

KROMATOGRAFI

Çeşitli karışımların spektroskopik ve elektrokimyasal olarak kalitatif ve kantitatif analizlerini yaparken girişim yapan maddeler bulunmaktadır. Kalitatif ve kantitatif analizler yaparken her madde için özel reaktifler olmadığından matriks etkisini ortadan kaldırmak gerekmektedir. Bu amaçla kristalizasyon, ekstraksiyon, damıtma, adsorpsiyon, buharlaştırma gibi fiziksel ayırma yöntemleri yetersiz kalmaktadır. Çok karmaşık olan bu numunelerden girişim yapan maddelerin uzaklaştırılması veya aranan maddelerin o ortamdan ayrılması için özel yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır. İşte bu sebeple kromatografik yöntemler kullanılmaktadır.

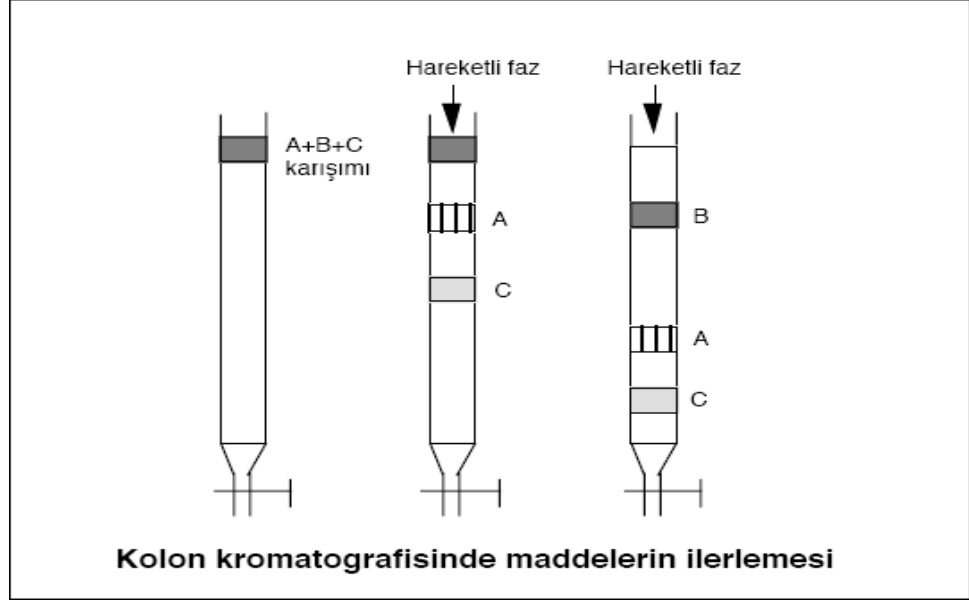
Kromatografi: Bir karışımdaki fiziksel ve kimyasal özellikleri birbirine çok yakın olan maddeleri bir hareketli faz ile bir sabit faz arasındaki dağılımlarına esas olarak ayırma ortamını farklı zamanlarda terk etmelerine bağlı olarak ayırma ve sonrasında kalitatif ve kantitatif analiz yapma yöntemine denir.

Kromatografik Yöntemlerin Diğer Enstrumental Yöntemlere Üstünlükleri

- 1. Hız:** Uygun kromatografik şartların seçilmesi halinde karışımı oluşturan bileşenleri kısa sürede ayırıp analiz etmek mümkündür. Gaz krom. sıvı krom. den daha hızlıdır. Bunun sebebi, gaz krom. ile ayrılabilirlerin sayısının az olması yanında hareketli faz hızının daha yüksek olmasındandır.
- 2. Küçük miktarlarla çalışabilme özelliği:** Özellikle gaz kromatografisinde duyarlıkları yüksek detektörlerin kullanılması sebebiyle çok küçük örnek miktarlarıyla çalışılabilir. GC de çoğunlukla 0.1-10 mikrolitre, sıvı krom. de 1-20 mikrolitre örnek hacimleri yeterlidir.
- 3. Örnek türlerinin çeşitliliği:** Krom. yöntemler ile organik, inorganik, biyokimyasal orijinli çok büyük sayıda türün analizlenmesi mümkündür.

Ayrıca cihazın fiyatı, kullanım kolaylığı çalıştırma maliyeti dikkate alınacak diğer unsurlardır.

Rus botanikçi Tswett 1903'de bitki pigmentleri üzerine yaptığı çalışmada kromatografi tekniğini ilk kez uygulamış ve kromatografi yönteminin kurucusu olarak tarihe geçmiştir. Tswett bitki yapraklarından ekstrakte ettiği klorofilleri ve ksantofilleri, içine toz kalsiyum karbonat doldurduğu cam kolondan petrol eteri geçirerek ayırmayı başarmıştır. Şekil 1'de görüldüğü gibi önceleri tek bir madde (bant) halinde yürüyen maddeler daha sonra renkli maddeler halinde birbirlerinden ayrılmışlardır. Böylece ilk kromatogram elde edilmiştir. Tswett bu renk olayından esinlenerek Yunanca renk anlamına gelen chroma kelimesini kullanmış ve yönteme kromatografi adını vermiştir. Yapılan bu ilk uygulama daha sonraları klasik kolon kromatografi olarak tanımlanmıştır.



Şekil 1. Kolon kromatografisi

Tswett'in kromatografisinde cam kolona katı adsorban doldurulmuş, üzerine klorofil karışımlarının konulmasından sonra petrol eteri sürekli olarak kolondan geçirilmiştir. Yani ayırma ortamı adını vereceğimiz bir kolonda, katı madde ve sıvı madde birlikte bulunmaktadır. Katı veya sıvı olabilen birinci faza zamanla adsorban, sabit faz, hareketsiz faz ve durgun faz gibi isimler verilmiştir. Maddelerin birbirinden ayrılarak sürüklenip cam kolonu terk edebilmeleri için verilen petrol eteri ise hareketli faz olarak adlandırılmıştır. Daha sonra geliştirilen kromatografik yöntemlerde gaz veya süperkritik sıvılar da kullanılmıştır. Bunlara da çözücü, hareketli faz, mobil faz, yürütücü sıvı gibi adlar verilir.

Hareketli faz ile birlikte çıkan ayırma ortamını terk eden maddeler ya fraksiyonlar halinde toplanıp ayrı ayrı kalitatif ve kantitatif tayin yapılır, ya da hareketli faz detektör adı verilen bir elektronik cihazdan geçirilir. Detektör sürekli olarak izlenirken hareketli faz özelliğine bağlı olarak sabit elektronik sinyal verir (temel çizgi, baseline). Hareketli faz içinde karışım içindeki maddelerden birisinin gelmesi halinde detektör sinyali değişir. **Her madde için ayrı oluşan bu değişik sinyal topluca kromatogram olarak adlandırılan şekli oluşturur.** Bu izleme kalitatif ve kantitatif analizde veri elde etmeye yarar.

Kromatografik yöntem; bir örnek içindeki maddelerin, biri hareketli ve diğeri sabit faz arasında dağılımlarına bağlı olarak, ayırma ortamını farklı zamanlarda terk etmelerini esas alarak kalitatif ve kantitatif analiz yapılmasına olanak sağlayan yöntemdir.

Kromatografi hem maddelerin birbirlerinden ayrılmasını sağlamakta, hem de tür ve miktarlarını belirlemeye yaramaktadır.

Bugün onlarca temel kromatografik yöntemlerden başka hemen her gün yeni katılımlarla kromatografik yöntem sayısı artmaktadır. Bu nedenle tek bir sınıflandırmayla kromatografik yöntemleri sıralamak gerçekçi olmayacaktır. Sınıflandırmalarda değişik kriterler temel alınmaktadır. Bu kriterlerden bazılarına göre yaptığımız sınıflandırmalar aşıaıda kısaca açıklanmıştır. Sınıflandırmalarda alınan kriterler şunlardır:

1. Kromatografik ortamın fiziksel şekli.
2. Örneğin kromatografik ortama verililiş biçimi.
3. Kromatografik ayırım mekanizması.
4. İki fazın polarlık durumları.
5. İki fazın fiziksel durumu.

1. Ortamın Fiziksel Durumuna Göre Sınıflandırma

Kromatografik ortamın fiziksel durumu dikkate alınarak yapılan sınıflandırmada ***kolon*** ve ***düzlem*** kromatografilerinden bahsedilebilir. Gaz ve yüksek basınç sıvı kromatografileri kolon kromatografiye, kağıt ve ince tabaka kromatografileri düzlem kromatografilerine örnektir.

Kolon krom. de, sabit faz ince bir kolonda tuturulur ve hareketli faz basınç altında bu sabit faz arasından geçmeye zorlanır.

Kolon Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Genel Sınıf	Özel Yöntem	Sabit Faz	Denge Tipi
Sıvı Krom (LC), (hareketli faz: sıvı)	Sıvı-sıvı veya dağılma	Katı üzerine adsorplanmış sıvı	Karışmayan sıvılar arasında dağılma
	Sıvı-bağlı faz	Katı yüzeye bağlanmış organik türler	Sıvı ve bağlı yüzey arasında dağılma
	Sıvı-katı veya adsorpsiyon	Katı	Adsorpsiyon
	İyon değişimi	İyon değiştirici reçine	İyon değişimi
	Boyut eleme	Polimer bir katının gözeneklerindeki sıvı	Dağılma/eleme
Gaz krom (GC) (hareketli faz: gaz)	Gaz-sıvı	Katı yüzeyine adsorplanmış sıvı	Gaz ve sıvı arasında dağılma
	Gaz-bağlı faz	Katı yüzeye bağlanmış organik türler	Sıvı ve bağlı faz arasında dağılma
	Gaz-katı	Katı	Adsorpsiyon
Süperkritik akışkanlı krom (SFC) (hareketli faz: süper kritik sıvı)		Katı yüzeyine bağlanmış organik türler	Süperkritik akışkan ve bağlı yüzey arasında dağılma

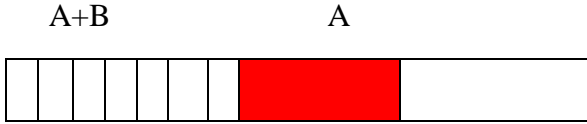
Düzlemsel krom. de sabit faz düz bir pakla üzerine veya bir kağıdın gözenekleri arasına tutturulur ve bu durumda hareketli faz sabit faz arsından kapiler etkisiyle veya yerçekimi etkisiyle hareket ettirilir.

2. Örneğin Kromatografik Ortama Veriliş Şekline Göre Sınıflandırma

Örneğin ayırma ortamına veriliş biçimi dikkate alınarak kromatografik yöntemleri üç grupta toplamak mümkündür: Öncül (frontal), yer değiştirme (displacement) ve sürüklenme ile yürütme (elusyon).

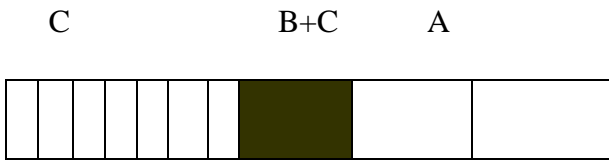
Öncül (frontal) analiz

Kromatografik ayırım sırasında, ayırımı yapılacak maddeleri içeren örnek sürekli olarak kolona (ayırma ortamına) verilir. Diğerleri ortamda tutulurken, önce bir bileşen öncül (frontal) olarak sistemi terk eder. Bunun hemen arkasından diğer maddeler birinciyle beraber gelirler. Burada amaç bir karışımdan bir bileşeni, tek olarak, bir miktar almayı sağlamaktır.



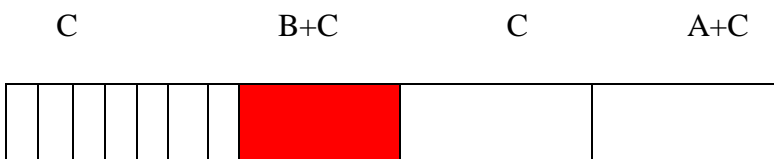
Yer değiştirme (displacement) ile yürütme

Bir karışım halindeki örnek (A+B) ayırma ortamına verilir. Daha sonra yürütücü hareketli faz sisteme verilir. Yürütücü faz sistemde tutulmuş olan örnek içindeki maddelerden birini (örneğin A maddesi) sabit fazdan çıkararak onun yerine geçer, tutulur. Böylece hareketli faza geçen A maddesi, diğerleri tutunmuş olarak kalırken ayırma ortamında ilerler. Karışımdan A maddesi saf olarak elde edilmiş olur.



Sürükleme ile yürütme

Hareketli faz (C), sabit faz ortamından sürekli olarak geçirilmekte iken herhangi bir zamanda, A+B karışımından meydana gelen örnek ayırma ortamına verilir. Örnek içindeki maddeler ayırma ortamında hareketli ve sabit faz arasında dağılıma uğrarlar. Dağılım katsayılarına (partisyon katsayısı, geçirgenlik, adsorpsiyon katsayısı, dağılım katsayısı) bağlı olarak, hareketli faz hangisini daha kolay sürükleyebiliyor ise o madde (A) ayırma ortamını önce terk eder. Diğerleri onu takip eder ve böylece karışımdaki maddelerin ayırımları sağlanmış olur.



3. Mekanizma Yönünden Sınıflandırma

Mekanizma yönünden sınıflandırmada adından da anlaşılacağı gibi ayırma ortamında maddelerin ayırımını gerçekleştiren mekanizma temel alınır. Çok çeşitli ayırma mekanizmaları ileri sürülmektedir. Bu nedenle gruplandırma bir hayli güçtür. Ancak yine de genel ayırma mekanizmaları dikkate alınarak kromatografik yöntemleri altı gruba ayırabiliriz:

1. Dağılma (Partisyon) Kromatografi,
2. Dışa Soğurma (Adsorpsiyon) Kromatografi,
3. İyon Değiştirme Kromatografi,
4. İyon-çifti Kromatografi,
5. Molekül Seçme (Dışarılama, Eksklüsyon) Kromatografi,
6. İlgı (Affinite) Kromatografi.

1. Dağılma krom: Örnek içindeki her madde hareketli ve sabit faz arasında Nernst kuralına göre dağılıma uğrar. Dağılma katsayısı (C_H/C_S) büyük olan ortamı önce terk eder.

2. Adsorpsiyon krom. : Sabit fazın katı olduğu sistemlerde katı yüzeyinde maddenin alıkonulması daha çok fiziksel kuvvetlerle adsorpsiyon ile sağlanır. Adsorpsiyon enerjilerinin farklılığı maddelerin ayırma ortamını farklı zamanlarda terk etmelerini sağlar.

3. İyon Değiştirme Kromatografi: Sabit fazda anyon ve katyonları değiştirebilen fonksiyonel grupları bulunduran organik veya anorganik iyon değiştiriciler bulunur. İyonik maddelerden oluşan örnek karışım ayırma ortamına verildiği zaman bu iyonlar sabit fazdaki anyon veya katyonlarla yer değiştirerek tutunurlar. Sürekli olarak verilmekte olan hareketli faz, iyonun sabit ve hareketli fazda oluşturduğu dengeye göre iyonik maddeyi sürükler. Denge sabitinin büyüklüğü hangi iyonun daha uzun süre sabit fazda alıkonulacağını, hangisinin önce ortamı terk edeceğini belirler.

4. İyon-çifti krom. : Kendileri iyonik olmadıkları halde, bir iyonik madde ile ayırma ortamı öncesi veya ayırma ortamında bir iyonik yapı oluşturularak maddenin alıkonulması sağlanır.

5. Molekül Seçme (Dışarılama, Eksklüsyon) Kromatografi: Sabit faz gözenekli taneciklerden oluşur. Bu gözenekler örnek içindeki maddelerin alıkonma ortamında molekül büyüklüklerine göre bir süre alıkonulmalarını sağlar. Hemen hemen tüm kromatografik

yöntemlerde ayırma ortamını önce küçük moleküllü maddeler terk ederken molekül seçme kromatografisinde önce büyük moleküllü maddeler terk eder. Bunun nedeni büyük moleküllerin sabit fazın küçük gözeneklerine girememesidir. Molekül seçme yöntemi polimerlerin ayırımında vazgeçilmez bir yöntemdir.

6. Affinite Krom. : Protein-ligand etkileşimine dayalı, biyolojik moleküllerin ayırımında uygulanan bir yöntemdir. Bir taşıyıcı katı üzerine uzun zincirli organik molekül ve bunun da ucuna özellikle biyolojik moleküllere ilgisi olan büyük bir molekül (ligand) bağlanır. Bu ligand hareketli faz ortamında büyük biyoloji molekülleri örneğin proteinleri tutarak ayrılmasını ve kromatografik ortamı terk etmelerini sağlar.

4. İki Fazın Polarlık Durumuna Göre Sınıflandırma

Polarlık yönünden kromatografik yöntemleri, normal ve ters faz olmak üzere iki gruba ayırmak mümkündür. Sabit fazın hareketli faza göre daha polar olduğu yöntemler normal faz, hareketli fazın sabit faza göre daha polar olduğu yöntemler ise ters faz olarak sınıflandırılır. Özellikle sıvı kromatografik yöntemler bu şekilde sınıflandırılabilir. Ancak gaz kromatografiyi de, hareketli faz olarak H₂, N₂, He, CH₄, Ar gibi apolar gazlar kullanıldığı için, normal faz kromatografi olarak kabul etmek hatalı olmaz.

5. Fazların Fiziksel Şekline Göre Sınıflandırma

Bu sınıflandırma en yaygın klasik bir sınıflandırmadır. Buna göre kromatografik yöntemler önce hareketli faza göre;

- gaz kromatografi (GC)
- sıvı kromatografi (LC)
- süperkritik akışkan kromatografi (SFC)

olarak ikiye ayrılır. Daha sonra da her biri tekrar, bu kez de sabit faza göre sınıflandırılabilir.

Gaz kromatografi;

- gaz-sıvı kromatografi (GLC)
- gaz-katı kromatografi (GSC)

olarak ikiye ayrılır.

Sıvı kromatografiyi de;

- sıvı-sıvı (LLC)
- sıvı-katı (LSC)
- iyon değiştirme (IEC)
- dışarılama (EXC)

kromatografi olmak üzere dört gruba ayırmak mümkündür.

Süperkritik akışkan kromatografi de sabit faza göre ayırım yoktur, yalnız hareketli faz dikkate alınır.

Bazı sınıflandırmalar yukarıda verilen yalnız iki kritere göre olmaktadır:

- 1) Hareketli ve sabit fazların fiziksel temas ettirilmelerine göre (Ortamın fiziksel durumuna göre olan sınıflandırma)
- 2) Hareketli ve sabit fazların tipleri ve fazlar arasında madde aktarımını sağlayan dengelerin cinslerine göre (fazların fiziksel şekline göre olan sınıflandırma)

Yukarıdaki sınıflandırmaların ötesinde, pratikte kromatografik yöntemler denince akla daha çok aşağıdaki yöntemler ve sınıflandırma gelir:

1. Kağıt kromatografi
2. İnce tabaka kromatografi
3. Kolon kromatografi
4. İyon değiştirme krom.
5. Gaz-sıvı kromatografi
6. Yüksek basınç sıvı kromatografi
7. Süper Kritik Akışkan kromatografi.

Kritik sıcaklık: Bir madde için basınç ne olursa olsun, o sıcaklığın yukarısında maddenin sıvı olarak bulunamayacağı sıcaklıktır. Maddenin, kritik sıcaklığındaki buhar basıncına da kritik basınç denir. Süper kritik akışkan, hem sıcaklığı hem de basıncı kritik noktanın üzerinde olan maddeler için kullanılan bir terimdir. Süperkritik akışkanların, yoğunlukları, viskoziteleri ve diğer özellikleri (difüzyon katsayısı, cm^2/s gibi), maddenin gaz ve sıvı halleri arasında yer alır.

Süper kritik akışkanlara örnek: CO₂, N₂O, NH₃, n-butan verilebilir.

- 1) Uçucu olmayan veya gaz krom. şartlarında termal bozunmaya uğrayan bileşikler.
- 2) Sıvı krom. de kullanılan spektroskopik veya elektrokimyasal detektörlerle belirlenmeleri mümkün kılacak fonksiyonel grupları bulunmayan bileşikler süper kritik akışkan krom. ile ayrılabilir.