



KROMATOGRFİK TEKNİKLER

BALIKESİR ÜNİVERSİTESİ FEN-EDEBİYAT FAKÜLTESİ KİMYA BÖLÜMÜ

Sibel SANDIKÇIOĞLU

Danışman: Prof. Dr. Nuri NAKİBOĞLU



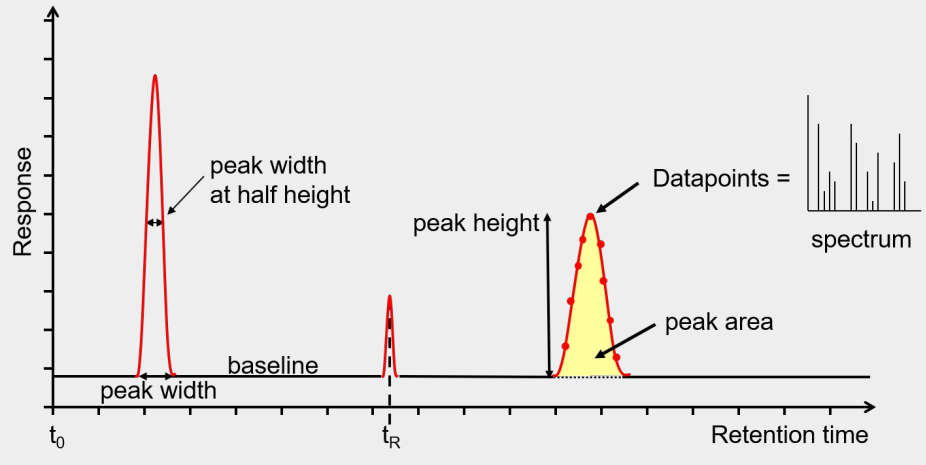
Kromatografi, bir karışımda bulunan maddelerin, biri sabit diğeri hareketli faz olmak üzere birbirleriyle karışmayan iki fazlı bir sistemde ayrılması, tanınması ve saflaştırılması yöntemlerinin genel adıdır. Çeşitli maddelerin hareketli faz yardımıyla, sabit faz üzerinden, değişik hızlarla hareket etmeleri veya sürüklenmeleri esasına dayanır.

GC ÇALIŞMA PRENSİBİ

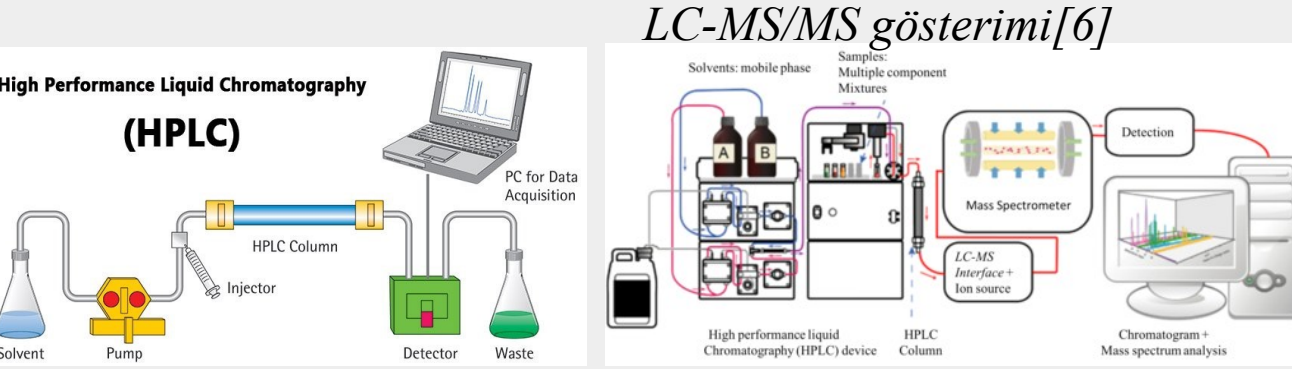
Helyum gibi inert bir gaz kolon boyunca taşıyıcı gaz olarak geçirilir ve hareketli fazı oluşturur. Diğer çoğu kromatografi çeşitlerinin aksine hareketli faz analitle etkileşmez, yalnızca kolon boyunca moleküllerin hareketine yardımcı olur. Örnek kolona çok sıcak bir kısımdan enjekte edilir ve buharlaştırılır. Helyum ile karışmış gaz örneği kolon boyunca taşıyıcı gaz yardımıyla hareket eder. Örnekteki çeşitli bileşikler kolon sıvısı içinde farklı çözünürlüğe sahiptirler ve bu bileşikler bir parça soğuyarak kolon destek materyaline deposit olurlar. Bununla birlikte kolon hala onları buharlaştıracak kadar yeterli sıcaklığa sahiptir. Bileşiklerin farklı kaynama noktaları olduğu için bu işlem farklı hızlarda olacaktır. Dolayısıyla ayırmanın temelinde bileşiklerin kaynama noktaları ve durgun fazla olan etkileşimleri vardır. Kolon boyunca bu olay defalarca tekrar eder. Böylece örnek bileşenlerine ayrılır ve bunlar kolondan farklı zamanlarda çıkarlar. Kolonun sonunda çıkan gazın bileşimine duyarlı bir dedektör bulunur ve sinyaller kaydedilir.

GAZ KROMATOGRFİSİ-KÜTLE SPEKTROMETRESİ (GC-MS)

GC ile yapılan ayırmada, bileşiklerin kolondaki alıkonma zamanlarına göre kalitatif tayin yapılabilmektedir. Ancak aynı gaz kromatografik şartlarda alıkonma zamanları aynı olan birden fazla molekül olabilir. Bu nedenle gaz kromatografide tam teşhis mümkün olmayabilir. GC-MS'de uçucu organik bileşikler analiz edilmektedir. Analiz edilmek istenen örnekteki elementler GC de iyonlaştırıldıktan sonra kütle spektroskopisine gönderilirler ve burada kütle/yük (m/z) oranlarına göre ayrılarak kalitatif ve kantitatif ölçümler yapılmaktadır. GC-MS'de yürütücü gaz olarak helyum gazı kullanılır.



Bir GC veya GC-MS kromatogram çıktısı[4]



HPLC CİHAZLARI

-Hareketli Faz Haznesi

Modern bir HPLC cihazında bir veya daha çok cam veya paslanmaz çelik kaplar bulunur. Bunların her biri 500 mL'den daha fazla çözücü alacak kapasiteye sahiptir. Sistemde kullanılan hareketli fazın seçimi uygulanan ayırma tipine bağlıdır. HPLC sistemlerinde kullanılacak tüm çözümler çok saf olmalıdır. Az miktardaki safsızlık kolonu etkileyerek dedeksiyon sisteminde girişime neden olabilirler.

-Pompa Sistemleri

HPLC pompası, sıvı kromatografi sisteminin en önemli kısımlarından biridir. Sistemde elüentin, enjektör, kolon ve dedektör boyunca sürekli sabit akışını sağlayan kısımdır. HPLC'de kullanılan başlıca iki tip pompa vardır. Bunlar; pistonlu pompalar ve vida güdümlü sürgülü pompalardır. Modern ticari cihazların hemen hemen hepsinde pistonlu pompa kullanılır.

-Numune Enjeksiyon Sistemi

Örnek HPLC'ye enjeksiyon ünitesinden enjekte edilir. Genellikle enjekte edilen numune hacimleri 0,1 – 20 µL arasındadır. Sistemdeki yüksek basınca dayanıklı olmalıdır.

-Kolon

5 – 100 °C arasında ayarlanabilmektedir. Ayırma kolonda gerçekleşir. Durgun faz mm boyutlu poröz partiküllerden oluşur, bu nedenle hareketli fazın kolondan geçişi için yüksek basınç pompalarına ihtiyaç vardır. Ayırım, bileşenlerin fiziksel veya kimyasal özelliklerine göre gerçekleşir. Analizler için doğru kolon seçimini yapmak çok önemlidir.

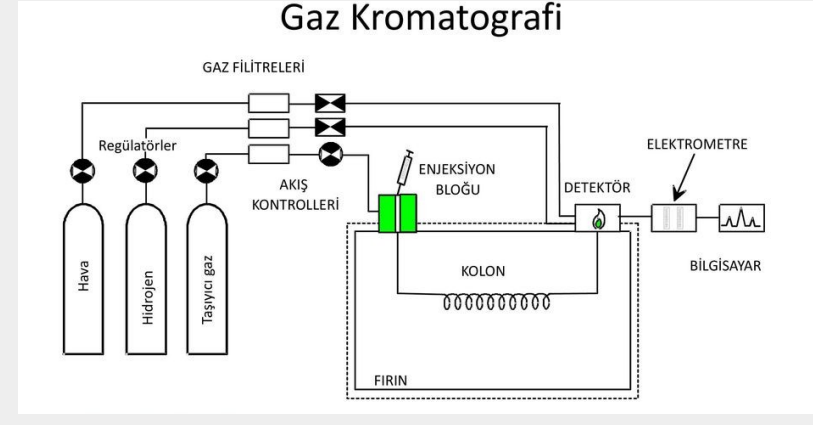
-Dedektör

Kolonu terk eden bileşenleri görebilmemizi ve ayrılan moleküllerin miktarını belirlememizi sağlar. Dedektörden geçen maddeler bir kaydedici yardımıyla kaydedilerek, zamana karşı dedektör cevabına ait bir grafik oluştururlar buna da kromatogram denir. En çok kullanılan dedektörler; spektroskopik, floresans ve diferansiyel kırma indisidir.

-Kaydedici

KROMATOGRFİNİN SINIFLANDIRILIMASI

1. Ayrılma mekanizmalarına göre: <ul style="list-style-type: none"> •Adsorpsiyon kromatografisi •Dağılıma kromatografisi •İyon değiştirme kromatografisi •Jel filtrasyon (boyut ayırıcı) kromatografisi •Afinite kromatografisi 	2. Uygulama biçimine göre <ul style="list-style-type: none"> •Kolon kromatografisi <ul style="list-style-type: none"> •Gaz kromatografisi (GC) •Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) •Düzlemsel kromatografi <ul style="list-style-type: none"> •Kağıt kromatografisi •İnce tabaka kromatografisi (TLC) 	3. Faz tiplerine göre <ul style="list-style-type: none"> •Sıvı kromatografisi <ul style="list-style-type: none"> •Sıvı-katı kromatografisi •Sıvı-sıvı kromatografisi •Gaz kromatografisi <ul style="list-style-type: none"> •Gaz-katı kromatografisi •Gaz-sıvı kromatografisi
--	---	---



Tablo 1 : Gaz kromatografisi dedektörleri [2]

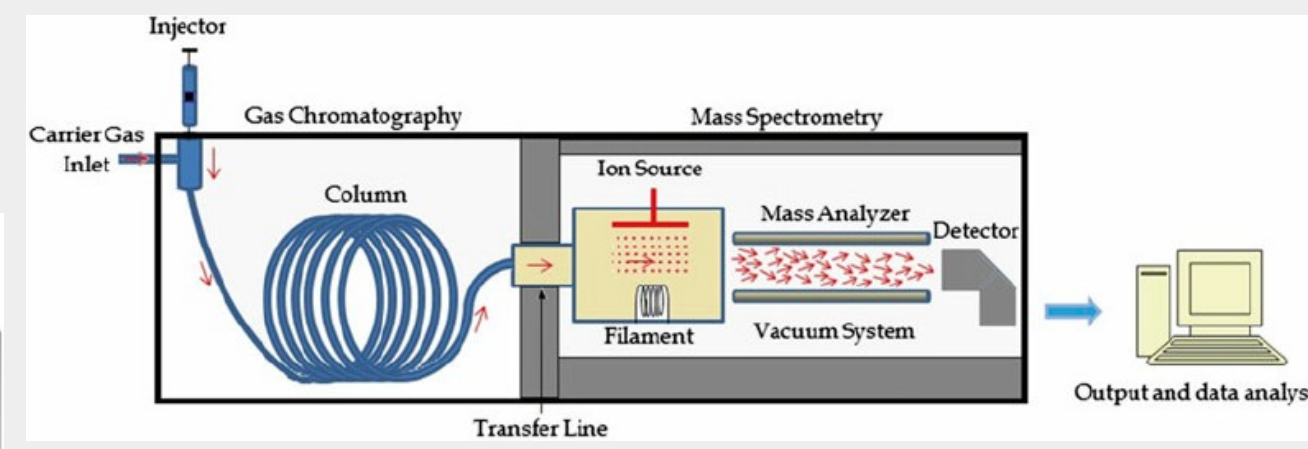
Tipi	Uygulanan Numuneler	Gözlenebilme Sınırı
Alev iyonlaşma	Hidrokarbonlar	1 pg/s
Termal iletkenlik	Her tip bileşik	500 pg/mL
Elektron yakalama	Halojenli bileşikler	5 fg/s
Kütle spektrometre (MS)	Her tür için ayarlanabilir	0,25 – 100 pg
Termiyonik	Azot ve fosfor bileşikleri	0,1 pg/s (P), 1 pg/s (N)
Elektrolitik iletkenlik (Hall)	Halogen, 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

GC-MS ÇALIŞMA PRENSİBİ

Gaz kromatografisi/kütle spektroskopisi (GC-MS), iki güçlü analitik tekniğin kombinasyonudur. Gaz kromatografisi, karışımdaki bileşenleri ayırır. Kütle spektroskopisi, her bir bileşenin yapısal olarak tanımlanmasında yardımcı olur. Çok düşük miktarlardaki örneklerin tanımlanması, güçlü yapısal analiz, hızlı analiz süresi gibi önemli avantajları bulunmaktadır.

GC-MS sistemi çok bileşenli karışımlardaki elementlerin belirlenmesinde, gaz fazında bulunan ya da gazlaştırılabilen organik numunelerin kütle kromatografik yöntemle ayırımı sağlar. Elde edilen spektrumlar yardımıyla ileri seviye (organik, inorganik ve biyolojik) moleküler yapı tayinlerinde, kalitatif ve kantitatif çalışmalar için kullanılan yüksek performanslı ve yüksek hızlı bir gaz kromatografisi kütle spektrometresi sistemidir. Cihazlarında ppm ve ppb hassasiyette uçucu organik bileşik içeren her türlü madde analiz edilebilmektedir.

GC-MS gösterimi



GC UYGULAMA ALANLARI

Biyokimya, biyoteknoloji, petrokimya, farmakoloji, Bitkisel yağlardan sterollerin ayrılmasında, Gentik, gıda

Adli tıp toksikoloji laboratuvarlarında, Amino asitlerin kalitatif ve kantitatif tayininde Temiz su, atık su, katı atık ve atık yağ numunelerinde düşük miktarlardaki mineral yağ ve hidrokarbonların belirlenmesi amacıyla ayırma ve analiz için kullanılmaktadır.

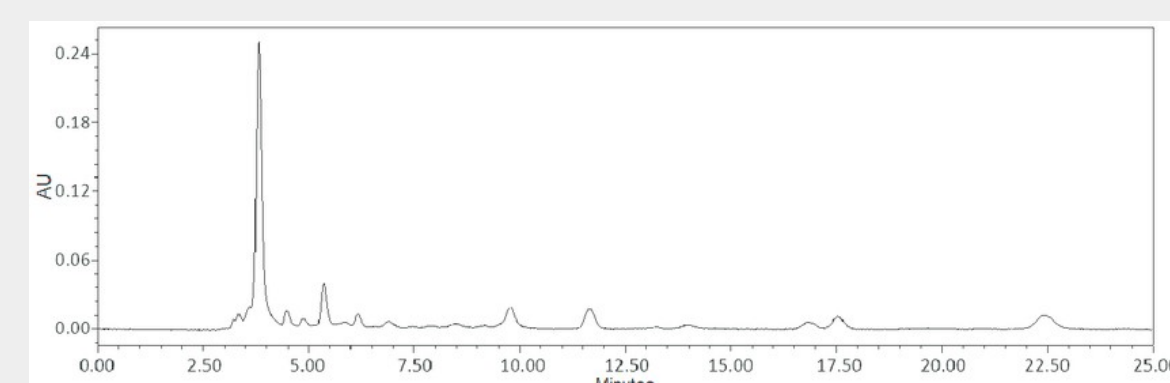
YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRFİSİ (HPLC)

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) bir sıvıda çözülmüş bileşenlerin, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile değişik etkileşimlere girmesi, kolon içinde değişik hızlarla hareket etmeleri sonucu, farklı zamanlarda bileşenlerin kolonu terk ederek birbirinden ayrılması temeline dayanır.

TERS FAZ VE NORMAL FAZ DOLGULARI

En yaygın kullanılan HPLC tipi dağılıma kromatografisi olup burada, durgun faz, hareketli faz ile karışmayan ikinci bir sıvıdır. Dağılıma kromatografisinin ilk uygulamaları sıvı-sıvı kolonlarında gerçekleştirilmiştir. Fakat modern LC sistemlerinde bunların yerine bağlı sıvı faz kolonları geçmiştir. Dağılıma kromatografisi, hareketli ve durgun fazlarının bağlı polarlığına bağlı olarak ikiye ayrılabilir. Normal faz kromatografide, en düşük polaritedeki bileşenler hareketli fazda nispeten çok çözüldükleri için en önde elue edilirler. Hareketli fazın polaritesindeki artış, elüsyon süresinin azalması ile sonuçlanır. Bunun aksine, ters faz yönteminde, en polar bileşenler, en önde yürür ve hareketli fazın polaritesindeki artış, elüsyon süresini artırır.[2]

	Durgun faz	Hareketli faz
Normal faz kromatografisi	Silika veya alümina taneçikler üzerine tutturulmuş su, trietilenglikol (polar)	Hekzan, i-propil eter (az polar çözücüler)
Ters faz kromatografisi	Hidrokarbon (apolar)	Su,metanol, asetonitril, tetrahidrofur (nispeten polar çözücüler)



HPLC spektrum analizi: yabancı sarımsak yaprağı liyofilizat (WGLL) HPLC kromatogramı [1].

HPLC UYGULAMA ALANLARI

İlaçlar (antibiyotikler, sedatifler, analjezikler), Biyokimyasallar (amino asitler, proteinler, karbonhidratlar, lipidler), Gıda maddeleri (suni tatlandırıcılar, antioksidanlar, aflatoksinler, katkı maddeleri), Endüstriyel kimyasallar (çok halkalı aromatikler, yüzey aktif maddeleri, iticiler, boyalar), Kirleticiler (pestisitler, herbisitler, fenoller), Klinik tıp (safra asitleri, ilaç metabolitleri, üre özütleri, östrojenler), Uyuşturucular (uyuşturucu ilaçlar, zehirler, kan alkolü, narkotikler).

LC-MS/MS

LC ünitesinden ayrıştırılmış analitler iyonlaştırılarak MS/MS ünitesine gönderilirler. MS/MS ünitesinde iyonlar ilk kuadrupolden kütle/yük (m/z) oranlarında ayrıştırılarak collision cell olarak bilinen girişim hücrelerine yönlendirilirler. Burada yüksek saflıkta azot gazı ile çarpıştırılan moleküller parçalanarak ikinci kuadrupole gönderilirler. İkinci kuadrupol ünitesindeki bu ikinci iyonlar da kütle/yük (m/z) oranlarında ayrıştırılarak kütleli olarak tayin edilirler.

İNCE TABAKA KROMATOGRFİSİ (TLC)

İnce tabaka kromatografisi, bir katı-sıvı adsorpsiyon kromatografisidir. Bu yöntemde sabit faz ince bir tabaka halinde sıvanmış katı adsorban maddedir. Adsorban madde olarak alumina, silika jel, sellüloz vb. kullanılabilir. Bu yöntemde hareketli faz, sabit faz üzerinden aşağıdan yukarı doğru ilerler. Çözücü kılcallık etkisi ile içerisinde daldırılan ince tabaka plakası üzerinden yürür. Bu işlem sırasında, plakanın alt kesimlerine bir damlalıklarla önceden damlatılmış olan karışımı da farklı hızlarla yukarıya sürükler. Ayırım bu şekilde sağlanmış olur. Yürüme hızı maddenin, katı fazın ve çözücünün polaritesine bağlıdır. Polar maddeler, çözücü-adsorban madde ikilisinden daha polar olan ile daha sıkı etkileşim gösterirler.[3]

KAYNAKLAR

- [1] Bombicz, M., Priksz, D., Varga, B., Gesztelyi, R., Kertesz, A., Lengyel, P., et al. (2016). Anti-Atherogenic Properties of Allium ursinum Lipophilic: Impact on Lipoprotein Homeostasis and Cardiac Biomarkers in Hypercholesterolemic Rabbits. International Journal of Molecular Sciences, 2016, 17, 1284; doi:10.3390/ijms17081284
- [2]Skoog, D. A., Holler, F. J., Crouch, S. R. (2013). Enstrümantal Analiz İlkeleri. (E. Kılıç, H. Yılmaz, çev.) Ankara: Bilim Yayınları.
- [3]https://avys.omu.edu.tr/storage/app/public/aaksoy/73029/02%20Ka%20C4%9F%20C4%B1t,%20Kolon%20ve%20C4%B0nce%20Tabaka%20Kromatografisi.pdf
- [4]https://www.technetynetworks.com/analysis/articles/gas-chromatography-how-a-gas-chromatography-machine-works-how-to-read-a-chromatograph-and-gcxcg-335168
- [5] https://en.wikipedia.org/wiki/Liquid_chromatography%E2%80%93mass_spectrometry