

Yarıyıl	Eğitim ve Öğretim Yöntemleri							Krediler		
	Teori	Uyg.	Lab.	Proje/Alan Çalışması			Diğer	Toplam	Kredi	AKTS Kredisi
									3	7,5
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		
	Kısa Sınavlar							40		
	Ödevler							X (isteğe bağlı)		
	Projeler							(2. Vize gibi değerlendirilecek)		
	Dönem Ödevi									
	Laboratuar									
	Diğer									
	Dönem Sonu Sınavı							x		
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. Ara Sınav 7. Gaz kromatografisi, 8. Gaz kromatografisi 9. Sıvı Kromatografisi ,Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) 10. Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) 11. İyon değiştirme kromatografisi, 12. Moleküler dışlama, affinite kromatografisi 13. Kılcal elektroforez									

Prof.Dr. Mehmet Sayım KARACAN

1

KROMATOGRAFI

1903 Yılında Rus botanikçi Michail Semenovich Tswett tarafından bulunmuştur.

Bitki ekstraktı



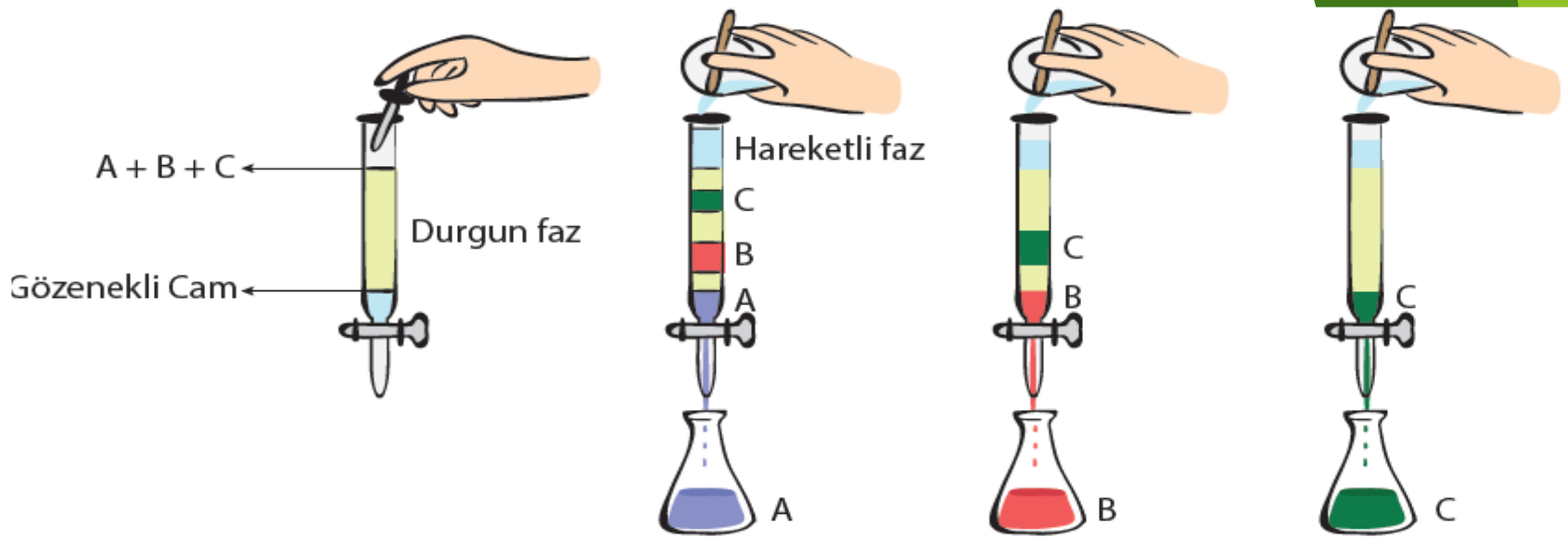
Numune : Yaprak pigmentlerini
içeren çözelti Analit :
Pigmentler (sırasıyla; klorofil,
karoten, ksantofil)
Sabit faz : Kalsiyum karbonat
Hareketli faz : Petrol eteri

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

- 1-Kolon Kromatografisi
- 2-Düzlemsel Kromatografi

Hareketli fazın fiziksel haline göre

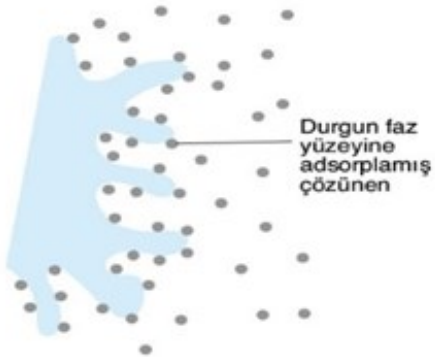
- 1-Gaz kromatografisi
2. Sıvı kromatografisi
3. Süperkritik-akışkan kromatografisi

Hareketli ve Sabit faz arasında gerçekleşen işlemlere göre

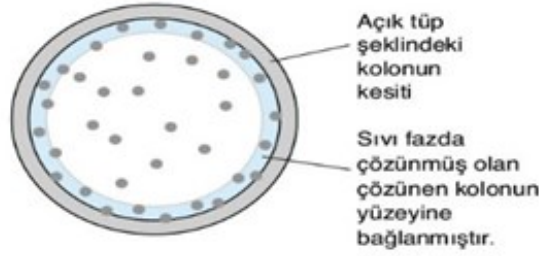
- 1- Adsorpsiyon kromatografisi
- 2- Dağılım (partisyon) kromatografisi
- 3- İyon-değiştirme kromatografisi
- 4-Eleme (ekskülizyon, boyut ayırma) kromatografisi
- 5- Afinite(affinity,benzeşme) kromatografisi

Kolon Kromatografik yöntemlerin Sınıflandırılması

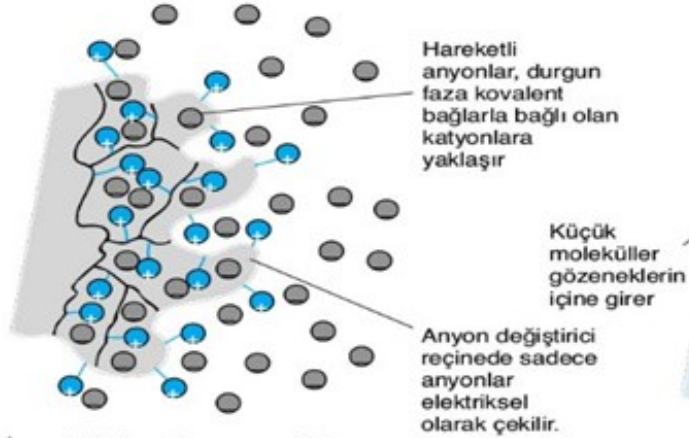
Genel Sınıflandırma	Kromatografi tekniği	Durgun Faz	Denge türü
Gaz Kromatografisi	Gaz-sıvı	Bir katı yüzeye bağlanmış sıvı	Gaz veya sıvı arasında dağılma
	Gaz-katı	Katı	Adsorpsiyon
Sıvı Kromatografisi	Sıvı-sıvı (dağılma)	Bir katı yüzeye bağlanmış sıvı	Birbiri ile karışmayan iki sıvı arasında dağılma
	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



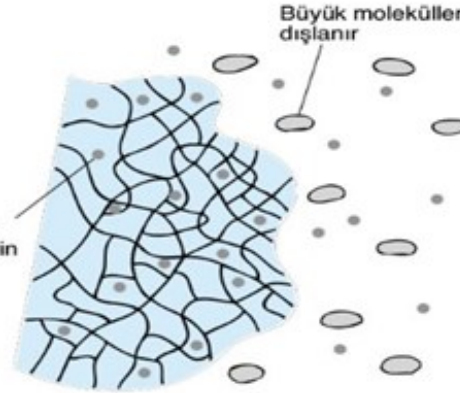
Adsorpsiyon kromatografisi



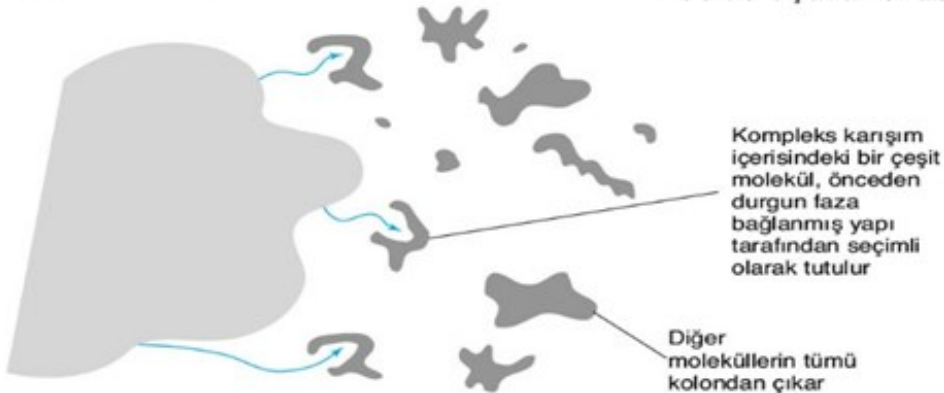
Dağılıma kromatografisi



İyon değiştirme kromatografisi



Moleküler dışlama kromatografisi

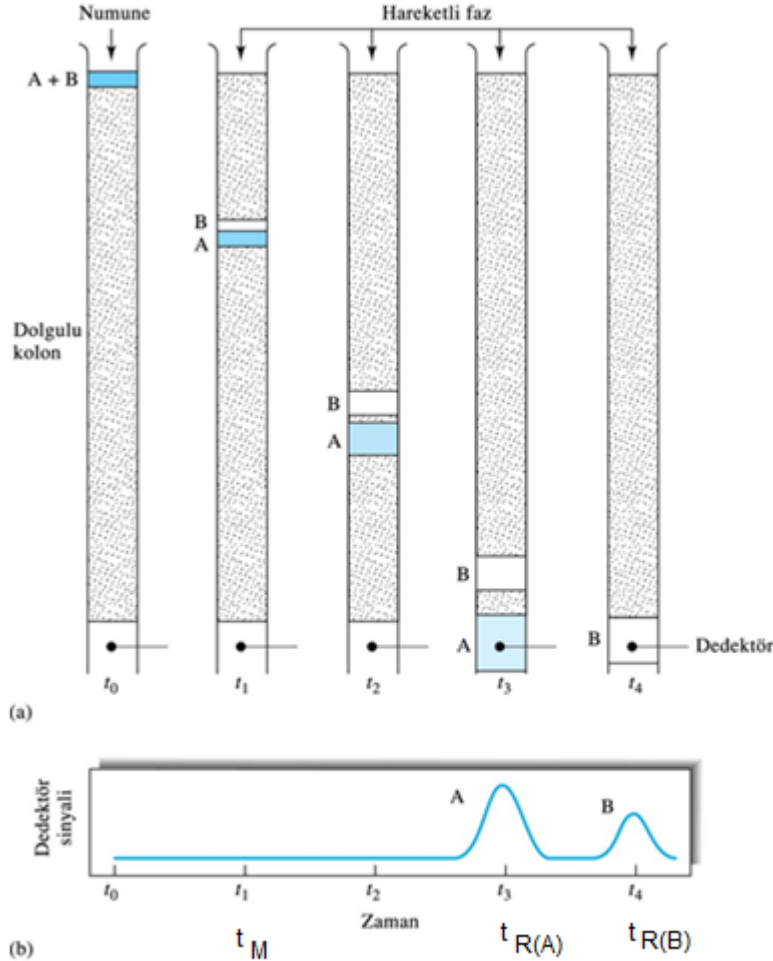


Etkileşim (afinite) kromatografisi

Yaygın kromatografik yöntemlerin tanecik bazında işleyişleri

Kolon Kromatografisi

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



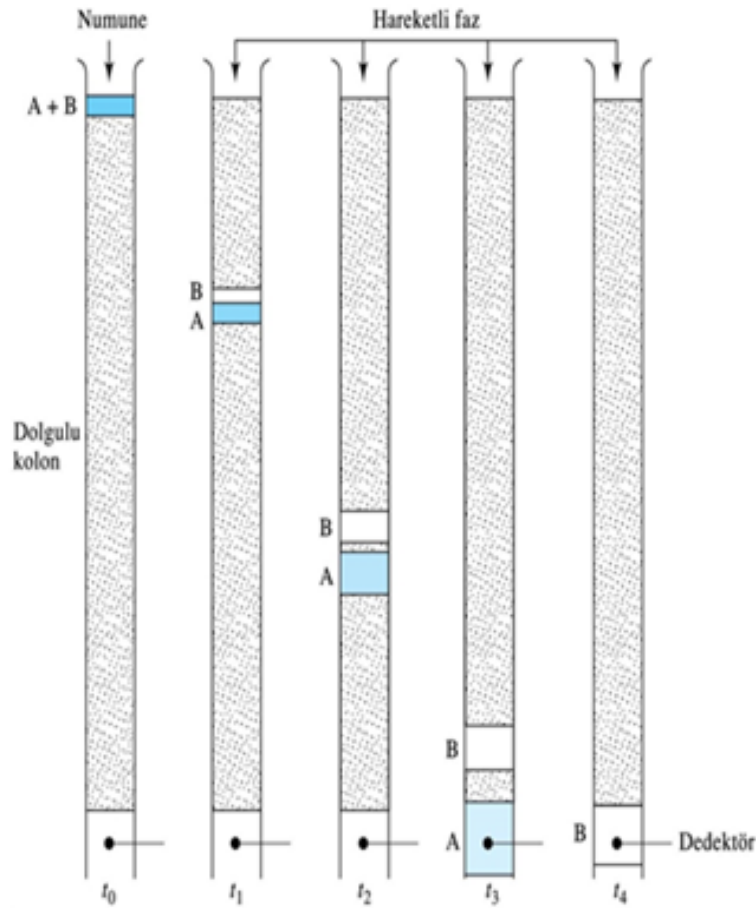
Hareketli fazın ilerlemesiyle durgun fazda tutunan maddelerin yıkanarak alınmasına elüsyon (geri alma) denir.

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

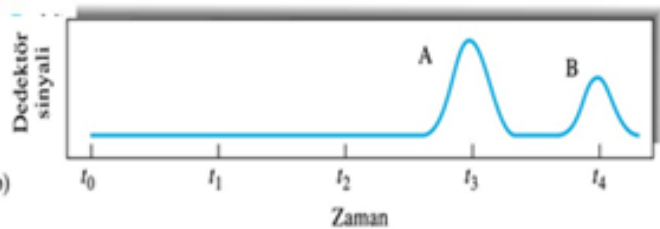
(b) (a)'da görülen elüsyonun farklı basamaklarına karşılık gelen dedektör

sinyalleri (kromatogram)

Kromatogramda, t_M : 2 min olduğuna göre t_{RA} ve t_{RB} 'yi ve pik taban genişliklerini okuyunuz.



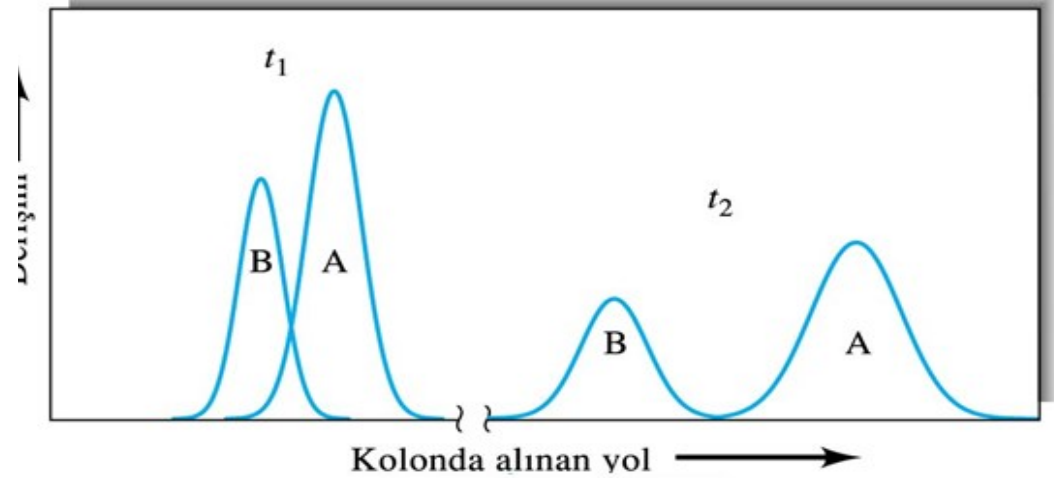
(a)



(b)

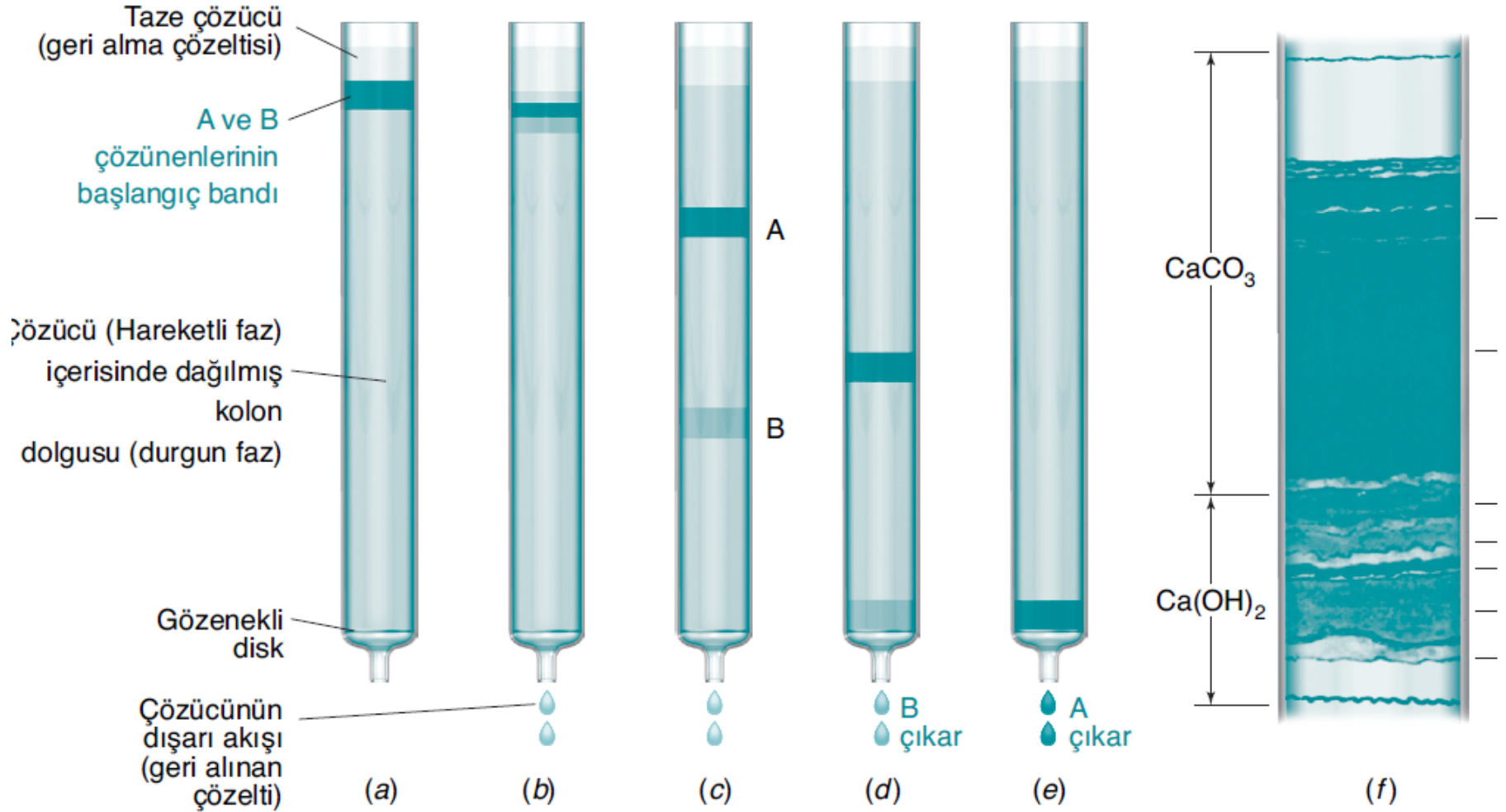
(a) Kolon elüsyon kromatografi ile A ve B bileşenlerinin ayrılma diyagramı.

(b) (a)'da gösterile elüsyonun çeşitli basamaklarında dedektör sinyali.



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

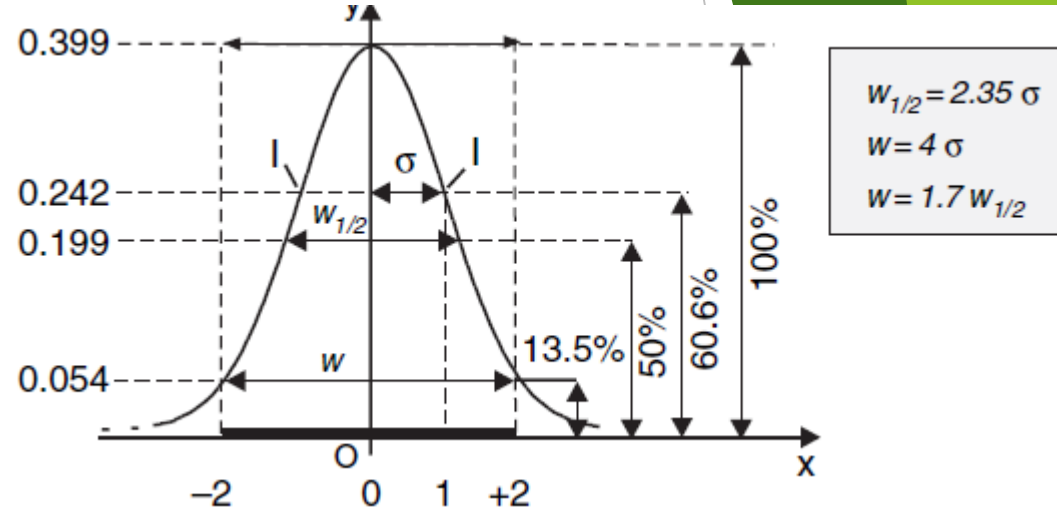
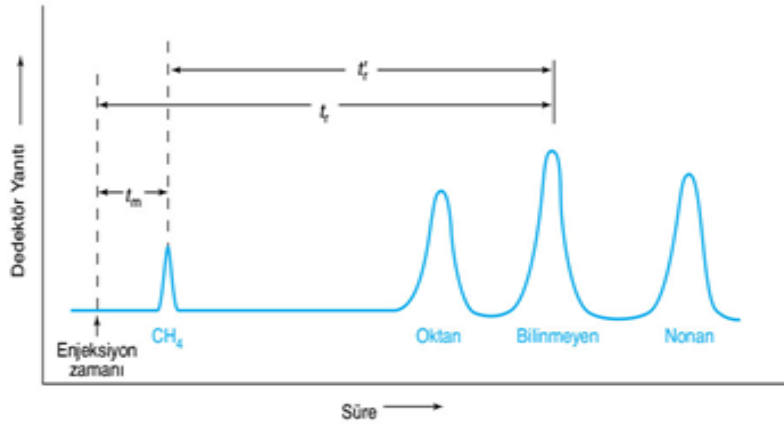
Soldaki Şekilde, bir kromatografik kolonda A ve B maddeleri karışımı bir örneğin, sıyırma işleminin kısa ve uzun olması halinde verdiği konsantrasyon profili görülmektedir. A'nın ayrılma katsayısı B'ninkinden daha büyüktür; bu nedenle göç işlemi sırasında B geride kalır. Kolonun buyu uzadıkça iki pik 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.



ŞEKİL 22-5 Kromatografinin temelindeki fikir: Çözünen A maddesinin durgun faza olan ilgisi, B maddesine göre daha büyük olması ve bu nedenle kolonda daha uzun süre kalmasıdır. f şekli, 1930'larda L. Zechmeister'in yaptığı çalışmada kırmızı biberin kabuğundaki pigmentleri ayırdığı deneyin yeniden yapılandırılmış halidir. Yatay çizgiler ile işaretlenmiş bantlar, farklı pigmentlerdir. Altındaki durgun faz Ca(OH)_2 , üstteki ise CaCO_3 'tür. [Panel f from L. S. Ettre, "The Rebirth of Chromatography 75 Years Ago," *LCGC* 2007, 25, 640.]

Kromatogram

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

Birbiri ile ilişkili iki pikin bağıl alıkonmalarına ayırma faktörü(α) denir.

İki bileşen, 1 ve 2 için ayırma faktörü α , (aynı zamanda **bağıl alıkonma** olarak da bilinir), düzeltilmiş alıkonma sürelerinin birbirine oranıdır:

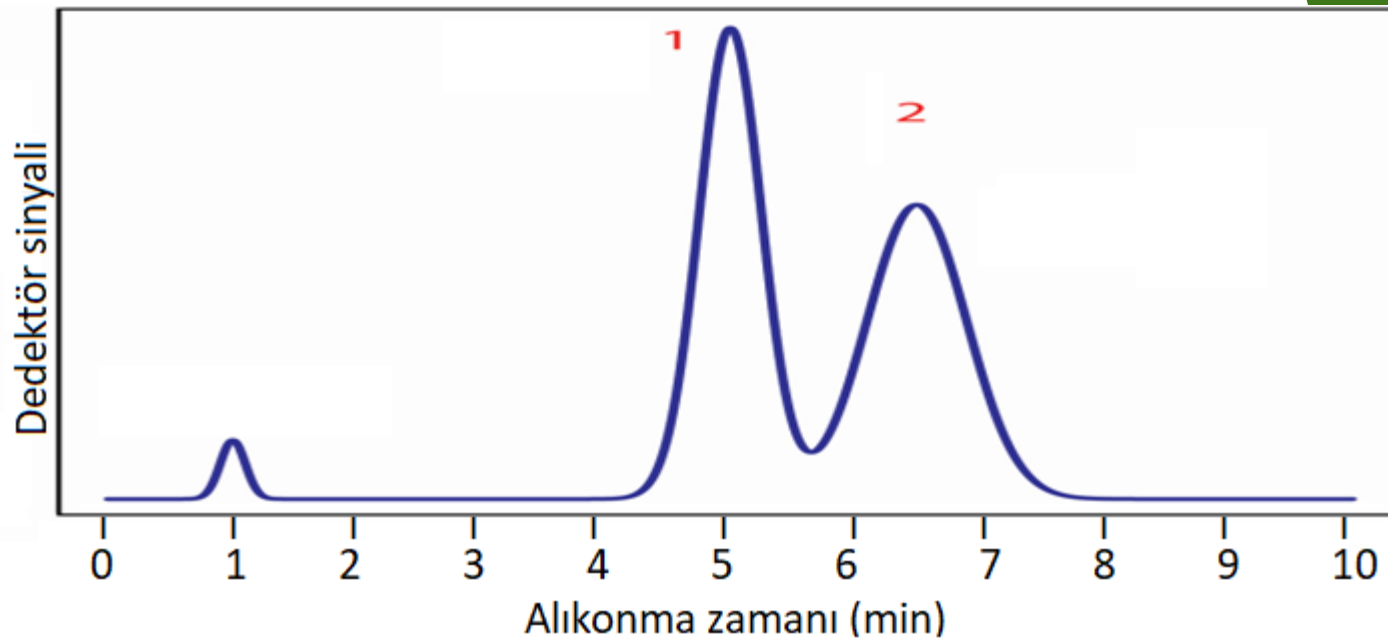
$$\alpha = \frac{t_{R(B)} - t_M}{t_{R(A)} - t_M} = \frac{t'_{R(B)}}{t'_{R(A)}}$$

$\alpha = 1$ 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;

a) Alıkonma zamanını okuyunuz

b) Düzeltilmiş alıkonma zamanını hesaplayınız

c) Alıkonma faktörünü hesaplayınız.

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

Alıkonma Süresi ve Dağılım Katsayısı) $A_{(M)} \rightleftharpoons A_{(S)} \quad K = \frac{C_S}{C_M}$

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

$$K = \frac{C_S}{C_M} \quad k = \frac{n_S}{n_M} = \frac{C_S V_S}{C_M V_M} = K \frac{V_S}{V_M} \quad k = K \frac{V_S}{V_M}$$

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)

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



Kolonun iç yarıçapı 125 μm $\cdot r_2$

Kaplandıktan sonra iç yarı çapı 124 μm $\cdot r_1$

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

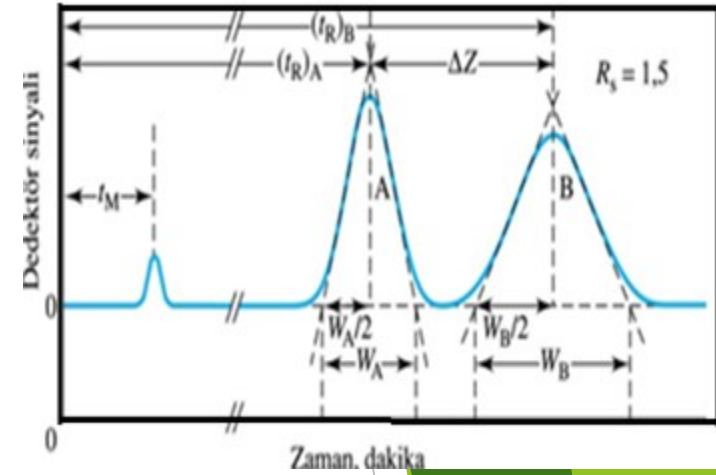
d) Benzenin durgun fazda geçirdiği zaman kesri = $1 - 0,17 = 0,83$

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;

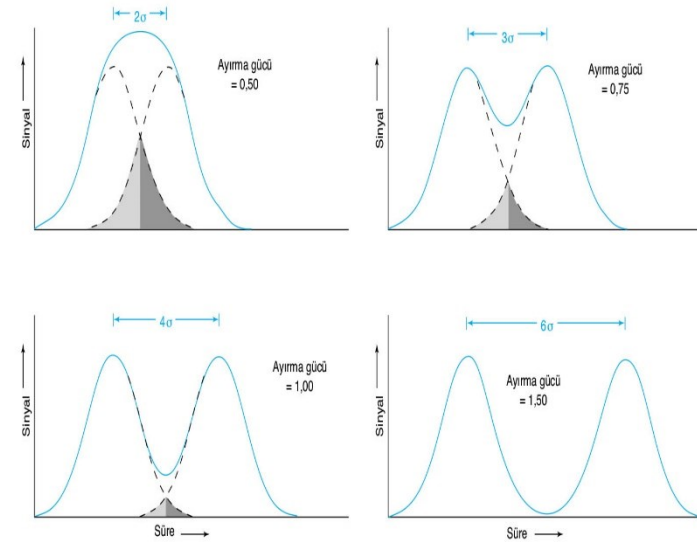
- (1) pik yüksekliğin yarısında ölçülen $w_{(1/2)} = 2,35 \sigma$
- (2) zemin çizgisinde pikin en dik kısımlarına çizilen teğetler arasındaki genişlik, w ile ifade edilir. Yaygın olarak w kullanılır ($w = 4\sigma$)



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

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

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



ŞEKİL 22-10 Eşit alan ve genliktaki Gauss piklerinin ayrılması. Kesikli çizgiler her bir piki, sürekli çizgiler iki pikin toplamı 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

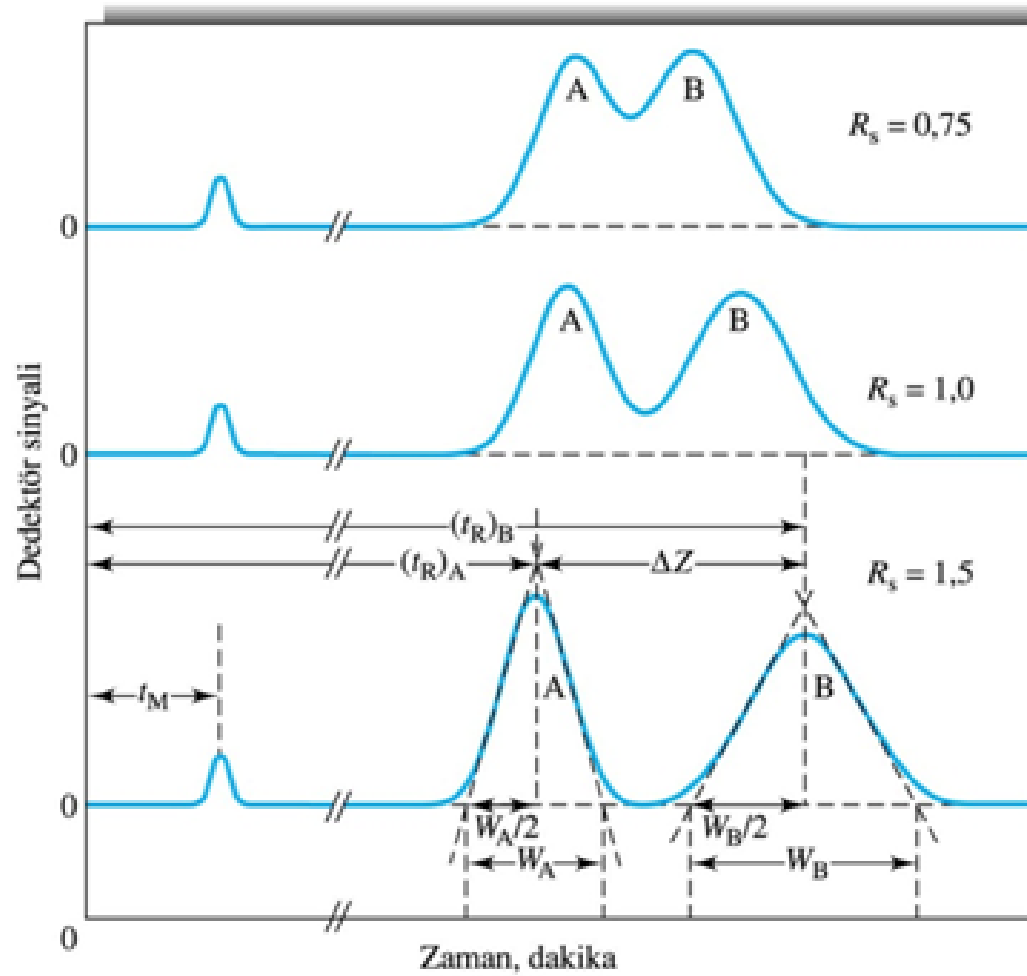
Ayırma Gücünün Ölçülmesi

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.

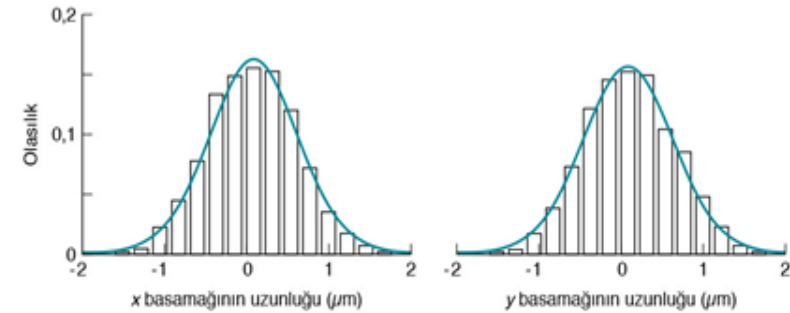
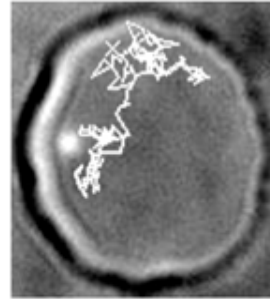
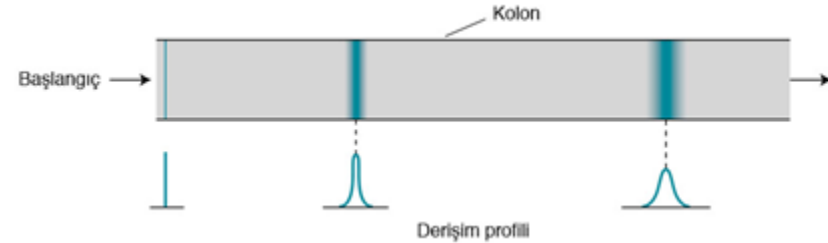
Difüzyon

Çözünene ilişkin bir bant, çözünen kromatografi kolonunda ilerledikçe genişler. İdeal durumda, başlangıçta, kolona girişte çok dar olan bant, çıkışta bir Gauss eğrisine benzeyen şekil alır.

Daha gerçekçi koşullarda, bant asimetrik bir şekil alır.

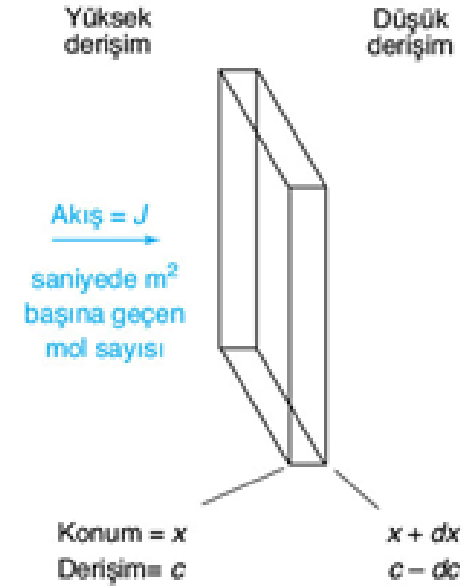
Bant genişlemesinin ana sebeplerinden biri **difüzyondur**. Difüzyon, çözünenin, derişimce çok olduğu taraftan az olduğu tarafa doğru, taşınmasıdır.

Yandaki Şekil mikroskobik bir su damlacığının içerisinde floresans davranışı gösteren Bir küreciğin *Brown hareketleri* ile moleküllerin gelişigüzel hareketlerini gösterilmektedir. gelişigüzel doğrultu ve hızlarda hareket eden su moleküllerinin itmeleri ile hareket eder. Kürelerin x ve y koordinatlarındaki ardışık aralıklarla olan hareketleri, Gauss dağılımına uyar.



20 μm çaplı su damlası içerisinde 290 nm çaplı floresans küreciklerin 155 ms'lik aralıklarla kaydedilmiş hareketleri. Histogramlar her bir basamak için 800 fotoğraf kaydı ile elde edilmiş Δx ve Δy değerlerini gösterir. Düzgün çizgilerin oluşturduğu eğriler Gauss tipine uyar.

- **Difüzyon katsayısı**, moleküllerin derişim bakımından çok oldukları bölgeden az oldukları bölgeye gelişigüzel hareketleri sırasındaki hızın ölçüsüdür. Yandaki Şekilde, çözünenin bir düzlem boyunca dc/dx 'lik bir derişimdeki değişim (gradyen) ile hareketini göstermektedir.
- Saniyede her bir metrekare alandan geçen moleküllerin sayısı, yani *akış*, J , derişim farkı ile orantılıdır:
- $Akış \left[\frac{mol}{m^2 \cdot s} \right] = J = -D \frac{dc}{dx}$
- Orantı sabiti olan D , difüzyon katsayısı olarak bilinir ve net akış, derişimin çok olduğu bölgeden az olduğu bölgeye doğru olduğundan negatif işaretlidir.



Birim alana sahip bir düzlemde moleküllerin difüze olarak akışı, derişim farkı ve difüzyon katsayısı ile orantılıdır:
 $J = -D(dc/dx)$.

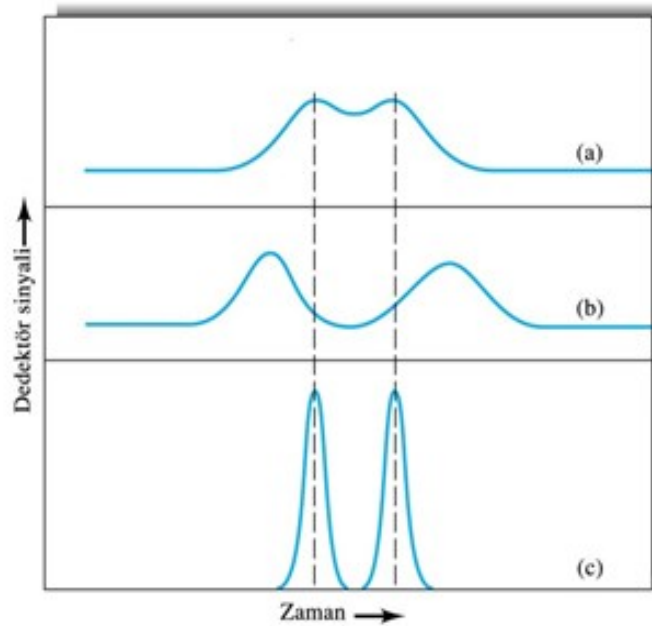
ÇİZELGE 22-1 298 K'de bazı maddelerin difüzyon katsayıları

Çözünen	Çözücü	Difüzyon katsayısı (m ² /s)
H ₂ O	H ₂ O	$2,3 \times 10^{-9}$
Sakkaroz	H ₂ O	$0,52 \times 10^{-9}$
Glisin	H ₂ O	$1,1 \times 10^{-9}$
CH ₃ OH	H ₂ O	$1,6 \times 10^{-9}$
Ribonükleaz (FK 13700)	H ₂ O (293 K)	$0,12 \times 10^{-9}$
Serum albumin (FK 66000)	H ₂ O (293 K)	$0,059 \times 10^{-9}$
I ₂	Heksan	$4,0 \times 10^{-9}$
CCl ₄	Heptan	$3,2 \times 10^{-9}$
N ₂	CCl ₄	$3,4 \times 10^{-9}$
CS ₂ (g)	Hava (293 K)	$1,0 \times 10^{-5}$
O ₂ (g)	Hava (273 K)	$1,8 \times 10^{-5}$
H ⁺	H ₂ O	$9,3 \times 10^{-9}$
OH ⁻	H ₂ O	$5,3 \times 10^{-9}$
Li ⁺	H ₂ O	$1,0 \times 10^{-9}$
Na ⁺	H ₂ O	$1,3 \times 10^{-9}$
K ⁺	H ₂ O	$2,0 \times 10^{-9}$
Cl ⁻	H ₂ O	$2,0 \times 10^{-9}$
I ⁻	H ₂ O	$2,0 \times 10^{-9}$

$$C = \frac{m}{\sqrt{4\pi Dt}} e^{\frac{-x^2}{4Dt}}$$

Çizelge, sıvılardaki difüzyonun gazlardakine göre 10^4 kez yavaş olduğunu göstermektedir. Ribonükleaz ve albumin gibi büyük moleküller küçük moleküllerden 10 - 100 kez yavaş difüzlenirler. Eğer m mol çözünen madde kolon içerisindeki hareketine başlar ve kolon içerisinde son derece ince bir birim kesit alandan difüzyon ile geçerse, bandın Gauss tipindeki profili aşağıdaki eşitliğe uyar: Burada, C , derişim (mol/m³), t süre ve x de kolon boyunca bandın o andaki merkezinden olan uzaklıktır. (Bu eşitlikte daima bant merkezi $x = 0$ 'dadır).

İyi bir kromatografik ayırmada,
(a) maddelerin göç etme hızı, ve
(b) (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 Synge 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 olanınkinden 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,

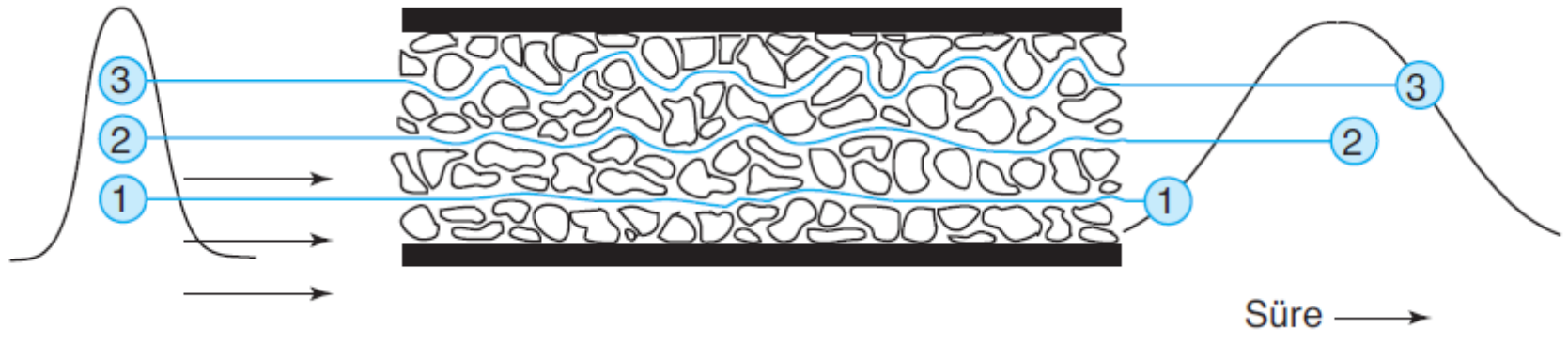
A : çoklu akış yolları (eddy difüzyonu)

B : uzunlamasına difüzyon

C : kütle transferine direnç

► Çoklu Akış Yolları (Eddy difüzyonu)

- Van Deemter eşitliğindeki A terimi, kuramı karmaşık olan çoklu akış yollarından kaynaklanır. Şekil'de bu etki resmedilmiştir. Bazı akış yolları diğerlerine göre daha uzun olduklarından sol tarafta kolona aynı anda giren moleküller, sağ tarafta farklı zamanlarda kolondan çıkarlar. Basitlik açısından birçok farklı etki Eşitlikteki A teriminde birleştirilmiştir



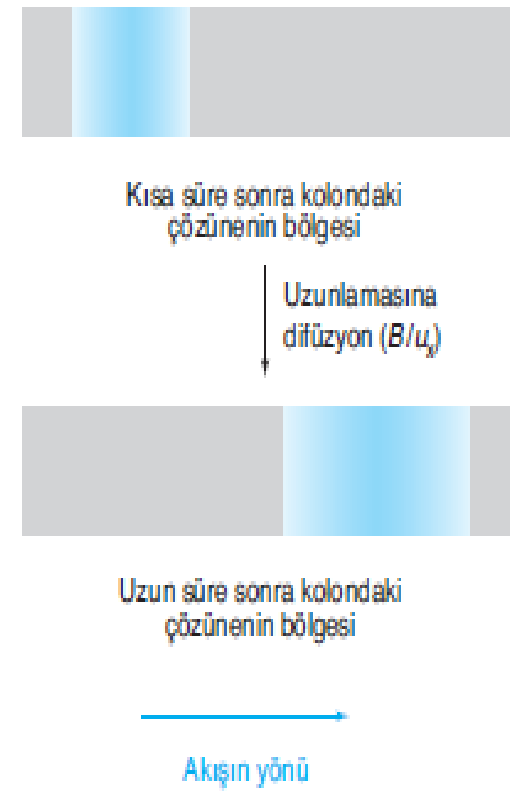
- Şekil: Çoklu akış yollarından kaynaklanan bant genişlemesi. Durgun fazdaki taneciklerin boyutu azaldıkça bu sorun ortadan kalkar. Bu süreç açık borulu kolonlarda söz konusu değildir.

Uzunlamasına Difüzyon

Eğer çözüneni bir kolonun merkezine disk şeklinde ve ince bir bant halinde verebilseydik, moleküller, kolon içerisinde daha yüksek derişimden, bantın kenarlarındaki daha düşük derişime doğru difüzlenirken bant da yavaşça genişleyecekti. Bir bantın difüzyona bağılı olarak genişlemesine **uzunlamasına difüzyon** denir, çünkü bu difüzyon, çözücünün akışı ile bant kolon boyunca taşınırken kolonun eksenı boyunca gerçekleşir.

Van Deemter eşitliğinde B/u_x terimi uzunlamasına difüzyondan kaynaklanır. Daha hızlı doğrusal akış hızı, kolonda daha az zaman harcamak demektir ve daha az difüzyon genişlemesi oluşur. difüzyondan kaynaklanan varyansın aşağıdaki şekilde olduğunu ifade eder: Burada, D_m çözünenin hareketli fazdaki difüzyon katsayısı, t süre ve H_D de uzunlamasına difüzyona bağılı tabaka yüksekliğidir. Kolon boyunca hareket için gerekli olan süre L/u_x olup burada L kolon uzunluğu ve u_x doğrusal akış hızıdır.

Uzunlamasına difüzyona bağılı
tabaka yüksekliği:

$$H_D = \frac{\sigma^2}{L} = \frac{2D_m}{u_x} = \frac{B}{u_x}$$


ŞEKİL 22-17 Uzunlamasına difüzyon van Deemter eşitliğinde (B/u_x) terimini artırır. Çözünen, sürekli olarak derişik merkez bölgeden dışarı doğru uzaklaşır. Daha hızlı akış olduğunda kolonda daha az zaman harcanır ve daha az uzunlamasına difüzyon oluşur.

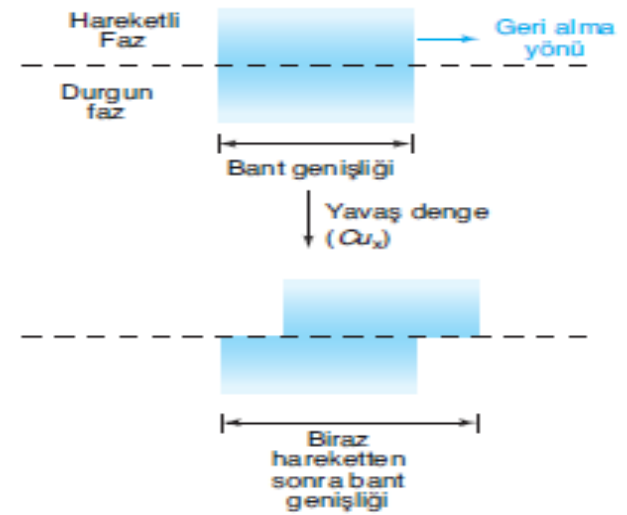
► Fazlar Arasındaki Sonlu Denge Süresi

- Eşitlik teki Cux terimi çözünenin hareketli faz ile durgun faz arasında dengeye gelmesi için gerekli olan süre ile ilgilidir. Her ne kadar çözünenin bir kısmı durgun fazda kalıyorsa da hareketli fazda kalan çözünen, tüm bölgeye yayılarak ileri doğru hareket eder. Aynı zamanda *kütle aktarım terimi* de denilen ve sonlu denge süresinden kaynaklanan tabaka yüksekliği aşağıdaki gibidir:

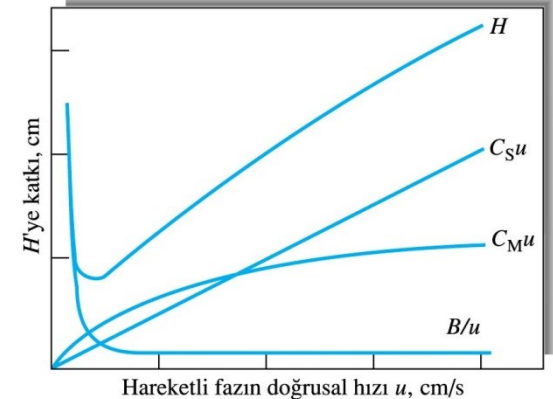
$$H_{\text{kütle aktarımı}} = Cu_x = (C_s + C_m)u_x$$

- Burada, C_s durgun fazdaki C_m de hareketli fazdaki kütle aktarım hızını açıklar. C_s ve C_m için özel eşitlikler kromatografinin türüne bağlıdır.

Dolgulu kolonlarda her üç terim de bant genişlemesine katkıda bulunur. Açık borulu kolonlarda çoklu yollar ile ilgili terim olan $A = 0$ olduğundan bant genişlemesi azalır ve ayırma gücü artar.



ŞEKİL 22-18 Çözünenin hareketli faz ile durgun faz arasında dengeye gelmesi için gerekli olan belirli süre (van Deemter eşitliğinde Cu_x terimi). Doğrusal akış yavaşladıkça denge daha fazla tamamlanır ve daha az bant genişlemesi olur.



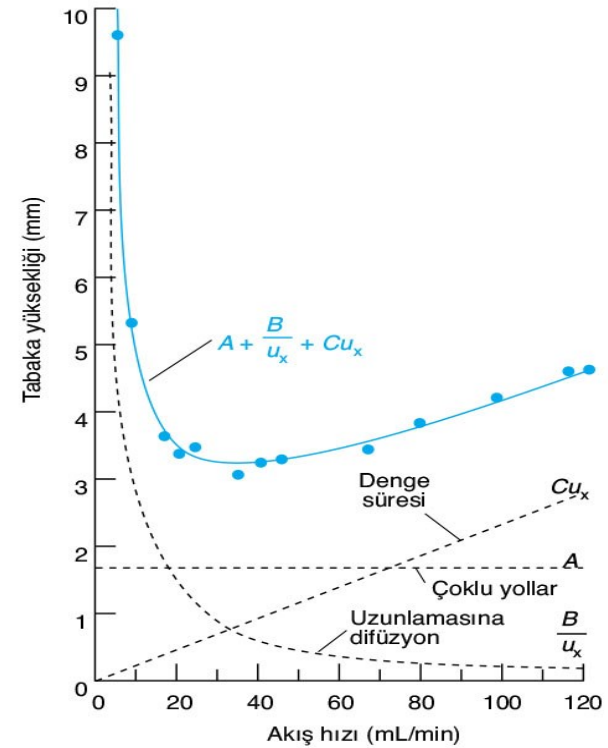
ŞEKİL 26-10 Çeşitli kütle-aktarım terimlerinin tabaka yüksekliğine katkıları. $C_s u$ durgun faza ve durgun fazdan kütle aktarım hızlarından; $C_m u$ hareketli fazdaki kütle aktarım hızının sınırlı olmasından; B/u ise, boyuna difüzyondan kaynaklanır.

- 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. Eğer bandın kolona enjeksiyonu sırasındaki bu genişleme Δt (zaman biriminde) ile gösterilirse, sonuçtaki bant genişliğinin varyansına katkı aşağıdaki bağıntı ile verilir:

Enjeksiyon veya dedektör
kaynaklı oluşan varyans:

$$\sigma_{\text{enjeksiyon}}^2 = \sigma_{\text{dedektör}}^2 = \frac{(\Delta t)^2}{12}$$

- Aynı ilişki, örneğin geçmesi için Δt 'lik bir süre gerektiren bir dedektördeki genişleme için de söz konusudur. Bazen, kolon üzerinde belirleme olasıdır; bu durumda dedektördeki bant genişlemesi sorunu giderilmiş olur.



ŞEKİL 22-16 van Deemter eşitliğinin gaz kromatografisine uygulanması $A = 1,65 \text{ mm}$, $B = 25,8 \text{ mm} \cdot \text{mL/min}$ ve $C = 0,0236 \text{ mm} \cdot \text{min/mL}$. [Experimental points from H. W. Moody, "The Evaluation of the Parameters in the van Deemter Equation," *J. Chem. Ed.* **1982**, 59, 290.]

Kapasite faktörünün Ayırma gücüyle ilişkisi

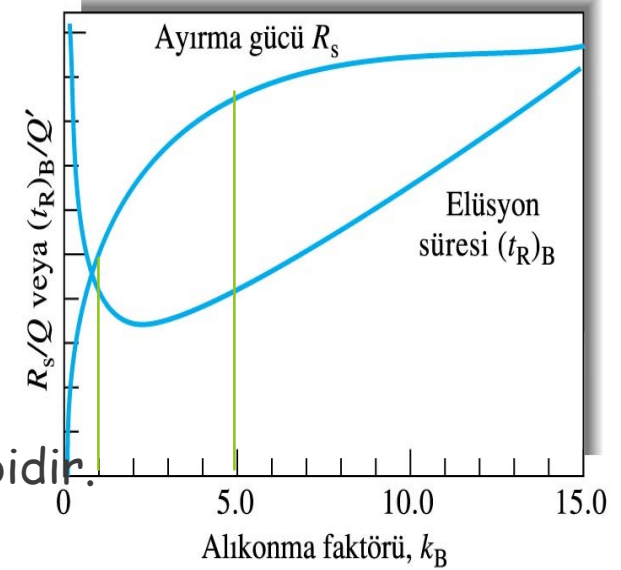
Analitlerin kolonda göç etme hızlarını tanımlamak amacıyla yaygın olarak kullanılan önemli bir büyüklüktür. Kapasite (alıkonma) faktörü (k_B)'nın 1-5 arasında bir değer göstermesi idealdir. Uygun bir kolonun seçilmiş olması halinde k değeri mobil fazın bileşimi değiştirilerek ayarlanabilir. Kapasite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



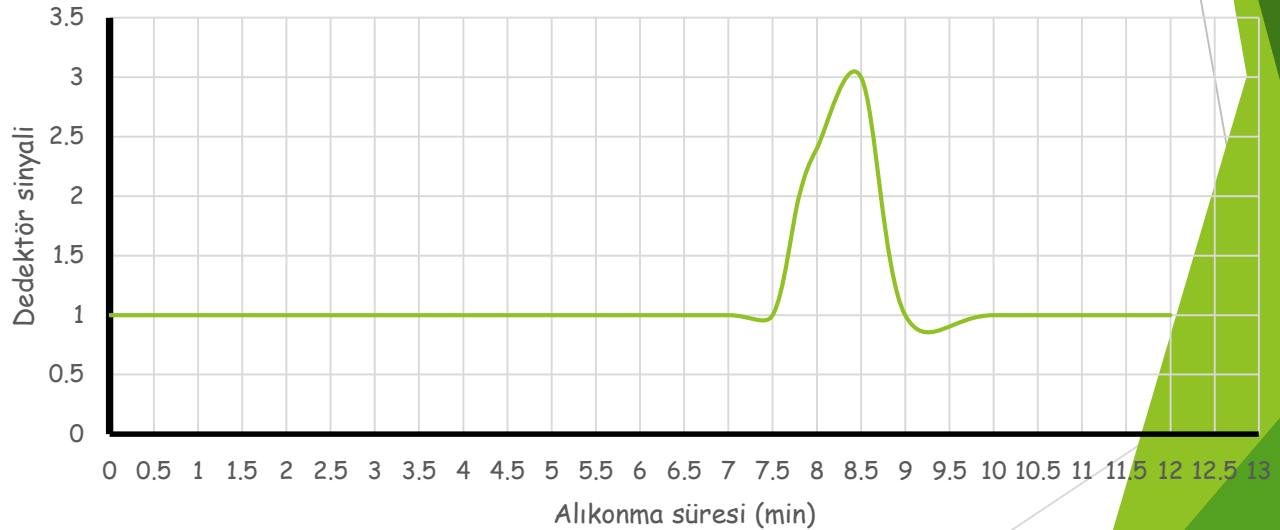
Şekilden de görüldüğü k değeri için 1- 5 aralığında hem Ayırma gücü en fazla hem de elüsyon süresi en azdır.

ŞEKİL 26-13 Alıkonma faktörü k_B 'nin, ayırma gücü (R_s) ve elüsyon süresine $(t_R)_B$ etkisi. k_B 'deki değişim sırasında Q ve Q' 'nin sabit kaldığı kabul edilmiştir.

- **Örnek:** Bir kromatogramda bir klorlanmış pestisit kromatogramı aşağıdaki şekilde verilmiştir. Grafikten yararlanarak 20 cm uzunluğunda bir kolon için teorik tabaka yüksekliğini bulunuz.

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad N = 16 (8,5 \text{ min} / 2,5 \text{ dakika})^2 = 513,8 \text{ tabaka}$$

$$H = L/N = 20 \text{ cm} / 513,8 \text{ tabaka} = 0,039 \text{ cm/tabaka} = 0,4 \text{ mm/tabaka}$$



Kolon kromatografisinde önemli deneysel büyüklükler ve bağıntıları

Deneysel 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	Kolon hazırlama verisi
Hareketli faz hacmi	V_m	Kolon hazırlama verisi
Analitin hareketli ve sabit fazlardaki derişimleri	C_M , C_S	Analiz ve hazırlama verilerinden

Kolon kromatografisinde önemli türetilmiş büyüklükler ve bağıntıları

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

Türetilmiş büyüklüğün ismi

Hesaplanması

Diğer büyüklüklerle
ilişkisi

Ayırma gücü

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

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \left\{ \frac{\alpha}{\alpha - 1} \right\}^2 \left\{ \frac{1 + k_B}{k_B} \right\}^2$$

Kuramsal tabaka sayısı

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

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

Kuramsal tabaka
yüksekliği

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

Alıkonma zamanı

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

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. Pik genişlikleri 1,11 ve 1,21 min olduğuna göre aşağıdaki ;

- (a) kolonun ayırma gücünü $R_s=?$
- (b) kolondaki ortalama tabaka sayısını, $N=?$
- (c) tabaka yüksekliğini, $H=?$
- (d) Ayırma gücünün $R_s=1,5$ olması için gerekli kolon uzunluğunu, $L_2=?$
- (e) $R_s= 1,5$ olan kolonda B maddesinin çıkması için gerekli zamanı hesaplayınız. $tr_2=?$
- f) 30 cm'lik kolonda ve aynı alıkonma zamanlarında 1,5 ayırma gücü elde etmek için gerekli tabaka yüksekliğini hesaplayınız. $H_2=?$

- (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

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

- denklemiyle hesaplanır.

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

- (b) Ortalama tabaka sayısı aşağıdaki denklemden bulunur.

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

- $N_1 = 16(16,40 / 1,11)^2 = 3493$

- $N_1 = 16(17,63 / 1,21)^2 = 3397$

- $N_{ort} = (3493 + 3397) / 2 = 3445$

- (d) N ve L nin artması ile k' ve α değişmez.

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

- Denklem^a N_1 ve N_2 cinsinden yazılır ve iki denklem birbirine bölünerek aşağıdaki denklem elde edilir.

$$\frac{R_{s1}}{R_{s2}} = \frac{\sqrt{N_1}}{\sqrt{N_2}} \quad \frac{1,06}{1,5} = \frac{\sqrt{3445}}{\sqrt{N_2}}$$

- $N_2 = 6900$

- $L = 6900 \cdot 8,7 \cdot 10^{-3} = 60 \text{ cm}$

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

► (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

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

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

Kolon Etkinliğinin(Performansının) Optimizasyonu

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

Ayrımı iyileştirmenin en kolay yolu kapasite faktörü(k)'nü optimize etmek

k için mobil fazı veya kolon dolgu maddesini değiştirmek

N için;

kolon uzunluğunu,

mobil fazın akış hızını,

dolgu maddesinin tanecik büyüklüğünü,

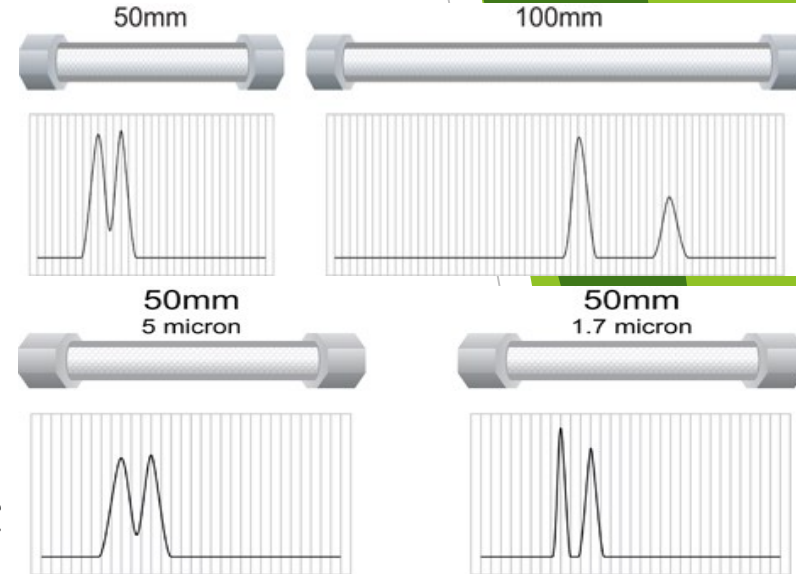
mobil fazın viskozitesini değiştirmek

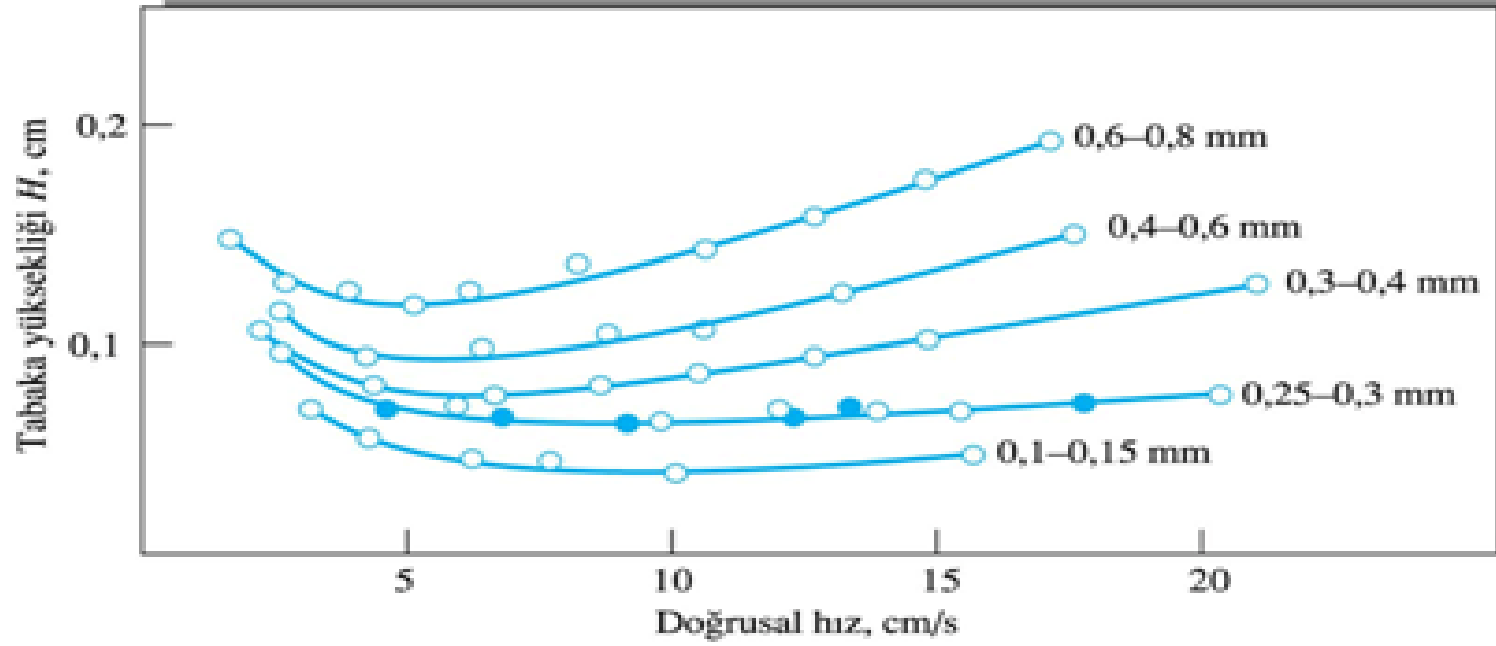
α için azalan tercih edilebilirlik sırasıyla;

pH değişikliklerini de içeren mobil faz bileşimini değiştirmek,

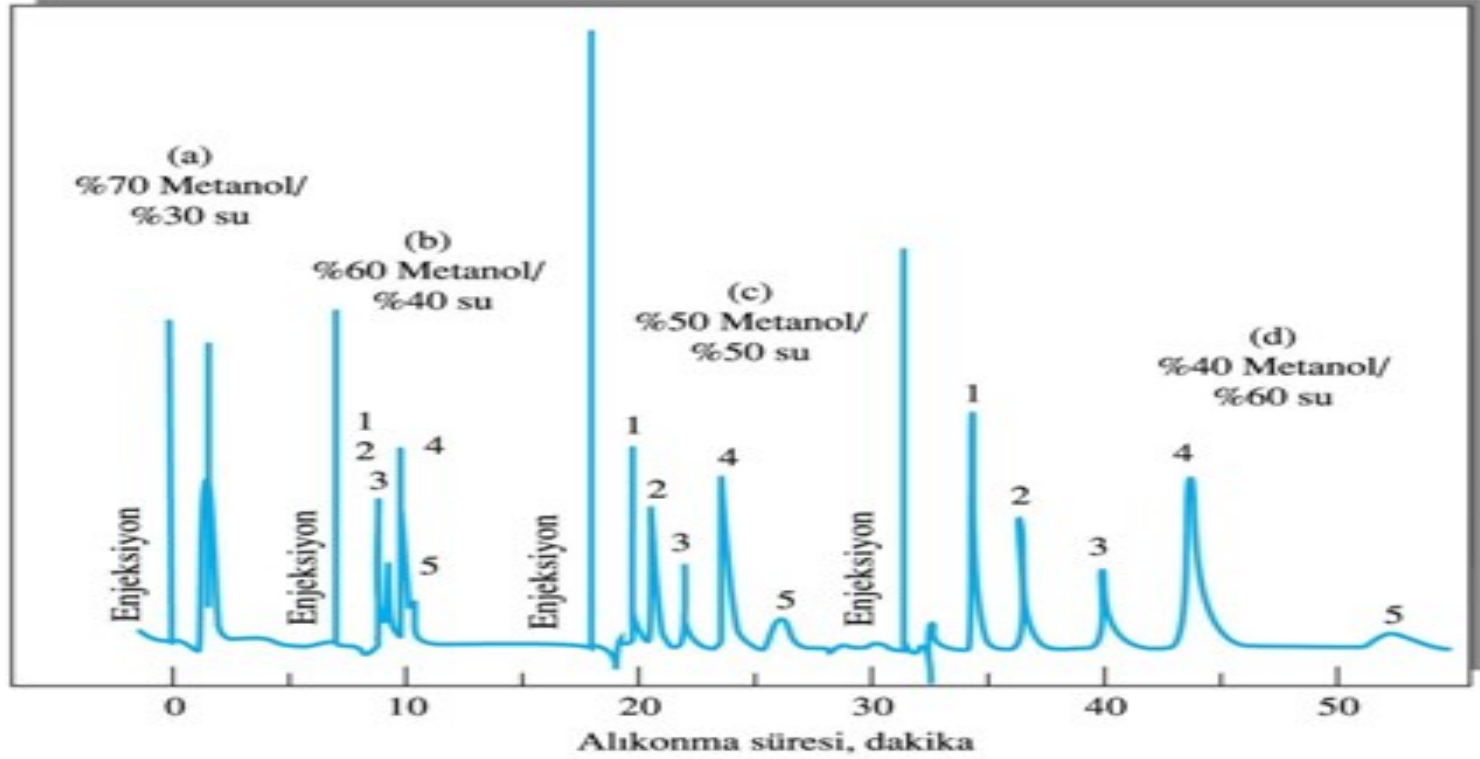
kolon sıcaklığını değiştirmek,

sabit fazın bileşimini değiştirmek,





Tabaka yüksekliğine tanecik boyutunun etkisi

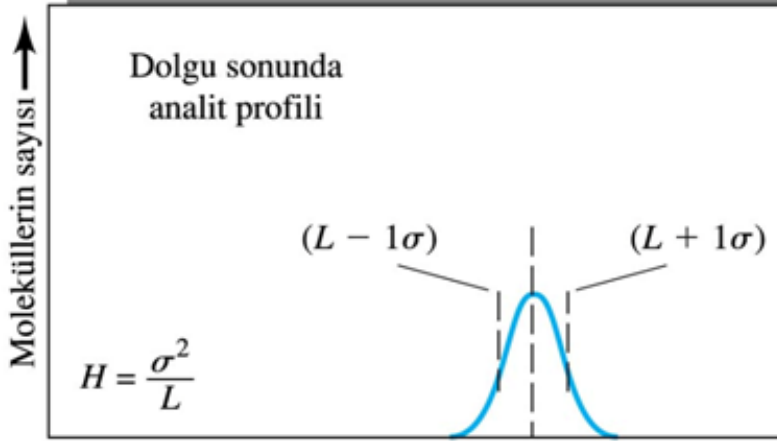


Çözücü değişikliğinin kromatogramlara etkisi. .

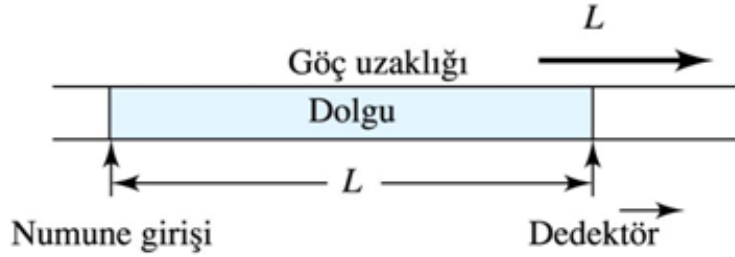
Analitler:

- (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*- bütül-9, 10-antrakinon.

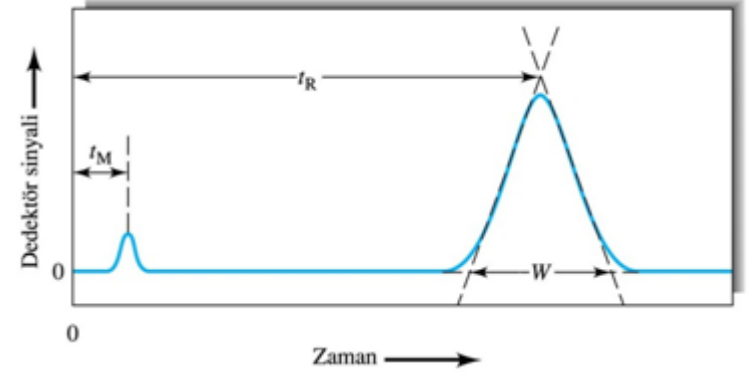
(b)



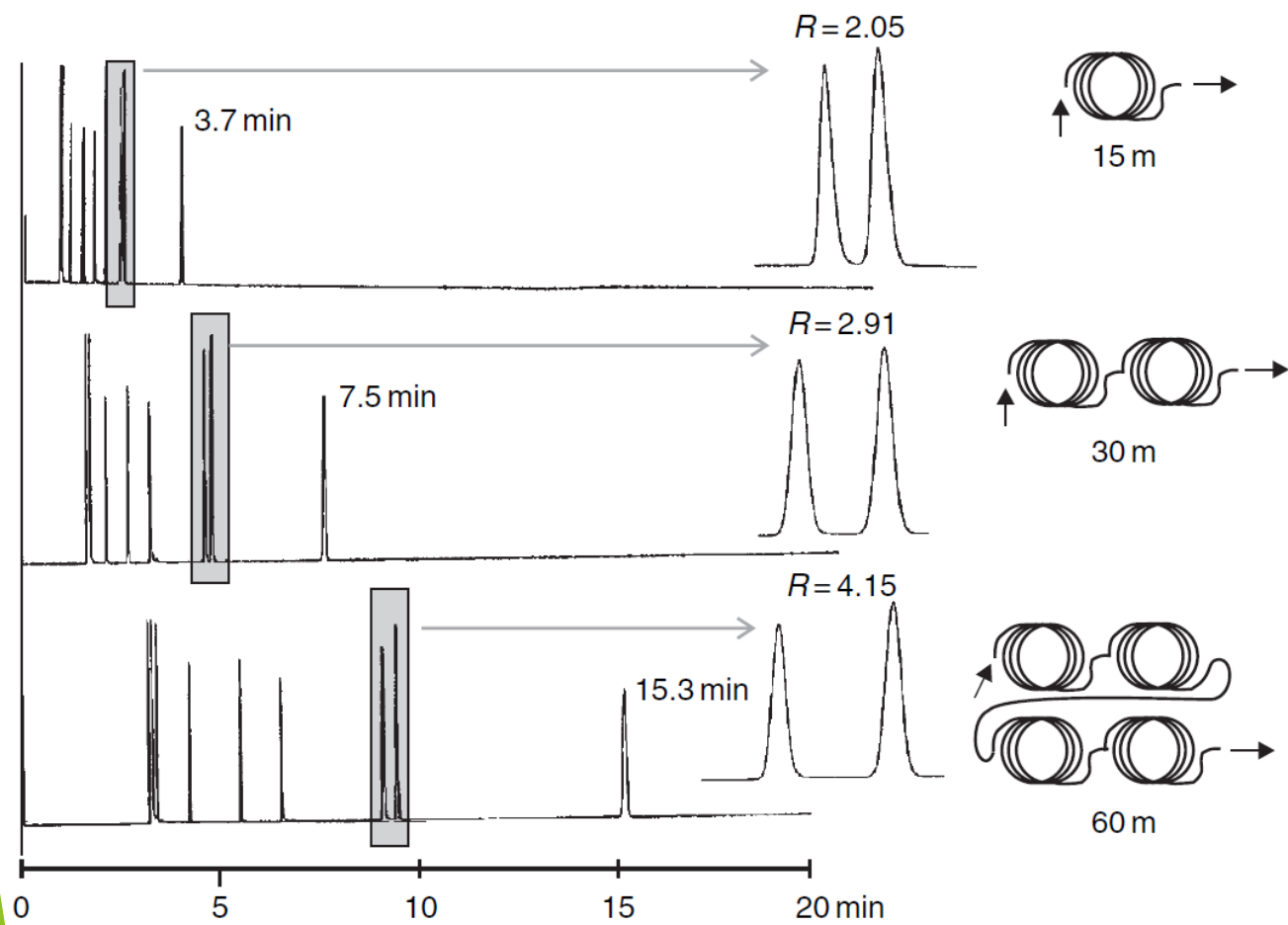
(a)



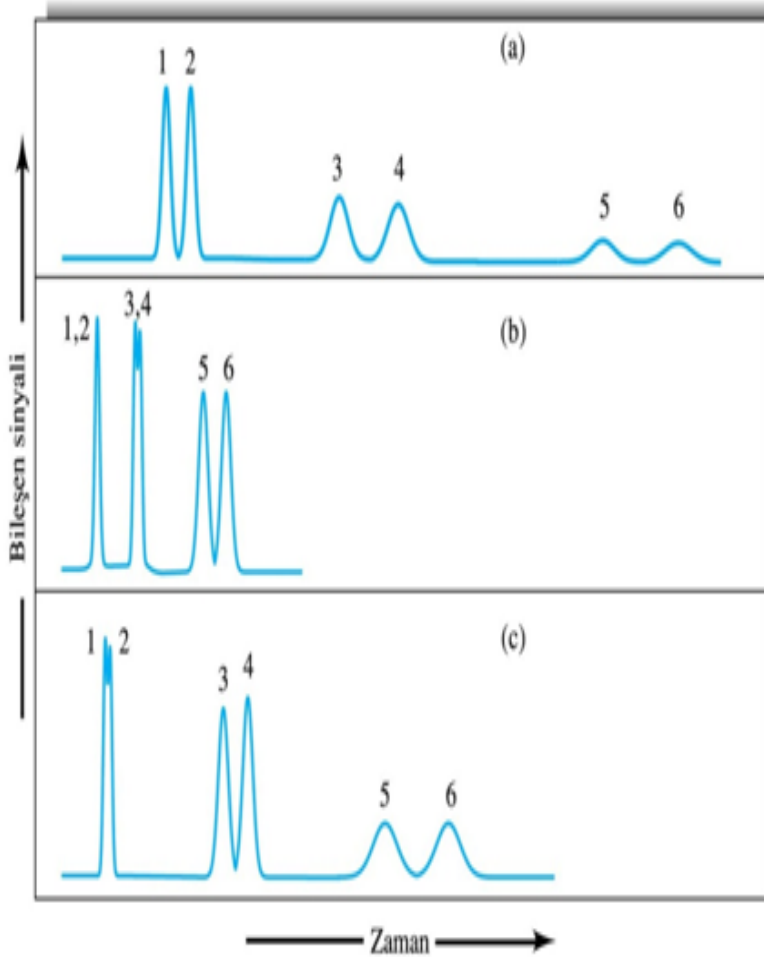
$H = \sigma^2/L$ şeklinde verilen tabaka yüksekliğinin tanımı. (a) Kolon uzunluğu, numune girişinden dedektöre kadar olan mesafedir. (b) Numune moleküllerinin dağılımı Gauss eğrisine uyar.



Tabaka Sayısının tayini



Kromatografide genel geri alma (elüsyon) problemi



Kromatografide genel elüsyon problemi.

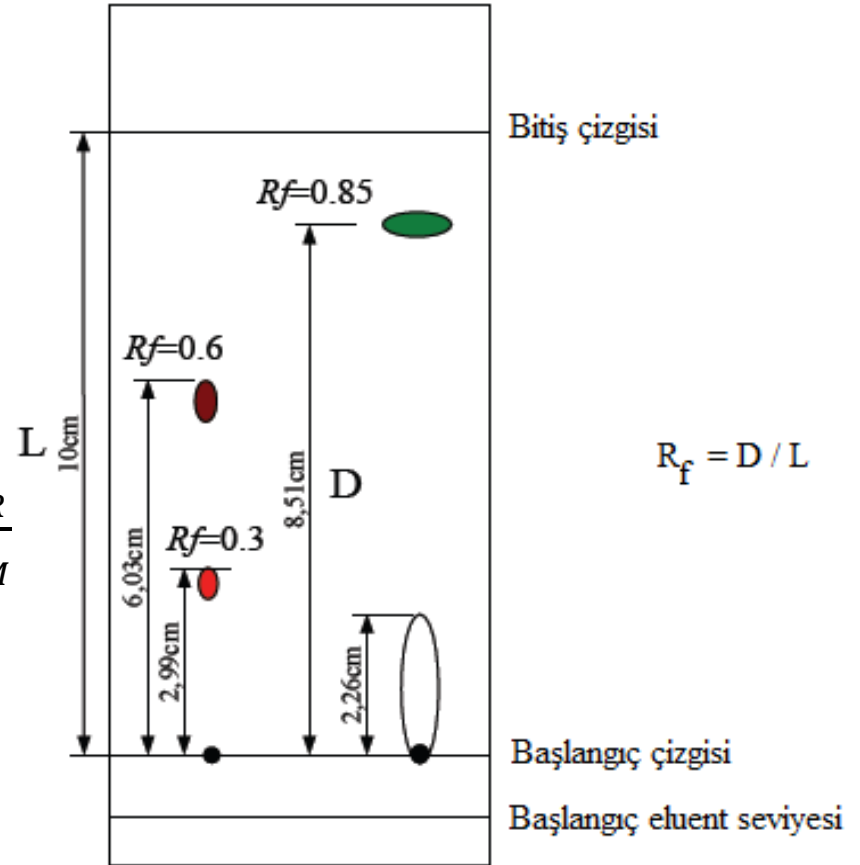
- ▶ Alıkonma faktörü farklı bileşenlerin kromatogramlarında
- ▶ a kromatogramında sadece 1 ve 2 maddesi k değerleri optimumdur (1-5)
- ▶ b kromatogramında şartlar sadece 5 ve 6 maddesini ayırmak için uygundur.
- ▶ c kromatogramında ise k değerleri sadece 3 ve 4 maddesini ayırmak için uygundur.
- ▶ Bu 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.

Düzlemsel kromatografi

Kağıt kromatografisi
İnce tabaka
kromatografisi

R_f = Yürüme oranı

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

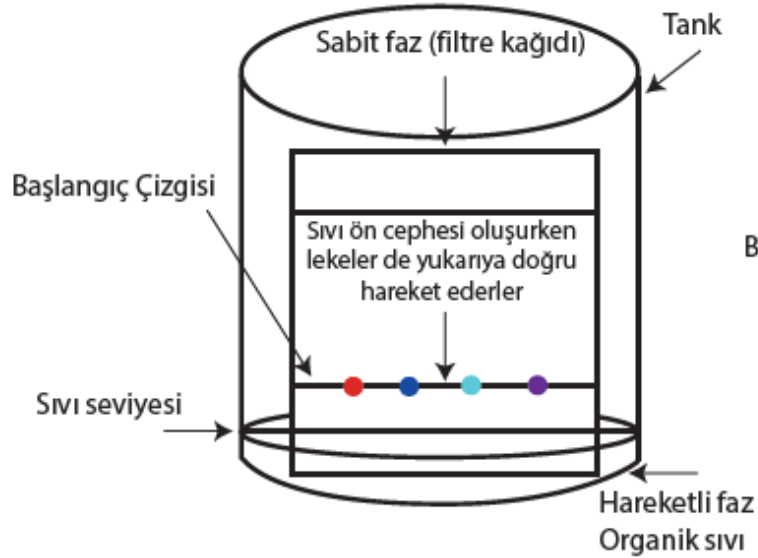


Kağıt Kromatografi

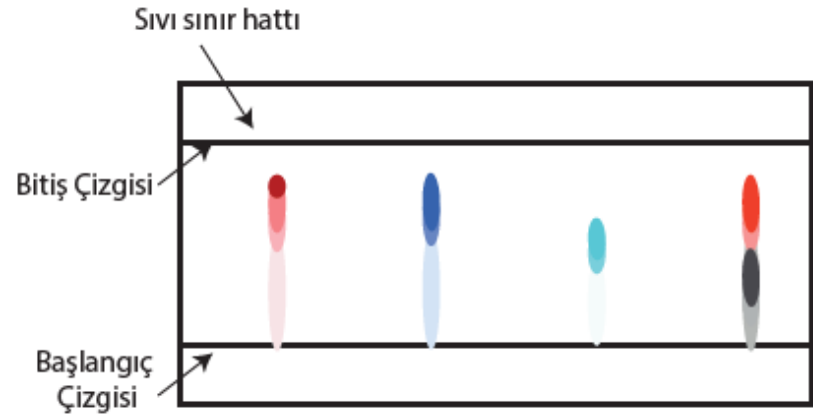
Kolon kromatografiden farklı olarak sabit faz, bir sütun halinde değil; yüzeye tutunmuş ince film halinde olabilir. Mesela kağıdı oluşturan selüloz ile su molekülleri arasında çok sağlam hidrojen bağları vardır. Oda şartlarında kağıt yüzeyi, her zaman ince bir su filmi ile kaplıdır. Bu durumda sabit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



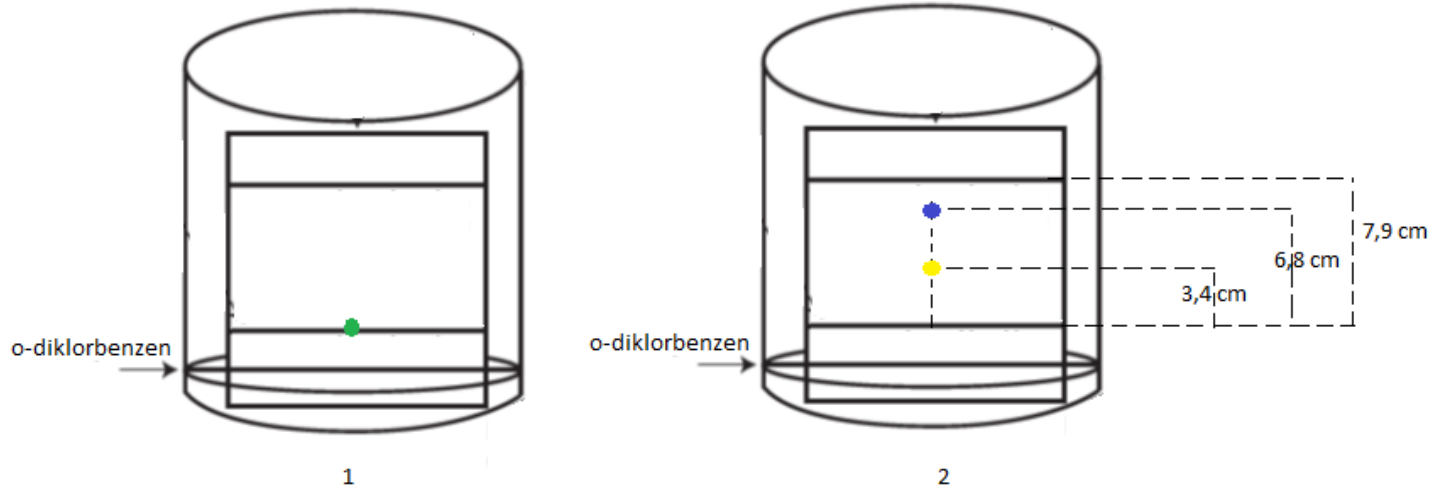
(a)



(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

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

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

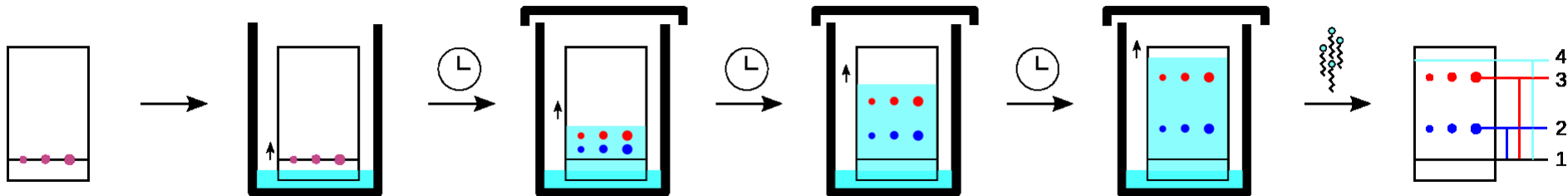
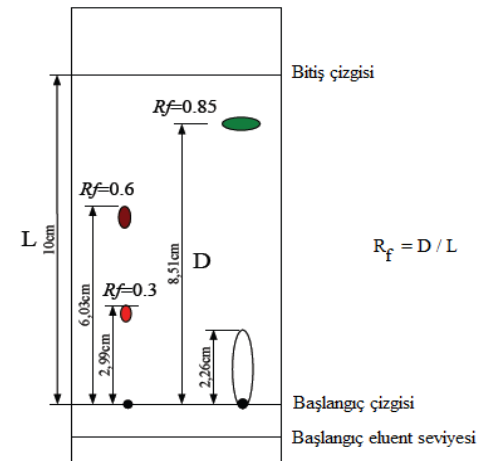
Olduğuna göre Çizelgedeki değerlerle karşılaştırıldığında

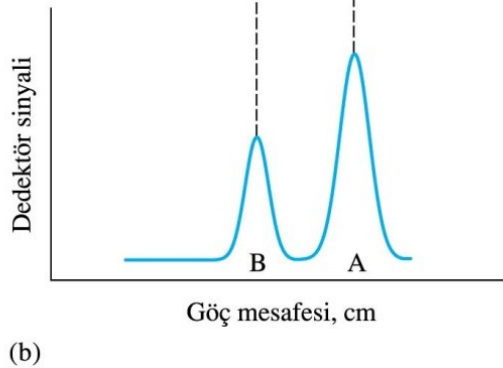
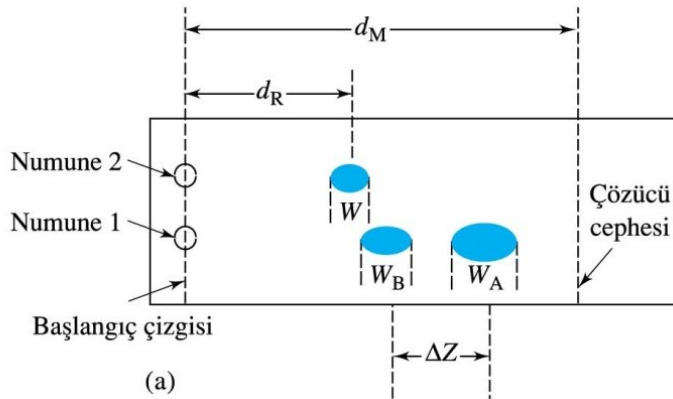
1. analit equilenin,

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.





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 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

$$t_M = d_R/u$$

$$t_R = d_M/u \text{ yazılır.}$$

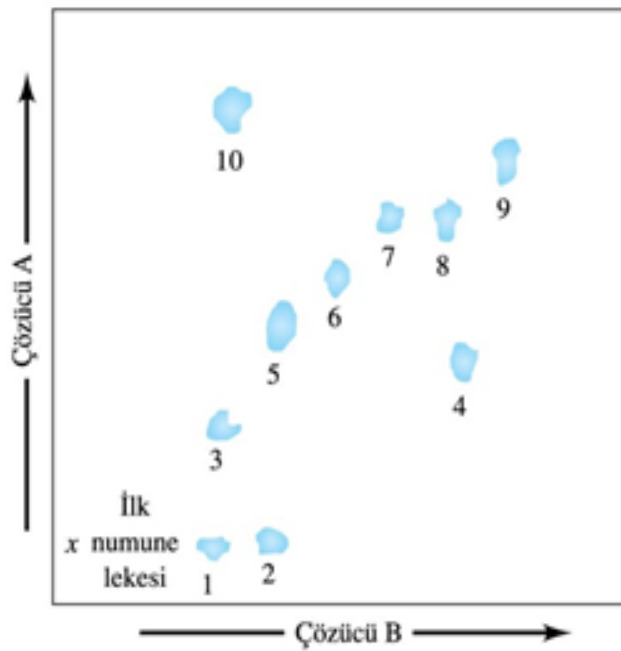
$$k = (d_M/u) - (d_R/u) / (d_R/u) = (d_M - d_R)/d_R$$

Bu değerleri alıkonma faktöründe yerine koyarsak;

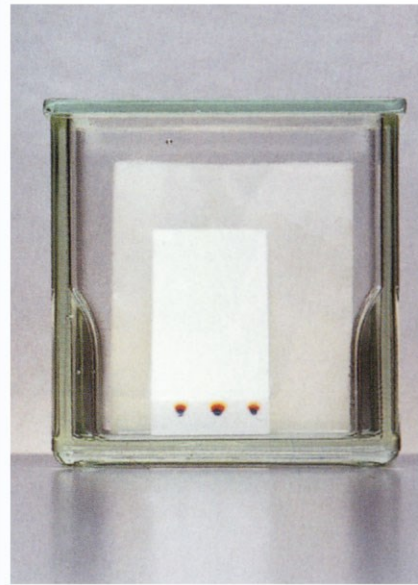
$$k = (d_M - d_R)/d_R = ((1/R_f) - 1)$$

Buradan

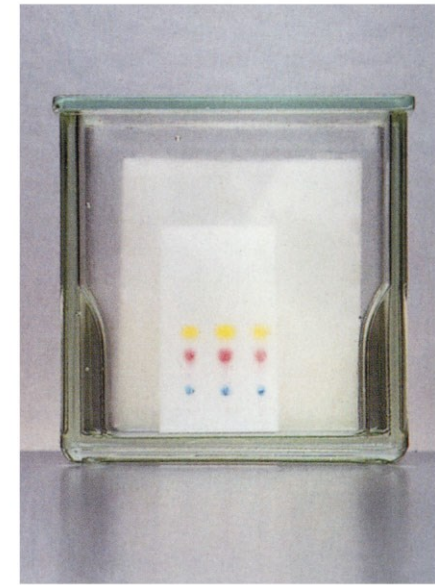
$$k = (1 - R_f)/R_f \text{ olur.}$$



Bazı amino asitlerin iki-boyutlu ince-tabaka kromatogramları (Silikajel). Çözücü: toluen/2-kloroetanol/pridin. Çözücü B: kloroform/benzil alkol/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.



(a)



(b)

Renkli Resim 28 İnce Tabaka Kromatografisi (Bölüm 24-1) Ayrılacak karışım, bir adsorplayıcı durgun faz ile kaplanmış bir plastik veya cam levhanın tabanına yakın yerde küçük noktalar halinde yerleştirilir. Levha, kapalı bir bölmede ve sıg bir çözücü havuzuna yerleştirildiğinde, sıvı kılcal hareket ile levhada yukarıya doğru hareket eder. Karışımın farklı bileşenlerinin durgun faz yüzeyinde ne kadar güçlü tutunduklarına bağlı olarak, bileşenler farklı derecelerde çözücü ile birlikte taşınırlar. Daha güçlü tutunan bir bileşen daha yavaş hareket eder. (a) Çözücü levhanın tabanına yakın bölgede bir boya karışımını geçerek yükselir. (b) Ayırma, çözücünün levhanın büyük bir kısmını tırmanmasından sonra başarıldı.

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 türlerini içermeye ihtimali olan madde ince tabaka kromatografisi ile analiz edilmiştir. 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. Numunedeki madde hangisidir?

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

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.

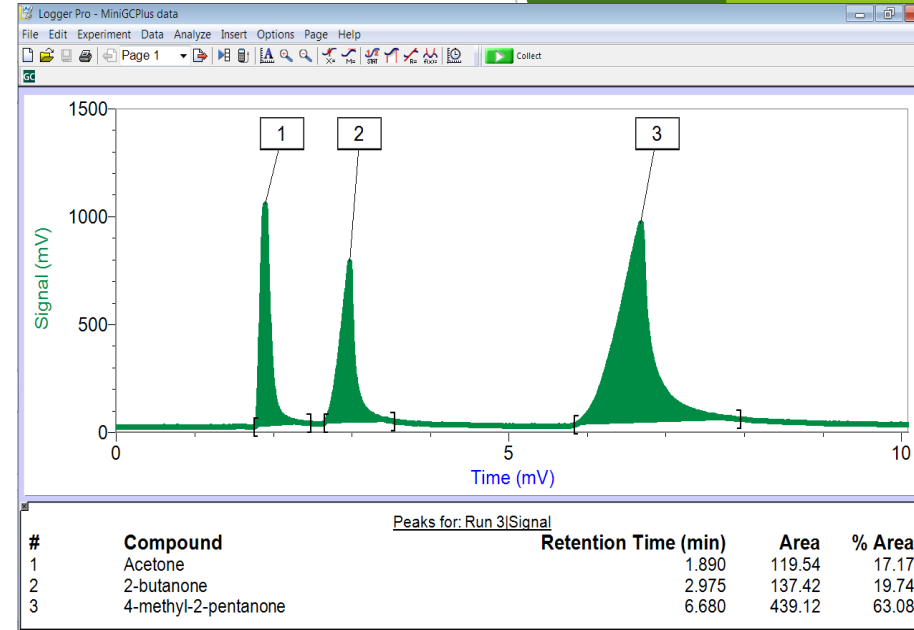
Bu durum kromatografinin kalitatif analizde başarısız bir yöntem olduğunu göstermez. İsimleri bilinen ve çoğunlukla bir arada bulunan bazı madde karışımlarının tanımlanması yapılabilir. Örneğin, bir protein hidroliz örneğinde 30 veya daha çok sayıdaki amino asidin varlığı veya yokluğu, ince tabaka kromatografisinde ayrılan maddelerin şiddetine göre saptanabilir. Yine de teşhisin kesin olması için ayrılan maddelerin spektral veya kimyasal tanımına gerek vardır. Karmaşık yapılı 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.



Toplam alan 696,08

$$1\text{-}\% \text{aseton} = 119,54 / 696,08 \times 100 = 17,17$$

$$2\text{-}2\text{-bütanon} = 137,42 / 696,08 \times 100 = 19,74$$

$$3\text{-}4 \text{ metil } 2.p = 439,12 / 696,08 \times 100 = 63,08$$

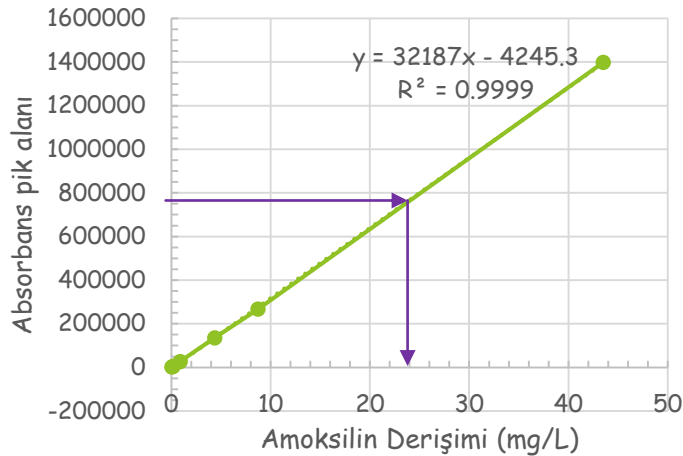
► Kalibrasyon grafiği yöntemi

- 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 oto örnekleyici kullanılarak giderilir.

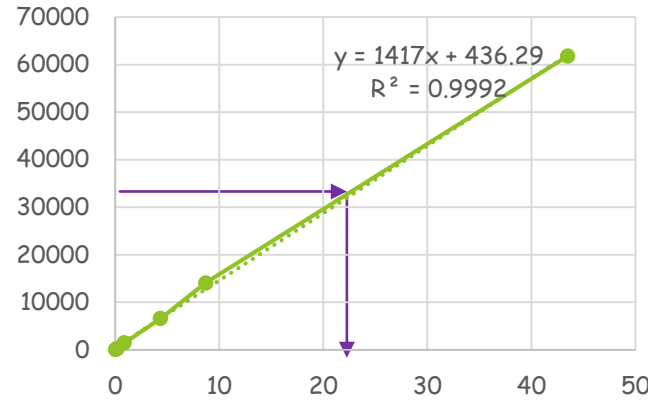
Bir antibiyotik ilacında amoksilin tayini için 1 g'lık tablet alınıp çözünürleştiriliyor. Çözelti 100 mL'ye tamamlanıyor. Bu çözeltiden alınan 0,275 mL örnek tekrar 100 mL ye seyreltiliyor. UV dedektörlü bir HPLC'de sinyali ölçülüyor, Ayrıca çeşitli derişimlerdeki standart çözeltilerin pik alanları ve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

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

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

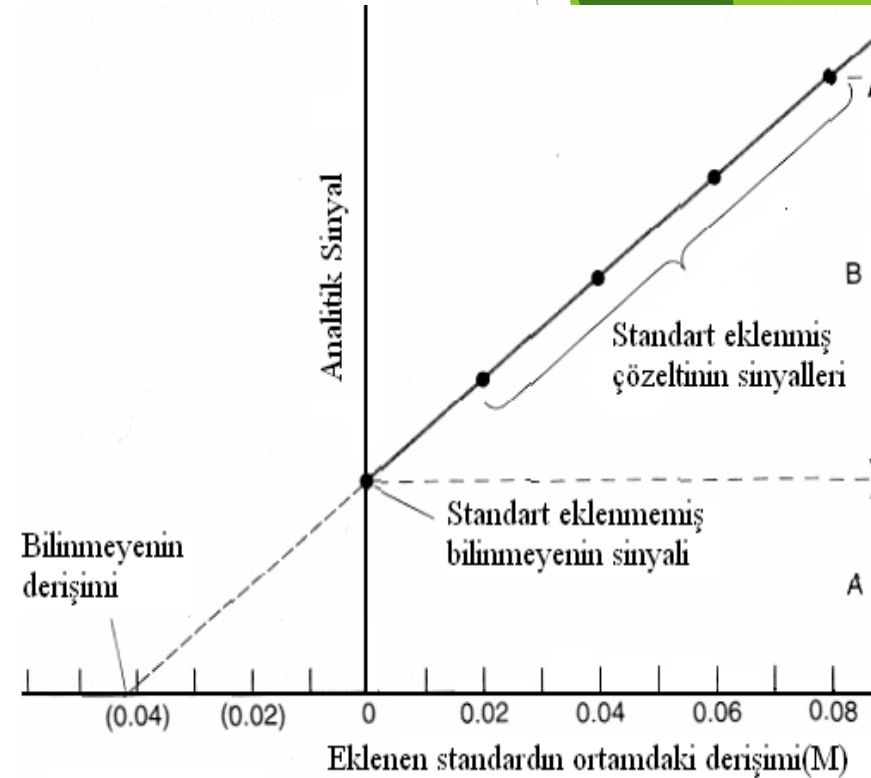
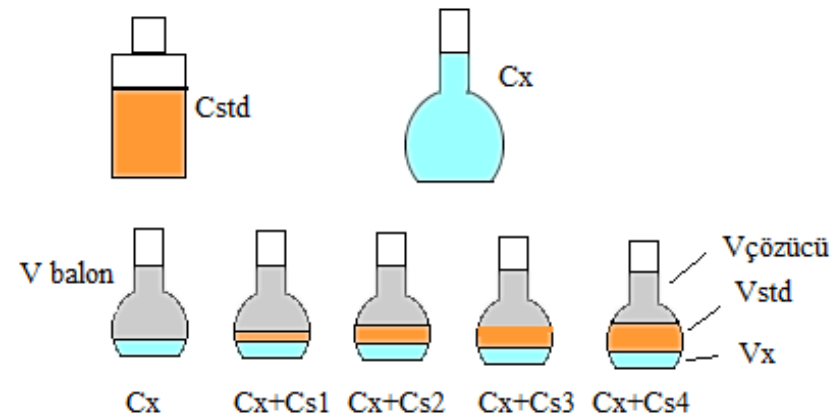
Standart Ekleme Yöntemi

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.)

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

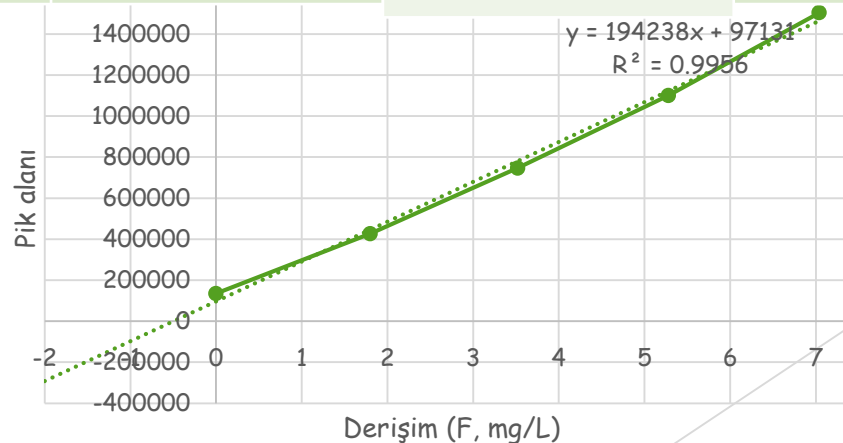
$$S_T = 0 \text{ için } -kC_x = kC_{\text{std}} \quad C_x = -C_{\text{std}}$$



Standart ekleme Yöntemi

Bir su numunesinde, Florür tayini yapılmak isteniyor, Bu amaçla 35,2 ppm F- içeren çözeltisinden çeşitli hacimlerde alınarak hazırlanan çözeltilerde iyon kromatografisi ile alınan pik alanları tabloda verilmiştir. Hazırlanan çözeltilerin son hacimleri 10 mL dir. Buna göre numunedeki florür derişimini ppm cinsinden bulunuz.

Eklenen Numune Hacmi (mL)	Toplam hacim (mL)	Eklenen standart hacmi (mL)	Eklenen ortamdaki derişimi (ppm)	Alıkonma zamanı (min)	Pik alanı
5	10	0,0	0,0	2,5	135235
5	10	0,5	$0,5 \times 35,2 / 10 = 1,8$	2,8	426313
5	10	1,0	$1 \times 35,2 / 10 = 3,52$	2,15	746095
5	10	1,5	5,28	2,46	1100673
5	10	2,0	7,04	2,41	1503699



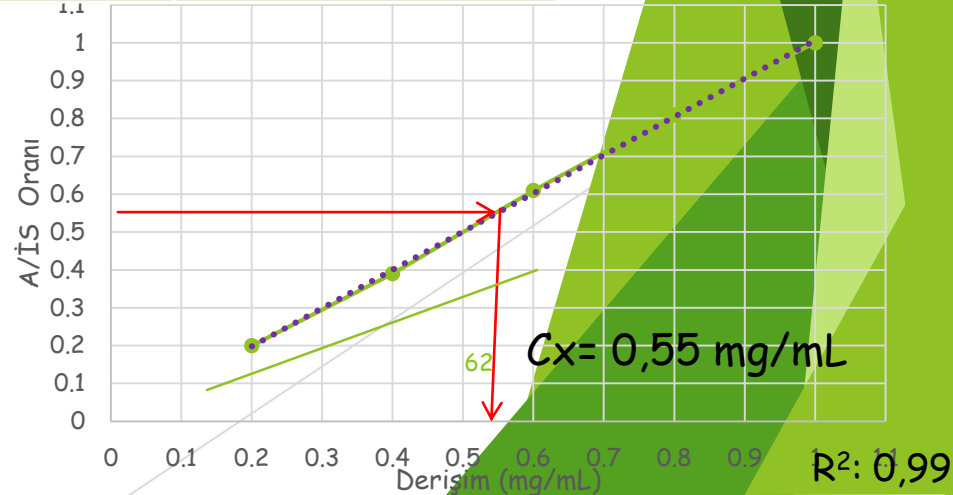
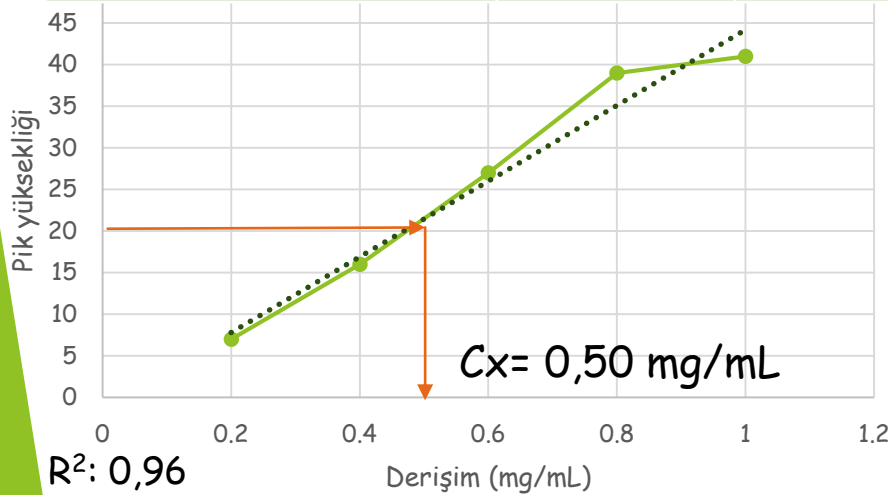
Grafikten bulunan değer 0, 5 ppm dir.
2 kat seyrelmeden dolayı, Numunedeki florür derişimi : 1,0 ppm bulunur.

- **İç Standart Ekleme Yöntemi**
- Kantitatif amaçla, kromatografide en hassas sonuçlar örnek enjeksiyonundan kaynaklanan hataların giderildiği iç standart ekleme 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.

İzobütirik asit içeren bir numunenin kromatografik tayininde; bütün asit iç standart olarak kullanılarak aşağıdaki sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre numunedeki analit derişimi nedir. Bütün standart çözeltile ve numuneye 2 mg/mL bütirik asit eklenmiştir.

Standart çözelti derişimi (mg/mL)	Sinyal Pik yükseklikleri (mm)		
	Analit	İç standart	Pik yüksekliği (A/İS)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

$$\%Hata = \frac{(0,50 - 0,55)}{0,55} \times 100 = -\%9,1$$



- **Alan Normalizasyonu Yöntemi**
- Örnek enjeksiyonundaki düzensizliğin yarattığı hata alan normalizasyonu ile de giderilebilir. Bu yöntemde örnekteki tüm maddelerin kolondan çıkması gerekir. Kromatogramdaki tüm piklerin alanları hesaplanır ve her madde için bilinen dedektör algılama faktörü ile çarpılarak düzeltilir. Analitin konsantrasyonu, analit pikine ait alanın toplam pik alanlarına bölünmesiyle hesaplanır. Aşağıda bu yöntemdeki hesaplamalara bir örnek verilmiştir.

ÖRNEK Bir seri bütıl alkol karışımındaki bileşenlerin kromatografik tayini yapılmak isteniyor. Bilinen derişimlerde bütık alkol karışımı hazırlanarak kromatogramları alınıyor. İlk tablodaki veriler normal, sekonder, izo, tersiyer bütıl alkol karışımı içeren örneğin kromatogramından alınmıştır. Derişimi bilinmeyen karışımındaki bütıl alkoller için Z sütunundaki veriler elde edilmiştir. Aşağıdaki verileri kullanarak her bir alkolün kütlece yüzdesini hesaplayınız. (1. tablo standart çözelti, 2. tablo bilinmeyen numune için elde

Alkol	Alınan Kütle, g	Kütlece % alkol	Pik alanı, A, cm ²	Kütlece % /Alan	Bağıl cevap Faktörü, F
n-bütıl	0,1731	(0,1731/0,7035)X 100=24,61	3,023	24,61/3,023= 8,141	8,141/8,141= 1,000
i-bütıl	0,1964	27,92	3,074	27,92/3,074 =9,083	9,083/8,141= 1,116
s-bütıl	0,1514	21,52	3,112	21,52/3,112= 6,915	6,915/8,141 = 0,849
t-bütıl	0,1826	25,96	3,004	25,96/3,004= 8,642	8,642/8,141 = 1,062
Toplam	0,7035	100	12,213		

Alkol	Pik alanı, A, cm ² (Z)	AlanxF	Kütlece % alkol
n-bütıl	1,731	1,731X1,0= 1,731	(1,731/9,521)x100= 18,18
i-bütıl	3,753	3,753x1,116= 4,188	(4,188/9,521)x100= 43,99
s-bütıl	2,845	2,845x0,849 = 2,415	(2,415/9,521)x100 = 25,36
t-bütıl	1,117	1,117x1,062 = 1,186	(1,186/9,521)x100 = 12,46
Toplam		9.521	100

- **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)

$$a) k'_M = K_M \cdot V_S/V_M = 6,01 \cdot 0,422 = 2,54 \quad \alpha = (t_R(B) - t_M)/(t_R(A) - t_M) = k(B) \cdot t_M / k(A) \cdot t_M$$

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

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

- c) denklemden N çekilir ve değerler yerine yazılırsa

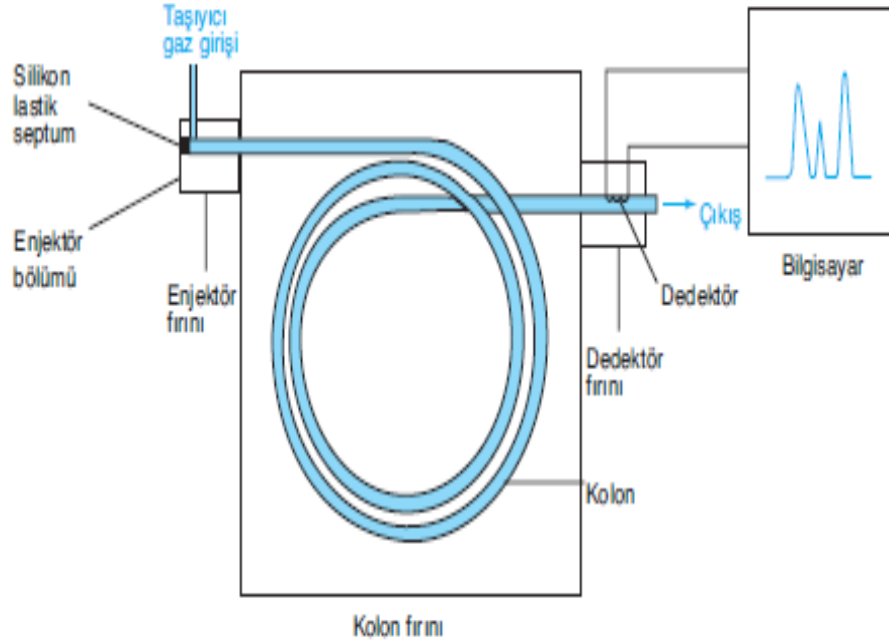
$$\sqrt{N} = 4R_s \left(\frac{\alpha}{\alpha-1} \right) \left(\frac{1+k'_N}{k'_N} \right) = \sqrt{N} = 4 \cdot 1,5 \left(\frac{1,03}{1,03-1} \right) \left(\frac{1+2,62}{2,62} \right) N = 81000 \text{ bulunur.}$$

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

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

Denklemden $(t_R)_N = 91$ min çıkar.

GAZ KROMATOGRAFİSİ



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.

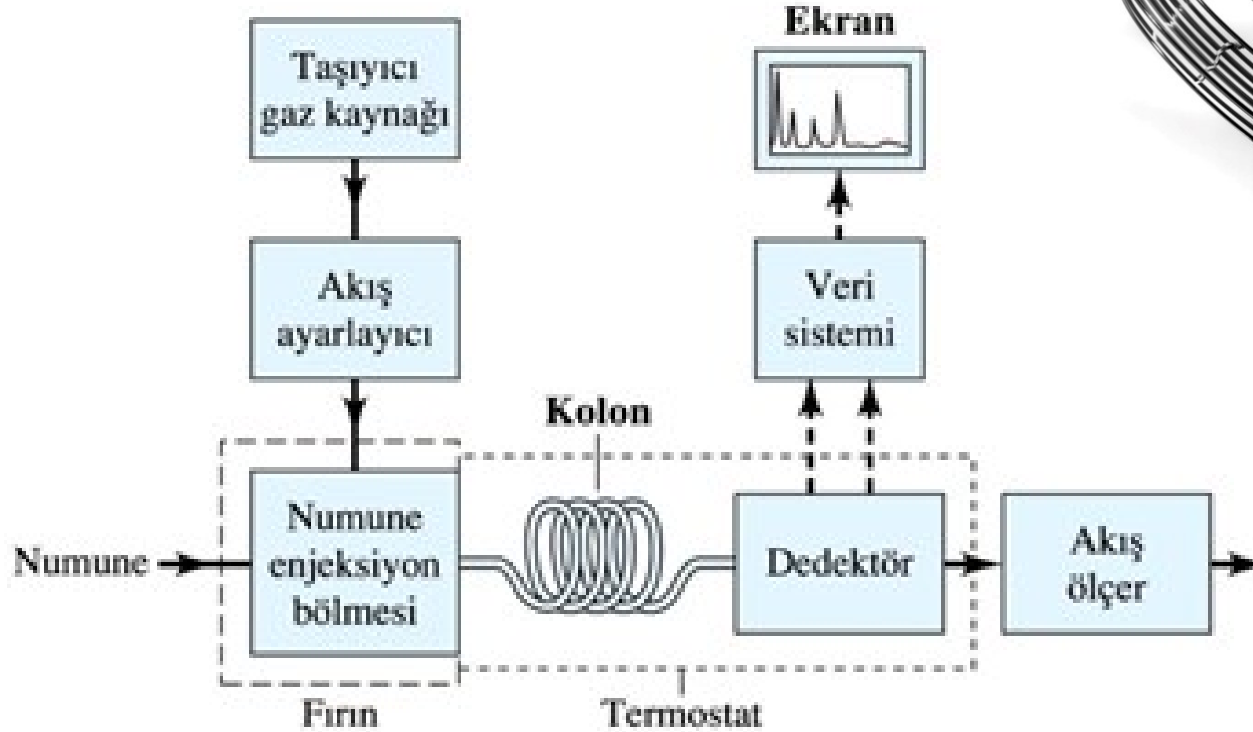
Kolon, analitlerin kabul edilebilir bir sürede kolondan geri alınması (elue edilmesi) için yeterli buhar basıncını sağlayacak kadar sıcak olmalıdır.

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.
- Sabit faz genellikle 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.
- Gaz-katı kromatografisinde sabit faz katı bir maddedir; bu nedenle de dağılma işlemi gaz adsorbsiyon dengesine göre olur.
- Gaz-sıvı kromatografisinde (GLC) sabit faz, inert bir katı destek üzerinde tutturulmuş bir sıvıdır; burada gaz-sıvı dengesi önemlidir.

GAZ KROMATOĞRAFİSİ CİHAZI



Tipik bir gaz kromatografi cihazının blok diyagramı.

- 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.
- $V_R = t_R \cdot F$ $V_M = t_M \cdot F$
- Bir maddenin alıkonma hacmini bulmak için kolon içindeki ortalama hacimsel 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 hacimsel akış hızı F_m ile ortalama hacimsel 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 su buharı basıncını çıkarmak gerekir)



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

Alıkonma Hacmi

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

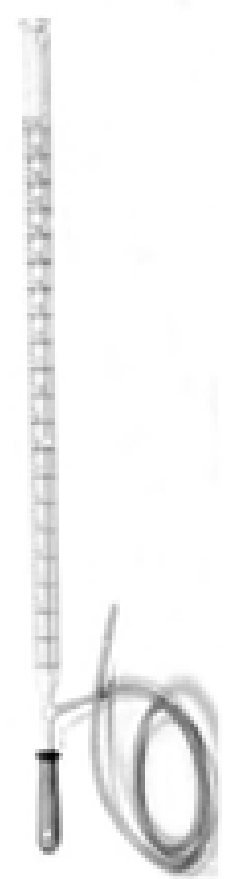
$$V_R = t_R \cdot F \quad V_M = t_M \cdot F$$

Kromatografik yöntemlerde bir maddenin alıkonma hacmi V_R , maddenin ve sabit fazın yapısına bağlı olan fakat kolon değişkenlerine bağlı olmayan bir değişkendir. V_R , kolaylıkla elde edilebilen deneysel verilerden bulunur ve nitel analizlerde kullanılır. Burada V_R ; tutunan maddenin alıkonma hacmini, V_M ; hareketli fazın alıkonma hacmini gösterir. 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 (Şekil 1) ile belirlenebilir; Bu akış ölçerlerde gaz su ile doymuştur. Ölçülen akış hızı F_m ile ortalama akış hızı (F) arasında aşağıdaki bağıntı vardır.

$$F = F_m \times T_c T \times P - P_{H_2O}$$

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 basıncını gösterir. (Gaz basıncını düzeltmek için su buharı basıncını çıkarmak gerekir).

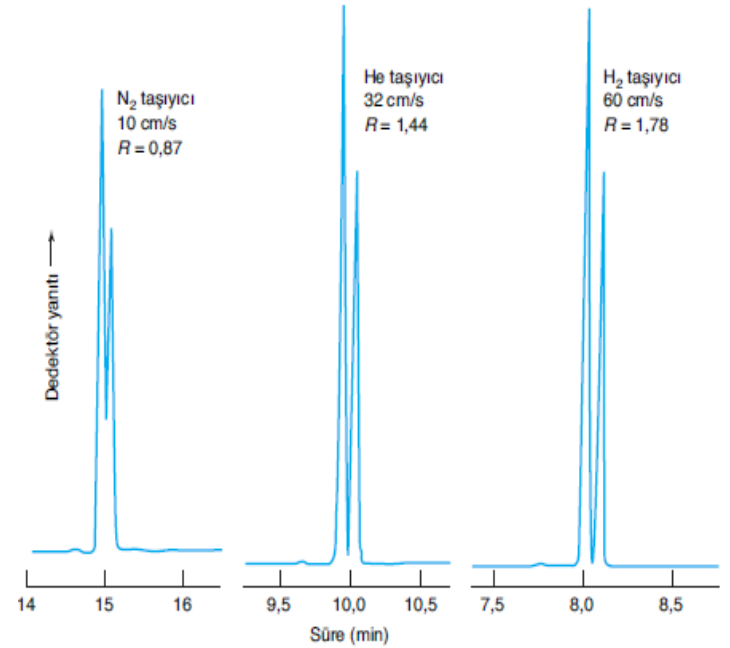


Şekil 1 Sabun köpüklü akış ölçer

► 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.

Prof.Dr. Mehmet Sayım KARACAN



Şekil. İki poliaromatik hidrokarbonun açık borulu kolonda farklı taşıyıcı gazlarla ayrılması

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 verilebil-mesi önemlidir; enjeksiyonun yavaş yapılması veya gereğinden fazla madde verilmesi band yayılmasına ve ayırmanın kötü olmasına yol açar.

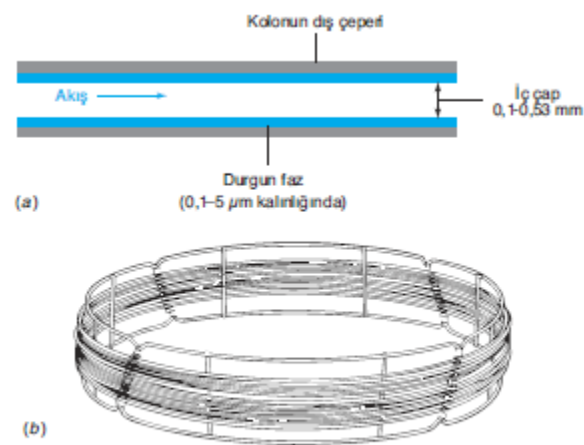
Gaz kromatografisinde örnek enjeksiyonu örneğin yapısına göre değişir. En iyi kolon performansının elde edilebilmesi için verilen örneğin hacmi en düşük düzeyde tutulmalıdır. Ayırma gücü kaybı ve band genişlemesi olmaması için örneğin kolona girişi bir buhar 't'ıpasından verilmelidir.

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 mikroşiringa seti (Hamilton Company'in izniyle).

► Kolonlar



ŞEKİL 23-2 (a) Açık boru tipi gaz kromatografisi kolonunun tipik boyutları. (b) 0,2 m kafes çaplı ve 15 - 100 m kolon uzunluklu erimiş silika kolonu. (c) çeperi kaplı, destek kaplı ve gözenekli-tabaka kolonlarının en kesit görünümü.

- Gaz kromatografisinde
- Dolgulu kolonlar
- Açık boru kolonlar kullanılır. Bu kolonlar, 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.

Açık Boru Tipi kolonlar

Analizlerin büyük bir çoğunluğu erimiş silikadan (SiO_2) yapılan, destek sağlama ve atmosferik nemden koruma

için poliimid (350 °C'a dayanabilen bir plastik) ile kaplanan, uzun, dar **açık boru tipi kolonlar** kullanılır.

Açık boru tipi kolonlar dolgulu kolonlardan daha yüksek ayırma gücü, daha kısa analiz süresi ve daha büyük duyarlık sağlarlar, fakat daha az örnek kapasitesine sahiptirler.

Çeperi kaplı kolon, kolonun iç çeperinde 0,1 - 5 μm kalınlığında durgun sıvı faz içerir.

Bir destek-kaplı kolon, iç çepere tutturulmuş ve durgun sıvı fazla kaplanmış katı parçacıklara sahiptir.

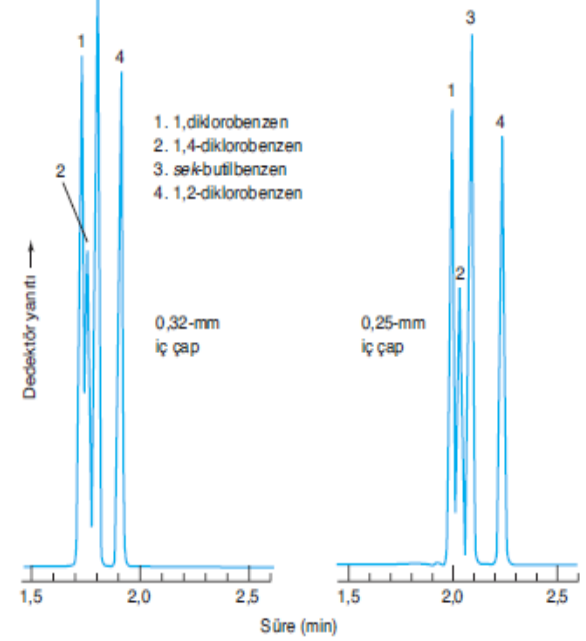
Gözenekli-tabaka kolonunda, katı parçacıklar etkin durgun fazdır. Büyük yüzey alanlarıyla destek-kaplı kolonlarda, çeperi kaplı kolonlara göre daha çok örnek kullanılabilir. Destek-kaplı kolonların performansı, çeperi kaplı kolonlar ile dolgulu kolonların performansları arasındadır.



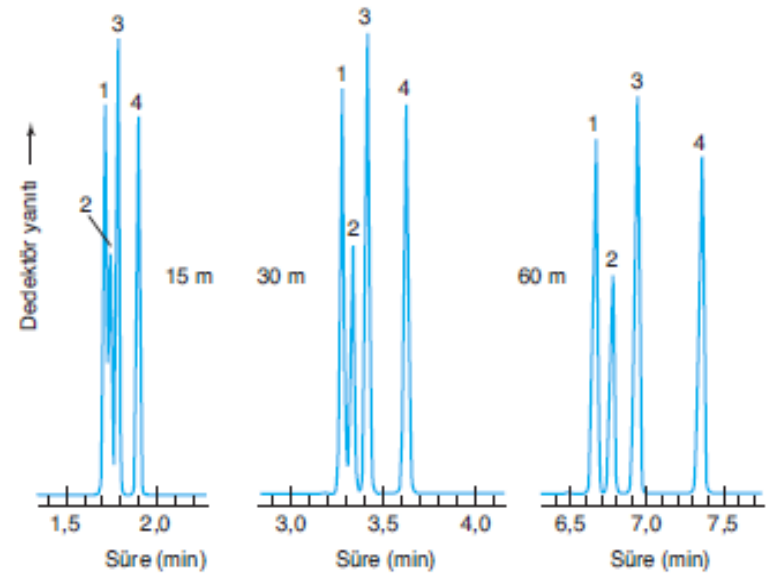
Kolon iç çapları tipik olarak 0,10 – 0,53 mm ve uzunlukları, 30 m yaygın olmak üzere, 15 – 100 m'dir. Dar kolonlar daha geniş kolonlardan daha yüksek ayırma gücü sağlarlar (yandaki şekil) , fakat daha yüksek işlem basıncı gerektirirler ve daha düşük örnek kapasitesine sahiptirler.

0,32 mm'ye eşit veya daha büyük çaplar bir kütle spektrometresinin vakum sistemini aşırı yükleme eğilimindedir, dolayısıyla gaz akımı bölünmeli ve sadece bir kısmı spektrometreye gönderilmelidir.

0,32 mm iç çaplı kolonda kolon boyu artırılarak tabaka sayısı artırılıp ayırma iyileştirilir. N, aynı zamanda Ayırma gücü ile ve dolayısıyla kolon uzunluğunun karekökü ile orantılıdır (alttaki şekil)



ŞEKİL 23-4 Açık boru tipi kolon iç çapının ayırma gücü üzerine etkisi. Daha dar kolonlar daha yüksek ayırma gücü sağlarlar. Dar kolondaki 1 ve 2 piklerinin artmış ayırma gücüne dikkat ediniz. Koşullar: 34 cm/s'lik He doğrusal hızıyla 95 °C'ta çalıştırılan 15 m çeperi kaplı kolonda DB-1 durgun fazı (kalınlık 0,25 µm). [Courtesy J&W Scientific, Folsom, CA]



► Dolgulu Kolonlar

- **Dolgulu kolonlar**, uçucu olmayan sıvı durgun fazla kaplanmış katı desteğin ince parçacıklarını içerir veya katının kendisi durgun faz olabilir. Açık boru tipi kolonlara kıyasla, dolgulu kolonlar daha büyük örnek kapasitesi sağlarlar, fakat daha geniş pikler, daha uzun alıkonma süreleri ve daha az ayırma gücü verirler (Şekil 23-8'i Şekil 23-3 ile kıyaslayınız). Düşük ayırma gücüne karşın, dolgulu kolonlar oldukça fazla durgun faz gerektiren preparatif ayırmalar için veya zayıfça alıkonan gazları ayırmak için kullanılırlar.

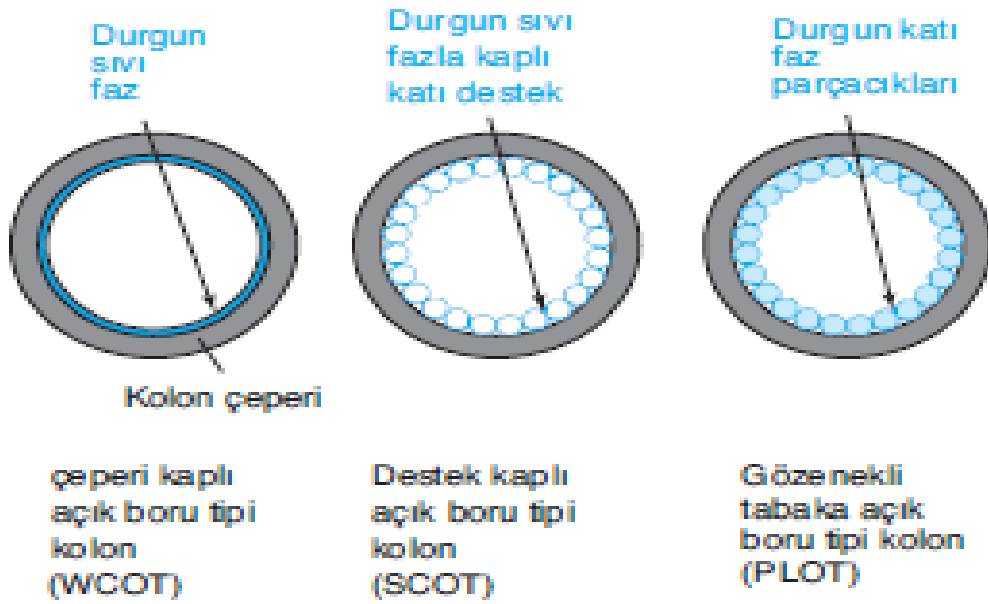
Dolgulu kolonlar genellikle paslanmaz çelik veya camdan yapılırlar ve tipik olarak 3 - 6 mm çapında ve 1 - 5 m uzunluğundadırlar.

Katı destek, sıklıkla, polar çözünenlerle olabilecek hidrojen bağıni azaltmak için, *silanlanmış* silikadır. Güçlüce bağlanan çözünenler için Teflon yararlı bir destektir, ancak $<200\text{ }^{\circ}\text{C}$ 'la sınırlıdır.

Bir dolgulu kolonda, tekdüze parçacık boyutu van Deemter eşitliğindeki (22-23) çoklu yol terimini azaltır, dolayısıyla tabaka yüksekliğini düşürür ve ayırma gücünü artırır. Bunlar katlanmış veya sarımlar şeklindedir, böylece termostat içine sığabilecek boyutlara getirilmişlerdir. 100-1000 teorik tepsi bulunur. En iyi dolgulu kolondaki teorik tabaka sayısı 20000 veya daha fazladır.

► 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 doymuş 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



ÇİZELGE 27-2 Tipik GC Kolonların Özellik ve Nitelikleri

	Kolon Tipi			
	FSWC*	WCOT [†]	SCOT [‡]	Dolgu
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 bolusal kolon

[†]Çeperi kaplı açık borusal kolon

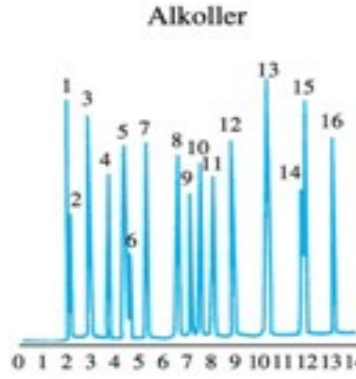
[‡]Destek kaplı açık borusal kolon (gözenekli tabaka açık borusal, PLOT olarak da anılır).

ÇİZELGE 27-3 GLC için Bazı Yaygın Sıvı Durgun Fazlar

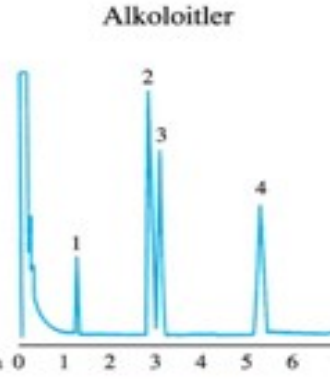
Durgun Faz	Genel Ticari Adı	En Yüksek Sıcaklık, °C	Genel Uygulamaları
Polidimetil siloksan	OV-1, SE-30	350	Genel amaçlı apolar faz, hidrokarbonlar, polinükleer aromatikler; ilaçlar; steroidler, PCB'ler
%5 Fenil-polidimetil siloksan	OV-3, SE-52	350	Yağ asidi metilesterleri, alkaloidler, ilaçlar, halojenli bileşikler
%50 Fenil-polidimetil siloksan	OV-17	250	İlaçlar, steroidler, pestisitler; glikoller
%50 Trifloropropil-polidimetil siloksan	OV-210	200	Klorlanmış aromatikler, nitroaromatikler, alkil sübstitüe 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 pridin alıkonma indisleri, aynı solventlerin squalane üzerinde gösterdiği alıkonma indisleri ile kıyaslanır.

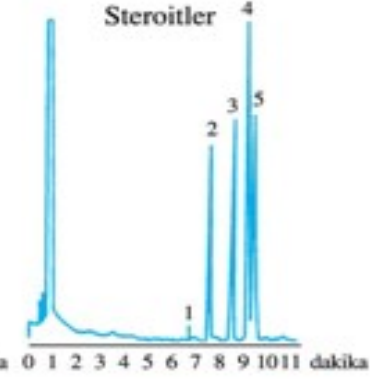
Sonuçta elde edilen verilerle, sabit fazlar sınıflandırılır. Yine de bir ayırma işleminde kullanılacak sabit fazlar arasında deneme⁷⁹ ile en uygunu seçilmelidir. Tabloda çok kullanılan bazı sabit sıvı fazların listesi verilmiştir.



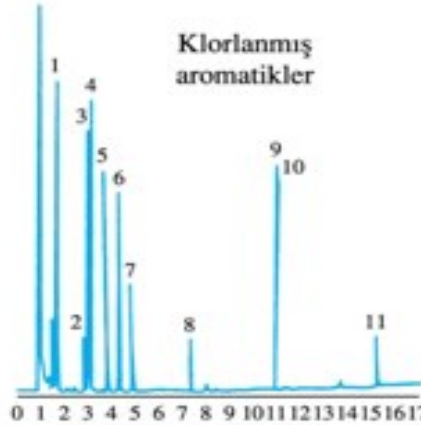
(a)



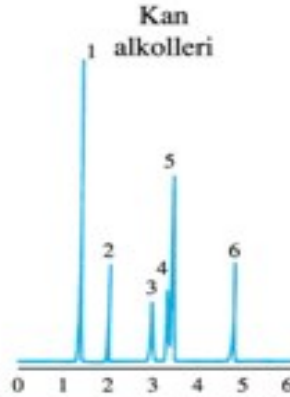
(b)



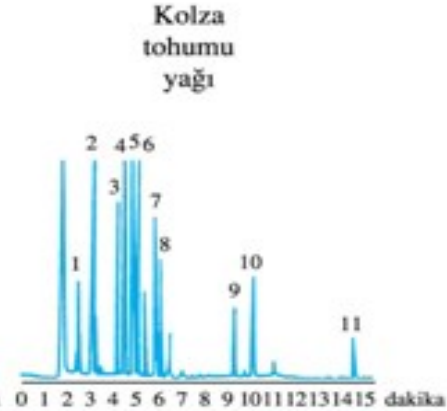
(c)



(d)



(e)



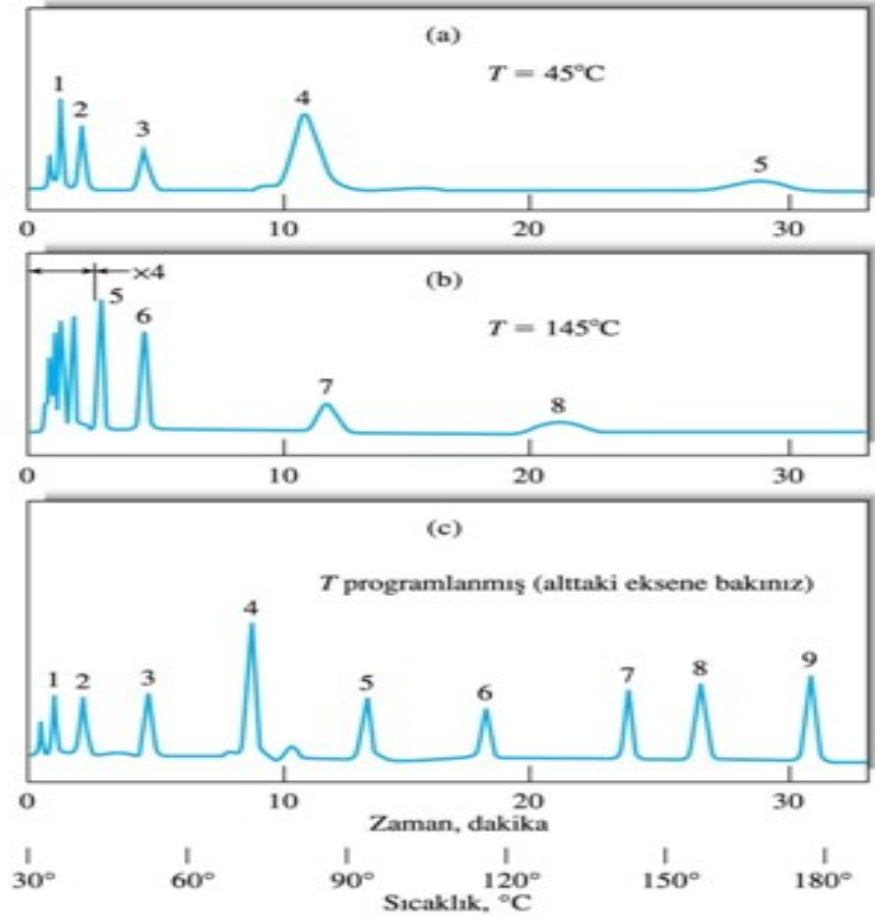
(f)

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

Kolon Sıcaklığının Kontrolü

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.

Prof.Dr. Mehmet Aydın KARACAN



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.

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

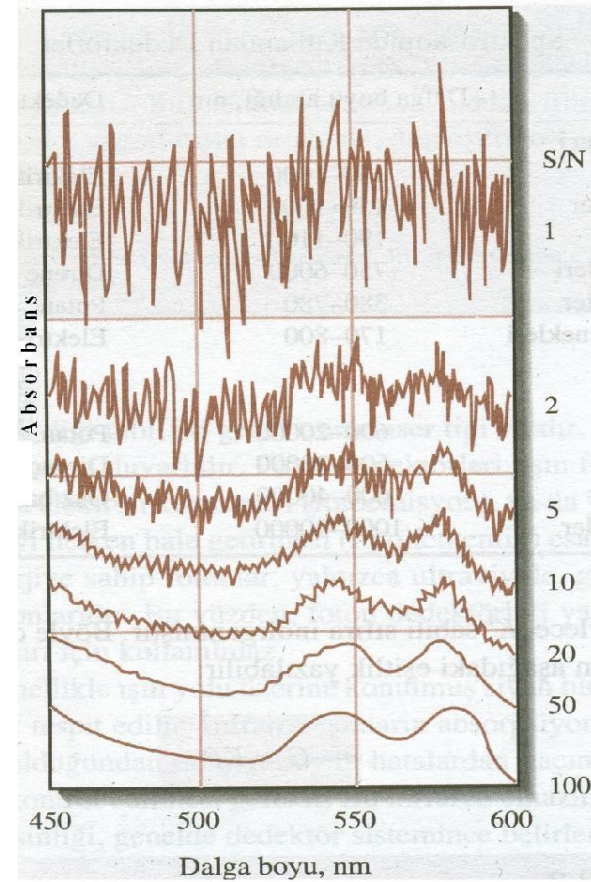
Oda sıcaklığından 400 °C'ye kadar çalışabilme

Akış hızından bağımsız cevap süresi

Yüksek güvenilirlik ve kullanım kolaylığı

Her türden analite benzer cevap vermesi

Numuneyi parçalamama



Gürültü: Analitik cihazlardan elde edilen sinyal, kontrolü mümkün olmayan pek çok değişkenin etkisiyle rastgele şekilde dalgalanır. Cihazın duyarlığını azaltan bu dalgalanmalara gürültü denir. Yandaki şekilde Hemoglobinin farklı S/G oranlarında elde edilmiş absorpsiyon spektrumları gösterilmektedir.

LOD: Gözlenebilme sınırı (Limit of detection) Zemin gürültüsünden farklı olarak tespit edilen fakat miktarı belirlenemeyen en küçük analit derişimidir.

LOQ: Tayin sınırı (Limit of quantification): Uygun doğruluk ve kesinlikle miktarı saptanabilen en küçük derişimdir.

S: Sinyal (Absorbans veya emisyon şiddeti)

$$S_{LOD} = S_b + k\sigma_b$$

$$S_{LOD} = S_b + 3\sigma_b \quad (\%95 \text{ olasılıkla gözlenebilir sinyal})$$

S_b = Boş çözeltinin (tanık ya da kör) sinyali

σ_b = Boş çözeltinin (tanık) standart sapması

Kalibrasyon grafiğı çizildiğinde,

(Sinyale karşı derişim grafiğı)

Doğru denklemi;

$$S = mC + S_b \quad (C = \text{derişim}, m = \text{eğim})$$

Buradan,

$$S_{LOD} = m C_{LOD} + S_b \quad \text{aynı zamanda} \quad S_{LOD} = S_b + 3\sigma_b$$

$$S_{LOD} = m C_{LOD} + S_b = S_b + 3\sigma_b$$

$$m C_{LOD} + S_b = S_b + 3\sigma_b$$

$$\text{Dolayısıyla; } m C_{LOD} = 3\sigma_b$$

$$C_{LOD} = 3\sigma_b / m \quad \text{Aynı şekilde Tayin sınırı } k=10 \text{ için}$$

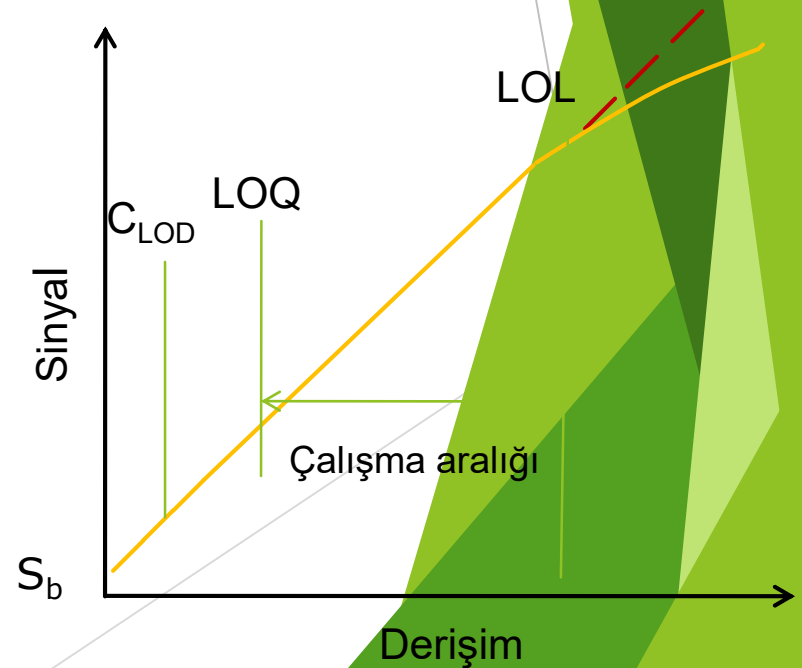
$$C_{LOQ} = 10\sigma_b / m$$

Duyarlık = dS/dC

Analit derişimindeki küçük farkları ayırtedebilme özelliğı

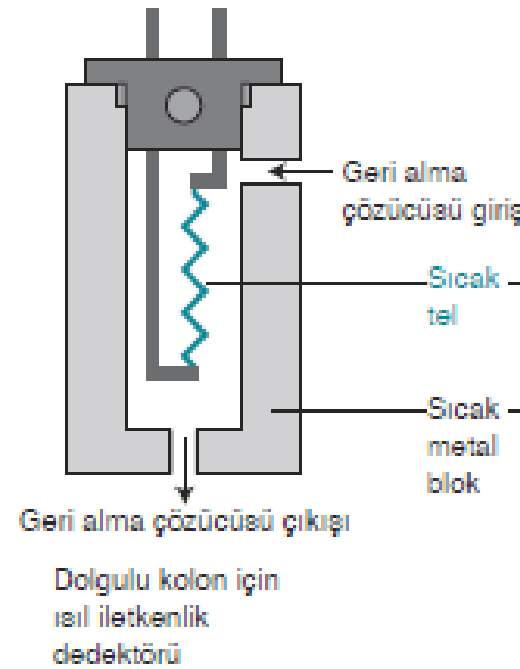
Kalibrasyon duyarlığı = m

Analitik duyarlık = m/s_s



► 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

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

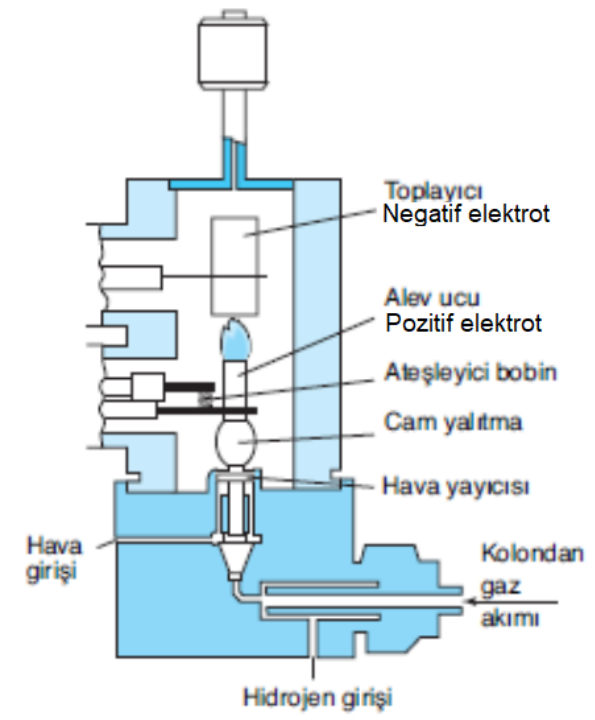
ile verilir. Burada κ ısıl iletkenlik [birimler = J/(K · m · s)] ve dT/dx sıcaklık gradyentidir (K/m). Difüzyon katsayısı kütle akışı olduğu gibi, ısıl iletkenlik de enerji akışıdır.

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 kütleye 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.



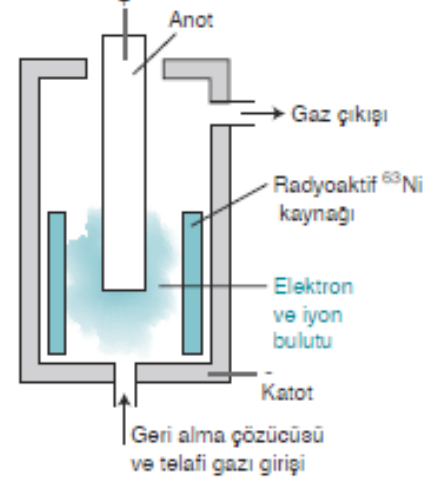
Tipik bir alev iyonlaşma dedektörü

► Elektron Yakalama Dedektörü

► Alev iyonlaşma ve ısı iletkenlik dışında çoğu dedektörler sınırlı analit türlerine yanıt verir. **Elektron yakalama dedektörü** halojen içeren moleküllere, eşlenik karbonillere, nitrillere, nitro bileşiklerine ve organometalik bileşiklere özellikle duyarlıdır, fakat hidrokarbonlara, alkollere ve ketonlara nispeten duyarsızdır.

► Taşıyıcı gaz ya N_2 ya da Ar içinde %5 metan olmalıdır. Nem, duyarlılığı azaltır. Dedektöre giren gaz radyoaktif ^{63}Ni içeren folyodan yayılan yüksek enerjili elektronlarla ("β-ışınları") iyonlaştırılır.

► Böylece plazmada oluşturulan elektronlar, katot ve anot arasında uygulanan değişken frekanslı pulslarla sabit bir düzeyde tutulan küçük bir akım üreterek, bir anoda çekilir. Yüksek elektron ilgili analitler dedektöre girdiği zaman, bazı elektronları yakalarlar ve plazmanın iletkenliğini düşürürler. Dedektör sabit bir akımı sürdürmek için voltaj pulslarının frekanslarını değiştirerek yanıt verir. Pulsların frekansı dedektör sinyalıdır. Elektron yakalama dedektörü, kütle spektrometrik seçilmiş iyon izlemeninkine yakın bir gözlenebilme sınırıyla, son derece duyarlıdır.



ŞEKİL 23-19 Elektron yakalama dedektörü.

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

► 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 standardın 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 analitinin 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 İndeksi (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.

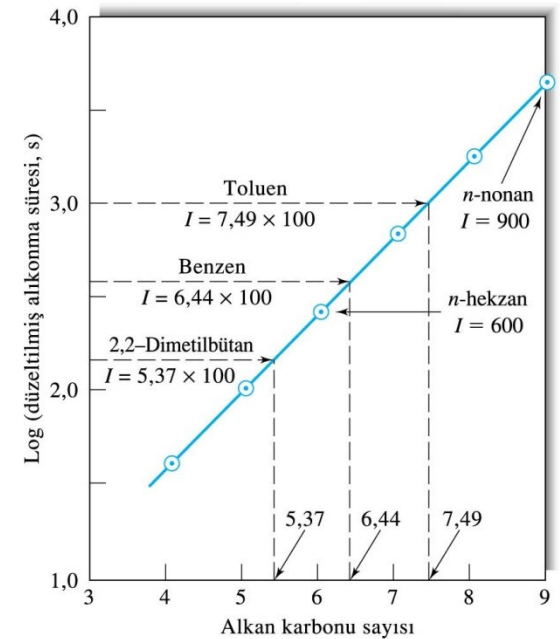
Homolog bir seride bulunan maddelerin alıkonma zamanlarının (veya hacimlerinin) logaritmaları t'_R ($t'_R = t_R - t_M$) bu maddelerin içerdikleri karbon sayısı ile doğrusal bir ilişki gösterir. Bunun sonucu olarak da n-parafinlerde ($t_R - t_M$) değerlerinin alıkonma zamanlarına göre çizilen grafiği 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 v $t'_R = (t_R - t_M)$ ye eşittir. X analiti, n ve (n+1) karbon sayısına gören-parafinleri belirtir. Hidrokarbonları alıkonma süreleri analitin alıkonma süresini için alacak şekilde seçilir.

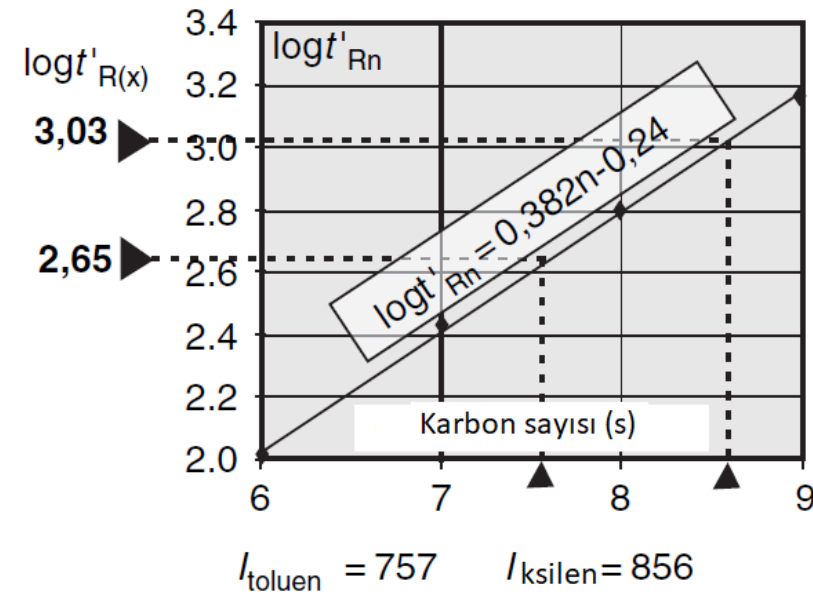
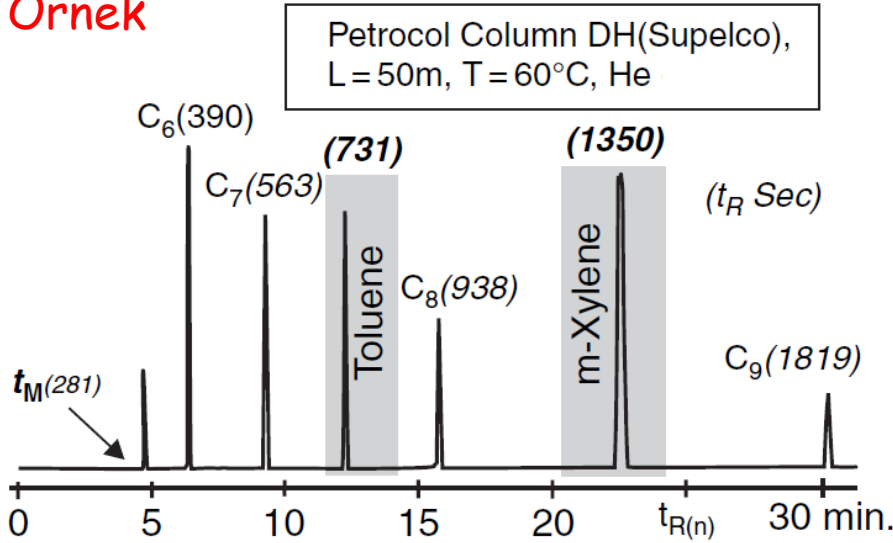
C4 -C9 n-Parafinler için çizilen grafik Şekil'd görülmektedir. Üç bileşiğin aynı kolonda ve aynı sıcaklıktaki log alıkonma zamanları da ordinatt gösterilmiştir. Alıkonma indeksleri, apsiste karşılığı olan değerlerin 100 ile çarpılmasıyla bulunur: tolueni alıkonma indeksi 749, benzeninki 644'dür.

Prof.Dr. Mehmet Sayım KARACAN



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 toluen ve ksilenin gaz kromatogramı verilmiştir. Grafikteki verileri kullanarak, toluen 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.

$(t_R)_{toluen} = 12,2$, Toluen 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.

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

Unleaded Gasoline

Column: DB-Petro 100

100 m x 0.25 mm I.D., 0.5 µm

J&W P/N: 122-10A6

Carrier: Helium at 25.6 cm/sec

Oven: 0°C for 15 min

0-50°C at 1°/min

50-130°C at 2°/min

130-180°C at 4°/min

180°C for 20 min

Injector: Split 1:300, 200°C

1 µL of neat sample

Detector: FID, 250°C

Nitrogen makeup gas

at 30 mL/min

1. Methane
2. *n*-Butane
3. Isopentane
4. *n*-Pentane
5. *n*-Hexane
6. Methylcyclopentane
7. Benzene
8. Cyclohexane
9. Isooctane
10. *n*-Heptane

- *11. Toluene
12. 2,3,3-Trimethylpentane
13. 2-Methylheptane
14. 4-Methylheptane
15. *n*-Octane
16. Ethylbenzene
- **17. *m*-Xylene
18. *p*-Xylene
19. *o*-Xylene
20. *n*-Nonane

21. Isopropylbenzene
22. Propylbenzene
23. 1,2,4-Trimethylbenzene
24. Isobutylbenzene
25. *sec*-Butylbenzene
26. *n*-Decane
27. 1,2,3-Trimethylbenzene
28. Butylbenzene
29. *n*-Undecane
30. 1,2,4,5-Tetramethylbenzene
31. Naphthalene
32. Dodecane
33. Tridecane

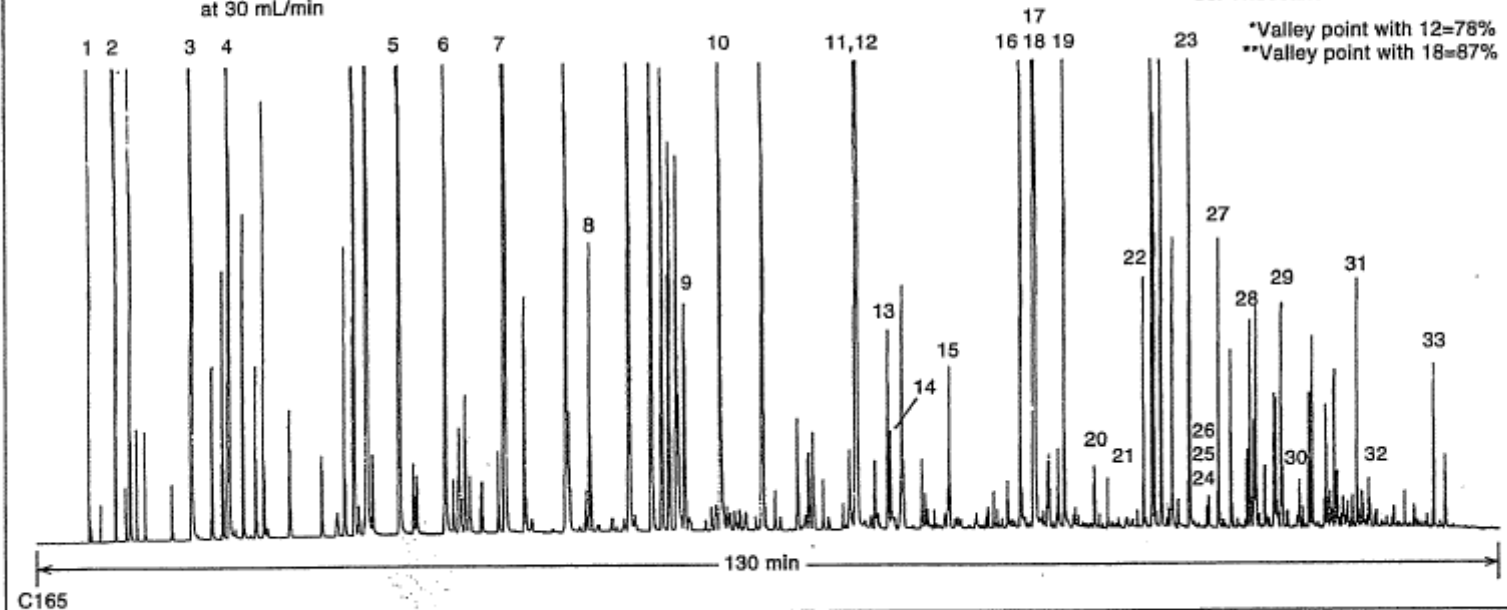


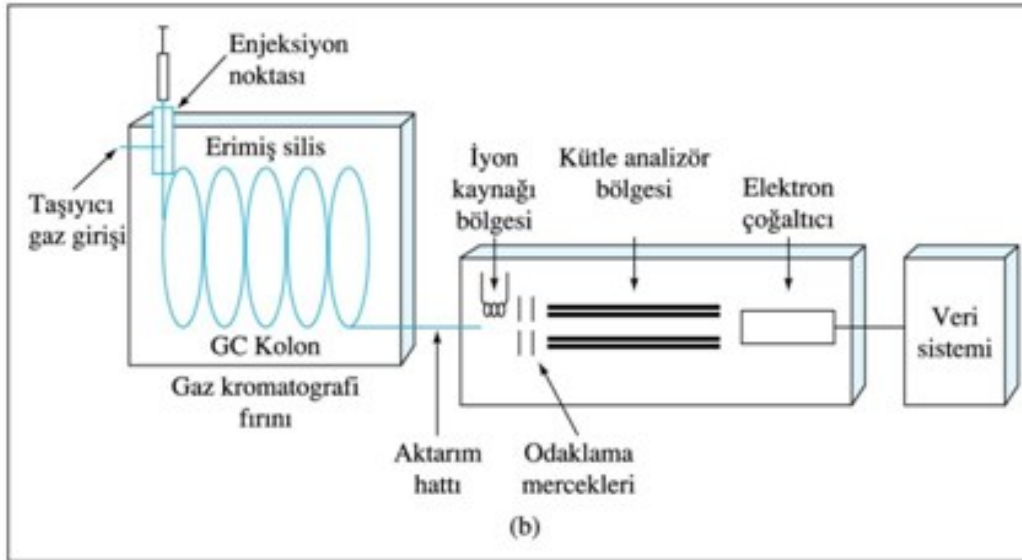
Fig. 20.3. Typical gas chromatogram of complex mixture using a capillary column.
(Courtesy of Agilent Technologies.)

► **Kantitatif Analiz**

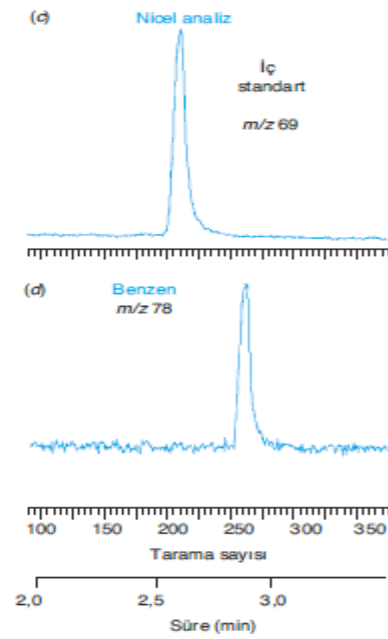
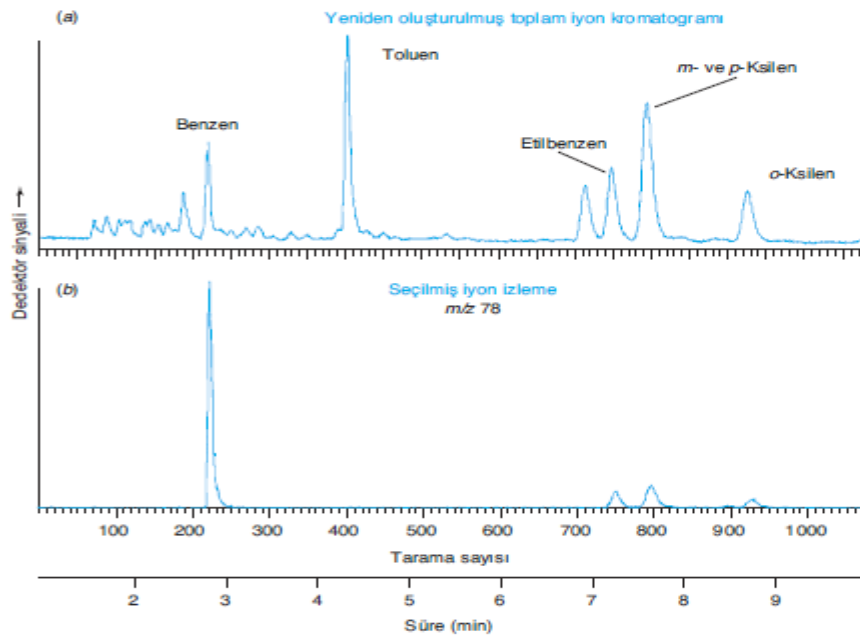
- Bir gaz-sıvı kromatografi kolonundan alınan dedektör sinyali kantitatif ve yarı kantitatif analizde kullanılır. Çok iyi kontrol edilen koşullarda %1-3 kadar duyarlılık-la tayin yapılabilir. Pek çok analitik yöntemde olduğu gibi sonuçların doğruluğun-da, kalibrasyon ve değişken parametrelerin kontrolü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

Gaz Kromatografi - Kütle Spektrometri /GC/MS)

Kütle spektrometri hem nitel hem nicel bilgi sağlayan duyarlı bir dedektördür. *Seçilmiş iyon izleme* veya *seçilmiş tepkime izleme* ile, yetersiz olarak ayrılmış bileşiklerin karmaşık bir kromatogramındaki bir bileşeni ölçebiliriz. Seçilmiş iyon izleme gözlenebilme sınırını m/z taramasına göre 100– 1000 kat düşürür, çünkü seçilmiş iyon izlemede sadece ilgili iyonların toplanmasına daha fazla zaman harcanır.

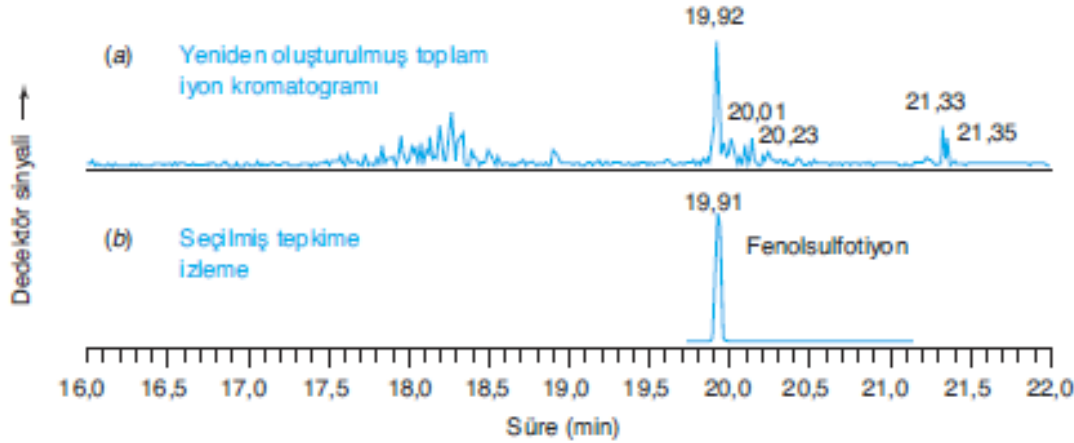


Tipik bir kılcal GC/MS sisteminin şeması. GC'den çıkan karışım kütle spektrometrenin girişine gelir ve burada gazdaki moleküller parçalara ayrılır; iyonlaştırılır; analizlenir ve dedekte edilir.



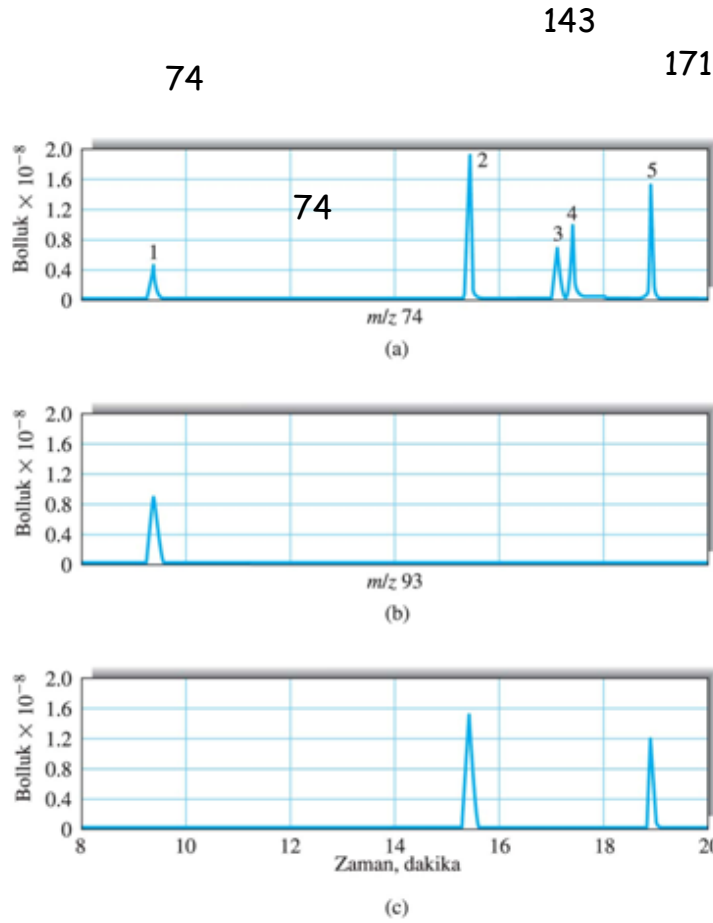
Şekil seçilmiş iyon izleme yöntemini göstermektedir. Toplam iyon kromatogramı, kaza bölgelerindeki sağıntıların tanımlanması için tasarımlanan taşınabilir bir gaz kromatografi-kütle spektrometreden elde edilmiştir. Kolon çıktısının toplam 1072 spektrumu 1 ile 10 min arasında eşit zaman aralıklarında kaydedilmiştir. Yeniden oluşturulmuş toplam iyon kromatogramında düşey eksen, seçilmiş bir sınır üzerindeki bütün m/z değerleri için dedektör sinyalinin toplamıdır. Sistem kolondan çıkan her şeyi ölçer. Şekil b'deki seçilmiş iyon kromatogramı, dedektörü m/z 78'de sabit tutarak ve sadece bu bir kütle ölçerek elde edilmiştir. Bütün zamanı sadece bir iyonu ölçerek harcadığından, sinyal/gürültü oranı artar ve kromatogram sadeleşir.

Benzen (anma kütlesi 78 Da) için bir pik gözlenir ve benzen türevleri için küçük pikler 7-9 min'de gözlenir. Nicel analiz için, m/z 69'da sinyali olan bir iç standart karışıma ilave edilir. Bu iç standart 2 min'lik bir alıkonma süresi civarında kromatogramın kalabalık kısmıyla çakışmasına rağmen, m/z 69 için seçilmiş iyon kromatogramı, Şekil c'de tek bir pike sahiptir. Benzeni ölçmek için Şekil d'deki m/z 78 pikinin alanı, c'deki m/z 69'un alanı ile karşılaştırılır.



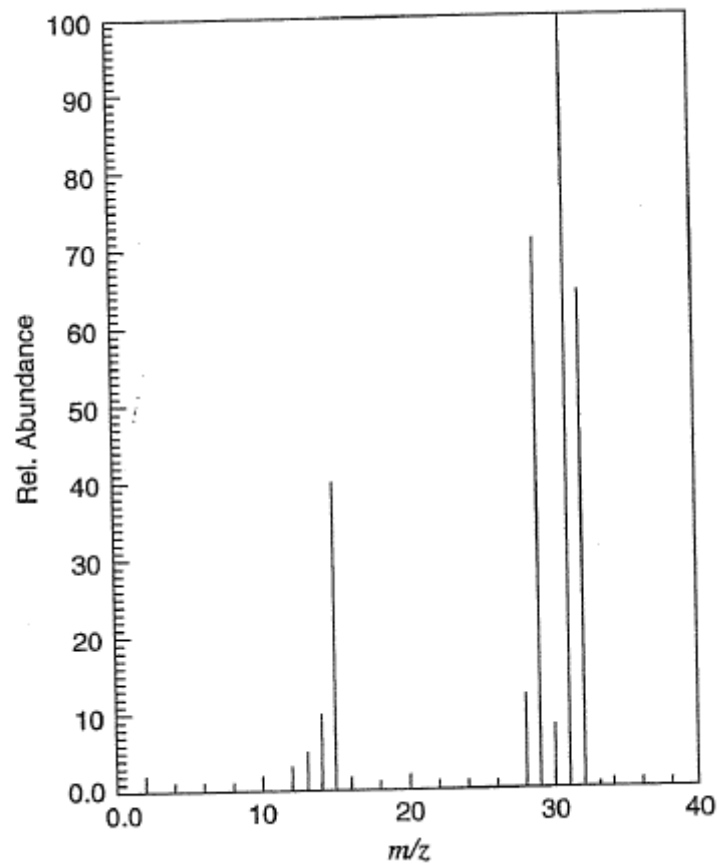
ŞEKİL 23-22 Gaz kromatografi - kütle spektrometride seçilmiş tepkime izleme. (a) Elektron iyonlaşma ile bir portakal kabuğu özütünün yeniden oluşturulmuş toplam iyon kromatogramı. (b) Şekil 21-26'daki kütle süzgeci Q1 ile seçilmiş m/z 293 öncül iyonu ve kütle süzgeci Q3 ile seçilmiş m/z 264 ürün iyonu ile seçilmiş tepkime izleme. Kromatogram Q3'ten m/z 264'teki şiddetin zamana karşı grafiğidir. [Courtesy

- **Seçilmiş tepkime izleme** Şekil'de gösterilmektedir. Şekil a, bir portakal kabuğu özütünün yeniden oluşturulmuş toplam iyon kromatogramıdır. Analizi fenolsulfotiyon pestisitine seçici yapmak için, Şekil'de kütle süzgeci Q_1 ile seçilen m/z 293 öncül iyonu, içinde m/z 264'te göze çarpan bir iyon olan parçalanma ürünlerine ayrıldığı, Q_2 çarpışma hücresine geçmiştir. Şekil 23-22'deki b şekli Q_3 kütle süzgecinden m/z 264'teki dedektör sinyalini göstermektedir. Sadece bir pik gözlenir çünkü fensulfotiyondan başka çok az bileşik m/z 264'te bir parçalanma ürünü üreten m/z 293'teki bir iyonla yol açar. Seçilmiş tepkime izleme, kromatografik analizde sinyal/gürültü oranını artırır ve çoğu girişimi yok eder.



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

Fig. 20.10. Electron ionization mass spectrum of methanol. From NIST MassSpec Data Center. Reproduced by permission.



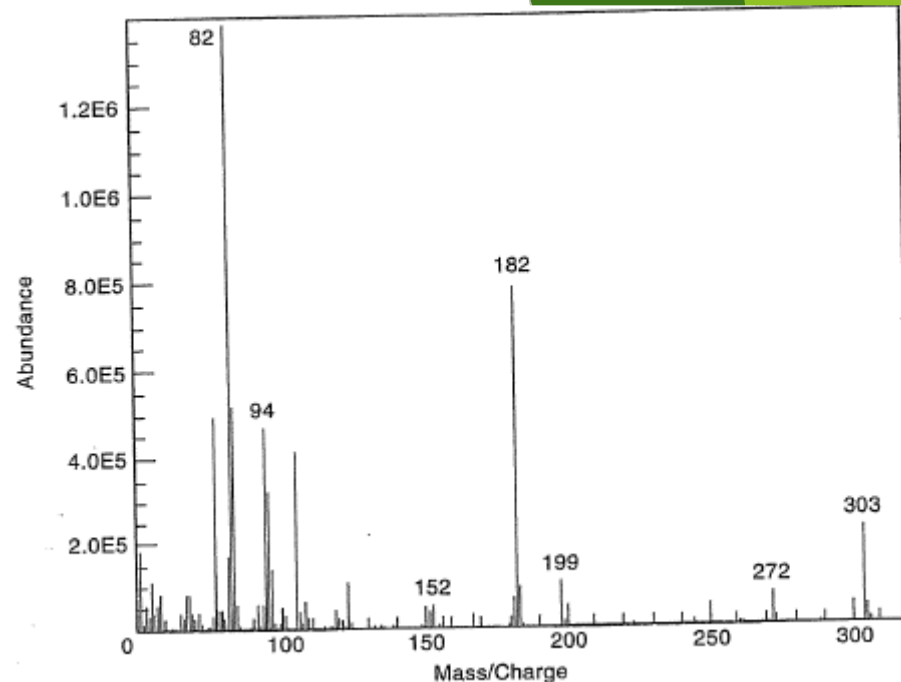
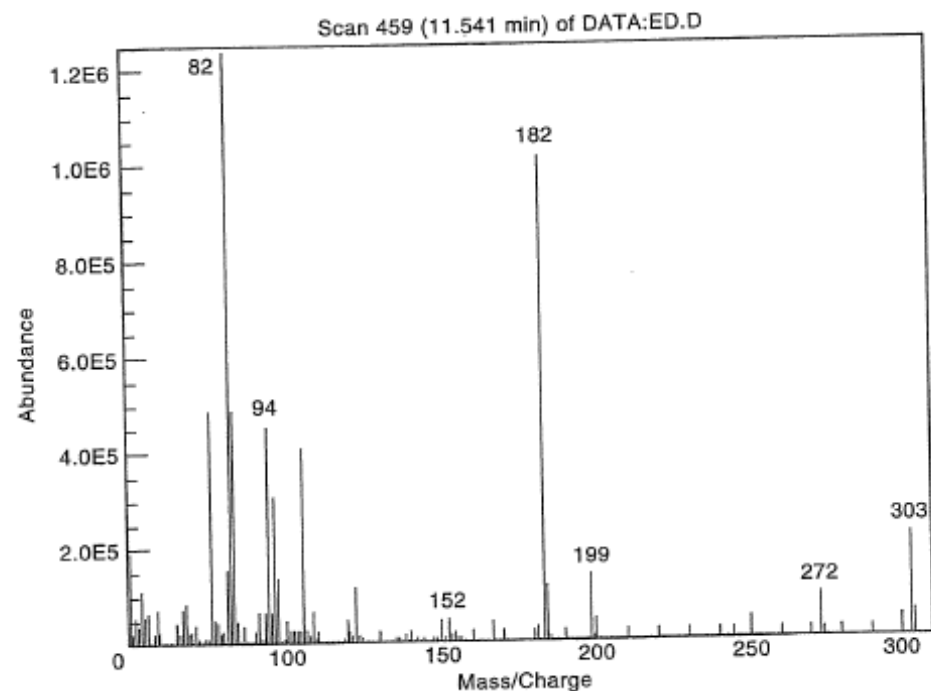
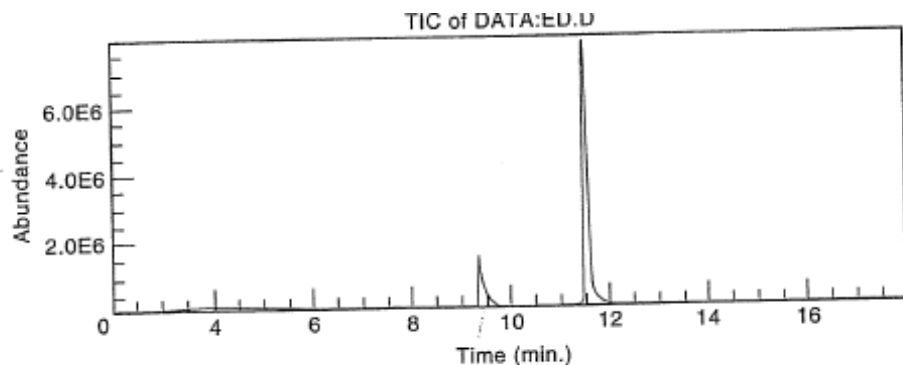
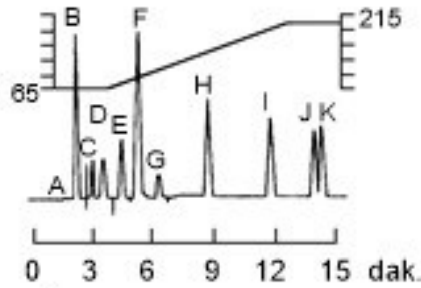
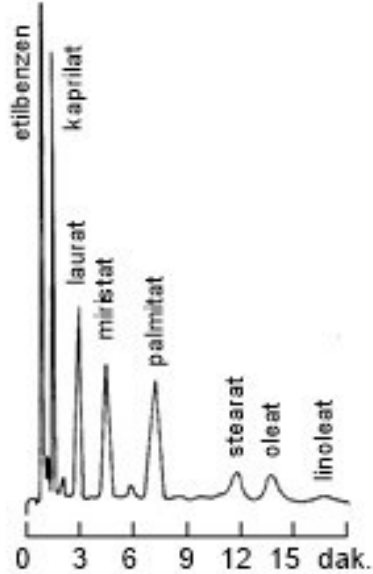


Fig. 20.13. Confirmation of cocaine by GC-MS. *Top:* Total ion current gas chromatogram of cocaine in urine sample. *Middle:* Mass spectrum taken from peak at 11.5 min. *Bottom:* Mass spectrum taken from GC peak of cocaine standard at same elution time.

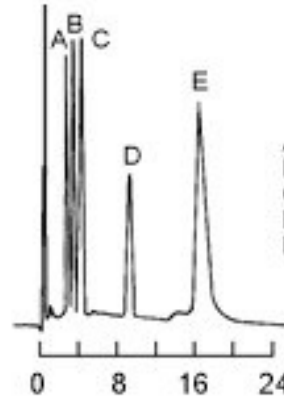
(a) eksoz karışımı



A: %35 H₂
B: %25 CO₂
C: %1 O₂
D: %1 N₂
E: %1 C₂
F: %30 CH₄
G: %3 CO
H: %1 C₃
I: %1 C₄
J: %1 i-C₅
K: %1 n-C₅

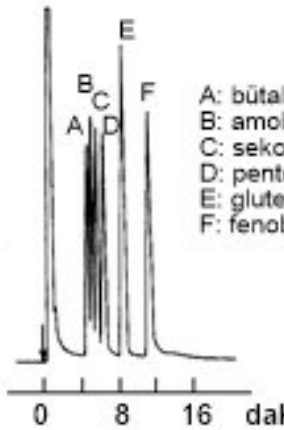


(c) yağ asiti metil esterleri



A: lindan
B: heptaklor
C: aldrin
D: dieldrin
E: DDT (3 ng)

(b) pestisidler (ilk dört: 3.0 ng)



A: bütalbital
B: amobarbital
C: sekobarbital
D: pentobarbital
E: glutetimid
F: fenobarbital

(d) yatıştırıcı karışım (500 ng)

SIVI KROMATOĞRAFİSİ (LC)

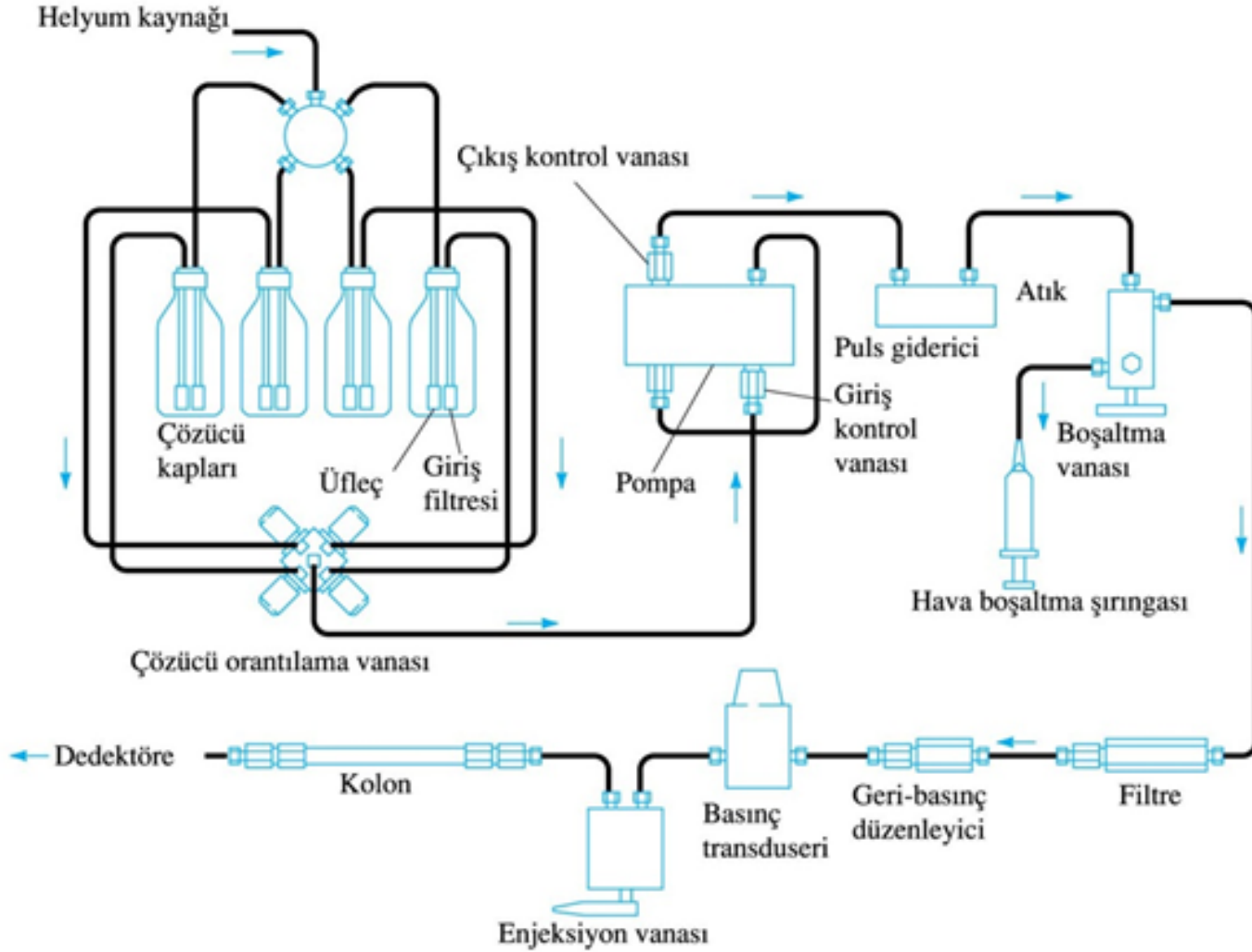
- (1) Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)
- (2) Adsorpsiyon veya sıvı-katı kromatografisi
- (3) Dağılım kromatografisi
- (4) İyon kromatografisi
- (5) Boyut eleme veya jel kromatografisi
- (6) Affinite kromatografisi

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 alanlarında ayırma ve tayin için yaygın olarak kullanılan bir yöntemdir. Bu yöntemle çevre sıcaklığında termal olarak kararsız bileşikler ve yüksek polarlıktaki bileşikler herhangi bir türevlendirme olmaksızın ayırmak ve analiz 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 mikrosırınga ile enjeksiyon,

a) Hareketli faz akışının durdurulmasıyla septum yoluyla enjeksiyon,

b) Kolonun hemen başında hareket eden faza septum yoluyla enjeksiyon.

2. Dış ilmek subabı (valfi) yoluyla enjeksiyon.

► 2. Ayırma Kolonları

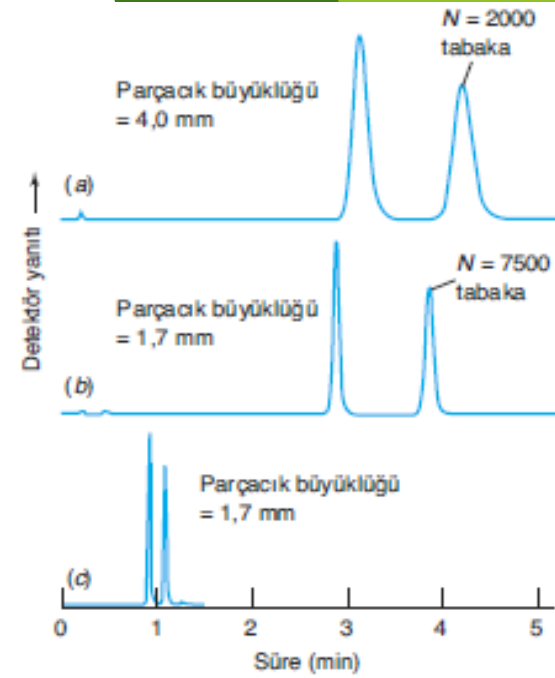
- HPLC cihazında kullanılan kolonlar, yüksek basıncı korumak için paslanmaz çelikten yapılmışlardır. Bunlar baştan başa düzgün bir iç çapa sahiptirler ve ticari olarak değişik büyüklüklerde mevcuttur.
- Bir kromatografik sistemin performansı, kolonda gerçekleştirilen ayırma ile yani, kolon dolgu maddesinin seçilmesi ve kullanılmasıyla tayin edilir.
- İyi bir kolon dolgu maddesi kararlı olmalıdır ve hem hareketli faz çözücülerine hem de örnek çözeltilere karşı inert olmalıdır. Geniş yüzey alanına, düzgün olarak dağılmış ve hareketli faza kolay erişebilir açık yapısal yüzeye sahip olmalıdır. Yüksek basınç ve yüksek akış hızlarından etkilenmemelidir.
- Kolon verimi; kolon dolgu maddesi, ortalama parçacık çapı, kolonu doldurmak için kullanılan teknikler, kolonun iç çapı ve kolonun iç yüzeyinin geometrisi gibi pek çok faktör tarafından tayin edilir. Paslanmaz çelik kolonların, malzeme özellikleri açısından en uygun kolonlar olduğu ortaya çıkmıştır. Analitik uygulamalarda, 2,1 mm, 3,2 mm ve 4,5 mm iç çapa sahip kolonlar 10-30 cm arasındaki uzunluklarda kullanılırlar.

Çözünen maddenin durgun faz ile hareketli faz arasında dengeye ulaşma hızını artırmak kromatografinin etkinliğini artırır. Açık boru tipi kolonlu gaz kromatografisinde kolonun çapı küçültüldüğünde moleküller kanal ile cidardaki durgun faz arasında hızla dağılabildiğinden dengeye hızlıca ulaşılır.

Sıvılardaki dağılma gazlardaki dağılmadan 100 kat daha yavaştır. Bu nedenle sıvı kromatografisinde açık boru şeklindeki kolonları kullanmak pek uygun değildir. Çünkü çözücü kanalının çapı çözünen bir molekülün kısa bir zamanda geçemeyeceği kadar çok büyüktür. Sıvı kromatografisi dolgulu kolonlarla gerçekleştirildiğinden durgun faz ile karşılaşmak için bir çözünen molekülünün çok uzağa difüzlenmesine gerek kalmaz.

Bir dolgulu kolonun etkinliği, durgun fazın parçacık boyutu küçüldükçe artar. HPLC'deki tipik parçacık boyutu 1,7 - 5 μm 'dir. Şekil a ve b parçacık boyutu küçüldükçe sağlanan ayırma gücü artışını göstermektedir. Parçacık boyutu küçüldüğünde tabaka sayısı 2000'den 7500'e çıkmakta ve böylece küçük parçacık boyutunda pikler daha keskin olmaktadır. Şekil

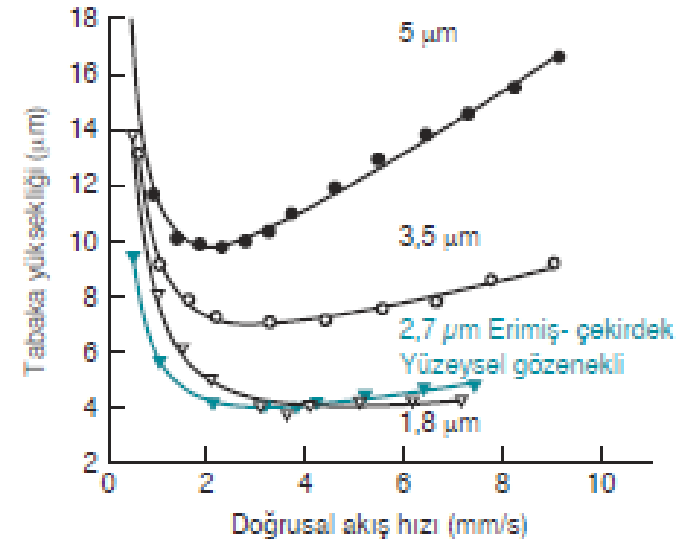
Şekil c'de pikleri daha kısa sürede geri almak için daha güçlü bir çözücü kullanılmıştır. Parçacık boyutunun küçültülmesi bize ayırma gücünü artırmamızı veya çalışma süresini azaltırken aynı ayırma gücünü elde etmemizi sağlar.



ŞEKİL 24-2 (a ve b) C18-silika ile doldurulmuş 5,0 cm uzunluğundaki kolonda aynı doğrusal hızdaki aynı örneğin kromatogramları (c) Çözünen maddeyi b şeklindeki kolondan daha hızlı geri almak için daha güçlü bir çözücü kullanılmıştır. [Y. Yang and

Şekildeki doğrusal akış hızına karşı tabaka yüksekliği grafikleri olan van Deemter grafikleri küçük parçacıkların tabaka yüksekliğini azalttığını ve parçacıklar küçük ise tabaka yüksekliğinin akış hızının artmasına karşı pek duyarlı olmadığını gösteriyor. Her bir kolon için en uygun akış hızında, L uzunluğundaki (cm) bir kolonun kuramsal tabaka sayısı yaklaşık olarak aşağıdaki eşitlikle hesaplanır: Burada d_p , μm cinsinden parçacık çapıdır.

$$N \approx \frac{3000 L (\text{cm})}{d_p (\mu\text{m})}$$



ŞEKİL 24-3 van Deemter eğrileri: Parçacık çapları 5,0, 3,5 ve 1,8 μm olan mikro gözenekli (Şekil 2) durgun faz ve 2,7 μm çapındaki (gözenekli tabaka kalınlığı 0,5 μm) yüzeysel olarak gözenekli (Şekil 2) durgun faz için doğrusal akış hızının (mm/s) bir fonksiyonu olarak tabaka yüksekliği. 24 °C'da hacimce % 60 asetonitril/% 40 H_2O ile C_{18} -silika kolondan (50 mm uzunluğunda x 4,6 mm çapında) geri alınmış naftalin için ölçümler. [Courtesy MAC-MOD Analytical, Chadds Ford, PA]

Şekil de parçacık çapı 4,0 μm olan 5,0 cm uzunluğundaki kolonun tabaka sayısı $\approx (3000)(5,0)/4,0 = 3800$ olarak öngörülür. İkinci pik için gözlenen tabaka sayısı ise 2000'dir. Kolon muhtemelen en uygun akış hızında çalışmamaktadır. Durgun fazın parçacık çapı 1,7 μm 'ye düşürülürse en uygun tabaka sayısı $\approx (3000) (5,0)/1,7 = 8800$ olarak beklenir. Gözlenen değer ise 7500'dür.

Küçük parçacıkların daha iyi bir ayırma gücü vermesinin bir nedeni kolondan daha düzenli bir akış sağlamaları ve böylelikle van Deemter eşitliğindeki çoklu yol terimi A' 'yı küçültmeleridir. İkinci bir neden ise çözünen maddenin hareketli ve durgun fazlardaki alacağı yolun parçacık büyüklüğü ile orantılı olmasıdır. Parçacık küçüldükçe çözünenin difüzyon hızı artar, bu da çözünenin hareketli fazla temas etme süresini azaltır. Bu etki, van Deemter eşitliğindeki sınırlı denge süresine karşılık gelen C terimini küçültür. Küçük parçacıklar için en uygun akış hızı, büyük parçacıklar için olan en uygun akış hızından daha büyüktür, çünkü çözünen madde daha kısa

Çok küçük parçacıklar ve kuvvetli bir biçimde adsorplanan çözünenler koruyucu kolon tarafından tutulur. Bu kolon, kolon basıncı arttığında ya da çok sayıda enjeksiyondan sonra veya hizmet süresince düzenli olarak değiştirilir. Koruyucu kolon 10-30 cm uzunluğundaki kromatografi kolonları için uygunken, birçok kişi 5 cm uzunluğundaki bir kolon için koruyucu bir kolon kullanılmasını maliyetli olarak kabul etmektedir.

Bir kromatografi kolonunu ısıtmak genellikle çözücünün viskozitesini azaltır, böylece gereken basıncı düşürür veya daha hızlı akış sağlar. Sıcaklığın artması alıkonma sürelerini düşürür ve çözünenin difüzyonunu hızlandırarak ayırma gücünü artırır. Ancak artan sıcaklık durgun fazın bozunmasına neden olabilir ve kolonun ömrünü kısaltır. Kolonun sıcaklığı kontrol edilmezse oda sıcaklığında küçük dalgalanmalar yapar. Oda sıcaklığından 10 °C daha yüksek bir sıcaklıkta bir kolon ısıtıcı sisteminin kullanılması alıkonma sürelerinin tekrarlanabilirliğini ve nicel analizin kesinliğini artırır. Bazı araştırmacılar, bütün ayırmaları rutin olarak 50 ya da 60 °C'da yaparlar. Isıtılmış bir kolonda hareketli fazın enjektör ile kolon arasındaki ön ısıtılmış metal bobinden geçirilmesi gerekmektedir. Böylelikle çözücü ve kolonun aynı sıcaklıkta olması sağlanır. Eğer çözücü ile kolonun sıcaklığı farklıysa piklerin şekli bozulur ve alıkonma süreleri değişir.

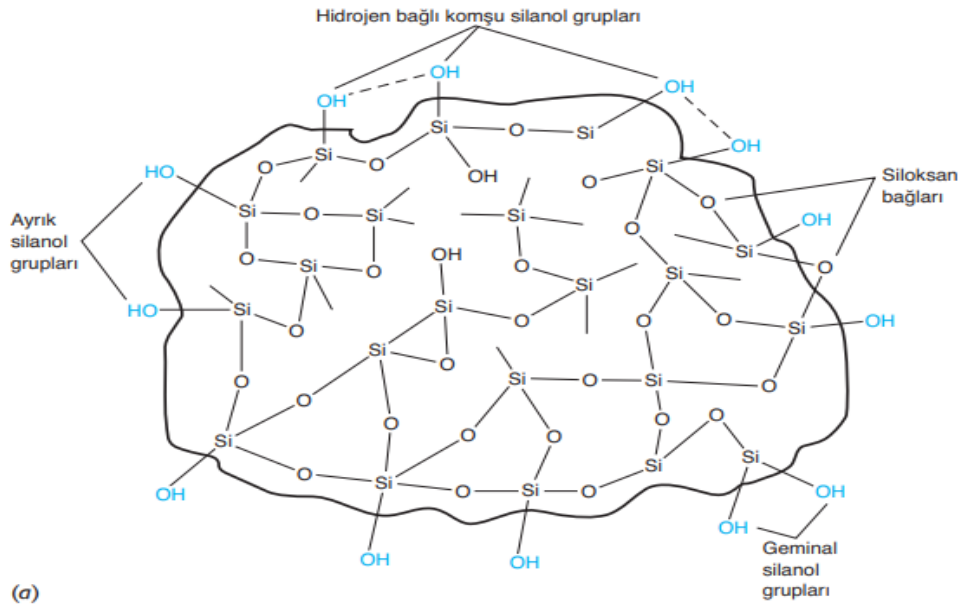
Durgun Faz

En yaygın destek, çözücünün geçebildiği ve gram başına yüzlerce metrekaresel bir yüzey alanına sahip olan oldukça saf, küresel, **mikro gözenekli silika parçacıklarıdır**.

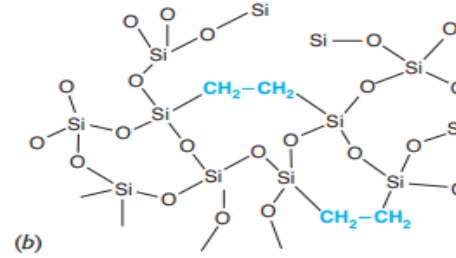
Birçok silika, bazlarda çözündüğü için pH 8'in üzerinde kullanılamaz. Şekil sıradan silikanın ve pH 12'ye kadar hidrolize direnen etilen köprülü silikanın yapısını göstermektedir. pH 8-12'deki bazik bileşikleri ayırmak için etilen köprülü silika ya da polistiren gibi polimerik destekler kullanılabilir. Durgun faz polimere kovalent olarak bağlanır. Bir silika yüzeyinde metrekarede 8 μmol 'e kadar silanol grupları ($\text{Si}-\text{OH}$) bulunur. Silanol grupları $\sim\text{pH}$ 2-3'te protonlanır. Bu gruplar pH 3'ün üstündeki geniş bir pH aralığında negatif $\text{Si}-\text{O}-$ ye ayrışırlar. $\text{Si}-\text{O}-$ gruplarına sahip eski Tip A silika, protonlanmış bazları (örneğin RNH_3^+) kuvvetli olarak tutarlar ve kuyruk oluşmasına neden olur. Tip A silikadaki metalik safsızlıklar da kuyruk oluştururlar.

Silanol gruplarına daha az sahip olan ve daha az metalik safsızlıkları olan Tip B silika günümüzde en yaygın kullanılan dolgu maddesidir. Tip C silikada $\text{Si}-\text{OH}$ gruplarının % 90'ı çözünen maddelerle hidrojen bağı yapmayan $\text{Si}-\text{H}$ bağlarıyla değiştirildiğinden kuyruk oluşması daha da az olur.

Çıplak silika adsorbsiyon kromatografisinde durgun faz olarak kullanılabilir. En yaygın olarak sıvı-sıvı dağılma kromatografisi aşağıdaki gibi tepkimelerle silika yüzeyine kovalent olarak bağlanan **bağ yapmış durgun faz** ile gerçekleştirilir:



(a)

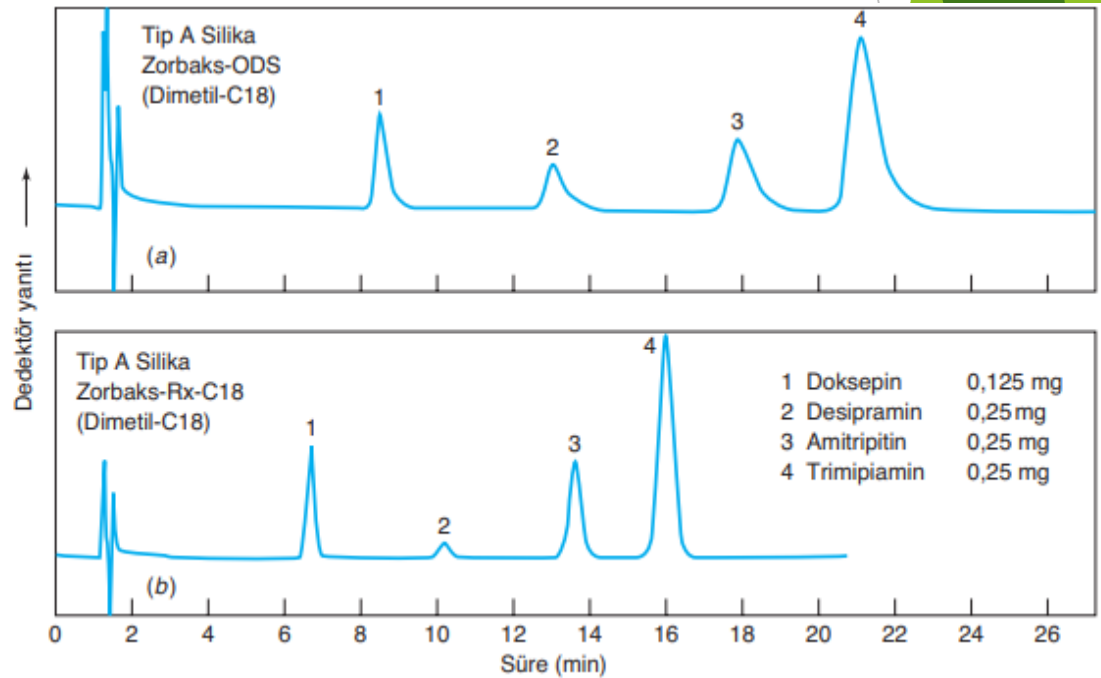


(b)

ŞEKİL 24-6 (a) Silika parçacığının şematik yapısı. [R. E. Majors, *LCCG*, May 1997, p. S8.]

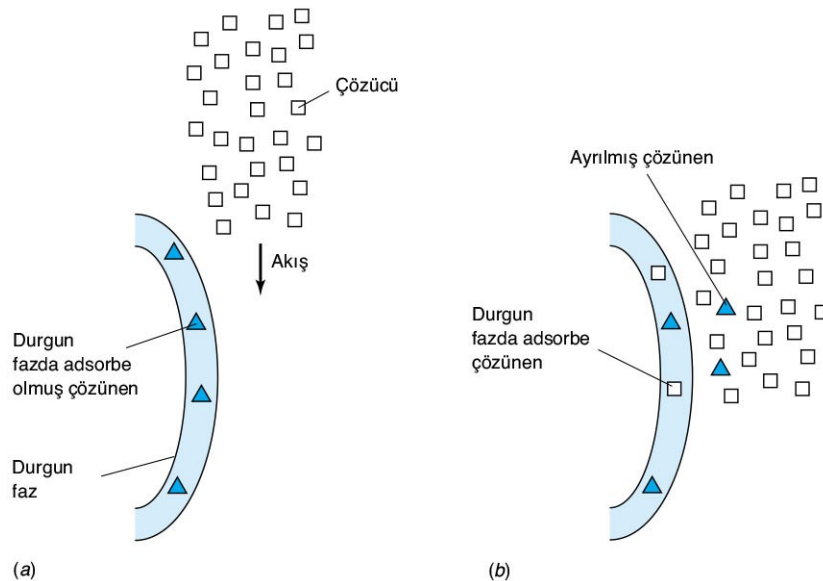
(b) Baz hidrolizine karşı dayanıklı silika, silisyum atomları arasında oksit köprüleri yerine etilen köprüleri içerir. Yüksek basınca karşı dayanıklı olması gereken etilen köprülü yapı, daha serttir ve çapı < 2 µm'den küçük parçacıklar için daha uygundur.

ŞEKİL 24-7 Silika üzerindeki amin bazlarının kuyruk yapması: (a) Tip A silika bozulmuş biçimsiz pikler verir. (b) Asitliği, Si-OH grubu ve metalik safsızlık içeriği daha az olan Tip B silika, daha az alıkonma süresinde simetrik pikler verir. Her iki durumda da kromatografi işlemi 0,46 x 15 cm'lik kolon ile gerçekleştirildi ve 40 °C'da kütlece % 0,2 trietilamin ve triflorasetik asit içeren hacimce % 30 asetonitril/% 70 sodyum fosfat tamponu (pH 2,5) ile 1,0 mL/min akış hızında geri alındı. Detektör 254 nm'deki morötesi absorpsiyon ölçtü. Güçlü adsorpsiyon merkezlerini maskelemek kuyruk oluşmasını azaltmak için genellikle trietilamin ve triflorasetik asit gibi katkı maddeleri kullanıldı. [J. J. Kirkland, *Am. Lab.*, June 1994,p. 28K.]



Geri alma süreci

Sıvı kromatografisinde çözücü molekülleri durgun faz üzerindeki merkezler için çözünmüş maddenin molekülleriyle yarışır. Değişik çözücülerin belirli bir çözünen maddeyi adsorbandan geri alma yetenekleri çözünen maddenin niteliğinden hemen hemen tamamen bağımsızdır. Durgun fazdaki çözünenin yerine çözücü geçtiğinde geri alma meydana gelir.



ŞEKİL 24-11 Çözücü molekülleri durgun faz üzerindeki bağlanma merkezlerine bağlanmak için çözünmüş maddenin molekülleriyle yarışır. Çözücünün geri alma kuvveti arttıkça çözünmüş madde ile daha kolay yer değiştirir.

Geri alma kuvveti, ϵ^0 , çözücü adsorpsiyon enerjisinin bir ölçüsü olup çıplak silika üzerinde adsorplanan pentan için bu değer 0 olarak alınır. Çözücü ne kadar polar ise, o çözücünün çıplak silika ile adsorpsiyon kromatografisindeki geri alma kuvveti de o kadar büyük olur. Geri alma kuvveti ne kadar büyükse, çözünenin kolondan geri alınması o kadar hızlı olacaktır.

Çıplak silika üzerindeki adsorpsiyon kromatografisi polar bir durgun faz ve daha az polar bir çözücüyü kullandığımız **normal faz kromatografisinin** bir örneğidir. Daha polar bir çözücü, daha büyük bir geri alma kuvvetine sahiptir. Durgun fazın apolar ya da zayıf polar olduğu, çözücünün ise daha fazla polar olduğu **ters faz kromatografisi** daha yaygın bir işlemdir.

Polaritesi daha az olan bir çözücü daha yüksek bir geri alma kuvvetine sahiptir. Genel olarak, hareketli faz durgun faza benzetilerek geri alma kuvveti artırılır. Ters faz kromatografisi pikin kuyruk yapmasını engeller. Çünkü bu kromatografi türünde durgun fazın üzerinde çözünen maddeyi adsorplayıp kuyruk yapmasına neden olacak merkezlerin sayısı azdır.

Elüotropik seri ve silika üzerindeki adsorpsiyon kromatografisi için çözücülerin morötesi üst sınır dalga boyları

Çözücü	Geri alma kuvveti (ϵ°)	Morötesi üst sınır (nm)
Pentan	0,00	190
Heksan	0,01	195
Heptan	0,01	200
Triklortrifloretan	0,02	231
Toluen	0,22	284
Kloroform	0,26	245
Diklormetan	0,30	233
Dietil eter	0,43	215
Etil asetat	0,48	256
Metil <i>t</i> -butil eter	0,48	210
Dioksan	0,51	215
Asetonitril	0,52	190
Aseton	0,53	330
Tetrahidrofuran	0,53	212
2-Propanol	0,60	205
Metanol	0,70	205

NOT: Sıvı morötesi üst sınırı 190 nm'dir.

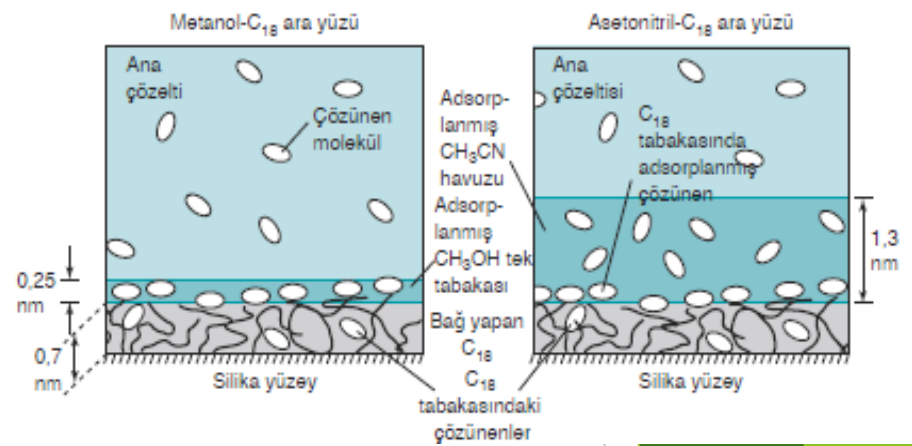
Çözücü-Bağlı Faz Ara Yüzeyinin Yapısı

Durgun faz ile hareketli faz arasındaki ara yüzeyde bulunan çözücünün tabakalı yapısı sıvı kromatografisindeki ayırmayı etkiler. Yandaki diyagramlar fenol ve

kafeinin adsorpsiyon çalışmalarından elde edildiği gibi metanol/su (hacimce 40:60) ve asetonyitril/su (hacimce 30:70) varlığında C_{18} -silikanın yüzeyindeki çözücü tabakalarını göstermektedir. 40:60 ve 30:70 oranlarının geri alma kuvveti yaklaşık olarak aynı olduğundan bu bileşimler seçilmiştir.

Metanol, C_{18} 'in yüzeyinde 0,25 nm kalınlığındaki (bir molekül kalınlığı) tek tabakalı bir adsorplanan çözücü oluşturur. Asetonyitril ise 1,3 nm kalınlığında adsorplanan çözücü havuzu ve çözünmüş çözücü için yüksek bir kapasite oluşturur. Adsorplanan fenol ve kafein molekülleri C_{18} tabakasının içinde ya da dış yüzeyinde kalabilir veya CH_3CN havuzunda çözünebilirler.

Adsorpsiyon merkezinin her tipinin farklı bir bağlanma enerjisi ve bağlanma kapasitesi vardır ve geri alınan çözünenin bandının şeklini değişik çözünen madde derişimlerinde farklı bir şekilde etkilerler. Adsorplanan CH_3CN havuzu, organik/sulu çözelti karışımından daha kuvvetli bir geri alma çözücüsüdür. Bu durum, asetonyitrilin neden metanolden daha kuvvetli bir geri alma çözücüsü olduğunu açıklar.



3. Dedektörler

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

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

* Hızlı ayrılan pikleri kaydetmek için süratli cevap zamanına sahiptir.

* Hareketli fazdaki akış hızı, sıcaklık ve fazın bileşimindeki değişimlere karşı bir dereceye kadar duyarsızdır.

• Bütün çözünenlere cevap verir veya en azı tahmin edilebilir bir seçiciliğe sahiptir.

* Kolay çalışır ve güvenilirliği fazladır.

* Oluşan pikte kalitatif bilgi de sağlar.

HPLC dedektörlerinin iki tipine rastlamak müm

1. Genel dedektörler 2. Seçici dedektörle

ÇİZELGE 24-3 Ticari HPLC dedektörlerinin karşılaştırılması

Dedektör	Yaklaşık gözlenebilir smirt ^a (ng)	Gradyent için yararlı mı?
Morötesi	0,1–1	Evet
Kırılma indisi	100–1 000	Hayır
Buharlaştırıcı ışık-saçılması	0,1–1	Evet
Yüklü aerosol	1	Evet
Elektrokimyasal	0,01–1	Hayır
Floresans	0,001–0.01	Evet
Azot (N $\xrightarrow{\text{Yanma}}$ NO $\xrightarrow{\text{O}_3}$ NO ₂ [*] $\rightarrow$ h ν)	0,3	Evet
İlekenlik	0,5–1	Hayır
Kütle spektrometri	0,1–1	Evet
Fourier dönüşümlü infraret	1000	Evet

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

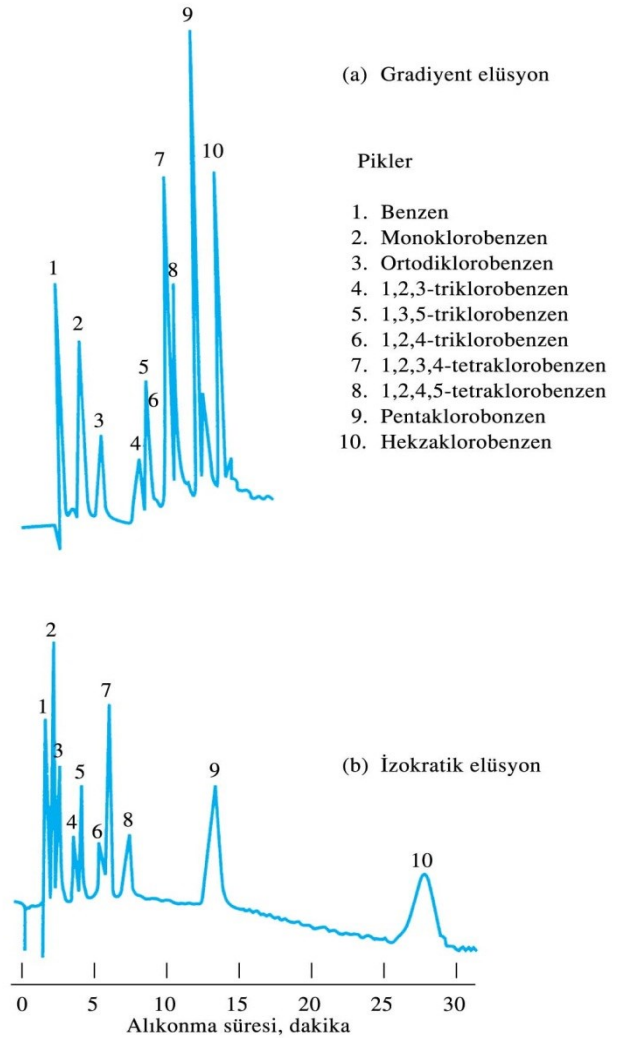
Seçici dedektörler ise yalnız örnek çözeltisi için duyarlık ve seçicilik gösterir. Genel özellikli dedektörlere örnek olarak kırılma indisi ölçen dedektörler ve kütle spektrofotometreleri verilebilir. Seçici dedektörlere örnek olarak da UV, FT-IR, floresans, elektrokimyasal, radyokimyasal, iletkenlik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

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

İzokratik ve Gradyen Geri Alma

İzokratik geri alma, tek bir çözücü (veya sabit çözücü karışımı) ile gerçekleştirilir. Eğer bütün bileşenlerin hızlı geri alınması bir çözücü bulunamazsa, gradyent geri alma kullanılabilir.

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



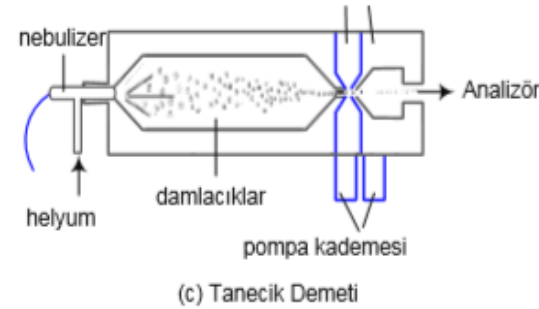
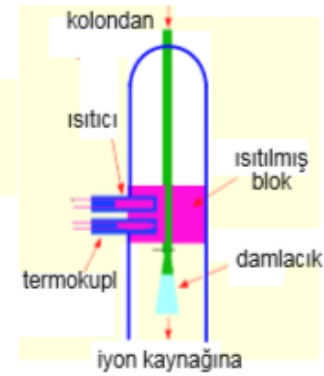
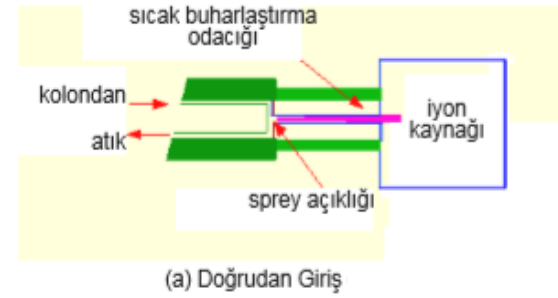
Gradyent elüsyon ile ayırmanın iyileştirilmesi.

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. 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 $\mu\text{L}/\text{dakika}$ 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 iyonlaştırıcılardır.



HPLC ile kütle spektrometrinin birleşimi, yüksek seçicilik sağlar; çünkü, iyi ayrılmamış bir pikin bile belli bir dilimini MS sistemine verip saf türleri yakalamak mümkündür. LC/MS sistemlerinde, ayrılan türün, geleneksel HPLC'de olduğu gibi, sadece alıkonma süresini kullanmak yerine, parmak izi kadar güvenilir kütle spektrumunu elde etme üstünlüğü vardır. Bu birleşme sayesinde, ayrıca mol kütlesi, yapısal ayrıntılar ve güvenilir nicel analiz sonucu elde edilebilir. Bazı kompleks karışımlar, LC/MS kombinasyonu ile yeterli ölçüde ayrılamayabilir. Son yıllarda, iki veya daha çok kütle analizörünü birleştiren bir teknik geliştirilmiş olup buna tandem kütle spektrometri denir. Böyle sistemler LC ile birleşince de LC/MS/MS cihazları ortaya çıkar.

Bir kuadropolün sağlayacağı ayırma gücünün daha fazlasını elde etmek için tandem MS sistemindeki en son kütle analizörü olarak uçuş-zamanlı kütle spektrometre seçilebilir. Tandem sistemler elde etmek için dilimli kütle spektrometreleri de birleştirilebilir. İyon siklotron rezonans ve iyon tuzaklı kütle spektrometreleri, iki basamaklı kütle ayırma amacıyla kullanılabileceği gibi, aynı işlemi n-basamaklı uygulamaya da elverişlidir. MSⁿ sistemleri denilen böyle bileşimler, tek bir kütle analizöründe ardışık analiz adımları sağlayabilir. Bunlar LC sistemleriyle birleştirilerek LC/MSⁿ cihazları elde edilir. LC/MS sistemleri bilgisayar kontrollüdür. Bu cihazlarla, kolondan çıkan eluat piklerinin hem gerçek-zamanlı hem de bilgisayarda sonradan oluşturulmuş kromatogramları elde edilebilir.

Örnek

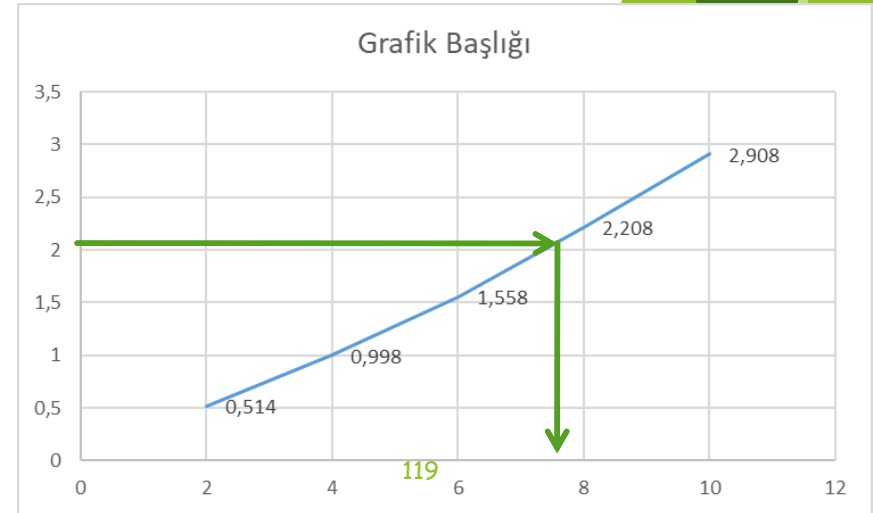
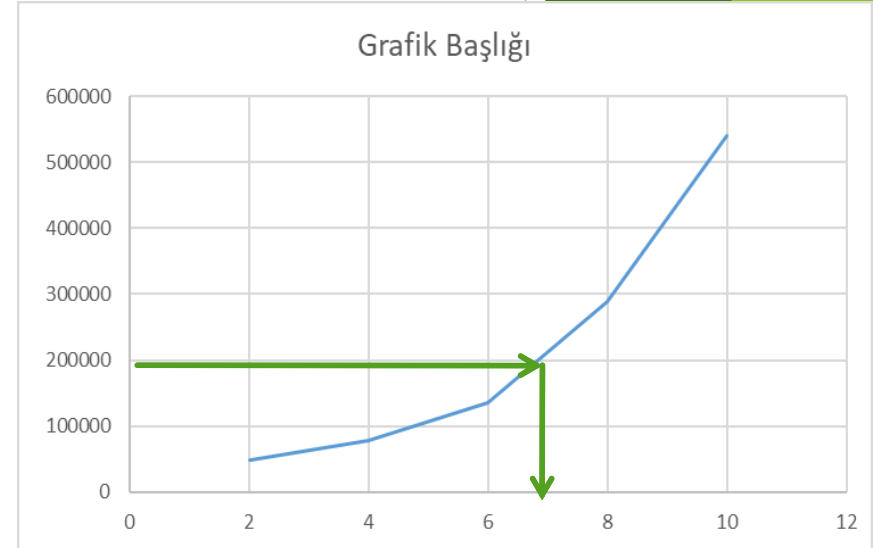
Bir numunede p-ksilen tayini için 2,4, 6, 8, 10 ppm 25 ml çözelti hazırlanmıştır. Çözeltilerin kromatogramları çekilmiş aşağıdaki veriler elde edilmiştir. P ksilen pik alanlarının doğrusallığının iyi olmadığı anlaşıldığından iç standart olarak metil izobütilketon hem standart hemde numuneye eklenerek pik alanları belirlenmiştir. Buna göre numunedeki p ksilen derişimini bulunuz.

p-ksilen derişimi (ppm)	p-ksilen pik alanı (piksel ²)	İç standart pik alanı (piksel ²)	p-ksilen pik alanı/ İç 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
Bilinmeyen	200456	95089	2,108

Standartlara ve bilinmeyene 10 ppm iç standart eklenmiştir.

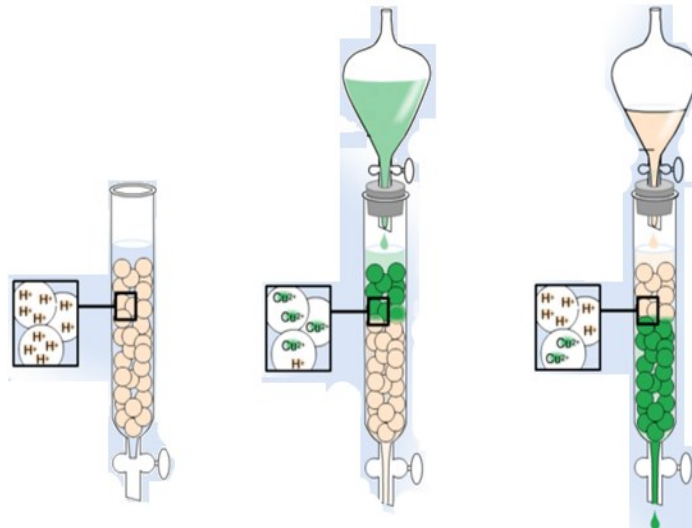
İç standart eklenmeden yapılan kalibrasyon grafiğinde doğru elde edilmemiştir. Buna rağmen grafikten okunan değer 7 ppm dir. İç standart eklenerek p-ksilenin pik alanın/iç standardın pik alanına oranının derişime karşı grafiğinde ise doğru elde edilmiştir. Bu grafikten elde edilen değer ise 7,8 ppm dir.

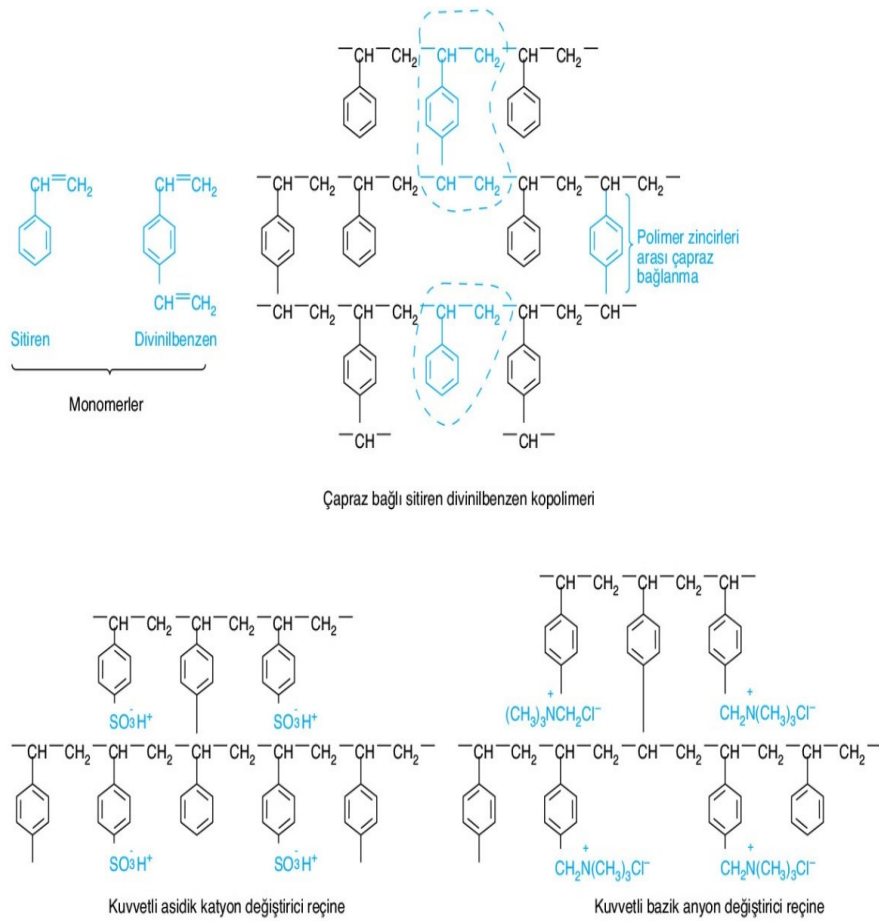
$$\%Hata = (7 - 7,8) / 7,8 \times 100 = 10,3$$



İyon-Değişirme Kromatografi

- İyon-değişirici reçineler kolon kromatografisinde çok kullanılan dolgu maddeleridir. Diğer kolon yöntemlerinin tersine burada solvent su, ayrılacak maddeler de iyonlardır. Bu nedenle iyon-değişirici kromatografi inorganik kimyasal analizlerde çok kullanılan bir yöntemdir. Aynı zamanda amino asitlerin ve diğer organik asitlerin ve bazların ayrılmasında da uygundur.
- İyon değişirme, 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 değişirici gibi davranır. Kil ve zeolitlerin iyon-değişirme özellikleri uzun zamandan beri bilinmekte ve bunlar yüzyılı aşkın bir süredir bu amaçla kullanılmaktadır. Sentetik iyon-değişirici reçineler ilk defa 1935'de yapılmış ve su sertliğinin giderilmesi, suyun saflaştırılması ve iyon ayırma işlemlerinde geniş bir uygulama alanına yayılmıştır.





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

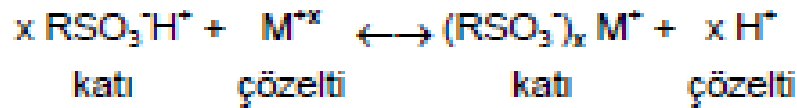
ÇİZELGE 25-1 İyon Değiştirici Reçineler

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

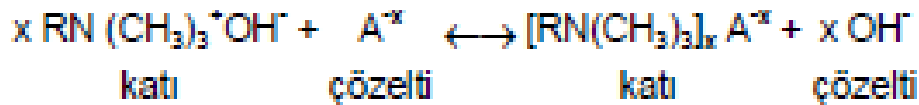
KAYNAK: J.X. Klyne'den uyarlandı, *Analytical Ion-Exchange Procedures in Chemistry and Biology* (Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall, 1974).

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 ($-\text{CO}_2^{2-}$) 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

- ▶ Sentetik iyon-değiştirici reçineler, her molekülünde çok sayıda iyonik fonksiyonel gruplar içeren yüksek molekül ağırlıklı polimerik maddelerdir.
- ▶ Katyon 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 katyon-değiştirme reaksiyonu aşağıdaki denklemlerle anlatılabilir.



- ▶ Burada M^{+x} bir katyonu, R reçine molekülünün kalan kısmını gösterir. Anyon değiştiricinin reaksiyonu da benzer bir şekilde yazılabilir (A^{-x} 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 ayırmışlardır.
- Örnek kolonun tepesinden konulduğunda her iki alkali iyon için de aşağıdaki reaksiyon olur.
- $\text{RH} + \text{B}^+ \rightleftharpoons \text{RB} + \text{H}^+ \quad (1)$
- 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).

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

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

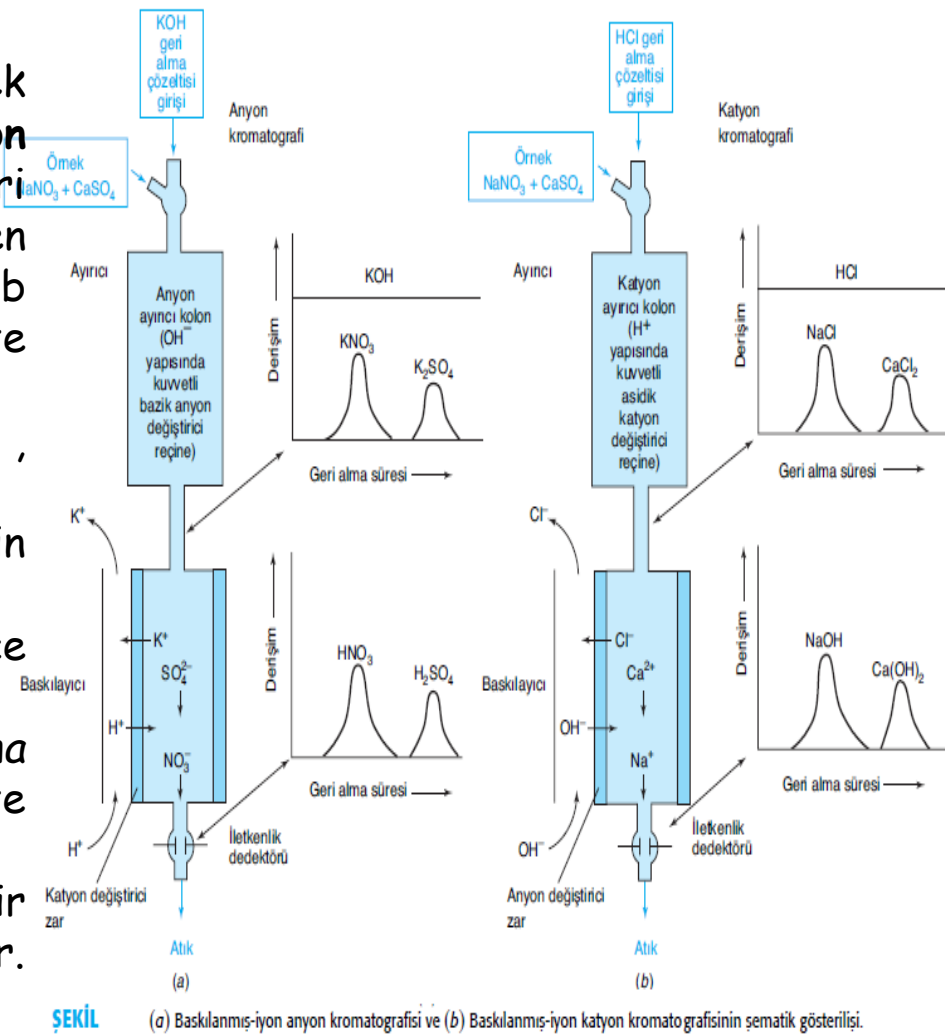
$$\frac{[\text{RB}]}{[\text{B}^+]} = \frac{K [\text{RH}]}{[\text{H}^+]} = K_D \quad (3)$$

- 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 $[RH]$ in toplam konsantrasyonları, dengenin kaymasından etkilenmezler (denklem 1). Buna göre $[RH]$ ve $[H^+]$ in $[RB]$ 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:
- $Cs^+ > Rb^+ > K^+ > NH_4^+ > Na^+ > H^+ > Li^+$ (iyon çapı soldan sağa doğru azalır)
- İki değerlikli katyonlar için de aşağıdaki gibi sıra yazılabilir:
- $Ba^{+2} > Pb^{+2} > Sr^{+2} > Ca^{+2} > Cd^{+2} > Cu^{+2} > Zn^{+2} > Mg^{+2}$

İyon Kromatografisi

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.

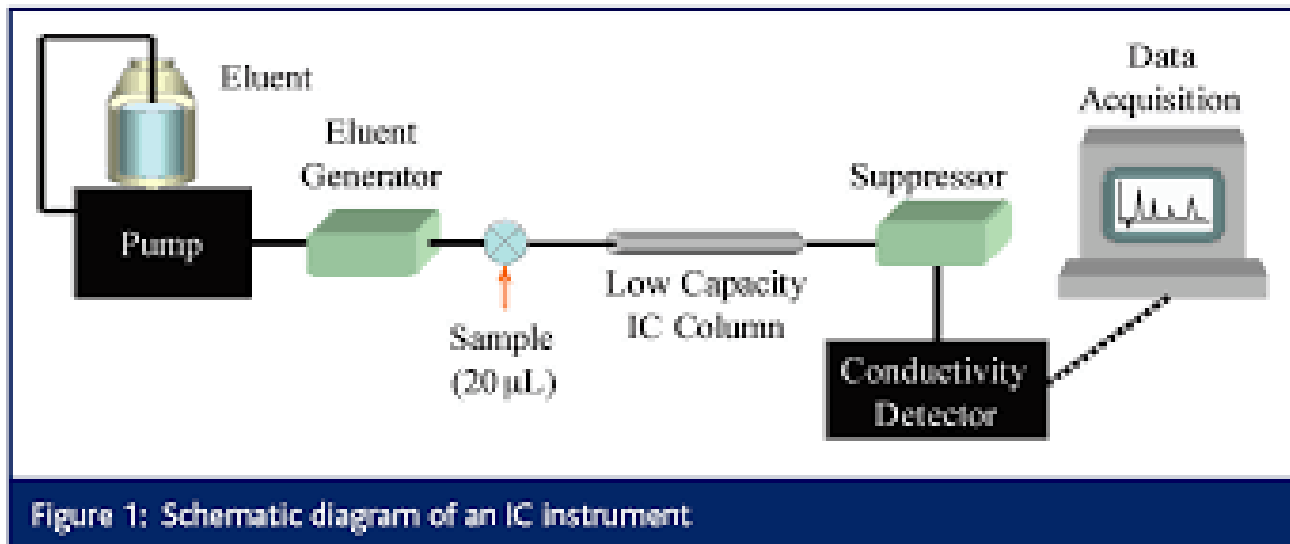
Baskılanmış iyon anyon kromatografisinde, anyonların bir karışımı iyon değişimi ile ayrılır ve elektrik iletkenliğine göre tayin edilirler. Baskılanmış-iyon kromatografisinin püf noktası, iletkenlik ölçümünden önce istenmeyen elektrolitlerin uzaklaştırılmasıdır. NaNO_3 ve CaSO_4 içeren bir örneğin ayırma 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.



ŞEKİL

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

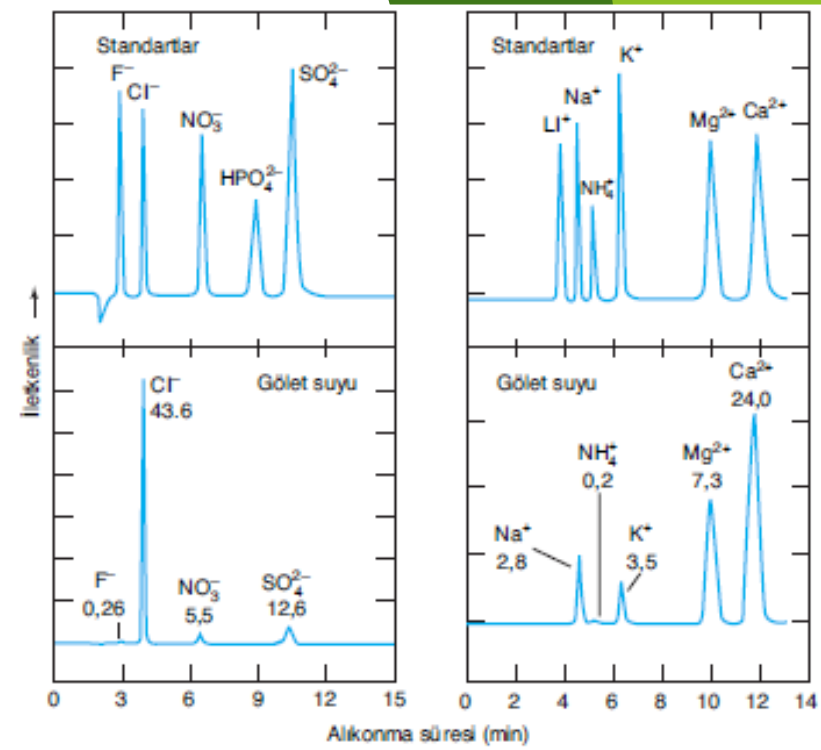
Sonunda, Şeklin üstünde gösterilen grafikten görüldüğü gibi ayırma kolonundan KNO_3 ve K_2SO_4 çıkar. Bu türler kolaylıkla tayin edilemezler, ancak çıkan çözelti yüksek bir derişimde KOH içerdiğinden bunun yüksek iletkenliği analitlerin tayinini bozar. Bu sorunu aşmak için çözelti daha sonra, katyonların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

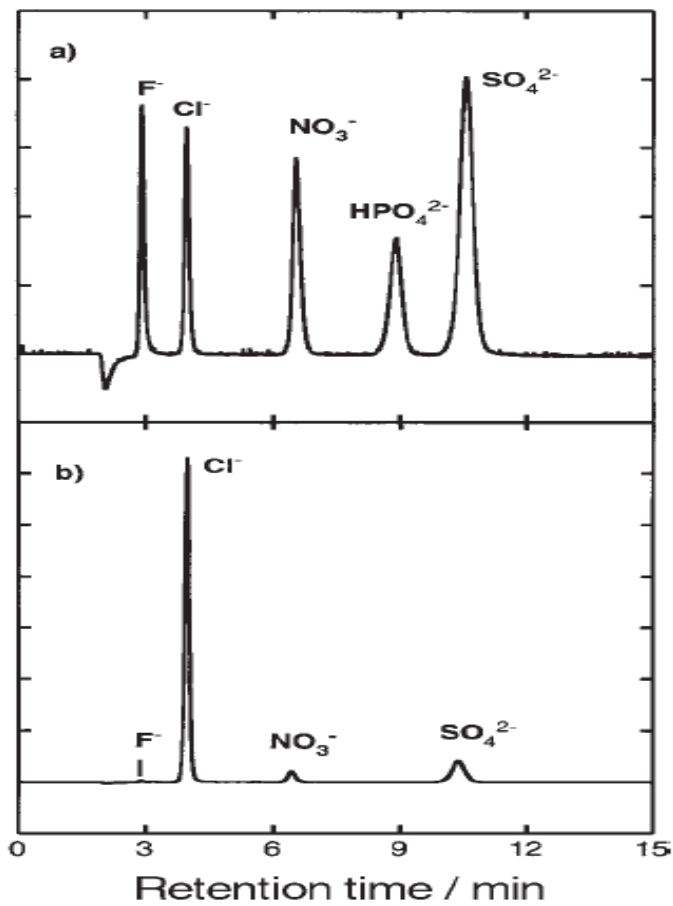
Baskılanmış-iyon katyon kromatografisi benzer bir şekilde çalışır, fakat baskılayıcı, bir anyon-değiştirici zar boyunca geri alma çözeltisindeki Cl^- , OH^- iyonu yer değiştirir. Şekilde $NaNO_3$ ve $CaSO_4$ 'ün ayrılması gösterilmektedir. HCl çözeltisi ile NaCl ve $CaCl_2$ katyon-değiştirici ayırma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

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 edilmezler, çünkü bu anyonlar çok zayıf iletken ürünlerine (H_2S gibi) dönüşürler.

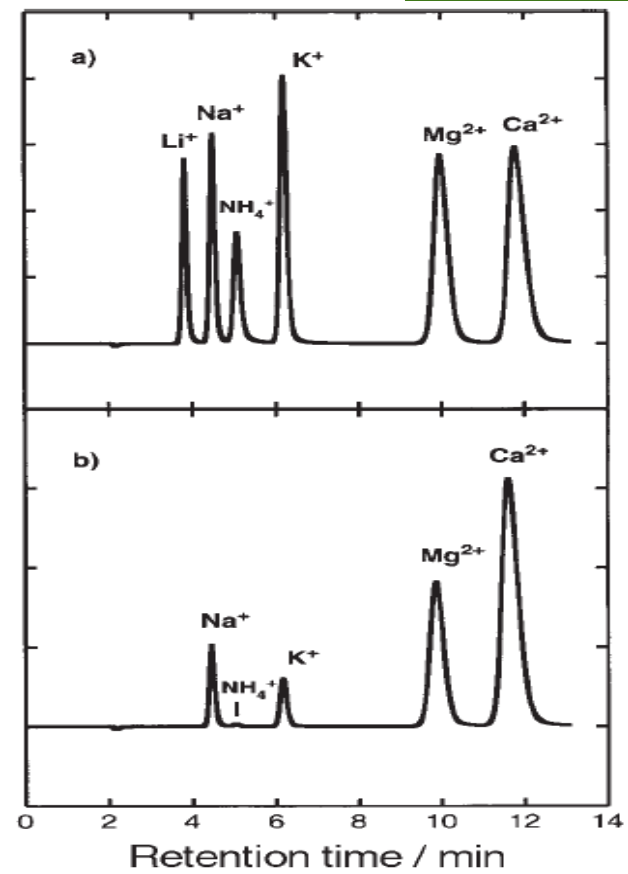


ŞEKİL Göl suyunun iyon kromatografisi. Üst kısımdaki kromatogramlar standartlardan elde edilmiştir. Alttağı göl suyu kromatogramlarında iyonların derişimleri $\mu g/mL$ (ppm) düzeyindedir. Anyon analizleri, iyon baskılanmış ve iletkenlik dedektörleri ile 1,0 mM $NaHCO_3/3,5$ mM Na_2CO_3 geri alma çözeltisi Katyon analizlerinde iyon baskılanmış 11 mM H_2SO_4 geri alma çözeltisi ile kullanılmıştır.

Detector signal / μS



Detector signal / μS

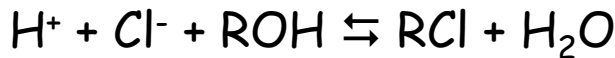


- (a) Standart çözeltide baskılanmış iyon kromatografiyle anyon analizi
(2,5 ppm F^- , 30 ppm Cl^- , 70 ppm NO_3^- , 150 ppm SO_4^{2-})
b) Göl suyunda anyon analizi : 0,26 ppm F^- , 43,6 ppm Cl^- , 5,5 ppm NO_3^- , 12,6 ppm SO_4^{2-})
Kolon: Ion Pac AS14; eluent: 1.0 mM NaHCO_3
3.5 mM Na_2CO_3 ; akış hızı: 1.2 mL/min;

- 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;

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 sıyırıcı kolon bulundurulur. Katyonların ayrılmasında sıyırıcı bir anyon-değiştirici reçinenin hidrokstiti ile doldurulur. Bu reçine HCL sıyırıcı çözeltiyi, katyonları etkilemeden adsorblayabilir. Sıyırıcı kolondaki reaksiyon aşağıdaki gibidir.

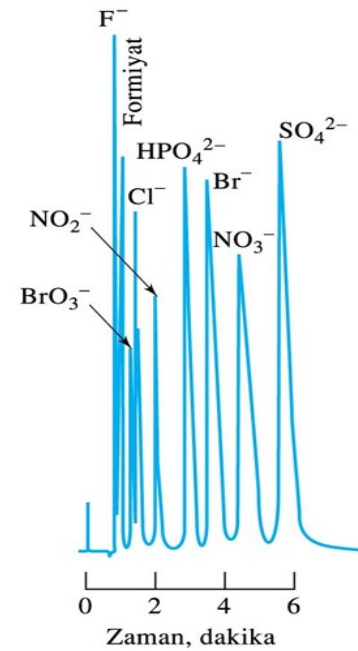


Anyonların ayrılmasındaki reaksiyon da,

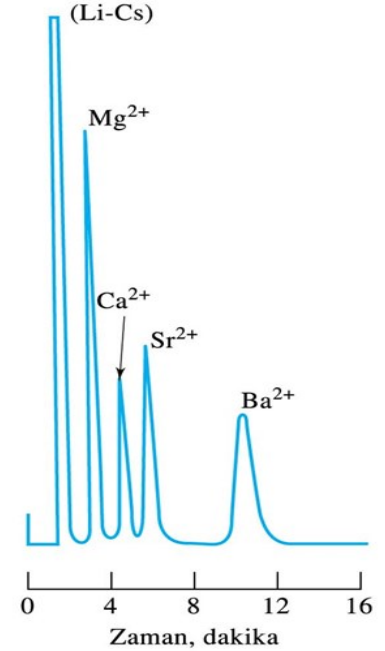


Derişimler, ppm	
F^-	3
Formiyat	8
BrO_3^-	10
Cl^-	4
NO_2^-	10
HPO_4^{2-}	30
Br^-	30
NO_3^-	30
SO_4^{2-}	25

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

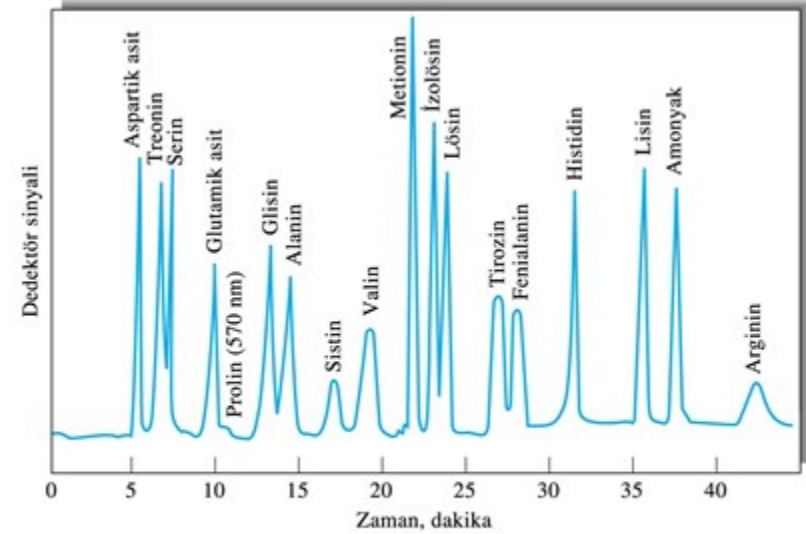


(a)



(b)

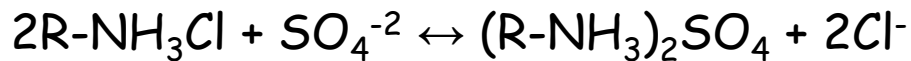
İyon-değişirici kromatografisi en çok amino asitlerin analizinde kullanılır. Örneğin, Şekilde, her birinden 1.0×10^{-8} mol bulunan 17 amino asit karışımının kromatogramı verilmiştir. Ayırma zamanı sadece 42 dakikadır. Değişik pH larda tamponlar kullanılarak kademeli geri yıkama uygulanmıştır.



Amino asitlerin iyon değişirici bir kolonda ayrılmaları. Dolgu maddesi: Tanecik boyutu 8 μ m olan kation değişirici. 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:

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

Yük denkliğinden bildiğimiz üzere: $[K^+]_o = [Cl^-]_o$ olur.
Reçine içerisinde üç farklı yüklü tür bulunur ve yük denkliği:

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

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

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

$$[K^+]_i^2 + 6[K^+]_i - 0,0025 = 0$$

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

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?

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

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

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

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

Çözüm:

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

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

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

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

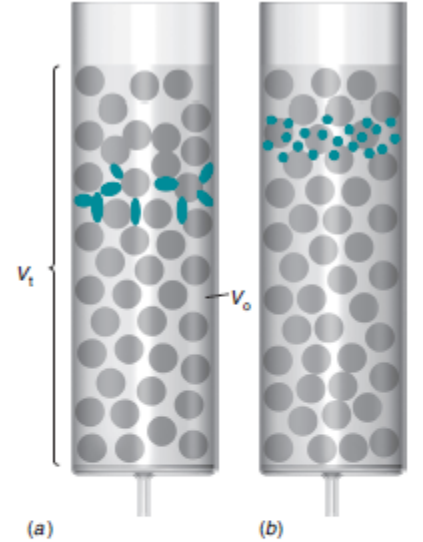
$$[Cl^-]_o/[Cl^-]_i = 1,0/0,303 = 3,30$$

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 geri alınır. Tuz giderme olarak bilinen bu teknik, bir makromolekül çözeltisinin tampon bileşimini değiştirmek için yararlıdır.



ŞEKİL 25-14 (a) Büyük moleküller durgun fazın gözeneklerine nüfuz edemez. Onlar hareketli fazın hacmine eşit çözücü hacmi ile kolondan geri alınırlar. (b) jelin içinde veya dışında bulunabilen küçük moleküller kolondan ayrılmak için büyük hacimlere ihtiyaç gösterirler. V_t jel ve çözücünün işgal ettiği toplam kolon hacmidir. V_o jel taneciklerinin dışındaki çözücü hacmidir. V_m jel taneciklerinin iç ve dışındaki çözücünün toplam hacmidir.

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

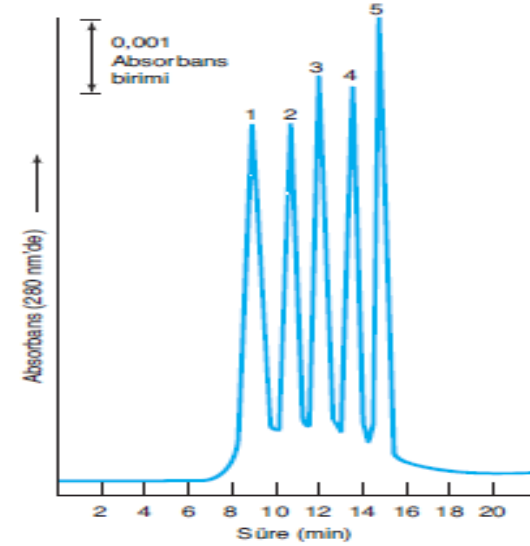
Açık kolonlar için jeller, preparatif-ölçekli moleküler dışlama, yapısı Şekil 25-2'de verilen Sephadex (Çizelge 25-4) ve *N,N*9-metilen bisakrilamid ile çapraz-bağlanmış bir poliakrilamid olan Bio-Gel P (Şekil 25-15) içerir. Oldukça fazla çapraz-bağlanmış jellerdeki en küçük gözenek boyutları mol kütlesi ≥ 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.

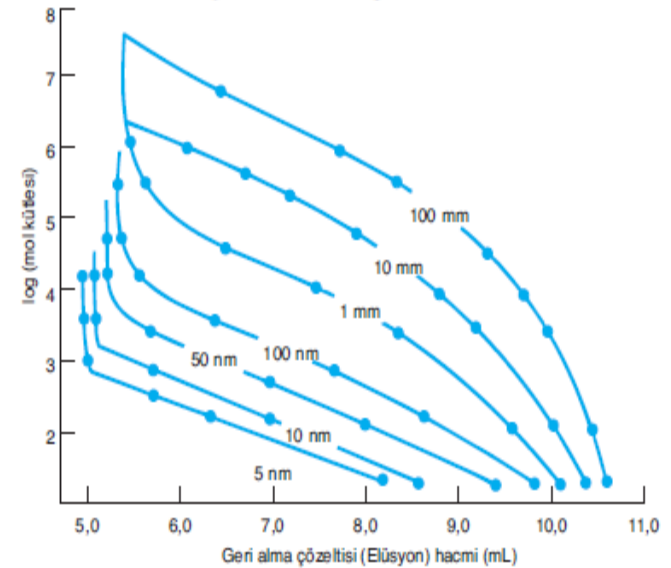
ÇİZELGE 25-4 Temsili moleküler dışlama ortamları

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			

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 Anspecc 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 deneme yapmalıyız, çünkü aynı mol kütleli fakat farklı şekilli moleküller farklı geri alma özelliği göstermektedir.

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

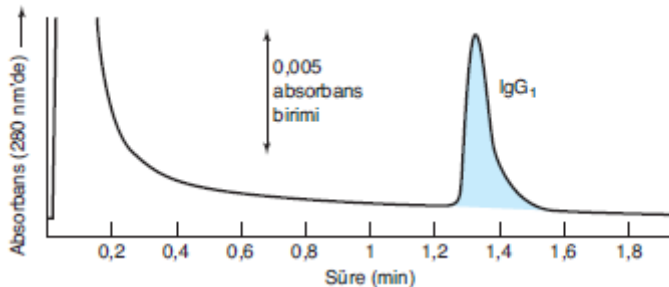
Etkileşim (Afinite) Kromatografisi

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

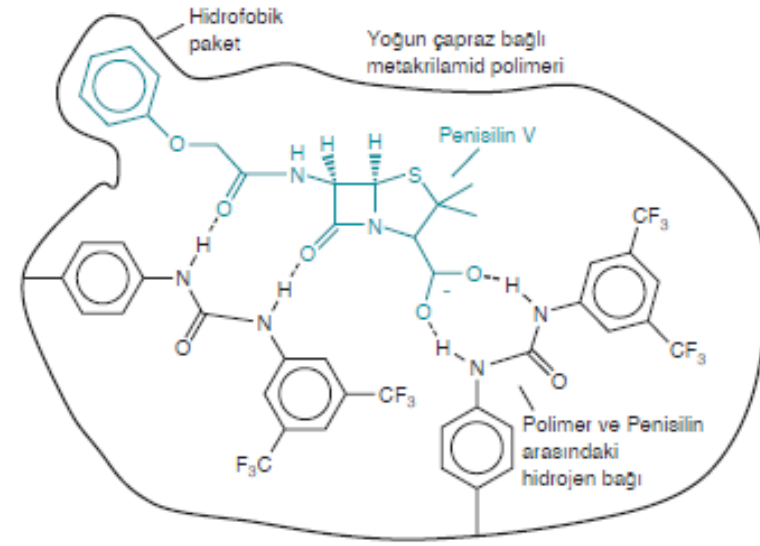
$\geq 7,2$ 'de IgG'nin özgün bir bölgesine bağlanır. IgG ve diğer proteinler içeren ham bir karışım pH 7,6'da kolondan geçirildiğinde IgG haricindeki herşey 0,3 min içerisinde kolondan çıkarlar.

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-

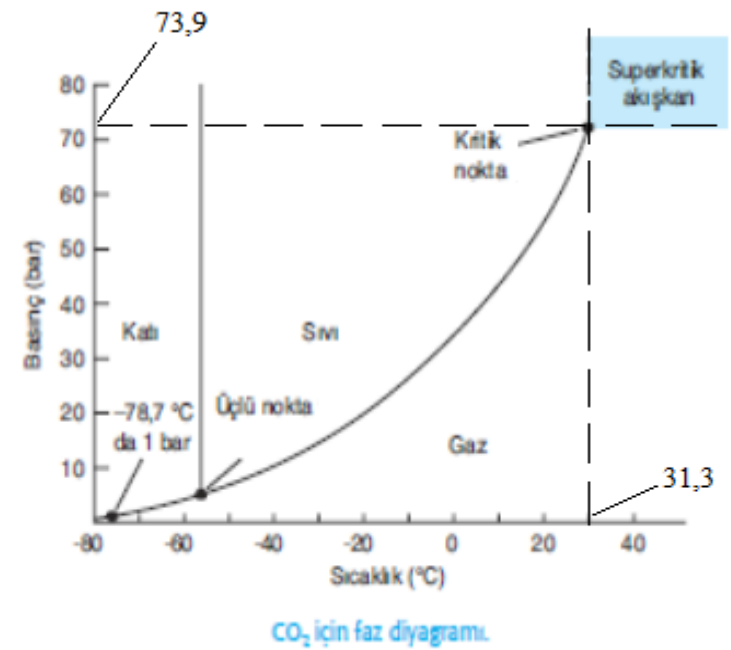
Baskılanmış polimer afinite kromatografisinde durgun bir faz veya bir kimyasal bir sensörde bir tanıma elemanı olarak kullanılabilir.

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 tetrabütülamonyum hidrojen sülfatın küçük hacimleri ile kolondan geri alınmıştır ve HPLC ile analiz edilmiştir.¹³⁹

Süperkritik Akışkan Kromatografisi

Karbon dioksitin faz diyagramında, $-78,7$ °C ve 1,00 bar basınçta katı CO_2 (Kuru Buz) gaz CO_2 ile dengededir. Katı karbon dioksit sıvılaşmadan süblimleşir. $-56,6$ °C'daki üçlü noktanın üzerindeki sıcaklıklarda sıvı ve buhar ayrı fazlar halinde bir arada bulunurlar. Örneğin 0 °C'da sıvı 34,9 bar'daki gaz ile dengededir. Sıvı-gaz sınırından yukarı çıkarsak 31,3 °C ve 73,9 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 ($\text{g cm}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$(1-3) \times 10^{-4}$	$(1-3) \times 10^{-4}$	$(0,2-3) \times 10^{-2}$

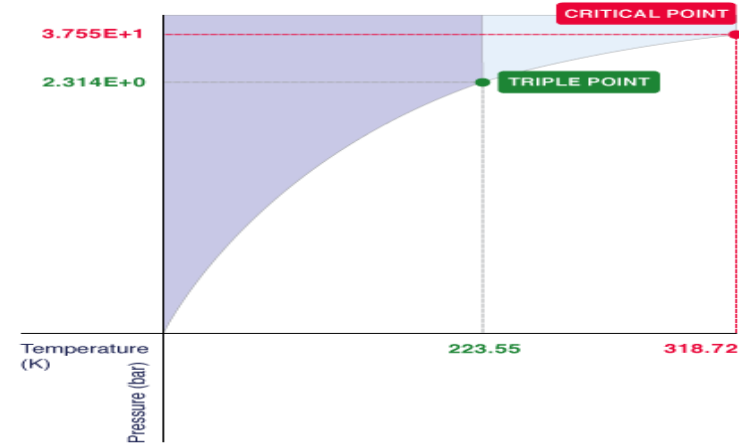
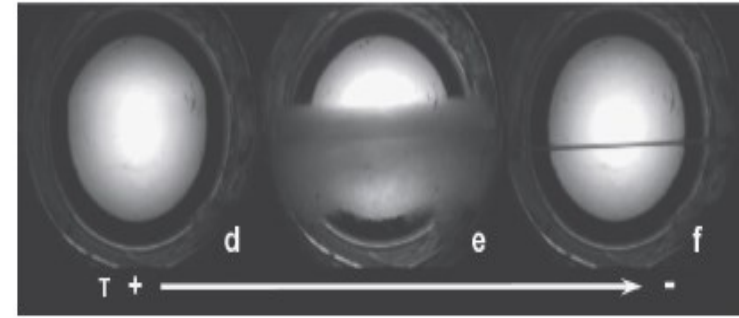
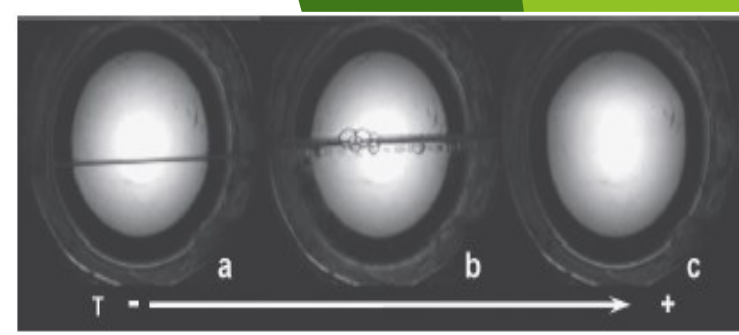
Not: Bütün verilerde sadece bir anlamlı rakam kullanılmıştır.

ÇİZELGE 29-2 Bazı Süperkritik Akışkanların Özellikleri*

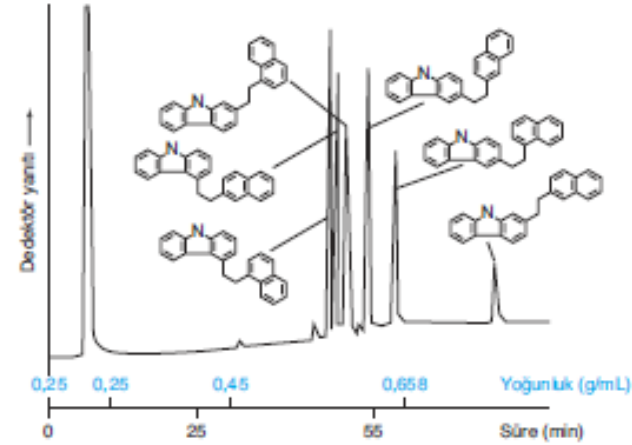
Akışkan	Kritik Sıcaklık, °C	Kritik Basınç, atm	Kritik Noktada Yoğunluk, g/mL	400 atm'de Yoğunluk, g/mL
CO_2	31,3	72,9	0,47	0,96
N_2O	36,5	71,7	0,45	0,94
NH_3	132,5	112,5	0,24	0,40
n-Butan	152,0	37,5	0,23	0,50

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

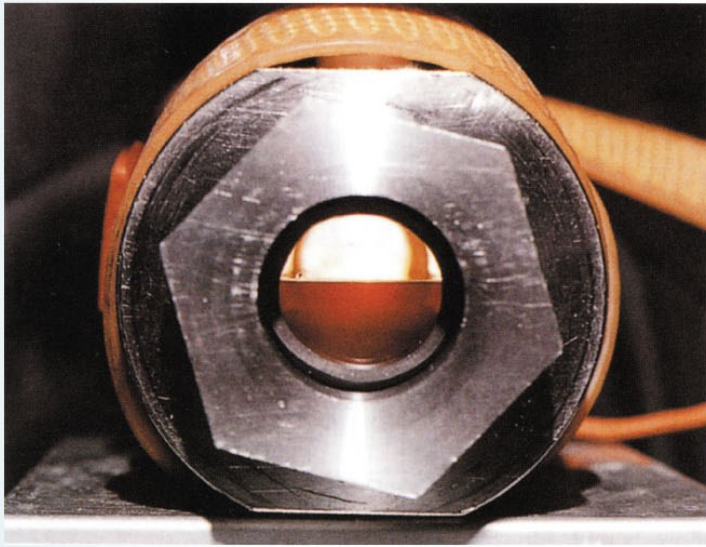
Süperkritik sıcaklıktaki SF_6 ($45,6^\circ\text{C}$) akışkanın ısıtıldığında ve soğutulduğunda meydana gelen farklı değişiklikler yandaki resimde gösterilmektedir. CO_2 ve organik çözücü karışımıyla gerçekleştirilen Süperkritik akış kromatografisi ilaç sanayinde kilogramlarca bileşik ve enantiyomerlerin ayrılmasında % 90'a varan organik çözücü tasarrufu sağlayan bir "yeşil" teknolojidir. Süperkritik akışkanın viskozitesinin düşük olması akış hızını artırarak verimliliğin yüksek olmasını sağlar. CO_2 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.



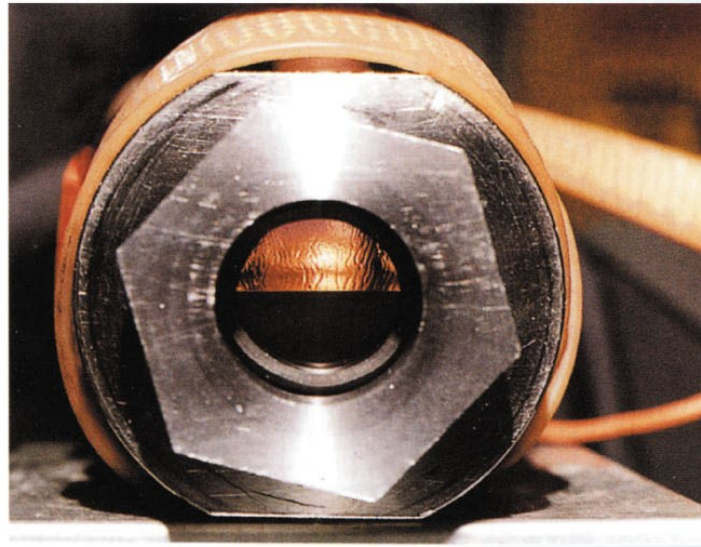
- Süperkritik akış kromatografisi için cihaz, dolgulu kolonlu ya da açık boru şekilli kolonlarla gerçekleştirilen HPLC'nin cihazına benzerdir.
- Geri alma kuvveti HPLC'de gradyent kolon yapılarak, gaz kromatografisinde sıcaklık yükseltilerek artırılır. Süperkritik akış
- kromatografisinde ise basınç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



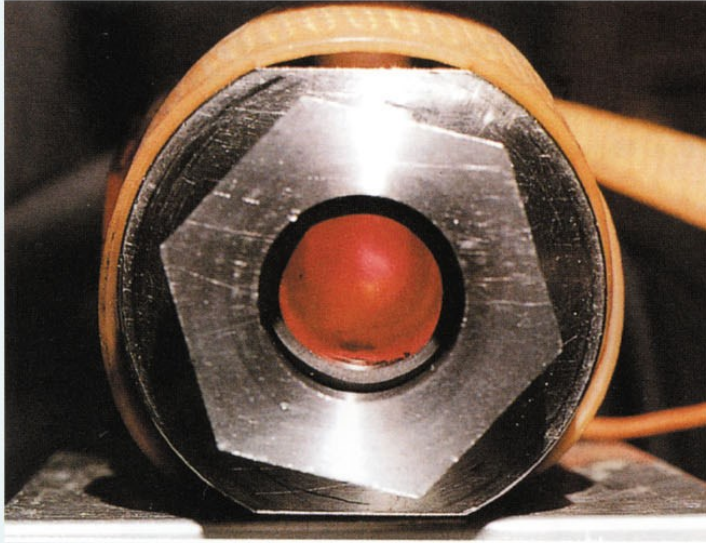
140 °C'da, yoğunluk-gradyent geri alması yapılarak aromatik bileşiklerin CO₂ ile açık boru şekilli kılcal süperkritik kromatogramı. [R. D. Smith, B. W. Wright, and C. R. Yonker, "Supercritical



(a)



(b)

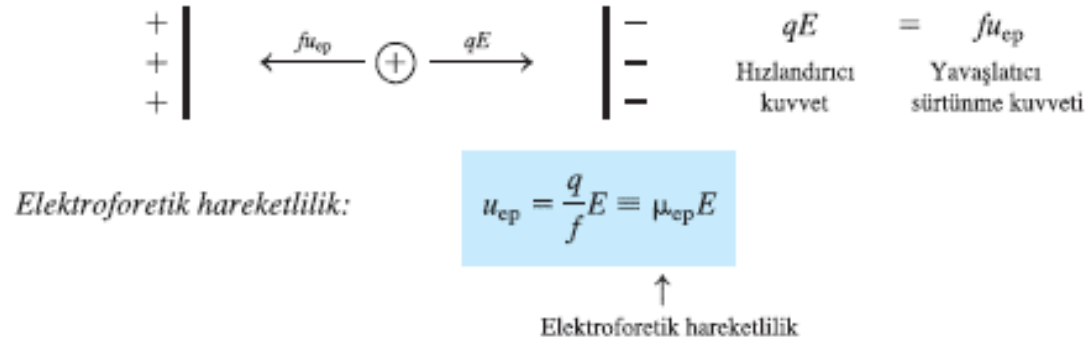


(c)

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.]

Kılcal Elektroferez

Elektroferez çözeltideki iyonların bir elektrik alanın etkisi altında göç etmesidir. Bu teknik, 1930 yılında İsveç'li kimyacılar tarafından geliştirildi. Tiselius, 1948 yılında "serum proteinlerin karmaşık yapısıyla ilgili buluşlar" başlıklı elektroferez ile ilgili çalışmasıyla Nobel ödülünü aldı.

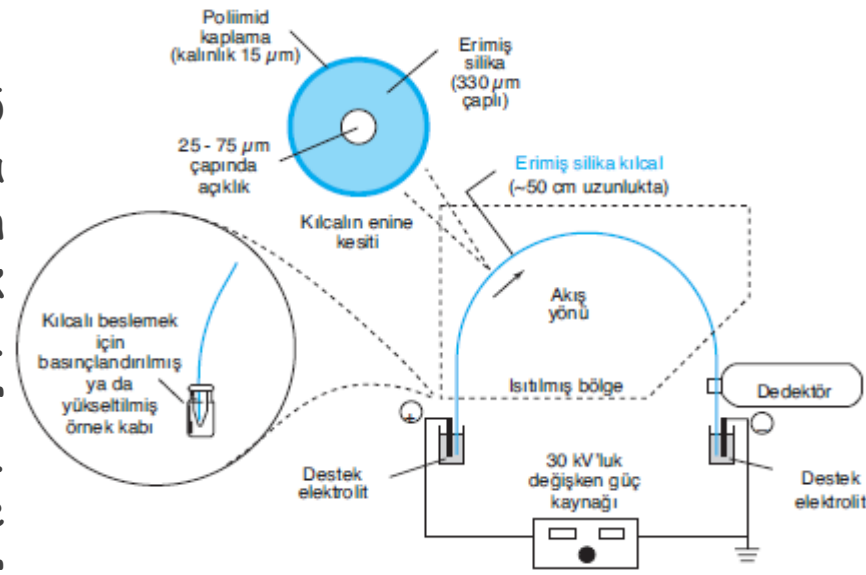


Yükü q (coulomb) olan bir iyon bir elektrik alanına $[E \text{ (V/m)}]$ koyulduğunda, iyon üzerine uygulanan kuvvet qE (newton) olur. Çözeltide *yavaşlatıcı sürtünme kuvveti* fu_{ep} olup, burada, u_{ep} iyonun hızı ve f ise sürtünme katsayısıdır. "ep" alt indisi "elektroferezi" belirtmektedir. Hızlandırıcı kuvvet sürtünme kuvvetine eşit olduğunda iyon çabukça kararlı bir hıza ulaşır:

Elektroforetik hareketlilik (μ_{ep}), iyon hızı ve elektrik alan şiddeti arasındaki orantı sabitidir.

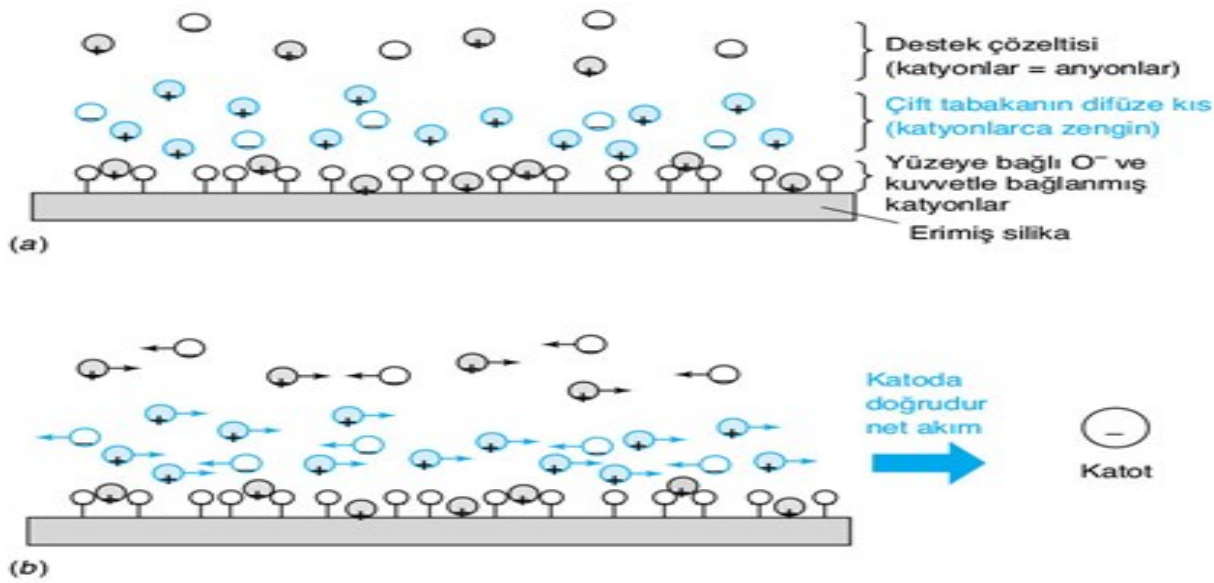
Hareketlilik iyon yükü ile doğru, sürtünme katsayısı ile ters orantılıdır. Benzer boyuttaki moleküllerde hareketlilik yüke bağlı olarak artar.

Şekil'de gösterilen kılcal elektroforezde, bir çözelti içerisindeki bileşenler, 25-75 μm 'lik iç çapa sahip 50 cm uzunluğunda erimiş-silikadan (SiO_2) kılcal bir borunun başından sonuna yaklaşık 30 kV elektrik voltajı uygulanarak birbirlerinden ayrılırlar. Farklı iyonlar farklı hareketliliğe sahiptirler ve kılcal içinde farklı hızlarla göç ederler. İyonların yanı sıra nötral molekülleri de ayırmak için bazı değişiklikler yapılabilir.



Elektroforez tıbbi teşhis için bütün hücreleri ayırabilir ve gıda bulaşanlarını teşhis edebilir. Elektroforez tek bir hücre, hücre çekirdeğini ya da mitokondrisini analiz edebilir. Tek bir hücre enziminin analizi zeptomol (10^{-21} mol) düzeyinde bir gözlenebilme sınırına sahiptir.

Kılcal elektroforez yüksek ayırma gücü sağlar. Kromatografiyi dolgu bir kolonda gerçekleştirdiğimizde, pikler van Deemter eşitliğinde yer alan üç mekanizma tarafından genişletilir: Çoklu akış yolu, uzunlamasına difüzyon ve sınırlı kütle aktarımı hızı. Açık borulu kolon çoklu yol mekanizmasını ortadan kaldırır ve böylece tabaka yüksekliğini azaltır ve ayırma gücünü artırır. Kılcal elektroforez, tabaka yüksekliğini maddenin kütle aktarımı sırasında hareketli faz ile durgun faz arasında dengeye gelmesi için gerekli süre terimini ortadan kaldırdığı için daha fazla düşürür. Kılcal elektroforezde durgun faz yoktur. İdeal koşullar altında pik genişlemesinin asıl kaynağı sadece uzunlamasına difüzyondur.



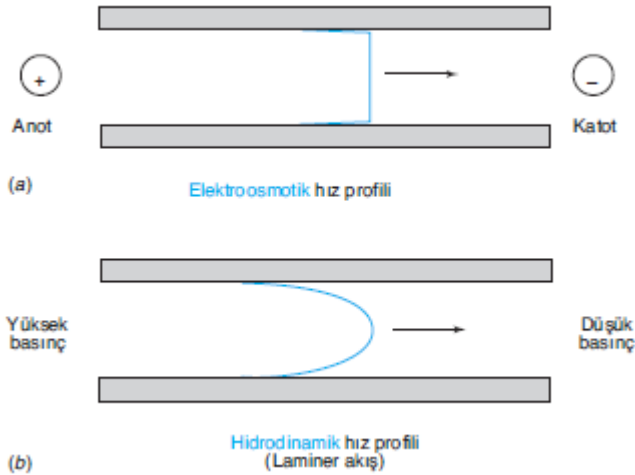
(a) Negatif olarak yüklenmiş silika yüzeyi ve ona yakın katyonlar tarafından üretilen elektrik çift tabaka. (b) Çift tabakanın difüze kısmında baskın olan katyonlar dış bir alan uygulandığında katoda doğru net elektroozmotik akış oluşturur.

Elektroozmoz

Erimiş silika kılcalın iç cidarı pH 3'ün üzerindeki pH'larda negatif yüke (Si-O-) sahip olan silanol (Si-OH) ile kaplanmıştır. Şekil, kılcal yüzeyde elektrik çift tabakayı göstermektedir. Çift tabaka, cidardaki sabitlenmiş negatif yüklerden ve cidara yakın yerlerde aşırı orandaki katyonlardan ibarettir. Sıkıca tutunmuş hareketsiz katyon tabakası negatif yükü kısmi olarak nötralleştirir. Kalan negatif yük cidara yakın çözeltideki çift tabakanın difüze kısmındaki hareketli katyonlar ile nötralleştirilir. Çift tabakanın difüze kısmının kalınlığı, iyonik şiddet 1 M olduğunda ~0,3 nm'den, iyonik şiddet 1 mM olduğunda yaklaşık 10 nm'ye kadar değişir.

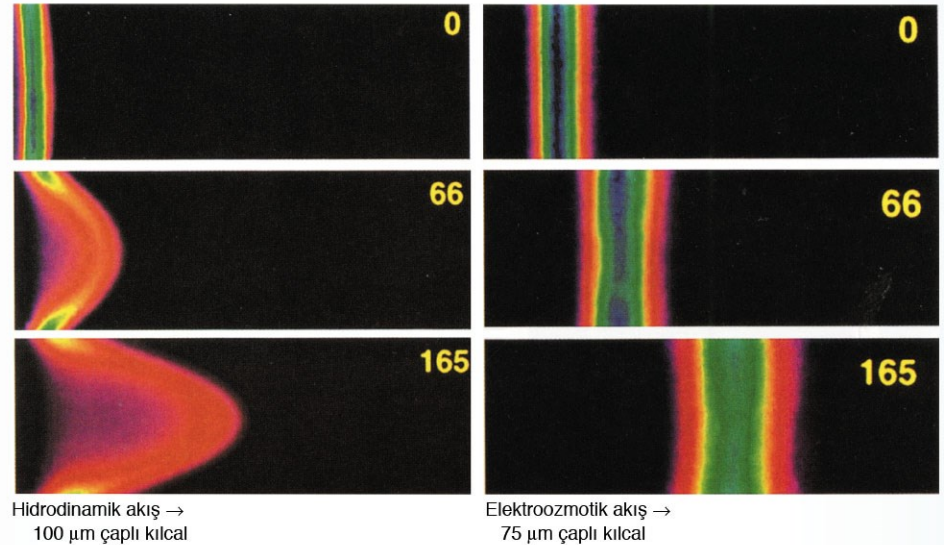
Bir elektrik alanında, katyonlar katoda, anyonlar ise anoda yönelir. Çift tabakanın difüze kısmındaki aşırı katyonlar katoda doğru net momentum gösterirler.

Elektroozmoz olarak adlandırılan bu pompalama hareketi cidarın yaklaşık 10 nm'lik bir kısmında katyonlar tarafından sürüklenir ve katoda doğru tüm çözeltinin elektroozmotik akışını düzenli bir şekilde oluşturur. Bu süreç basınç farklılıklarına göre oluşan *hidrodinamik akış* ile tamamen zıttır. Hidrodinamik akışta, sıvının bir kesit boyunca hız profili paraboliktir: Buna göre merkezde en hızlıdır ve cidarda 0'a kadar yavaşlar



(a) Elektroozmoz kılcalın enine kesitinin % 99,9 dan daha fazlasında düzenli bir akış verir. Kılcalın cidarının hemen yakınında hız azalır.

(b) Hidrodinamik akışın parabolik akış profili (aynı zamanda *laminer akış*) tüpün merkezinde en yüksek hız ve cidarda sıfır hız. Deneyisel olarak gözlenen hız profili Resim de gösterilmiştir.



Renkli Resim 30 Hidrodinamik ve Elektroozmotik Akış için Hız Profilleri (Bölüm 25-6) Bir floresan boya, akış başladıktan sonra 0,66 ve 165 ms'de bir kılcal tüp içinde görüntülendi. Bu görüntülerde boyanın en yüksek derişimi mavi, en düşük derişimi de kırmızı ile gösterilmektedir. Burada, farklı renkler farklı floresans şiddetlerine karşılık gelmektedir. [From P. H. Paul, M. G. Garguilo, and D. J. Rakestraw, Anal. Chem. 1998, 70, 2459. Aynı zamanda bakınız D. Ross, T. J. Johnson, and L. E. Locascio, Anal. Chem. 2001, 73, 2509.]

$$u_{eo} = \mu_{eo} E$$



Elektroozmotik Hareketlilik
(birimi = $m^2/[V \cdot s]$)

Elektroozmotik hız u_{eo} ve uygulanan alan arasındaki orantı sabiti *elektroozmotik hareketlilik* μ_{eo} olarak adlandırılır. Elektroozmotik hareketlilik silika yüzeyindeki yük yoğunluğu ile doğru, iyonik şiddetin kareköküyle ise ters orantılıdır. Elektroozmoz düşük pH'larda (Si-O-Si-OH yüzey yük yoğunluğunu azaltır) ve yüksek iyonik şiddette azalır. 20 mM borat tamponun pH 9'da elektroozmotik akışı yaklaşık 2 mm/s'dir. pH 3'te ise aynı değer 10 kat daha düşüktür.

Tekdüze elektroozmotik akış kılcal elektroforezin yüksek ayırma gücüne katkıda bulunur. Ozmotik akışı azaltan herhangi bir etki, pikin bozulmasına ve ayırma gücünün düşmesine sebep olur. Kılcal içerisindeki iyonların akışı saniyede I^2R joule oranında ısı (*Joule ısınması* olarak adlandırılır) açığa çıkarır. Bu formülde I akım (A) ve R çözeltinin direncidir (ohm). Birçok kılcalda, kılcal içerisindeki sıcaklık kontrolü için sulu termostat bölmesine ihtiyaç vardır. Tipik olarak, kılcal kanalın merkezindeki sıcaklık kanalın sonundaki kısmından 0.02- 0,3 K kadar daha fazladır. Daha sıcak bölgedeki daha düşük vizkozite sıvının tekdüze elektroosmotik profilini bozar. Joule ısınması 50 μm iç çaplı kılcal bir boruda önemli bir problemdir. Fakat iç çap ≥ 1 mm olursa sıcaklık gradyentiyle problem ortadan kaldırılmaktadır. Kılcal içerisindeki çözeltinin elektrik iletkenliğini azaltmak için kılcal, bazı araçlarla soğutulur ve Joule ısınmasının kontrolden çıkması önlenir.

Hareketlilik

Bir iyonun görünür (ya da gözlenen) hareketliliği $\mu_{\text{gör}}$ çözeltinin elektroosmotik hareketliliği ile iyonun toplam elektroforetik hareketliliğinin toplamıdır. Elektroosmotik akış olarak aynı yönde hareket eden bir analit katyonu için, μ_{ep} ve μ_{eo} aynı işarete sahiptir, böylece $\mu_{\text{gör}}$, μ_{ep} 'den daha büyüktür. Elektroforez elektroosmozdan zıt yöne doğru anyonların taşınmasını sağlar (Şekil 25-24b), böylece anyonlar için Eşitlik 25-11'deki

iki terim ters işaretlidir. Nötral ya da yüksek pH'larda, enerjik elektroosmoz anyonları katoda taşır, çünkü elektroosmoz genellikle elektroforezden daha hızlıdır. Düşük pH'larda, elektroosmoz zayıftır ve anyonlar detektöre varamazlar. Düşük pH'larda anyonlar ayrılmak istenirse örneğin sonunu negatif ve dedektörün sonunu pozitif yapmak için polarite ters çevrilebilir. Belirli bir türün görünür hareketliliği, $\mu_{\text{gör}}$, o türün net hızının, u_{net} , elektrik alanına, E , bölünmesiyle elde edilir:

$$\mu_{\text{gör}} = \mu_{\text{ep}} + \mu_{\text{eo}}$$

$$\mu_{\text{gör}} = \frac{u_{\text{net}}}{E} = \frac{L_d/t}{V/L_t}$$

$$\mu_{\text{eo}} = \frac{u_{\text{nötral}}}{E} = \frac{L_d/t_{\text{nötral}}}{V/L_t}$$

Burada, L_d enjektörden detektöre kadar kolonun uzunluğu, L_t uçtan uca kolonun toplam uzunluğu, V iki uç arasına uygulanan gerilim ve t enjeksiyondan sonra çözünenin detektöre göç etmesi için gerekli olan süredir. 149

ÖRNEK: Bir Protein Yük Merdivenindeki Hareketlilikler

Bovin karbonik anhidraz enzimi 18 lizin parçalı bir proteindir. Şekil 25-26'daki 19 pik, değiştirilmemiş proteinden (P^{n-}) proteine kadar asetilleme derecesiyle oluşur: $P^{(n+1)-}$, $P^{(n+2)-}$, $P^{(n+3)-}$, ..., $P^{(n+18)-}$. 0,840 m uzunluğunda kılcal kolona uygulanan gerilim $2,50 \cdot 10^4$ V'dur. Elektroozmotik akış ile taşınan nötral işaretleyici bir molekülün detektöre girişten 0,640 m'ye kadar taşınması için 308 s'ye ihtiyaç vardır. P^{n-} ve $P^{(n+1)-}$ nin göç etme süreleri sırasıyla 343 s ve 355 s'dir. Elektroozmotik hız ve elektroozmotik hareketliliği bulunuz. P^{n-} ve $P^{(n+1)-}$ nin görünür ve elektroforetik hareketliliklerini bulunuz.

Çözüm Elektroozmotik hız, u_{eo} , nötral işaretleyicinin göç etme süresinden bulunur:

$$\text{Elektroozmotik hız} = \frac{\text{Detektöre olan uzaklık } (L_d)}{\text{Göç etme süresi}} = \frac{0,640 \text{ m}}{308 \text{ s}} = 2,08 \text{ mm/s}$$

Elektrik alanı, gerilimin kolonun toplam uzunluğu L_t 'ye bölünmesidir: $E = 25000 \text{ V} / 0,840 \text{ m} = 2,98 \cdot 10^4 \text{ V/m}$. Hareketlilik, hız ve elektrik alanı arasındaki orantı sabitidir.

$$u_{eo} = \mu_{eo} E \Rightarrow \mu_{eo} = \frac{u_{eo}}{E} = \frac{0,00208 \text{ m/s}}{2,98 \times 10^4 \text{ V/m}} = 6,98 \times 10^{-8} \frac{\text{m}^2}{\text{V} \cdot \text{s}}$$

$$\mu_{\text{gör}} = \frac{u_{\text{net}}}{E} = \frac{0,640 \text{ m} / 343 \text{ s}}{2,98 \times 10^4 \text{ V/m}} = 6,26 \times 10^{-8} \frac{\text{m}^2}{\text{V} \cdot \text{s}}$$
$$\mu_{\text{gör}} = \mu_{ep} + \mu_{eo} \Rightarrow \mu_{ep} = \mu_{\text{gör}} - \mu_{eo} = (6,26 - 6,98) \times 10^{-8} \frac{\text{m}^2}{\text{V} \cdot \text{s}} = -0,72 \times 10^{-8} \frac{\text{m}^2}{\text{V} \cdot \text{s}}$$

Kuramsal Tabakalar ve Ayırma gücü

Girişten detektöre uzunluğu L_d olan bir kılcal kolonu düşünün. Daha önceki bölümlerde kuramsal tabaka sayısını, $N = L^2 d / \sigma^2$ (σ bandın standart sapması) olarak tanımlamıştık. Eğer band genişlemesinin tek mekanizması sadece uzunlamasına difüzyon ise, standart sapma elde edilir. Bu eşitlikteki D difüzyon sabiti, t göç etme süresi ($= L_d / u_{net} = L_d / [\mu_{gör} E]$) dir. Tanımlanan elektrik alanı ($E = V / Lt$; V uygulanan gerilim) ile bu eşitlikleri birleştirirsek tabaka sayısını veren ifadeyi elde ederiz:

$$N = \frac{\mu_{gör} V L_d}{2D L_t}$$

Ulaşmak istediğimiz tabaka sayısı kaç tanedir? Tipik bir $\mu_{gör} = 2 \cdot 10^{-8} \text{ m}^2 / (\text{V} \cdot \text{s})$ değerini ($L_t = 60 \text{ cm}$, $L_d = 50 \text{ cm}$ ve 25 kV 'luk bir kılcalda 10 min 'lık bir göç süresi için elde edilen değer) ve Çizelgeden bulunan difüzyon katsayısını kullanarak, tabaka sayısını bulabiliriz:

$$\text{K}^+ \text{ iyonu için: } N = \frac{[2 \times 10^{-8} \text{ m}^2 / (\text{V} \cdot \text{s})][25\,000 \text{ V}]}{2(2 \times 10^{-9} \text{ m}^2 / \text{s})} \frac{0,50 \text{ m}}{0,60 \text{ m}} = 1,0 \times 10^5 \text{ tabaka}$$

$$\text{Serum albümin için: } N = \frac{[2 \times 10^{-8} \text{ m}^2 / (\text{V} \cdot \text{s})][25\,000 \text{ V}]}{2(0,059 \times 10^{-9} \text{ m}^2 / \text{s})} \frac{0,50 \text{ m}}{0,60 \text{ m}} = 3,5 \times 10^6 \text{ tabaka}$$

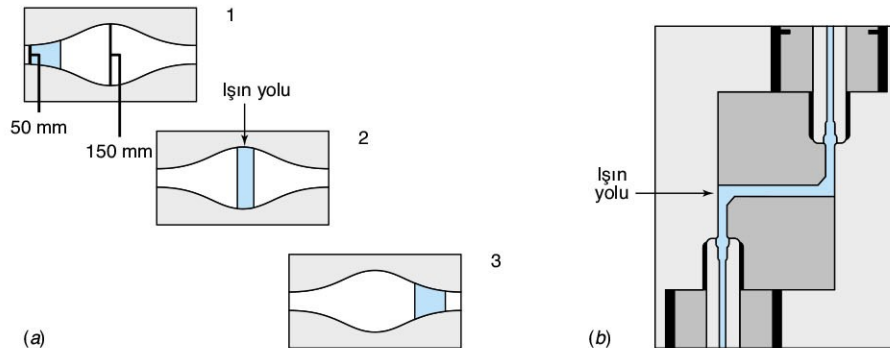
Kromatografide olduğu gibi elektroferogramdaki birbirine yakın A ve B pikleri arasındaki ayırma gücü tabaka sayısı (N) ve ayırma faktörüyle (γ) ilişkilidir:

Ayırma gücü . Ayırma faktörü ($\gamma = u_{net,A} / u_{net,B}$) göç etme süreleri t_B / t_A oranıdır. γ değerinin artışı piklerin ayrılmasını artırır ve N 'nin artması piklerin

Dedektörler

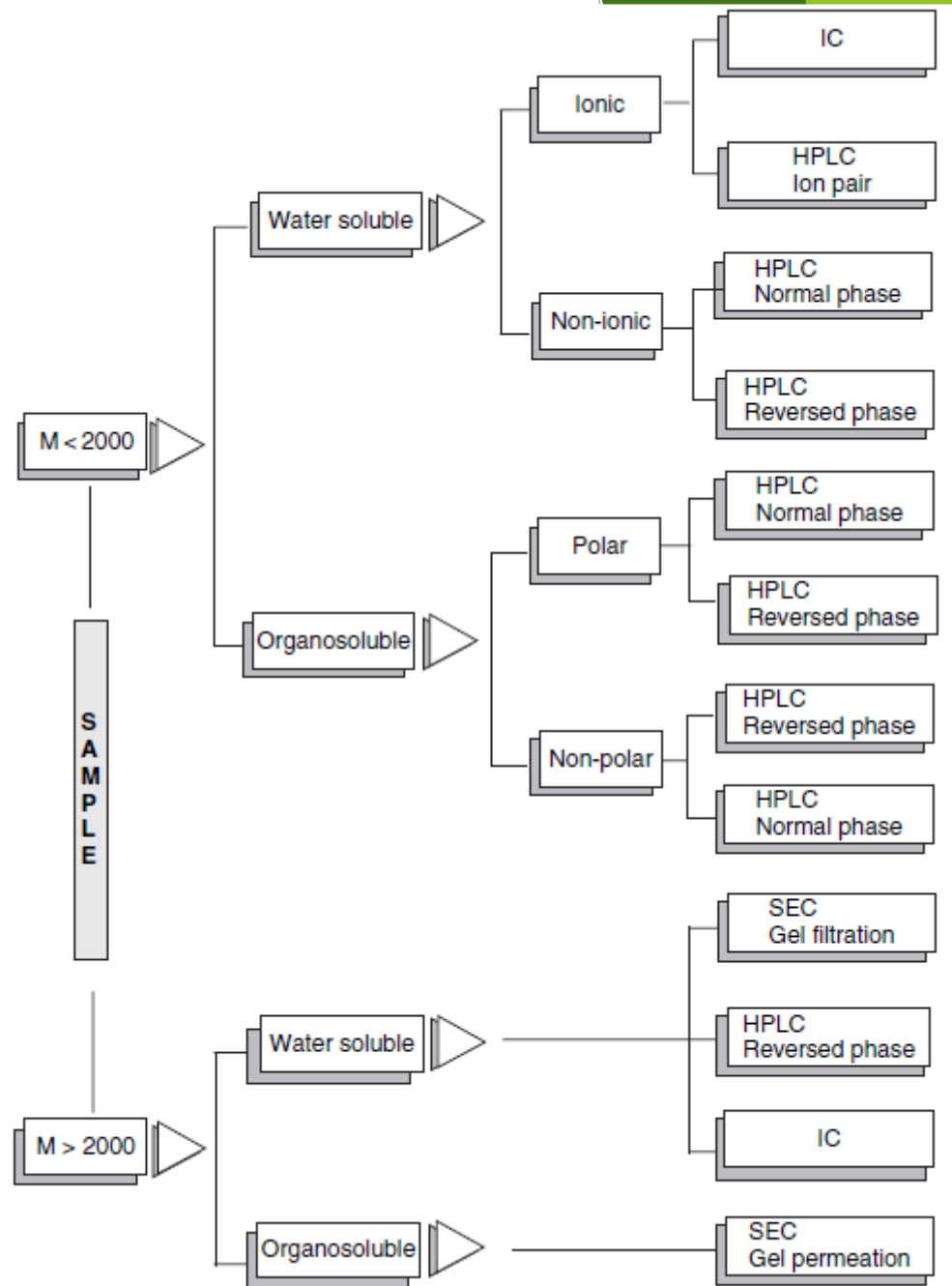
Su o kadar geçirgendir ki, morötesi dedektörler 185 nm'ye kadar kısa dalga boylarında kullanılabilir. Bu dalga boylarında çözünenlerin çoğu kuvvetli absorpsiyona sahiptir. Kısa dalga boylu morötesi dedektörlerin avantajlı olması için zemin elektrolit çok düşük absorpsiyona sahip olmalıdır. Borat tamponu yüksek geçirgenliklerinden dolayı elektroforezde çok yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Optik ışın yolu ancak kılcal kadar geniş (bu da 25-75 μm) olduğu için duyarlık kötüdür. Şekil 25-33 absorbands sinyal/görüntü oranı 3-5 kat kadar arttığı "balon hücre" ve sinyal-gürültü oranının 10 katı kadar arttığı dik açılı bükülmeyi göstermektedir.

Ancak, dik-açılı bükülme tasarımındaki daha büyük olan ışın yolu bir miktar bant genişlemesine sebep olur. Art arda gelen pikler 3 mm kadar ayrılmalıdır, aksi halde dedektörde üst üste geleceklerdir.



ŞEKİL 25-33 Kılcal, morötesi absorpsiyonu ölçmek için ışın yolunu artırmak amacıyla tasarlanmıştır. (a) Balon hücre. Çözünen bölgenin "Bloğu" balon içerisinden geçerken korunur (b) Dik açılı kıvrım. Kaçak ışınlar engellemek için ışın yolu erimiş siyah silikadan yapılmıştır. Yansıtıcı iç yüzey geçişi en yüksek yapmak için "ışın borusu" olarak görev yapar. Dedektör yanıtı 1,4 absorbands birimine kadar doğrusaldır. [Courtesy Agilent Technologies, Palo Alto, CA]

Kromatografik Analiz yöntem seçimi



Yararlanılan 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.
- [3] Enstrümental Analiz, Skoog, Holler , Nieman , 6.Baskı, Çeviri editörleri: E. Kılıç, H. Yılmaz. Bilim Yayıncılık, Ankara,
- [4] http://www.bayar.edu.tr/besergil/enstrumental_analiz