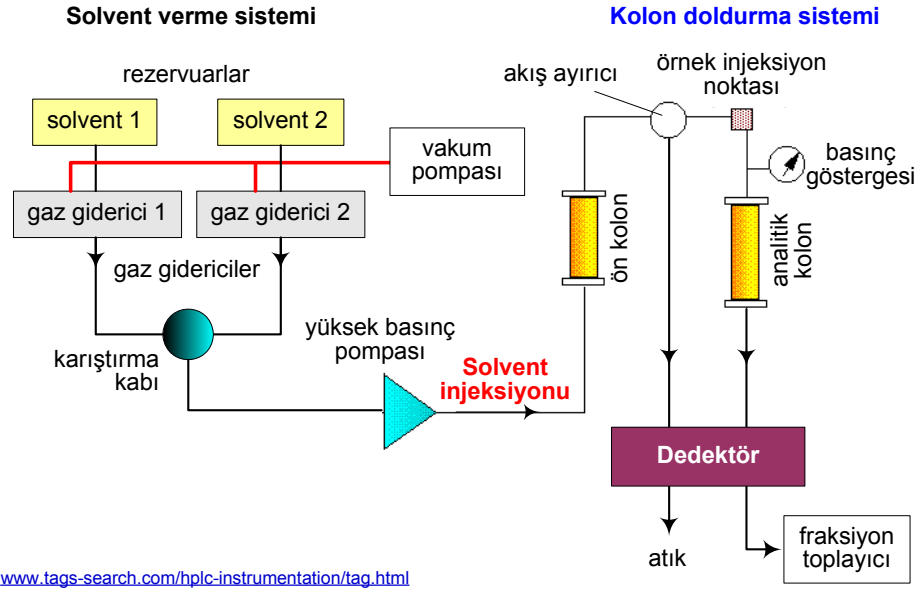


SIVI KROMATOGRAFİSİ

Ref. e-makaleleri, Enstrümantal Analiz



Şekil-1: Tipik bir sıvı kromatografisi cihazında sıvı akışını gösteren diyagram

1. KOLON KROMATOĞRAFI

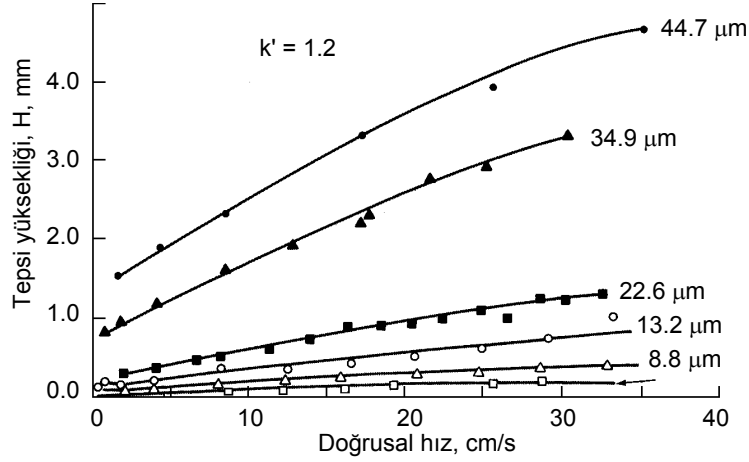
Klasik sıvı kromatografisi yönteminde çapı 10-50 mm olan ve 50-500 cm uzunluğunda katı sabit faz malzemesi içeren cam tüpler kullanılır. Uygun bir akış hızı alınabilmesi için katı malzemenin tanecik büyüklüğünün 150-200 mikrometreden fazla olması gerekir. Dolgu maddesinin yukarıdaki sıvının yüksekliği hareketli fazı kolon boyunca yürütebilecek seviyede olmalıdır. En iyi akış hızı dakikada bir mililitrenin onda bir kaçı kadardır ve tabii ayırma işleminde harcanan zaman da fazla olur. Klasik uygulamanın çabuklaştırılması için sıvı akış hızının vakumla çekilerek veya pompa ile itirilerek hızlandırılması olumlu sonuçlar vermez.

Sıvı kromatografisinin uygulanmaya başlandığı ilk yıllarda kolon veriminin, dolgu maddesinin tanecik boyutları küçültülerek önemli derecede artırılabilceği düşünülmüştür. 1960 yıllarında çapı 10 mikrometre gibi çok küçük taneciklerin üretildiği ve kullanıldığı yeni bir teknoloji geliştirilmiştir. Bu teknolojiye, klasik sıvı kromatografisinde kullanılan basit sistemlerin tersine çok karmaşık cihazlara gereksinim vardır. "Yüksek-performanslı sıvı kromatografisi, HPLC (highperformance liquid chromatography)" denilen bu tip cihazlar klasik kromatografilerde yapılamayan uygulamalarda çok başarılıdır.

Yüksek - Performanslı Sıvı Kromatografisi

Şekil-2'de, deneyde elde edilen bir sıvı kromatografisi verilerinin grafikleri verilmiştir; şekilde tepsi yüksekliğinin, akış hızı ve dolgu maddesinin tanecik çapına göre değişimleri görülmektedir. Eğrilerin hiç birinde, bir minimum yoktur; sıvı kromatografisinde bu tip minimumlarla sadece çok düşük akış hızlarında karşılaşılır. Yine aynı konuda görülen denklem(8), verim ile hareketli faz arasındaki ilişkiyi yeteri derecede tanımlayamaz; burada, Giddings tarafından çıkarılan daha kompleks bir denklem kullanılır (J.C Giddings, Anal. Chem., 35, 1338, 1963).

Şekil-1'de ayırma veriminin, küçük tanecik çaplarında çok arttığı açık bir şekilde görülmektedir. Bu tip maddelerle hazırlanan kolonlarda uygun akış hızları, yüksek basınçlı pompa ile sağlanabilmiştir. Bu da HPLC cihazındaki sistemin klasik sıvı kromatografisinde kullanılan yükleme (kendi ağırlığı ile) kolonuna göre çok daha ayrıntılı ve karmaşık olduğunu gösterir. Şekil-2'de böyle bir cihazın bölümlerinin gösterildiği bir blok diyagram verilmiştir.



Şekil-2: Dolgu maddesi tanecik büyüklüğünün ve akış hızının tepsi yüksekliğine (H) etkisi. Kolon boyutları 30 cm x 2.4 mm dir; madde N,N-dietil-p-aminobenzen, hareketli faz heksan, metilen klorür ve izopropil alkoldür; dolgu maddesi corosil II ince slikajel

a. Solvent Verme Sistemi

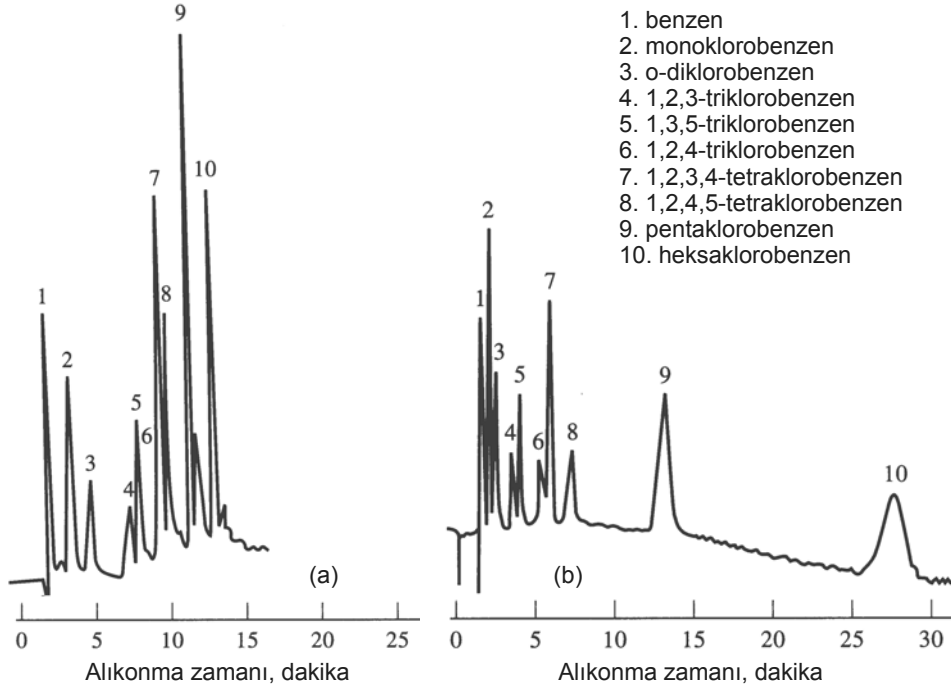
Çözgen (Solvent) Rezervuarı ve Gaz Giderme Sistemi

Modern bir HPLC cihazında, her biri 1-2 lt kapasiteli bir veya daha fazla cam veya paslanmaz çelik rezervuarlar bulunur. Rezervuarlarda çözünmüş gazları, çoğunlukla oksijen ve azotu, giderecek düzenekler vardır. Bu gibi gazlar kolonda ve dedektör sistemlerinde kabarcıklar oluşturarak çalışmayı bozarlar; band genişlemesine ve dedektörün algılama bozukluğuna neden olurlar. Gaz giderici düzeneklerde bir vakum pompa sistemi, bir distilasyon sistemi veya Çözgeni ısıtan ve karıştıran bir sistem bulunur.

Tek bir çözgenin kullanıldığı ayırmaya "tek kaynaklı (isokratik) sıyırma" denir. Polariteleri birbirinden önemli derecede farklı olan iki (bazan daha çok) çözgenin kullanıldığı ve "dereceli sıyırma (gradient)" adı verilen yöntemde ayırma verimi oldukça yüksektir. Sıyırma işlemi başlatıldıktan sonra iki çözgenin oranları programlı bir şekilde değiştirilir; değiştirme bazan sürekli, bazan da kademeli olarak

yapılır. Modern HPLC cihazlarında, iki veya daha fazla rezervuardan bir karıştırma odacığına sürekli olarak değişen hızlarda çözgen verilir; Çözgenlerin hacimleri arasındaki oran zamanla doğrusal veya üstel fonksiyon olarak değiştirilebilir.

Şekil-3'de dereceli sıyırma işlemi ile yapılan iyi bir ayırma görülmektedir. 3b' deki kromatogramda sıyırma hacimce 50/50 metanol/su çözeltisi kullanılmıştır. 3a'daki kromatogramda ise aynı çözgen çifti sıyırmanın başlangıcında 40/50 oranında olacak ve sonra metanol oranı dakikada % 8 hızla artacak şekilde bir uygulama yapılmıştır. Dereceli sıyırma yöntemiyle yapılan ayırmalarda, ilk çıkan piklerde herhangi bir bozulma olmaksızın ayırma süresi kısaltılabilir.



Kolon: 1 m x 2.1 mm (iç çap), hassas-delikli paslanmaz çelik; dolgu maddesi: %1 permafaz ODS; örnek: 5 µL, izopropil alkolde çözülmüş klorlu benzenler; detektör: UV fotometre (254 nm); sıcaklık 60 °C, basınç 1200 psi

Şekil-3: Kademeli sıyırma ile ayırma veriminin artırılması; (a) dereceli sıyırma
(b) tek kaynaklı sıyırma

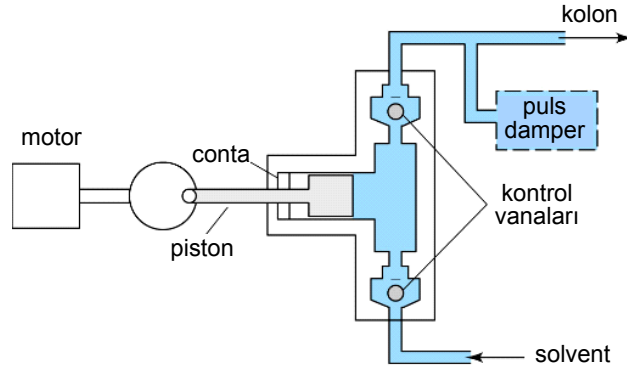
Pompalar

HPLC cihazlarının çoğundaki pompaların çıkış basıncı 1000 psi (libre/inc²) den büyüktür, dakikada 3 ml hızla akış sağlayan 4000-6000 psi lik pompalar tercih edilir. Akış hızı \pm % 2 lik bir toleransla sabit olmalıdır. Bu amaçla kullanılabilen iki mekanik pompa tipi vardır; bunlar:

- Vidalı (screw-driven) şırınga tipi pompalar
- Pistonlu pompalar

Birinci tip pompalarda kolaylıkla kontrol edilebilen, darbesiz bir akım alınır; ancak kapasitede düşme ve çözgen oranlarının değiştirilmesinde sorunlarla karşılaşılır. Pistonlu pompaların kullanım alanları daha geniştir, kademeli olarak azaltılan miktarlarda darbeleri bir akım verir. Pistonlu pompaların avantajı istenildiği kadar çözgen basabilmesidir; ayrıca iç hacminin küçük olması dereceli sıyırma işlemi için ideal bir durumdur (Şekil-4).

HPLC cihazlarında pnömomatik pompalar da kullanılabilir; en basitinde hareketli faz, sıkıştırılmış hava ile basınçlandırılan bir kabın içindeki portatif bir rezervuarda bulunur. Basittir, ucuzdur ve darbesiz akım verirler; kapasiteleri ve çıkış basınçları sınırlıdır, çözgenin viskozitesine göre akış hızı değişir. Ancak dereceli sıyırma işlemi için uygun değildir.



<http://faculty.atu.edu/abhuiyan/Course/Chem%204414/Chapter%2028.ppt#14>

Şekil-4: Bir pistonlu pompanın şematik görünümü

Pompalarla yüksek basınçlara çıkılmasının herhangi bir tehlike yaratmayacağını belirtmek gerekir, sıvılar fazla sıkıştırılmadıklarından sistemin bir parçasında meydana gelebilecek kopma veya açılma sadece çözügen sızıntısına yol açar.

b. Kolon Doldurma Sistemi ve Örnek İnjeksiyonu

Ön Kolonlar

Bazı HPLC cihazlarında çok bilinen ön kolonlar vardır. Ön kolonlardaki dolgu maddesi analitik kolondaki dolgu maddesi ile kimyasal yapı bakımından aynıdır, fakat tanecik boyutları daha büyüktür. Böylece ön kolon boyunca olan basınç düşmesi, sistemin geri kalan kısmındakine kıyasla ihmal edilebilir bir düzeydedir. Ön kolonun amacı, çözügendeki safsızlıkları tutarak analitik kolonun kirlenmesini önlemektir. Ayrıca ön kolon hareketli fazı sıvı ile doyurarak sabit fazı oluşturur; böyle bir durumda analitik kolondaki dolgu maddesinden sabit fazın sıyrılması işlemine gerek olmaz. (Şekil-5c)

Örnek İnjeksiyon Sistemleri

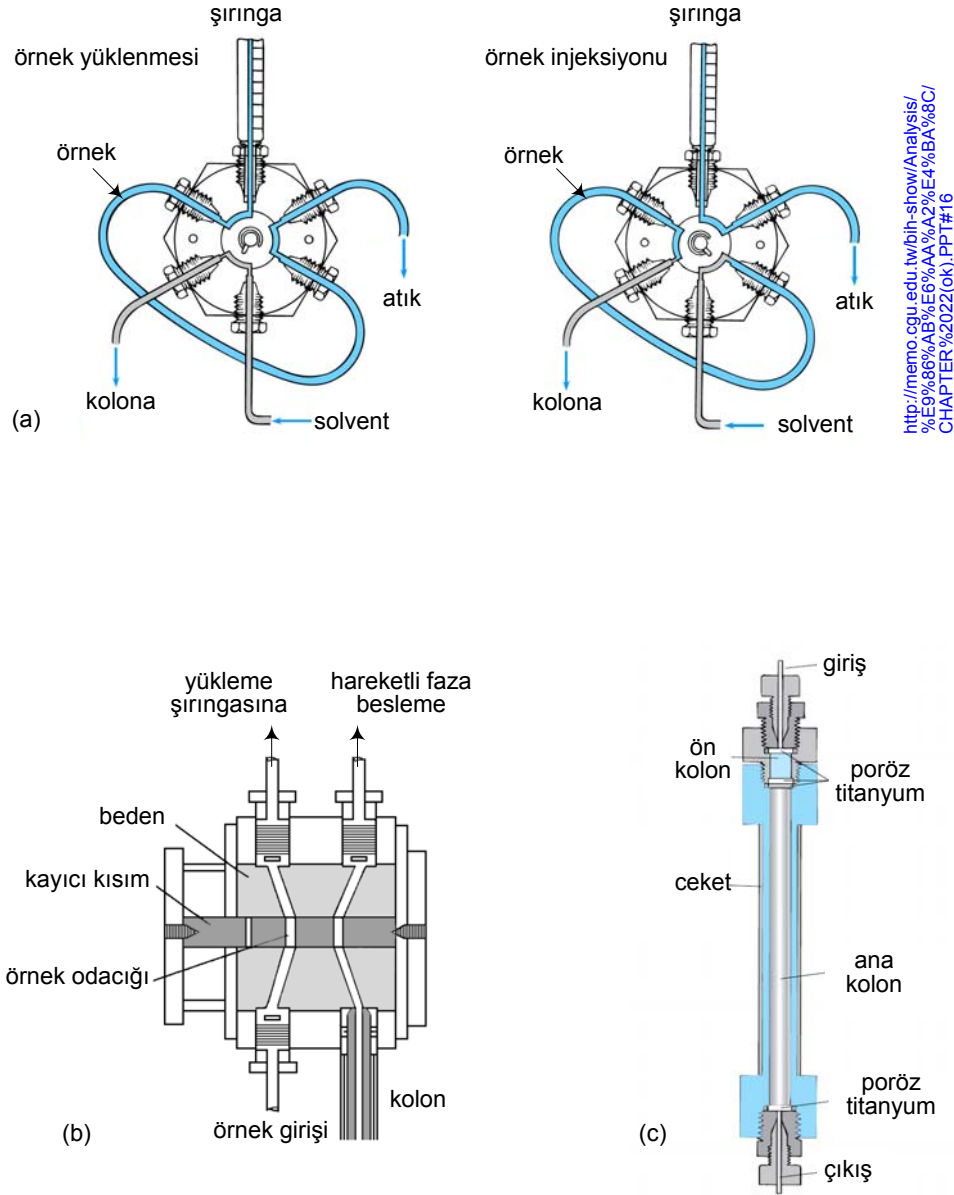
HPLC'de en çok döner örnek valf sistemi kullanılır. (Şekil-5a). Bazan kızak valflerde de kullanılmaktadır. (Şekil-5b). Kızak, Kel-F'den üretilmiştir ve iki tetrafluoroetilen parçası arasındaki düzlemde hareket eder konumdadır. Örnek valfe bir şırınga ile çekilir, sonra kızak soldan sağa doğru hareket ederek örneğin solvent akımı içine girmesini sağlar.

Örnek injeksiyonu bir şırıngayla da yapılabilir. İnjektör İğnesi silikon, neopren veya teflondan yapılmış bir conta (septum)'ya batırılarak sisteme verilir; injektör çekildiğinde conta kendi kendini kapatır.

Kolonlar

HPLC kolonları kalın kenarlı cam tüpten veya hassas-delikli paslanmaz çelik borudan yapılır. İnert yüzeylerin gerektiği özel kimyasal maddeler ve biyolojik uygulamalar da PEEK (bir mühendislik plastiğidir) ve cam tüp kolonlar kullanılır (600 psi altındaki basınçlarda).

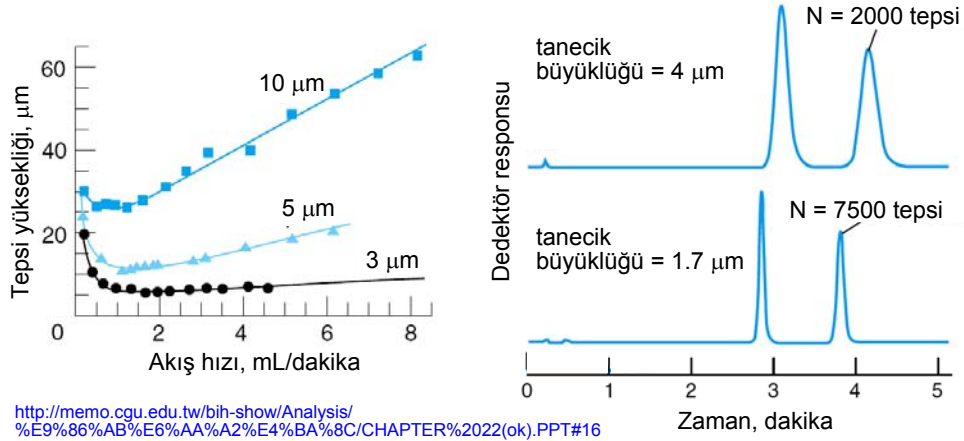
Kolon uzunlukları çoğunlukla 15-150 cm, iç çapı 2-3 mm kadardır. 1 m veya daha uzun kolonlar, kısa kolonları ucuca bağlayarak hazırlanabilir. Kolonlar sarılmış halde kullanılır; bu durumda kolon veriminde biraz düşme gözlenir.



[http://memo.cgu.edu.tw/bih-show/Analysis/%E9%86%AB%E6%AA%A2%E4%BA%8C/CHAPTER%2022\(ok\).PPT#16](http://memo.cgu.edu.tw/bih-show/Analysis/%E9%86%AB%E6%AA%A2%E4%BA%8C/CHAPTER%2022(ok).PPT#16)

Şekil-5: HPLC, (a) döner örnek valfi, (b) kızak örnek valfi, (c) ön ve ana kolonun şematik görünümü

HPLC kolonlarında en fazla kullanılan dolgu maddesi mikroporöz silikadır. Alumina ve Celite (diyatome toprağı) de çok kullanılan maddelerdir. Dolgu maddelerin tanecik büyüklüklerinin 1.5-10 mikrometre aralığında olması istenir.



[http://memo.cgu.edu.tw/bih-show/Analysis/%E9%86%AB%E6%AA%A2%E4%BA%8C/CHAPTER%2022\(ok\).PPT#16](http://memo.cgu.edu.tw/bih-show/Analysis/%E9%86%AB%E6%AA%A2%E4%BA%8C/CHAPTER%2022(ok).PPT#16)

Şekil-6: Dolgu maddesi tanecik büyüklüğünün kolon tepsi yüksekliği ve dedektör responsuyla ilişkisi

İkinci bir tip dolgu maddesi zarlı (pellicular) taneciklerdir; bunlar 40 mikrometre kadar çaptaki cam taneciklerinin, 1-3 µm kalınlıkta silika jel, alumina veya bir iyon değiştirici reçine gibi poröz bir madde ile kaplanarak hazırlanır. Böyle bir ince tabaka fazlar arasındaki dengenin hızla kurulmasını sağlar; böylece kolon verimi yükselir. Zarlı dolgu maddeli kolonlara sınırlı miktarlarda örnek verilebilir; bu miktar poröz maddenin ancak onda biri kadar olabilir.

d. Dedektörler

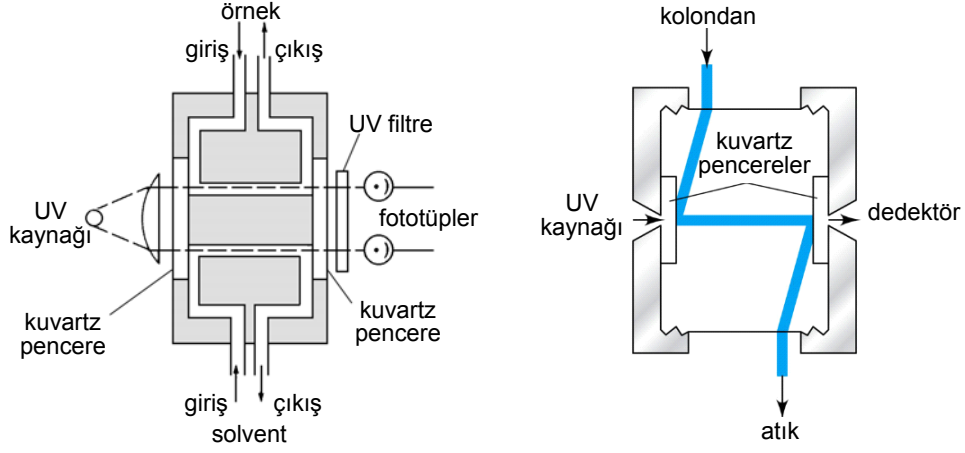
HPLC'de, gaz kromatografide olduğu gibi çok hassas dedektör sistemlerine gereksinim olmaz. Bu nedenle örneğe bağlı olarak çeşitli dedektörler kullanılabilir. Tablo-1'de çok kullanılan dedektörler ve özellikleri verilmiştir.

Tablo-1: Bazı Sıvı Kromatografisi Dedektörlerinin Özellikleri

Dedektör	Hassasiyet (g/ml), maksimum	Akış hızına hassasiyet	Sıcaklığa hassasiyet
UV absorpsiyon	5×10^{-10}	yok	düşük
IR absorpsiyon	10^{-6}	yok	düşük
Fluorometre	10^{-10}	yok	düşük
Refraktif indeks	5×10^{-7}	yok	$\pm 10^{-4} \text{ }^{\circ}\text{C}$
Kondüktometre	10^{-8}	var	$\pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Hareketli tel	10^{-8}	var	yok
Kütle spektrometresi	10^{-10}	yok	yok
Polarograf i	10^{-10}	var	$\pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$
Radyoaktivite		yok	yok

Ultraviyole ve Görünür Işık Dedektörler

En çok kullanılan dedektörler ultraviyole veya görünür ışın absorpsiyonuna dayanan dedektörlerdir. Fotometreler ve spektrofotometreler ticari cihazlardır. Fotometrelerde bir civa kaynağın alınan 254 ve 280 nm bandları kullanılır; bu dalga boylarında pek çok organik fonksiyonel grup absorpsiyon yapar. Spektrofotometrik dedektörler fotometrelerden daha elverişlidir, çünkü bunlarda örnekteki maddelerin absorpsiyon yapacağı dalga boylarını seçme olanağı vardır. Fotometrik dedektörlerde cihazın dalga boyu aralığında, örnekteki maddelerin ışığı absorblaması, fakat çözgenin herhangi bir absorpsiyona neden olmaması gerekir. Şekil-7'de ultraviyole fotometrik bir dedektörün şematik diyagramı verilmiştir.



Şekil-7: HPLC ultraviyole dedektörler

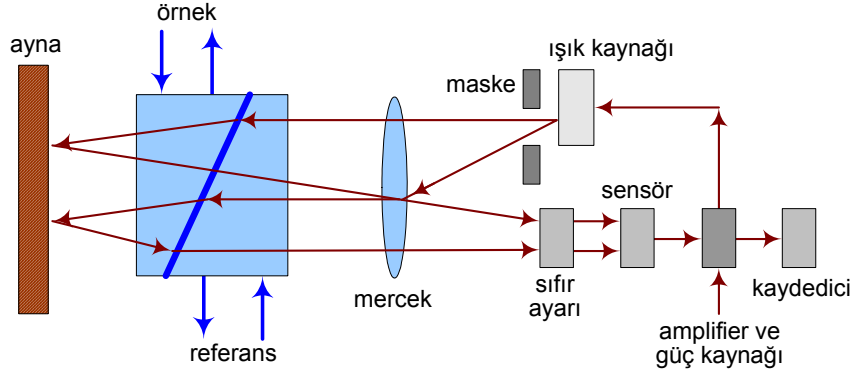
Refraktif İndeks Dedektörler

Refraktif indeks bir bulk özelliğidir, dolayısıyla refraktif indeks dedektörünün algılaması hareketli fazdaki tüm komponentlerin toplam refraktif indeksine dayanır.

Refraktif indeks dedektörü en az hassas sıvı kromatografisi dedektörüdür; çevre sıcaklığı, basınç, akış hızı değiştiğinde dedektörün algılaması da değişir. Çeşitli dezavantajlarına rağmen, refraktif indeks dedektörleri, noniyonikler, UV bölgede absorpsiyon yapamayan maddeler ve flüoresans olmayan bileşikler için çok uygun dedektörlerdir. Refraktif indeks dedektörleri çeşitlidir; diferansiyel refraktif indeks, Fresnel metodu, Christiansen etki, interferometre, termal lens, dielektrik sabiti dedektörler gibi.

Şekil-8'da bir diferansiyel refraktif indeks dedektörünün şematik diyagramı verilmiştir. Burada çözügen ve analit çözeltileri bir cam levha ile birbirinden ayrılmıştır. Cam levha, iki çözeltinin refraktif indeksleri birbirinden farklı olduğunda gelen ışının sapmasını sağlayacak bir açı ile yerleştirilmiştir. Bir ışık demeti optik maske'den geçerek hücre bölmesine gelir. Mercekler demeti yönlendirerek örnek ve referans hücrelerden geçmesini ve düz aynaya gelmesini sağlarlar. Ayna demeti yansıtarak tekrar örnek ve referans hücrelerine gönderir. Mercekten geçen demet bir fotosel üzerine odaklanır. Demetin yerini şiddeti değil, açısız sapması belirler; sapma, iki hücredeki maddeler arasındaki refraktif indeks farkının bir sonucudur.

Fotoelektrik hücrede demetin odak konumu (yeri) değiştiğinde çıkış da değişir ve fark sinyal elektronik olarak modifiye edilerek örnek hücresindeki madde konsantrasyonu ile orantılı bir sinyal şekline dönüştürülür.



Şekil-8: Refraktif indeks dedektörü (sapma açısına göre)

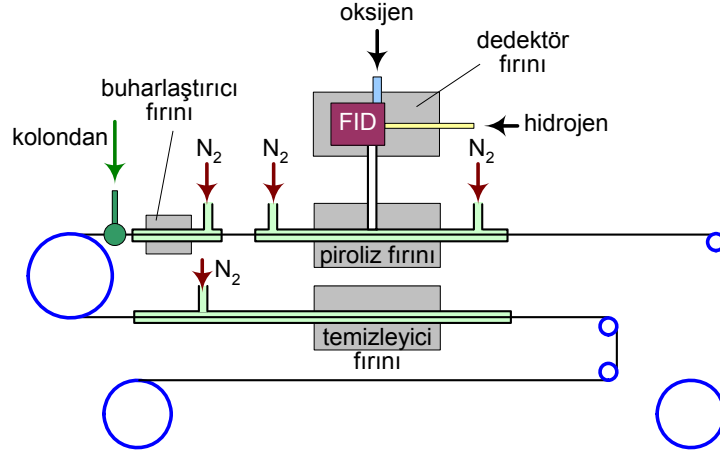
Transport Dedektör

Transport dedektör metal zincir, tel veya disk gibi bir taşıyıcıdır. Sürekli olarak kolon akımından geçer, örneğin bulunduğu hareketli fazdan örneği ekstrakt eder ve yüzeyinde ince bir film tabakası halinde biriktirir; film üzerinde kalan hareketli faz buharlaştırılarak uzaklaştırılır. Bu işlemden sonra taşıyıcı, üzerinde biriken maddenin saptanması için uygun bir algılama sistemiyle taranır. Bu amaçla, örneğin, piroliz ürünlerinin saptanması istendiğinde alev iyonizasyon dedektörü (FID) kullanılır; bunun için taşıyıcı ısıtılır, örnekteki piroliz ürünleri açığa çıkar ve ürünler çoğunlukla karbon içerdiğinden FID ile algılanır.

Hareketli fazda uçucu olmayan maddeler bulunması halinde doğru sonuç vermez, ayrıca kullanılan solventin uçucu ve çok saf olması gerekir.

Şekil-9'da, transport dedektörlere bir örnek olarak hareketli tel (moving wire) dedektörün şematik diyagramı verilmiştir. Bu tip bir dedektörde, sürekli hareket eden bir tel halka ile sıyırıcının bir kısmı bir alev iyonizasyon dedektörüne taşınır. Tel önce sıyırıcıdan geçer, onu bir fırına taşır ve burada sıyırıcının çözgeni buharlaşır. Buradan azot atmosferi altında tutulan piroliz fırınına gelen örnek piroliz

olur; piroliz ürünleri azot gazıyla taşınarak alev iyonizasyon dedektörü (FID) içindeki merkez tüpe taşınır ve bileşenler iyonizasyon dedektörü tarafından algılanır. FID, hareketli fazdaki solventten etkilenmeyen bir dedektördür.



<http://www.chromatography-online.org/HPLC-Detectors/Transport/Moving-Wire/rs64.html>

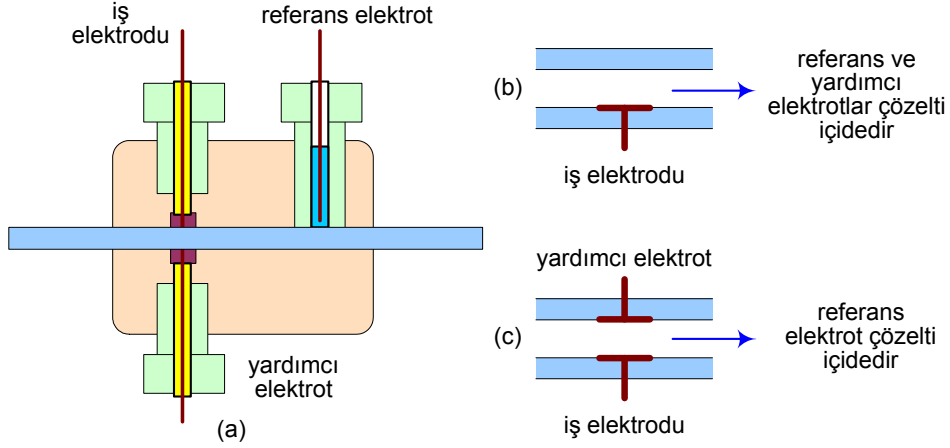
Şekil-9Pye Unicam hareketli tel dedektörü

Elektrokimyasal Dedektör

Elektrokimyasal dedektör uygun elektrotların bulunduğu bir hücrede analitin oksitlenme/indirgenme reaksiyonları sonucunda oluşan akımın ölçülmesi esasına göre çalışır. Doğan akımın seviyesi doğrudan analit konsantrasyonuyla orantılı olduğundan bu tip dedektörler kantitatif tayine olanak verir.

Elektrokimyasal dedektörlerin uygulama alanı fazla geniş değildir; fakat hassasiyetinin yüksek olması nedeniyle özellikle doğal ürünler ve yiyecek maddeleri incelemelerinde kullanılır. Oksijen, metal kirlilikleri ve halojenler ölçmelerde önemli hatalara neden olurlar.

Elektrokimyasal dedektörlerde üç elektrot bulunur; oksitlenme veya indirgenme reaksiyonunun olduğu iş elektrodu, yardımcı elektrot ve referans elektrot. Referans elektrot hareketli fazın taban iletkenliğinde olabilecek değişiklikleri dengeler. Elektrotlar çeşitli geometrik şekillerde yerleştirilebilir; ince tabaka hücrelerde en çok kullanılan yerleşimler şekil-10(b) ve (c)'de görüldüğü gibidir.



http://www.sec.psu.ac.th/web-board/?pid=view_replies&thread_id=722&forum_id=7

Şekil-10: (a) Bir elektrokimyasal dedektör, (b), (c) farklı elektrod konfigürasyonları

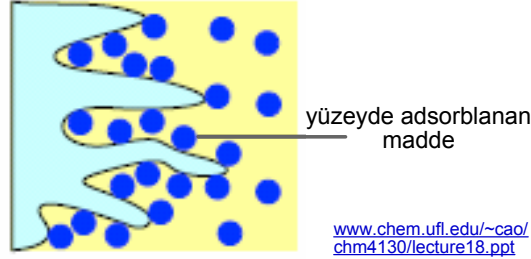
Kütle spektroskopisi de hassas bir özel dedektör olarak kullanılmaktadır. Ticari bir cihazda sıyırıcıyı iyon kaynağına taşıyan bir paslanmaz çelik veya poliimid kayış vardır. Kaynağa ulaşmadan önce kayış bir infrared buharlaştırıcının altından geçerek sıyırıcıdaki solventin büyük bir kısmı buharlaşır, sonra iki farklı vakum odasından geçen örnek kütle spektrofotometresine girer. Burada örnek, iyon odacığı içine püskürtülerek buharlaştırılır. Tayin sınırları 0.2-1 ng gibi çok düşük değerler arasındadır.

Yüksek performans sıvı kromatografisinde hareketli faz sıvıdır. Sabit faz katı, sıvı tabakası, iyon değiştirici reçine, mikroporöz tanecikler, modifiye reçineler gibi değişik maddeler olabilir. Sabit faza göre ayırma mekanizmaları da farklılıklar gösterir; şöyle ki:

1. Adsorbsiyon (Sıvı-Katı) Kromatografisi
2. Dağılıma (Partition) Kromatografisi
3. İyon-Değiştirme Kromatografi
4. Jel geçirgenlik veya Jel süzme (Moleküler-Exclusion veya Size-Exclusion) Kromatografi)

1. Adsorbsiyon (Sıvı-Katı) Kromatografisi

Kromatografideki ilk uygulamaların tamamı adsorbsiyon esasına dayanıyordu, burada sabit faz çok ince bir katı maddenin yüzeyidir. Böyle bir dolgu maddesinde madde ve sıyırıcı solvent katı yüzeyi üzerinde yarış halindedirler ve adsorbsiyon kuvvetlerin etkisi altındadırlar. Nötral organik bileşiklerin ayrılmasında en çok kullanılan yöntem HPLC yöntemi ile sıvı-katı kromatografisidir. Bir maddenin bir çözügen ve adsorblayıcı bir katı madde arasındaki en ideal dağılımı, "Kromatografiye Giriş, Şekil-1"deki A eğrisi adsorbsiyon izotermi ile tanımlanır. Bu eğri düşük konsantrasyonlarda bir doğruya yakındır; bu durum sıyırma işleminin doğrusal olduğunu ve pik bozulmasının da en düşük düzeyde bulunduğunu gösterir.



Sabit ve Hareketli Fazlar

Sıvı-katı kromatografisinde en çok kullanılan adsorblayıcı silika jel ve Aluminadır. Dolgu maddelerinin tanecik büyüklükleri çok çeşitli olabilir; HPLC'de kullanılan tipik silika jel dolgu maddesinin tanecik büyüklüğü 10 μm dir ve malzemenin % 80' i 8-12 μm aralığına girer.

Sıvı-katı kromatografisinde başarı, hareketli fazın seçimine bağlıdır; solvent değiştirilerek maddelerin kapasite faktörü (k'), ideal değerler olan 1-10 aralığına girecek şekilde değiştirilebilir. Bir solventin k' değerine etkisi, onun sıyırma gücü (ϵ^0) ne bağlıdır, bu ise bazı referans solventlere karşı relatif olarak ölçülebilir. Örneğin X maddesi için

$$\log \frac{(K_X)_1}{(K_X)_2} = A_X (\epsilon_2^0 - \epsilon_1^0)$$

yazılabilir. Burada $(K_x)_1$ ve $(K_x)_2$, (1) ve (2) çözümleri kullanıldığında X maddesinin katı adsorbent üzerindeki dağılım katsayılarıdır. A_x maddenin molekül büyüklüğü, ε_1^0 ve ε_2^0 (1) ve (2) solventlerinin sıyırma kuvvetleridir. Tablo-2'de alumina adsorbent kullanıldığında çeşitli çözümlerin n-pentana göre sıyırma kuvvetleri verilmiştir. Silika jel'in ε^0 değerleri, alumina için olan değerlerin 0.77 sine eşittir. Sıyırma gücü yüksek olan bir çözümler düşük olana kıyasla adsorblanan tanecikleri daha hızlı sıyırır.

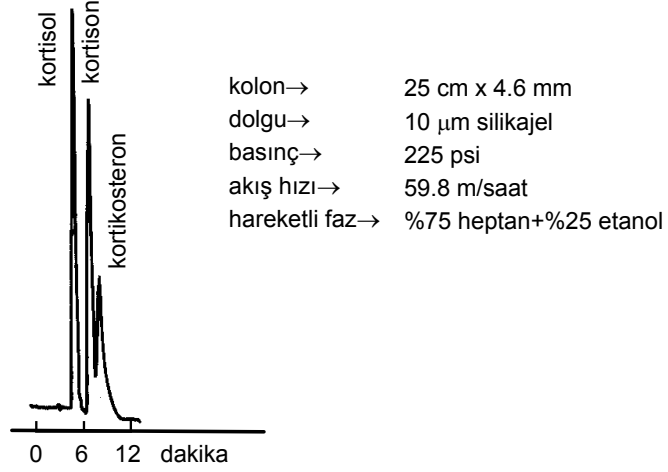
Adsorbsiyon kromatografisinde çoğunlukla kademeli sıyırma yapılır. Bunda, sıyırma gücü düşük bir çözümlerle kolaylıkla sıyırılabilen maddeler çekilir. Sonra sıyırma gücü yüksek bir çözümler ilave edilerek daha sıkı bağlı maddeler alınır.

Tablo-2: Alumina Adsorbenti ile Bazı Solventlerin Sıyırma Gücü

Solvent	Sıyırma gücü, ε^0	Solvent	Sıyırma gücü, ε^0
Fluoroalkanlar	-0.25	Kloroform	0.40
n-Pentan	0.00	Metiletil keton	0.51
Petrol eteri	0.01	Aseton	0.56
Sikloheksan	0.04	Dimetilamin	0.63
Karbon tetraklorür	0.18	Pridin	0.71
n-Propil klorür	0.30	n-Propanol	0.82
Benzen	0.32	Metanol	0.95

Uygulamalar

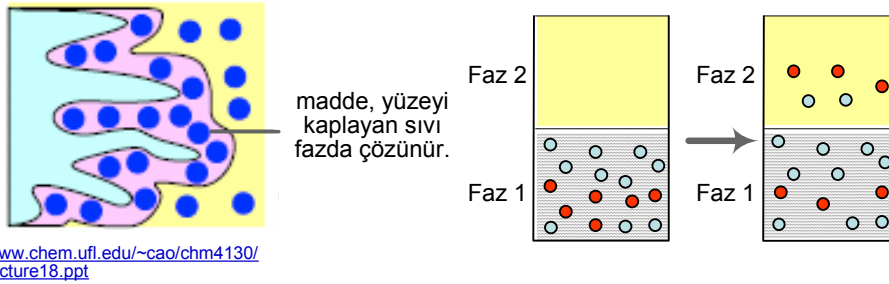
Bileşiklerin adsorblanma eğilimleri birbirinden büyük farklılıklar gösterir ve bu özellik de adsorbsiyon kromatografisinin temelini oluşturur. Örneğin, bir organik molekülün adsorbsiyon özellikleri ile hidroksil gruplarının sayısı arasında pozitif bir ilişki olduğu bilinir. Benzer bir ilişki çift bağlar için de söz konusudur. Bazı fonksiyonlu gruplar içeren bileşikler diğerinden daha sıkı tutulurlar. Adsorblama eğilimi aşağıdaki sıraya göre azalır: asid > alkol > karbonil > ester > hidrokarbon. Adsorbsiyon sırasının saptanmasında adsorbentin yapısı da önemlidir. Adsorbent ve solvent seçimi deneme-yanılma yöntemiyle yapılır. Şekil-11'de HPLC ile yapılan tipik bir sıvı-katı ayırması görülmektedir.



Şekil-11: Adrenal steroid-kortizonların sıvı-katı kromatografisi

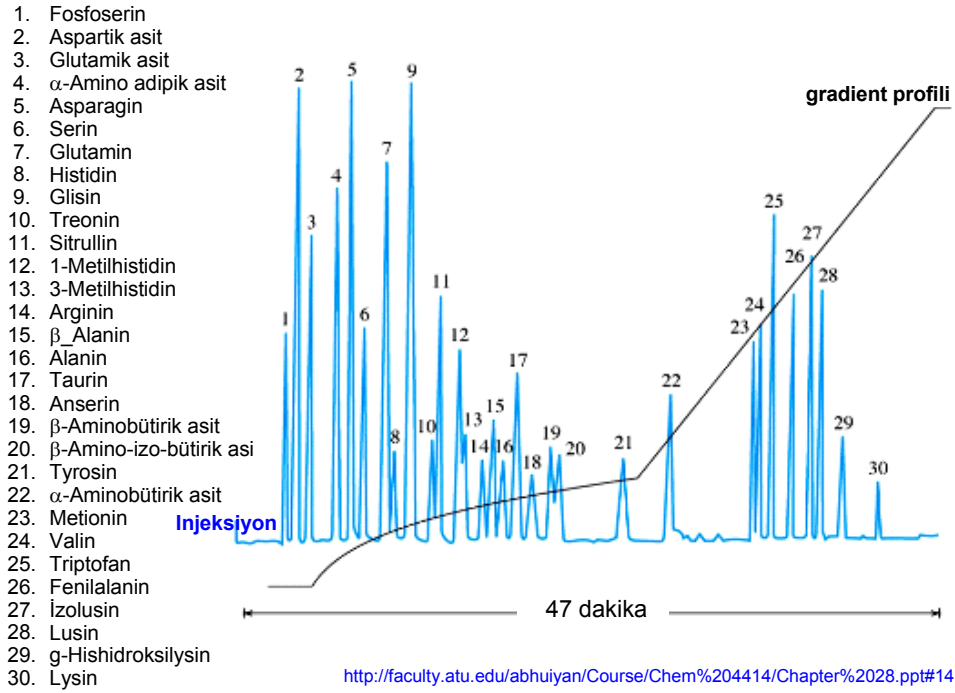
2. Dağılma (Partition) Kromatografisi

Partition (Dağılma) veya sıvı-sıvı kromatografisi Martin ve Syng'e'nin Nobel ödülünü kazandıkları çalışmaları ile başlamıştır (1941). Bu çalışmada tepsi yüksekliği 0.002 cm kadar küçük olan özel bir kolon hazırlanabileceği gösterilmiştir. Bu durumda 10 cm'lik bir kolonda 5000 teorik tepsi bulunabilecektir. Hatta daha kısa kolonlarda bile yüksek ayırma gücüne erişilebilecektir.



Katı Destek Maddeleri

Dağılma kromatografisinde en çok kullanılan katı destek maddeleri silisik asit veya sika jel'dir. Bu madde suyu kuvvetle adsorblar; bu nedenle sabit faz suludur. Bazı uygulamalarda su filmine bir tampon veya kuvvetli bir asit (veya bir baz) ilavesi ayırmayı kuvvetlendirebilir. Alifatik alkoller, glikoller ve nitrometan gibi polar çözügenler de tek başlarına veya su ile karışım halinde silika jel'e emdirilerek sabit faz olarak kullanılır. Destek olarak kullanılan diğer maddeler arasında alumina, diyatome toprağı, nişasta, selüloz ve çok ince (toz) cam sayılabilir; bu katılar su ve çeşitli organik sıvılarla kaplanarak kullanılır.



Şekil-12: 30 amino asit karışımının gradient elusyon yöntemiyle ayrılması

Hareketli faz saf bir çözügen veya çözügenler karışımıdır; polaritesi sabit faz sıvısından, sabit faz ile karışmayacak derecede farklı olmalıdır. Sabit faza emdirilen çözügen karışımı çoğunlukla, polariteleri yüksek iki çözügendir; "ters-faz" kromatografisinde ise sabit faz polar olmayan bir çözügen, hareketli faz da polar bir çözügendir. Sabit ve hareketli sıvı çiftlerinin seçimi deneyerek yapılır. Daha önce değinildiği gibi ayırmanın verimli olabilmesi için kademeli sıyırma (gradient elution) uygulanır. Şekil-12'de 30 amino asit karışımının gradient elusyon yöntemiyle ayrılması görülmektedir.

Destek Maddesi ile Bağlanmış Dolgu Maddeleri

HPLC'de çok kullanılan bir dolgu maddesi tipi de üzerinde kimyasal olarak bağlanmış organik bir grup bulunan saf silika jel tanecikleridir. Örneğin, Klorooktadesil silan'ın silika jel yüzeyi üzerinde OH grupları ile reaksiyonundan bir hidrokarbon yüzey oluşur.

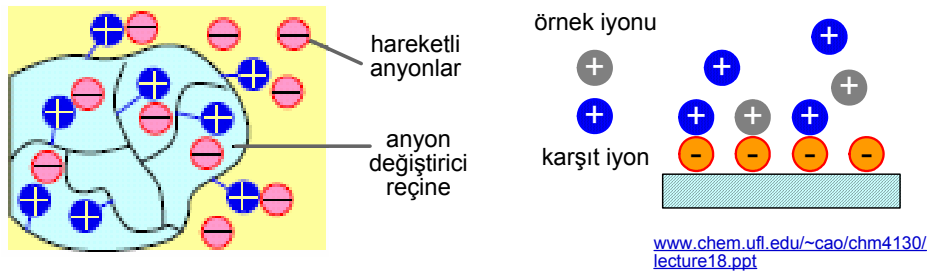
Burada R oktodesil grubunu ve daire içindeki Si'de jel taneciği üzerindeki pek çok SiOH gruplarından birini gösterir. Silika jel'e bağlanabilen başka gruplar da vardır; alifatik aminler, eterler, nitratlar ve aromatik hidrokarbonlar gibi.

Kimyasal olarak bağlanmış silika, yüzey adsorbsiyonun olduğu katı yüzey ile sıvı-sıvı dengesinin olduğu akıcı olmayan sıvı arasında bulunan bir ara kademedir. Kimyasal olarak bağlı yüzeylerin, normal katı-destekli sıvılara göre önemli derecelerde avantajları vardır.

Dağılım kromatografisi ile birbirine çok benzer maddeler ayrılabilir. Tipik örnekler arasında bir proteinin hidrolizinden elde edilen çok sayıdaki amino asitlerin, alifatik alkollerin ve şeker türevlerinin analizleri verilebilir.

3. İyon-Değiştirme Kromatografisi

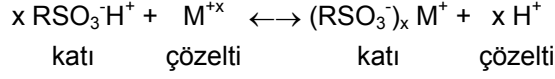
İyon-değiştirici reçineler kolon kromatografisinde çok kullanılan dolgu maddeleridir. Diğer kolon yöntemlerinin tersine burada solvent su, ayrılacak maddeler de iyonlardır. Bu nedenle iyon-değiştirici kromatografi inorganik kimyasal analizlerde çok kullanılan bir yöntemdir. Aynı zamanda amino asitlerin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



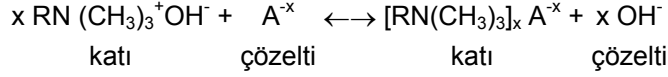
İyon değiştirme, bir çözelti ve bu çözelti ile ilişki halinde olan fakat çözünmeyen bir katı madde arasındaki, aynı işaretli iyonların birbiri ile yer değiştirmesi olayıdır. Nötral veya sentetik pek çok madde iyon değiştirici gibi davranır. Klay ve zeolitlerin iyon-değiştirme özellikleri uzun zamandan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

Sentetik iyon-değiştirici reçineler, her molekülünde çok sayıda iyonik fonksiyonel gruplar içeren yüksek molekül ağırlıklı polimerik maddelerdir. Katyon değiştirici reçinelerden sülfonik asit grupları (RSO_3^-H^+) içeren kuvvetli asit reçineleri, karboksilik asit grupları (RCOOH) içeren zayıf asit reçinelerden daha çok kullanılır. Anyon-değiştirici reçinelerde bazik fonksiyonel gruplar bulunur; bunlarda 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 reğinesi (asidik hali) ile doldurulmuş bir kolonla Na^+ ve K^+ iyonlarını ayırabilmişlerdir. Örnek kolonun tepesinden konulduğunda her iki alkali iyon için de aşağıdaki reaksiyon olur.



Burada B^+ , Na^+ veya K^+ iyonlarını gösterir. İyon değiştirme reaksiyonunun denge sabiti,

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

şekilde yazılır. Burada $[\text{RB}]$ ve $[\text{RH}]$ katı reçine fazındaki alkali ve hidrojen iyonlarının konsantrasyonlarıdır (veya yaklaşık aktiviteleri). Denklem(2) aşağıdaki,

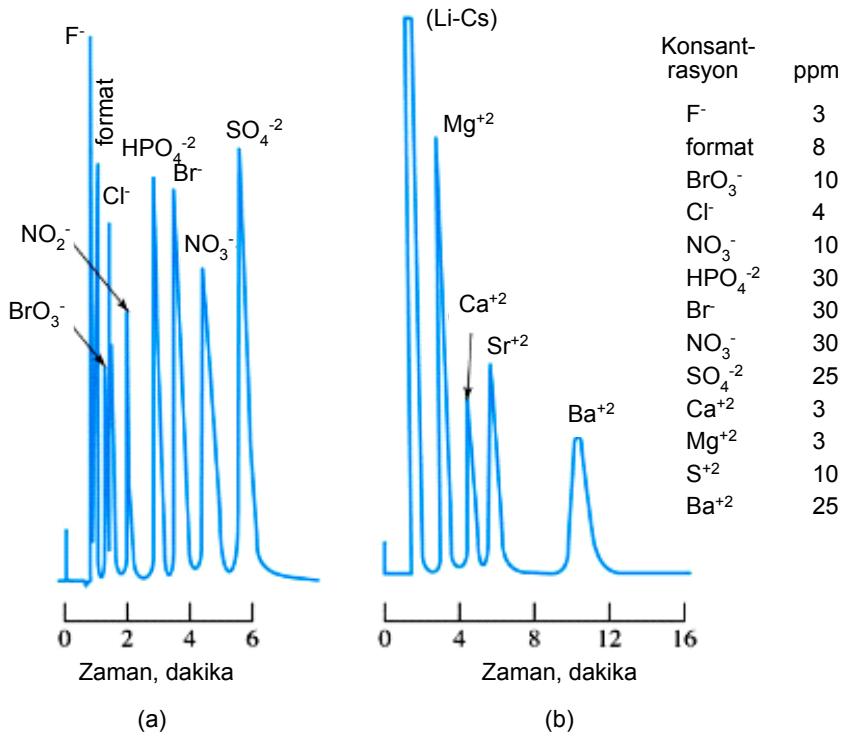
$$\frac{[\text{R B}]}{[\text{B}^+]} = \frac{K [\text{R H}]}{[\text{H}^+]} = K_D \quad (3)$$

şekilde yazılabilir. K_D , dağılma katsayısıdır. Sıyırmanın hidroklorik asit ile yapıldığı koşullarda K_D yaklaşık olarak sabit kalır, çünkü sıyırıcının hidrojen iyonu konsantrasyonu, potasyum ve sodyum iyonlarına göre çok büyüktür. Reçinenin değiştirme yapabileceği uçları da örnekteki alkali metal iyonları sayısından çok fazladır. Böylece $[\text{H}^+]$ ve $[\text{RH}]$ ın toplam konsantrasyonları, dengenin kaymasından etkilenmezler (denklem 1). Buna göre $[\text{RH}]$ ve $[\text{H}^+]$ ın $[\text{RB}]$ ve $[\text{B}^+]$ 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 seğilerek bilinen bir reğincede değişik iyonların dağılım oranları

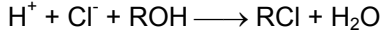
kıyaslanabilir. Böyle bir inceleme çok değerlikli iyonların tek değerlikli iyonlara göre daha sıkı tutulduğunu göstermiştir. Aynı değerlikli iyonlar arasında yapılan incelemelerde ise hidratlanmış iyonun, bazı özellikleri yanında, büyüklüğünün de etkin olduğu gözlenmiştir. Tipik bir sülfolanmış katyon değiştirici reçinenin K_D değerleri aşağıdaki sıraya göre azalır: $Cs^+ > Rb^+ > K^+ > NH_4^+ > Na^+ > H^+ > Li^+$. İki değerlikli katyonlar için de şöyle bir sıra yazılabilir: $Ba^{+2} > Pb^{+2} > Sr^{+2} > Ca^{+2} > Cd^{+2} > Cu^{+2} > Zn^{+2} > Mg^{+2}$.

K_D değerleri yakın olan iyonların birbirinden ayrılması için, adsorbsiyon ve dağılıma kromatografilerinde uygulanana benzer yöntemler kullanılır. Örneğin, Şekil-13'de inorganik iyonların sülfonik asitli katyon değiştirici bir reçinede (zar dolgu) ayrılmasını gösteren HPLC kromatogramı verilmiştir.

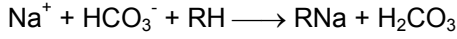


Şekil-13: İnorganik iyonların iyon değiştirici kromatografiyle ayrılması

Sıyırıcı iyonların analit içinde kalmaması için analitik kolondan sonra bir sıyırıcı kolon bulundurulur. Katyonların ayrılmasında sıyırıcı bir anyon-değiştirici reçine- nin hidroksiti ile doldurulur. Bu reçine HCL sıyırıcı çözeltiliyi, katyonları etkilemeden adsorblayabilir. Sıyırıcı kolondaki reaksiyon aşağıdaki gibidir.

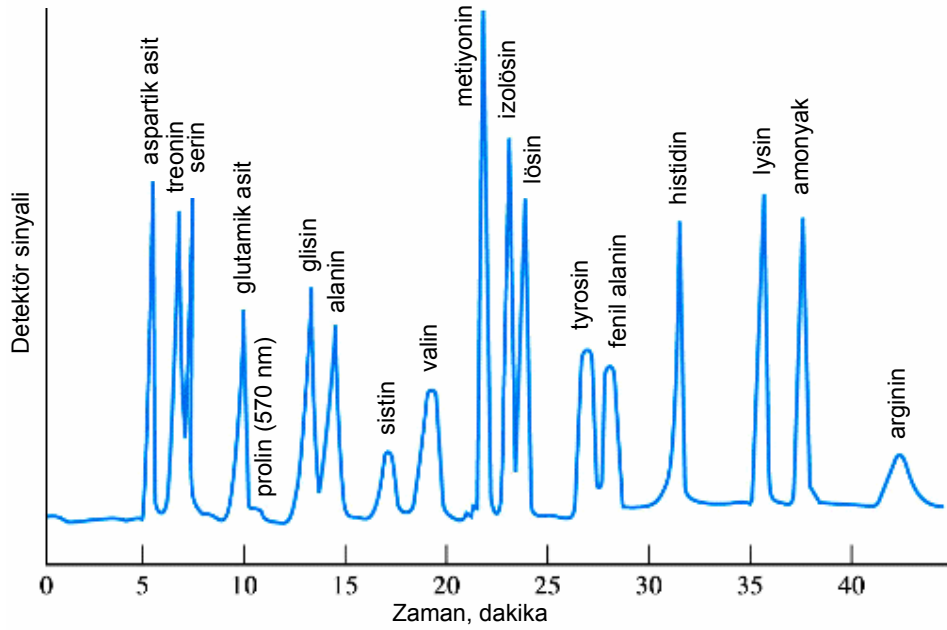


Anyonların ayrılmasındaki reaksiyon da,



şeklinindedir. Burada H_2CO_3 'ın çözenin iletkenliğine önemli bir tesiri yoktur.

İyon-değiştirici kromatografisi en çok amino asitlerin analizinde kullanılır. Örneğin, şekil-14'de, 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 sıyırma uygulanmıştır.



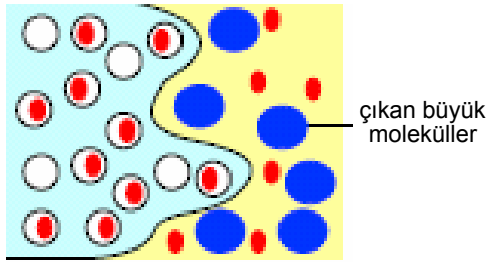
<http://faculty.atu.edu/abhuiyan/Course/Chem%204414/Chapter%2028.ppt#14>

şekil-14: Amino asitlerin bir iyon-değiştirici kolonda ayrılması

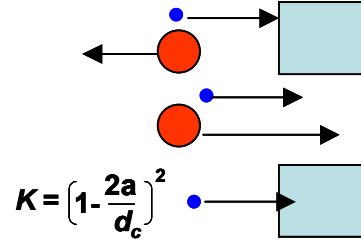
4. Jel geçirgenlik veya Jel süzme (Moleküler-Exclusion veya Size-Exclusion) Kromatografi)

Jel kromatografisi ayırmayı örnekteki maddelerin molekül büyüklüklerine göre yapan bir kromatografi tekniğidir. Bu tekniğe çeşitli adlar verilmiştir; jel geçirme (gel permeation) kromatografisi, çıkarma (exclusion) kromatografisi ve moleküler-elek (molecular sieve) kromatografisi gibi.

Moleküler Çıkarma, Jel Geçirme, Jel Filtrasyon Kromatografileri



Standart Entropi Etkisi



www.chem.ufl.edu/~cao/chm4130/lecture18.ppt

Jel kromatografisi, bir kolonda, sıyırma yöntemiyle yapılır. Burada maddenin çıkma derecesi, madde molekülleri veya iyonlarının çözelti fazına olan giriciliklerine bağlıdır; çözelti, porozitesi yüksek jel yapılı dolgu maddesi içinde tutulmuştur. Jelin gözeneklerinden daha büyük olan moleküller veya iyonların tamamı kolondan çıkarlar, daha küçüklerinin çıkışı ise küçüklüğünün derecesine, şekline ve bazan da jel tarafından adsorblanma eğilimlerine göre değişir.

Kolon Dolgusu

Jel kromatografisindeki sabit faz, su adsorpsiyonu (bazan başka çözügenler) fazla olan ve şişebilen, küçük tanecikler halinde, poröz bir polimerik maddedir. Çalışmaya hazırlanmış dolgu maddesinde polimer ağı içinde tutulmuş büyük miktarda

çözgen vardır. Şişen gözeneklerin ortalama büyüklükleri adsorplanan çözgenin miktarına bağlıdır; bu ise, polimer moleküllerindeki çapraz bağ miktarı ile saptanır.

Çok kullanılan bir polimer, polisakkarid dekstran'ın epiklorhidrin ile çaprazbağlanmasıyla hazırlanır. Epiklorhidrin miktarının değiştirilmesiyle gözenek büyüklükleri farklı bir seri polimer elde edilebilir. Bu jeller Sephadex ticari adı altında satılmaktadır. Tablo-3'de Sephadex jellerinden bazılarının özellikleri verilmiştir. Metilen birakrilamid ile çapraz-bağlanmış poliakrilamid'den hazırlanmış reçineler de diğer bir grup ticari reçinelerdir.

Tablo-3: Ticari Sephadex Jellerin Özellileri

Jel tanımı	Hacim ilişkisi, ml/g, orijinal jel ^(a)			Yaklaşık çıkma sınırı, mol.ağ.
	V_g	V_i	V_0	
G-10	0.6	1.0	0.9	700
G-15	0.6	1.5	0.9	1500
G-25	0.5	2.5	2	5000
G-50	1	5	4	10000
G-75	1	7	5	50000
G-100	1	10	6	100000
G-150	1	15	8	15000
G-200	1	20	9	200000

(a) V_g : katı jel matrisinin kapladığı hacim, V_i : gözeneklerde tutulan solvent hacmi, V_0 : jel tanecikleri arasındaki sıvı hacmi

Jel Kromatografisinin Teorisi

Suyla veya bir çözgenle şişirilmiş bir jel ile doldurulan kolonun toplam hacmi aşağıdaki ifade ile verilir.

$$V_t = V_g + V_i + V_0$$

V_g jelin katı matrisinin kapladığı alan, V_i jel gözenekleri içinde tutulan çözgen hacmi, V_0 jel tanecikleri dışında kalan hacimdir. Bir karışma veya difüzyon olmadığı vasayıldığında, V_0 aynı zamanda, maddeleri jel gözenekleri içine taşıyan solvent miktarını gösterir. Gerçekte ise bir miktar karışma ve difüzyon olayı vardır ve bu nedenle de Gaussian-şekilli eğride yer alan maddeler V_0 'da bir maksimum

verirler. Jel gözenekleri içine kolaylıkla girebilecek küçüklükteki moleküller için bu maksimum kolonun sonunda ve $V_i + V_0$ değerinde meydana gelir. V_i , V_0 ve V_g büyüklükleri, çoğunlukla birbirine yakındır; bu da, bir jel kolonu ile bir örnekteki büyük moleküllerin küçük moleküllerden ayrılması işleminde kullanılan yıkama sıvısının çok az olduğunu gösterir.

Büyüklükleri orta derecelerde olan moleküller gözeneklerde tutulan çözgenin bir kısmına girebilirler; bu fraksiyon K_d ile gösterilirse sıyrıcı hacmi V_e için aşağıdaki eşitlik yazılabilir.

$$V_e = V_0 + K_d V_i \quad (4)$$

Bu denklem bir jel kolonunun tüm maddelere karşı davranışını tanımlayabilir. Jel gözeneklerinden geçemeyecek kadar büyük moleküller için $K_d = 0$ ve $V_e = V_0$ dir; gözeneklere girebilen maddeler için ise $K_d = 1$ ve $V_e = V_0 + V_i$ dir. Denklem(4) ün yazılmasında madde molekülleri ve jel yüzeyleri arasında adsorpsiyon gibi etkileşimlerin olmadığı varsayılmıştır. Bu tür etkileşimler varsa, gözeneklerde tutulan madde miktarı artar; gözeneklere kolaylıkla girebilen maddeler için $K_d > 1$ olur.

Tablo-4'de dekstran-tipli jeller için deneysel olarak saptanan K_d değerleri verilmiştir.

Tablo-4: Sephadex Jellerin K_d Değerleri

Madde	Yaklaşık mol ağı.	K_d			
		Sephadex G-25	Sephadex G-75	Sephadex G-100	Sephadex G-200
Amonyum sülfat	132	0.9	-	-	-
Potasyum klorür	74	1.0	-	-	-
Tiptofan	204	2.2	1.2	-	-
Glisin	76	0.9	1.0	-	-
Ribonükleas	13000	0	0.4	-	-
Tripsin	24000	0	0.3	0.5	0.7
Serum albumin	75000	0	0	0.2	0.4
Fibrinojen	330000	0	0	0.0	0.0

Jel Kromatografisi Uygulamaları

Sephadex G-25 ve G-50 gibi, çok sıkı çapraz bağlı ve küçük gözenekli jeller tuz giderme işlemlerinde, veya yüksek molekül ağırlıklı doğal-maddelerden düşük molekül ağırlıklı molekülleri ayırmada kullanılır. Tablo-4'deki değerlerden de anlaşıldığı gibi G-25 jeli tuzları ve proteinlerden amino asitleri kolaylıkla ayırabilir. Burada, düşük molekül ağırlıklı moleküllerin K_d değerleri 1'e yaklaşırken, K_d değeri sıfır olan proteinler jelden tümüyle çıkarılırlar. Sonuçta, büyük hacimlerde (yatak toplam hacminin % 20-30'u) örneklerle çalışılması halinde bile iyi bir ayrılma elde edilir. Böyle bir ayırma, bir selofan membrandan yapılan diyalize benzer, fakat daha hızlı ve daha uygun bir ayırma yöntemidir.

Sephadex G-25 ve G-50 jelleri, Tablo-4'de verilen proteinler ile düşük molekül ağırlıklı maddeler arasında bulunan büyüklüklerdeki peptidlerin ayrılmasında da uygundur. Bu bileşiklerin K_d değerleri 0'dan büyük 1'den küçüktür. Tablo-4'deki çok gözenekli jeller, proteinler, nükleik asitler ve polisakkaridler gibi makromoleküllerin ayrılması ve saflaştırılmasında kullanılırlar; Sephadex 75, tripsin, pepsin ve sytokrom C'nin, serum, albumin, hemaglobin ve fibrinofen gibi yüksek molekül ağırlıklı proteinlerden ayrılmasında kullanılabilir.

Jel-geçirme kromatografisi, polimer kimyacıları ve biyokimyacılar tarafından büyük molekülün molekül ağırlıklarını saptamada kullanılmaktadır. Burada, bilinmeyen maddenin sıyrılan hacmi, aynı kimyasal özelliklerdeki bir seri standart maddenin sıyrılan hacimleri ile kıyaslanır.

Diğer bazı sıvı kromatografileri:

Afinite (veya Bioafinite) Kromatografi: Bu yöntemde proteinlerin, enzimler gibi özel ligandlara karşı afinitelerinden (benzeşim) yararlanılır. Ligand, selüloz gibi uygun bir polisakkarid polimere bağlanır. Afinite kromatografi biyomoleküllerin saflaştırılmasında kullanılır.

Zone Elektroforez: Zone elektroforez bir elektroforetik tekniktir; bileşikler bir tamponda zonlar veya bandlar olarak ayrılırlar ve katı, poröz, veya uygun diğer bir destek ortamında (filtre kağıdı, agar jel, poliakrilamid jel gibi) kararlı hale dönüştürülür.

Chiral Kromatografi: Enantiomerlerin ayrılmasında kullanılan bir tekniktir; bir enantiomere karşı diğerinden daha fazla aktif olan ve reaksiyona girebilen bir chiral sabit faz kullanılır.

YÜKSEK-PERFORMANSLI SIVI KROMATOĞRAFI GAZ-SIVI KROMATOĞRAFI KIYASLAMASI

Yüksek-performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve gaz-sıvı kromatografisi arasındaki kıyaslama Tablo-5'de verilmiştir. Her ikisinin de uygulanabildiği durumlarda, gaz, sıvı kromatografisi tercih edilir, çünkü gaz-sıvı kromatografisi cihazı çok basittir ve sonuçlar daha hızlı alınır. Uçucu olmayan maddeler (inorganik tuzlar da dahil) ve sıcaklıkla bozunabilen kararsız bileşikler gaz-sıvı kromatografisi ile analiz edilemezler, ancak HPLC yöntemi uygulanabilir. Bu iki kromatografik yöntem, çoğunlukla, birbirlerini tamamlarlar.

Tablo-5: Yüksek-Performans Sıvı ve Gaz-Sıvı Kromatografilerinin Kıyaslaması

Her iki yöntemin ortak özellikleri	Verimli, seçiciliği yüksek, kullanım alanı geniştir
	Az miktarda örnekle çalışılabilir
	Örnek bozunmadan kalır
	Kantitatif analizlerde kullanılabilir
Yüksek-performans sıvı kromatografisinin özel avantajları	Uçucu olmayan ve ısı kararlılığı olmayan örneklerle uygulanabilir
	İnorganik iyonların analizleri yapılabilir
Gaz-sıvı kromatografisinin özel avantajları	Cihaz basittir, ucuzdur
	Analiz sonuçları hızlı alınır

2. DÜZLEM KROMATOĞRAFİSİ

Düzlem kromatografisi iki tiptir. Bunlardan biri ince-tabaka kromatografisidir; ayırma, düz bir yüzey üzerinde bulunan ince toz halindeki katı bir tabakada da yapılır. Diğeri kağıt kromatografisidir; burada ayırma ortamı, ağır bir filtre kağıdından yapılmış bir şerit veya sayfadır.

Kağıt kromatografisi ilk olarak 19. yüzyılın ortalarında kullanılmıştır. 1940'lı yıllarda çeşitli sahalara uygulanabilen bir teknik olarak geliştirilmiştir. İnce-tabaka kromatografisinin gelişmesi 1950 yıllarında olmuş ve kısa sürede diğerinden daha çok kullanım alanına yayılmıştır. Kağıt ve ince-tabaka kromatografileri kompleks inorganik, organik, ve biyokimyasal maddeleri ayırma ve tanımlamada kullanılan basit ve ucuz yöntemlerdir. Hatta (özellikle ince tabaka kromatografisi), bu tip karışımların kantitatif analizlerinde bile kullanılabilirler.

Genel İlkeler

Düzlem kromatografide, örneğin bulunduğu bir damla çözelti sabit fazın düzlem yüzeyi üzerinde bir noktaya damlatılır. Çözgenin buharlaşmasından sonra, yüzey boyunca hareketli bir faz (yıkayıcı, developer) akışıyla kromatogram yıkanır. Yıkayıcının hareketini kapiler kuvvetler sağlar. "Yukarı yıkama"da hareketli faz yukarı doğru gider; radyal yıkamada yıkayıcı bir merkezden başlayarak daireler halinde ilerler. "Aşağı yıkama"da hareket aşağı doğrudur, bunda solventin akışına ağırlığı da yardımcı olur.

Düzlem kromatografisinde denge konumu, kullanılan sıvı-sıvı tipine bağlı olarak değişir. Çoğunlukla sabit faz su veya polar başka bir sıvıdır.

Kolon kromatografisinde ilk geliştirilen ilkeler kağıt ve ince-tabaka ortamlarına da uygulanabilir. Bu ortamlar içinde sabit ve hareketli fazlar arasında tekrar tekrar madde transferi olur. Maddenin hareket hızı dağılma katsayısına bağlıdır.

$$K = \frac{C_s}{C_M}$$

Tek bir taneciğin fazlar arasında gezinmesi, taneciğin gecikme fatörü (R F)

$$R F = \frac{\text{Maddenin hareket mesafesi}}{\text{Çözgenin hareket mesafesi}}$$

Kontrol edilemeyen değişkenleri dengeleyebilmek için bir maddenin dolaştığı mesafe, aynı koşullarda standart bir maddeninki ile kıyaslanır. Bu iki mesafe arasındaki oran R std şeklinde tanımlanır.

1. İnce-Tabaka Kromatografisi

Sabit Faz

İnce-tabaka kromatografisinde kullanılan katı adsorblyıcılar, kimyasal bileşim ve tanecik büyüklüğü bakımından çeşitli tipteki kolon kromatografilerinde kullanılanlara benzer. Ençok kullanılan adsorblyıcı, sıvı- sıvı ayırmasında su veya diğer polar çözügenler için bir destek malzemesi görevi yapan silikajel'dir. Hazırladıktan sonra kurutulan silika tabakası neminin çoğunu kaybedip katı bir tabaka haline dönüştürülerek sıvı-katı ayırmalarında da kullanılabilir. Böyle bir kurutma işlemi yapılırken silika yüzeyinin atmosfere açık olmamasına dikkat edilmelidir; aksi halde yüzey birkaç dakika içinde tekrar nem çekerek destek malzemesinin (silika jel) sıvı-sıvı ayırması yapabilecek şekle dönüşmesine neden olur.

İyon değiştirici reçineler ve Sephadex jelleri de ince-tabaka kromatografisinde sabit faz olarak kullanılabilirler.

İnce-Tabaka levhalarının Hazırlanması

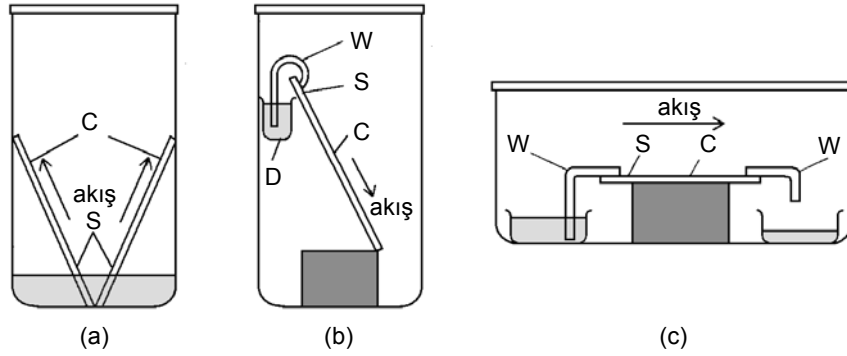
Bir ince-tabaka levhası bir cam veya "mylar" levhası veya mikroskop kızağı üzerine, çok ince toz halindeki katı maddenin sulu bir karışımı (çamur) yayılarak hazırlanır. Katı taneciklerin levha üzerine ve birbirine tutunması için karışım içine, çoğunlukla, bir bağlayıcı konulur, karışımın levha üzerinde yayılması ve yüzeye sıkıca yerleşmesi için levha bir süre bekletilir; bazan da bir etüvde bir kaç saat ısıtılır.

İnce tabaka üzerinde maddelerin iyi ve temiz bir şekilde ayrılabilmesi, levhanın kaplandığı maddenin tanecik büyüklüğü dağılımına ve tabaka kalınlığının düzgünlüğüne bağlıdır. Sabit kalınlıkta bir tabaka oluşturmak için çeşitli sürme yöntemleri geliştirilmiştir. Çeşitli firmalar kaplanmış halde levhalar pazarlamaktadır.

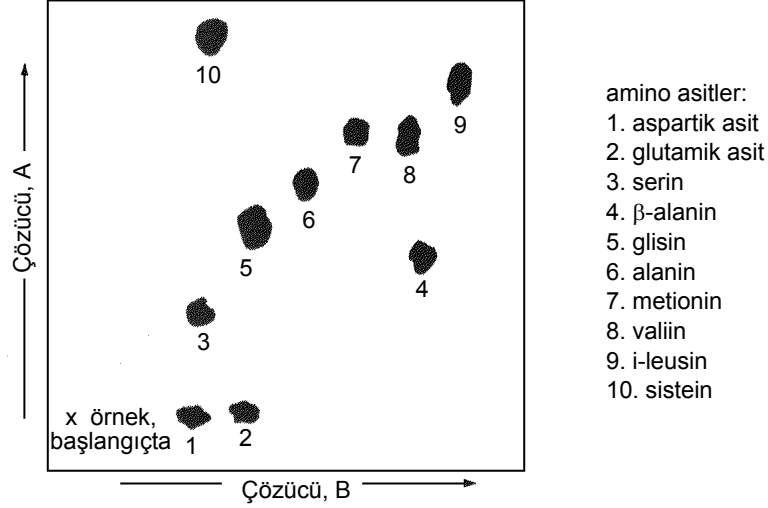
Levhanın Develope Edilmesi

İnce-tabaka levhalarının develope edilmesinde uygulanan tipik işlemler Şekil-11'de gösterilmiştir. Levhalar, çoğunlukla, 5x20x20 cm. boyutlarındadır. Levhanın bir ucu yakınına bir damla örnek konur ve yeri bir kalem ile işaretlenir. Örneğin çözücüsü buharlaştırılır ve levha, develope edecek madde buharları ile doyurulmuş kapalı bir kap içine konur. Levhanın bir ucu, Şekil-15'deki yöntemlerden birine göre, develop çözücüsüyle nemlendirilir (örnek develop solventine daldırılır). Developer levhanın tümünü geçtikten sonra levha çıkarılır, kurutulur ve üzerinde ayrılmış olan maddeler uygun bir yöntemle tanımlanır.

Şekil-16'da, bir karışımdaki amino asitlerin iki yönde develope edilerek ayrılması görülmektedir (iki-yönlü düzlem kromatografisi). Örnek kare şeklindeki levhanın bir köşesine konur ve önce A çözücüsü kullanılarak yukarı akış yöntemiyle develope edilir. B çözücüsü konulur ve tekrar yukarı akış ile develop edilir. B çözücüsü de uzaklaştırıldıktan sonra levhaya, amino asitlerle pembeden mora kadar değişen renkler oluşturan ninhidrin maddesi yayılarak amino asitlerin konumları belirlenir. Saptanan lekeler, standart örneklerdeki amino asitlerin konumları ile kıyaslanarak teşhis edilir.



Şekil-15: İnce tabaka kromatografisi için üç tip sistem; (a) yukarı akışlı, (b) aşağı akışlı, (c) yatay akışlı, S: örneğin başlangıçtaki konumu, D: developer, C: kromatografik yüzey, W: pamuk fitil



Şekil-16: Bazı amino asitlerin iki yönlü ince-tabaka kromatogramı; A: toluen-2-kloroetanol-ridin, B: kloroform-benzil alkol-asetik asit

Taneciklerin Tanımlanması

Ayırma işleminden sonra örnekteki maddelerin yerlerini belirlemek için çeşitli yöntemler uygulanır. Bunlardan en çok kullanılan ve pek çok organik karışımlarda uygulanabilen iki yöntemde iyod veya sülfürik asit çözeltileri kullanılır. Çözelti levha üzerine yayıldığında organik maddelerle koyu renkli ürünler vererek reaksiyona girer. Ninhidrin gibi bazı özel maddeler de kullanılabilir. Ayrılma işleminde fluoresans maddeler oluşuyorsa bunların tanımlanması UV bir lamba ile yapılabilir; veya, sabit faza fluoresans bir madde konularak developpe işleminden sonra levha UV bir lamba altında incelenebilir.

Kantitatif Analiz

Levha üzerinde açığa çıkan leke alanlarını daha önce hazırlanmış olan standartların alanlarıyla kıyaslayarak yarı kantitatif sonuçlar alınabilir. Daha iyi ve hassas sonuçlar için levha üzerindeki leke kazınarak alınır, ekstraksiyon ile madde katı kısımdan ayrılır ve uygun bir fiziksel veya kimyasal yöntemle analiz edilir. Bir başka metot da lekeden, fluoresans veya yansıma yoluyla çıkan ışının bir densitometre ile ölçülmesidir.

2. Kağıt Kromatografisi

Kağıt kromatografisi ile yapılan ayırmalar ince-tabaka levhalarına benzer şekildedir. Burada çok saf, porozitesi ve kalınlığı düzgün ve aynı kaliteli kağıtlar kullanılır. Bu kağıtlar yeterli miktarda su adsorblanmışlardır ve sıvı-sıvı tip kromatografi sınıfında bulunurlar. Su yerine başka sıvıları adsorblamış kağıtlar da olabilir, bunlarda sabit faz farklıdır. Örneğin, silikon yağı veya parafin ile işlem görmüş bir kağıtla, ters-faz kağıt kromatografisi yapılabilir; bunda hareketli faz polar bir solventtir. Bir adsorbent veya iyon-değiştirici reçine içeren özel kağıtlar da vardır; bunlar adsorbsiyon ve iyon-değiştirici kağıt kromatografisi olarak kullanılır.

3. ELEKTROFOREZ VE ELEKTROKROMATOĞRAFI

Elektroforez, bir elektrik alanının etkisi altında bulunan bir çözeltideki taneciklerin göç etmesi şeklinde tarif edilir. Eskiden, bu taneciklerin kolloidal oldukları ve adsorbladıkları iyonlar nedeniyle yüklü hale geldikleri kabul edilirdi. Böyle bir tanımlama bugün için fazla bağlayıcı bulunmaktadır ve elektroforez terimi iyonlara da kolloidal taneciklere de uygulanabilen bir tanım olarak kabul edilmektedir. Elektroforetik yöntemlerle bir karışımdaki maddeler, agregatlar (yapışık veya bir arada toplanmış gruplar) halinde veya tek tek ayrılabilir.

Elektroforetik yöntemler ayırma işleminin, bir destek veya sabitleyici ortamın bulunmadığı hallerde yapılmasına göre iki gruba ayrılır. "Serbest-çözelti" yönteminde örnek çözeltisi, bir tampon sıvı ile doldurulmuş U-tüpünün tabanına topluca konulur. Tüp uçlarının yakınına yerleştirilen elektrotlarla bir elektrik alanı uygulanır; yüklenen taneciklerin farklı hızlarla elektrotlardan birine veya diğerine doğru hareket ettikleri gözlenir. Farklı göç hızları sonucunda ayrılma olur; bu hızlar, ortamdaki taneciklerin yük/kütle oranları ile yapısal hareketliliklerine de bağlıdır. Serbest-çözelti yöntemi, Tiselius tarafından geliştirilmiş ve proteinlerin ayrılmasında kullanılmıştır; bu çalışmasıyla Tiselius 1948 Nobel ödülünü kazanmıştır. Yöntem, biyokimyanın gelişmesinde bir başlangıç olmuştur; ancak bazı deneysel sorunlar nedeniyle geniş bir uygulama alanına yayılamamıştır. Bu sorunlar ayrılan maddelerin, konveksiyonla, yoğunlukla ve mekanik titreşimlerle birbirine karışma eğilimlerinden kaynaklanmaktadır. Ayrıca ayrılan madde bandlarını saptayacak çok hassas optik sistemlere de gereksinim vardır.

Ayırma işleminin bir kağıt, çok ince bir katı tabaka veya uygun bir katı madde ile doldurulmuş bir kolon gibi sabitleyici bir ortamda yapılması halinde, serbest-çözelti elektroforez işlemlerinde karşılaşılan pek çok sorun giderilebilir. Bu yöntemde, daha önce anlatılmış olan çeşitli kromatografik yöntemlere ilave olarak elektrik alanı bulunur. Ortamın özelliklerine bağlı olarak ayırma, elektroforetik etkiler sonucunda veya elektroforez ile adsorbsiyon, iyon-değiştirme, veya diğer dağılma dengelerinin birleşimi sonucunda oluşur. Sabitleyici bir ortamdaki elektroforeze dayanan ayırma yöntemlerine çeşitli adlar verilir; bunlar, elektrokromatografi, zone elektroforez, elektrogöç ve iyonofrez' dir. Burada anlatılan elektrokromatografidir.

Elektrokromatografik Deney Yöntemleri

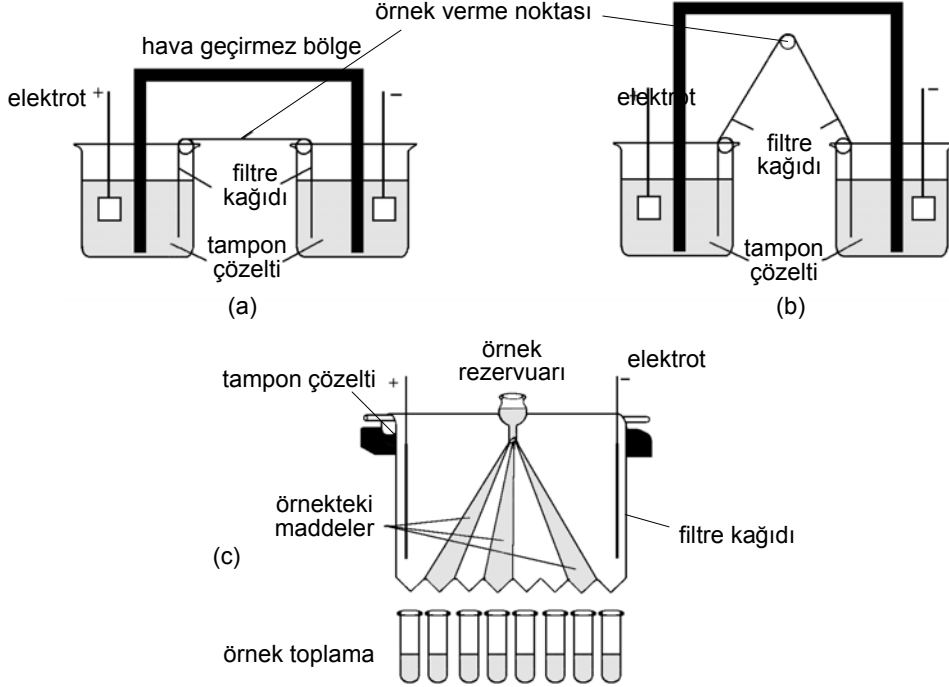
Elektrokromatografide kullanılan katı ortamlar çok ve çeşitlidir. Kağıt, selüloz asetat membranlar, selüloz tozlar, nişasta jelleri, iyon değiştirici reçineler, cam tozları, ve agar jelleri örnek olarak sayılabilir. Katının fiziksel yapısına bağlı olarak ayırma işlemleri kağıt şeritler, membranlar, kolonlar, tepsiler, cam veya plastikte desteklenmiş ince tabakalarda yapılabilir. Bazı dezavantajları olmasına karşın filtre kağıdı ve selüloz asetat en fazla kullanılan sabitleştiricilerdir.

Şekil-17'de kağıt elektroferezinde uygulanan yöntemlerden üçünün şematik diyagramı görülmektedir. Şekil-17'deki yöntemde bir kağıt şerit, tampon bir karışımla doldurulmuş iki kap arasına yatay olarak yerleştirilmiş ve uçları tampon çözeltilere daldırılmıştır. Buharlaşıma olmaması için cihaz hava-geçirmez bir sistem içinde bulundurulur. Örnek şeritin merkezine toplu olarak konur ve iki elektrod arasına 100-1000 V aralığında bir doğru akım uygulanır. Elektrod reaksiyonlarının kağıttaki tamponun bileşimini değiştirmemesi için, elektrodlar izole edilir. Miliamper seviyelerinde akımlar gözlenir. Uygun bir elektroliz periodu sonunda kağıt çıkarılır, kurutulur ve kolorimetrik maddelerle oluşan bandlar tanımlanır.

Şekil-17b'de ters-V biçiminde bir düzen görülmektedir. Burada örnek V' nin tepe noktasına konur; katyonik tanecikler V'nin bir kolundan, anyonik olanlar da diğer kolundan akarlar.

Şekil-17c'deki cihaz ise iki-yönlü elektrokromatografi yöntemine göre çalışır. Levha şeklindeki kağıt dikey olarak yerleştirilmiştir; örnek tamponlanmış bir çözgenle levhadan aşağı doğru taşınır. Hareketli ve sabit fazlar arasındaki dağılım farklılığı sonucunda dik yönde ayrılma oluşur. Ayrıca, çözeltinin akış yönüne dik yönde uygulanan bir elektrik akımı ile yatay eksen boyunca da değişik hızlarda elektrogöç olur. Böylece örnekteki maddeler, örneğin verildiği noktadan başlayan radyal birer yol boyunca birbirlerinden ayrılırlar.

Şekil-17c'deki yöntem hem analitik hem de preparatif uygulamalarda kullanılmaktadır. Analitik uygulamalarda kağıdın alabileceği kadar tampon çözelti kullanılır; deney sonunda kağıt çıkarılır, kurutulur ve tanımlama çözeltileri uygulanır. Preparatif uygulamalarda ise tampon çözeltinin akışı sürdürülerek her madde tüpler içinde toplanır.



Şekil-17: Kağıt kromatografisinde kullanılan bazı cihaz tipleri

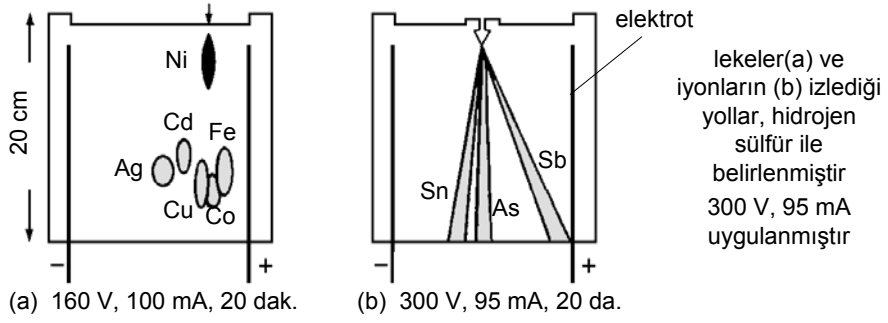
Elektrokromatografi Uygulamaları

Elektrokromatografik analiz yöntemleri, çok çeşitli biyolojik maddeleri ayırmak zorunda olan biyokimyacılar ve klinik kimyacıları için çok önemlidir. En çok kullanım yeri klinik teşhislerdir; proteinler, serum, urin, mide suyu ve diğer vücut sıvılarındaki büyük moleküller elektrokromatografi ile ayrılabilir. Elektrokromatografi, alkaloidler, antibiyotikler, nükleik asitler, vitaminler, doğal pigmentler, steroidler, aminoasitler, karbohidratlar ve organik asitler gibi küçük moleküllerin ayrılmasında da kullanılır.

İnorganik iyonların ayrılmasında da elektrokromatografi önemli bir cihazdır. Şekil-18a'da bir komplesten altı metal iyonunun ayrılması görülmektedir. Kompleks iyonun yüküne bağlı olarak anodik veya katodik göçmeler olmuştur. Ayrıca nikel(2) iyonunun hareketi, dimetilglioksim çökeleği ile geciktirilmiştir. Çözeltide

katyonlar (0.05 M), 0.1 M tartarik asit içinde, yıkama sıvısı: 0.01 M amonyum tartarat, 0.05 M dimetil glioksimde ve 4 M amonyakta karışımıdır.

Şekil-18b'de örnekdeki maddelerin, sürekli elektroforez ve sıyırma işlemi sırasında izledikleri yol gösterilmiştir. Kağıdın taban kısmına konulan uygun kaplar içinde her fraksiyon ayrı ayrı toplanabilir. Çözeltide her biri 0.05 M olan As(III), Sb(III) ve Sn(III) iyonları ile 0.02 M tartarik asit, 0.04 M laktik asit ve 0.04 M I-alanin vardır.



Şekil-18: İnorganik iyonların elektrokromatogramları

Yararlanılan Kaynaklar

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