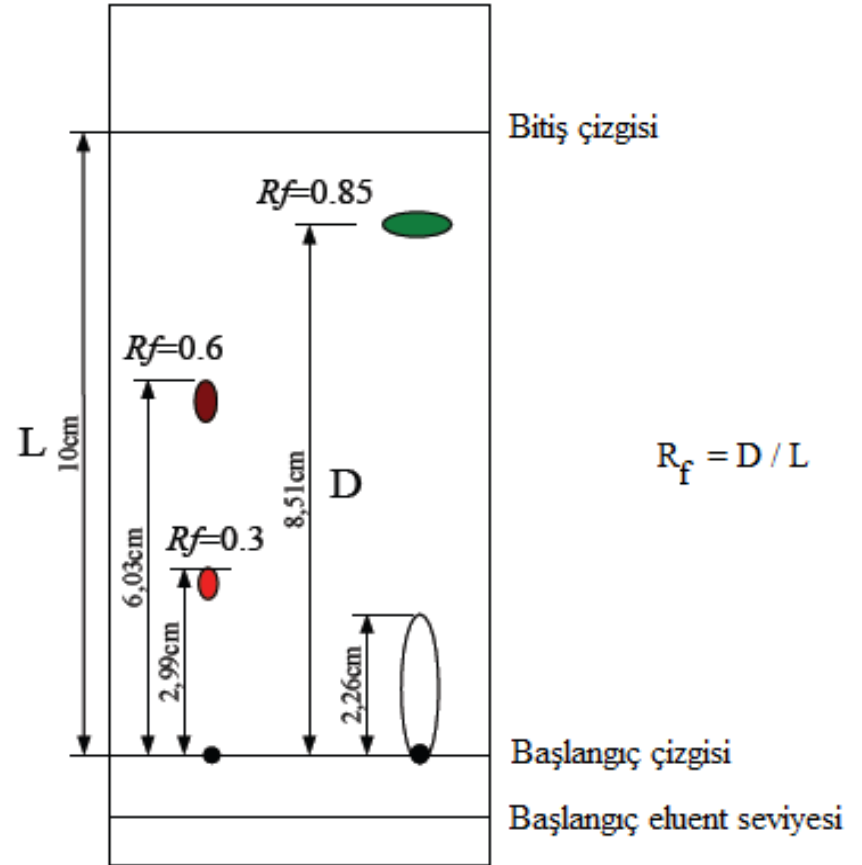
- (1) 9,10-antrakinon;
- (2) 2-metil-9, 10-antrakinon;
- (3) 2-etil-9,10-antrakinon;
- (4) 1,4-dimetil-9, 10-antrakinon;
- (5) 2-*t*- bütıl-9, 10-antrakinon.

Düzlemsel kromatografi

Kağıt kromatografisi
İnce tabaka kromatografisi

R_f = Yürüme oranı

$$R_f = \frac{\text{Bileşiğin aldığı yol (cm)}}{\text{Çözücünün aldığı yol (cm)}}$$



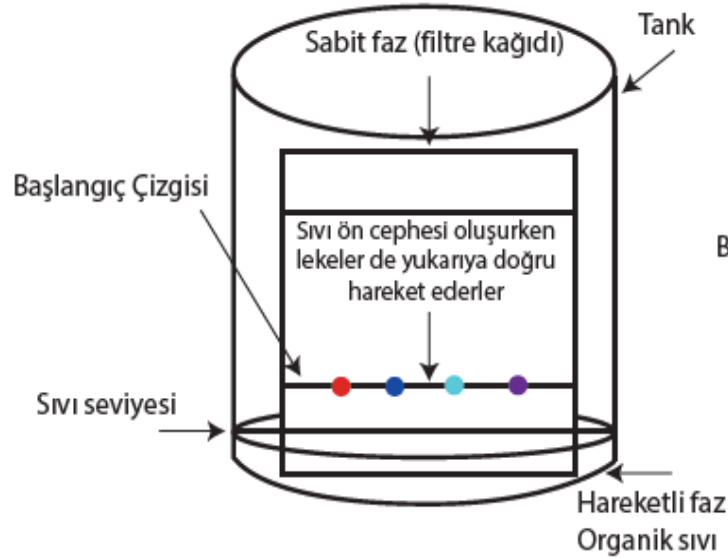
Kağıt Kromatografi

Kolon kromatografiden farklı olarak sabit faz, bir sütun halinde değil; yüzeye tutunmuş ince film halinde olabilir. Mesela kağıdı oluşturan selüloz ile su molekülleri arasında çok sağlam hidrojen bağları vardır. Oda şartlarında kağıt yüzeyi, her zaman ince bir su filmi ile kaplıdır. Bu durumda sabit faz, kalınlığı nm mertebesinde gözenekli bir düzlem yüzey oluşturur.

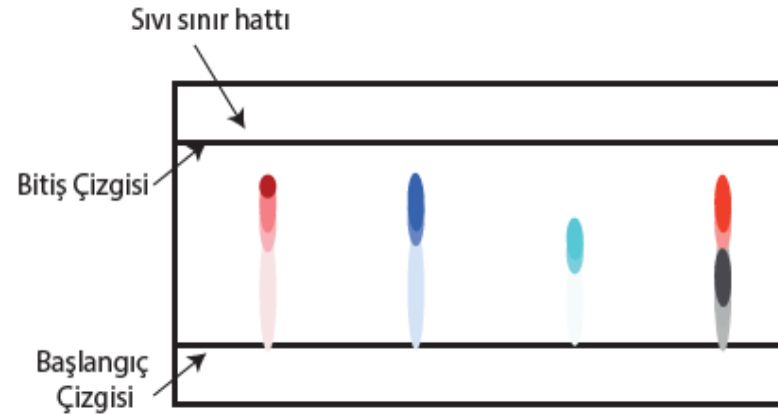
Kağıt kromatografi, karışımdaki bileşenlerin kağıt yüzeyindeki su filmi ile yürüyen organik sıvı arasında dağılması esasına göre ayırma sağlar. Her bileşenin su ve organik sıvı tarafından paylaşılma oranları farklıdır. Su ortamını tercih eden bileşen kağıt yüzeyinde daha fazla zaman geçirir. Organik sıvıyı tercih eden bileşen ise hareketli fazda daha hızlı sürüklenir.

Bu yöntemde kullanılan kağıt sadece sıvı filmi tutan bir destek görevi yapar.

Hareketli organik faz saf bir çözücü olabileceği gibi birden çok çözücünün bir karışımı da olabilir. Sıvı fazın ayrılacak karışımdaki herhangi bir bileşeni taşıması için bu bileşeni çözebilmesi gerekir.



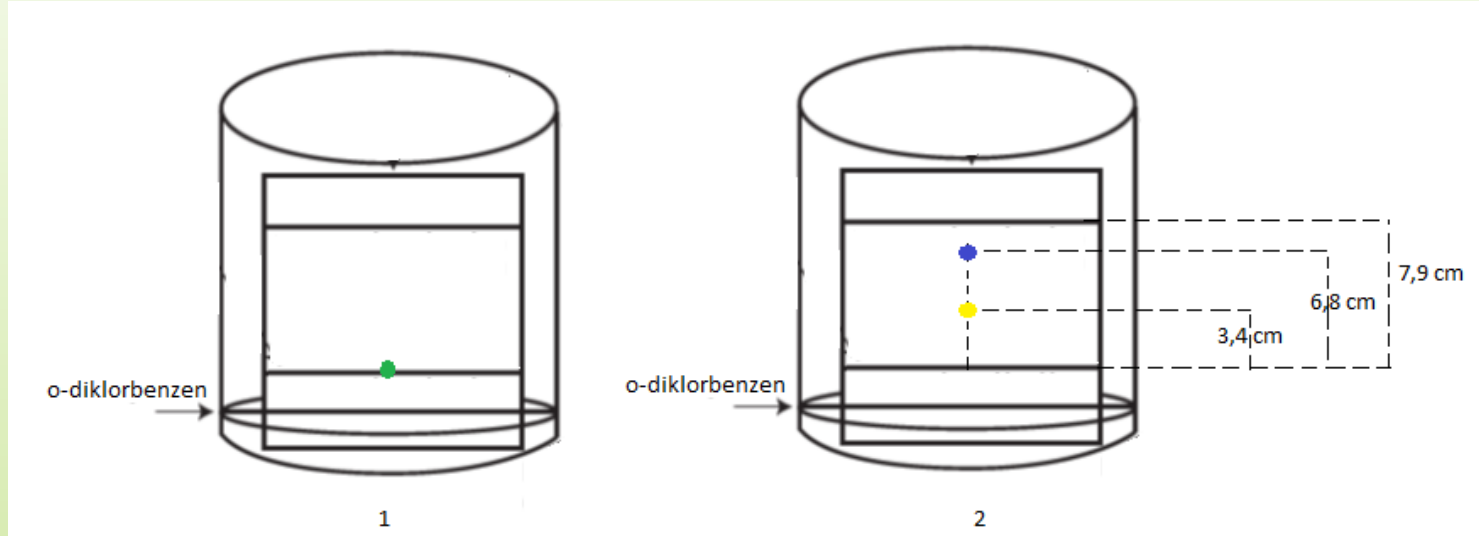
(a)



(b)

Şekil 4.27. Kağıt kromatografi yönteminin uygulanışı a) kullanılan gereçlerin düzeni b) ayırma işleminden sonra kâğıdın görünümü (kromatogram).

Örnek: Bir östrejen numunesi o-diklorbenzen hareketli faz olarak kullanmak suretiyle kağıt kromatografide bileşenleri analiz edilmek isteniyor. Numune kağıda damlatıldıktan bir süre sonra numunenin iki bileşene ayrıldığı gözleniyor. Şekildeki verilerden ve de östrejen türevlerine ait Rf değerlerinden yararlanarak numunenin bileşenlerini bulunuz.



Östrejen türevleri	Rf
Östriol	0
Östradiol	0,10
Equilenin	0,40
Östrone	0,90

$$Rf_1 = 3,4 / 7,9 = 0,43$$

$$Rf_2 = 6,8 / 7,9 = 0,86$$

Olduğuna göre Çizelgedeki değerlerle karşılaştırıldığında

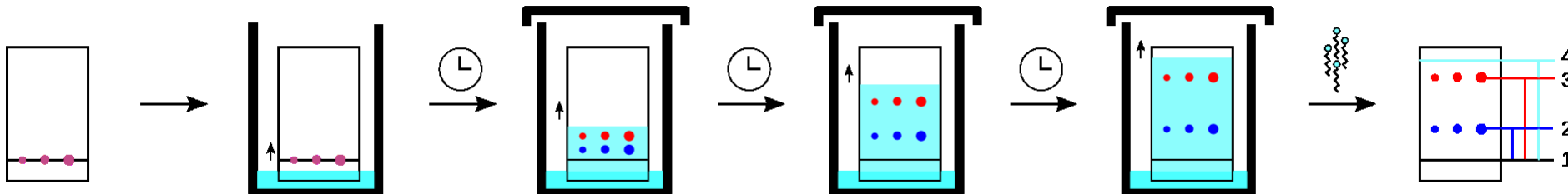
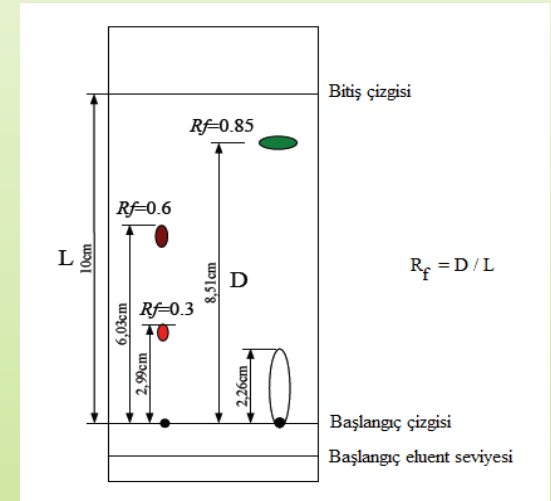
1. analit equilenin,

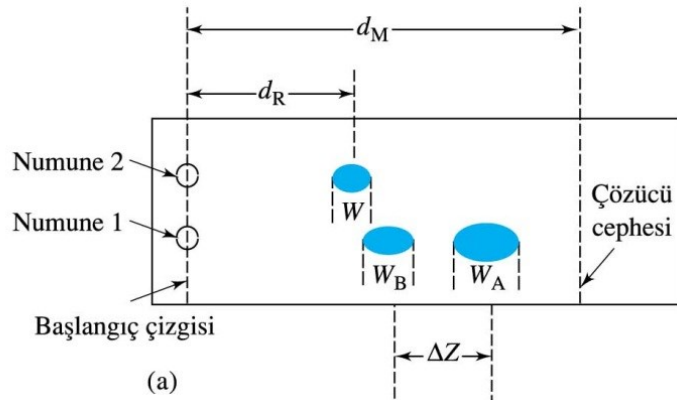
2. analit östrone olabilir.

İnce tabaka kromatografisi

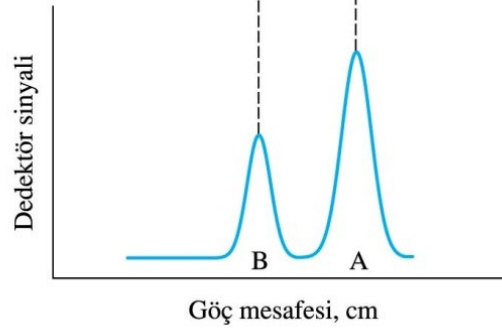
İnce tabaka kromatografisi, düzlemsel bir “katı-sıvı adsorpsiyon kromatografisidir.” Bu yöntemde sabit faz, çeşitli boyutlardaki cam plakalar üzerine, ince bir tabaka halinde sıvanmış katı adsorban maddedir. "Adsorban madde olarak kolon kromatografisinde kullanılan tüm katılar (alumina, siliko jel, sellüloz vb.) kullanılabilir. Bu kromatografi türünde hareketli fazın sabit faz üzerinden ilerleyişi, aşağıdan yukarı doğrudur. Çözücü, kılcalılık etkisiyle içerisine daldırılan ince tabaka plakası üzerinde yürür.

Bu yöntemde, adsorban bir malzeme cam veya plastik bir plakaya belirli bir kalınlıkta kaplanır ve böylece üzerinde gözenekler olan aktif yüzeyli bir sabit faz oluşturulur. Bu işlem yapılırken kaplama malzemesinin bir çözücünde süspansiyonu oluşturulur. Bu süspansiyon cam veya plastik üzerine dökülerek yüzey kaplanır. Ardından çözücü buharlaştırılır ve böylece yüzeyde sadece kaplama malzemesi kalır.





(a)



(b)

ŞEKİL 28-30 (a) Yürütme işleminden sonra ince-tabaka plakası. (b) Numune 1 için ince-tabaka kromatogramı.

Kromatografik ayırmalarla ilgili çıkarılan eşitlikler çoğunlukla ince tabaka kromatografisi ile de kullanılabilir.

$$R_f = \frac{\text{Bileşiğin aldığı yol (cm)}}{\text{Çözücünün aldığı yol (cm)}} = \frac{D}{L} = \frac{d_R}{d_M}$$

Burada d_R ve d_M nin t_R ve t_M ile ilişkilendirilmesi gerekir.

Numune 2 kromatogramında

$$t_M = d_R / u$$

$$t_R = d_M / u \text{ yazılır.}$$

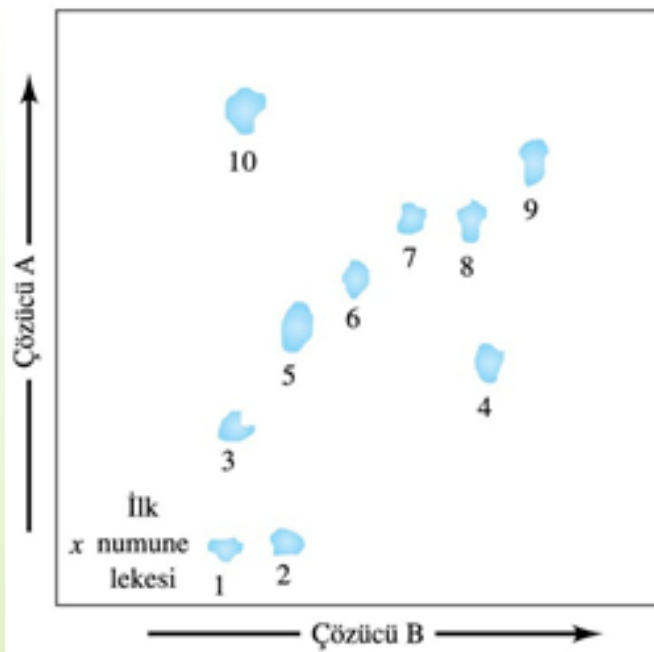
$$k = (d_M / u - d_R / u) / (d_R / u) = (d_M - d_R) / d_R$$

Bu değerleri alıkonma faktöründe yerine koyarsak;

$$k = (d_M - d_R) / d_R = ((1/R_f) - 1)$$

Buradan

$$k = (1 - R_f) / R_f \text{ olur.}$$



Bazı amino asitlerin iki-boyutlu ince-tabaka kromatogramları (Silikajel). Çözücü: toluen/2-kloroetanol/pridin. Çözücü B: kloroform/benzil alkol/asetik asit. Amino asitler: (1) aspartik asit, (2) glutamik asit, (3) serin, (4) β -alanin, (5) glisin, (6) alanin, (7) metiyonin, (8) valin, (9) izolösin ve (10) sistein.

İki boyutlu ince tabaka kromatografide, Numune, kare şeklindeki bir plakanın köşesine uygulanır, ve A çözücüsü yürütülerek yukarı yönde hareket eder. Daha sonra A çözücüsü buharlaştırılır. Plaka 90 ° çevrilerek bu sefer B çözücüsü yürütülür. B çözücüsü buharlaştırılır. Amino asitler için boyar madde olan ninhidrin püskürtülerek amino asitlerin yerleri tayin edilir. Standart değerlerinin yürüme oranları ile karşılaştırılarak amino asitlerin varlıkları belirlenir.

Örnek 2: “İnce Tabaka” kromatografisi ile analiz edilen bir karışımdaki iki maddenin R_f değerleri 0,8 ve 0,5 ise, çözücü 12 cm ilerlediğinde iki madde arasındaki mesafe kaç cm olacaktır?

Çözüm:

$$R_{f1}=0,8 \quad R_{f2}=0,5$$

$$R_f = \frac{d_{madde}}{d_{\text{çözücü}}}$$

$$0,8 = \frac{d_1}{d_{\text{çözücü}}} \Rightarrow d_1 = 0,8 \cdot d_{\text{çözücü}} \Rightarrow d_1 = 0,8 \times 12 = 9,6 \text{ cm}$$

$$0,5 = \frac{d_2}{d_{\text{çözücü}}} \Rightarrow d_2 = 0,5 \cdot d_{\text{çözücü}} \Rightarrow d_2 = 0,5 \times 12 = 6 \text{ cm}$$

$$d_1 - d_2 = 9,6 - 6 = 3,6 \text{ cm}$$

Metil oranj metilen mavisi karışımı ince tabaka kromatografisi ile analiz edilmek istenmektedir. Bu amaçla Durgun faz olarak Silika jel, Hareketli faz: Etil alkol kullanılarak yapılan deneyde çözücünün 4,2 cm, bir bileşenin ise 3,3 cm yürüdüğü ölçülmüştür.

$$R_f = 3,3 / 4,2 = 0,79$$

Madde	R _f
Metil oranj	0,60
Metilen mavisi	0,77

Tablodan bileşenin metilen mavisi olduğu anlaşılmaktadır.

Kromatografide Kalitatif (nitel) Analiz

Bir kromatogram, örnekteki her bir madde hakkında çok az bilgi verir; maddenin alıkonma zamanı ,bir sıyırma periyodu süresince maddenin sabit fazdaki konumu.

İlave bilgiler elde edilebilmesi için hareketli ve sabit fazlar değiştirilip çeşitli sıyırma sıcaklıkları uygulanabilir.

Yine de bir madde için kromatografide alınan veriler, IR, NMR veya kütle spektrumunda alınanlara göre oldukça azdır. Dikey eksendeki değerler (σ , λ , veya m/e) yatay eksendeki değerlere (t_R) kıyasla daha hassastır. Bu durum kromatografinin kalitatif analizde başarısız bir yöntem olduğunu göstermez. İsimleri bilinen ve çoğunlukla bir arada bulunan bazı madde karışımlarının tanımlanması yapılabilir.

Örneğin, bir protein hidroliz örneğinde 30 veya daha çok sayıdaki amino asidin varlığı veya yokluğu, ince tabaka kromatografisinde ayrılan maddelerin şiddetine göre saptanabilir.

Yine de teşhisin kesin olması için ayrılan maddelerin spektral veya kimyasal tanımına gerek vardır. Karmaşık yapıları bir örneğin spektroskopik yöntemlerle tanımlanması için önceden kromatografik bir ayırmaya gereksinim vardır.

Kromatografide Kantitatif (Nicel) Analiz

- Kromatografide kantitatif analiz, analitin pik yüksekliği veya pik alanının standart maddenin pik yüksekliği veya pik alanıyla kıyaslanır. Çalışma koşulları kontrol edilebiliyorsa bu iki parametre de konsantrasyonla doğrusal olarak değişir.

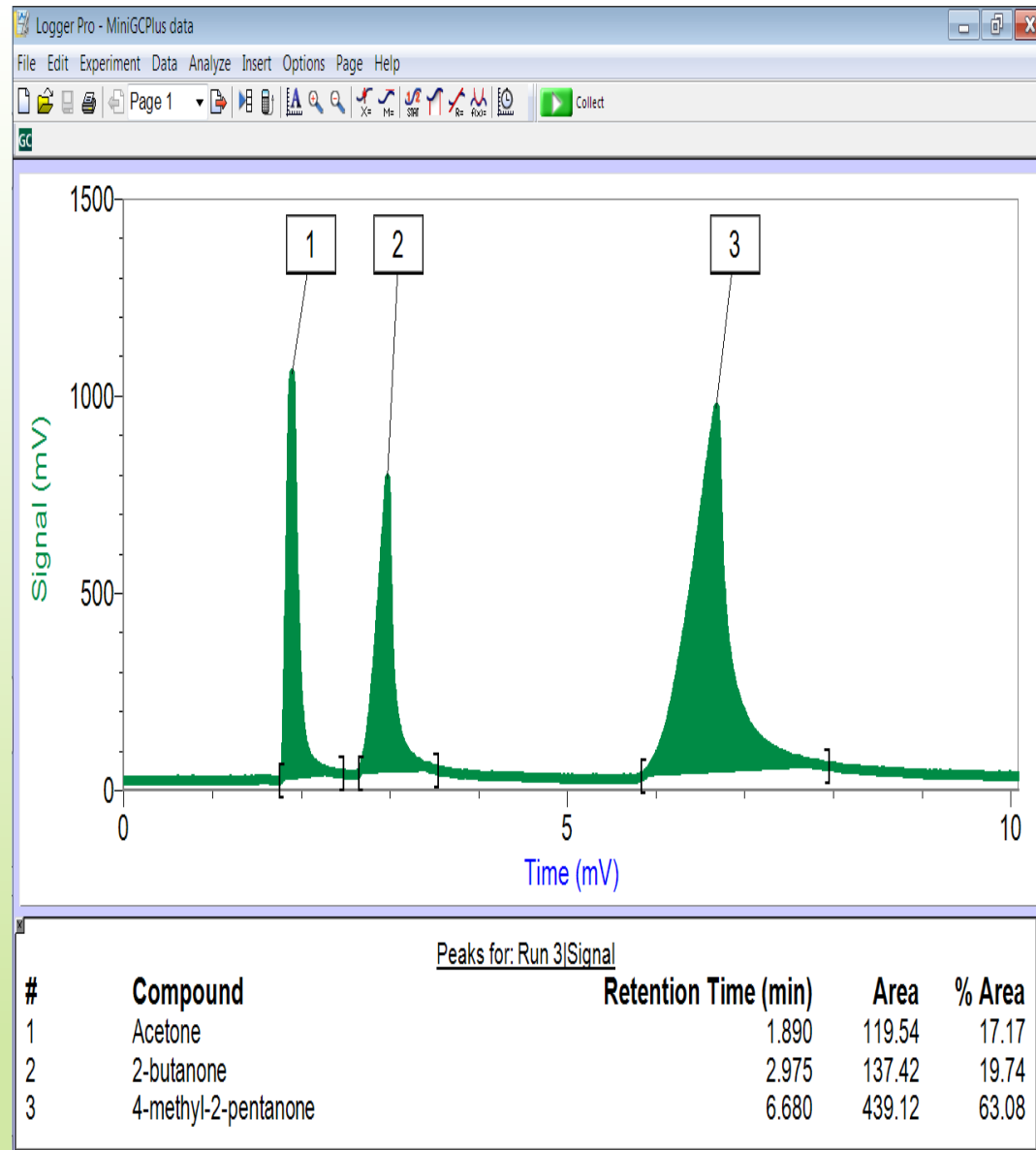
■ Pik Yüksekliğine Göre Analiz

- Bir kromatografik pikin yüksekliğini ölçmek için pikin iki yanındaki taban çizgileri düz bir doğru ile birleştirilir ve pik tepesinden bu doğruya bir dikme inilir; dikmenin uzunluğu, pik yüksekliğidir. Yükseklik çok hassas olarak ölçülebilir. Kolon koşullarını etkileyen değişkenler, örnek ve standartların kromatogramlarının alındığı süre boyunca sabit tutulmalıdır. Çok iyi kontrol edilmesi gereken değişkenler kolon sıcaklığı, hareketli fazın akış hızı ve örneğin enjeksiyon hızıdır. Ayrıca kolonun aşırı yüklenmemesine de dikkat edilmesi gerekir. Enjeksiyon hızı bir kromatogramda ilk çıkan pikler için önemlidir ve % 5-10 'a kadar ulaşan bağıl hatalara yol açar.

■ Pik Alanına Göre Analiz

Yukarıdaki paragrafta belirtilen değişkenler pik alanında genişleme etkisi yapmazlar. Bu bakımdan alana göre yapılan analizler yüksekliğe göre yapılanlara kıyasla daha doğrudur. Diğer yönden pik yüksekliklerin ölçülmesi daha kolaydır ve dar piklerde bu yöntemle daha doğru sonuçlar alınır. Modern kromatografi cihazlarında bilya ve disk veya elektronik bilgisayarlar vardır. Bunlarda pik alanları hassas olarak ölçülebilir. Bu tip sistemlerin olmaması durumunda hesaplamalar el ile yapılır. Uygun genişlikteki simetrik piklerde alan basit bir yöntemle hesaplanır; pikin yüksekliği, yüksekliğin tam ortasından çizilen yatay doğrunun uzunluğu (o noktadaki pik genişliği) ile çarpılır. Pik alanı pikin bir planimetre ile taranmasıyla da bulunabilir. Bir başka yöntem de pikin kesilerek tartılması ve tartımın, aynı kaydedici kağıdın alanı bilinen bir parçasının ağırlığı ile kıyaslanmasıdır.

Prof.Dr. Mehmet Sayım KARACAN



Toplam alan 696, 08

%aseton= $119,54/696,08 \times 100 = 17,17$

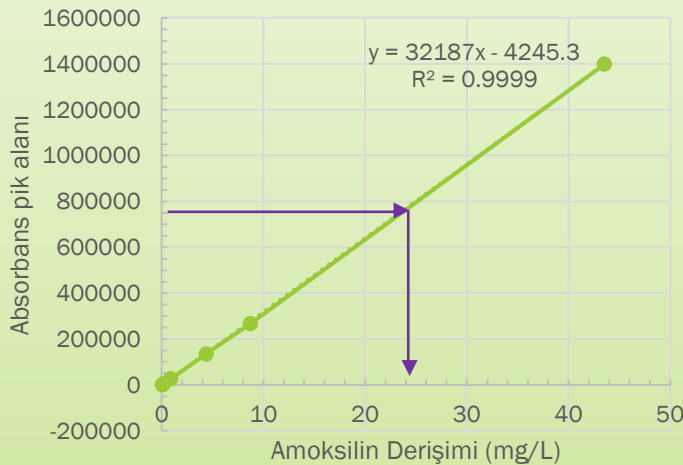
■ Kalibrasyon grafiği yöntemi

- Kantitatif kromatografik analizde en çok uygulanan yöntem örnekteki maddelerin bileşimine yakın bileşimlerdeki bir seri standart çözelti ile çalışılmasıdır. Standartların kromatogramları alınarak pik yüksekliklerinin veya alanlarının, madde konsantrasyonlarına göre " kalibrasyon grafiği" çizilir; grafik orijinden geçen bir doğru şeklindedir. Örneğin analizi bu grafiğe göre yapılır. Yüksek hassasiyet alınabilmesi için standart çözeltilerin ve kalibrasyon grafiğinin sık sık kontrol edilmesi gerekir.
- Analizdeki en önemli hata kaynağı, enjekte edilen standart ve analit örnek hacminin tam sabit olamayışıdır; ayrıca enjeksiyon hızı da hataya neden olan bir faktördür. Örnek miktarı çoğunlukla 1 μL civarındadır ve her defasında aynı hacimde madde verebilmek için bir mikro şırınga kullanılarak bağıl hata % birkaç seviyesine kadar düşürülebilir. Bu hata gaz-sıvı kromatografisinde daha da büyüktür; örnek sıcak bir uçtan enjekte edildiğinde, şırınga ucundaki buharlaşma kolona verilen madde hacminde büyük farklılıklar olmasına yol açar.
- Bu hata döner numune vanası veya otoörnekleyici kullanılarak giderilir.

C (mg/L)	Pik alanı A	Pik Yüksekliği
0,0435	675	60
0,174	4224	290
0,87	26510	1450
4,35	134422	6578
8,7	265961	14093
43,5	1397932	61817
Bilinmeyen Derişim	750000	32000

Bir antibiyotik ilacında amoksilin tayini için 1 g'lık tablet alınıp çözünürleştiriliyor. Çözelti 100 mL'ye tamamlanıyor. Bu çözeltiden alınan 0,275 mL örnek tekrar 100 mL ye seyreltiliyor. UV dedektörlü bir HPLC'de sinyali ölçülüyor, Ayrıca çeşitli derişimlerdeki standart çözeltilerin pik alanları ve yükseklikleri ölçülüyor ve yandaki tablodaki değerler elde ediliyor. Tabletteki amoksilin kütlece yüzde derişimi nedir.

Amoksilin için Pik alanı-derişim



Amoksilin için Pik yüksekliği-derişim



$$\%Hata = \frac{(80-87,3)}{87,3} \times 100 = -\%8,4$$

Bilinmeyen amoksilin derişimi Pik alanına göre 24 mg/L ,. Pik alanı daha doğru sonuç verdiğiinden .
 Amoksilin : 24mg/Lx 0,1 L= 2,4 mg
 0,275 mL de 2,4 mg amoksilin varsa
 100 mL de x= 872,7 mg amoksilin
 1 g tablette 872,7 mg amoksilin varsa
 100 de x= %87,3

Pik yüksekliğine göre 22 mg/L Amoksilin :
 22mg/Lx 0,1 L= 2,2 mg
 0,275 mL de 2,2 mg amoksilin varsa
 100 mL de x= 800 mg amoksilin
 1 g tablette 800 mg amoksilin varsa
 100 de x= %80,0

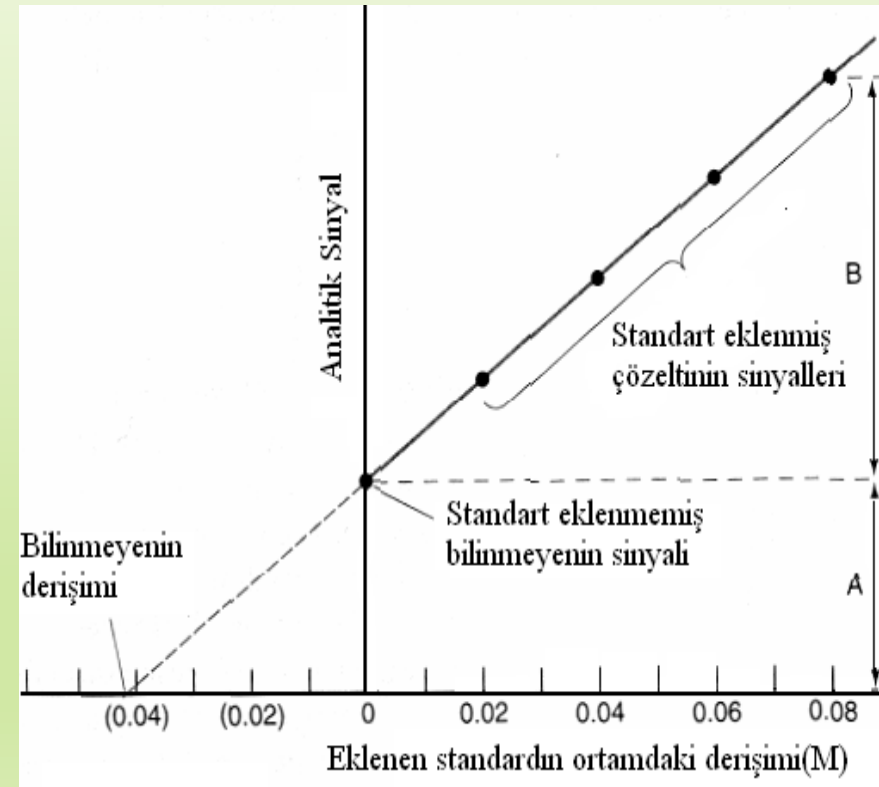
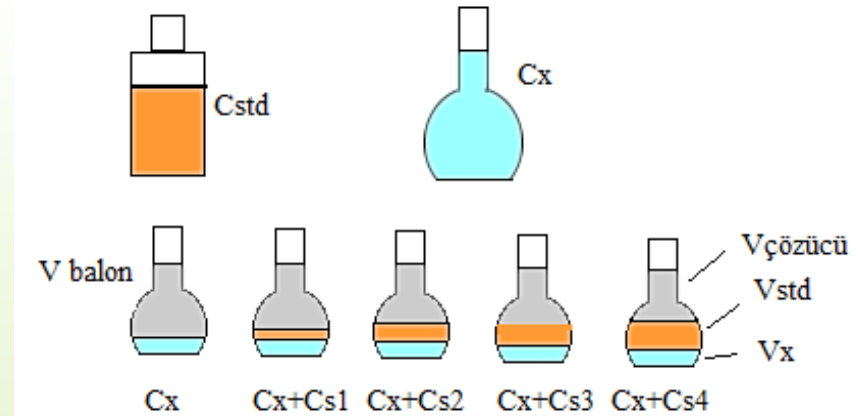
Standart Ekleme Yöntemi

Aynı miktarda alınan numunelere, artan derişimlerde standart çözelti ilave edilir. İlk numune çözeltisine ilave yapılmaz. Bu çözeltilerin cihazla sinyalleri ölçülür. Numune çözeltisi hepsinde bulunduğundan ortam yaklaşık olarak aynıdır. Doğrunun X eksenini kesim noktasından numunedeki analit derişimi bulunur veya hesaplanır. Ortam etkisinin olduğu karmaşık numunelerin analizinde Standart Ekleme Yöntemi kullanılır.

$S_T = S_{\text{numune}} + S_{\text{standart}}$ (Standart ekleme grafiğinde S_T toplam sinyal; numune ve standardın absorbanları toplamıdır. Aynı madde olduğundan k aynıdır.)

$$S_T = kC_x + kC_{\text{std}}$$

$$S_T = 0 \text{ için } -kC_x = kC_{\text{std}} \quad C_x = -C_{\text{std}}$$



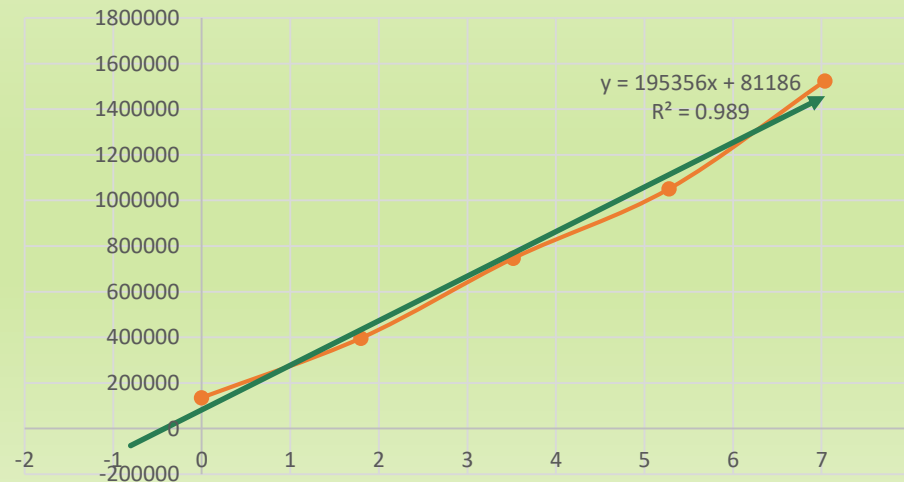
Standart ekleme Yöntemi

Bir su numunesindeki Florür tayini yapılmak isteniyor,

Bu amaçla hazırlanan çözeltilerde iyon kromatografisi ile alınan pik alanları tabloda verilmiştir. Hazırlanan çözeltilerin son hacimleri 10 mL dir. Kullanılan Florür standart çöze 35,21 ppm dir. Buna göre numunedeki florür derişimini ppm cinsinden bulunuz.

Eklenen Numune Hacmi (mL)	Eklenen standart hacmi (mL)	Eklenenin ortamdaki derişimi	Alıkonma zamanı (min)	Pik alanı
5	0,0	0,0	2,5	135235
5	0,5	$1,8 = 35,21 \cdot 0,5 / 10$	2,8	396313
5	1,0	3,52	2,15	746095
5	1,5	5,28	2,46	1050673
5	2,0	7,04	2,41	1523699

Alıkonma
zaman= 2,5
min



Grafikten bulunan değer -0, 5 ppm olur. Numune 2 kat seyreltiği için numunedeki Florür $2 \times 0, 5 = 1$ ppm dir.

■ İç Standart Ekleme Yöntemi

- Kantitatif kromatografide en hassas sonuçlar örnek enjeksiyonundan kaynaklanan hataların giderildiği iç standart yöntemi ile elde edilir. Bu yöntemde örnek ve standartlara çok hassas tartılmış bir iç standart maddesi ilave edilir; analit pik alanının (veya yüksekliğinin) iç standart pik alanına (veya yüksekliğine) oranı analitik parametre olarak kullanılır. Yöntemin başarılı olabilmesi için iç standart pikinin örnekteki diğer maddelerin piklerinden uzakta ($RS > 1.25$), analit pikinin yakınında olması gerekir. Uygun bir iç standart kullanıldığında kesinlik %0,5-1 civarındadır.

ÖRNEK: Bir numunede izobütirik asidin kromatografik analizindeki doğrusallığı iyileştirmek için bütirik asit iç standart olarak kullanılarak aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre numunedeki analit derişimi nedir. Numuneye ve kalibrasyon standardı çözeltilerine 10 mg/mL bütirik asit iç standart olarak eklenmiştir.)

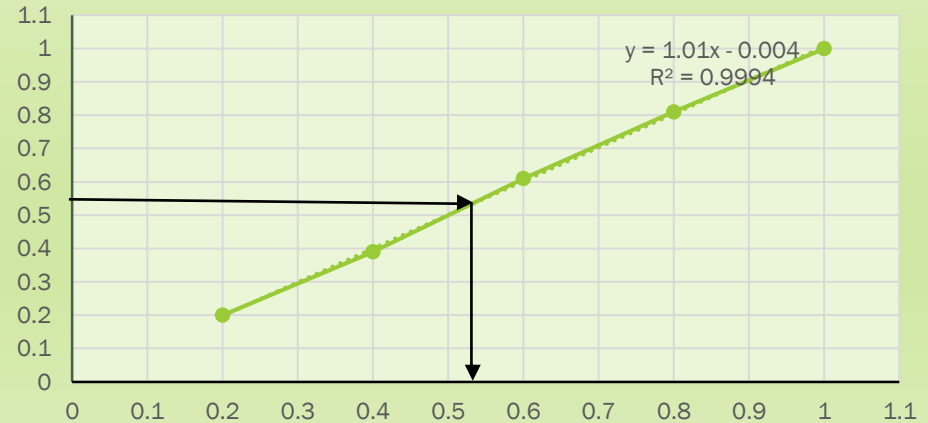
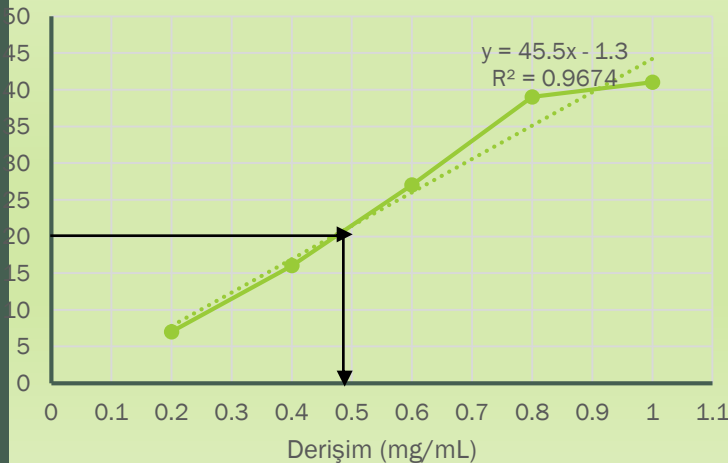
Standart çözelti derişimi (mg/mL)	Analit Sinyali	İç standart Sinyali	(A/İS) sinyal oranı
0,20	7	35	7/35= 0,20
0,40	16	41	16/41=0,39
0,60	27	44	27/44= 0,61
0,80	39	48	39/48= 0,81
1,00	41	41	41/41= 1,00
Numune (Cx)	21	39	21/39=0,54

Kalibrasyon grafiğinden
Cx= 0,49 mg/mL
İç standart grafiğinden
Cx= 0,54 mg/mL

$$\%hata = \frac{0,49 - 0,54}{0,54} \times 100 = \%$$

Analit Sinyaline göre

A/İS sinyal oranına göre



- Örnek: M ve N türlerinin su/hekzan arasındaki dağılıma sabitleri $K_M = 6,01$, $K_N = 6,20$ dir. Bu iki tür su ile doyurulmuş silikajel doldurulmuş kolonda hekzan ile geri yıkanarak ayrılıyor. Kolon dolgusu için $V_S/V_M = 0,422$ dir.

- M ve N bileşenleri için kapasite faktörleri nedir?
- N'nin M'ye göre seçicilik faktörü nedir?
- Ayırma gücü, $R_s = 1,5$ için kaç tabaka sayısı gereklidir.
- Tabaka yüksekliği $2,2 \cdot 10^{-3}$ cm ise gerekli kolon uzunluğu nedir?
- 7,1 cm/min akış hızında 2 türü kolondan almak için ne kadar süre gereklidir?

(N türü kolonu en son terk etmektedir)

a) $k'_M = K_M \cdot V_S/V_M = 6,01 \cdot 0,422 = 2,54$

$k'_N = K_N \cdot V_S/V_M = 6,20 \cdot 0,422 = 2,62$

b) $\alpha = k'_N/k'_M = K_N/K_M = 6,20/6,01 = 1,03$

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k_B}{1 + k_{ort}}$$

c) denklemden N çekilir ve değerler yerine yazılırsa

$$\sqrt{N} = 4R_s \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right) \left(\frac{1 + k'_N}{k'_N} \right) = \sqrt{N} = 4 \cdot 1,5 \left(\frac{1,03}{1,03 - 1} \right) \left(\frac{1 + 2,62}{2,62} \right) N = 81000 \text{ bulunur.}$$

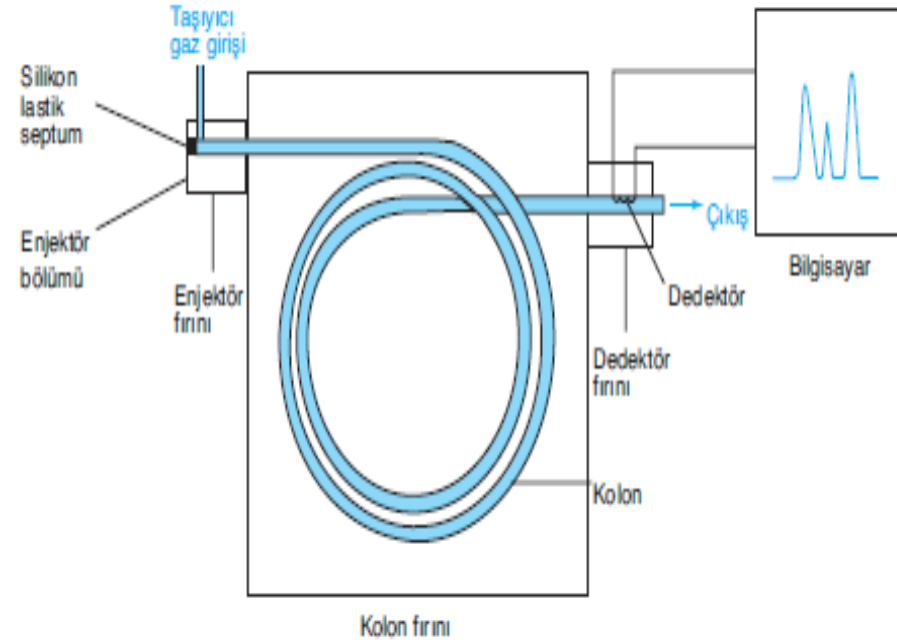
d) $N = L/H$ den $H = 2,2 \cdot 10^{-3} \text{ cm} \cdot 81000 = 178,2 \text{ cm}$ çıkar.

e)

$$(t_R)_B = \frac{16R_s^2 H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \frac{(1 + k_{ort})^3}{(k_B)^2} \quad (t_R)_B = 16 \cdot \left(\frac{1,5^2 \cdot 2,2 \cdot 10^{-3} \text{ cm}}{7,1 \text{ cm/min}} \right) \times \left(\frac{1,03}{1,03 - 1} \right)^2 \times \frac{(1 + 2,62)^3}{(2,62)^2}$$

Denklemden $(t_R)_B = 91 \text{ min}$ çıkar.

GAZ KROMATOĞRAFİSİ



Uçucu sıvı veya gaz halindeki örnek bir **septum** içinden hızlıca buharlaşacağı ısıtılmış bir bölmeye enjekte edilir.

Buhar, He, N₂ veya H₂ taşıyıcı gazıyla kolon boyunca süpürülür ve ayrılan analitler, yanıtı bir bilgisayarda gösterilen, bir dedektör içinden akar.

Kolon, analitlerin kabul edilebilir bir sürede kolondan geri alınması (elue edilmesi) için yeterli buhar basıncını sağlayacak kadar sıcak olmalıdır.

Dedektör, analitler gaz halinde olacak şekilde, kolondan daha yüksek bir sıcaklıkta tutulur.

Gaz kromatografisinde, gaz halindeki analit **taşıyıcı gaz** olarak isimlendirilen gaz halindeki bir hareketli faz tarafından kolon boyunca taşınır. Gaz-sıvı ve gaz-katı olmak üzere iki çeşidi vardır.

Gaz-sıvı dağılma kromatografisinde durgun faz, kolonun iç tarafına veya ince bir katı desteğe bağlanmış uçucu olmayan bir sıvıdır.

Gaz-katı adsorpsiyon kromatografisinde, analit durgun fazın katı parçacıkları üzerine doğrudan adsorplanır.

- Gaz kromatografi, gaz halde veya kolayca buharlaştırılabilen karışımların ayrılması için kullanılan yaygın bir yöntemdir. Hareketli faz olarak helyum veya argon gibi asal bir gaz kullanılır. Bu gaza **taşıyıcı gaz** denir.
- Gaz sıvı kromatografisinde sabit faz sıvıdır. Yüksek sıcaklıklarda bile uçucu olmayan (mum benzeri) bu sıvı, bir katı yüzeyine bağlanarak sıvı film oluşturur. Sıvı emdirilmiş katı, yüksek basınca dayanıklı metal bir boru (kolon) içine doldurulur. Gaz haline getirilmiş numuneler bu kolonun bir ucuna uygulanır. Yüksek basınç altında kolona giren taşıyıcı gaz, numunenin uçuculuğu yüksek bileşenlerini hızlı sürükleyerek diğerlerinden ayırır. Burada gaz-sıvı dengesi önemlidir.
- Gaz-katı kromatografisinde sabit faz katı bir maddedir; bu nedenle de tutunma işlemi adsorbsiyon dengesine göre olur.
- Bir maddenin GC yöntemiyle analiz edilebilmesi için;
 - 1. Bağlı buhar basıncı yüksek yani kolay buharlaşabilir olmalıdır.
 - 2. Uygulanan sıcaklıkta bozunmamalı, ısıl kararlılığı yüksek olmalıdır.
 - 3. Molekül kütlesi < 400 akb olmalıdır.
 - 4. Gaz fazda kararlı olmalı ve taşıyıcı gaz ile tepkimeye girmemelidir.

Diğer kromatografik yöntemlerden farklı olarak sıcaklık ve basıncın etkilerini dikkate almak için alıkonma süresi yerine Gaz kromatografide alıkonma hacmi kullanmak daha yararlıdır.

Alıkonma Hacmi

Bir maddenin alıkonma hacmi V_R , maddenin ve sabit fazın yapısına bağlı olan fakat kolon değişkenlerine bağlı olmayan bir parametredir. V_R , kolaylıkla elde edilebilen deneysel verilerden bulunur ve kalitatif analizlerde kullanılır.

$$V_R = t_R \cdot F \quad V_M = t_M \cdot F$$

Bir maddenin alıkonma hacmini bulmak için kolon içindeki ortalama akış hızı F , bilinmelidir. Kolondaki gazın ortalama akış hızı doğrudan ölçülemez, onun yerine kolon çıkışındaki gazın akış hızı ölçülür.

Kolonun sonundaki akış hızı F_m bir sabun köpüklü akış ölçer ile belirlenebilir; Bu akış ölçerlerde gaz su ile doymuştur. Ölçülen akış hızı F_m ile ortalama akış hızı arasında aşağıdaki bağıntı vardır.

$$F = F_m \cdot \frac{T_c}{T} \cdot \left(\frac{P - P_{H_2O}}{P} \right)$$

Burada T_c ; K cinsinden kolon sıcaklığı,

T , akış ölçerin sıcaklığı

P kolon çıkışındaki gaz basıncı

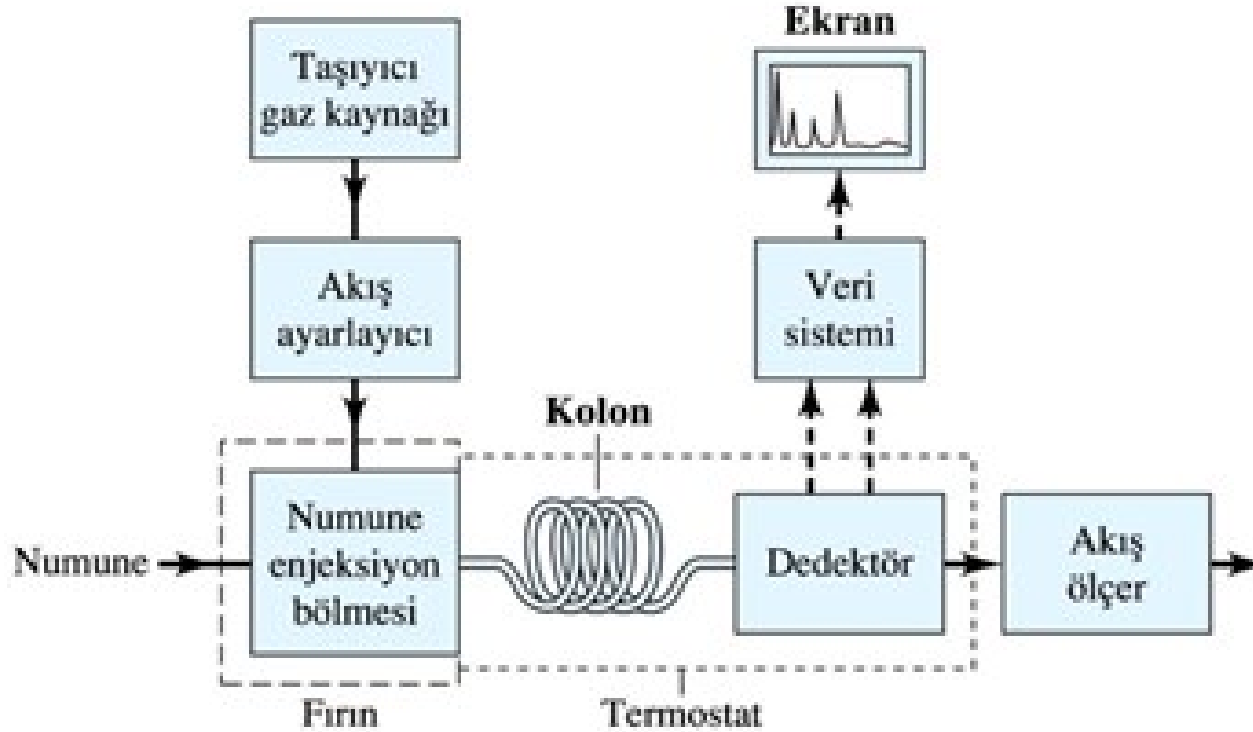
P ve T , ortam basıncı ve sıcaklığı

P_{H_2O} , Bu sıcaklıkta suyun buhar basıncı (Gaz basıncını düzeltmek için subuharı basıncını çıkarmak gerekir)

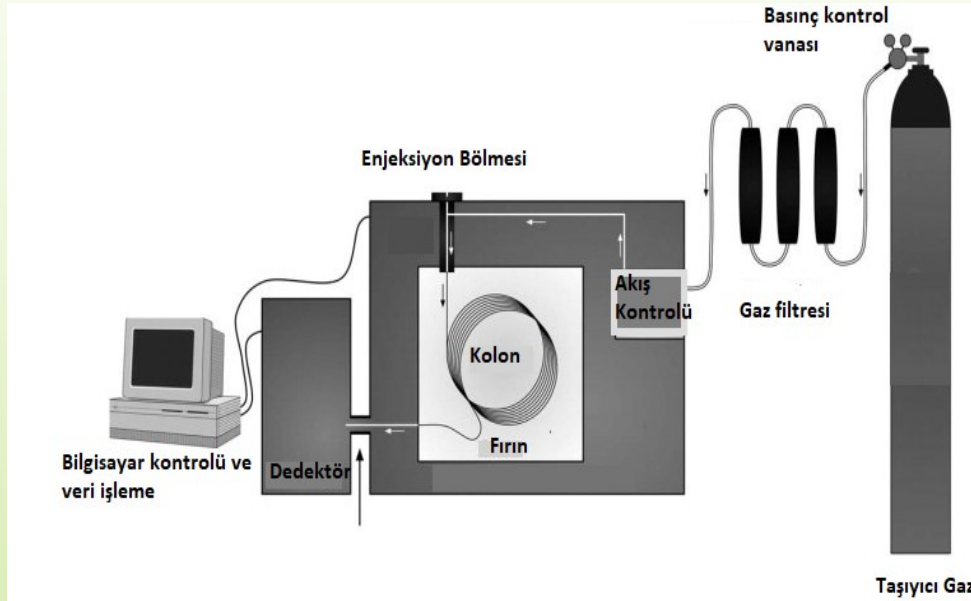


ŞEKİL 27-2 Sabun-köpüklü akış ölçer (Agilent Technologies'in izniyle).

GAZ KROMATOĞRAFİSİ CİHAZI



Tipik bir gaz kromatografi cihazının blok diyagramı.



Şekil 2 Gaz kromatografi cihazının şematik gösterimi

Bir gaz kromatografisi sistemi 6 kısımdan oluşur (Şekil 3):

- Taşıyıcı gaz sistemi
- Numune enjeksiyon kısmı
- Kolon
- Fırın
- Dedektör
- Kaydedici

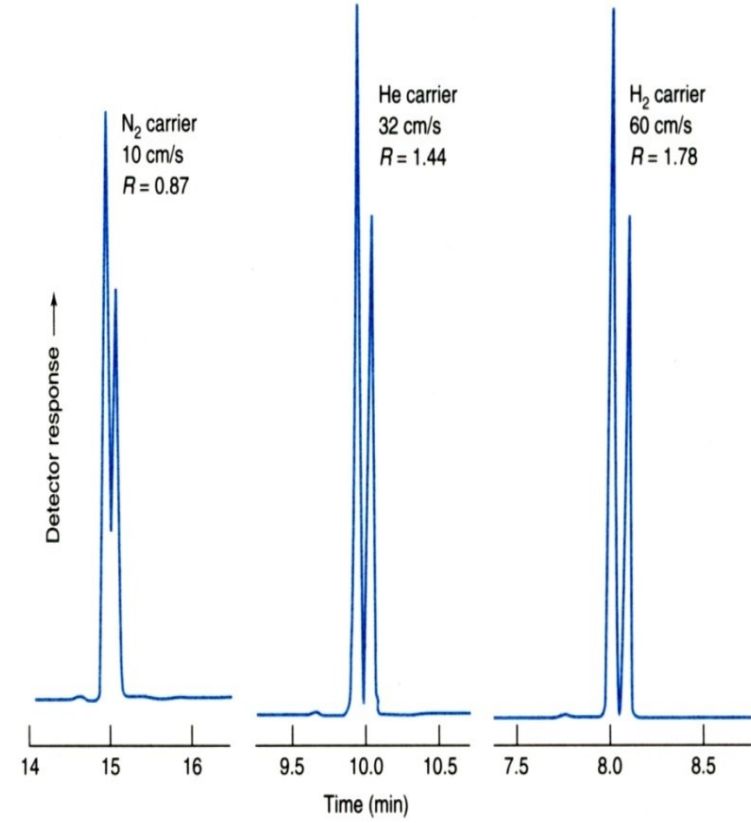
Taşıyıcı Gaz Sistemleri

GC de hareketli faz taşıyıcı gaz olarak da adlandırılır. Taşıyıcı gazlar kimyasal olarak inert gazlardır, bunlar helyum (He), azot (N_2) ve hidrojen (H_2).

Helyum yaygın olarak kullanılan taşıyıcı gazdır, pek çok dedektörle uyum sağlar. Ayırma gücü çok iyidir, bileşikler kolaylıkla düfüzlenir.

Azot gazının ayırma gücü ve çözünen difüzyonu düşüktür, alev iyonizasyon dedektöre karşı hassasiyeti azdır.

Hidrojenin ayırması çok hızlıdır. Metal yüzeylerde doymamış bileşiklerle katalitik reaksiyon verir. Kütle spektrometreyle kullanılamaz. Havayla patlayıcı karışım yapar. Ayırma gücü çok iyidir, çözünen difüzyonu hızlıdır.



*Akış hızı: $N_2 < He < H_2$,
difüzyon katsayısı: $H_2 > He > N_2$*

Numune Enjeksiyon sistemi

Kolonun verimli çalışabilmesi için uygun miktardaki örneğin gaz halinde verilebilmesi önemlidir; enjeksiyonun yavaş yapılması veya gereğinden fazla madde verilmesi band yayılmasına ve ayırmanın kötü olmasına yol açar.

Gaz kromatografisinde örnek enjeksiyonu örneğin yapısına göre değişir. En iyi kolon performansının elde edilebilmesi için verilen örneğin hacmi en düşük düzeyde tutulmalıdır. Ayırma gücü kaybı ve band genişlemesi olmaması için örneğin kolona girişi bir buhar tıpasından verilmelidir.

Katı örnekler çözülerek kullanılır, veya ince cidarlı bir tüp içinde kolona konulur ve tüp dışardan kırılarak maddenin kolona girmesi sağlanır. Sıvı numuneler için enjeksiyon yeterli iken gaz numunelerin sisteme verilmesi için özel düzeneklere ihtiyaç duyulur.



ŞEKİL 27-3 Numune enjeksiyonu için mikrosiringa seti (Hamilton Company'in izniyle).

Kolonlar

Gaz kromatografisinde iki tip kolon kullanılır.

Kapiler kolonlar (Açık boru)

Dolgulu kolonlar

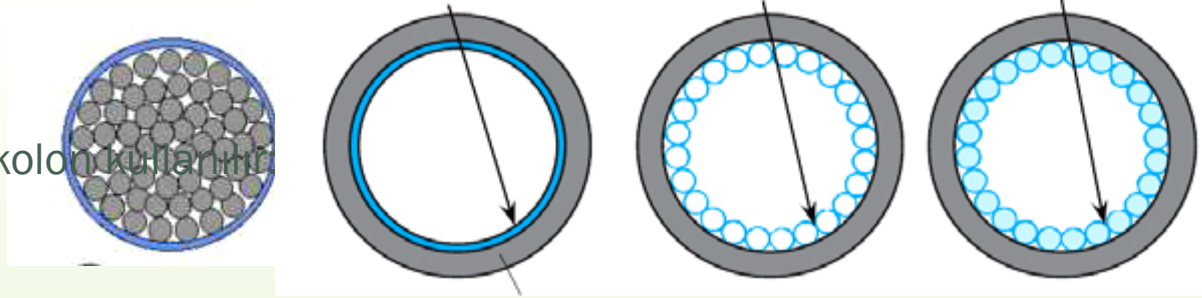
Kapiler kolonlar (gaz-sıvı kromatografisinde kullanılır), kapiler tüpten (0.3-0.5 mm iç çap) yapılmış ve içi 1 mikro metre kadar kalınlıkta sıvı ile kaplanmış kolonlardır. Kapiler kolonlardaki basınç düşüşü ihmal edilebilir düzeyde olduğundan bu tip kolonlar çok uzundur (10-100 m veya daha fazla);

Teorik tabaka sayısı birkaç yüz bin olan kolonlar hazırlanabilir. Bu kolonların örnek alma kapasiteleri çok düşüktür (< 0.01 mikro litre). Kapiler kolonların kapasitesi, tüpün içini grafit, metal oksit veya silika gibi poröz bir madde ile kaplayarak artırılabilir. Böylece yüzey alanı artırılarak tüpte kalan örnek miktarı ve dolayısıyla kolonun kapasitesi de artırılmış olur.

Dolgulu kolonlar (gaz-katı kromatografisinde kullanılır)

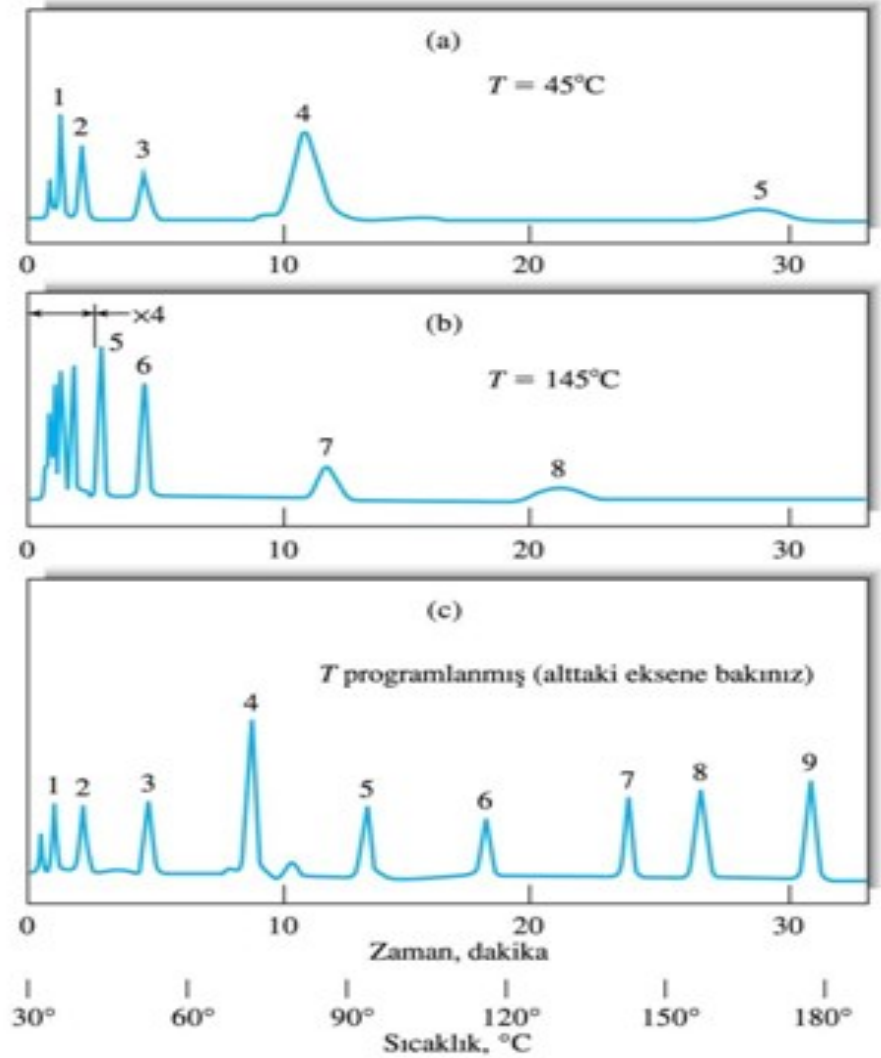
iç çapı 1-8 mm aralığındaki cam veya metal tüplerden yapılır; uzunlukları 2-20 m olabilir. Bunlar katlanmış veya sarımlar şeklindedir, böylece termostat içine sığabilecek boyutlara getirilmişlerdir. En iyi dolgulu kolondaki teorik tabaka sayısı 20000 veya daha fazladır.

Kolonlar camdan, paslanmaz çelikten, bakırdan, veya alüminyumdan yapılır. Sıvı faz ile kaplanmış katı tanecikler düz çubuk şeklindeki kolona akıtarak doldurulur. Düzgün bir dolgu olması için kolona dışardan hafifçe vurulur veya sallanır. Katı tanecikler arasında kanallar oluşmamasına dikkat edilmemelidir. Doldurulan kolon bükülür veya uygun bir sarım şekline getirilerek fırının içine konur. İyi hazırlanmış bir kolonla bir kaç yüz analiz



Kolon Sıcaklığının Kontrolü /fırın

Kolon sıcaklığı çok önemli bir değişkendir ve hassas bir çalışmada 1 derecenin onda birkaç değerine kadar kontrol edilebilmelidir. Kolon, normal olarak, termostatik bir etüv içinde bulundurulur. Optimum kolon sıcaklığı örneğin kaynama noktasına ve istenilen ayırmanın derecesine bağlıdır. Sıcaklığın, örneğin ortalama kaynama noktasına eşit veya biraz yüksek olması sıyırma süresini önemli derecede değiştirir. Kaynama aralığı geniş olan örneklerde programlı sıcaklık uygulaması önerilir. Böyle bir çalışmada kolon sıcaklığı ayırma işlemi ile paralel olarak artar; artış sürekli veya kademeler şeklindedir. Şekilde sıcaklık programlamasıyla bir kromatogramın nasıl düzeldiği görülmektedir.



Gaz kromatogramlarına sıcaklık etkisi:

- (a) 45°C 'ta izotermal;
- (b) 145°C 'ta izotermal;
- (c) 30°C 'tan 180°C 'a programlanmış

Dedektörler

Gaz-sıvı kromatografisi dedektör sistemleri, kolondan çıkan maddeleri süratle ve hassasiyetle algılayabilmelidir. Herhangi bir anda, taşıyıcı gazdaki madde konsantrasyonu sadece binde birkaç seviyesindedir ve dedektör bunun çok altındaki değerleri algılayabilecek kapasitede olmalıdır. Ayrıca bir pikin dedektörü geçtiği süre 1 sn veya daha kısa bir zaman aralığı olduğundan, dedektör kısa bir periyot içinde tüm algılama gücünü gösterebilmelidir.

Dedektörün doğrusal ve düzenli algılama yapabilmesi ve uzun süre kararlılığını koruyabilmesi istenir. Tek bir dedektör bütün numune çeşitleri için gerekli özelliklerin hepsini birden karşılayamaz. Burada en çok kullanılan dedektör tipleri görülecektir.

İdeal bir dedektör de aşağıdaki özellikler aranır;

- Yeterli duyarlık
- İyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirlik
- Geniş doğrusal çalışma aralığı
- Oda sıcaklığından 400 °C'a kadar çalışabilme
- Akış hızından bağımsız cevap süresi
- Yüksek güvenilirlik ve kullanım kolaylığı
- Her türden analite benzer cevap vermesi
- Numuneyi parçalamama

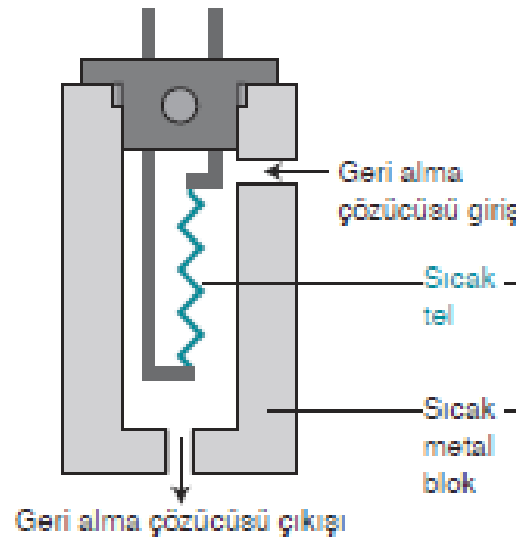
Isıl İletkenlik Dedektörü

Geçmişte, basit ve evrensel (tüm analitlere yanıt veren) olmalarından dolayı **ısıl iletkenlik dedektörleri** gaz kromatografisinde yaygın olarak kullanılıyordu. Isıl iletkenlik dedektörleri dolgulu kolonlar için yararlıdır. Bunlar, açık boru tipi kolonlarla kullanılan diğer detektörlerden daha az duyarlıdır .

Isıl iletkenlik bir maddenin sıcak bir bölgeden soğuk bir bölgeye ısı taşıma özelliğini ölçer. Helyum bir ısıl iletkenlik dedektörü ile yaygın olarak kullanılan taşıyıcı

gazdır. Helyum en yüksek ikinci ısıl iletkenliğe (H_2 'den sonra) sahiptir, dolayısıyla helyumla karışmış olan herhangi bir analit, gaz akımının iletkenliğini düşürür. Şekil'de, kromatografi kolonundan çıkan gaz bir sıcak tungsten-renyum teli üzerinden akar.

Analit kolondan çıktığı zaman, gaz akımının iletkenliği azalır, tel daha sıcak olur, onun elektriksel direnci artar ve tel boyunca gerilim değişir. Dedektör gerilimdeki değişikliği ölçer.



ÇİZELGE 23-5 273 K ve 1 atm'de ısıl iletkenlik

Gaz	Isıl iletkenlik J/(K · m · s)
H ₂	0,170
He	0,141
NH ₃	0,0215
N ₂	0,0243
C ₂ H ₄	0,0170
O ₂	0,0246
Ar	0,0162
C ₃ H ₈	0,0151
CO ₂	0,0144
Cl ₂	0,0076

Sıcak bir bölgeden soğuk bir bölgeye birim zamanda birim alandan akan enerji

$$\text{Enerji akısı (J/m}^2 \cdot \text{s)} = -\kappa(dT/dx)$$

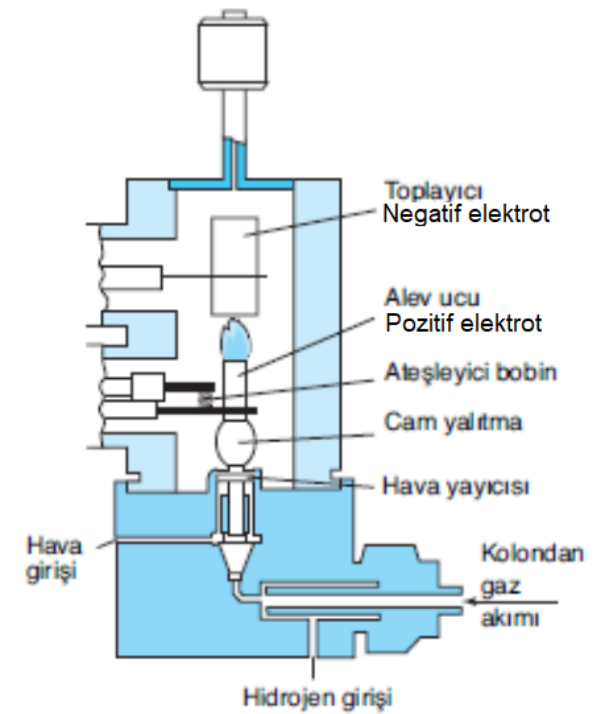
ile verilir. Burada κ ısıl iletkenlik [birimler = J/(K · m · s)] ve dT/dx sıcaklık gradyentidir (K/m). Difüzyon katsayısı kütle akısı olduğu gibi, ısıl iletkenlik de enerji akısıdır.

Alev iyonlaşma dedektörü

Şekildeki alev iyonlaşma dedektörünün çalışma ilkesi; kolondan çıkan organik bileşiklerin bir H_2 ve hava karışımında yakılmasıyla oluşan iyonların sayılmasına dayanır. Yakılan karbon atomları, CH radikallerini, onlar da CHO^+ iyonlarını oluşturur. 10^5 karbon atomunun sadece yaklaşık 1'i bir iyon üretir, iyon üretimi aleve giren karbon atomlarının sayısıyla orantılıdır. Bu iyonları tespit etmek için potansiyel bir fark sağlamak için iki **elektrot** kullanılır. Pozitif elektrot, alevin üretildiği kafa görevi görür, negatif elektrot ise alevin üzerine yerleştirilmiştir. Pozitif iyonlar toplayıcı negatif elektroda çekilir ve plakaya çarptıktan sonra bir akıma neden olur. Bu akım yüksek empedanslı bir ampermetre ile ölçülür. Veriler bilgisayarla işlenerek grafik haline getirilir. Genel olarak, x ekseninde zamanı olan bir grafik ve y eksenindeki toplam iyon görüntülenir.

Ölçülen akım kabaca alevdeki karbon atomlarının oranına karşılık gelir. Dedektörün yanıtı, birim zamanda dedektöre çarpan karbon iyonlarının sayısına göre belirlenir. Bu, dedektörü derişim yerine kütleyle duyarlı hale getirir, bu da dedektörün yanıtı taşıyıcı gaz akış hızındaki değişikliklerden büyük ölçüde etkilenmediği için yararlıdır.

Gözlenebilme sınırı ısı iletkenlik dedektörününkünden yaklaşık 100 defa daha küçüktür (Çizelge 1) ve He yerine N_2 taşıyıcı gazı kullanıldığında %50 azalır. Taşıyıcı gaz olarak He veya N_2 , yanıcı gaz olarak H_2 , yakıcı gaz olarak da O_2 veya hava kullanılır. Açık boru tipi kolonlar için, H_2 veya He çıktısına, dedektöre girmeden önce N_2 telafi gazı ilave edilir. Alev iyonlaşma dedektörü dar delikli açık boru tipi kolonlar için yeteri kadar duyarlıdır. Çoğu hidrokarbonlara yanıt verir ve H_2 , He, N_2 , O_2 , CO, CO_2 , H_2O , NH_3 , NO, H_2S ve SiF_4 gibi hidrokarbon olmayan analitlere duyarsızdır.



Tipik bir alev iyonlaşma dedektörü

Uçucu sıvı veya gaz halindeki örnek bir septum içinden hızlıca buharlaşacağı ısıtılmış bir bölmeye enjekte edilir. Buhar, He, N₂ veya H₂ taşıyıcı gazıyla kolon boyunca süpürülür ve ayrılan analitler, bir dedektör içinden geçer. Kolon, analitlerin kabul edilebilir bir sürede kolondan geri alınması (elue edilmesi) için yeterli buhar basıncını sağlayacak kadar sıcak olmalıdır. Dedektör, analitlerin gaz halinde kalması için, kolondan daha yüksek bir sıcaklıkta tutulur.

Aşağıdaki çizelgede Gaz kromatografide kullanılan dedektörlerin özellikleri verilmiştir.

Gaz Kromatografik Dedektörler

Tipi	Uygulanan Numuneler	Gözlenebilme Sınırı
Alev iyonlaşma	Hidrokarbonlar	1 pg/s
Termal iletkenlik	Her tip bileşik	500 pg/mL
Elektron yakalama	Halojenli bileşikler	5 fg/s
Kütle spektrometre (MS)	Her tür için ayarlanabilir	0,25 – 100 pg
Termiyonik	Azot ve fosfor bileşikleri	0,1 pg/s (P), 1 pg/s (N)
Elektrolitik iletkenlik (Hall)	Halojen, kükürt veya azot içeren bileşikler	0,5 pg Cl/s, 2 pg S/s, 4 pg N/s
Fotoiyonlaşma	UV ışınıyla iyonlaşan bileşikler	2 pg C/s
Fourier dönüşümlü IR (FTIR)	Organik bileşikler	0,2 - 40 ng

Kolon dolgusu için Durgun Fazlar

Katı maddeye emdirilmiş sıvı kullanıldığında Gaz-sıvı kromatografisi adını alır. Bu yöntemde kullanabilecek yüzlerce sıvı vardır. Benzer maddelerin bu yöntemle ayrılabilmesi için uygun bir sıvı seçimi yapılmalıdır.

Bir maddenin alıkonma zamanı doğrudan doğruya onun dağılma katsayısına bağlıdır, bu da sabit fazın yapısıyla ilişkilidir. Gaz-sıvı kromatografisindeki sabit sıvı fazın örnekteki maddeler arasında farklı dağılma katsayısı yaratması gerekir. Ayrıca, bu katsayının çok küçük veya çok büyük olmaması da önemlidir. Dağılma katsayısı küçük olan maddeler kolondan çok hızlı çıkarlar ve yeterli ayırma olmaz. Dağılma katsayısının gereğinden büyük olması durumunda ise maddenin kolondan çıkması için gerekli zaman çok uzar.

Kolon içinde yeterli bir alıkonma zamanı, maddenin sabit faz ile bir dereceye kadar uyumlu (çözünebilir) olmasıyla sağlanır. Bu ise madde ile sabit fazın polaritelerinin kısmen benzer olmalarını gerektirir. Örneğin, hidrokarbonlar veya eterler gibi polar olmayan bir homolog seri, (yüksek molekül ağırlıklı bir doğmuş hidrokarbon) gibi bir sabit sıvı faz ile birbirinden ayrılabilir. Diğer yandan, alkoller ve aminler, polietilen glikol gibi daha polar bir sıvı ile çalışılır. Aromatik hidrokarbonlar için ise benzildifenil sabit sıvı fazı uygundur.

Polarlıkları birbirine benzeyen maddeler çoğunlukla, kaynama noktası sırasına göre ayrılırlar; kaynama noktası farkı arttıkça ayrılma daha iyi olur. Kaynama noktaları birbirine yakın, fakat polariteleri farklı olan maddelerin ayrılması için, sabit sıvı fazın maddelerden birini (veya daha fazlasını) dipol etkisiyle veya katılma ile tutması gerekir

ÇİZELGE 27-2 Tipik GC Kolonların Özellik ve Nitelikleri

	Kolon Tipi			
	FSWC*	WCOT†	SCOT‡	Dolgulu
Uzunluk, m	10–100	10–100	10–100	1–6
İç çap, mm	0,1–0,3	0,25–0,75	0,5	2–4
Verim, tabaka/m	2000–4000	1000–4000	600–1200	500–1000
Numune büyüklüğü, ng	10–75	10–1000	10–1000	10–10 ⁶
Bağıl basınç	Düşük	Düşük	Düşük	Yüksek
Bağıl hız	Hızlı	Hızlı	Hızlı	Yavaş
Esneklik	Evet	Hayır	Hayır	Hayır
Kimyasal inertlik	En iyi			→ En kötü

*Ergitilmiş silis açık borusal kolon

†Çeperi kaplı açık borusal kolon

‡Destek kaplı açık borusal kolon (gözenekli tabaka açık borusal, PLOT olarak da anılır).

Tablo-1: Hidrokarbonların Çeşitli sabit Sıvılarla Ayrılması

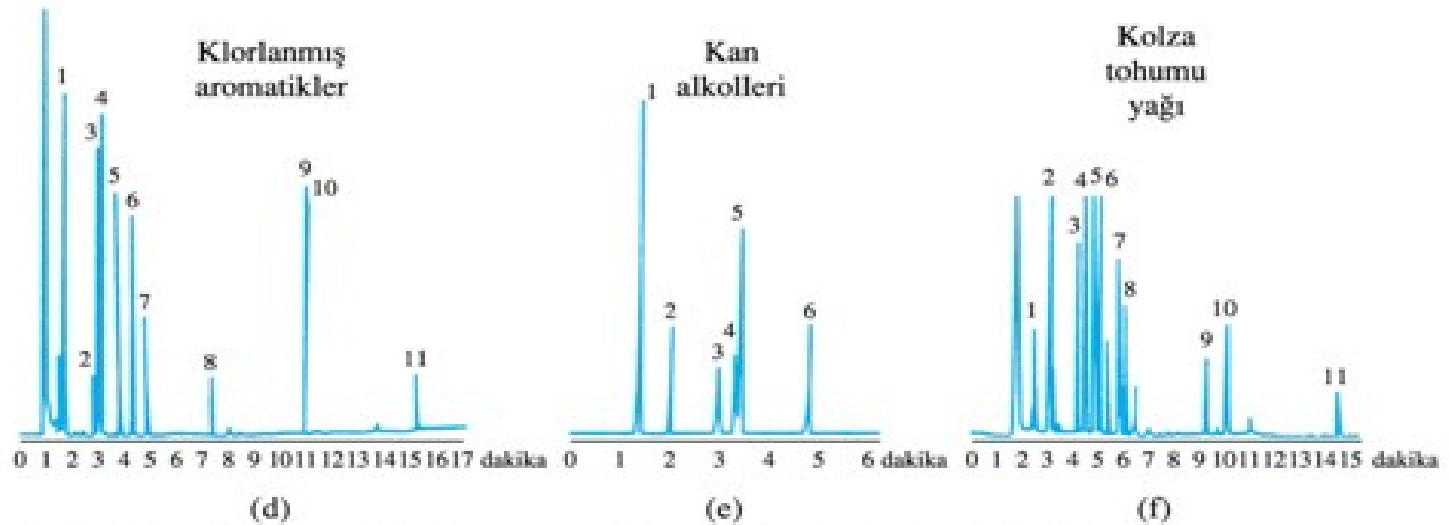
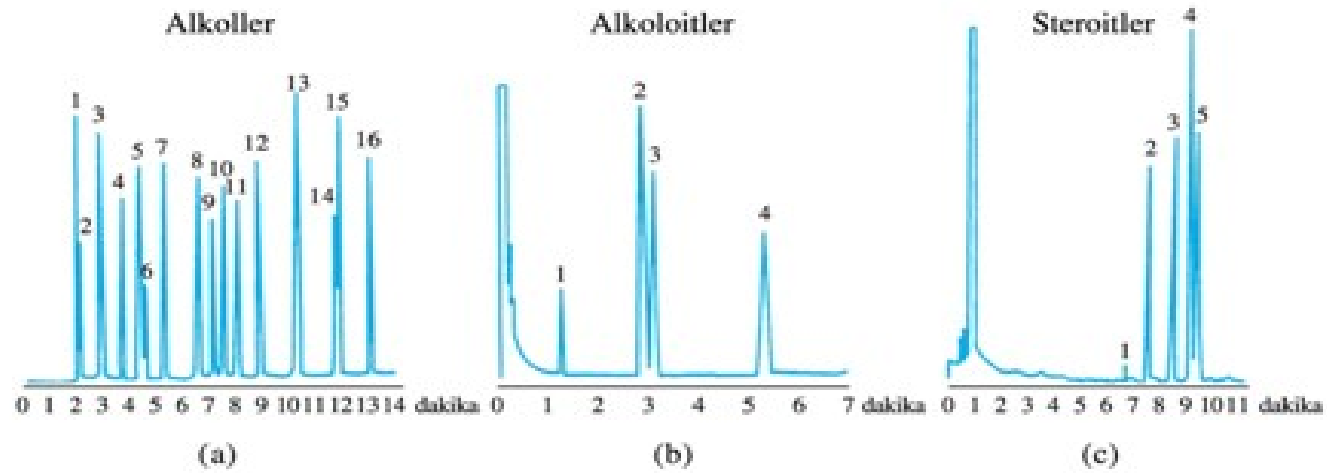
Bileşik	Kaynama noktası °C	Relatif alıkonma zamanı		
		Tri-izobütülen	Asetonil aseton	Glikolde AgNO ₃
Etan	-10.4	1.0	1.0	1.0
İzobütan	-11.7	5.6	2.2	0.75
İzobüten	-6.9	6.7	4.75	3.25
Büten-1	-6.3	6.7	4.75	6.25
Bütadien	-4.4	6.7	10.0	10.0
n-Bütan	-0.5	7.5	3.0	0.75
Trans-büten-2	0.88	8.0	5.85	1.75
Cis-Büten-2	3.72	8.9	6.8	5.5

ÇİZELGE 27-3 GLC için Bazı Yaygın Sıvı Durgun Fazlar

Durgun Faz	Genel Ticari Adı	En Yüksek Sıcaklık, °C	Genel Uygulamaları
Polidimetil siloksan	OV-1, SE-30	350	Genel amaçlı apolar faz, hidrokarbonlar, polinükleer aromatikler; ilaçlar; steroidler, PCB'ler
%5 Fenil-polidimetil siloksan	OV-3, SE-52	350	Yağ asidi metilesterleri, alkaloidler, ilaçlar, halojenli bileşikler
%50 Fenil-polidimetil siloksan	OV-17	250	İlaçlar, steroidler, pestisitler; glikoller
%50 Trifloropropil-polidimetil siloksan	OV-210	200	Klorlanmış aromatikler, nitroaromatikler, alkil süstitüe benzenler
Polietilen glikol	Carbowax 20M	250	Serbest asitler, alkoller, eterler, eteri yağlar, glikoller
%50 Siyanopropil-polidimetil siloksan	OV-275	240	Poli-doymamış yağ asitleri, rozin asitleri, serbest asitler, alkoller

Bir grup maddenin bulunduğu bir örneğin analizi için gerekli sabit fazın saptanmasında çeşitli yöntemler uygulanır. Bunlardan birinde, sabit fazlardaki benzen, etanol, metiletil keton, nitrometan, ve pridinin alıkonma indisleri, aynı solventlerin squalane üzerinde gösterdiği alıkonma indisleri ile kıyaslanır.

Sonuçta elde edilen verilerle, sabit fazlar sınıflandırılır. Yine de bir ayırma işleminde kullanılacak sabit fazlar arasında deneme ile en uygunu seçilmelidir. Tabloda çok kullanılan bazı sabit sıvı fazların listesi verilmiştir.



Aşağıdaki malzemelerle kaplanmış açık borusal kolonlardan elde edilen tipik kromatogramlar: (a) polidimetilsiloksan; (b) %5 (fenil metildimetil) siloksan; (c) %50 (fenil metildimetil) siloksan; (d) %50 poli(trifloropropil-dimetil) siloksan; (e) polietilen glikol ve (f) %50 poli(siyanopropil dimetil) siloksan

Kalitatif Analiz

Sıvı-kromatografisi gibi gaz kromatografisi de karmaşık karışımları ayırmada ve her bir maddenin tanımlanmasında kullanılan önemli bir yöntemdir.

Alıkonma Zamanı ve Alıkonma Hacmi

Bir maddenin kalitatif analizi için tek bir alıkonma zamanı yeterli değildir. Çünkü alıkonma zamanı kolon sıcaklığı, akış hızı, basınç, ve sabit fazın yapısı gibi çalışma koşullarına göre değişir. Emin olmak için analit ve standartın alıkonma zamanları, çalışma koşulları değiştirilerek incelenir, her ikisindeki alıkonma zamanı benzer bir değişiklik gösteriyorsa, analitin standart ile aynı madde olduğu söylenebilir. Veya, iki/üç ayrı kolonda iki/üç farklı sıcaklıkta elde edilen alıkonma zamanlarının analit ve standart için benzer olmaları da maddenin tanımlanması için yeterlidir. Bir karışımdaki maddelerin birbirinden ayrıldıktan sonra tanımlanması, karışım halindeyken tanımlanmasından daha kolaydır.

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M}$$

Seçicilik faktörleri:

A analitin bulunduğu bir örneğe B iç standart ilave edilerek α parametresi bulunur. A ve B kimyasal olarak birbirinin benzeri maddeler olduğundan kolon değişkenlerinden etkilenmez. A ve B'nin pikleri birbiri üzerine düşmemeli ve her ikisi de birbiriyle ve hareketli fazla uyumlu olmalıdır. Seçicilik faktörünün, sadece $(t_R)_A$, $(t_R)_B$ ve t_M ölçümlerinden bulunabilme gibi bir avantajı vardır.

Alıkonma İndeksi

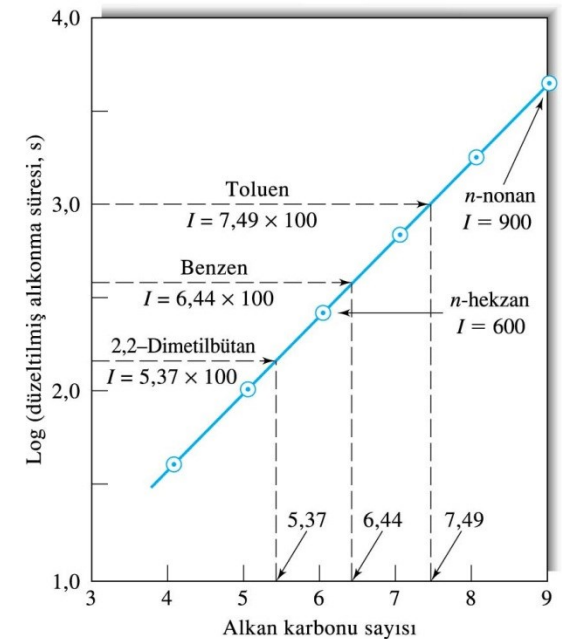
Alıkonma indeksi (I) Kovats tarafından çıkarılmış bir parametredir; kromatografik verilerin rapor edilmesinde kullanılır. Bir analitin alıkonma indeksi analit pikini iki veya daha fazla normal parafin piki ile kıyaslayarak bulunur.

Homolog bir seride bulunan maddelerin alıkonma zamanlarının (veya hacimlerinin) logaritmaları t'_R ($t'_R = t_R - t_M$) bu maddelerin içerdikleri karbon sayısı ile doğrusal bir ilişki gösterir. Bunun sonucu olarak da n-parafinlerde ($t_R - t_M$) değerlerinin alıkonma zamanlarına göre çizilen grafiği bir doğru verir. Buna göre X maddesinin alıkonma indeksi aşağıdaki eşitlikle tarif edilir

$$I_X = 100 \left[\frac{\log (t'_R)_X - \log (t'_R)_n}{\log (t'_R)_{n+1} - \log (t'_R)_n} \right] + 100 n$$

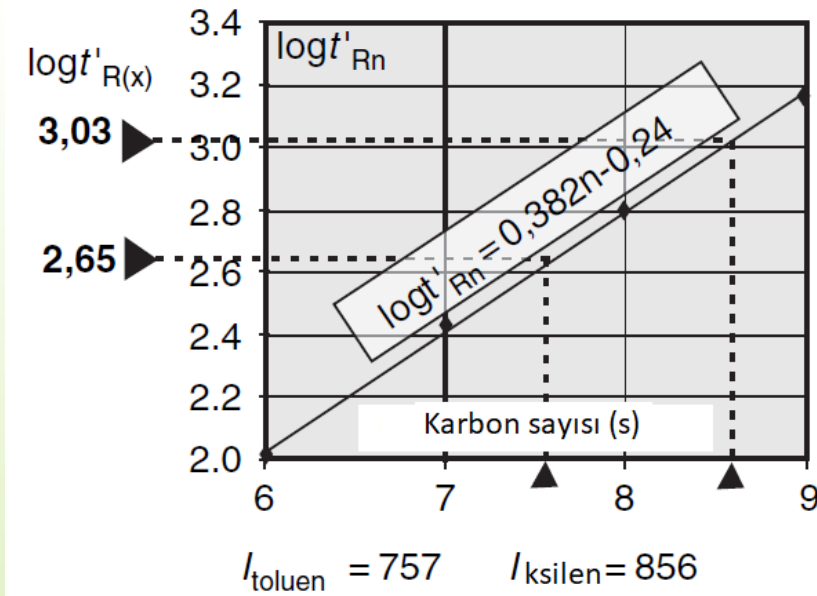
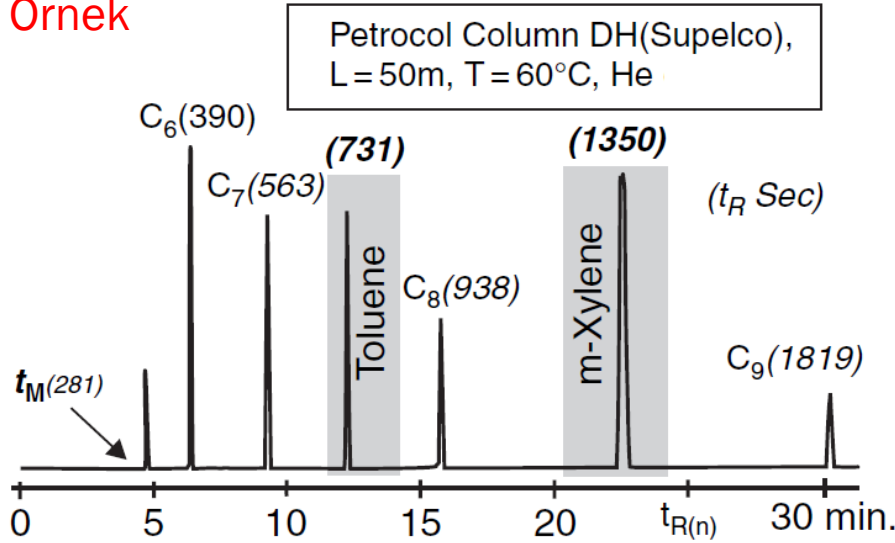
t'_R , her madde için düzeltilmiş alıkonma zamanıdır ve $t'_R = (t_R - t_M)$ ye eşittir. X analiti, n ve (n+1) karbon sayısına gören-parafinleri belirtir. Hidrokarbonlar, alıkonma süreleri analitin alıkonma süresini içine alacak şekilde seçilir.

C4 -C9 n-Parafinler için çizilen grafik Şekil'de görülmektedir. Üç bileşiğin aynı kolonda ve aynı sıcaklıktaki log alıkonma zamanları da ordinatta gösterilmiştir. Alıkonma indeksleri, apsiste karşılığı olan değerlerin 100 ile çarpılmasıyla bulunur: toluenin alıkonma indeksi 749, benzeninki 644'dür.



ŞEKİL 27-18 Üç maddenin alıkonma indislerinin bulunmasında kullanılan bir yöntemin grafik gösterimi. Durgun faz: skualen. Sıcaklık: 60°C. Normal alkanlar olan nonan ve hekzan standartları için alıkonma indisleri oklarla gösterilmiştir.

Örnek



Yukarıda 4 homolog alkan karışımına enjekte edilmiş tolüen ve ksilenin gaz kromatogramı verilmiştir. Grafikteki verileri kullanarak, tolüen ve ksilen için alıkonma indekslerini hesaplayınız. (piklerin alıkonma zamanı saniye cinsinden ifade edilmiştir) (grafikteki dikey eksendeki değerler s cinsinden düzeltilmiş alıkonma zamanlarıdır) Kromatogramdan şu değerleri elde ederiz.

$(t_R)_{toluen} = 12,2$, Tolüen için C₇ ve C₈ karbonlu alıkonma zamanlarını

$(t_R)_{ksilen} = 22,5$ Ksilen için C₈ ve C₉ karbonlu alıkonma zamanlarını kullanırsak;

$$I_{toluen} = 100n + 100 \left[\frac{\log(12,2 - 4,7) - \log(9,4 - 4,7)}{\log(15,6 - 4,7) - \log(9,4 - 4,7)} \right] = 100 \cdot 7 + 55,6 = 755,6$$

$$I_{ksilen} = 100n + 100 \left[\frac{\log(22,5 - 4,7) - \log(15,6 - 4,7)}{\log(30,3 - 4,7) - \log(15,6 - 4,7)} \right] = 100 \cdot 8 + 58,3 = 858,3$$

ÖRNEK:

Aşağıdaki verileri kullanarak 100 °C'de squalene kolondaki benzenin alıkonma indeksini hesaplayınız.

madde	$(t_R - t_M)$, dak.	I
n-heksan	3.43	600
benzen	4.72	?
n-heptan	6.96	700

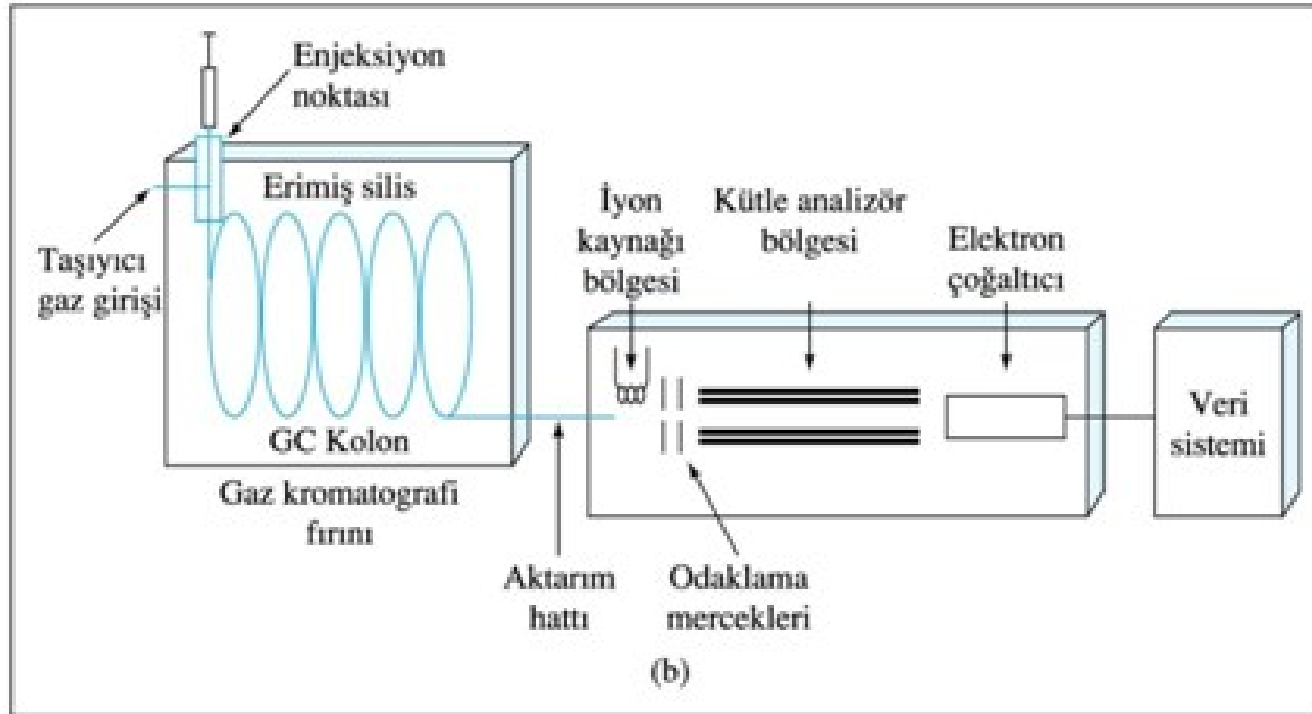
Denklem(7)'de değerler yerine konur.

$$I = 100 \left[\frac{\log 4.72 - \log 3.43}{\log 6.96 - \log 3.43} \right] + 100 \times 6 = 45.1 + 600 = 645$$

■ Kantitatif Analiz

- Bir gaz-sıvı kromatografi kolonundan alınan dedektör sinyali kantitatif ve yarı kantitatif analizde kullanılır. Çok iyi kontrol edilen koşullarda %1-3 kadar duyarlılıkla tayin yapılabilir. Pek çok analitik yöntemde olduğu gibi sonuçların doğruluğun-da, kalibrasyon ve değişken parametrelerin kontrolü çok önemlidir; örneğin yapısı da doğruluğu kısmen de olsa etkileyebilir.
- Daha önce Kromatografi başlığında verilen kantitatif analiz teknikleri gaz kromatografi için de geçerlidir.

GC/MS



Tipik bir kılcal GC/MS sisteminin şeması. GC'den çıkan karışım kütle spektrometrenin girişine gelir ve burada gazdaki moleküller parçalara ayrılır; iyonlaştırılır; analizlenir ve dedekte edilir.

Molekül Kütlesi

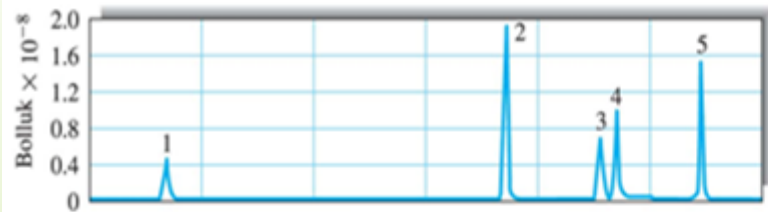
1: 74

2: 143

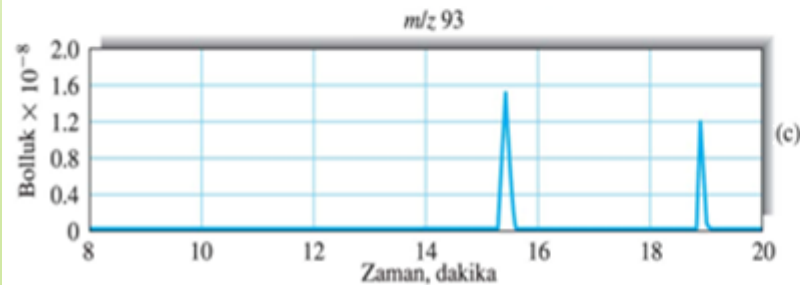
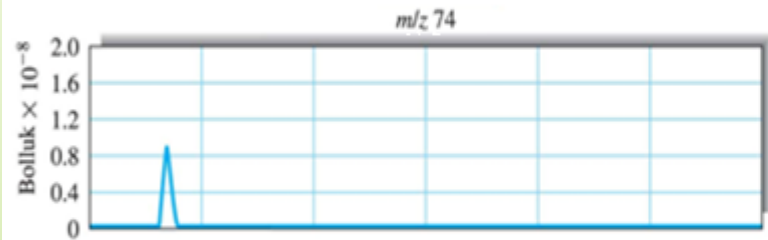
3: 171

4: 130

5: 173



(a) Bir GC/MS sisteminden alınan tipik çıktılar. (a) Beş bileşenli bir karışımın toplam-iyon akımı kromatogramı. Bileşenler: 1. *N*-nitrozodimetilamin, 2. bis(2-kloroetil)eter, 3. bis(2-kloroisopropil)eter, 4. *N*-nitrozodi-*n*-propilamin ve 5. bis(2-kloroetoksi)metan. (b) $m/z = 74$ için kütle kromatogramı. Buradaki pik *n*-nitrozodimetilamin ($C_2H_6N_2O$) bileşiği moleküler iyonuna aittir. (c) $m/z = 93$ için başka bir seçilmiş-iyon kromatogramı. Pik 2 ve Pik 5 bu m/z değerinde, parçalanma ürünlerinden kaynaklanan pikler vermektedir



SIVI KROMATOĞRAFİSİ (LC)

(1) Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)

(2) Adsorpsiyon veya sıvı-katı kromatografisi

(3) Dağılım kromatografisi

(4) İyon kromatografisi

(5) Boyut eleme veya jel kromatografisi

(6) Affinite kromatografisi

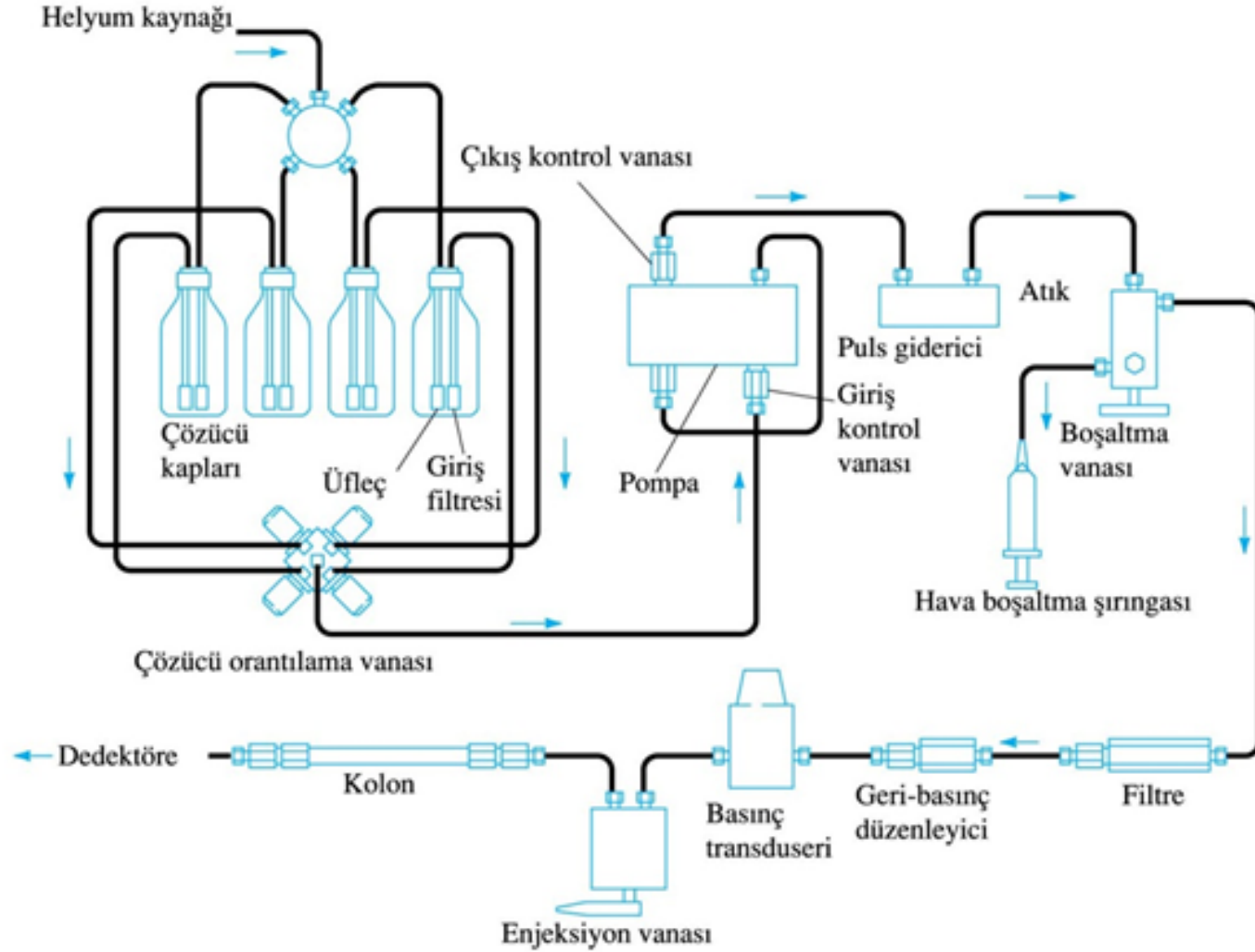
HPLC kromatografisinde
Taşıyıcı (hareketli faz) olarak genelde
Çeşitli organik çözücüler
Durgun (sabit) faz olarak,
Silis ve Alümina türevleri
Dedektör olarak
UV-GB Absorpsiyon, IR, Kırma indisi,
Floresans dedektörleri kullanılır.

YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC)

Sıvı kromatografisi yönteminin özel bir uygulaması olan *yüksek performanslı sıvı kromatografisinde* (HPLC), hareketli faz sıvı durgun faz ise, katı parçacıklardan (alümina, silikajel vb.) oluşur.

Durgun (sabit) faz olarak kullanılan malzemenin tanecik boyutlarının önemli ölçüde küçültülmesi sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyür ve böylece kolonun etkinliği arttırılmış 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 ilaçlarında ayırma ve tayin için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle çevre sıcaklığında termal olarak kararsız bileşikleri ve yüksek polarlıktaki bileşikleri herhangi bir türevlendirme olmaksızın ayırmak ve analiz etmek mümkündür.



Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazının şematik görünüşü

Yukarıdaki şekilde görülen HPLC cihazı başlıca üç ana 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

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 eylemsiz 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 kısa tutulması istenir. Kolon çıkışına ve dedektör sistemine bağlanmış boruların en iyisi, hareketli fazla önemsiz ölçüde seyrelmeye izin veren en düşük 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 silika jel kullanılır. İçerdiği SiOH grupları nedeniyle zayıf asidik özellik gösteren silikajel, bazik özellik gösteren bileşikleri bazik kuvvetlerine göre tutar. Yani, kuvvetli bazlar silika jel kolonlarda zayıf bazlara oranla daha kuvvetli tutulurlar. Silika jel 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.

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:

Dedektör	Yaklaşık gözlenebilir sınırlar ^a (ng)	Gradyent için yararlı mı?
Morötesi	0,1–1	Evet
Kırılma indisi	100–1 000	Hayır
Buharlaştırıcı ışık-saçılması	0,1–1	Evet
Yükü aerosol	1	Evet
Elektrokimyasal	0,01–1	Hayır
Floresans	0,001–0.01	Evet
Azot ($N \xrightarrow{\text{Yanma}} NO \xrightarrow{O_3} NO_2^+ \rightarrow h\nu$)	0,3	Evet
İletkenlik	0,5–1	Hayır
Kütle spektrometri	0,1–1	Evet
Fourier dönüşümlü infraret	1000	Evet

- * Düşük gürültü seviyesine sahip olmalıdır. Böylece ayrılan bileşenlerin küçük miktarları bile gözlenebilir.
- * Hızlı ayrılan pikleri kaydetmek için süratli cevap zamanına sahip olmalıdır.
- * Hareketli fazdaki akış hızı, sıcaklık ve fazın bileşimindeki değişimlere karşı bir dereceye kadar duyarsız olmalıdır.
- * Bütün çözünenlere cevap vermeli veya en azından tahmin edilebilir, tatmin edici bir seçiciliğe sahip olmalıdır.
- * Kolay çalışır olmalı ve kararlılığı fazla olmalıdır.
- * Oluşan pikte nitel bilgi de sağlamalıdır.

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.

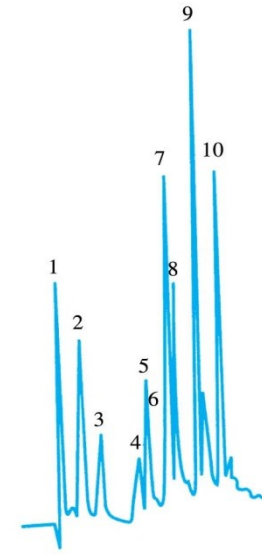
- UV absorpsiyon dedektörü, kolondan ayrılarak dedektöre ulaşan bileşenlerin ultraviyole bölgede yaptığı absorpsiyonun ölçümüne dayanır. Tek bir dalga boyunda çalışan dedektörler kullanılabildiği gibi bir monokromatör ile çeşitli dalga boylarını seçerek çalışan dedektörler de vardır. Tek dalga boyunda çalışan dedektörlerde ışık kaynağı olarak genellikle 254 nm'de ışıma yapan Hg lambası, çeşitli dalga boylarını 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 özellikleri şunlardır:
- * Örneklerin UV- görünür bölgede absorpsiyon yapması gerekir.
- * Hareketli faz akış hızı ve sıcaklık değişimlerinden etkilenmez.
- * Band genişletme etkisi küçüktür.
- * Çok güvenilir, çalıştırılması kolaydır.
- * Örnek çözeltiyi bozmaz.

- HPLC'nin diğer kromatografi türlerinden üstünlükleri :
- 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.

- **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 çözülmelidir. Eğer örnek böyle bir çözücüde çözünmüyorsa, diğer bir çözücüde çözünmeli, fakat bu durumda kullanılan çözücü kesinlikle hareketli fazla karışabilir olmalıdır. Örnek bileşenlerinin, hareketli faz çözücüsünde çökmemesine de dikkat edilmelidir.
- **Sıvı örnekler:** Sıvı örneklerde çözücü, sistem ile uyumluysa, doğrudan enjekte edilebilir. Eğer örnekler istenen çözücüde değilse veya enjekte edilecek kadar derişik değilse, deriştirilmelidir.
- **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.
-
- **Dedeksiyon sisteminin korunması**
- Dedeksiyon hücresinde gaz kabarcıkları oluşursa, tayinde problemler ortaya çıkar. Gaz kabarcığının oluşumunu önlemek için şu önlemler alınmalıdır:
 - * Sistemde sızıntı olmamalıdır.
 - * Çözücü HPLC sisteminde kullanılmadan önce gaz uzaklaştırılmalıdır.
 - * Eter, pentan gibi uçucu çözücüler sistemde buharlaşacağından, bunları kullanmaktan kaçınılmalıdır.

HPLC’de çözücü değiştirmek suretiyle ayırmanın iyileştirilmesi

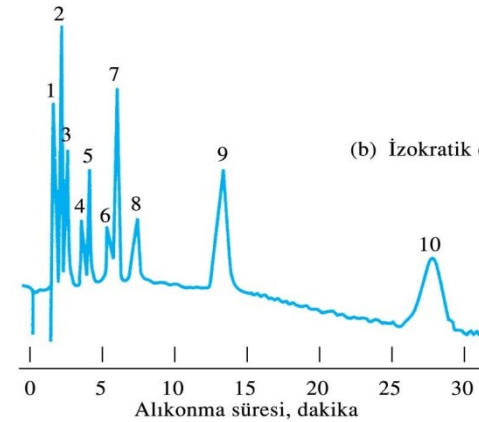
Tek bir çözücü veya sabit bileşimdeki çözücü karışımı kullanılarak yapılan elüsyona izokratik elüsyon adı verilir. Bu durumda birbirinden ayıramayan maddeler çözücü değiştirmek suretiyle birbirinden ayrılır. Bu amaçla polarlıkları birbirinden farklı 2 veya 3 çözücü kullanılır. Ayırma sırasında çözücü değiştirilir. Bu yöntemle gradiyent elüsyon adı verilir.



(a) Gradiyent elüsyon

Pikler

1. Benzen
2. Monoklorobenzen
3. Ortodiklorobenzen
4. 1,2,3-triklorobenzen
5. 1,3,5-triklorobenzen
6. 1,2,4-triklorobenzen
7. 1,2,3,4-tetraklorobenzen
8. 1,2,4,5-tetraklorobenzen
9. Pentaklorobenzen
10. Hekzaklorobenzen

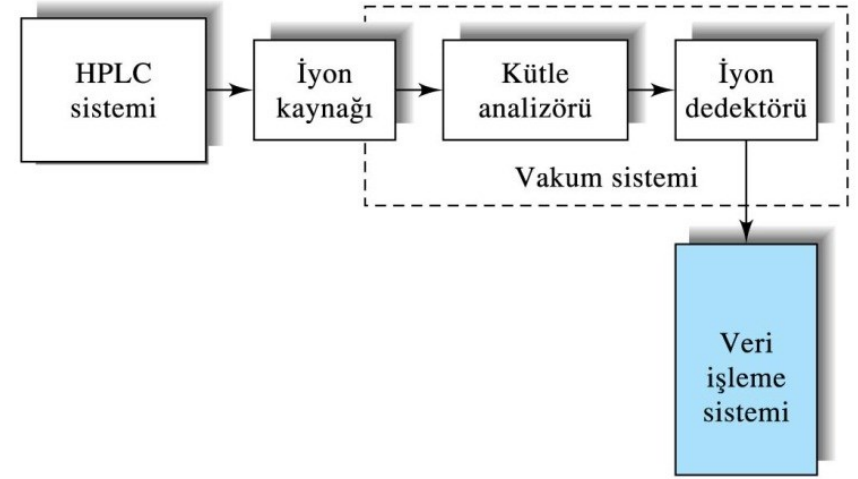


(b) İzokratik elüsyon

Gradiyent elüsyon ile ayırmanın iyileştirilmesi.
Numune: 5 µL, izopropanolde hazırlanmış klorlanmış benzenler. Kolon: 1 m × 2,1 mm iç çap, paslanmaz çelik boru. Dolgu maddesi: %1 Permaphase® ODS. Dedektör: UV fotometre (254 nm). Koşullar: 60°C sıcaklık, 1200 psi basınç

LC/MS

Kütle Spektrometrik Dedektörler
Gaz kromatografide olduğu gibi, sıvı kromatografi kolonundan çıkan türlerin bir kütle spektrometride tayini çok doğal bir çözüm gibi görülmektedir. Ancak, bu iki tekniği birleştirmede önemli sorunlar vardır. Çünkü, kütle spektrometre için gaz halde bir numune gerekirken, LC kolonundan çıkan bir çözeltidir. Öncelikle çözücünün buharlaştırılması gerekir. Ne yazık ki, LC kolondan çıkan sıvı buharlaşınca, oluşan gaz hacmi, gaz kromatografi kolonundan çıkan gaz hacminin 10-1000 katı olabilmektedir. Dolayısıyla, önce çözücünün büyük bir kısmını uzaklaştırmak gerekir



ŞEKİL 28-13 Bir LC/MS sisteminin blok diyagramı. LC kolonundan çıkan akışkan, normal atmosfer basıncında çalışan, elektrosprey veya kimyasal iyonlaştırıcı tipi bir iyonlaştırıcıya girer. Oluşan iyonlar, kütle analizör tarafından ayrılır ve iyon dedektöründe dedekte edilir.

Çözücüyü uzaklaştırma ve LC kolonuyla MS sistemi arayüzünü oluşturma amaçlı çeşitli düzenekler geliştirilmiştir. Günümüzde en yaygın olan yaklaşım, atmosferik basınçta düşük akış hızlı iyonlaştırma sağlayan bir tekniktir. Tipik bir LC/MS sisteminin blok diyagramı Şekil 28-13'de görülmektedir. HPLC sistemi nano boyutlu bir kılcal LC sistemi olup akış hızı $\mu\text{L/dakika}$ mertebesinde. Başka bir seçenek de, yaygın HPLC şartlarında olduğu gibi, çıkış hızını 1-2 mL/dakika aralığında tutmaktır. En yaygın iyonlaştırıcılar, elektrosprey iyonlaştırıcılar ve atmosferik basınçta kimyasal iyonlaştırıcılarıdır .

Örnek

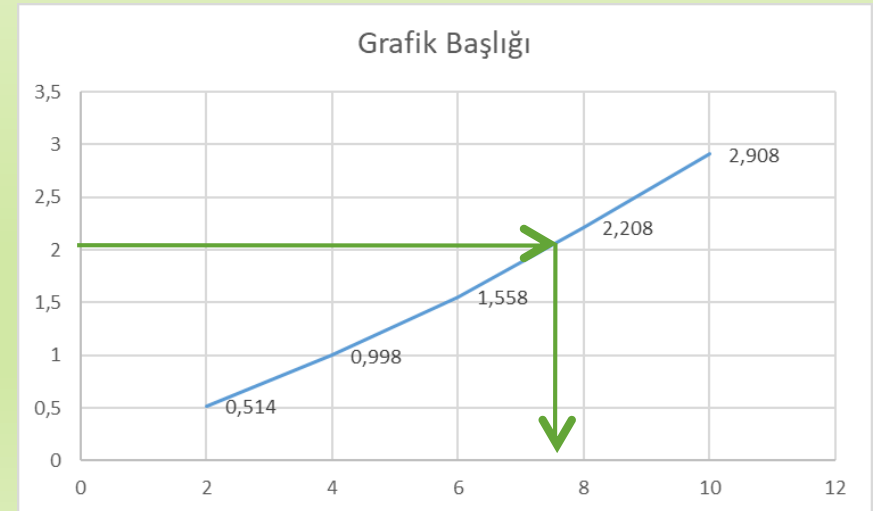
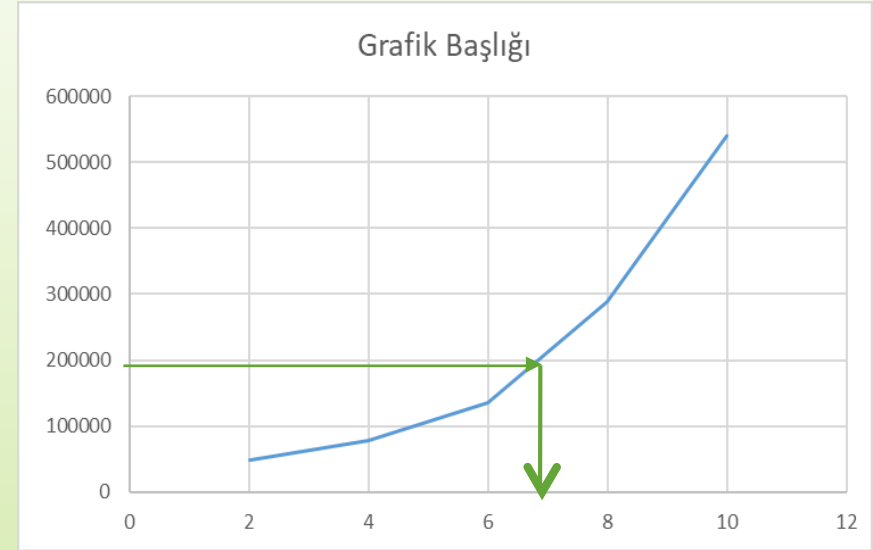
Bir p-ksilen tayininde iç standart olarak metil izobütilketon kullanılmaktadır.

$$\%Hata = (7-7,8)/7,8 \times 100 = -10,25$$

p-ksilen derişimi (ppm)	p-ksilen pik alanı (mm ²)	iç standart pik alanı (mm ²)	p-ksilen pik alanı/ iç standart pik alanı
2	49075	95476	0,514
4	78112	78268	0,998
6	135404	86908	1,558
8	289025	130899	2,208
10	540289	185794	3,008
Standartlara ve bilinmeyene 10 ppm iç standart eklenmiştir.			
Bilinmeyen	200456	95089	2,108

iç standart eklenmeden kalibrasyon grafiğı doğru elde edilmemiştir. Buna rağmen grafikten okunan değer 7 ppm dir.

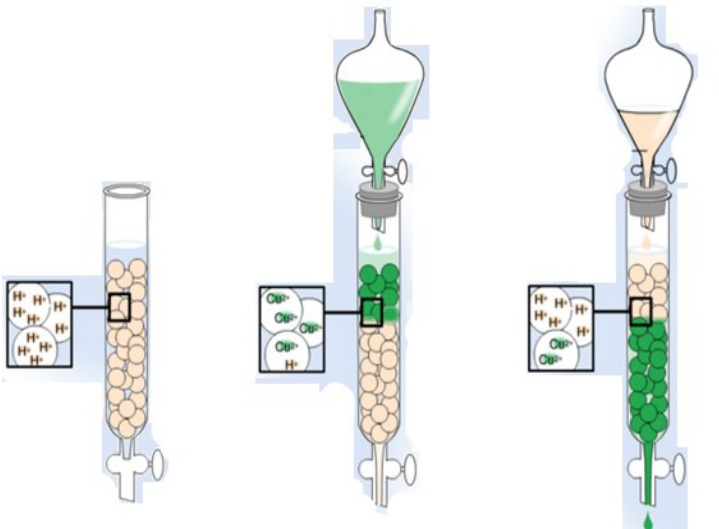
iç standart eklenerek p-ksilenin pik alanının/iç standardın pik alanına oranının derişime karşı grafiğinde ise doğru elde edilmiştir. Bu grafikten elde edilen değer ise 7,8 ppm dir.

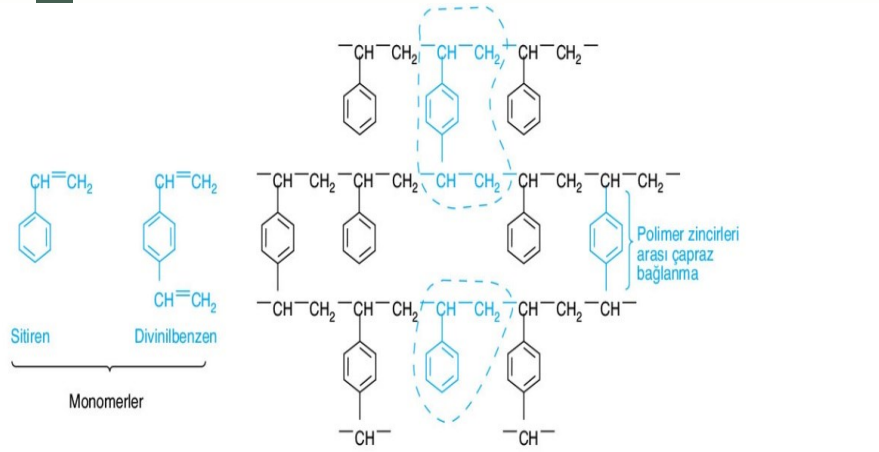


İyon-Değiştirme Kromatografi

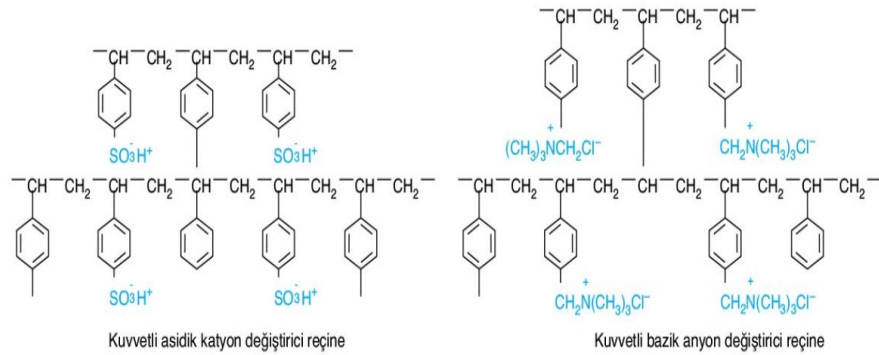
İyon-değiştirici reçineler kolon kromatografisinde çok kullanılan dolgu maddeleridir. Diğer kolon yöntemlerinin tersine burada solvent su, ayrılacak maddeler de iyonlardır. Bu nedenle iyon-değiştirici kromatografi inorganik kimyasal analizlerde çok kullanılan bir yöntemdir. Aynı zamanda amino asitlerin ve diğer organik asitlerin ve bazların ayrılmasında da uygundur.

İyon değiştirme, bir çözelti ve bu çözelti ile ilişki halinde olan fakat çözünmeyen bir katı madde arasındaki, aynı işaretli iyonların birbirini ile yer değiştirmesi olayıdır. Nötral veya sentetik pek çok madde iyon değiştirici gibi davranır. Kil ve zeolitlerin iyon-değiştirme özellikleri uzun zamandan beri bilinmekte ve bunlar yüzyılı aşkın bir süredir bu amaçla kullanılmaktadır. Sentetik iyon-değiştirici reçineler ilk defa 1935'de yapılmış ve su sertliğinin giderilmesi, suyun saflaştırılması ve iyon ayırma işlemlerinde geniş bir uygulama alanına yayılmıştır.





Çapraz bağlı sitiren divinilbenzen kopolimeri



Kuvvetli asidik katyon değiştirici reçine

Kuvvetli bazik anyon değiştirici reçine

ŞEKİL 25-1 Çapraz bağlı sitiren divinilbenzen iyon değiştirici reçinesinin yapısı

ÇİZELGE 25-1 İyon Değiştirici Reçineler

Reçine Tipi	Kimyasal yapı	Satın alınan şekli	Yaygın ticari adlar		Seçicilik	Isıl kararlılık
			Rohm & Haas	Dow Kimyasal		
Güçlü asidik katyon değiştirici	Stiren ve divinilbenzen kopolimere bağlı sülfonik asit	$\text{Aryl}-\text{SO}_3^-\text{H}^+$	Amberlite IR-120	Dowex 50W	$\text{Ag}^+ > \text{Rb}^+ > \text{Cs}^+ > \text{K}^+ > \text{NH}_4^+ > \text{Na}^+ > \text{H}^+ > \text{Li}^+ > \text{Zn}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+}$	150 °C'a kadar iyi
Zayıf asidik katyon değiştirici	Akrilik ve divinilbenzen kopolimere bağlı karboksilik asit grupları	$\text{R}-\text{COO}^-\text{Na}^+$	Amberlite IRC-50	—	$\text{H}^+ \gg \text{Ag}^+ > \text{K}^+ > \text{Na}^+ > \text{Li}^+ > \text{H}^+ \gg \text{Fe}^{2+} > \text{Ba}^{2+} > \text{Sr}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$	100 °C'a kadar iyi
Güçlü bazik anyon değiştirici	Stiren ve divinilbenzen kopolimere bağlı kuaterner amonyum grupları	$\text{Aryl}-\text{CH}_2\text{N}(\text{CH}_3)_3^+\text{Cl}^-$	Amberlite IRA-400	Dowex 1	$\text{I}^- > \text{fenolat}^- > \text{HSO}_4^- > \text{ClO}_3^- > \text{NO}_3^- > \text{Br}^- > \text{CN}^- > \text{HSO}_3^- > \text{NO}_2^- > \text{Cl}^- > \text{HCO}_3^- > \text{IO}_3^- > \text{HCOO}^- > \text{asetat}^- > \text{OH}^- > \text{F}^-$	50 °C'a kadar OH^- yapısı uygun; 150 °C'a kadar Cl^- ve diğer yapıları iyi
Zayıf bazik anyon değiştirici	Stiren ve divinilbenzen kopolimere bağlı polialkilamin grupları	$\text{Aryl}-\text{NH}(\text{R})_2^+\text{Cl}^-$	Amberlite IR-45	Dowex 3	$\text{Aril}-\text{SO}_3\text{H} > \text{sitrik} > \text{CrO}_3 > \text{H}_2\text{SO}_4 > \text{tartarik} > \text{oksalik} > \text{H}_3\text{PO}_4 > \text{H}_3\text{AsO}_4 > \text{HNO}_3 > \text{HI} > \text{HBr} > \text{HCl} > \text{HF} > \text{HCO}_2\text{H} > \text{CH}_3\text{CO}_2\text{H} > \text{H}_2\text{CO}_3$	Fazla bir bilgi mevcut değil; 65°C ile sınırlı

KAYNAK: J.X. Klyne'den uyarlandı, *Analytical Ion-Exchange Procedures in Chemistry and Biology* (Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, 1974).

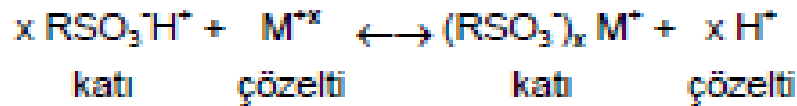
Çizelge'de zayıf veya kuvvetli asidik veya bazik iyon değiştiriciler sınıflandırılmıştır. Kuvvetli asidik reçinelerin sülfonat grupları ($-\text{SO}_3^-$) kuvvetli asidik çözeltilerde bile iyonlaşmış olarak kalırlar. Zayıf asidik reçinelerin karboksil grupları ($-\text{CO}_2^-$) yaklaşık pH 4'te protonlanır ve onların katyon değişim kapasitesi kaybolur. “Kuvvetli bazik” kuaterner amonyum grupları ($-\text{CH}_2\text{NR}_{13}^+$) (tam olarak bazik olmayan) pH'nın tüm değerlerinde katyonik özelliklerini korurlar. Zayıf bazik özellikli tersiyer amonyum ($-\text{CH}_2\text{NHR}_{12}^+$) anyon değiştiriciler orta düzey bazik ortamlarda protonlarını ve dolayısıyla anyon bağlama özelliklerini kaybederler.

Sentetik iyon-değiştirici reçineler, her molekülünde çok sayıda iyonik fonksiyonel gruplar içeren yüksek molekül ağırlıklı polimerik maddelerdir.

Kasyon değiştirici reçinelerden sülfonik asit grupları ($\text{RSO}_3\text{-H}^+$) içeren kuvvetli asit reçineleri, karboksilik asit grupları (RCOOH) içeren zayıf asit reçinelerden daha çok kullanılır.

Anyon-değiştirici reçinelerde bazik fonksiyonel gruplar bulunur; polimer molekülüne bağlanmış, çoğunlukla, amin grupları vardır. Kuvvetli baz değiştiricilerde kuvaterner aminler $[\text{RN}(\text{CH}_3)^3\text{OH}^+]$, zayıf baz olanlarında ise sekonder veya tersiyer aminler bulunur.

Bir kasyon-değiştirme reaksiyonu aşağıdaki denklemlle anlatılabilir.



Burada M^{+x} bir kasyonu, R reçine molekülünün kalan kısmını gösterir. Anyon değiştiricinin reaksiyonu da benzer bir şekilde yazılabilir (A^- anyondur).



- İyon-değiştirici reçineler sıyırma kromatografisinde başarı ile kullanılmaktadır. Örneğin, Beukenkamp ve Reiman, sulfonik asit reçinesi (asidik hali) ile doldurulmuş bir kolonla Na^+ ve K^+ iyonlarını ayırabilmişlerdir.
- Örnek kolonun tepesinden konulduğunda her iki alkali iyon için de aşağıdaki reaksiyon olur.
- $\text{RH} + \text{B}^+ \rightleftharpoons \text{RB} + \text{H}^+$ (1)
- Burada B^+ , Na^+ veya K^+ iyonlarını gösterir. İyon değiştirme reaksiyonunun denge sabiti, aşağıdaki gibi yazılır. Burada $[\text{RB}]$ ve $[\text{RH}]$ katı reçine fazındaki alkali ve hidrojen iyonlarının konsantrasyonlarıdır (veya yaklaşık aktiviteleri).

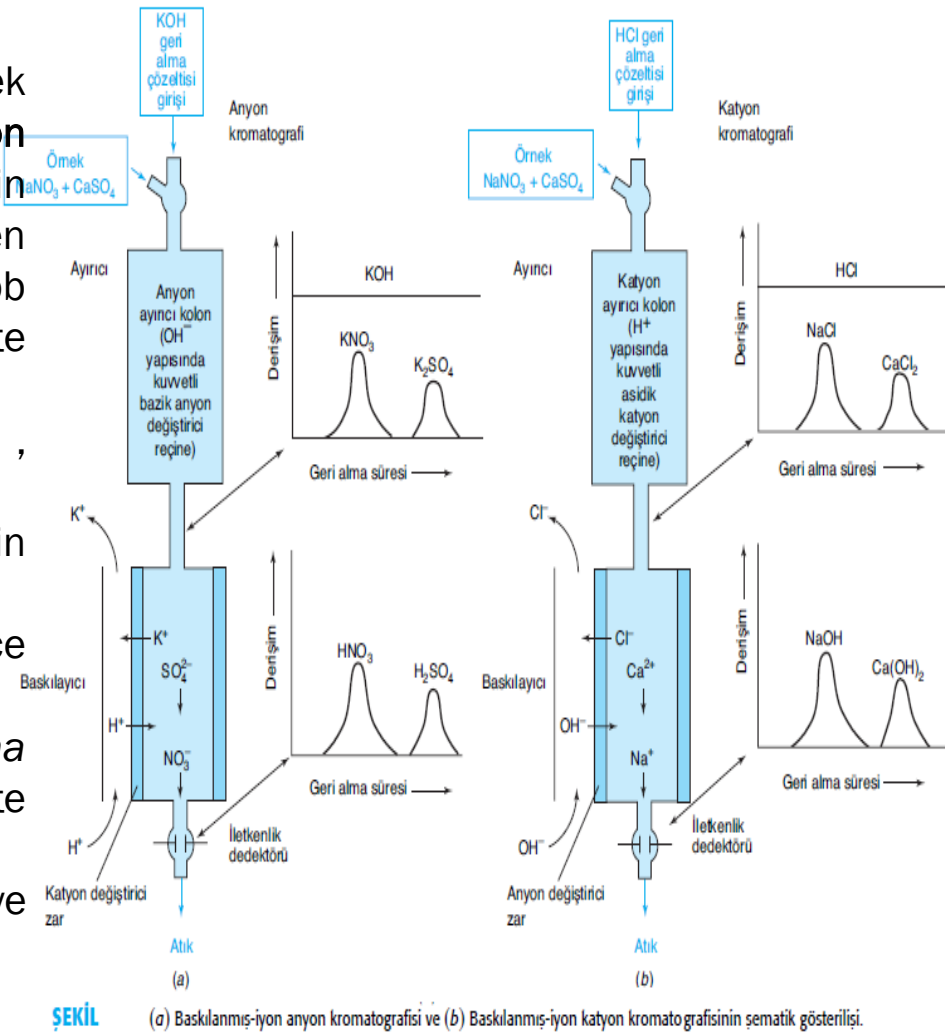
$$K = \frac{[\text{RB}] [\text{H}^+]}{[\text{RH}] [\text{B}^+]}$$
 (2)

- Denklem(2) aşağıdaki, şekilde yazılabilir. K_D , dağılma katsayısıdır.

$$\frac{[\text{RB}]}{[\text{B}^+]} = \frac{K [\text{RH}]}{[\text{H}^+]} = K_D$$
 (3)

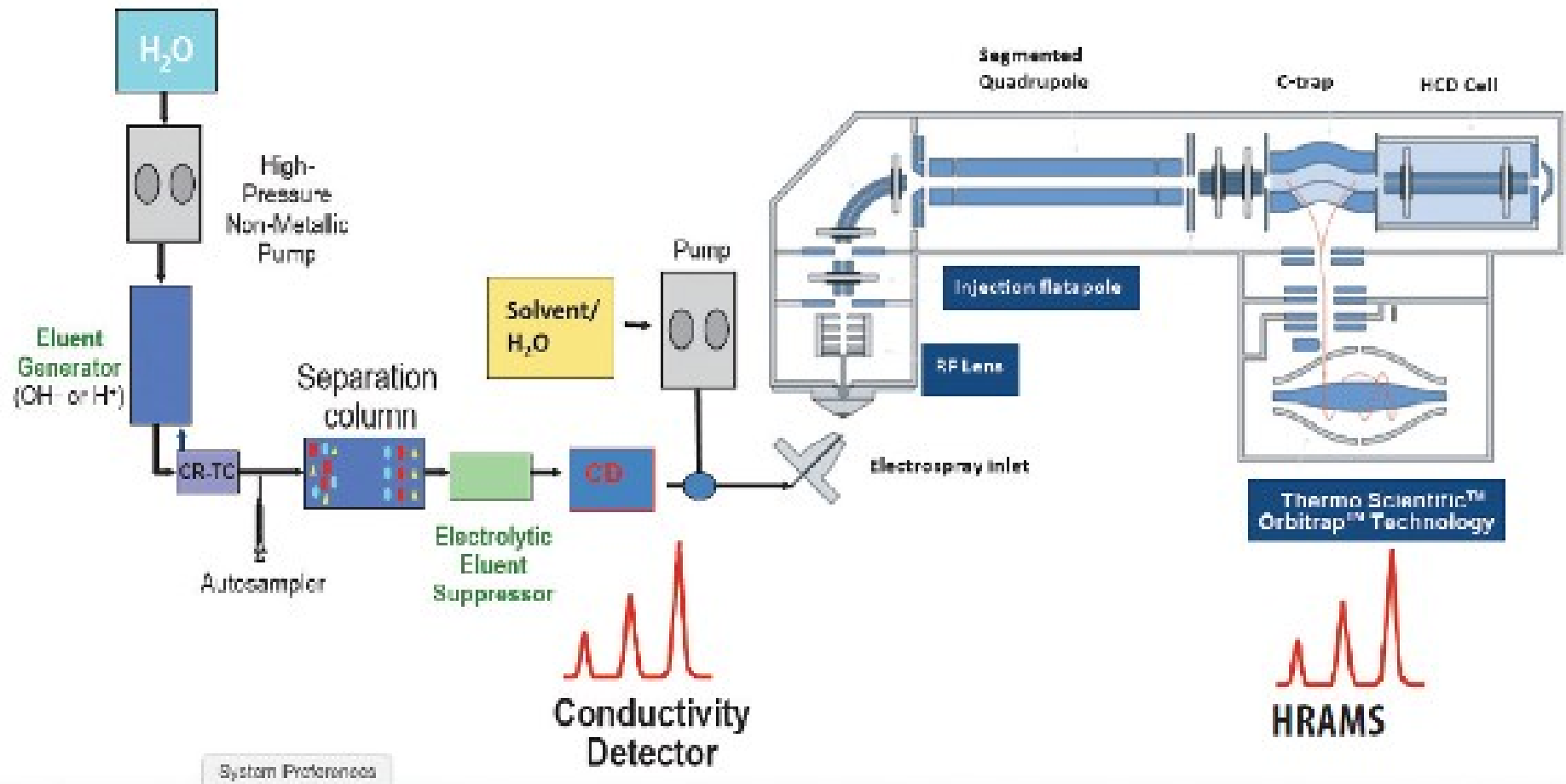
İyon değişim kromatografisinin yüksek performanslı bir sürümü olan **İyon kromatografisi** genel olarak anyon analizleri için seçilen yöntemlerden birisidir. Yarı-iletken sanayinde, iyonları giderilmiş suda 0,1 ppb düzeyinde anyon ve katyonları izlemekte kullanılır.

Baskılanmış iyon anyon kromatografisinde , anyonların bir karışımı iyon değişimi ile ayrılır ve elektrik iletkenliğine göre tayin edilirler. Baskılanmış-iyon kromatografisinin püf noktası, iletkenlik ölçümünden önce istenmeyen elektrolitlerin uzaklaştırılmasıdır. NaNO_3 ve CaSO_4 içeren bir örneğin ayırma kolonuna (hidroksitli anyon değiştirici) enjekte edilip KOH ile geri alındığında; NO_3^- ve SO_4^{2-} iyonları reçine ile dengeye gelir ve OH^- iyonu ile yavaş bir şekilde yer değiştirir. Na^+ ve Ca^{2+} katyonları tutulmazlar.



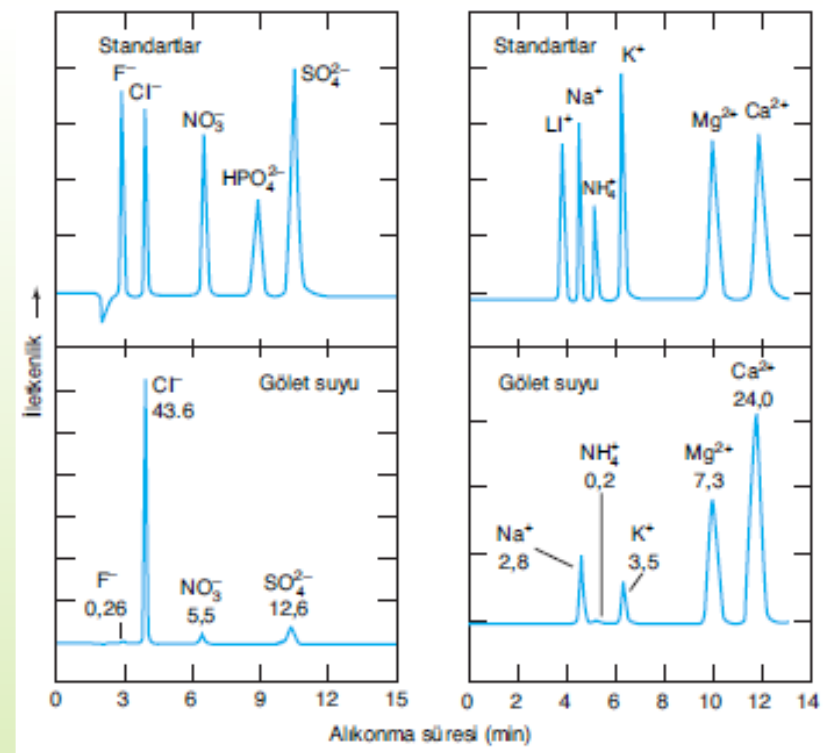
(a) Baskılanmış-iyon anyon kromatografisi ve (b) Baskılanmış-iyon katyon kromatografisinin sematik gösterilişi.

Sonunda, Şekilin üstünde gösterilen grafikten görüldüğü gibi ayırma kolonundan KNO_3 ve K_2SO_4 çıkar. Bu türler kolaylıkla tayin edilemezler, ancak çıkan çözelti yüksek bir derişimde KOH içerdiğinden bunun yüksek iletkenliği analitlerin tayinini bozar. Bu sorunu aşmak için çözelti daha sonra, kasyonların H^+ ile yer değiştirdiği bir *baskılayıcı*dan geçirilir.



Bu örnekte, baskılayıcıdaki katyon değiştirici zar içerisinde H^+ iyonu K^+ ile yer değiştirir. H^+ zarın dışındaki yüksek derişimli yerden, zarın içindeki düşük derişimli yere difüzlenir. K^+ iyonu ise içerideki yüksek derişimli yerden dışarıdaki düşük derişimli yere difüzlenir. Zar dışındaki K^+ uzaklaştırılır, böylece derişimi zar dışında her zaman düşük olur. Sonuçta yüksek iletkenliğe sahip olan KOH düşük iletkenliğe sahip olan H_2O 'ya dönüşmektedir. Analit varsa, yüksek iletkenliğe sahip olan HNO_3 veya H_2SO_4 oluşur ve tayin edilir.

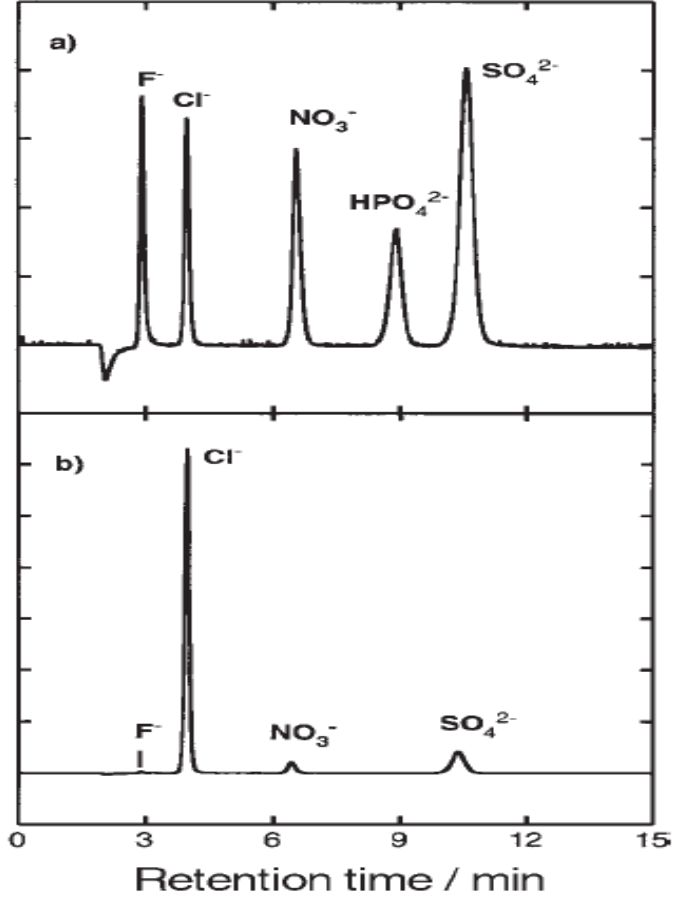
Baskılanmış-iyon katyon kromatografisi benzer bir şekilde çalışır, fakat baskılayıcı, bir anyon-değiştirici zar boyunca geri alma çözeltisindeki Cl^- , OH^- iyonu yer değiştirir. Şekilde $NaNO_3$ ve $CaSO_4$ 'ün ayrılması gösterilmektedir. HCl çözeltisi ile NaCl ve $CaCl_2$ katyon-değiştirici ayırma kolonundan ayrılır ve NaOH ve $Ca(OH)_2$ baskılayıcı kolonuna verilir. HCl geri alma çözeltisi baskılayıcıda H_2O 'ya dönüştürülür.



ŞEKİL Havuz suyunun iyon kromatografisi. Üst kısımdaki kromatogramlar standartlardan elde edilmiştir. Altteki havuz suyu kromatogramları iyonların derişimleri $\mu g/mL$ (ppm) düzeyindedir. Analizleri, iyon baskılanmış ve iletkenlik dedetörleri ile 1 mM $NaHCO_3$ /3,5 mM Na_2CO_3 geri alma çözeltisi Katyon analizlerinde iyon baskılanmış 11 mM H_2SO_4 geri alma çözeltisi ile kullanılmıştır.

Baskılanmamış İyon Kromatografisi; Ayırma kolonun iyon değiştirici kapasitesi yeteri kadar düşükse ve seyreltik çözelti kullanılıyorsa, iyon baskılayıcısına gerek yoktur. Aynı zamanda, borat, silikat, sülfür ve siyanür gibi zayıf asitlerin anyonları iyon baskılayıcısı ile tayin edilemezler, çünkü bu anyonlar çok zayıf iletken ürünlerine (H_2S gibi) dönüşürler.

Detector signal / μS



(a) Standart çözeltide baskılanmış iyon kromatografiyle anyon analizi

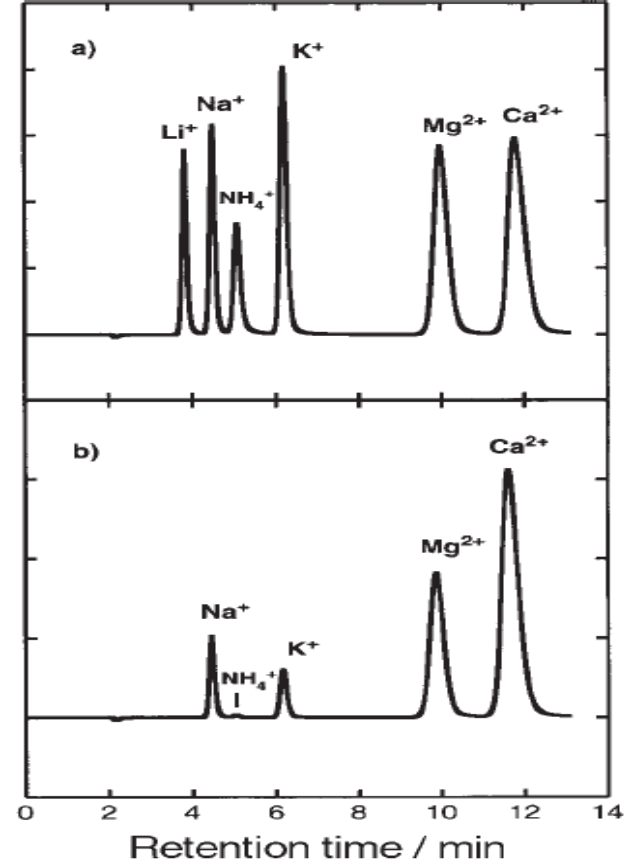
(2,5 ppm F^- , 30 ppm Cl^- , 70 ppm NO_3^- , 150 ppm SO_4^{2-})

b) Göl suyunda anyon analizi : 0,26 ppm F^- , 43,6 ppm Cl^- , 5,5 ppm NO_3^- , 12,6 ppm SO_4^{2-})

Kolon: Ion Pac AS14; eluent: 1.0 mM NaHCO_3

3.5 mM Na_2CO_3 ; akış hızı: 1.2 mL/min;

Detector signal / μS



a) Standart çözeltide baskılanmış iyon kromatografiyle katyon analizi

(7,5 ppm Na^+ , 3,2 ppm NH_4^+ , 20 ppm K^+ , 10 ppm Mg^{2+} , 18 ppm Ca^{2+})

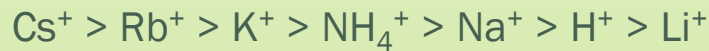
(b) Göl suyunda katyon analizi:

(2,8 ppm Na^+ , 0,2 ppm NH_4^+ , 3,5 ppm K^+ , 7,3 ppm Mg^{2+} , 24 ppm Ca^{2+})

Kolon: IonPac CS12A; eluent: 11 mM H_2SO_4 ; akış hızı: 1.0 mL/min;

Geri yıkamanın hidroklorik asit ile yapıldığı koşullarda K_D yaklaşık olarak sabit kalır, çünkü geri yıkama çözeltisinde hidrojen iyonu konsantrasyonu, potasyum ve sodyum iyonlarına göre çok büyüktür. Reçinenin değiştirme yapabileceği uçları da örnekteki alkali metal iyonları sayısından çok fazladır. Böylece $[H^+]$ ve $[RH]$ ın toplam konsantrasyonları, dengenin kaymasından etkilenmezler (denklem 1). Buna göre $[RH]$ ve $[H^+]$ ın $[RB]$ ve $[B^+]$ ye göre büyük olduğu koşullarda denklem(3), denklem(1) gibi kullanılabilir ve genel kromatografi teorisi, sabit fazın iyon değiştirici bir reçine olduğu halde de uygulanabilir.

Denklem(3)'deki K_D değeri reçinenin diğer iyonla kıyaslandığında B^+ iyonuna karşı ilgisini gösterir. K_D büyükse B^+ iyonunun katı fazda kalma eğilimi artar, tersine K_D nin küçük olması bu eğilimi azaltır (buradaki diğer iyon H^+ 'dir). H^+ gibi çok bilinen bir referans iyon seçilerek bilinen bir reçine kıyaslanabilir. Böyle bir inceleme çok değerlikli iyonların tek değerlikli iyonlara göre daha sıkı tutulduğunu göstermiştir. Aynı değerlikli iyonlar arasında yapılan incelemelerde ise hidratlanmış iyonun, bazı özellikleri yanında, büyüklüğünün de etkin olduğu gözlenmiştir. Tipik bir sülfolanmış katyon değiştirici reçinenin K_D değerleri aşağıdaki sıraya göre azalır:

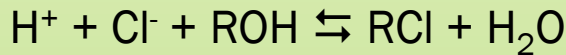


İki değerlikli katyonlar için de aşağıdaki gibi sıra yazılabilir:



K_D değerleri yakın olan iyonların birbirinden ayrılması için, adsorbsiyon ve dağılma kromatografilerinde uygulanana benzer yöntemler kullanılır. Örneğin, Şekil'de inorganik iyonların sülfonik asitli katyon değiştirici bir reçinede ayrılmasını gösteren HPLC kromatogramı verilmiştir.

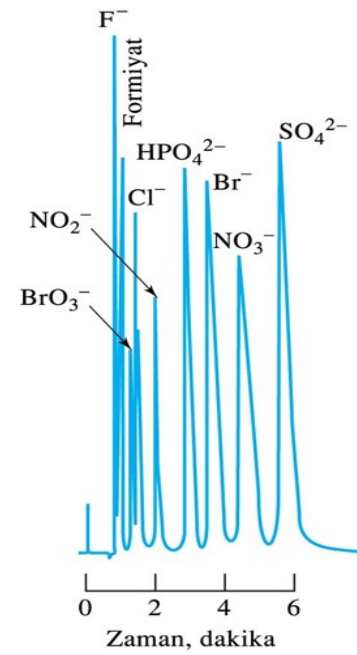
Geri yıkama çözeltisindeki iyonların analit içinde kalmaması için analitik kolondan sonra bir sıyrıcı kolon bulundurulur. Katyonların ayrılmasında sıyrıcı bir anyon-değiştirici reçinenin hidroksiti ile doldurulur. Bu reçine HCL sıyrıcı çözeltiyi, katyonları etkilemeden adsorblayabilir. Sıyrıcı kolondaki reaksiyon aşağıdaki gibidir.



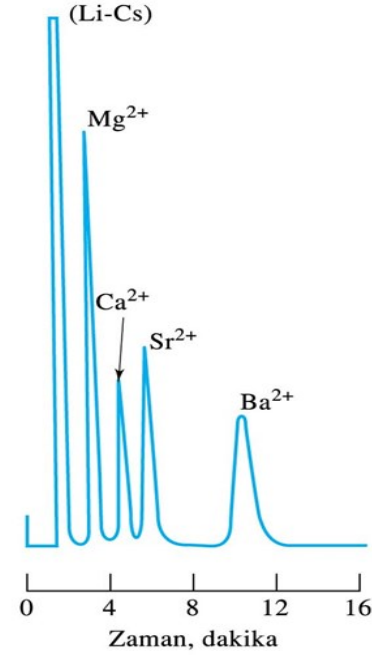
Anyonların ayrılmasındaki reaksiyon da,
 $Na^+ + HCO_3^- + RH \rightleftharpoons RNa + H_2CO_3$

Derişimler, ppm	
F^-	3
Formiyat	8
BrO_3^-	10
Cl^-	4
NO_2^-	10
HPO_4^{2-}	30
Br^-	30
NO_3^-	30
SO_4^{2-}	25

Derişimler, ppm	
Ca^{2+}	3
Mg^{2+}	3
Sr^{2+}	10
Ba^{2+}	25

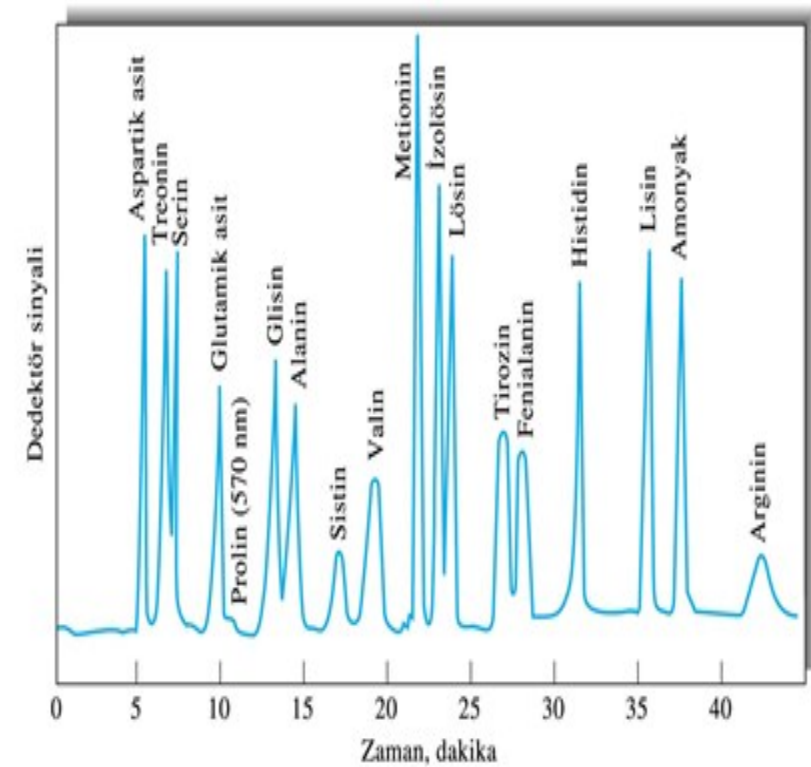


(a)



(b)

İyon-değiştirici kromatografisi en çok amino asitlerin analizinde kullanılır. Örneğın, Şekilde, her birinden 1.0×10^{-8} mol bulunan 17 amino asit karışımının kromatogramı verilmiştir. Ayırma zamanı sadece 42 dakikadır. Değışik pH larda tamponlar kullanılarak kademeli geri yıkama uygulanmıştır.



Amino asitlerin iyon değıştirici bir kolonda ayrılmaları. Dolgu maddesi: Tanecik boyutu 8 μ m olan katyon değıştirici. Basınç 2700 psi

Donnan Dengesi

Bir iyon değiştirici bir elektrolit çözeltisi içerisine konulduğunda, *reçinenin dışındaki elektrolit derişimi içindekinden daha fazladır*. Çözeltideki iyonlar ile reçine içindeki iyonlar arasındaki denge **Donnan dengesi** olarak adlandırılır.

KCl çözeltisine, Cl⁻ yapısında bir kuaterner amonyum anyon değiştirici reçine (R1) batırılmış olduğunu düşünelim. Reçine içerisindeki iyonun derişimi [X]_i, reçinenin dışındaki iyon derişimi ise [X]_o olsun. Reçine içindeki iyon derişiminin reçine dışındaki iyon derişimine yaklaşık olarak eşit olduğu termodinamik olarak gösterilebilir:

$$[K^+]_i[Cl^-]_i = [K^+]_o[Cl^-]_o$$

$$[K^+]_o = [Cl^-]_o$$

Yük denkliğinden bildiğimiz üzere: olur.

Reçine içerisinde üç farklı yüklü tür bulunur ve yük denkliği:

$$[R^+]_i + [K^+]_i = [Cl^-]_i$$

$$[K^+]_i([K^+]_i + [R^+]_i) = [K^+]_o^2$$

Burada, [R1], reçineye bağlanan kuaterner amonyum iyonlarının derişimidir. Yukarıdaki eşitlikler birleştirilirse aşağıdaki eşitlik elde edilir:

$$[K^+]_i([K^+]_i + [R^+]_i) = [K^+]_o^2$$

Bu eşitliğe göre [K⁺]_o derişimi [K⁺]_i'den büyük olmalıdır. Reçine ile *aynı* yüklü iyonlar elektrostatik etkiyle dışlanır.

ÖRNEK Bir Anyon Değiştirici ile Katyonların Ayrılması

Reçinedeki katyonik bölgelerin derişiminin 6,0 M olduğunu varsayalım. Bu reçinenin Cl-li tipi 0,050 M KCl çözeltisine batırıldığında, $[K^+]_0 / [K^+]_i$ oranı ne olacaktır?

$$[K^+]_i([K^+]_i + [R^+]_i) = [K^+]_0^2$$

$[K^+]_0$ değerinin hâlâ 0,050 M olduğunu varsayalım. Eşitlik kullanılarak

$$[K^+]_i([K^+]_i + 6,0) = (0,050)^2 \Rightarrow [K^+]_i = 0,00042 \text{ M}$$

$$[K^+]_0 / [K^+]_i = 0,050 / 0,00042): 119$$

Elde edilir. Reçinenin dışındaki K^+ derişimi reçinenin içindekinin 100 katından daha fazladır.

(25-8) Bir iyon değiştirici reçinenin (R^-Na^+) NaCl çözeltisine batırıldığını varsayınız. Reçinedeki R^- iyonun derişiminin 3,0 M olduğunu kabul ediniz.

(a) Eğer $[Cl^-]_o$ 0,10 M ise $[Cl^-]_o/[Cl^-]_i$ oranı ne olacaktır?

(b) Eğer $[Cl^-]_o$ 1,0 M ise $[Cl^-]_o/[Cl^-]_i$ oranı ne olacaktır?

(c) Reçine dışındaki derişim artarken, reçine içerisindeki elektrolit artar mı yoksa azalır mı?

$$\text{Kütle denkliği} : [Na^+]_i \cdot [Cl^-]_i = [Na^+]_o [Cl^-]_o$$

$$\text{Reçine dışında yük denkliği} : [Na^+]_o = [Cl^-]_o$$

$$\text{Reçine içinde yük denkliği} : [Na^+]_i = [Cl^-]_i + [R^-]_i$$

2. denklem ve 3. Denklem 1. Denkleminde yerine konulursa;
 $[Cl^-]_i \cdot ([Cl^-]_i + [R^-]_i) = [Cl^-]_o^2$

Çözüm:

$$\mathbf{a)} [Cl^-]_i ([Cl^-]_i + [R^-]_i) = [Cl^-]_o^2$$

$$[Cl^-]_i ([Cl^-]_i + 3) = (0,10)^2 \quad [Cl^-]_i = 0,00333$$

$$[Cl^-]_o/[Cl^-]_i = 0,10/0,0033 = 30$$

$$\mathbf{b)} [Cl^-]_o = 1,0 \text{ değerini kullanırsak, } [Cl^-]_i ([Cl^-]_i + 3) = (1)^2 \quad [Cl^-]_i = 0,303$$

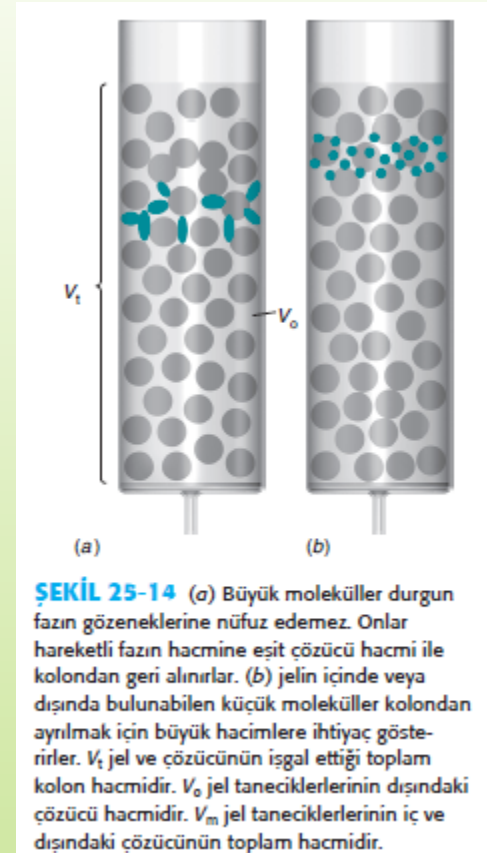
$$[Cl^-]_o/[Cl^-]_i = 1,0/0,303 = 3,30$$

c) $[Cl^-]_o$ (0,1-1) artarken, $[Cl^-]_i$ (0,0033-0,303) artar.

Boyut Eleme (Moleküler Dışlama) Kromatografisi

Moleküler dışlama kromatografisinde (*boyut dışlama* veya *jel süzme* veya *jel geçirgenlik kromatografisi* olarak da adlandırılır), moleküller boyutlarına göre ayrılırlar. Küçük moleküller durgun fazdaki gözenekler içerisine girer, fakat büyük moleküller gözenekler içerisine giremez. Küçük moleküllerin etkin olarak daha büyük bir hacim içerisinde geçmesi gerektiğinden, *kolondan önce büyük moleküller geri alınır*. Bu teknik makro molekülleri saflaştırmak için biyokimyada yaygın olarak kullanılır.

Düşük molekül kütleli tuzlar (veya diğer küçük moleküller) jel süzme ile büyük moleküllerin çözeltilerinden ayrılabilir çünkü büyük moleküller ilk olarak kolondan çıkar. *Tuz giderme* olarak bilinen bu teknik, bir makromolekül çözeltisinin tampon bileşimini değiştirmek için yararlıdır.



Geri Alma (Elusyon) Eşitliği

Bir kromatografi kolonundaki hareketli fazın *toplam* hacmi V_m 'dir. Bu hacim, jel parçacıklarının içindeki ve dışındaki çözücülerini de içerir. Jel parçacıkları *dışındaki* hareketli fazın hacmi **ölü hacim**, V_0 olarak adlanır. Bu nedenle, jelin *içerisindeki* çözücü hacmi $V_m - V_0$ olur. Kort ("*K* ortalama" olarak okunur) aşağıdaki eşitlikle tanımlanır:

$$K_{ort} = \frac{V_r - V_0}{V_m - V_0}$$

Bu eşitlikte V_r bir çözünen için alıkonma hacmidir. Jel içerisine nüfuz etmeyen bir büyük molekül için, $V_r = V_0$ ve $K_{ort} = 0$ olur. Jel içerisine serbestçe nüfuz eden küçük bir molekül için ise $V_r = V_m$ ve $K_{ort} = 1$ 'dir. Jelin bazı gözeneklerine nüfuz eden orta büyüklükteki moleküller için K_{ort} değeri 0 ile 1 arasındadır. İdeal olarak, jel geçirgenlik, bu tip kromatografide moleküllerin tutunması için için tek mekanizmadır. Gerçekte, daima biraz adsorpsiyon vardır, böylece K_{ort} değeri 1'den büyük olabilir.

Ölü hacim kolon içerisinden büyük eylemsiz bir molekülün geçirilmesiyle ölçülür. Bu molekülün geri alma (elüsyon) hacmi V_0 olarak tanımlanır. $2 \cdot 10^6$ g/mol mol kütlesine sahip olan Blue dekstran 2000 genellikle bu amaçla kullanılır. V_m hacmi ise, kuru jelin gramı başına kolon yatak hacminin ölçülmesiyle hesaplanabilir. Örneğin, 1 g kuru Sephadex G-100, sulu çözelti içerisinde şiştiği zaman 15-20 mL hacim kaplar. Bu şişmiş jelin katı fazı sadece ≈ 1 mL hacim tutar, böylece V_m 14 – 19 mL olur veya toplam kolon hacminin %93 – %95'i kadardır. Farklı katı fazların eşdeğer kütleleri, çözücü ile şiştiği zaman çok farklı hacimler kaplarlar.

Durgun Faz

Açık kolonlar için jeller, preparatif-ölçekli moleküler dışlama, yapısı Şekil 25-2’de verilen Sephadex (Çizelge 25-4) ve *N,N*9-metilen bisakrilamid ile çapraz-bağlanmış bir poliakrilamid olan Bio-Gel P içerir. Oldukça fazla çapraz-bağlanmış jellerdeki en küçük gözenek boyutları mol kütlesi ≥ 700 olan molekülleri dışlarken, daha büyük gözenek boyutları mol kütlesi ≥ 108 olan molekülleri dışlar. Jelin tane boyutu ne kadar küçükse, ayırma gücü o kadar iyi, fakat kolon akış hızı o kadar yavaştır.

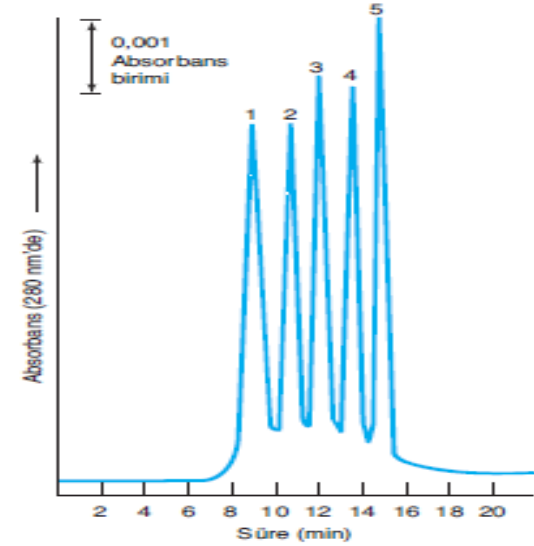
Moleküler dışlama için hidrofilik HPLC kolonu poli(vinil alkol), poliakrilamid ve sülfonallenmiş polisitren maddeleriyle doldurulur. Kontrollü gözenek boyutlu silika metre başına 10000 – 16000 tabakaya sahiptir. Bu silika, çözelti adsorpsiyonunu azaltmak için bir hidrofilik faz ile kaplanır.

ÇİZELGE 25-4 Temsili moleküler dışlama ortamları

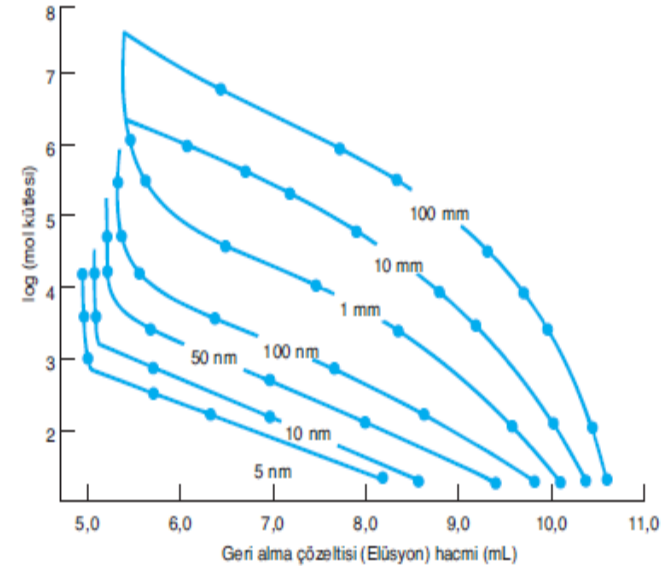
Açık kolonlarda jel süzme		HPLC için TSK SW silika		
Adı	Küresel proteinler için ayırma aralığı (Da)	Adı	Gözenek büyüklüğü (nm)	Küresel proteinler için ayırma aralığı (Da)
Sephadex G-10	700’e kadar	G2000SW	13	500–60000
Sephadex G-25	1000–5000	G3000SW	24	1000–300000
Sephadex G-50	1500–30000	G4000SW	45	5000–1000000
Sephadex G-75	3000–80000	G5000SW	100	>1500000
Sephadex G-100	4000–150000			
Sephadex G-200	5000–600000			

NOT: Sephadex is manufactured by GE Amersham Biosciences. TSK SW silica is manufactured by Tosoh Corp.

1	Glutamat dehidrojenaz (290000)
2	Laktat dehidrojenaz (140000)
3	Enolaz kinaz (67000)
4	Adenilat kinaz (32000)
5	Stokrom c (12400)



ŞEKİL 25-16 TSK 3000SW kolonunda moleküler dışlama kromatografisi yöntemiyle proteinlerin ayrılması. [Courtesy Varian Associates,



ŞEKİL 25-17 Beckman µSpherogel moleküler dışlama kolonunda (0,77 × 30 cm) polistiren için moleküler kütle kalibrasyon eğrisi. Çizgiler üzerinde yazılı olan reçinenin gözenek boyutu 5 nm'den 100 µm'ye kadar değişmektedir. [Courtesy Ansco Co., Ann Arbor, MI.]

■ Mol Kütlesinin Tayini

■ Jel süzme, genellikle, önemli derecede farklı molekül boyutuna sahip molekülleri birbirinden ayırmak için kullanılır (Şekil). Her durgun faz için, geri alma çözeltisi hacmine karşı mol kütlesinin logaritması grafiğe geçirilerek bir kalibrasyon grafiği elde ederiz.

■ Standart maddelerin geri alma çözeltisi hacmi ile karşılaştırarak bilinmeyen bir maddenin kütlesini tahmin edebiliriz. Sonuçları yorumlarken çok fazla dene yapmalıyız, çünkü aynı mol kütleli fak farklı şekilli moleküller farklı geri alm özelliği göstermektedir.

■ Proteinler için, jeldeki nadir olabilecek yüklü bölgeler tarafından çözünenin elektrostatik adsorpsiyonunu azaltmak için yeterli kadar yüksek (>0,05 M) iyonik şiddet kullanmak önemlidir.

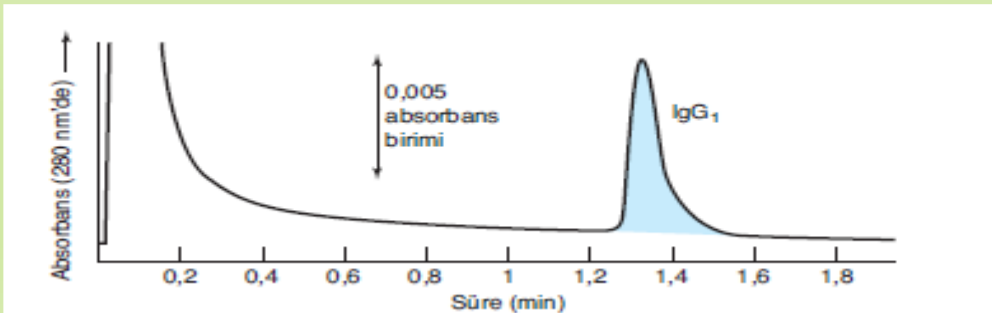
Etkileşim (Afinite) Kromatografisi

Etkileşim kromatografisi, karmaşık bir karışımdan tek bir bileşiği ayırmak için kullanılmaktadır. Bu teknik, bir bileşiğin durgun faza özel olarak bağlanmasına dayanır. Örnek kolondan geçirildiğinde sadece bir çözünen bağlanır. Her şey kolondan geçip yıkandıktan sonra geriye kalan bileşeni kolondan uzaklaştırmak için pH veya iyonik şiddet koşulları değiştirilerek aradaki bağın zayıflaması sağlanır. Etkileşim kromatografisi özellikle biyokimya alanında uygulanmakta ve enzimler ve substratlar, antikorlar ve antijenler veya reseptörler ve hormonlar arasındaki kendilerine özgü etkileşmeye dayanmaktadır.

Şekil, kovalent olarak bağlı *protein A* içeren bir kolonda etkileşim kromatografisi yöntemiyle immunoglobulin G (IgG) proteininin ayrılmasını göstermektedir. Protein A, pH

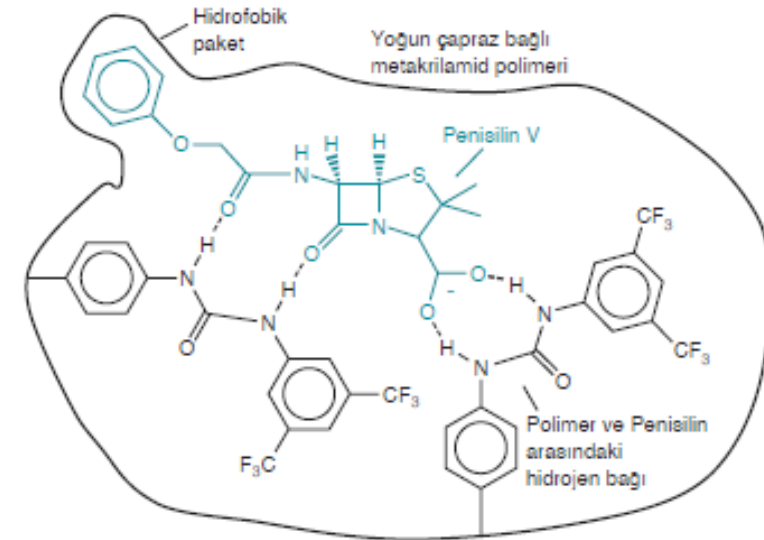
$\geq 7,2$ 'de IgG'nin özgün bir bölgesine bağlanır. IgG ve diğer proteinler içeren ham bir karışım pH 7,6'da kolondan geçirildiğinde IgG haricindeki herşey 0,3 min içerisinde kolondan çıkarlar.

Geri alma çözeltisi pH'sı yaklaşık 1,0 min'da 2,6'ya düşürülür ve IgG 1,3 min'da saf bir şekilde kolondan alınır. Bir ilacın optik izomerleri tamamen farklı iyileştirici etkilere sahip olabilir. Etkileşim kromatografisi her bir optik izomeri diğerinden ayırarak ilaç geliştirmede kullanılabilir.



ŞEKİL 25-19 Polimer destekli kovalent olarak bağlanmış protein A içeren $0,46 \times 5$ cm'lik bir kolonda etkileşim kromatografisi ile monoklonal antikor IgG'nin saflaştırılması. Örnekteki diğer proteinler pH 7,6'da 0 - 0,3 min'da geri alınırlar. Geri alma çözeltisinin pH'sı 2,6'ya düşürüldüğü zaman, IgG protein A'dan ayrılır ve kolondan dışarı çıkar. [B. J. Compton and

Bir **Moleküler baskılanmış polimer**, polimer bileşenlerinin belirli bir etkileşime sahip olduğu bir kalıp molekül varlığında sentezlenir. kalıp uzaklaştırıldığında, polimer kalıbın şekliyle ve kalıpla bağ yapabilen tamamlayıcı işlevsel gruplarla “baskılanmış” olur. Kalıp, ilgilenilen analit olabilir, ancak, polimer kullanıldığında polimerdeki kalıntıların yanlış pozitif sonuçlara sebep olmaması için yapısal olarak benzer molekülü kullanmak daha iyidir.



Penisilin türevlerini bağlayan bir baskılanmış polimerde paketin kavramsal yapısı. [J. L. Urraca, M. C. Moreno-Bondi, A. J. Hall, and B. Sellergren, "Direct Extrac-

Baskılanmış polimer afinite kromatografisinde durgun bir faz veya bir kimyasal bir sensörde bir tanıma elemanı olarak kullanılabilir.

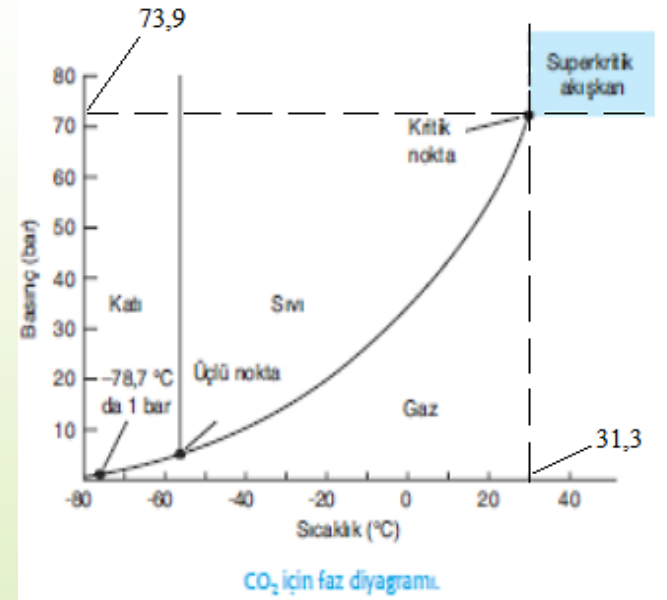
Bir moleküler baskılanmış polimer, analiz için penisilin antibiyotiklerin nehir suyundan deriştirilmesinde ve toplanmasında kullanılabilir. Şekilde, monomerler bir kalıp olarak penisilin G ile polimerleştirildiğinde, oluşan bir polimer paketinin kavramsal bir yapısını göstermektedir. Metanol ve HCl ile yıkanarak penisilin G uzaklaştırıldıktan sonra, paket onun şeklini ve şekilde renkli olarak gösterilen penisilin V gibi benzer molekülleri bağlamak için işlevsel grupların düzenini korur.

Sekiz farklı penisilinden 30'ar ppb eklenmiş nehir suyu baskılanmış polimer içeren bir kolon içerisinden geçirildiğinde, penisilinlerin altısı %90-99 oranında kolonda tutunmuştur. İki penisilin türü yeteri kadar iyi bağlanmamıştır. Kolonda tutunan penisilinler metnolde hazırlanmış 0,05 M tetrabütilamonyum hidrojen sülfatın küçük hacimleri ile kolondan geri alınmıştır ve HPLC ile analiz edilmiştir.

Süperkritik Akışkan Kromatografisi

Karbon dioksitin faz diyagramında, $-78,7\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $1,00\text{ bar}$ basınçta katı CO_2 (Kuru Buz) gaz CO_2 ile dengededir. Katı karbon dioksit sıvılaşmadan *süblimleşir*. $-56,6\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'daki *üçlü noktanın* üzerindeki

sıcaklıklarda sıvı ve buhar ayrı fazlar halinde bir arada bulunurlar. Örneğin $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'da sıvı $34,9\text{ bar}$ 'daki gaz ile dengededir. Sıvı-gaz sınırından yukarı çıkarsak $31,3\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve $73,9\text{ bar}$ 'daki kritik noktaya ulaşıncaya kadar daima iki fazın bulunduğunu görürüz. *Bu sıcaklığın üzerindeki sıcaklıklarda basınç ne olursa olsun sadece bir faz vardır. Bu faz, süperkritik akışkan olarak adlandırılır*. Bu fazın yoğunluğu ve viskozitesi gaz ile sıvının yoğunluğu ve viskozitesi arasındadır ve bir çözücü olarak davranabilir.



ÇİZELGE 29-1 Süperkritik Akışkanların Özelliklerinin, Sıvıların ve Gazların Özellikleri ile Karşılaştırılması

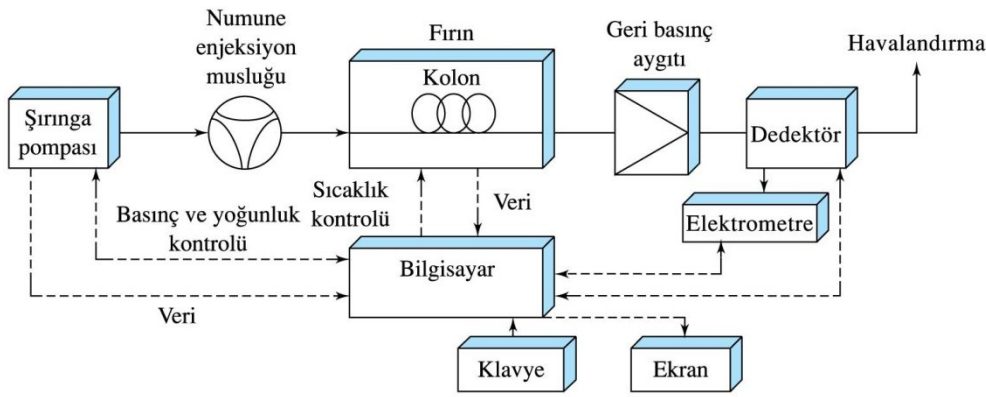
Özellik	Gaz (STP)	Süperkritik Akışkan	Sıvı
Yoğunluk (g/cm^3)	$(0,6-2) \times 10^{-3}$	0,2-0,5	0,6-2
Difüzyon katsayısı (cm^2/s)	$(1-4) \times 10^{-1}$	$10^{-3}-10^{-4}$	$(0,2-2) \times 10^{-5}$
Viskozite ($\text{g cm}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$(1-3) \times 10^{-4}$	$(1-3) \times 10^{-4}$	$(0,2-3) \times 10^{-2}$

Not: Bütün verilerde sadece bir anlamlı rakam kullanılmıştır.

ÇİZELGE 29-2 Bazı Süperkritik Akışkanların Özellikleri*

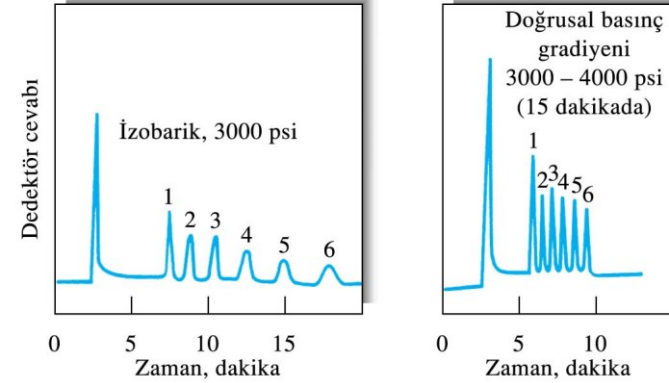
Akışkan	Kritik Sıcaklık, $^{\circ}\text{C}$	Kritik Basınç, atm	Kritik Noktada Yoğunluk, g/mL	400 atm'de Yoğunluk, g/mL
CO_2	31,3	72,9	0,47	0,96
N_2O	36,5	71,7	0,45	0,94
NH_3	132,5	112,5	0,24	0,40
n-Butan	152,0	37,5	0,23	0,50

Kaynak: M. L. Lee and K. E. Markides, Science, 1987, 235, 1345'ın izniyle. Veriler Matheson Gaz Data Book and CRC Handbook of Chemistry and Physics'den alınmıştır.

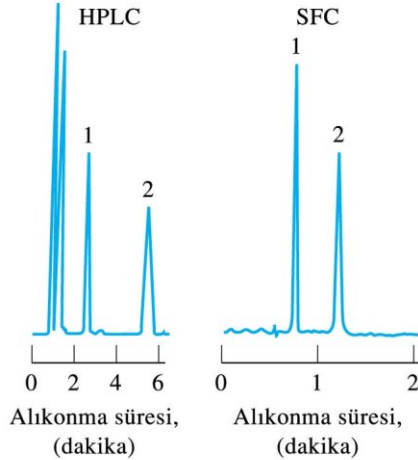


ŞEKİL 29-1 SFC cihazının blok diyagramı.

- Numune:
1. kolesterol oktanat
 2. kolesterol desilat
 3. kolesterol laurat
 4. kolesterol miristat
 5. kolesterol palmitat
 6. kolesterol stearat
- Kolon: DB-1
Hareketli faz: CO₂
Sıcaklık: 90°C
Dedektör: FID Alev iyonlaşma

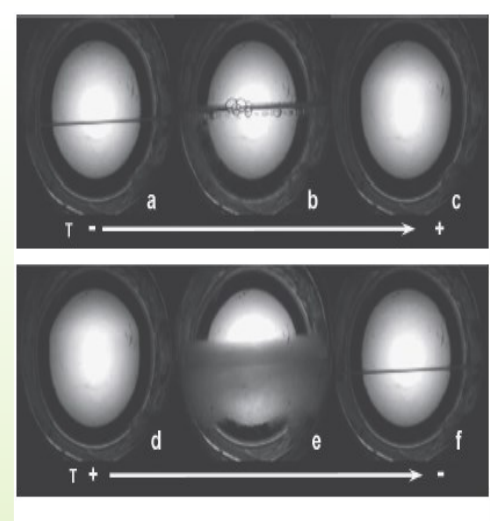


ŞEKİL 29-2 SFC'de basınç programlamanın etkisi. Sağdaki basınç gradiyenli kromatogramın soldaki sabit basınçta (izobarik) kromatogramdan daha kısa sürede elde edildiğine dikkat ediniz (Brownlee Labs, Santa Clara, CA.'ın izniyle).

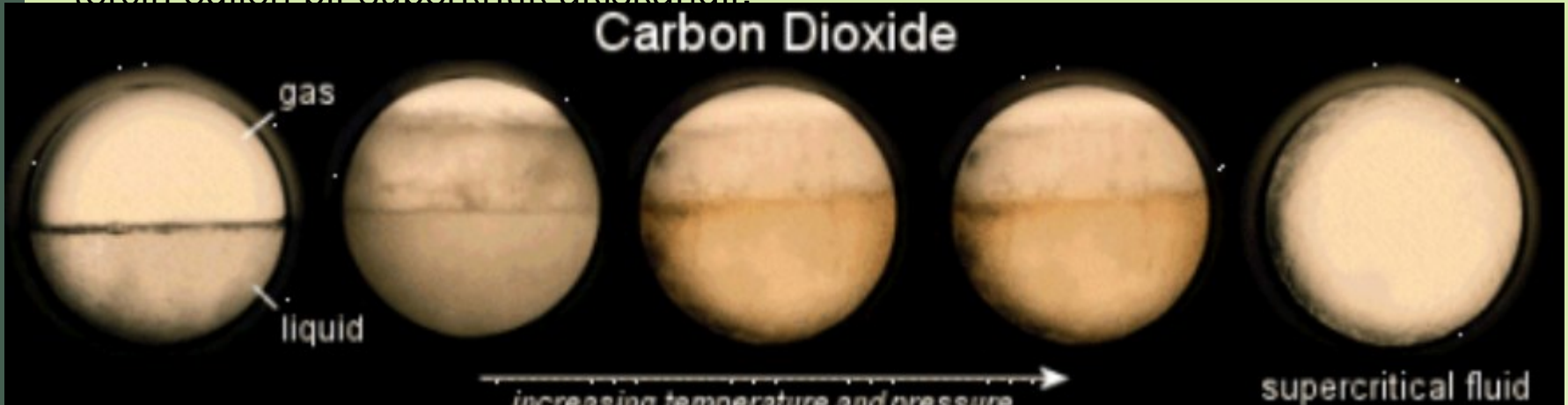


ŞEKİL 29-4 Geleneksel dağılım kromatografisi (HPLC) ve SFC ile elde edilmiş kromatogramların karşılaştırılması. Kolon: 20 cm × 4,6 mm; 10-µm'lik bağlı ters-faz ile doldurulmuş. Analitler: (1) bifenil; (2) terfenil. HPLC için: hareketli faz, %65 CH₃OH / %35 H₂O; akış hızı, 4 mL/dakika; doğrusal hız, 0,55 cm/s; numune miktarı, 10 µL. SFC için: hareketli faz, CO₂; akış hızı, 5,4 mL/dakika; doğrusal hız, 0,76/s; numune miktarı, 3 µL (D. R. Gere, T. J. Stark, and T. N. Tweenen, *Application Note 800-4*, Hewlett-Packard Corp., Palo Alto, CA, 1983'in izniyle).

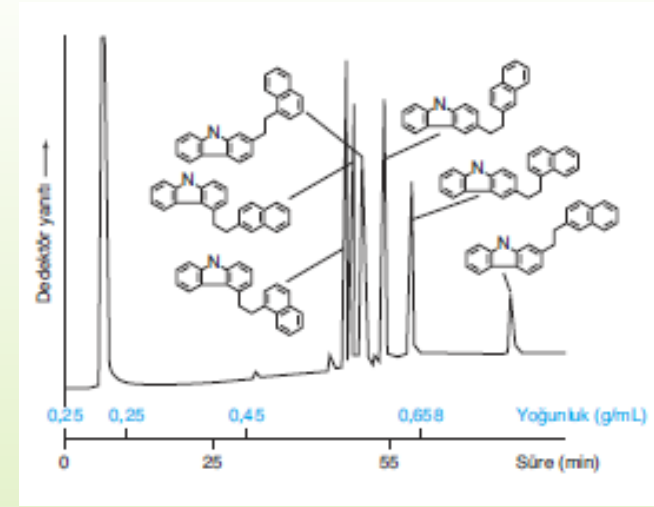
Gösterilmesi gereken ilginç bir süperkritik akışkan SF6'dür. Yandaki fotoğraflar, süperkritik sıcaklıktaki bu akışkanın (Tk:45,6 °C) ısıtıldığında ve soğutulduğunda meydana gelen farklı değişiklikleri göstermektedir. CO₂ ve organik çözücü karışımıyla gerçekleştirilen süperkritik akışkan kromatografisi ilaç sanayinde kilogramlarca bileşik ve enantiyomerlerin ayrılmasında % 90'a varan organik çözücü tasarrufu sağlayan bir "yeşil" teknolojidir. Süperkritik akışkanın viskozitesinin düşük olması akış hızını artırarak verimliliğin yüksek olmasını sağlar.



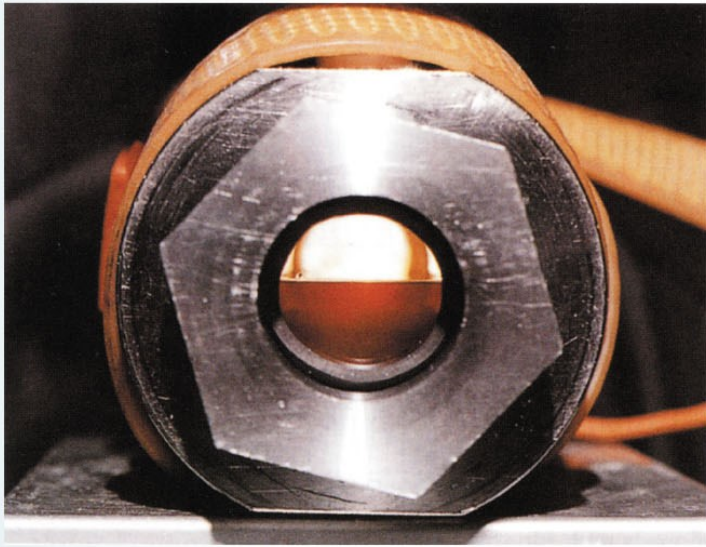
CO₂ tek başına zayıf bir çözücü ise de bazı organik çözücülerle karıştırıldığında birçok organik bileşiği çözebilir. Süperkritik akış kromatografisi süperkritik akışkanda çözünen maddenin difüzyon katsayısının daha yüksek olmasından dolayı sıvı kromatografisine göre daha yüksek hız ve ayırma gücü sağlar. Süperkritik akışkanlar gazların aksine uçucu olmayan maddeleri de çözebilirler. Basınç kaldırıldığında çözücü, gaz haline dönüşerek çözünen maddenin gaz fazında kolaylıkla belirlenebilmesini sağlar. Karbon dioksit, alev iyonlaşma ve morötesi detektörlerle uyumlu, kritik sıcaklığı düşük ve toksik olmadığı için kromatografide tercih edilen bir süperkritik akışkandır.



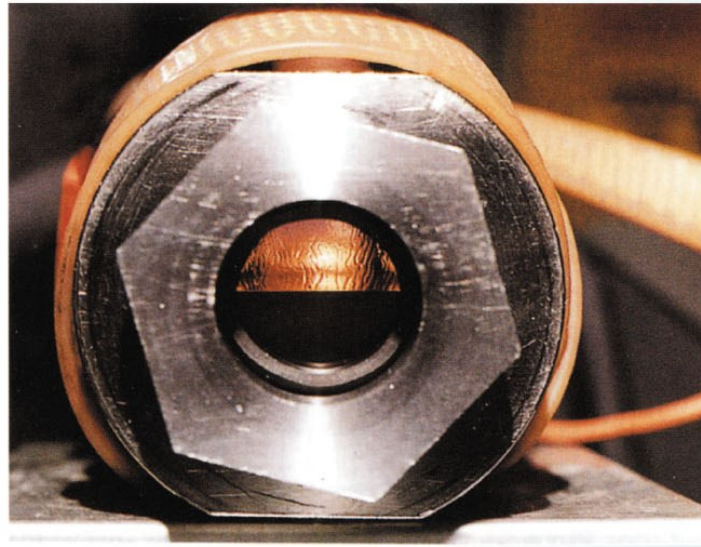
- Süper kritik akışkan kromatografisi için cihaz, dolgulu kolonlu ya da açık boru şekilli kolonlarla gerçekleştirilen HPLC'nin cihazına benzerdir.
- Geri alma kuvveti HPLC'de gradyent kolon yapılarak, gaz kromatografisinde sıcaklık yükseltilerek artırılır. Süperkritik akışkan
- kromatografisinde ise basınç artırılarak çözücü daha yoğun bir hale getirilir ve böylece geri alma kuvveti artırılmış olur. Yandaki kromatogram bir yoğunluk-gradyent geri alma işlemini göstermektedir.



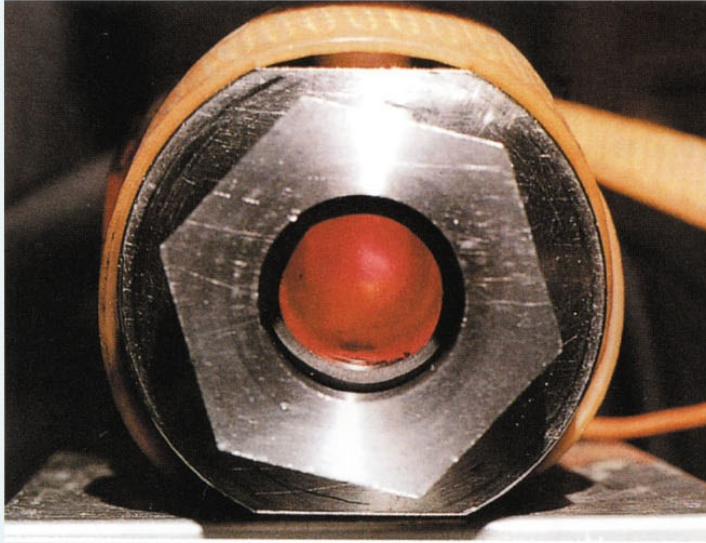
140 °C'da, yoğunluk-gradyent geri alması yapılarak aromatik bileşiklerin CO₂ ile açık boru şekilli kılcal süperkritik kromatogramı. [R. D. Smith, B. W. Wright, and C. R. Yonker, "Supercritical



(a)



(b)



(c)

Renkli Resim 29 Süperkritik Karbon Dioksit (Açıklama 24-3) (a) 30 °C ve 6,9 MPa'da 60 mL'lik bir çelik kap içinde sıvı CO₂. Onu görünür hale getirmek için sıvıya küçük bir miktar I₂ eklenerek kırmızı renk oluşur. (b) Sıcaklık arttıkça süperkritik faz geçişinin başlaması. (c) Tek-fazlı süper kritik karbon dioksit. [From H. Black, Environ. Sci. Technol. 1996, 30, 124A. Photos courtesy D. Pesiri and W. Tumas, Los Alamos National Laboratory.]

Kolon kromatografisinde önemli deneysel büyüklükler ve bağıntıları

Deneyisel büyüklüğün ismi	Sembolü	Elde edilişi
Tutulmayan türün kolondan çıkma zamanı (ölü zaman)	t_M	Kromatogramdan
A ve B bileşenlerinin alıkonma zamanları	$t_{R(A)} , t_{R(B)}$	Kromatogramdan
A bileşeni için düzeltilmiş alıkonma zamanı	$t'_{R(A)}$	$t'_{R(A)} = t_{R(A)} - t_M$
A ve B bileşenlerinin pik genişlikleri	W_A , W_B	Kromatogramdan
Kolon dolgusu (sabit faz) uzunluğu	L	Doğrudan ölçülerek
Akış hızı (hacımsal akış hızı)	F	Doğrudan ölçülerek
Sabit faz hacmi	V_S	Kolonun hazırlanma verilerinden
Analitin hareketli ve sabit fazlardaki derişimleri	C_M , C_S	Analiz ve hazırlama verilerinden

Türetilmiş büyüklüğün ismi	Hesaplanması	Diğer büyüklüklerle ilişkisi
----------------------------	--------------	------------------------------

Ayırma gücü (Resolüsyon)
(iki pikin birbirinden
ayrılma derecesi)

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

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k_B}{1 + k_{ort}}$$

a

Kuramsal tabaka sayısı
(kolon veriminin yani
piklerin keskinliğinin nicel
ölçüsüdür)

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

$$N = 16 R_S^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + k_{ort}}{k_B} \right)^2$$

Kuramsal tabaka yüksekliği

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

Alıkonma zamanı

$$(t_R)_B = \frac{16 R_S^2 H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \frac{(1 + k_{ort})^3}{(k_B)^2}$$

Kolon kromatografisinde önemli türetilmiş büyüklükler ve bağıntıları

Türetilmiş büyüklüğün ismi	Hesaplanması	Diğer büyüklüklerle ilişkisi
Hareketli fazın ortalama doğrusal hızı	$\bar{u} = \frac{L}{t_M}$	
Hareketli fazın hacmi	$V_M = t_M \cdot F$	
Alıkönme faktörü (Kapasite faktörü)	$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$	$k = K \frac{V_S}{V_M}$
Dağılım katsayısı (Bileşenin iki fazdaki derişimlerinin oranı)	$K = k \frac{V_M}{V_S}$	$K = \frac{C_S}{C_M}$
Ayırma faktörü (Seçicilik faktörü)	$\alpha = \frac{t_{R(B)} - t_M}{t_{R(A)} - t_M}$	$\alpha = \frac{k_B}{k_A} = \frac{K_B}{K_A}$

Tavsiye edilen videolar

Gaz Kromatografisi ;

<https://www.youtube.com/watch?v=iX25exzwKhl>