

## KROMATOGRAFIYE GİRİŞ

### Ref. e-makaleleri, Enstrümantal Analiz

Bir analitte bulunan engelleyici maddeler fiziksel veya kimyasal yöntemlerle ayrılabilir; bunlar çok bilinen distilasyon, kristalizasyon, çözgen ekstraksiyonu ve kimyasal veya elektrolitik çöktürmedir. Bilimin her dalına uygulanabilen bir ayırma yöntemi de " kromatografik " ayırmadır.

Kromatografi, 20. yüzyılın başlarında Rus botanikcisi Mikhail Tswett tarafından bulundu. Tswett, Klorofil ve ksantofiller gibi çeşitli pigmentleri içeren bir çözeltiyi, toz halinde kalsiyum karbonatla doldurulmuş bir cam kolondan geçirerek birbirinden ayırmayı başardı. Ayrılan maddeler kolonda renkli bölgeler halinde gruplar oluşturdu; Bu nedenle ayırma yöntemine, renkli fotoğraf anlamına gelen kromatografi (chromatography ) adını verdi.

Kromatografi uygulamaları ve yeni yöntemler geliştirilmesi son 50 yılda büyük aşamalar gösterdi. Bu alandaki çalışmaları ile A.J.P. Martin ve R.L.M. Synge 1952 yılında Nobel ödülünü kazandılar.

Kromatografi, kompleks karışımlardaki çeşitli maddeleri birbirinden ayırmaya ve tanımlamaya olanak veren ve bilim adamlarının çalışmalarını kolaylaştıran bir seri ayırma yöntemleri tekniğidir. Tüm kromatografik uygulamalarda bir "sabit faz" ve bir "hareketli faz" bulunur. Bir karışımdaki maddeler hareketli faz ile sürüklenerek sabit faz üzerinden taşınır; Örnekteki maddelerin göç etme hızlarının farklı olması, her bir maddenin sabit faz üzerinde gruplaşarak ilerlemesine yol açar, böylece karışım içindeki maddeler birbirinden ayrılırlar.

## **Kromatografik Metotların Sınıflandırılması**

### **A. Ayırma Mekanizmasına Göre Sınıflandırma**

1. Adsorbsiyon Kromatografi
2. Dağılıma (Partition) Kromatografi
3. İyon-değiştirme kromatografi (veya iyon kromatografi)
4. Jel geçirgenlik veya Jel süzme (Moleküler-Exclusion veya Size-Exclusion) Kromatografi
5. Zone Elektroforez
6. Afinite (veya Bioafinite) Kromatografi
7. Chiral Kromatografi

### **B. Hareketli Faza Göre Sınıflandırma**

1. Sıvı Kromatografisi (LC)
2. Gaz Kromatografisi (GC)

### **C. Uygulanan Teknięe Göre Sınıflandırma**

1. Kolon Kromatografi
2. Düzlem Kromatografi (İnce Tabaka Kromatografi, TLC; Kağıt Kromatografisi, PC)

### **D. Kullanım Amacına Göre Sınıflandırma**

1. Analitik Kromatografi (Kalitatif Kromatografi; Kantitatif Kromatografi)
2. Preparatif Uygulamalar (Karışımlardan Saf madde Elde Etme)

## Sabit Faz Tipleri

Kromatografide, ayrılacak maddeler hareketli fazda çözünebilmeli ve sabit faz ile de bazı etkileşimlerde bulunabilmelidirler; Örneğin, sabit fazda çözünme, adsorblanma veya kimyasal reaksiyona girme gibi. Ayırma işlemi süresince maddeler iki faz arasında dağıtılırlar.

Bazı uygulamalarda sabit faz, ince bir cam veya metal çubuk içine doldurulmuş toz halinde katı bir maddedir. Gaz veya sıvı haldeki hareketli faz basınç altında (veya kendi ağırlığı ile) katı içinden geçirilir. Bu yöntem " kolon kromatografisi" denir. Bir de "düzlemsel kromatografisi" vardır; bunda sabit faz poröz bir kağıt veya bir cam levha üzerine yayılmış ince toz halinde katı bir maddedir. Düzlem kromatografisinde hareketli faz kapiler etkisi veya kendi ağırlığı ile sabit faz üzerinde ilerler .

Sabit faz, hareketli fazla karışmayan ve akıcı olmayan bir sıvı da olabilir. Bu durumda sabit sıvı fazı bir yerde tutabilmek için çeşitli yöntemler uygulanır. Örneğin, toz halindeki bir katının üzerine bir sabit faz sıvısından ince bir tabaka kaplanır ve kaplanmış katı madde bir cam veya metal tüpe doldurulur; hareketli faz bu tüpten geçirilir. Burada katı maddenin ayırma işleminde herhangi bir rolü yoktur, sadece faz sıvısını tutma (adsorblayarak) görevi yapar.

Başka bir yöntemde sabit sıvı faz bir kapiler tüpün cidarlarına kaplanarak tutulur, gaz hareketli faz bu tüpten geçirilir. Bir diğer yöntemde ise sabit sıvı fazı tutmak için kağıt lifleri veya üzerinde çok ince öğütülmüş katı tanecikler bulunan bir cam levha kullanılır.

Tablo-1'de, sabit ve hareketli fazların yapılarına göre uygulanan çeşitli kromatografik yöntemler verilmiştir. Bu kısımda dağılıma (partisyon) ve gaz-sıvı kromatografisi anlatılacaktır. Gerekli değişiklikler yapılarak bu kavramlar diğer yöntemlere de uygulanabilir.

**Tablo-1: Kromatografik Ayırmaların Sınıflandırılması**

Adı	Hareketli faz tipi	Sabit faz tipi	Sabit fazı tutma yöntemi
Gaz-sıvı	Gaz	Sıvı	Bir tüp içindeki poröz katı üzerinde veya kapiler bir tüpün iç cidarı üzerinde adsorblanır
Gaz-katı	Gaz	Katı	Bir kolon (tüp) içinde tutulur
Dağıtma	Sıvı	Sıvı	Bir kolon (tüp) içindeki poröz bir katı üzerinde adsorblanır
Adsorbsiyon	Sıvı	Katı	Bir kolon (tüp) içinde tutulur
Kağıt	Sıvı	Sıvı	Kalın bir kağıdın gözenekleri içinde tutulur
İnce tabaka	Sıvı	Sıvı-katı	Bir cam levhadaki ince toz halindeki katı üzerinde tutulur
Jel	Sıvı	Sıvı	Polimerik bir katının lifleri arasında tutulur
İyon değiş-tirme	Sıvı	Katı	Bir kolondaki (tüp) iyon değiştirici reçine üzerinde tutulur

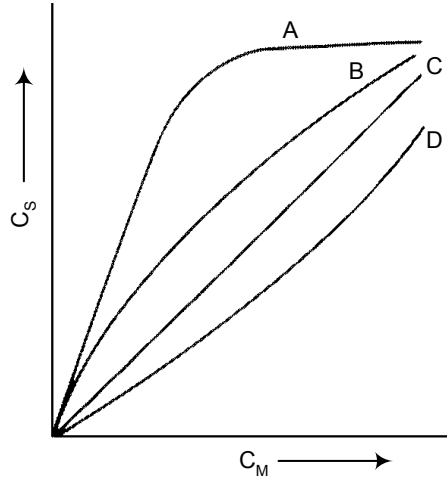
## Doğrusal Kromatografi

Tüm kromatografik ayırmalar hareketli ve sabit fazlar arasında dağılan maddelerin değişik yayılma (hareket) özelliklerine dayanır. "Dağıtma katsayısı, K" denilen ve sıcaklığa bağımlı bir sabit ile kantitatif bir denklem verilebilir.

$$K = \frac{C_S}{C_M} \quad (1)$$

Burada  $C_S$  maddenin sabit fazdaki analitik konsantrasyonu,  $C_M$  aynı maddenin hareketli fazdaki konsantrasyonudur. İdeal halde, geniş bir madde konsantrasyonu aralığında dağıtma kat sayısı sabittir; yani  $C_S$ ,  $C_M$  ile doğru orantılıdır.

Çok sık olmasa da  $C_S$  ile  $C_M$  arasında doğrusal olmayan bir ilişkiyle karşılaşılabilir. Şekil-1'de bazı tipik dağıtma eğrileri verilmiştir. Şekilde görülen C eğrisi ideal bir hali gösterir. Bu eğri ayrışma (disosiyasyon) veya birleşme (asosiyasyon) reaksiyonları bulunmayan ve birbiriyle karışmayan iki sıvı arasındaki dağıtma dengesine yaklaşıp.



Şekil-1: Tipik dağılıma eğrileri;  $C_S$ , maddenin sabit fazdaki konsantrasyonu,  $C_M$ , aynı maddenin hareketli fazdaki konsantrasyonu

B ve D eğrileri böyle bir dengenin bulunduğu hale daha çok benzerlik gösterirler. Örneğin, eğer sabit faz su hareketli faz da benzen ise, zayıf bir organik asit içeren bir madde için B'de görülen şekilde bir eğri elde edilir. Burada benzen içinde sadece disosiyasyon olmayan asit çözünürken, sulu çözeltide bir miktar disosiyasyon olmayan asit ile onun konjuge bazı da bulunur; asit ve konjuge baz arasındaki oran konsantrasyona bağımlı değildir. Bu nedenle düşük konsantrasyonlarda, toplam asitin az bir miktarının iki solvent arasında dağılması yeterlidir ve dağılım katsayısı büyüktür. Diğer taraftan, eğer hareketli faz benzen değil de su ise D'deki gibi bir eğri elde edilir. Buharın hareketli fazı olduğu buhar-sıvı dengelerinde de eğriler B şeklindedir.

A eğrisi tipik bir "adsorbsiyon izotermi"dir ve bir katı yüzey üzerinde adsorblanan madde miktarının, katının temasta olduğu çözeltideki madde konsantrasyonu ile olan ilişkisini gösterir. Madde konsantrasyonu arttıkça katı yüzeyde adsorbsiyon da artar ve bu durum yüzeyin adsorblama kapasitesi doluncaya kadar devam eder; sonra madde konsantrasyonundan bağımsız hale gelir. Bu tip eğriler k ve n sabit olmak üzere,

$$C_S = k C_M^n$$

eşitliğiyle tanımlanır.

Fraksiyonlama proseslerinde uygulanabilir bir denklem elde edebilmek için yaklaşık bir K sabiti kullanılır. Şekil-1'deki dört eğrinin de düşük konsantrasyonlar aralığında doğrusal olması, sınırlı bir bölgede yaklaşık K değerinin kullanılmasının önemli hatalara neden olmayacağını gösterir. Geniş konsantrasyon aralıklarında ise yukarıdaki denklem, madde konsantrasyonunun K 'da yapacağı değişiklikler dikkate alınarak değiştirilir. Bir kromatografik kolondaki konsantrasyon, çoğunlukla düşüktür. K 'nın sabit olduğu bu koşullarda alınan kromatograflara "doğrusal kromatografi" denir. Bu bölümde, bu tip kromatograflar ele alınacaktır.

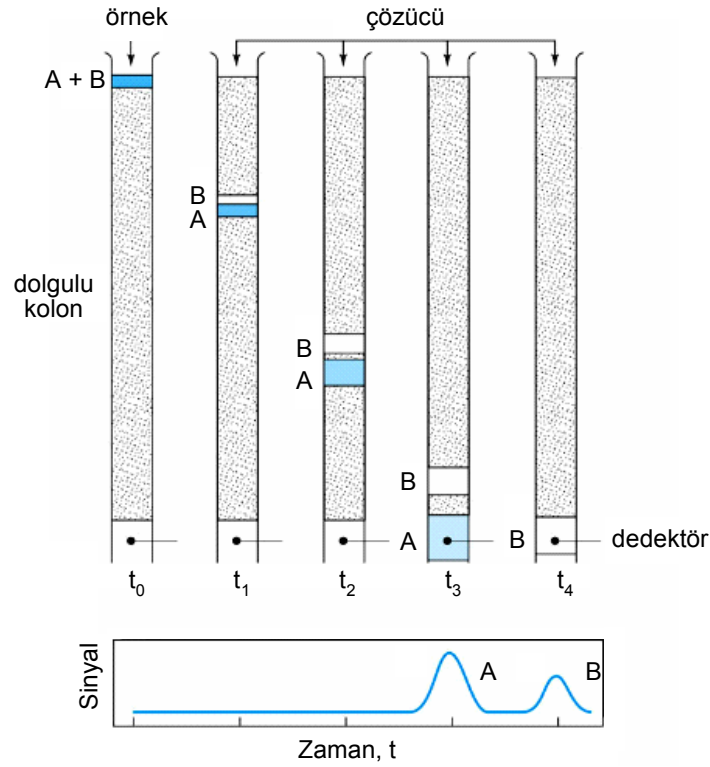
## **Doğrusal Sıyırma Kromatografisi**

Sıyırma (elüsyon) kromatografide, bir miktar örnek önce hareketli fazda (solvent) çözülür ve hazırlanan çözelti kolona verilir (Şekil-2) ; kolonda, örneğin içerdiği maddeler kendi kendine iki faz (hareketli ve sabit) arasında dağılır. Çözelti injeksiyonundan sonra kolona bir miktar saf halde hareketli faz (sıyırıcı) verilir. Sıyırıcı olarak çalışan bu kısım, çözeltiyi kolonun alt kısımlarına doğru iter: böylece hareketli faz (içinde hala sabit faza geçecek kısımlar vardır) ile aşağı kısımlardaki taze sabit faz arasında daha ileri derecelerde dağılma sağlanır. Aynı anda taze hareketli faz ile üst kısımlardaki sabit faz (içinde hareketli faza geçecek kısımlar vardır) arasında da yeniden dağılma olur. Sürekli olarak taze çözgen ilave edilerek örnekdeki moleküller, hareketli ve sabit fazlar arasındaki geçişlerle kolonun altına kadar taşınır. Maddedeki moleküller sadece hareketli faz eşliğinde ilerleyebildiklerinden, bir maddenin ortalama göçme (ilerleme) hızı, onun hareketli fazda kalma süresine bağlıdır. Bu süre, maddelerin dağılma oranlarından anlaşılabilir; sabit fazdaki madde konsantrasyonu yüksekse süre kısa, hareketli fazdaki konsantrasyon yüksekse süre uzundur. En ideal hal, hızlar arasındaki farkların, bir karışımdaki maddeleri kolon uzunluğu boyunca ayrı bantlar halinde ayırabildiği durumdur. (Şekil-2 ve 3). Kolondan yeteri kadar hareketli faz geçirilerek bölgeler halinde toplanmış maddeler kolondan sıra ile çıkarılır ve kendilerini tanımlayan bantlar halinde kaydedilir. Başka bir yöntemde, her maddenin toplandığı kolon dolgu maddesi bölgesi ölçülerek hesapla sonuca gidilir.

Kolona verilen örneğin taze çözgen ilavesiyle yıkanması işlemine "sıyırma" veya "elüsyon" denir. Kolonun sonunda örnekteki madde konsantrasyonlarını algılayan bir detektör bulunması halinde alınan sinyaller zamanın fonksiyonu olarak simetrik eğriler verir (Şekil-2 nin alt kısmındaki eğriler). Böyle bir grafiğe "kromotogram" denir ve kalitatif/kantitatif analizlerde kullanılır. Piklerin konumları maddenin cinsini, alanları ise konsantrasyonlarını tanımlar.

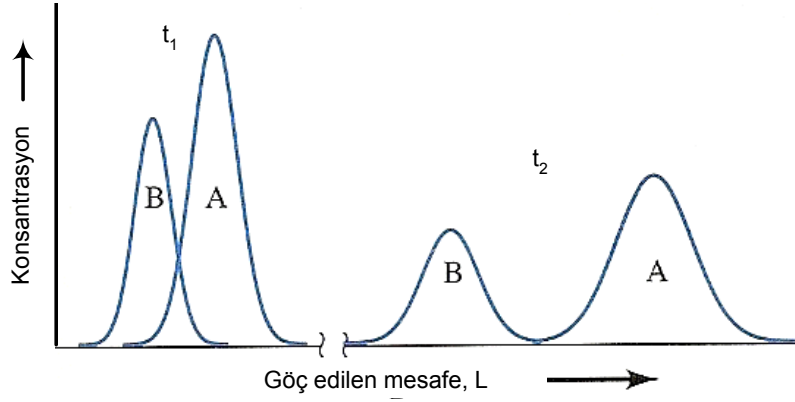
## Sıyırma (Elüsyon) Kromatografisi Teorileri

Şekil-3'de, bir kromatografik kolonda A ve B maddeleri karışımı bir örneğin, sıyırma işleminin kısa ve uzun olması halinde verdiği konsantrasyon profili görülmektedir. Maddelerden A'nın ayrılma katsayısı B'ninkinden daha büyüktür; bu nedenle göç işlemi sırasında A geride kalır. Kolonun buyu uzadıkça iki pik arasındaki uzaklık artar. Aynı zamanda iki bandda da genişleme olur; bu durum kolonun ayırma verimini düşürür. Ancak göç mesafesi uzadıkça görülen bu band genişlemesi, aynı koşullarda bandların birbirinden ayrılma etkinliğine göre daha zayıftır. Böylece Şekil-3 'de ikinci kısımdaki gibi iyi bir ayırım elde edebilmek için yeteri kadar uzun bir kolona gereksinim vardır.



[http://www2.fju.edu/~cal/index\\_files/Chapter%2028%20Chromatographic%20Separation.ppt#9](http://www2.fju.edu/~cal/index_files/Chapter%2028%20Chromatographic%20Separation.ppt#9)

Şekil-2: İki maddeli bir karışımın ayırma kromatografisi yöntemiyle ayrılmasını gösteren şematik diyagram



Şekil-3: A ve B maddeleri kolondan aşağı ilerlerken iki ayrı noktada alınan konsantrasyon profilleri

İyi bir kromatografik ayırmada, (a) maddelerin göç etme hızı, ve (b) madde piklerinin genişlemeye başladığı bölgenin (uzaklık) tanımlanması önemlidir. Kromatografinin orijinal teorisi "tepsi teorisi" dir ve göç hızını kantitatif anlamda tarif eder. Ancak bu teori piklerin bölgesel genişlemelerine yol açan çok sayıdaki değişkeni açıklayamaz. Bu nedenle tepsi teorisinin yerini, bu değişkenleri de tanımlayan "kinetik" veya "hız teorisi" almıştır.

Kinetik teoride kullanılan iki terim vardır: "teorik tepsi sayısı" ve "teorik tepsinin eşdeğer yüksekliği, TTEY" (veya teorik tepsinin yükseklik eşdeğeri). Bu iki terimi açıklayabilmek için tepsi teorisine kısaca değinmek gerekir. Kromatografi tepsi teorisini Martin ve Syngge geliştirmiştir. Buna göre bir kromatografik kolonun ayrı ayrı, fakat birbirine bitişik dar, yatay bir seri tabakalardan (teorik tepsi denen) oluştuğu varsayılır. Her tepside maddenin hareketli ve sabit fazlar arasında dengeye ulaştığı kabul edilir. Madde ve çözücünün hareketi, bir tepside diğerine kademeler halinde geçiş şeklindedir.

Kromatografik bir kolonun bir ayırma sistemi olarak verimi, denge sayısının artmasıyla yükselir, yani teorik tepsi sayısı arttıkça kolonun verimi de artar. Buna göre yukarıda belirtilen birinci terim "teorik tepsilerin sayısı, N" kolon veriminin bir ölçüsüdür. İkinci terim "eşdeğer tepsi yüksekliği, H" da bu kavrama yardımcı bir parametredir. Bu iki parametre arasında,

$$N = L / H$$

(2)



bağıntısı bulunur; L kolon dolgusunun yüksekliğini gösterir. Kolon verimi yükseldikçe H düşer, H 'ın küçülmesi kolonun belirli bir uzunluğundaki denge sayısının büyümesine yol açar. Kısaca, H küçük, N büyük olduğunda kolon verimliliği artar. H ve N hız teorisinde verim parametreleridir ve denklem (2) uygulanabilir. Ancak bir kolonda fiziksel anlamda tepsi bulunamaz, tepsi ve tepsi yüksekliği terimleri kolon verimi için kullanılan birer değer birimleridir.

## **KROMATOGRAFİK HIZ TEORİSİ**

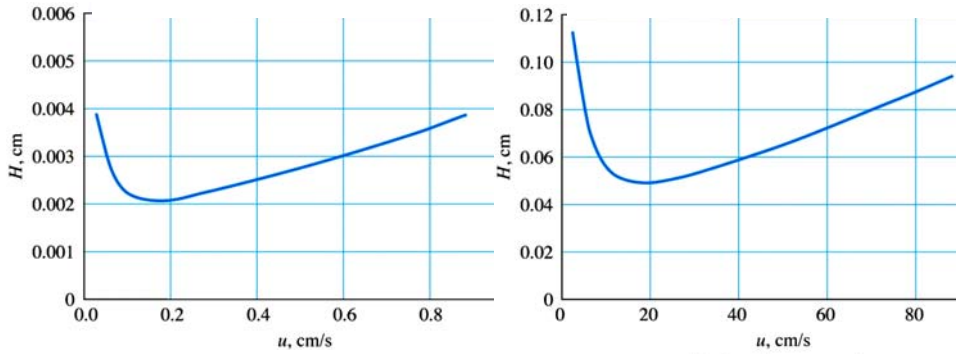
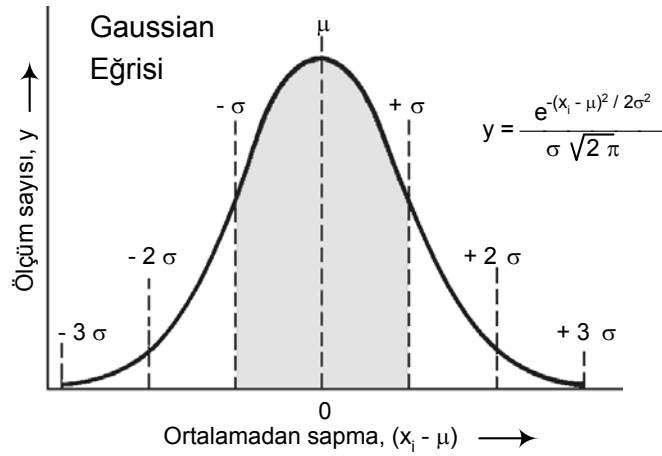
Kromatografik hız teorisi, bir bandın genişliğini etkileyen değişkeleri ve bu bandın kolondan çıkma zamanını tanımlayabilen başarılı bir teoridir.

### **Bölge (Zone) Şekilleri**

Tipik bir kromatogram (Şekil-2 ve 3) Gaussian eğrilerine benzer. Bir Gaussian eğrisi, normal bir hata eğrisidir ve tekrarlanan ölçüm değerlerinin ortalama değerden sapma miktarlarına göre grafiğe alınmasıyla elde edilir. Böyle bir eğri, herhangi bir ölçümdeki hatanın, çok sayıda küçük, tayin edilemeyen ve rasgele hataların (pozitif veya negatif) bir toplamı olduğu kabul edilerek çizilir. Bu hataların çoğu birbirini giderir ve bir ortalama değer bulunur. Veriler, ortalama değere göre simetrik dağılım gösterirler. Bir kromatogramın Gaussian şeklindeki eğrisi de, kromatografik banddaki veya bölgedeki sayısız madde taneciklerinin rasgele hareketlerinin birbirine eklenmesiyle oluşur.

Tek bir madde 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 bazan çok kısa bazan 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. Bazı tanecikler hareketli fazda tesadüfen daha uzun süre kalırlar. Bazılarının da, tersine sabit fazda kalış süreleri ortalamadan daha uzun olur. Bu rasgele bireysel olayların sonucunda hız, ortalama değer etrafında simetrik bir dağılım gösterir.

Kolonun alt bölgelerine inildikçe alınan kromatografi eğrisinin genişliği artar; çünkü taneciklerin bir fazda kalma zamanı dolayısıyla göç etme süresi uzar. Buna göre bölgesel band genişlemesi kolondaki kalma süresi ile bağıntılıdır ve hareketli fazın akış hızıyla ters orantılıdır. Hareketli fazın akış hızı sıvı ve gaz kromatografisinde oldukça farklıdır. Tipik bir örnek Şekil-4'de görülmektedir. GC'de H değerleri daha yüksektir, ancak verim de yüksektir.



[http://www2.fiu.edu/~cai/index\\_files/Chapter%2026%20Chromatographic%20Separation.ppt#9](http://www2.fiu.edu/~cai/index_files/Chapter%2026%20Chromatographic%20Separation.ppt#9)

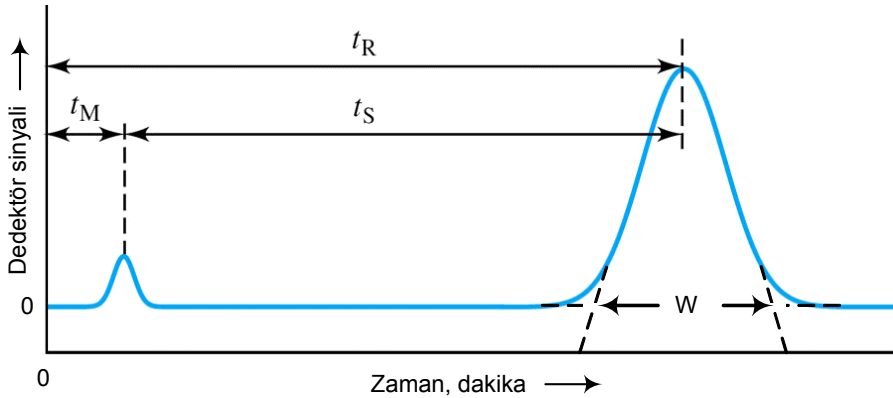
Şekil-4: Hareketli fazın akış hızı; (a) sıvı kromatografisi, (b) gaz kromatografisi ( $H$ : tepsi yükseklikleri,  $u$ : akış hızı)

## Bölge Genişlemesinde Standart Sapma

Bir Gaussian eğrisinin genişliği standart sapma ( $\sigma$ ) denilen tek bir parametreye bağlıdır. Eğrinin altındaki alanın yaklaşık %96'sı, eğri maksimumunun,  $\pm 2\sigma$  standart sapma değeri içindedir. Buna göre, bir kromatogramdan çıkarılan standart sapma, bölgesel genişlemenin kantitatif bir ölçüsüdür.

Bir kromatografik pikin standart sapması, zaman birimi ile veya kolon uzunluğu boyunca olan mesafe ile tarif edilir. Buna göre Şekil-3'deki bölge profillerinden çıkarılan bir standart sapmanın birimi uzunluk (cm cinsinden) olacaktır. Şekil-5 'deki kromatogramda görüldüğü gibi bir kromatogramın apsisinin saniye veya dakika gibi zaman birimleri cinsinden ifadesi daha çok uygulanan bir yöntemdir. Hangi birimin kullanıldığı tanınan sembollerle belirtilir; uzunluk birimi için  $\sigma$  sembolü, zaman birimi için de  $\tau$  sembolü kullanılır.

$\tau$  veya  $\sigma$  'nun bir kromatogramdaki ifadesi, Şekil-5'de gösterilmiştir. Eğrinin iki tarafından çizilen teğetler apsis eksenine doğru uzatılırsa birer üçgen elde edilir. Uzanlıların eksenini kestiği nokta, maksimumdan eksene inilen dikine, eksenini kestiği noktadan yaklaşık olarak  $\pm 2\tau$  kadardır; ve tabii  $W = 4\tau$  'dir.



[http://www2.fiu.edu/~cai/index\\_files/Chapter%2026%20Chromatographic%20Separation.ppt](http://www2.fiu.edu/~cai/index_files/Chapter%2026%20Chromatographic%20Separation.ppt)

Şekil-5: Bir kromatografik pikten standart sapma  $\tau$  'nun tayini;  $W = 4\tau$ ,  $t_R$ : kolon dolgusu içinde maddenin alıkonma zamanı,  $t_M$ : kolonda tutulmayan kısmın çıkma zamanı ( $t_M \equiv$  kolondan geçen hareketli faz molekülünün çıkma zamanı)

### Bölge Genişlemesinden H ve N in Hesaplanması

Kromatografik bir bölgenin genişlemesi birim uzunluktaki kolon için standart sapmanın karesi(değişiklik) olarak aşağıdaki eşitlikle verilir.

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad (3)$$

Burada H cm cinsinden tepsi yüksekliğini gösterir ve verimi ifade eder, L kolonun uzunluğunu (cm) gösterir;  $\sigma$  nin birimi H ve L ile olan bağıntısı nedeniyle uzunluk birimidir (cm). Denklem(3), (2) ile bileştirilip yeniden düzenlenirse bir kolonunun ayırma özelliklerini tanımlayan diğer bir ifade elde edilir.

$$N = \frac{L^2}{\sigma^2} \quad (4)$$

N, L uzunluğundaki bir kolondaki tepsi sayısını verir; yani, tepsi sayısının artması ve tepsi yüksekliğin azalması kolon veriminin yükselmesini sağlar.

### N ve H 'ın Deneysel Olarak Değerlendirilmesi

Şekil-5'de görüldüğü gibi deneylerde elde edilen kromatogramların çoğunda apsis ekseni zamanı gösterir. Tabii bu tip eğrilerden çıkarılan standart sapmanın birimi de uzunluk (cm) değil zaman (saniye, dakika) birimi olacaktır. Şekil-5 'deki  $t_R$  alıkonma zamanıdır ve örneğin injeksiyonundan, kromatografik kolonun sonundan çıkışına kadar geçen zamanı gösterir. Madde taneciklerinin kat ettikleri yol boyunca olan ortalama hareket hızları  $L/t_R$  'dir. Buna göre standart sapmanın uzunluk ve zaman birimleri arasındaki ilişki,

$$\tau = \frac{\sigma}{L/t_R} \quad (5)$$

ifadesi ile verilebilir. Burada  $\tau$  zaman birimli standart sapmayı gösterir. Daha önce de değinildiği gibi Şekil-5 'deki gibi bir Gaussian eğrisi için  $W = 4 \tau$  'dur. Bu eşitliğin denklem (5) 'de yerine konmasıyla aşağıdaki bağıntı elde edilir.

$$\sigma = \frac{L W}{4 t_R}$$

Bu ifade denklem (3) 'de yerine konursa,

$$H = \frac{L W^2}{16 t_R^2} \quad (6)$$

denklemini bulunur. N 'yi elde edebilmek için denklem(2) 'deki H yerine yukardaki H ifadesi yazılır ve denklem yeniden düzenlenir. Buna göre,

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (7)$$

denklemini çıkarılır. Bu ifade kullanılarak iki zaman ölçmesi olan  $t_R$  ve W den N hesaplanabilir, H 'ın bulunması için kolon uzunluğunun da bilinmesi gerekir.

### Band Genişlemesinin Kaynakları

Kromatografik pikler kinetik olarak kontrol edilen üç işlem nedeniyle genişler; bunlar: (1) girdap difüzyonu, (2) boylamasına difüzyon ve (3) dengesiz kütle transferidir. Bu etkilerin büyüklüklerini akış hızı, dolgu maddesinin tanecik büyüklüğü, difüzyon hızları ve sabit fazın kalınlığı gibi kontrol edilebilen değişkenler belirler. Bu üç işlemi de kapsayacak şekilde kromatografik kolonların verimini hesaplamada kullanılabilecek çeşitli denklemler geliştirilmiştir. Bunlardan ilk bulunanı ve en basit olanı "van Deemter" denklemdir ve gaz-sıvı kromatografisi için çıkarılmıştır; denklem, akış hızı u ile tepsi yüksekliği H arasında yaklaşık bir ilişki verir; burada A girdap difüzyonu ile, B boylamasına difüzyon ile ve C dengesiz kütle transferi ile ilgili terimlerdir.

$$H = A + \frac{B}{u} + C u \quad (8)$$

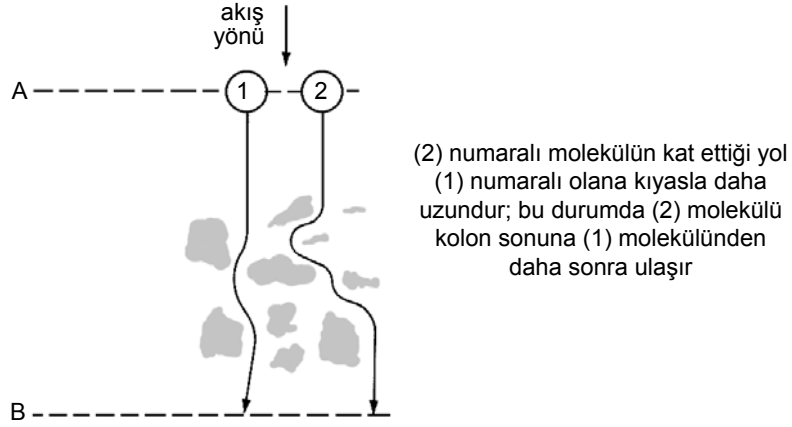
### Girdap Difüzyonu

Bir molekülün dolgulu bir kolondan geçerken karşılaştığı patikaların sayısı arttıkça girdap difüzyonu etkisiyle bölge genişlemesi meydana gelir. Şekil-6'da görüldüğü gibi bu patikaların uzunlukları farklıdır; bunun sonucu olarak aynı maddeye ait moleküllerin kolonda alıkonma süreleri de farklı olur. Böylece tüm moleküllerin kolonun sonuna ulaşmaları bir zaman aralığında gerçekleşir ve çıkan band da geniş bir şekil alır.

Denklem(8) 'deki A miktarı girdap difüzyonun etkisini gösterir ve sabit fazın tanecik büyüklüğü, geometrisi ve kolondaki sıkışıklığı ile ilişkilidir. Birinci yaklaşım olarak A 'nın akış hızına bağlı olmadığı varsayılır ve aşağıdaki ifade yazılabilir

$$A = 2 \lambda d_R$$

Burada  $d_R$  ortalama tanecik capı,  $\lambda$  sıkışıklık faktörüdür.  $\lambda$  'nın değerlerini, sabit fazın tanecik büyüklüğü aralığı ve doldurulma şekli belirler.



*Şekil-6: Kromatografik sıyırma işlemi sırasında aynı maddeye ait iki molekülün izlediği patika yollar*

Örneğin, 20-40 mesh aralığındaki tanecikler için  $\lambda \sim 1$  dolayında, 200-400 meshlik tanecikler için ise 8 dolayındadır. Bir kolon doldurulurken küçük ve küresel, dar aralıklı boyutlarda dolgu maddesinin kullanılarak girdap difüzyonu nedeniyle oluşan band genişlemesi en düşük düzeye indirilebilir. Kolondaki dolgu maddesinin aralarında açık kanallar bulunmamalıdır. Özenle doldurulan bir kolonda girdap difüzyonu çok düşük seviyelerdedir.

### **Boylamasına Difüzyon**

Boylamasına difüzyon bir bandın yoğun merkez kısmındaki moleküllerin, bandın iki tarafındaki daha seyreltik bölgelere doğru göç etme eğilimlerinden kaynaklanır. Hareketli ve sabit fazların her ikisinde de oluşabilen bu tip difüzyonun yarattığı band genişlemesi oldukça fazladır. Boylamasına difüzyon hareketli fazın gaz olduğu bir ortamda çok önem kazanır, çünkü gaz fazındaki difüzyon hızlarının büyüklüğü sıvılara göre birkaç derece fazladır. Difüzyon miktarı zamanla artar; akış hızı azaldıkça band genişlemesi de artar.

Denklem(8)'deki ikinci terim (boylamasına difüzyon terimi) akış hızıyla ters orantılıdır. B bir sabittir ve  $D_M$  ile,

$$B = 2 \psi D_M$$

denklemlerle belirtilen bir ilişkidir.

Burada,  $D_M$  hareketli fazda bulunan maddenin difüzyon katsayısı,  $\psi$  blokaj faktörüdür ve sabit fazdaki taneciklerin, serbest moleküler difüzyonu engellemelerinin bir ölçüsüdür; dolgu maddesinin tipine göre  $\psi$  değeri 0.5 - 0.9 aralığında değişebilir. Boylamasına difüzyonun neden olduğu band genişlemesi sıcaklığı düşürmek (böylece  $D_M$  de düşer) ve akış hızını artırmakla azaltılabilir.

### Dengesiz Kütle Transferi

Kromatografik bandların genişlemesine yol açan bir diğer neden de hareketli faz akışının çok hızlı olması ve fazlar arasında gerçek bir dengenin kurulamamasıdır. Örneğin, hareketli fazın taze sabit fazla karşılaştığı band bölgesinin ön tarafında henüz denge konumuna ulaşılmamıştır. Bu durumda madde, kolonun gerçek dengeye gelindiği halde bulunması gereken kısmından daha ileride bir yerde bulunur. Benzer şekilde, bölgenin sonunda, sabit fazdaki maddeler taze hareketli fazla karşılaşırlar. Yine, madde taneciklerinin fazlar arasındaki geçişi hemen gerçekleşemez ve denge konumuna gelmesi için yeterli zaman olmadığından bölgenin uzantısı yayılır.

Dengesiz kütle transferinin etkisi akış hızı düşürülerek küçültülebilir (Denklem-8), çünkü dengeye ulaşılabilmesi için daha fazla zamana gereksinim vardır. Ayrıca, hareketli fazın aktığı kanalların dar olması halinde madde moleküllerinin sabit faza difüzenmeleri daha kolay olacağından denge konumuna daha çabuk ulaşılır. Aynı nedenle, sabit bir faz üzerine akmayan sıvıların kaplandığı hallerde sıvı tabakaların mümkün olduğu kadar ince olması gerekir.

Denklem(8)'deki son terim hareketli fazın bir gaz olduğu durumda, yüksek akış hızlarında çok önemlidir. C değeri iki terimden oluşur. Birincisi sabit fazdaki kütle transferi ile, diğeri hareketli fazdaki hızla ilişkilidir. Bu iki terimin C ye bağlılığı aşağıdaki denklemle verilir.

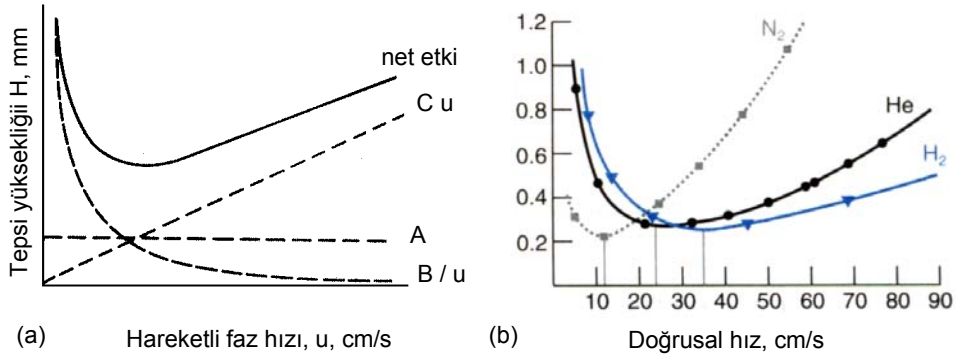
$$C = \frac{q R (1 - R) d_f^2}{D_s} + \frac{w d_R^2}{D_M}$$

$d_f$ , filmin veya çapı  $d_R$  olan sabit faz taneciklerinin kalınlığını gösterir.  $R$  miktarı alıkonma oranıdır ve  $t_M/t_R$  'ye eşittir (Şekil-5).  $D_S$  ve  $D_M$  terimleri maddenin sabit ve hareketli fazlardaki difüzyon katsayılarıdır.  $q$  ve  $w$ ; dolgu maddesinin yapısı ve konfigürasyonuna bağlı sabitlerdir.  $W$ , 1.3 civarında bir değerdir. Katı bir destek üzerinde bulunan düzgün bir sıvı filmi için  $q = 0.5$  'dir.  $C$ 'yi etkileyen en önemli değişken  $d_f$  'dir. Çok ince sıvı faz tabakaları kullanılarak kolon verimi önemli derecede artırılabilir. Yüksek sıcaklıklarda ve düşük solvent viskozitelerinde dengeye daha çabuk ulaşılabilir.

### Bant Genişlemesi Yapan Proseslerin Net Sonuçları

Şekil –7(a)'da van Deemter denklemindeki üç terimin eğrileri çizilmiştir (Kesikli çizgi); eğriler  $H$  değerinin hareketli faz hızı ile değişimini göstermektedir. Bu üç terimin net sonucu ise kesiksiz eğri ile verilmiştir. Görüldüğü gibi optimum verim kesiksiz eğrinin minimumunda elde edilir. Bu tip deneysel eğrilerden herhangi bir kolon için  $A$ ,  $B$ ,  $C$  değerleri bulunabilir. Bu gibi veriler bir dolgu maddesinin daha verimli koşullarda kullanılmasına yardımcı olur.

van Deemter denklemi tepsi yüksekliğinin bulunmasında kullanılan ilk yaklaşım yöntemidir. Kolon verimi etkileyen değişkenleri tanımlamada bundan daha hassas bazı yöntemler de geliştirilmiştir.



Şekil-7: (a)  $(H = A + B/u + C u)$  denklemin'deki değişkenlerin tepsi yüksekliğine etkisi, (b) Van Deemter eşitliği; akış hızının kolon verimi ile ilişkisi



## KOLONLARDAKİ AYIRMA

Bir kromatografik kolonun verimi, içerdiği teorik tepsi sayısı ile belirlenir. Burada herhangi bir ayırma işleminde, bir kolondaki tepsilerin sayısı ile gerekli zaman arasındaki ilişki anlatılacaktır.

### Maddenin Göç Etme Hızı

Şekil-5'de verilmiş olan kromatogramda zaman eksenindeki sıfır, örneğin kolona injekte edildiği ve sıyırma işleminin başladığı anı gösterir.  $t_M$  'de çıkan pik, kolon dolgu maddesi tarafından tutulmayan maddeye (çoğunlukla hava) aittir; bu maddenin hareket hızı, hareketli fazdaki örnek moleküllerinin ortalama hızı ile aynıdır. Alıkonma zamanı  $t_R$  (örnek pikine aittir), maddenin kolonun sonundaki detektöre ulaşması için gerekli zamanı gösterir.

Maddenin ortalama göç etme hızı  $v$  aşağıdaki denklemle verilir.

$$v = \frac{L}{t_R} \quad (9)$$

Benzer şekilde moleküllerin hareketli fazdaki ortalama hızı  $u$  da,

$$u = \frac{L}{t_M} \quad (10)$$

denklemleriyle verilir.

Maddenin göç etme hızı aynı zamanda hareketli fazın hızına göre de tarif edilebilir, buna göre,

$$v = u \text{ (maddenin hareketli fazda bulunduğu zamanın kesri)}$$

Bu kesir herhangi bir anda maddenin hareketli fazda bulunan mol sayısına (ortalama), kolondaki toplam mol sayısına bölünmesiyle bulunur. Yani,

$$v = u \left( \frac{\text{hareketli fazdaki mol sayısı}}{\text{toplam mol sayısı}} \right)$$

veya,

$$v = u \left( \frac{C_M V_M}{C_M V_M + C_S V_S} \right) = u \left( \frac{1}{1 + C_S V_S / C_M V_M} \right)$$

Burada  $C_M$  ve  $C_S$ , hareketli ve sabit fazlardaki madde konsantrasyonları,  $V_M$  ve  $V_S$  iki fazın kolondaki toplam hacimleridir.

Denklem(1) 'deki eşitlik yukarıdaki ifade ile birleştirilerek aşağıdaki eşitlikler bulunur.

$$v = u \left( \frac{1}{1 + K V_S / V_M} \right)$$

veya,

$$v = u \left( \frac{1}{1 + k'} \right) \quad (11)$$

$k'$  'kapasite faktörüdür ve maddenin dağıtma katsayısı ile ilişkilidir.

$$k' = \frac{K V_S}{V_M} \quad (12)$$

Denklem (9), (10) ve (11)'den  $t_R$  çıkarılır.

$$t_R = t_M (1 + k') = \left( 1 + \frac{K V_S}{V_M} \right) \quad (13)$$

Buna göre bir maddenin alıkonma zamanı  $t_R$ , maddenin dağıtma katsayısı ve fazların hacimleri arasındaki oran ile artar.

Denklem(13) yeniden düzenlenerek, deneysel parametreler olan  $t_R$  ve  $t_M$  den, bir maddenin kapasite faktörü  $k'$  'nün hesaplanabileceği bir denklem bulunur.

$$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (14)$$

## Kolon Resolusyonu (Ayrırma Gücü)

Kromatografideki en önemli konu bir kolonun iki maddeyi birbirinden ayırabilme özelliğidir. Bir kolonun kantitatif anlamdaki ayırma gücü, "rezolusyon" terimi ile tarif edilir ve  $R_S$  ile gösterilir.

$$R_S = \frac{2 \Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2 [(t_R)_S - (t_R)_A]}{W_A + W_B} \quad (15)$$

$W_A$  ve  $W_B$  piklerin taban genişlikleridir ve birimleri zamandır.  $\Delta Z$  maddelerin detektöre ulaşma zamanları arasındaki farkı gösterir (Şekil-8). İki pikin genişlikleri  $W$  ile gösterilirse denklem(15) aşağıdaki şekilde basitleşir.

$$R_S = \frac{\Delta Z}{W}$$

Birbirine yakın çıkan piklerde  $W_X$  ve  $W_Y$ 'de birbirine yakın değerlerde olurlar; bu durumda tek bir değer ölçülmesi yeterlidir.

Şekil-8 'de iki maddenin bulunduğu bir karışımın üç ayrı rezolusyonda alınan kromatogramları görülmektedir.  $R_S = 1.5$  'da A ve B maddeleri birbirlerinden tam olarak ayrılmışlardır.  $R_S = 0.75$  'de ise ayırma yapılamamıştır.

$R_S = 1.0$  değerindeki uygulamada A maddesinde % 4 kadar B maddesi ve B 'de de % 4 kadar A maddesi kalmıştır; rezolasyonun 1.5 olduğu durumda bu karışma % 0.3 kadardır. Aynı kolon dolgu maddesi ile rezolasyonun yükseltilmesi için kolon boyu uzatılır; dolayısıyla teorik tepsi sayısı artırılmış olur.

### **$R_S$ ile Kolon Özellikleri Arasındaki İlişki**

Bir kromatografik kolonun bazı özellikleri ile  $R_S$  arasında çeşitli ilişkiler bulunabilir. Aşağıdaki örnekte bu ilişkilerin nasıl çıkarılabileceği gösterilmiştir.

### **ÖRNEK**

$R_S$  ile  $(t_R)_A$  ve  $(t_R)_B$  arasında bir ilişki çıkarılması; son iki terim Şekil-8'deki kromatogramdan ölçülen alıkonma zamanlarıdır.

Daha önce de belirtildiği gibi,

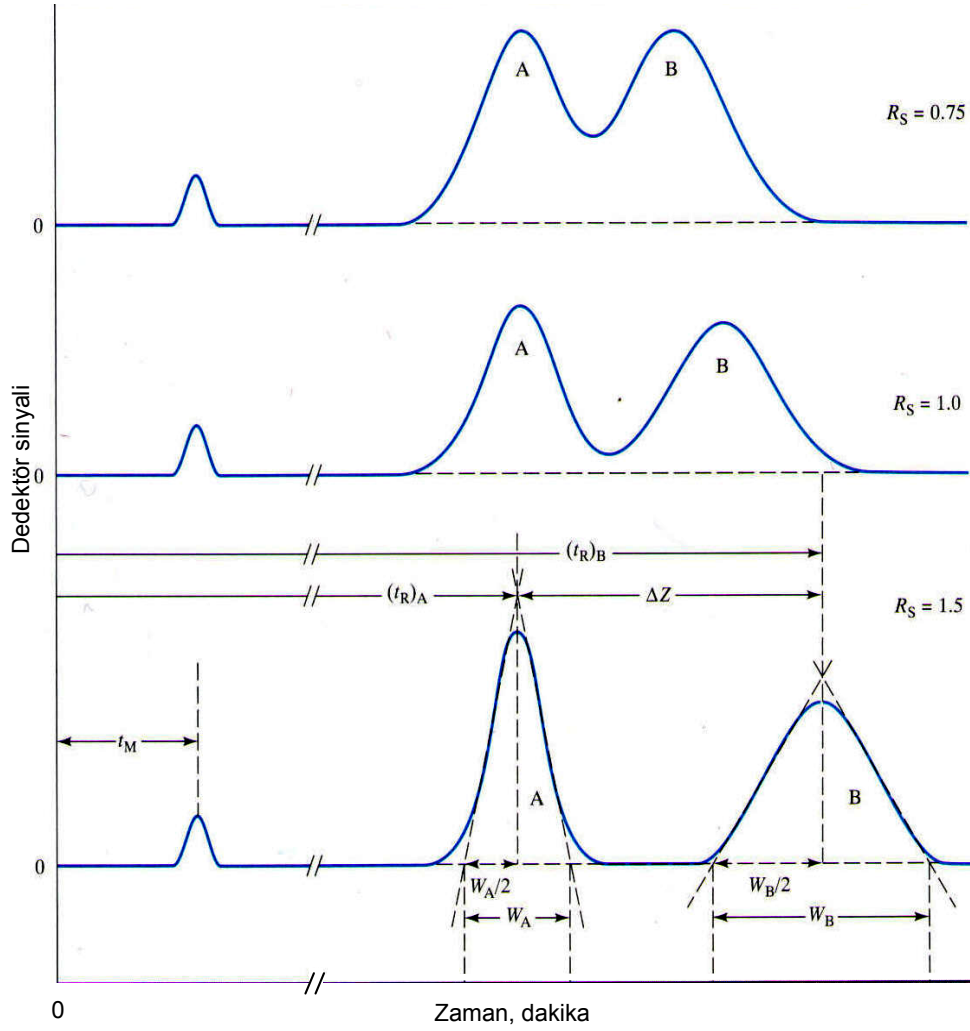
$$W = W_B \cong W_A$$

alınabilir. Bu durumda denklem(15) aşağıdaki gibi yazılır.

$$R_S = \frac{(t_R)_B - (t_R)_A}{W_B}$$

Denklem(7),  $W_Y$  yi  $(t_R)_X$  ve  $N$  cinsinden vermektedir. Buna göre

$$R_S = \frac{(t_R)_B - (t_R)_A}{(t_R)_B} \times \frac{\sqrt{N}}{4}$$



[http://www2.fiu.edu/~cai/index\\_files/Chapter%2026%20Chromatographic%20Separation.ppt](http://www2.fiu.edu/~cai/index_files/Chapter%2026%20Chromatographic%20Separation.ppt)

Şekil-8: Üç ayrı ayırma gücü için kromatogramlar;  $R_S = 2 \Delta Z / (W_A + W_B)$

Denklem (13)'deki  $t_R$  nin yukardaki ifade ile birleştirilmesiyle,  $R_S$  değeri X ve Y nin kapasite faktörleri ile tanımlanmış olur.

$$R_S = \frac{(k'_B - k'_A) \sqrt{N}}{(1 + k'_B) 4}$$

$k'_B / k'_A$  terimine "seçicilik faktörü" denir ve  $\alpha$  ile gösterilir

$$\alpha = \frac{k'_B}{k'_A} \quad (16)$$

$k'_B / k'_A$  terimi yerine  $\alpha$  konularak  $R_S$  denklemi yeniden düzenlenir ve  $k'_A$  denklemden çıkarılır.

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'_B}{1 + k'_B} \right) \quad (17)$$

En uygun rezolusyonu bulmak için gerekli teorik tepsi sayısı hesaplanmalıdır. Bunun için de denklem(17) yeniden düzenlenerek elde edilen aşağıdaki eşitlik kullanılır.

$$N = 16 R_S^2 \left( \frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left( \frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)^2 \quad (18)$$

### Seçicilik Faktörünün ( $\alpha$ ) Özellikleri

Denklem(17) ve (18)in uygulamalarına geçmeden seçicilik faktörü  $\alpha$  nın özelliklerini bilmek yararlı olacaktır. Bu değer Şekil-8'de görüldüğü gibi bir kromatogramdan doğru olarak bulunabilir.  $\alpha$  değeri denklem(14) ün denklem(17)'de yerine konmasıyla ve sonra da denklem(12) nin denklem(16)'da yerine konmasıyla iki farklı şekilde ifade edilebilir.

$$\alpha = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_R)_A - t_M} \quad (19)$$

$$\alpha = \frac{K_B}{K_A} \quad (20)$$

### Rezolusyon ve Ayırma Zamanı

Denklem(17) ve (18)'de, önemli bir performans özelliği olan, tam bir ayırma için gerekli olan zaman yoktur. Bu önemli değişkenin de rezolusyon ile ilişkisini sağ-

lamak için denklem (19) dan, önce daha yavaş hareket eden maddenin(B) hızı bulunur

$$v_B = \frac{1}{(t_R)_B}$$

Sonra bu bağıntı denklem(11) ve (12) ile birleştirilerek  $(t_R)_B$  çıkarılır

$$(t_R)_B = \frac{NH(1+k'_B)}{u}$$

Burada  $(t_R)_B$ , hareketli fazın hızı  $u$  olduğunda B nin çıkması için gerekli zamanı gösterir. Bu eşitlik denklem(18) ile birleştirilerek  $(t_R)_B$  için rezolasyon ( $R_S$ ) ile ilişkili aşağıdaki denklem elde edilir.

$$(t_R)_B = \frac{16 R_S^2 H}{u} \left( \frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \frac{(1+k'_B)^3}{(k'_B)^2} \quad (21)$$

## Kolon Performansının Optimizasyonu

Denklem(17) ve (21), kolon kromatografisinde çok önemlidir; uygun rezolasyon derecesini sağlayacak koşulların seçiminde bu iki denklemden yararlanılır. Denklemler üçer kısımdan oluşmuşlardır. Birinci terimler kolonun  $\sqrt{N}$  veya  $H$  cinsinden verimini tanımlar. İkinci terimlerde  $\alpha$  katsayısı vardır ve secicilik terimidir; bu terim örnekteki iki maddenin sadece özelliklerine bağlıdır. Denklemlerdeki üçüncü terimler kapasite terimleridir,  $k'_B$  faktörünü içerirler ve hem maddenin ve hem de kolonun özelliklerine bağlıdır.

### Kolon Verimi

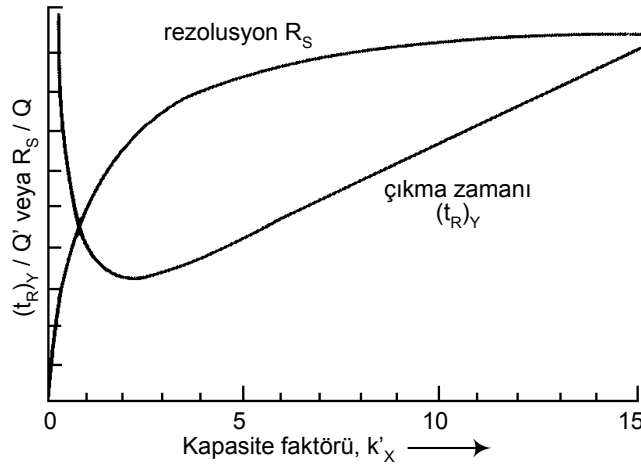
Denklem(17)'de görüldüğü gibi rezolasyon, kolondaki tepsi sayılarının kare kökü ile orantılıdır. iyi bir ayırma yapabilmek için tepsi sayısı artırılabilir. Bu durumda  $H$  değerinin küçültülüp kolon boyunun da uzatılmasıyla ayırma işlemi için gerekli zamanın uzamaması sağlanabilir. Daha önce anlatılan hız teorisinde (2. kısım) verimin en yüksek,  $H$  in ise en düşük olmasını sağlayan değişkenler tanımlanmıştır.

### Kapasite Faktöründeki Değişme

Bir maddenin kapasite faktörü  $k'_B$ , hareketli veya sabit fazların bileşimlerinin değiştirilmesiyle farklı değerler alır. Hareketli fazın bileşiminin değiştirilmesi kolaydır ve bir ayırma işleminin optimize edilmesinde çoğunlukla uygulanan bir yöntemdir. Denklem(12)'ye göre  $k'_B$  değeri, sabit fazın hareketli faza oranının değiştirilmesiyle de artırılabilir veya azaltılabilir. Sabit fazı oluşturan malzemenin tanecik boyutlarının küçültülmesi de  $k'_B$  değerini artırır, çünkü yüzey alanı artar ve dolayısıyla  $V_S$  büyür.  $k'_B$  nin artması rezolusyonu ( $R_S$ ) artırır, fakat pikin çıkma zamanını ( $t_{R_B}$ ) uzatır. Bu iki etkiyi daha iyi anlayabilmek için, Denklem(17) ve (21) aşağıdaki şekilde yazılabilir.

$$R_S = Q \frac{k'_B}{1 + k'_B} \quad \text{ve,} \quad (t_{R_B}) = Q' \frac{(1 + k'_B)^2}{(k'_B)^2}$$

Burada, denklem(17) ve (21)'deki ilk ikişer terim  $Q$  ve  $Q'$  harfleri ile gösterilmiştir.  $R_S/Q$  ve  $(t_{R_B}) / Q'$  değerleri  $k'_B$  'nin fonksiyonu olarak grafiğe alındığında, Şekil-9'daki gibi iki eğri elde edilir;  $Q$  ve  $Q'$  nun sabit kaldığı varsayılmıştır.  $k'_B$  değerinin 10'dan daha büyük olması istenmez, çünkü bu değer üstünde, şekilde de görüldüğü gibi rezolusyondaki artışın çok az olmasına karşın ayırma zamanındaki uzama fazladır. Maddenin ayrıldığı en kısa zaman süresi  $k'_B$  'nin 2-3 arasında olduğu bölgedir.  $k'$  nin optimum değeri; çoğunlukla 2 - 5 arasındadır.



Şekil-9: Kapasite faktörü  $k'_y$  'nin çıkma zamanı  $(t_{R}_y)$  'ye etkisi,  $k'$  nün değişiminde  $Q$  ve  $Q'$  nün sabit olduğu kabul edilmiştir

### Seçicilik Faktöründeki Değişme

Denklem(17) 'ye göre, seçicilik faktörü büyüdükçe rezolusyon da artar. Bu parametrenin 2 'den büyük olması halinde en kısa zamanda iyi bir ayırma yapılabilir. Diğer taraftan,  $\alpha$  nın 1 'e yaklaşması durumunda çok uzun bir kolon kullanılmazsa rezolusyon kaybolur. Denklem(21)'de görüldüğü gibi 1 'e yakın değerlerinde ayırma zamanı anormal derecede uzar. Örneğin,  $\alpha$  'nın 1.1 değerine karşılık 1.01 olması durumunda aynı rezolusyon için gerekli zaman 84 kat daha fazla olur.

### 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 mm olduğuna göre aşağıdaki ; (a) kolon rezolusyonunu, (b) kolondaki ortalama tepsi sayısını, (c) tepsi yüksekliğini, (d) rezolusyonun 1.5 olması için gerekli kolon uzunluğunu, ve (e) uzun kolonda B maddesinin çıkması için gerekli zamanı hesaplayınız.

(a) Kolon rezolusyonu ( $R_s$ ) denklem (15)'den hesaplanır

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

$$R_s = \frac{2 (17.63 - 16.40)}{1.11 + 1.21} = 1.06$$

(b) Ortalama tepsi sayısı denklem(7)'den bulunur.

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 \quad N = 16 \left( \frac{16.40}{1.11} \right)^2 = 3493$$

$$N = 16 \left( \frac{17.63}{1.21} \right)^2 = 3397$$

$$N_{ort} = (3393 + 3397)/2 = 3445 = 3.44 \times 10^3$$

(c) Tepsi yüksekliğinde, denklem(3) ve (4)'den çıkarılan  $H = L/N$  eşitliği kullanılır.

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad N = \frac{L^2}{\sigma^2}$$

$$\sigma = \frac{L^2}{N} \quad H = \frac{L^2}{NL} \quad H = \frac{L}{N}$$



$$H = \frac{30}{3445} = 8.708 \times 10^{-3} = 8.71 \times 10^{-3} \text{ cm}$$

(d) N ve L nin artması ile  $k'$  ve  $\alpha$  değişmez. Denklem(18)  $N_1$  ve  $N_2$  cinsinden yazılır ve iki denklem birbirin bölünerek  $N_1/N_2$  bulunur.

$$N = 16 R_S^2 \left( \frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left( \frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)^2$$

$$N_1 = 16 (R_S)_1^2 \left( \frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left( \frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)^2$$

$$N_2 = 16 (R_S)_2^2 \left( \frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left( \frac{1 + k'_B}{k'_B} \right)^2$$

$$\frac{N_1}{N_2} = \frac{(R_S)_1^2}{(R_S)_2^2}$$

Burada (1) ve (2) orijinal ve daha uzun kolonları gösterir.  $N_1$ ,  $(R_S)_1$  ve  $(R_S)_2$  'nin değerleri yerlerine konularak  $N_2$  hesaplanır.

$$\frac{3445}{N_2} = \frac{(1.06)^2}{(1.5)^2}$$

$$N_2 = 3445 \times \frac{2.25}{1.124} = 6.90 \times 10^3$$

$$L = N_2 H = 6.90 \times 10^3 \times 8.71 \times 10^{-3}$$

$$L = 60.1 \text{ cm}$$

(e) Denklem(21) den  $(t_R)_1 / (t_R)_2$  eşitliği bulunur.

$$(t_R)_B = \frac{16 R_S^2 H}{u} \left( \frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \frac{(1 + k'_B)^2}{(k'_B)^2}$$

$$\frac{(t_R)_1}{(t_R)_2} = \frac{(R_S)_1^2}{(R_S)_2^2} = \frac{17.63}{(t_R)_2} = \frac{(1.06)^2}{(1.5)^2} \quad (t_R)_2 = 35.3 \text{ dakika}$$

Kromatografide kullanılan terimler, miktarlar ve bunların birbirleri ile olan ilişkileri çok ve oldukça karmaşıktır. Tablo-2'de bazı tanımların özeti verilmiştir.

**Tablo-2: Önemli Kromatografik Değerler ve İlişkilerin Özeti**

Deneyle Bulunan Değerler		
Adı	Sembolü	Nereden Bulunduğu
Alıkonma zamanı, hareketli faz	$t_M$	Kromatogramdan (Şekil-8)
Alıkonma zamanı, A ve B 'nin	$(t_R)_A, (t_R)_B$	Kromatogramdan (Şekil-8)
Pik genişlikleri, A ve B 'nin	$W_A, W_B$	Kromatogramdan (Şekil-8)
Kolon dolgu maddesinin uzunluğu	L	Doğrudan ölçme
Akış hızı	F	Doğrudan ölçme
Sabit fazın hacmi	$V_S$	Doğu hazırlama verisi
Maddenin sabit ve hareketli fazlardaki konsantrasyonları	$C_M, C_S$	Analiz ve hazırlama verileri

Hesaplanan Değerler		
Adı	Hesaplama Değerleri	Diğer Özelliklerle İlişkileri
Hareketli fazın hızı	$u = L / t_M$	
Hareket fazın hacmi	$V_M = t_M F$	
Kapasite faktörü	$k' = \frac{t_R - t_M}{t_M}$	$k' = \frac{K V_S}{V_M}$
Dağıtım katsayısı	$K = \frac{k' V_M}{V_S}$	$K = \frac{C_S}{C_M}$
Seçicilik faktörü	$\alpha = \frac{(t_R)_Y - t_M}{(t_R)_X - t_M}$	$\alpha = \frac{k'_Y}{k'_X} = \frac{K_Y}{K_X}$
Rezolasyon	$R_S = \frac{2 [(t_R)_Y - (t_R)_X]}{W_X + W_Y}$	$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \left( \frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left( \frac{k'_Y}{1 + k'_Y} \right)$
Tepsi sayısı	$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2$	$N = \frac{L}{H} = 16 R_S^2 \left( \frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left( \frac{1 + k'_Y}{k'_Y} \right)^2$
Alıkonma zamanı	$(t_R)_Y = \frac{16 R_S^2 H}{u} \frac{\alpha^2}{(\alpha - 1)^2} \frac{(1 + k'_Y)^3}{(k'_Y)^2}$	

Kromatografi, benzer özellikteki maddelerin birbirinden ayrılmasında uygulanan yöntemler arasında birinci sırayı alır. Ayrıca, ayrılan maddelerin kalitatif tanımlanmasında ve kantitatif tayininde de kullanılır. Bu bölümde tam bir analizin yapılmasında kullanılan genel kromatografik kavramlar açıklanacaktır.

## **Kalitatif Analiz**

Bir kromatogram, örnekteki her bir madde hakkında çok az bilgi verir; bunlar maddenin alıkonma zamanı veya bir sıyırma periyodu süresince maddenin sabit fazdaki konumunu gösteren bilgilerdir. 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. Spektral apsislerdeki veriler ( $\lambda$ ,  $\sigma$ , veya  $m/e$ ) kromatografik apiste alınana ( $t_R$ ) kıyasla daha hassastır.

Bu gerçekler kromatografinin kalitatif analizlerde başarısız bir yöntem olduğunu göstermez. İsimleri bilinen ve çoğunlukla birarada bulunan bazı madde karışımlarının tanımlanması yapılabilir. Örneğin, bir protein hidroliz örneğinde 30 veya daha çok sayıdaki amino asidin varlığı veya yokluğu, ince bir kromatografik levhada açığa çıkan görüntülerin 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. Yani kalitatif spektroskopik analizlerde analizin geleceği kromatografiye bağlıdır.

## **Kantitatif Analizler**

Kromatografi süratli, basit, ve çok iyi bir ayırma yöntemi olması nedeniyle son 30 yılda büyük bir alana yayılmıştır. Bunda kromatografinin kantitatif analizlerde çok kullanılması en önemli etken olmuştur.

Kantitatif kromatografide analit pikinin yüksekliği veya alanı bir veya daha çok sayıdaki standartla 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 dik inilir; dikin 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, sıyrıcının akış hızı ve örneğin injeksiyon hızıdır. Ayrıca kolonun aşırı yüklenmemesine de dikkat edilmesi gerekir. Örnek injeksiyon hızı bir kromatogramda ilk çıkan pikler için önemlidir ve % 5-10 'a kadar ulaşan relatif hatalara yol açar.

### **Pik Alanlarına Göre Analiz**

Yukarıdaki paragrafta belirtilen değişkenler pik alanında genişleme etkisi yapmazlar. Bu bakımdan alana göre yapılan analizler yüksekliğe göre yapılanlara kıyasla daha yeterlidir. Diğer yönden pik yüksekliklerin ölçülmesi daha kolaydır ve dar piklerde bu yöntemle daha doğru sonuçlar alınır.

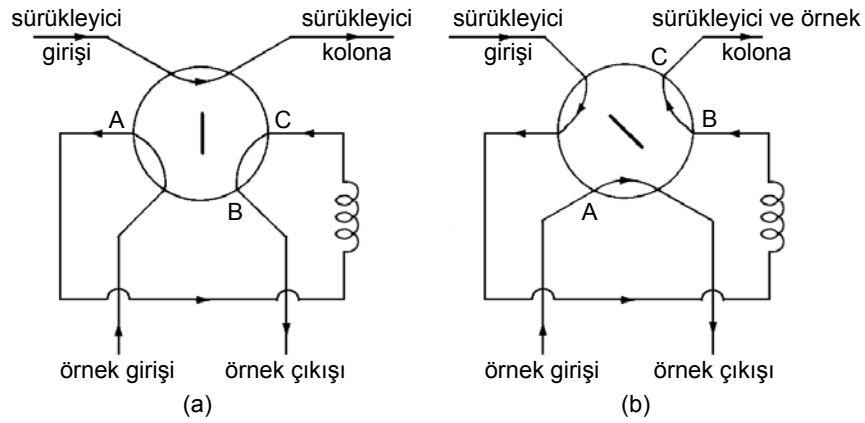
Modern kromatografi cihazlarında bilya ve disk veya elektronik bilgisayarlar vardır. Bunlarda pik alanları hassas olarak ölçülebilir. Bu tip sistemlerin olmaması durumunda hesaplamalar el ile yapılır. Uygun genişlikteki simetrik piklerde alan basit bir yöntemle hesaplanır; pikin yüksekliği, yüksekliğin 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. McNair ve Bonelli, 10 örnek üzerinde bu yöntemlerin hassasiyetlerini inceleyen bir çalışma yapmışlardır. Çalışma sonuçlarına göre aşağıdaki standart sapmalar belirlenmiştir.

### **Standartlarla Yapılan Kalibrasyon**

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, injekte edilen standart ve analit örnek hacminin tam sabit olamayışıdır; ayrıca injeksiyon hızı da hataya neden olan bir faktördür. Örnek miktarı çoğunlukla 1 mikrolitre gibi çok az miktarlardır ve her defasında aynı hacimde madde verebilmek için bir mikro şırınga kullanılarak relatif hata % birkaç seviyesine kadar düşürülebilir. Bu hata gaz-sıvı kromatografisinde daha da büyüktür; örnek sıcak bir uçtan injekte edildiğinde, şırınga ucundaki buharlaşma kolona verilen madde hacminde büyük farklılıklar olmasına yol açar.

Örnek hacmindeki hatalar, Şekil-10'da görülen bir "döner gaz örnek valfi ile verilen miktarın % 1-2'sine kadar düşürülebilir. (a)'daki örnek yuvası örnekle doldurulur; valfin  $45^\circ$  döndürülmesiyle yuvadaki örnekten belirli bir miktarı hareketli faz akımı içine verilir.



Şekil-10: Döner bir örnek valfi; (a) örnek yuvası ABC'nin doldurulduğu valf konumu, (b) örneğin kolona verilmesi

### İç Standart Yöntemi

Kantitatif kromatografide en hassas sonuçlar örnek injeksiyonundan kaynaklanan hataların bulunmadığı iç standart yöntemi ile elde edilir. Bu yöntemde örnek ve standartlara çok hassas tartılmış bir iç standart maddesi ilave edilir; analit pik alanının (veya yüksekliğinin) iç standart pik alanına (veya yüksekliğine) oranı analitik parametre olarak kullanılır. Yöntemin başarılı olabilmesi için iç standart pikinin örnekteki diğer maddelerin piklerinden uzakta ( $R_S > 1.25$ ), analit pikinin

yakınında olması gerekir. Uygun bir iç standart kullanıldığında relatif hata %0.5-1 civarındadır. (Ref. Kalibrasyon)

### Alan Normalizasyonu Yöntemi

Örnek injeksiyonundaki 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. (Ref. Kalibrasyon)

### ÖRNEK

Aşağıdaki veriler butil-alkoller karışımı bir örneğin kromatogramından alınmıştır (dedektör hassasiyeti düzeltme faktörleri bilinen miktarlarda saf alkoller kullanılarak ayrı deneylerde saptanmıştır).

Alkol	Pik alanı, cm <sup>2</sup>	Dedektör algılama faktörü	Düzeltilmiş alanlar, cm <sup>2</sup>
n-bütil	2.74	0.603	1.652
i-bütil	7.61	0.530	4.033
s-bütil	3.19	0.667	2.128
t-bütil	1.66	0.681	1.130
toplam:			8.943

$$\text{n-bütil alkol, \%} = 1.652 \times 100/8.943 = 18.5$$

$$\text{i-bütil alkol, \%} = 4.033 \times 100/8.943 = 45.1$$

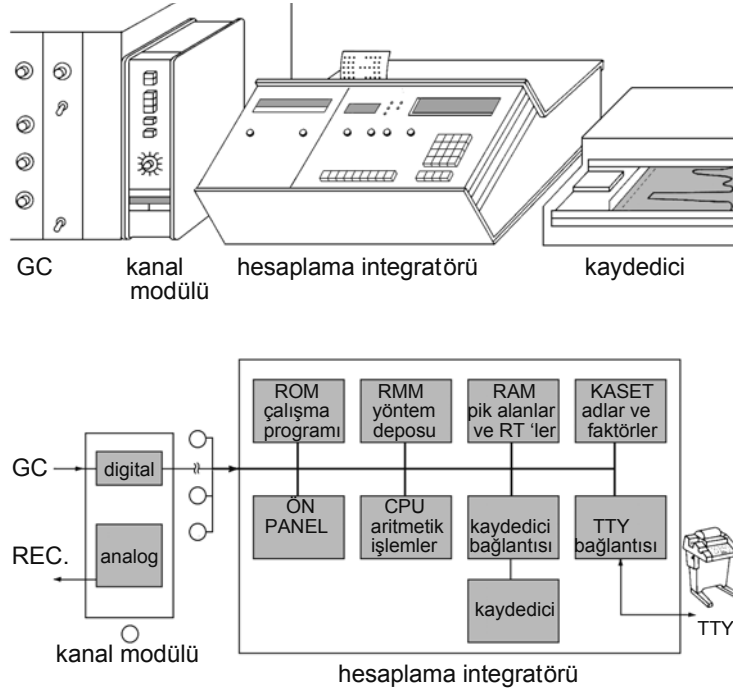
$$\text{s-bütil alkol, \%} = 2.128 \times 100/8.943 = 23.8$$

$$\text{t-bütil alkol, \%} = 1.130 \times 100/8.943 = 12.6$$

$$\text{toplam, \%:} \quad 100$$

## Bilgisayarlı Kromatografi

Modern kromatografi cihazlarında kolon sıcaklığı, sıyırıcı akış hızı, örnek injeksiyon zamanı ve örnek sıcaklığı gibi parametreler " mikroprosesör" lerle kontrol edilir. Bunlarda kişiler tarafından yapılan hiç bir kontrol yoktur veya çok azdır. Cihazlar çok karmaşık fakat son derece otomatiktir. Örnekler (bir kaç düzine olabilir) dönen bir sistem içine konur. Her analizden sonra kolon otomatik olarak başlangıç noktası gelir, döner örnek tablası da yeni bir örneği kolonun önüne getirecek şekilde döner, örnek otomatik olarak çekilir ve kolona injekte edilir, kromatogramı alınır ve bir bilgisayar hafızasına yerleştirilir. Veriler kromatogram ve tablo şeklinde alınır; tabloda alıkonma zamanları, relatif pik alanları ve bazılarında her pikin hangi bileşiğe ait olduğu da kaydedilir.



Şekil-11: Bir kromatografi hesaplama integratörü

### Yararlanılan Kaynaklar

Principles of Instrumental Analysis, D.A.Skoog, D.M. West, II. Ed. 1981