

Kapiler kolonların tipleri:

- İç yüzeyi, sabit fazla kaplı kapiler kolon,
- Destek materyali kaplanmış kapiler kolon,
- İç yüzeyine sadece poroz destek katısı kaplanmış kapiler kolon,
- Ergimiş silika kapiler kolon

Sabit faz, kapiler kolonlarda kolon iç yüzeyine ince bir film şeklinde kaplanmaktadır.

Kolon sabit fazını oluşturan maddeler:

- sıcaklığa dayanıklı olmalı ve çalışılan sıcaklıkta parçalanmamalı,
- buhar basıncı düşük, kaynama noktası yüksek olmalı,
- inert olmalı,
- ayrımı yapılacak bileşenlerle reaksiyona girmemeli,
- polariteleri analiz edilecek bileşenlerle uyumlu olmalıdır.

Dedektör

Gaz kromatografisinde kullanılan dedektörler, kolonun çıkış ucuna yerleştirilmiş ve gaz içerisinde gelen bileşenleri belirleme ya da tayin etmeye yarayan mekanizmalardır.

Temel çalışma prensibi itibariyle çok farklı dedektör sistemleri vardır ve analiz edilecek örneğin özelliğine göre de değişik dedektör seçimi yapılmaktadır.

Dedektörde olması gereken özellikler:

- Hassasiyetinin yüksek olması,
- Hızlı olması,
- Taşıyıcı gazı cevap vermemesi, yalnızca örnek bileşenlerine karşı duyarlılık göstermesi,
- Alınan cevap (sinyal, pik) örnek bileşiminin konsantrasyonuyla doğru orantılı olması ve gürültü üretimi düşük olması,
- Stabilitesi ve tekrarlanabilirliği iyi olması,
- Çok geniş bir sıcaklık aralığında (20-400 °C) çalışabilmesi,
- Örnek bileşenlerine karşı seçiciliği yüksek olması ve örneği tahrip etmemesidir.

Gıda analizlerinde en sık kullanılan dedektörler:

- Alev İyonlaşma Dedektörü (FID)
- Alkali Alev İyonizasyon Dedektörü (AFID)
- Termal İletkenlik Dedektörü (TCD)
- Elektron Yakalama Dedektörü (ECD)
- Alev Fotometrik Dedektör (FPD)

Gaz kromatografisinde en fazla kullanılan dedektör sistemlerinden birisi olan *alev iyonlaşma dedektöründe* kolondan çıkan gazlar, hidrojen- oksijen gazları ile karıştırılarak yakılır ve iyonlaşması sağlanır. Oluşan pozitif yüklü iyonlar daha negatif bir elektroda doğru çekilerek elektrik akımı oluştururlar. Alev iyonlaşma dedektörü de seçimli bir dedektör olup N₂, O₂, CO₂ gibi alevde iyonlaşmayan moleküllere karşı duyarlı olmaması önemli bir avantaj sağlar. Termal gaz iletkenliği ilkesinden yararlanılarak geliştirilen *termal iletkenlik dedektöründe*, Wheatstone iletkenlik köprüsü kullanılır. Basit, ucuz ve her örneğe cevap verebilen bir sistemdir.

Elektron yakalama dedektöründe ise kolondan çıkan gazlar beta ışınlarına maruz bırakılır. Beta tanecikleri ile yani yüksek enerjili elektronlarla çarpışan moleküller iyonlaşırlar ve bir elektron akımı oluştururlar. Bu sistemle nitrit-nitratlar, pestisitler, amino asitler, biyojenik aminler, ozon ve sülfürlü bileşikler tayin edilebilir.

Alev iyonlaşma dedektörüyle hemen hemen aynı ilkeye dayanarak çalışan ve özellikle kükürt ve fosfor atomları içeren moleküllere karşı duyarlı olan *alev fotometresi dedektöründe*, kükürtün 394 nm’de, fosforun ise 526 nm’de yaydığı ışımaya ölçülür.

Gaz Kromatografisinde Örnek Hazırlama

Uçucu olmayan maddelerin (numunelerin) gaz fazına geçebilen esterleri hazırlanarak bu bileşenler, önce uçucu, sıcaklığa dayanıklı ve dedektörde tespit edilebilir hale getirilmelidir. Örneğin çeşitli gıdalarda yağ asitleri analizi yapabilmek için türevlendirme, sabunlaşma ve metilleşme gibi bazı ön işlemler yapılması gerekir.

Ayrıca gıdalarda istenen ya da istenmeyen uçucu aroma maddeleri ile düşük sıcaklıklarda buhar haline geçebilen bileşiklerin tespitinde head space yöntemi kullanılır. Materyalin kapalı bir ortama konulup, üst kısmından uçucu maddelerin gaz fazında çekilerek, doğrudan GK’ya verildiği bir yöntemdir.

En çok kullanılan *türevlendirme* teknikleri:

- Hidrür oluşturma
- Alkilasyon

Hidrür oluşturma tekniği, yalnızca As, Sb, Bi, Sn, Pb, Se, Te ve Ge gibi hidrür oluşturan elementlere uygulanır.

Alkilleme genellikle, di ve trialkilkurşun, mono-, di- ve trialkilalay gibi iyonik organometalik türlerine uygulanır. Bütün bu türevlendirme teknikleri, orjinal metal-karbon bağlarının bütünlüğünü değiştirmeksizin, yalnızca bileşiklerin uçuculuğunu değiştirir. Son zamanlarda GC için uçucu metalik hidrürlerin elde edilmesinde, yeni kolon üzeri türevlendirme tekniği rapor edilmiştir. Bu yöntem, NaBH₄ değiştiren fraksiyon içeren GC dolgulu kolonlarında veya gaz kromatografinin enjeksiyon bölmesinin içine yerleştirilmiş, NaBH₄ içeren mini bir reaktör içinde, organik ve inorganik metallerin hidrür türevlerinin oluşumunu kapsar

Analiz İşlemi

- Çeşitli yöntemlerle hazırlanan örnekler, mikro-pipet (Hamilton pipet vb.)yardımıyla 0.01- 0.5 µl kadar alınarak enjeksiyon bloğuna enjekte edilir.
- Burada örnek yüksek sıcaklığın etkisiyle buhar hale geçer ve taşıyıcı gazla beraber kolona ilerler.
- Kolon içinde en az tutulan madde ilk önce dedektöre gelir.
- Dedektörden üretilen sinyaller yazıcıya ulaştırılarak bir grafik çizilir.
- Daha sonra bilinen standart madde cihaza verilir.
- Elde edilen kromatogramlardan tutunma zamanları ve grafiklerin alanları hesaplanarak konsantrasyon bulunur.

Gaz kromatografisi yönteminde nicel analiz ise kromatogramdaki piklerin altlarında kalan alanların hesaplanması ile veya pik yüksekliğinin ölçülmesi ile yapılır. Örneğin, enjekte ettiğimiz bir karışımda başlangıçta eşit miktarlarda C ve D bileşenlerinin olduğunu varsaydığımız bir durumda, kromatogramda bu bileşenlere ait piklerin altında kalan alanlar da birbirine eşit olacaktır.

Bir bileşen kolondan ne kadar erken çıkarsa, o bileşene ait pik de o kadar keskin elde edilirken, kolondan geç çıkan bileşenlere ait pikler ise geniş ve yayvan olarak elde edilmektedir. Bu ise istenmeyen bir durumdur. Bu durumu önlemek için sıcaklık programlaması yöntemi uygulanır. Başlangıçta kolon sıcaklığı düşük tutulur ve zamanla doğrusal bir biçimde arttırılır.

GK'nın Avantajları

- Hızlı olması: 5-25 dk. İçinde hızlı ve doğru sonuç alınabilir.
- Ayırma gücünün yüksek olması.
- Kalitatif analizlerin yapılabilmesi: alıkonma zamanı bilinerek pek çok analiz yapılabilir.
- Kantitatif analizlerin yapılabilmesi: elde edilen pik alanları ile örnek konsantrasyonu doğru orantılıdır.
- Metodun hassasiyetinin yüksek olması: termal iletkenlik dedektörü duyarlılık 100ppm e ulaşırken; foto iletkenlik dedektörü ile 1ppb ye ulaşmaktadır.
- Basit olması:örneğin hazırlanması, enjeksiyonu ve analizi son derece basittir.

HPLC

Bir sıvıdaki (çözünmüş) bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan (genellikle katı) bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşimlere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Kolonu değişik zamanlarda terkederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Burada taşıyıcı faz olan sıvı, pompalarla kolona basıldığından yüksek akış hızındadır. Bu nedenle ayırma daha kısa sürede ve tam olarak gerçekleşmektedir.

Ayrılan bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tesbit edilip miktarıyla orantılı olarak kaydedilir. Bu şekilde yüksek hızda gerçekleştirilen ayırmaların yapıldığı sıvı kromatografi sistemlerine, Yüksek Basınç Sıvı Kromatografi (HPSC) denir HPLC günümüzde gıda, kimya, biyokimya, biyoteknoloji, farmakoloji, tıp kimyası, bitki kimyası, tarım ve kimya mühendisliğini içeren alanlarda ayırma ve analiz için vazgeçilmez bir araç olarak kabul edilmektedir.

Diğer kromatografik tekniklere uygun olmayan bileşiklerin ayrılması ve analizi için uygundur.

Çevre sıcaklığında termal olarak kararsız bileşikler ve yüksek polarlıktaki bileşikler herhangi bir türevlendirme olmaksızın ayırabilir ve analiz edebilir.

HPLC'nin kullanım alanları:

- Karbonhidrat analizleri
- Lipid analizleri
- Amino asit, peptit ve protein analizler
- Vitamin analizleri
- Mikotik ve bakteriotoksinler
- Tarım ilaçları (Pestisit) kalıntı analizleri
- Diğer katkı ve kontaminant analizleri

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC)'nde, sabit faz olarak kullanılan parçacık boyutlarının çok küçültülmesi sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz yüzey alanı büyümekte ve kolonun etkinliği arttırılmaktadır.

Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için bir basınç uygulanması gerekir.

Bu yüksek verimdeki kolonların ve oldukça yüksek basınçların kullanıldığı HPLC, element türevlendirilmesinde en yaygın biçimde uygulanan kromatografi metodudur.

- Kolon kromatografisi uzun zaman alan bir prosestir. Basınca dayanıklı çelik kolon ve destek materyalleri ile çok hızlı ve etkin (yüksek kapasiteli) ayırma işlemlerinin geliştirilmesi ile HPLC yöntemiyle analiz süresi kısaltılmıştır.
- Bu amaçla ilk olarak 1967'de cam bilyeciklerin etrafı bir iyon değiştirme reçinesiyle, 1969'da bir silikajel tabakasıyla kaplanarak ideal özellikte kolon materyali geliştirilmiştir.
- HPLC ısıya dayanıklı olmayan ve çok yüksek polariteye sahip maddeler ile çeşitli biyopolimerlerin analizi için uygun bir ayırma metodudur.

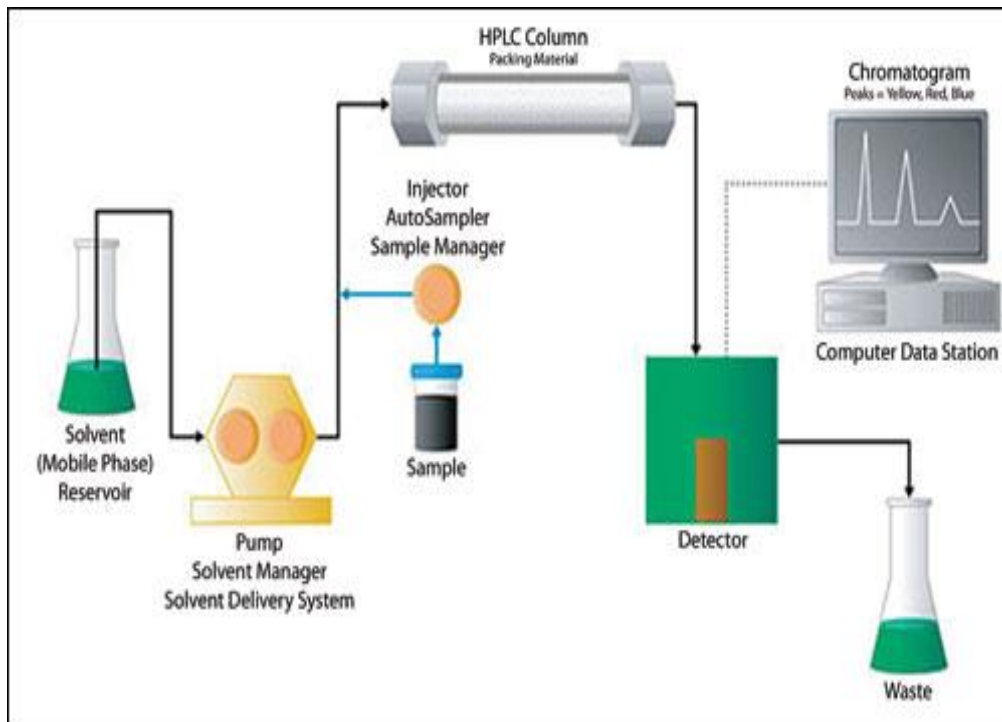
Sistemde, dar ve kısa bir kolonda

- Solventin akış hızı
- Kompozisyonu
- Hacmi

değiştirilerek ve çoklu gradient elüsyon uygulamaları kolaylıkla yapılabilmektedir.

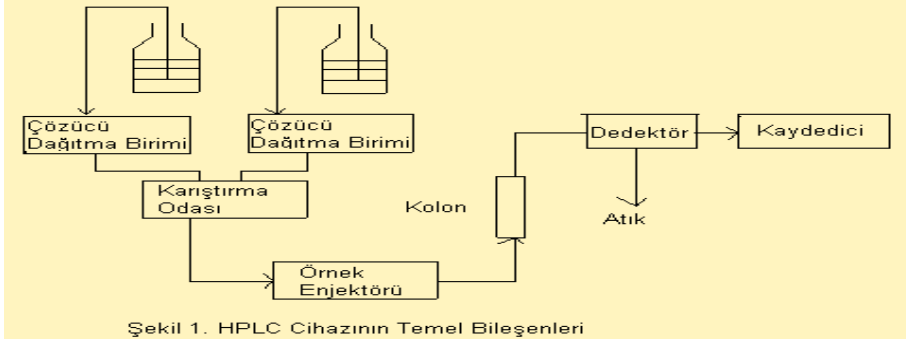
HPLC'nin diğer sıvı kromatografisi türlerine göre üstünlükleri:

- HPLC kolonu rejenerasyon olmadan birden fazla kullanılabilir.
- Kullanıcının becerisine daha az dayanır ve tekrarlanabilirlik daha yüksektir.
- Nicel analiz amaçları için de kullanılabilir.
- Analiz süresi kısadır.
- Duyarlılık çok yüksektir, çok küçük miktarlar floresans ya da elektron yakalama dedektörleri kullanılarak tayin edilebilir.



”

HPLC cihazının bölümleri:



- Çözücü dağıtma bölümü
- Ayırma kolonu
- Dedektör ve kaydedici

sistem

Çözücü Dağıtma Sistemi

HPLC cihazı, diğer sıvı kromatografisi cihazlarından, daha önce de belirtildiği gibi, kolon giriş ve çıkışı arasında oluşturulması gereken yüksek basınç nedeni ile farklılık gösterir. Bu basınç farkı, kolon girişine bir pompa yoluyla uygulanan basınç ile sağlanır. Çözücü pompalama sistemi belki de HPLC sisteminin en önemli kısmıdır.

Pompanın performansı, analitik sonuçlardaki tekrarlanabilirliği, nicel değeri, gözlenebilme sınırı vb. değerleri büyük ölçüde etkiler.

Çözücü Dağıtma Sistemi

Ticari olarak mevcut pompalama sistemleri;

- Doğrudan gaz basınç pompaları
- Pnömatik hızlandırıcı pompalar
- Pistonlu pompalar
- Şırınga tipi pompalar

Doğrudan gaz basınç pompalarında, yüksek basınçta sıvı akışının sağlanmasıyla olur. Genellikle azot veya helyum gazının kullanılır. Gaz basıncı, hareketli fazın yüzeyine doğrudan veya bir diyafram yoluyla uygulanır.

Bu sistem sınırlı bir hacime sahiptir, bu yüzden durdurularak tekrar çözücü ile doldurulmalıdır. Avantajı, ucuz ve tek hareketli faz kullanıldığında güvenilir olmasıdır.

Pnömatik (havalı) pompalar da gaz basıncıyla çalışır. Gaz basıncı küçük alanlı bir pistonu iten büyük alanlı bir pistonu etkiler. Gaz basıncı böylece pistonların yüzey alanları oranında kuvvetlenir. Sabit basınçtaki sıvı sisteme dağıtılır. Sıvının pompayı terketme hızı, çözücünün vizikositesine, pompa çıkışındaki akışın direncine ve kolon dolgu maddesiyle olan etkisine bağlıdır.

Şırınga tipinde pompalarda, elektriksel olarak hareket eden kurşun vida, verilen çözücü hacmini yeterli basınçta tutan bir pistonu hareket ettirir. Bu pompaların başlıca avantajı, yüksek basınçta (7500 psi'a kadar) serbest pulslu akış sağlama yetenekleridir ve akış hızı, çalışılan basınçtan bağımsızdır.

Çözücüler, ayırma kolonuna girmeden önce karıştırılırlar. Bu sistem gerekli ayırmayı sağlamakta kullanılan iki hareketli faz için, iki yüksek basınç pompasına sahiptir. Bu amaçla kullanılacak iki hareketli fazın tamamen karışabilir olması gerekir. Pompalar yoluyla çözücüler, ya difüzyon ya da mekanik olarak çalışan küçük hacimdeki karıştırma odalarında karıştırılırlar.

Kolonlar

HPLC cihazında kullanılan kolonlar, yüksek basıncı korumak için paslanmaz çelikten yapılmışlardır.

Düzgün bir iç çapa sahiptirler ve ticari olarak değişik büyüklüklerde mevcuttur.

Bir kromatografik sistemin performansı, kolonda gerçekleştirilen ayırma ile yani, kolon dolgu maddesinin seçilmesi ve kullanılmasıyla tayin edilir.

İyi bir kolon dolgu maddesi:

- Kararlı olmalıdır.
- Hem hareketli faz çözücülerine hem de örnek çözeltilere karşı inert olmalıdır.
- Geniş yüzey alanına sahip olmalıdır.
- Yüksek basınç ve yüksek akış hızlarından etkilenmemelidir.

Kolon verimi:

- kolon dolgu maddesi,
- ortalama parçacık çapı,
- kolonu doldurmak için kullanılan teknikler,
- kolonun iç çapı,
- kolonun iç yüzeyinin geometrisi
- gibi faktörlere bağlıdır.

Paslanmaz çelik kolonların, malzeme özellikleri açısından en uygun kolonlar olduğu ortaya çıkmıştır. Analitik uygulamalarda, 2.1 mm, 3.2 mm ve 4.5 mm iç çapa sahip kolonlar 10-30 cm arasındaki uzunluklarda kullanılırlar.

Dedektörler

HPLC için ideal dedektör; geniş bir konsantrasyon aralığında yüksek duyarlılığa, düşük gürültü seviyesine, belirli seçiciliğe sahip olmalıdır

Dedektör tipleri:

- Maddenin bazı tabii özelliklerinin tanınmasına yönelik madde-özel dedektörler (Absorbans, flouresans, elektrokimyasal, iletkenlik dedektörleri)
- Kolonda ayrılan maddelerin varlığını, mobil fazın kütle özelliğine dönüştüren, kütle özellikli dedektörler (Reaktif indeks dedektörü)
- Maddenin tanımlanmasından önce evaporasyonla mobil fazın uzaklaştırıldığı desolvasyon dedektörleri (hareket eden tel dedektörü, modifiye FID dedektörü, kütle dedektörü)
- Kimyasal reaksiyon içeren türevlendirme dedektörü

Enjeksiyon sistemi-kolon ve kolon-dedektör arasındaki bağlantı borularının uzunluğunun mümkün olduğu kadar küçük olması istenmektedir.

Bu örnek seyrelmesini engelleyen, 0.025-0.05 cm iç çapa sahip (çelik ve teflon) bağlantı borularının kullanılmasıyla gerçekleşmektedir.

HPLC çalışmalarında sabit faz olarak genellikle silikajel kullanılır. İçerdiği gruplar nedeniyle zayıf asidik özellik gösteren silikajel, bazik özellik gösteren bileşikler bazlık kuvvetlerine göre tutar (kuvvetli bazlar silikajel kolonlarda zayıf bazlara oranla daha kuvvetli tutulur). Silikajel doğrudan dolgu maddesi olarak kullanıldığı gibi bir katı yüzeyine film halinde de kaplanabilmektedir.

Elemental türevlendirme amacı ile kullanılan dolgu maddesi ise genellikle anyon ya da kationları tutan iyon değiştirici reçinelerdir. Bu reçinelerin kullanılması durumunda örnekte iyon halinde bulunan türlerin birbirinden ayrılması sağlanabilir. Kullanılan iyon değiştirici reçineler doğrudan kolona doldurulabilen katı reçineler olabileceği gibi, bir katı yüzeyine

kaplanmış sıvı reçineler de olabilir. İyonların bu reçinelerle olan etkileşimi iyonların yükü ve büyüklüğü, pH, iyon şiddeti, kullanılan reçinenin gözenekliliği, çözücü cinsi, çözücü derişimi ve sıcaklık ile değişmektedir.

Birkaç bileşenden oluşan bir karışımdaki her bileşen, farklı bir net yüke sahiptir ve bu yüzden kolondan ayrılması için farklı bir iyonik kuvvet gerekmektedir. İyonik kuvvet tamponun ya da tampona eklenen tuzun artan derişimiyle artabilir. Bu örneğin kolonda alıkonma süresini azaltabilir ve bileşikler farklı tuz derişimlerinde kolondan ayrılır.