

Kromatografik Yöntemler

Kromatografi, tanımlar, teorik temeller

Sıvı ve Gaz Kromatografisi

Cihaz Bileşenleri

Kütle spektroskopisi Nasıl Değerlendirilir?

KROMATOĞRAFİNİN KURAMSAL TEMELLERİ

1903 Rus botanikçi Michail Semenovich Tswett

chroma (renk) + *graphein* (yazmak) → *kromatografi*



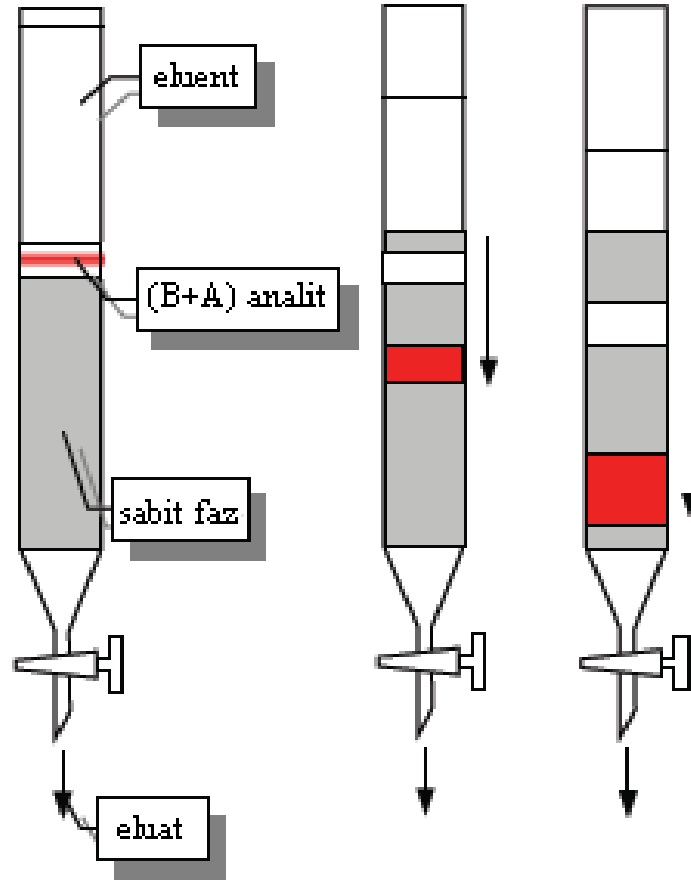
Tswett'in denemesi

Kromatografi, ayrılacak bileşenlerin biri sabit (**sabit faz**), diğeri belirli bir yönde hareket eden (**hareketli faz**) iki faz arasında bölündüğü fiziksel bir ayırma yöntemidir (IUPAC).

Kromatografik Yöntemlerin Tarihçesi

- İlk kromatografik çalışmalar;
Rus botanikçi Tswett (1903)
- Kromatografik çalışmaların hız kazanması;
Kuhn ve Lederer (1931)
- Sıvı-Sıvı kromatografisinin temeli;
Martin ve Synge (1941)
- İlk gaz kromatografisi;
James ve Martin (1950)
- Gaz-sıvı kromatografisinin gelişimi (1954 ile 1962)
- Gaz kromatografisi bir analitik teknik olarak kullanılması (1962)

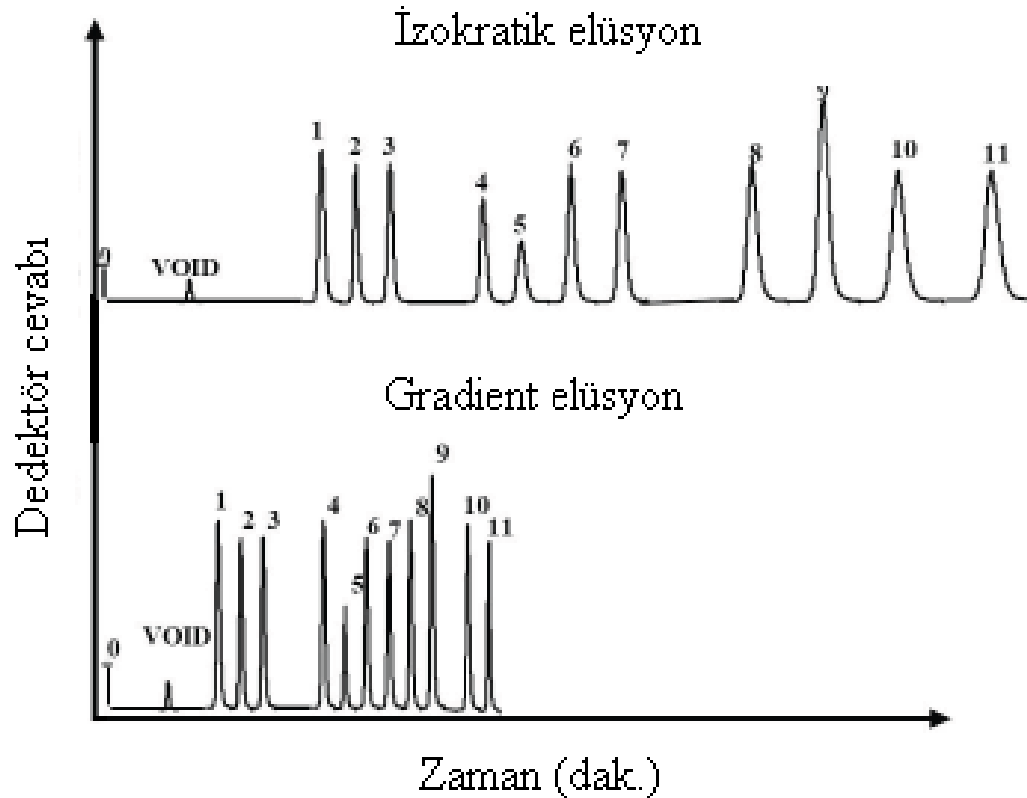
Hareketli faz, kolon boyunca bileşenleri farklı hızlarla sürükler. Bu işlem **elüsyon**; kolondan çıkan çözelti ise **elüat** olarak adlandırılır.



Elüent $\equiv$ hareketli faz $\equiv$ elüsyon çözeltisi

İzokratik elüsyon : Tek bir çözücünün kullanıldığı hareketli faz.

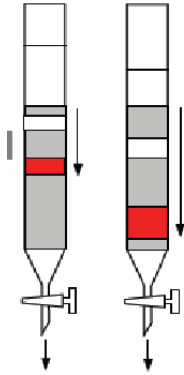
Gradient elüsyon : Belirli oranlarda kullanılan farklı polarlığa sahip çözücülerin kullanıldığı hareketli faz.



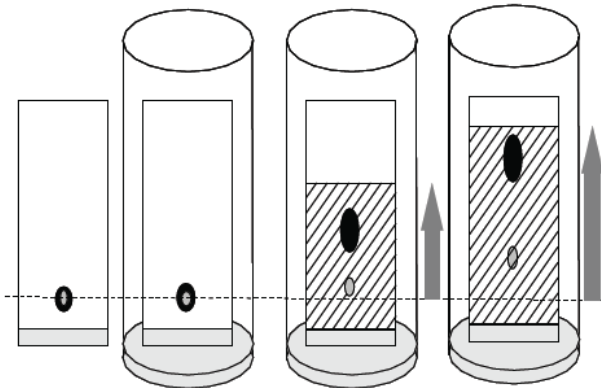
Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

Kromatografik yatağın (sabit fazın) şekline göre ;

1. Kolon kromatografisi



2. Düzlem kromatografisi



Hareketli (mobil) fazın fiziksel durumuna göre;

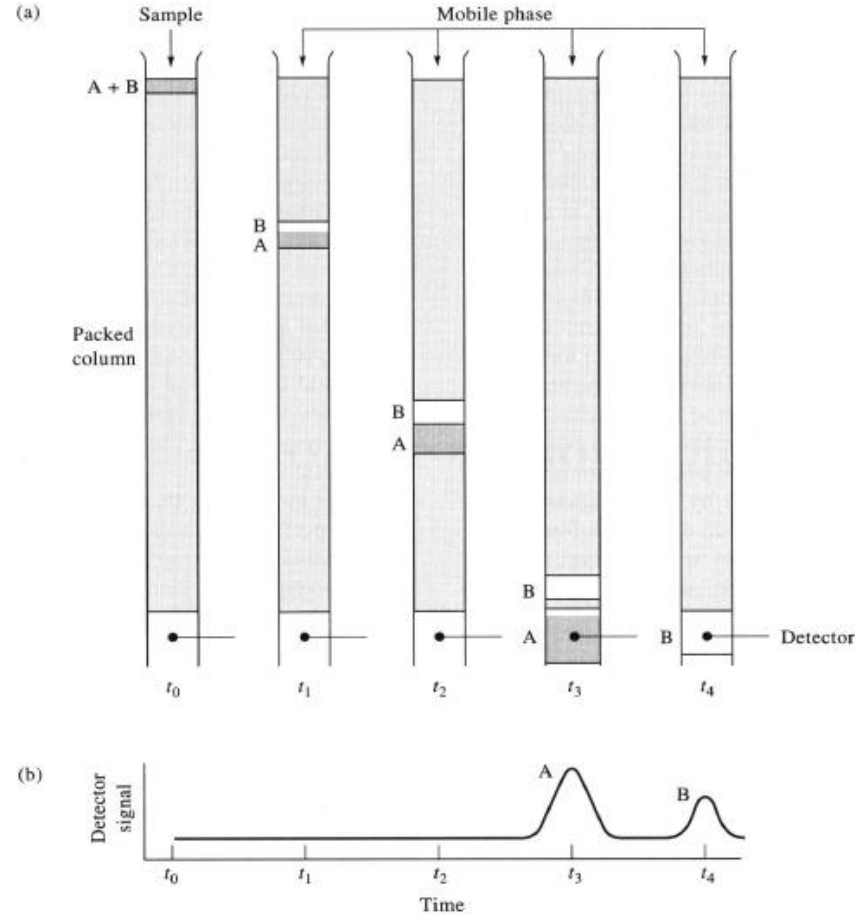
1. Gaz kromatografisi (GC)
2. Sıvı (likit) kromatografisi (LC ve HPLC)
3. Süperkritik-akışkan kromatografisi (SFC)

Ayırma mekanizmalarına (diğer bir deyişle, sabit fazın özelliğinden doğan denge işlemlerine) göre;

1. Adsorpsiyon kromatografisi
2. Dağılım (partisyon) kromatografisi
3. İyon-değiştirme kromatografisi
(iyon kromatografisi, IC)
4. Eleme (ekskülizyon, exclusion) kromatografisi
5. Afinite (affinity, benzeşme) kromatografisi

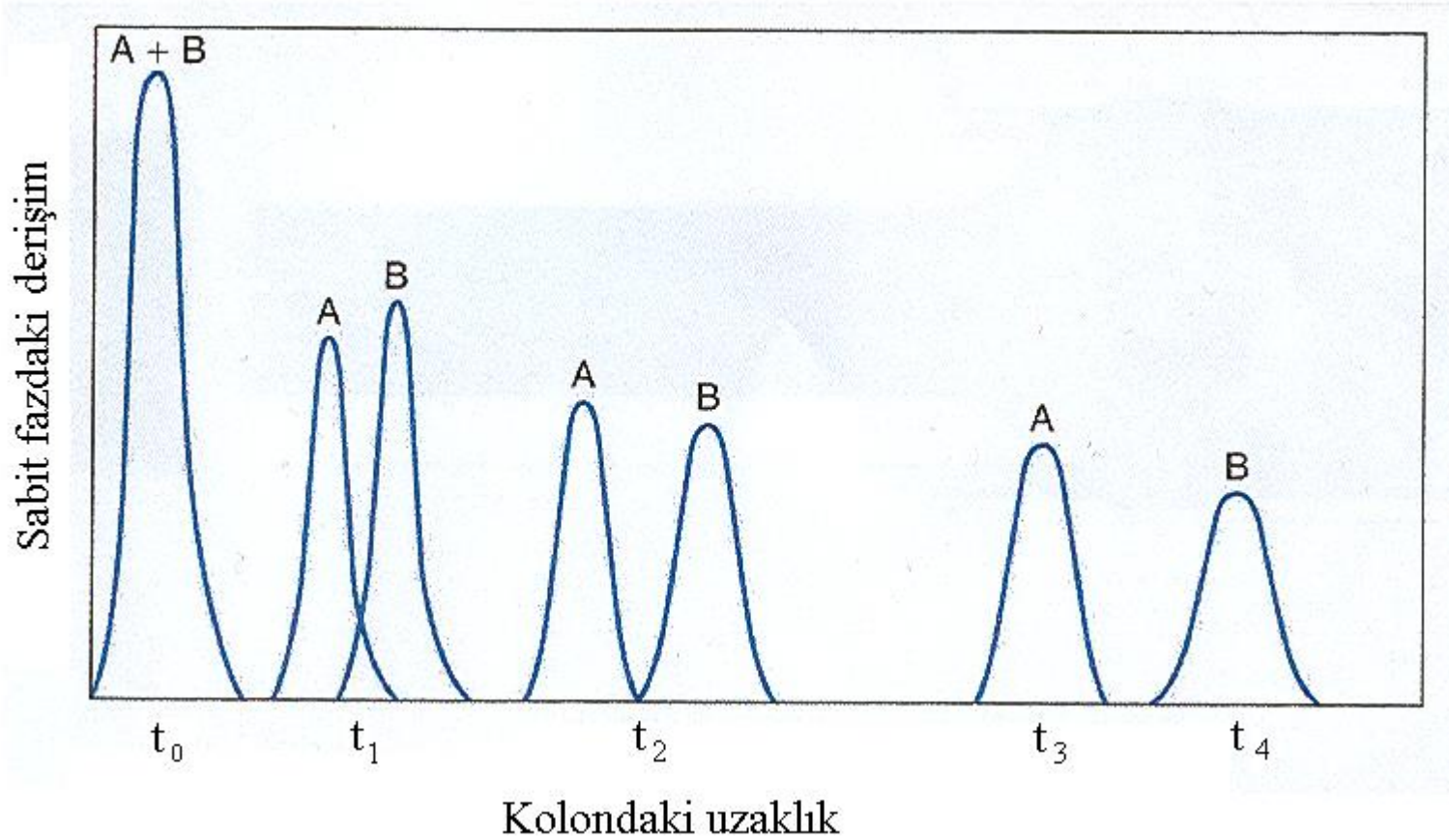
Kolon Kromatografisi

GC, HPLC ve SFC yöntemlerinin her üçü de kolonda gerçekleştirilir.

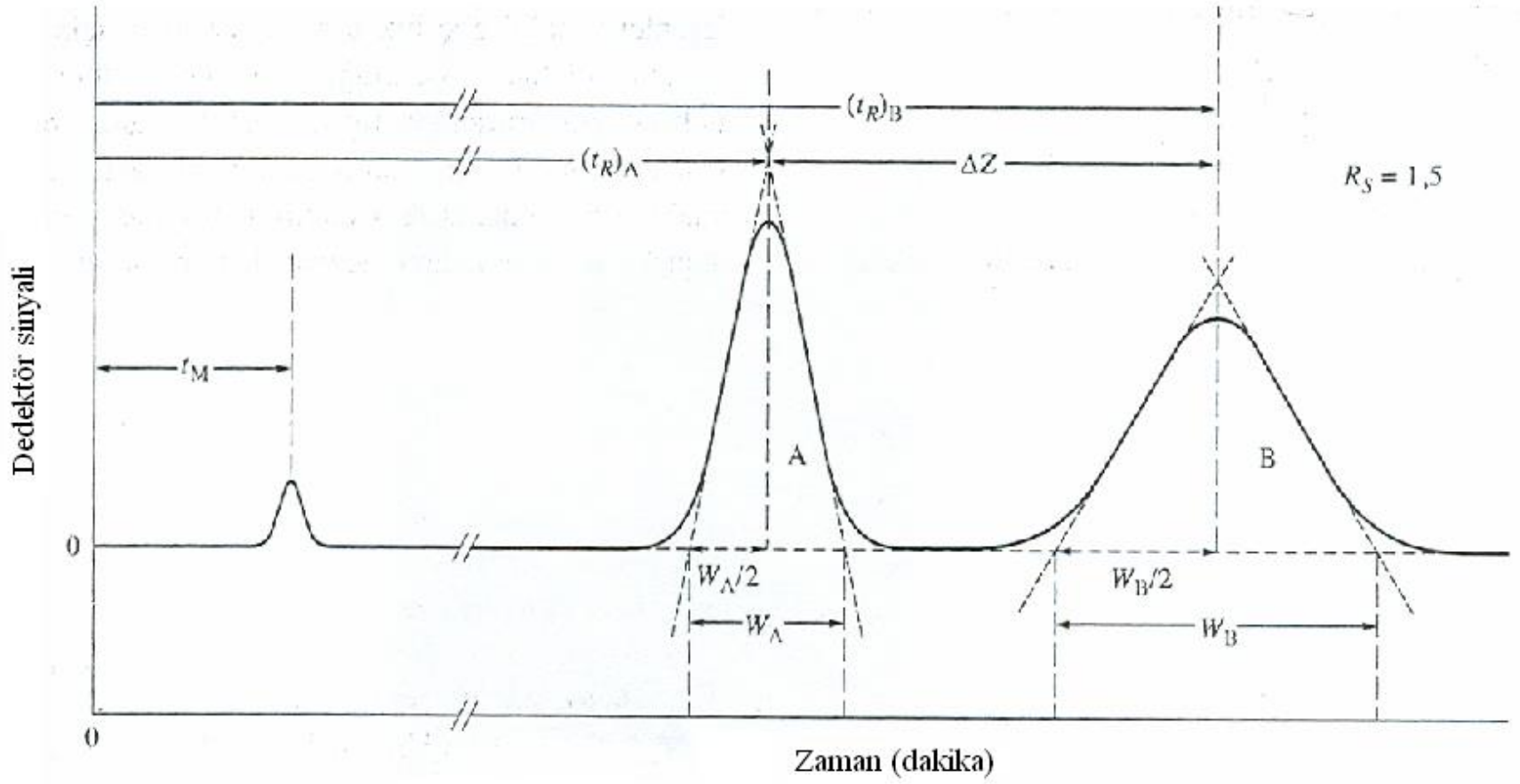


(a) A ve B bileşenlerinden oluşan bir karışımın kolonda ayrılmasının gösterimi

(b) (a)'da görülen elüsyonun farklı basamaklarına karşılık gelen dedektör sinyalleri (kromatogram)

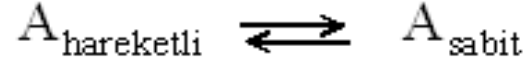


Kolon boyunca ilerleyen A ve B bileşenlerinin farklı zamanlara karşılık gelen derişimleri.



İki bileşenli bir karışımın kromatogramı

Kromatografide A ile gösterilen bir analit için dağılım dengesini sıklıkla, aşağıdaki basit denklemle tanımlayabiliriz:



Bu dengeye ait sabit, K, *dağılım katsayısı* olarak adlandırılır.

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

Bu denklemde C_S ve C_M analitin, sırasıyla sabit ve hareketli (mobil) fazdaki molar derişimleridir.

İdeal olarak dağılım katsayısı, geniş bir derişim aralığında sabittir, yani C_S , C_M ile doğru orantılıdır.

Bu eşitliğin uygulandığı kromatografi, *doğrusal kromatografi* olarak adlandırılır.

Kolon kromatografisinde önemli deneysel büyüklükler ve bağıntıları

Deneysel büyüklüğün ismi	Sembolü	Elde edilişi
Tutulmayan türün kolondan çıkma zamanı (ölü zaman)	t_M	Kromatogramdan
A ve B bileşenlerinin alıkonma zamanları	$t_{R(A)} , t_{R(B)}$	Kromatogramdan
A bileşeni için düzeltilmiş alıkonma zamanı	$t'_{R(A)}$	$t'_{R(A)} = t_{R(A)} - t_M$
A ve B bileşenlerinin pik genişlikleri	W_A , W_B	Kromatogramdan
Kolon dolgusu (sabit faz) uzunluğu	L	Doğrudan ölçülerek
Akış hızı (hacımsal akış hızı)	F	Doğrudan ölçülerek
Sabit faz hacmi	V_S	Kolonun hazırlanma verilerinden
Analitin hareketli ve sabit fazlardaki derişimleri	C_M , C_S	Analiz ve hazırlama verilerinden

Kolon kromatografisinde önemli türetilmiş büyüklükler ve bağıntıları

Türetilmiş büyüklüğün ismi	Hesaplanması	Diğer büyüklüklerle ilişkisi
Hareketli fazın ortalama doğrusal hızı	$\bar{u} = \frac{L}{t_M}$	
Hareketli fazın hacmi	$V_M = t_M \cdot F$	
Alıkonma faktörü (Kapasite faktörü)	$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$	$k = K \frac{V_S}{V_M}$
Dağılım katsayısı (Bileşenin iki fazdaki derişimlerinin oranı)	$K = k \frac{V_M}{V_S}$	$K = \frac{C_S}{C_M}$
Ayırma faktörü (Seçimlilik faktörü) (bağıl alıkonma)	$\alpha = \frac{t_{R(B)} - t_M}{t_{R(A)} - t_M}$	$\alpha = \frac{k_B}{k_A} = \frac{K_B}{K_A}$

Türetilmiş büyüklüğün ismi	Hesaplanması	Diğer büyüklüklerle ilişkisi
----------------------------	--------------	------------------------------

Resolüsyon (ayırım)
(iki pikin birbirinden
ayırılma derecesi) ayırım gücü

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

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{\alpha - 1}{\alpha} \frac{k_B}{1 + k_{ort}}$$

Kuramsal tabaka sayısı
(kolon veriminin yani
piklerin keskinliğinin nicel
ölçüsüdür)

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

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} (\alpha - 1) \left(\frac{k}{1 + k} \right)$$

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

Kuramsal tabaka yüksekliği

$$H = \frac{L}{N}$$

Alıkonma zamanı

$$(t_R)_B = \frac{16 R_s^2 H}{u} \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \frac{(1 + k_{ort})^3}{(k_B)^2}$$

Alıkonma Faktörü (Kapasite Faktörü, k)

Analitlerin kolonda göçetme hızlarını tanımlamak amacıyla yaygın olarak kullanılan önemli bir büyüklüktür.

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M}$$

Kapasite faktörü (k)'nın 1-5 arasında bir değer göstermesi idealdir.

Uygun bir kolonun seçilmiş olması halinde k değeri mobil fazın bileşimi değiştirilerek ayarlanabilir.

Ayırma Faktörü (α)

Birbiri ile ilişkili iki pikin göreceli alıkonmalarına ayırma faktörü (α) denir.

$$\alpha = \frac{t_{R(B)} - t_M}{t_{R(A)} - t_M} \qquad \alpha = \frac{k_B}{k_A} = \frac{K_B}{K_A}$$

$\alpha = 1$ ise pikler ayrılmamıştır. Mobil faz bileşimini değiştirerek veya çalışma sıcaklığını ayarlayarak α , 2'den büyük yapılabilir ve böylece iyi bir ayırma sağlanır.

Rezolüsyon (Ayrım, R_s)

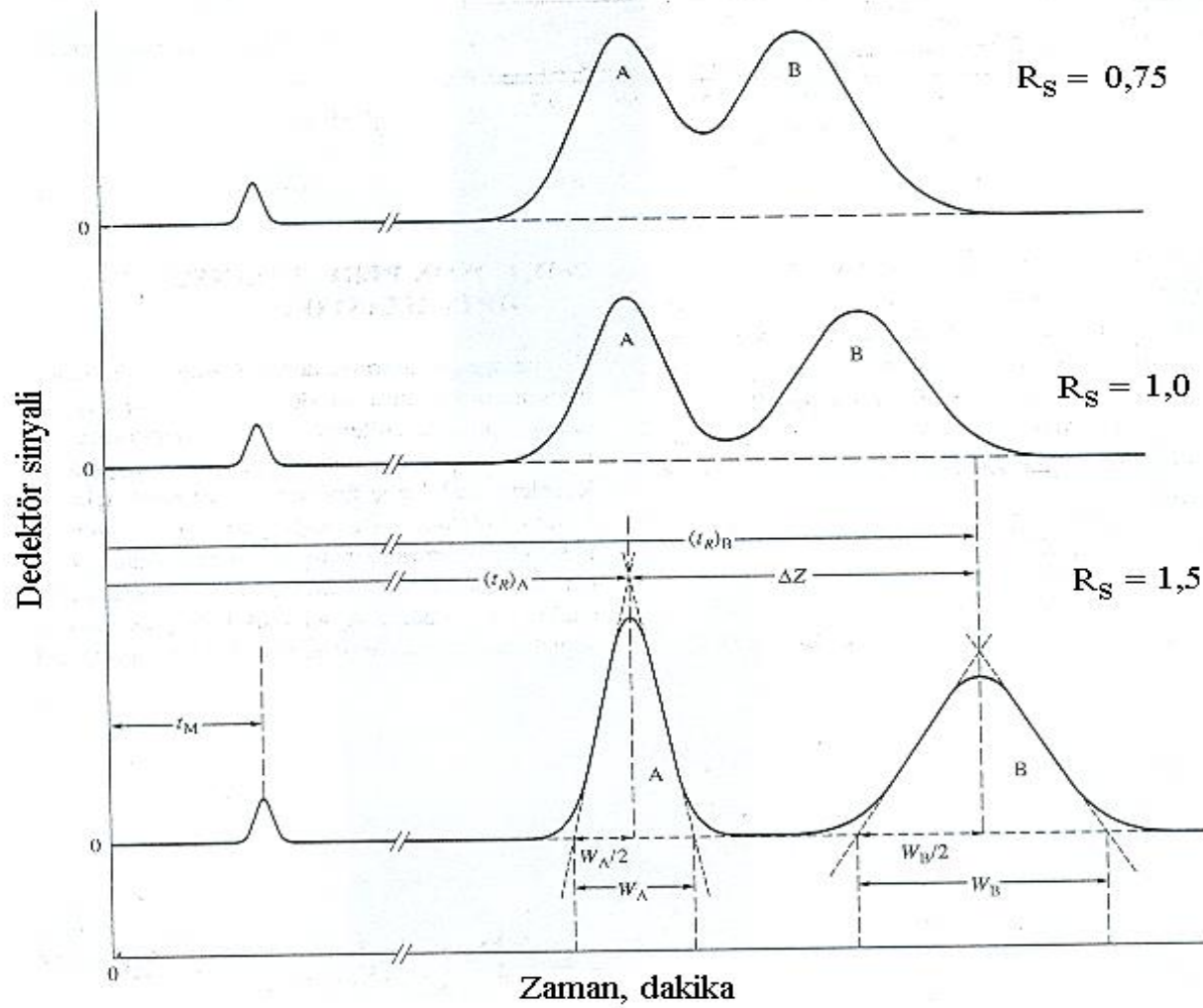
Rezolüsyon, iki kromatografik pikin birbirinden ayrılma derecesini tanımlayan bir büyüklüktür.

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

Ayrım, kolon etkinliğini belirleyen tüm faktörleri içerecek şekilde

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_B}{1 + k_{\text{ort}}} \right)$$

formülü ile ifade edilebilir.



Üç farklı ayırım değeri için elde edilen kromatogramlar.

Kolon Verimi

Kolon verimi; bir karışımdaki bileşenleri kolonun ayırma gücü olarak tanımlanabilir.

Tabaka Teorisi

Tabaka teorisi, 1941 yılında Martin ve Synge tarafından ortaya konmuştur. Kolon verimliliğinin, kantitatif olarak belirlenmesinde birbiriyle bağıntılı iki terimi içermektedir. Bunlar:

1- Tabaka yüksekliği (H),

2- Teorik tabaka sayısı (N).

- Tabaka yüksekliği (H) genellikle 0,1 ile 0,001 arasında değişir.
- Teorik tabaka sayısı ise (N) 100 ile 100.000 arasında değişir.

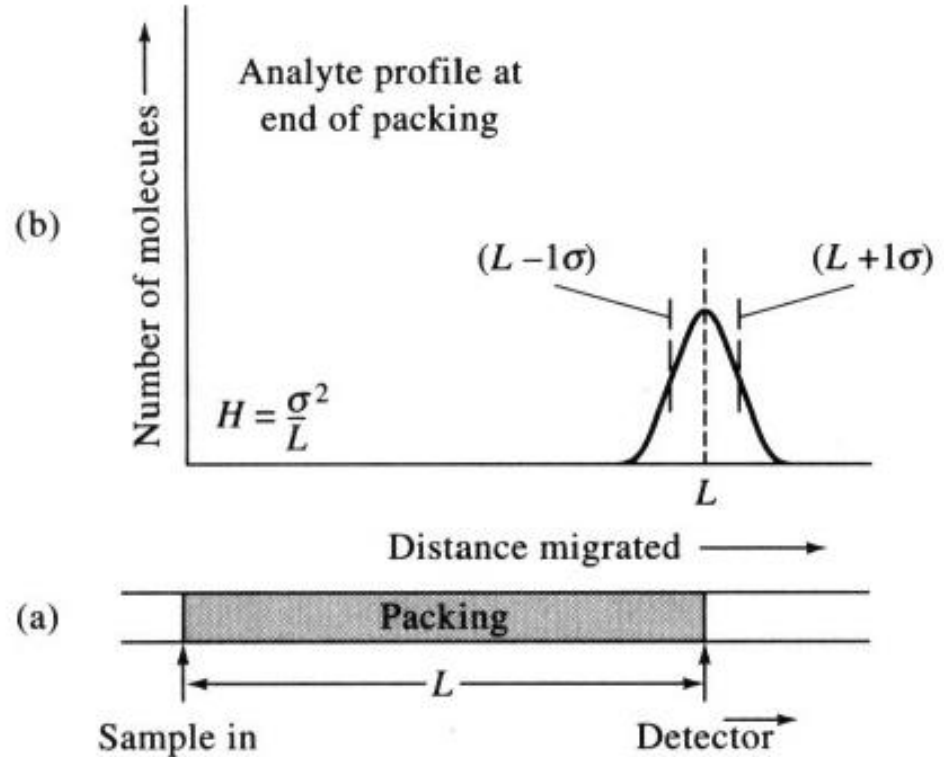
* *Kolon verimi*, tabaka yüksekliğinin (H) azalması ve tabaka sayısının (N) artmasıyla artar.

Plaka Yüksekliğinin (H) Belirlenmesi

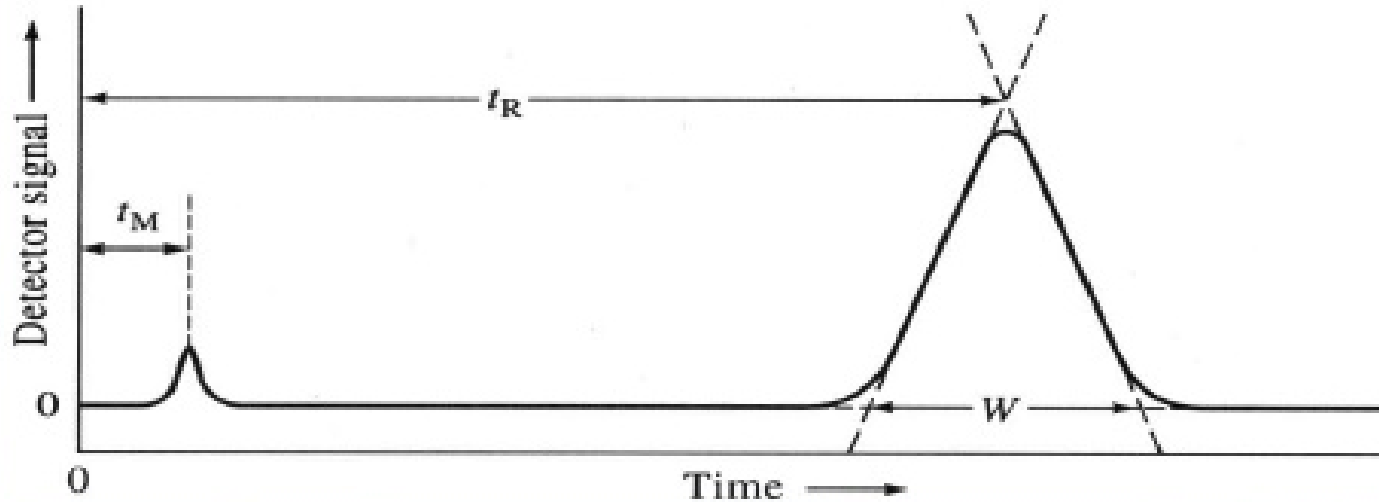
Kromatogramda elde edilen sonucun bir pik olduğundan bahsetmiştik. Bir Gauss eğrisinin eşitliğine göre değişim gösteren pikin genişliği, standart sapma (σ) ya da varyans (σ^2) ile tanımlanır.

Buna göre, birim kolon uzunluğu başına düşen genişleme (yani σ) kolon verimliğinin bir ölçüsü olarak kabul edilir ve plaka yüksekliği olarak (H) adlandırılır.

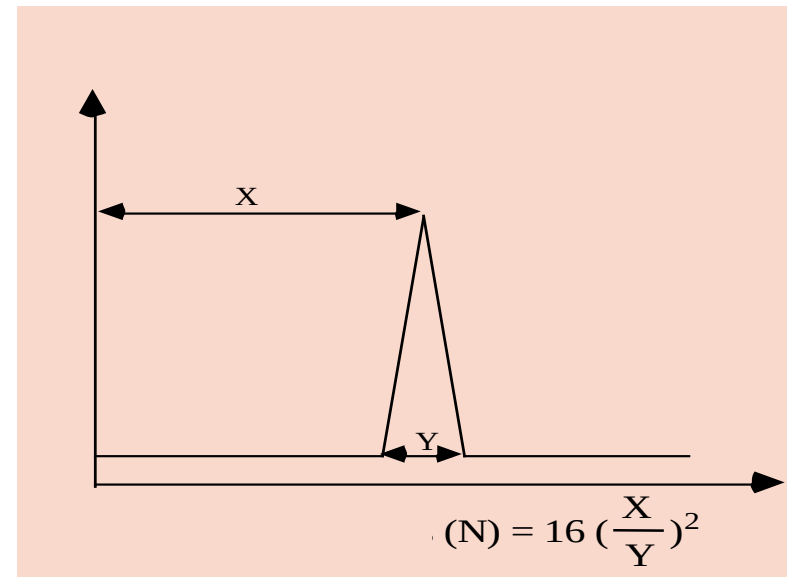
$$H = \frac{\sigma^2}{L}$$



H ve N deneysel olarak, alıkonma süresi (t_R) ve pik genişliği (W) yardımıyla tayin edilebilir.



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



Kolon Etkinliđinin(Performansının) Optimizasyonu

İyi bir ayırma için temel büyüklükler : α , k ve N (veya H)

Ayrımını iyileştirmenin en kolay yolu kapasite faktörü (k)'nü optimize etmektir.

k için mobil faz bileşimi değişimi, farklı bir kolon dolgu maddesi kullanılması (daha az uygun)

N için;

kolon uzunluđunu,

mobil fazın akış hızını,

dolgu maddesinin tanecik büyüklüđünü,

mobil fazın viskozitesini deđiřtirmek

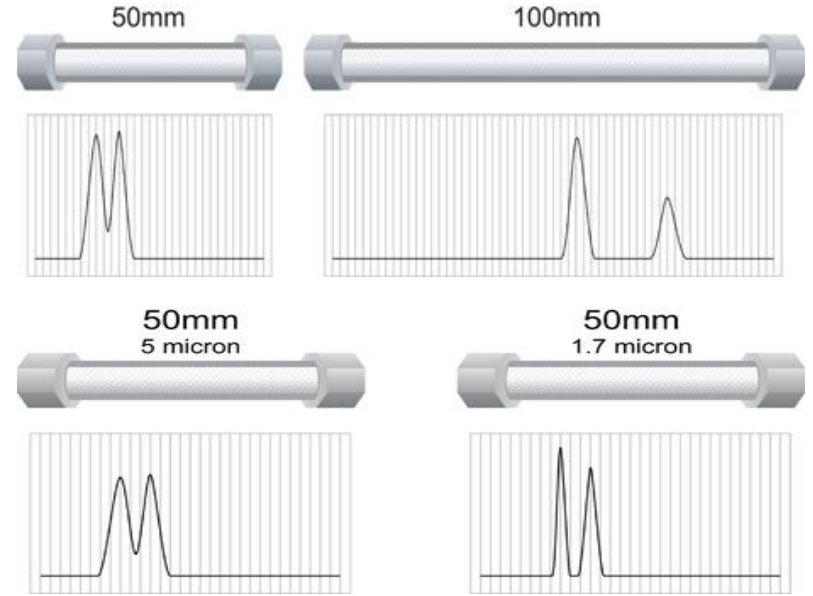
α için azalan tercih edilebilirlik sırasıyla;

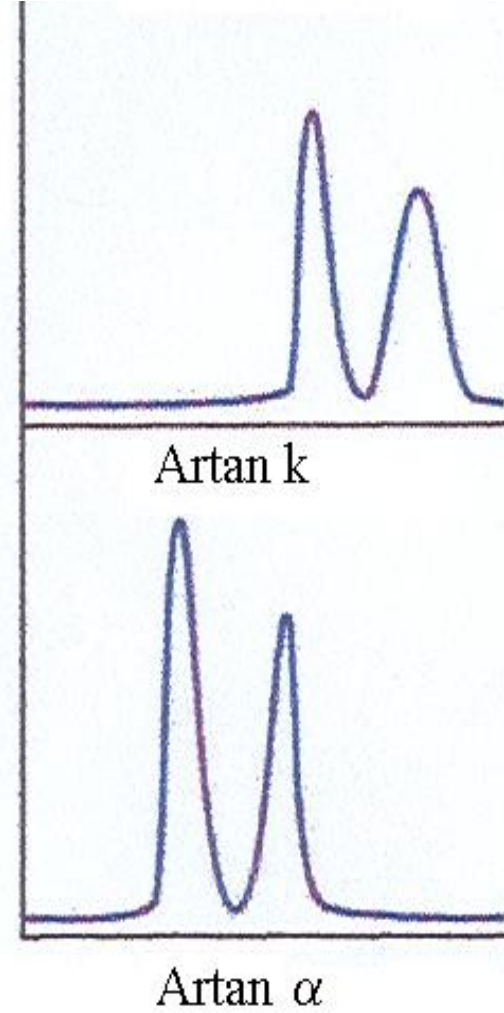
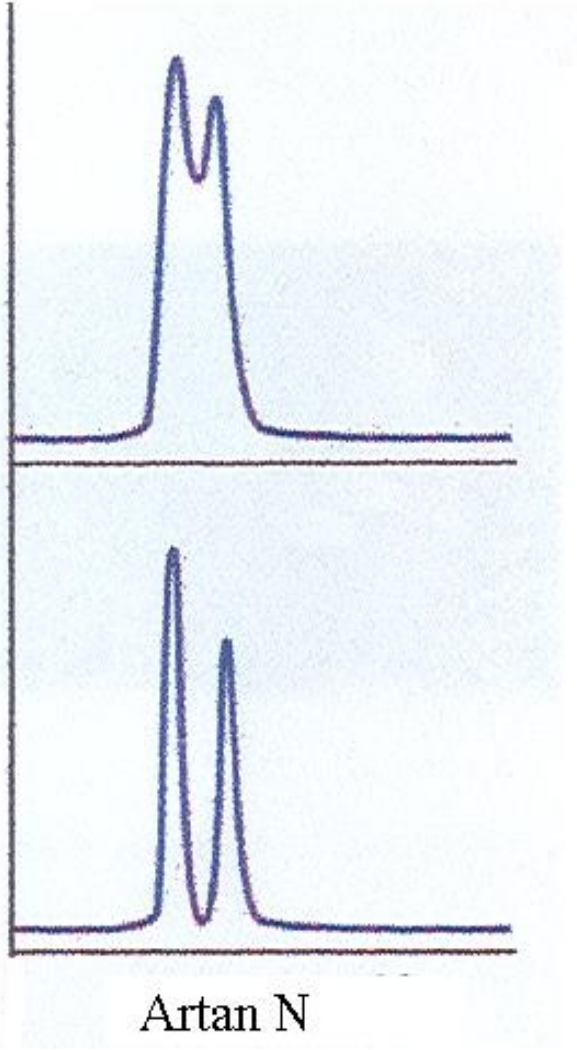
pH deđiřikliklerini de içeren mobil faz bileşimini deđiřtirmek,

kolon sıcaklığını değiştirmek,

sabit fazın bileşimini değiştirmek,

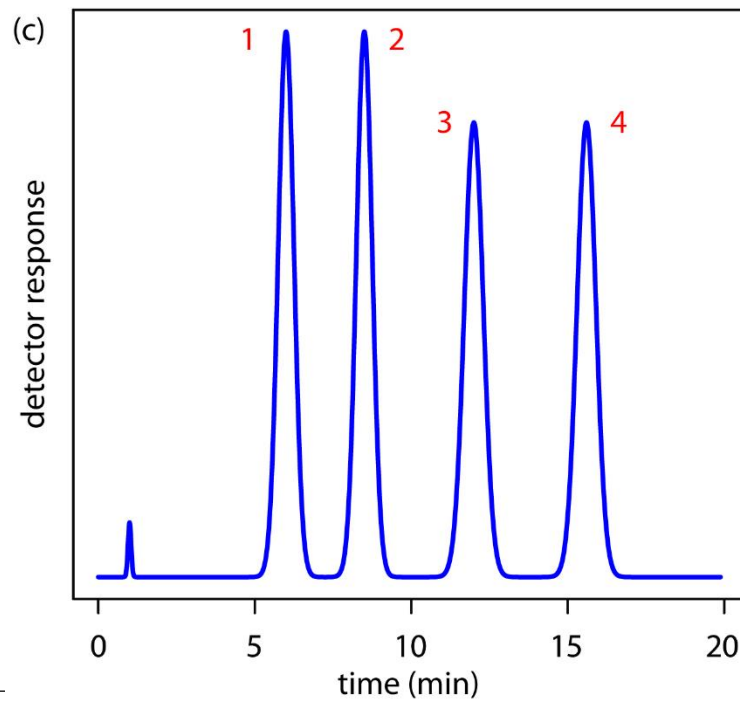
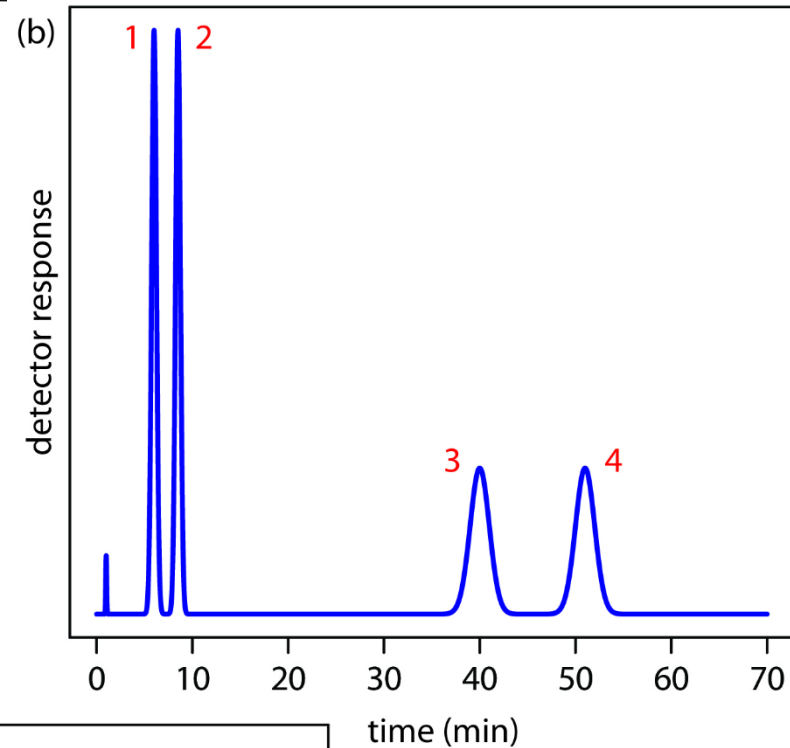
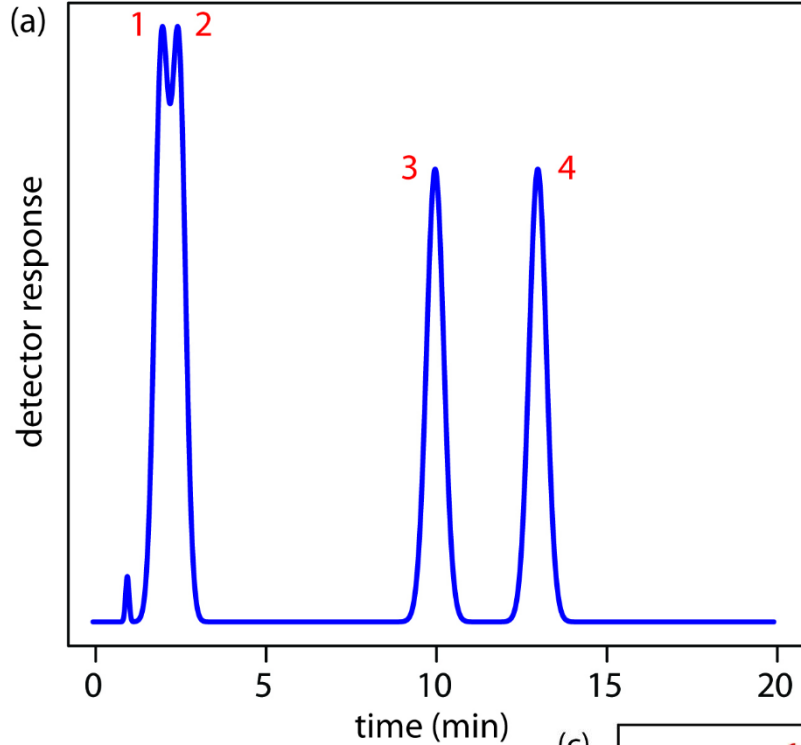
özel kimyasal etkilerden yararlanmaktır.



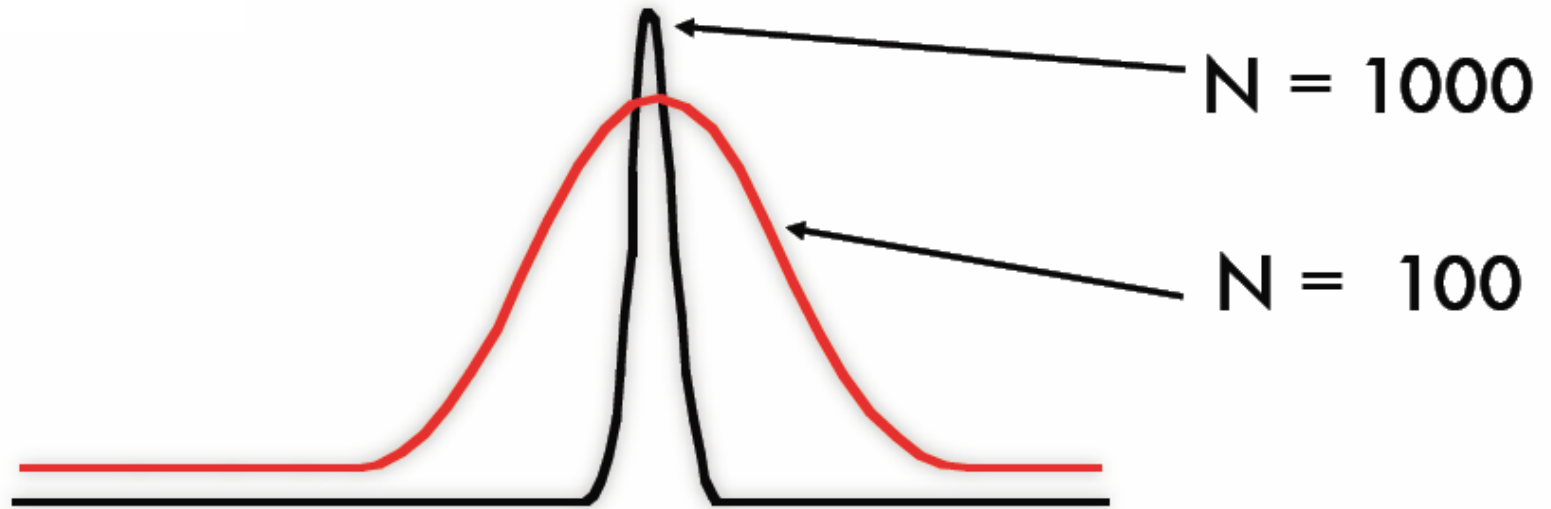


Kolon etkinliđinin optimizasyonu.

k: kapasite faktörü
 α : ayırma faktörü
N: tabaka sayısı



Tabaka Sayısının Pik Şekline Etkisi, örnek



Kolon verimliliğini tanımlamakta kullanılan N , kuramsal tabaka sayısı,

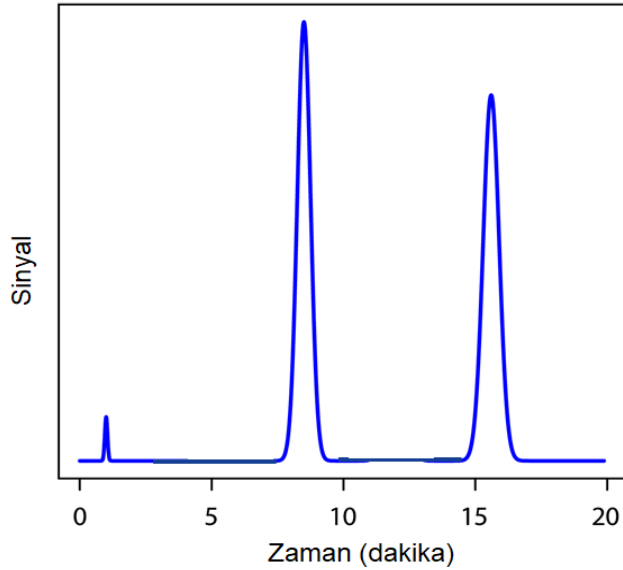
$$N = 16 R_s^2 \left(\frac{\alpha}{\alpha - 1} \right)^2 \left(\frac{1 + k_{\text{ort}}}{k_B} \right)^2$$

formülü ile; kolon verimliliğini tanımlamakta kullanılan diğer büyüklük, H , tabaka yüksekliği de

$$H = \frac{L}{N}$$

formülü ile de hesaplanabilir.

Örnek



$t_M = 0,98$ dak

Kolon boyu: 20 metre (GC kolonu)

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

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

$$H = \frac{L}{N}$$

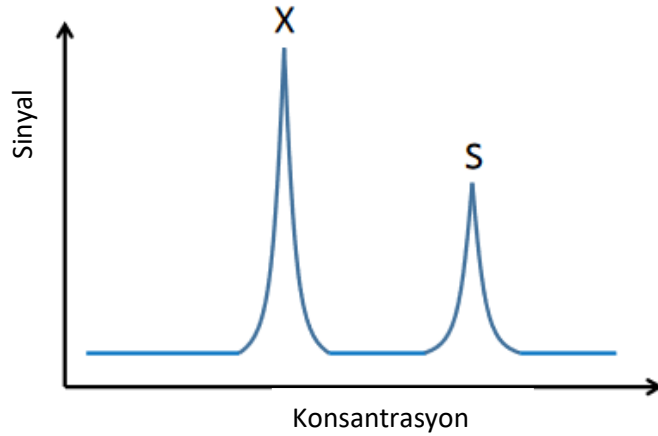
$t_1 = 8,21$ dak

$w_1 = 2,01$ dak

$t_2 = 16,01$ dak

$w_2 = 2,21$ dak

Örnek



$$F = \frac{A_x}{C_x} \frac{C_s}{A_s} \quad \text{Cevap faktörü, standart ile analitin (x) duyarlık farkından}$$

kaynaklanmaktadır. Cevap faktörü bulunduktan sonra bilinmeyen maddenin konsantrasyonu hesaplanabilir.

Örnek: Kromatografik bir düzenekte, 0,0837 M analit ve 0,0666 M standart varlığında, analit için 423 ve standart için de 347 alanı ölçülmüştür. 10,0 mL 0,146 M S ile 10 mL konsantrasyonu bilinmeyen analit karıştırılarak toplam 25 mL lik bir analiz çözeltisi elde edilmiştir. Bu çözeltiden, analit için 553 ve standart madde için de 582 alanları ölçüldüğüne göre, analitin konsantrasyonunu hesaplayınız.

Kromatografide Hız Teorisi

Kromatografide hız teorisi van Deemter tarafından 1956 yılında öne sürülmüştür. Tabaka teorisinden farklı olarak;

- Faz kalınlığı,
- Çözelti difüzyonu,
- Destek büyüklüğü,
- Ayırma faktörü,
- Destek porozitesi,
- Hareketli fazın hızı, gibi değişkenleri de ihtiva etmektedir.

Tabaka teorisinde olduğu gibi Gaussian dağılımına göre temellendirilir. Pek çok ayırma prosesinin dinamiğine temel teşkil etmektedir.

van Deemter Eşitliği

$$H = 2\lambda d_p + \frac{2\gamma D_g}{u} + \frac{8}{\pi} \frac{k d_f^2}{(1+k)^2 D_l} u$$

Paketlenme terimi

Taşıyıcı faz terimi

Durgun (sıvı) faz terimi

λ - Paketlenme sabiti

d_p - parçacık çapı

γ - parçacıklar arası boşluğun düzensizlik sabiti

D_g - Bileşiğin gaz içindeki difüzyon sabiti

D_l - Bileşiğin sıvı içindeki difüzyon sabiti

u - doğrusal gaz akış hızı

k - kapasite oranı

d_f - sıvı fazın etkin film kalınlığı

H - Teorik plaka (tabaka) yüksekliği

van Deemter Eşitliği

$$H = A + B/u + Cu$$

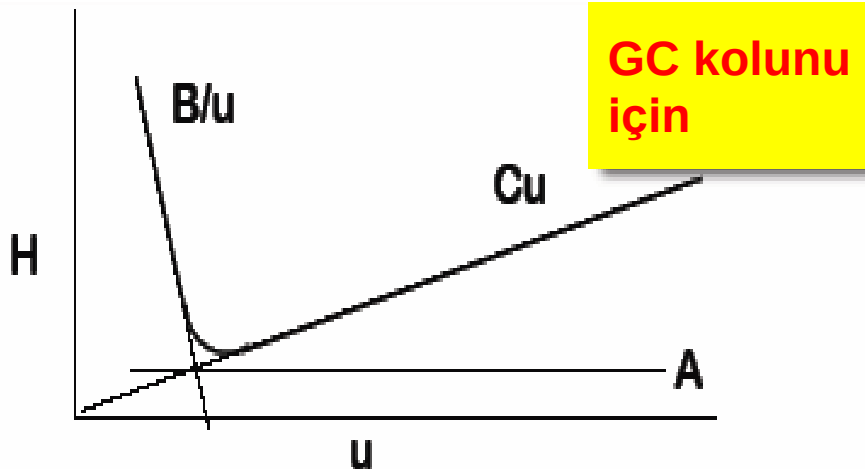
şeklinde kısaltıldığında,

A - çoklu yol veya eddy difüzyonu $2\lambda d_p$

B - moleküler difüzyon $\frac{2\gamma D_g}{u}$

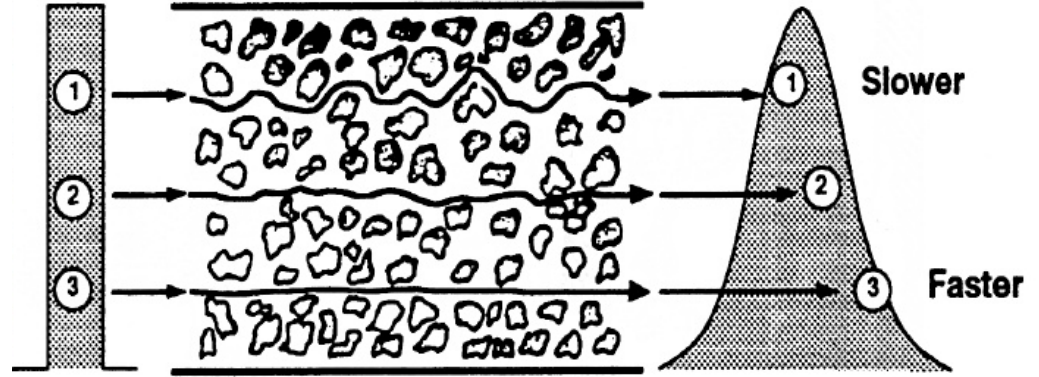
C - kütle transferine direnç $\frac{8}{\pi} \frac{k d_f^2}{(1+k)^2 D_l} u$

halini alır.



A terimi :

Paketlenme ölçüsü ve geometrisinden kaynaklanır.



Hareketli bir fazda hareket eden maddenin, kolondaki hareketi Eddy difüzyonuyla izah edilir.

Minimum pik genişliği elde etmek için;

- 1) Uygun boyutta paketleme,
- 2) Küçük çapta parçacıklar,
- 3) Uygun paketleme malzemesi,
- 4) Kolonda boşluk kalmaması, gibi hususlara dikkat edilmelidir.

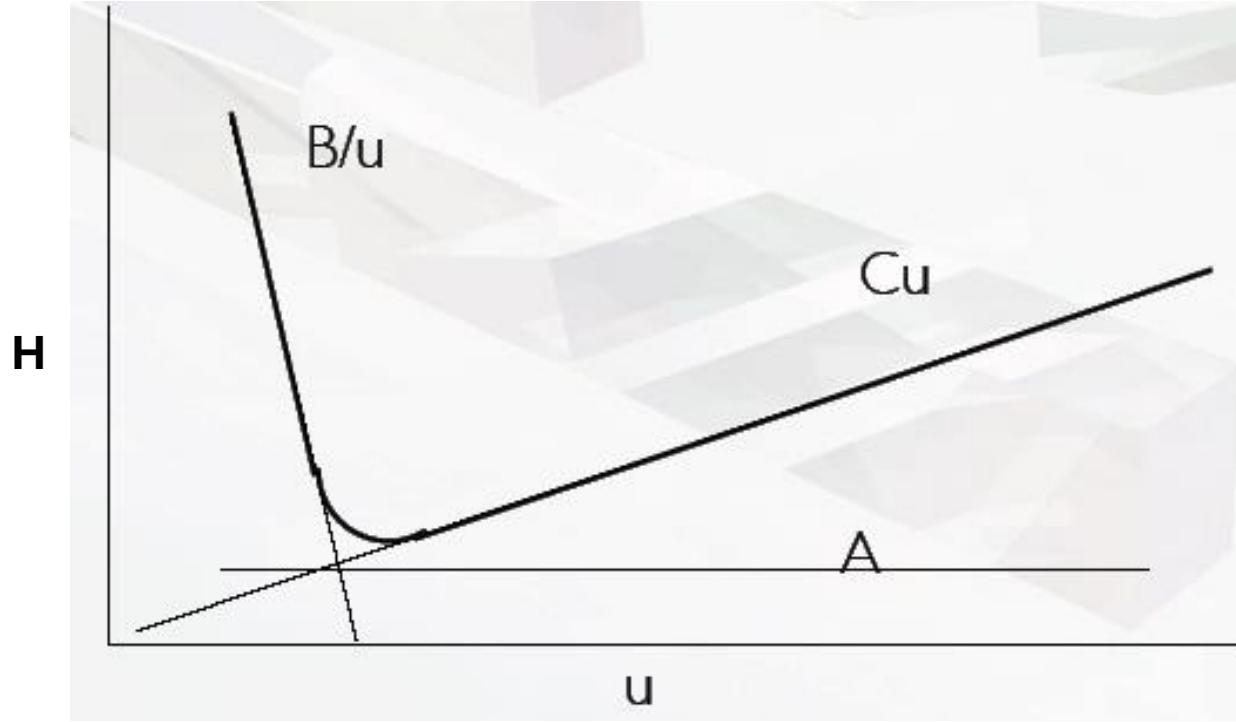
B terimi :

Mobil fazdaki difüzyon hızından kaynaklanan genişlemedir. Akış hızına duyarlı olan bu terim için, akış artırıldığında difüzyon için gerekli zaman kısalır. Bu nedenle akış hızını cihazın ve *C teriminin* izin verdiği derecede yüksek tutmak gerekir.

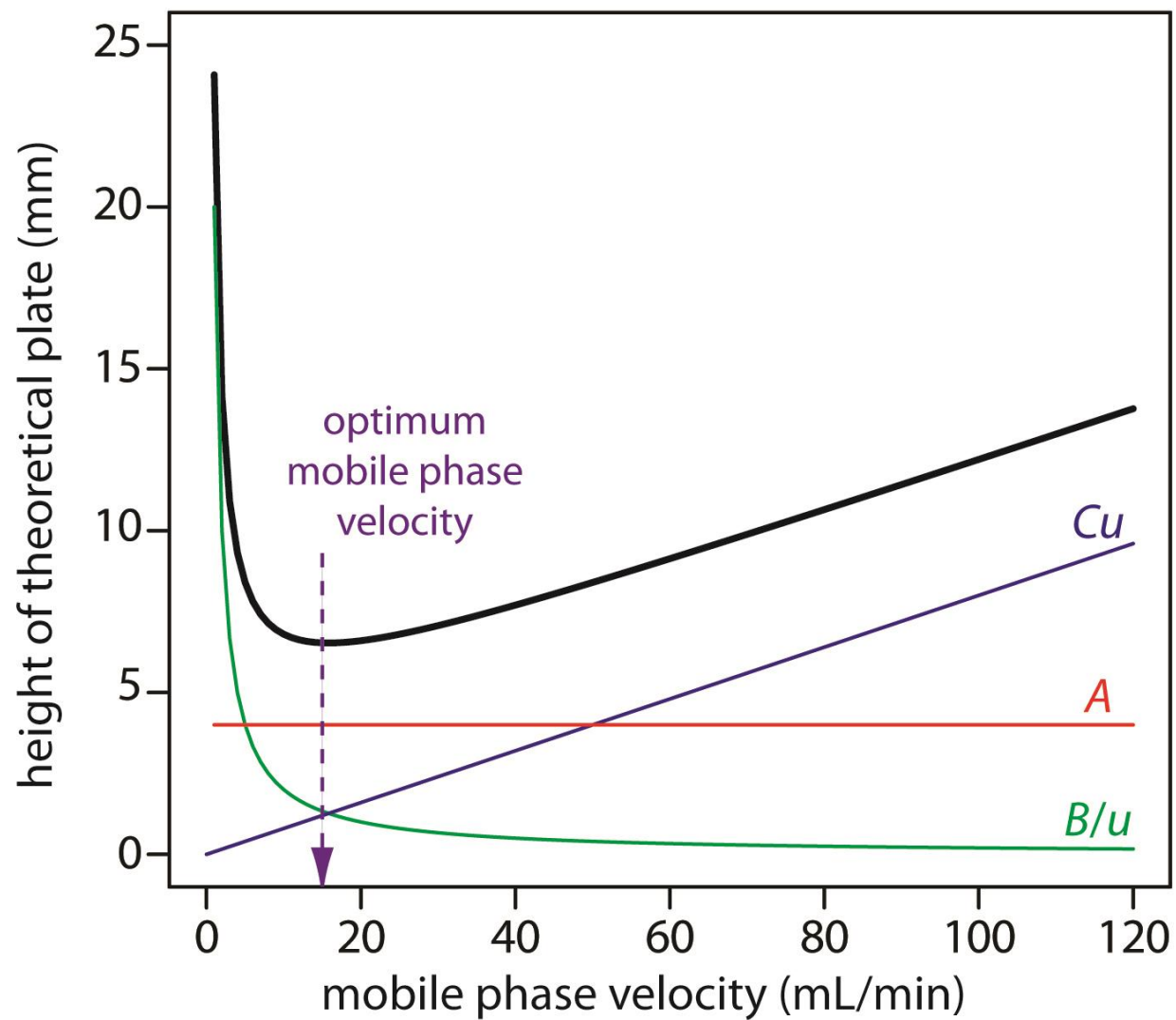
C terimi :

Kütle transferine dirençten kaynaklanır. Çözünenin, taşıyıcı ile durgun faz arasındaki dengeye ulaşması için zaman gerekir. Ayrıca, kalın ve viskoz durgun fazlar da daha geniş C terimine sebep olur. Bunu önlemek için;

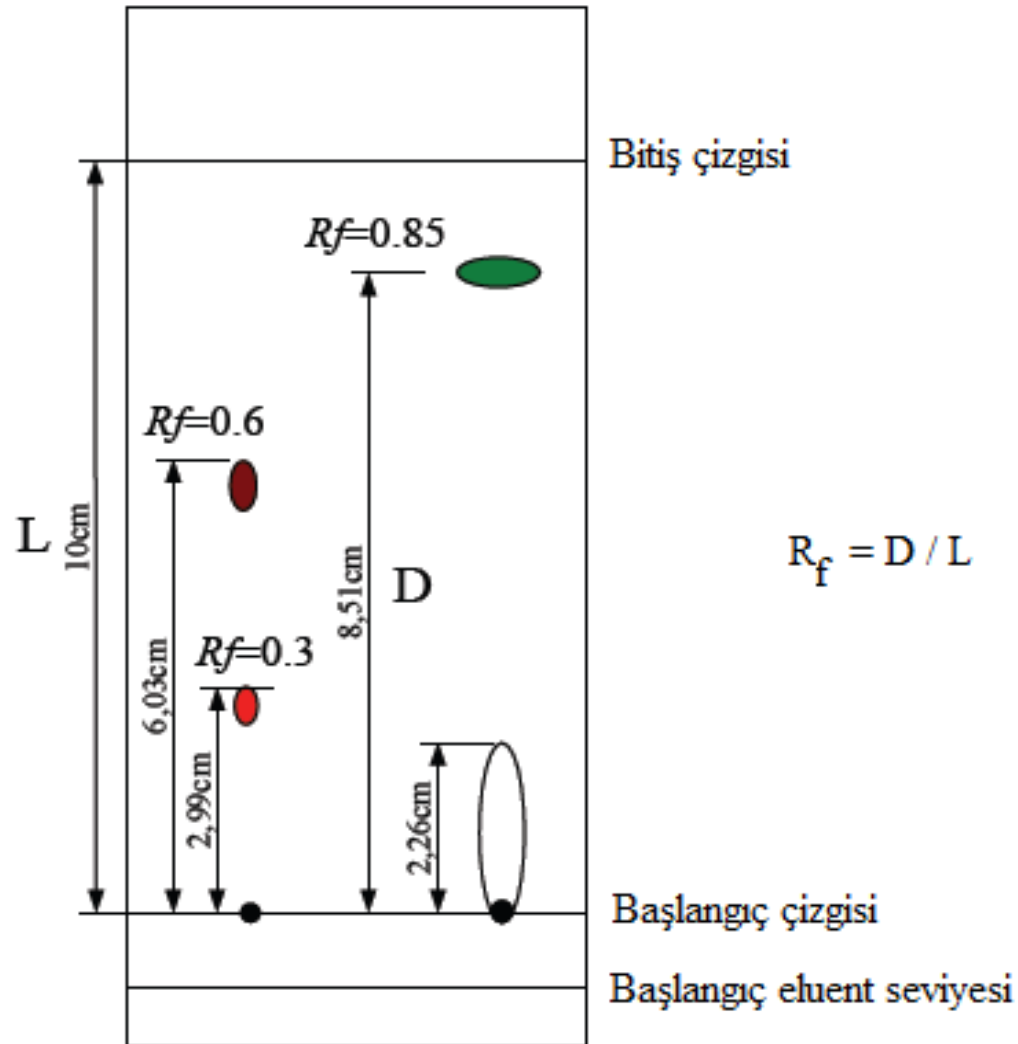
- 1) İnce bir durgun faz kullanılması,
- 2) Viskozitesi düşük fazların tercih edilmesi,
- 3) Akış hızının mümkün olduğunda düşük tutulması (B teriminin izin verdiği derecede), gerekmektedir.



Yukarıda gösterilen van Deemer plotları elde edilerek, optimum çalışma şartları belirlenir.

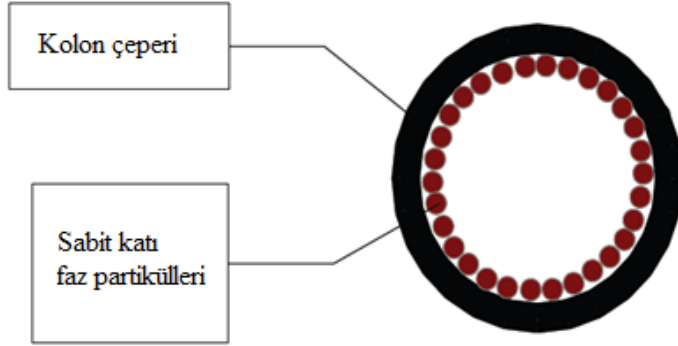


Düzlemsel kromatografi

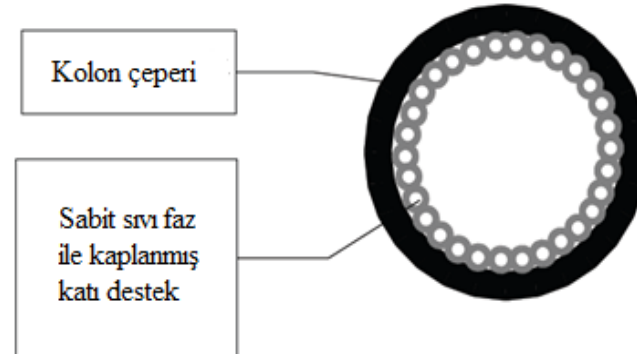
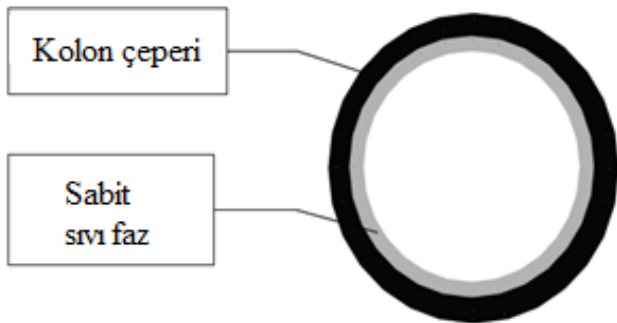


GAZ KROMATOĞRAFİSİ

Gaz-katı kromatografisi (GSC)



Gaz-sıvı kromatografisi (GLC)



Gaz-sıvı kromatografisinin temel kavramları

Alıkonma hacimleri

Gaz kromatografisinde sıcaklık ve basıncın etkilerini dikkate almak için, bazen alıkonma zamanı yerine alıkonma hacmini kullanmak daha yararlı olmaktadır.

$$V_R = t_R F$$

$$V_M = t_M F$$

F = kolon içinde gazın ortalama hacimsel hızı

$$F = F_m \times \frac{T_C}{T} \times \frac{(P - P_{H_2O})}{P}$$

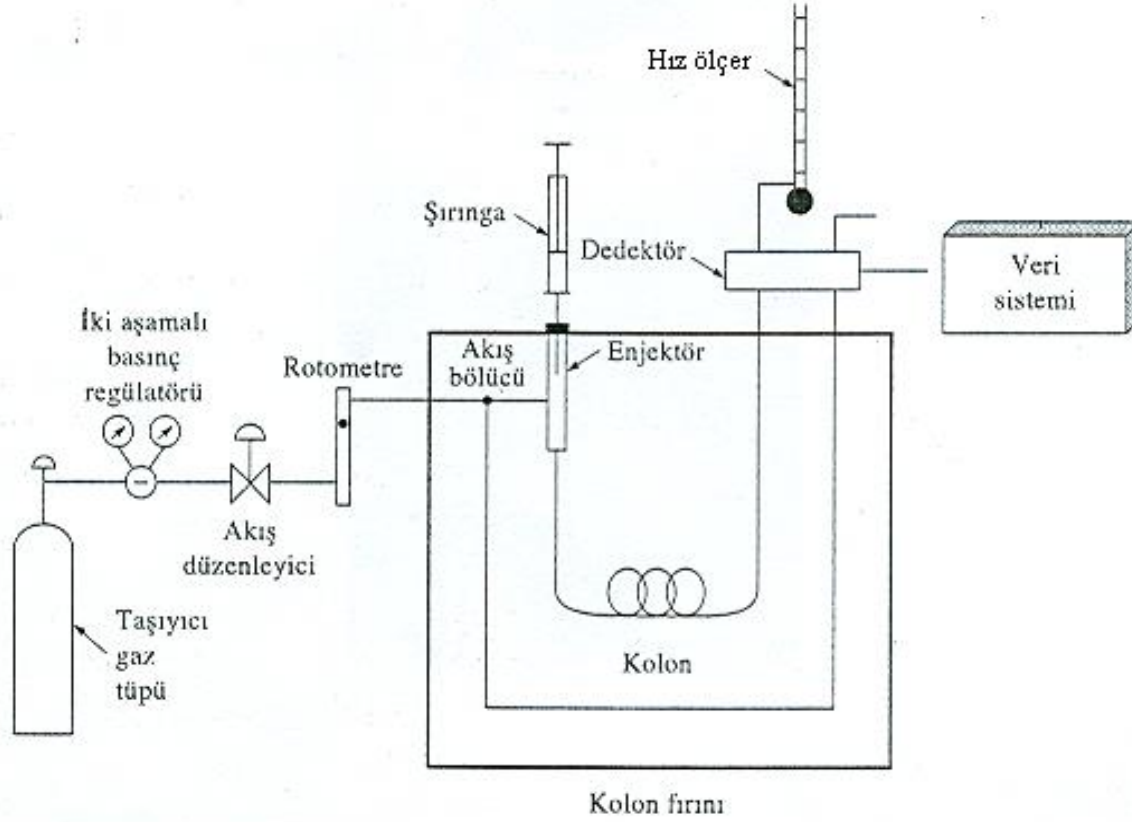
T_C = Kolon sıcaklığı (K)

T = Oda sıcaklığı

F_m = Ölçülen akış hızı

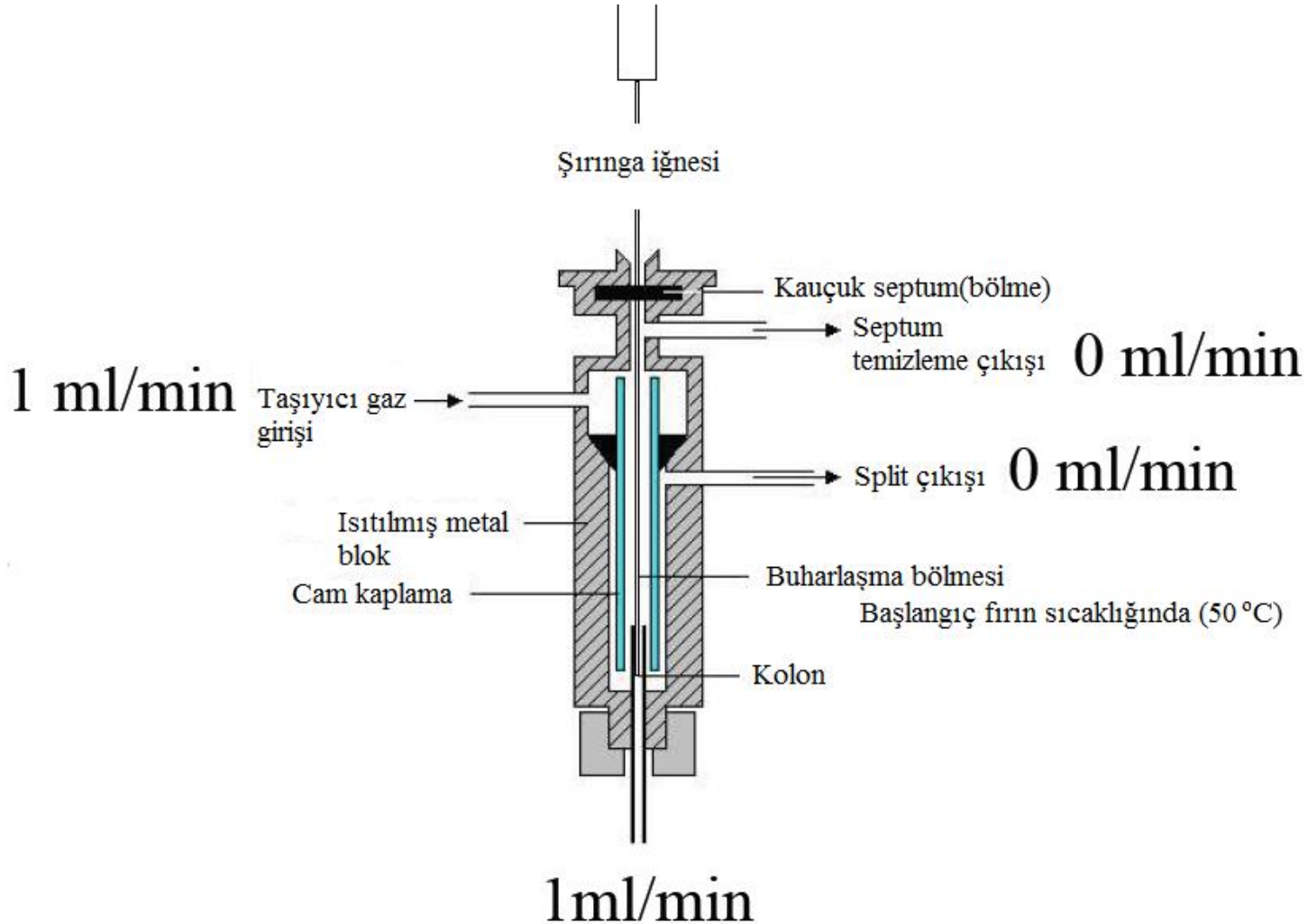
P = Kolon çıkışında gaz basıncı

GAZ KROMATOĞRAFİSİ CİHAZI



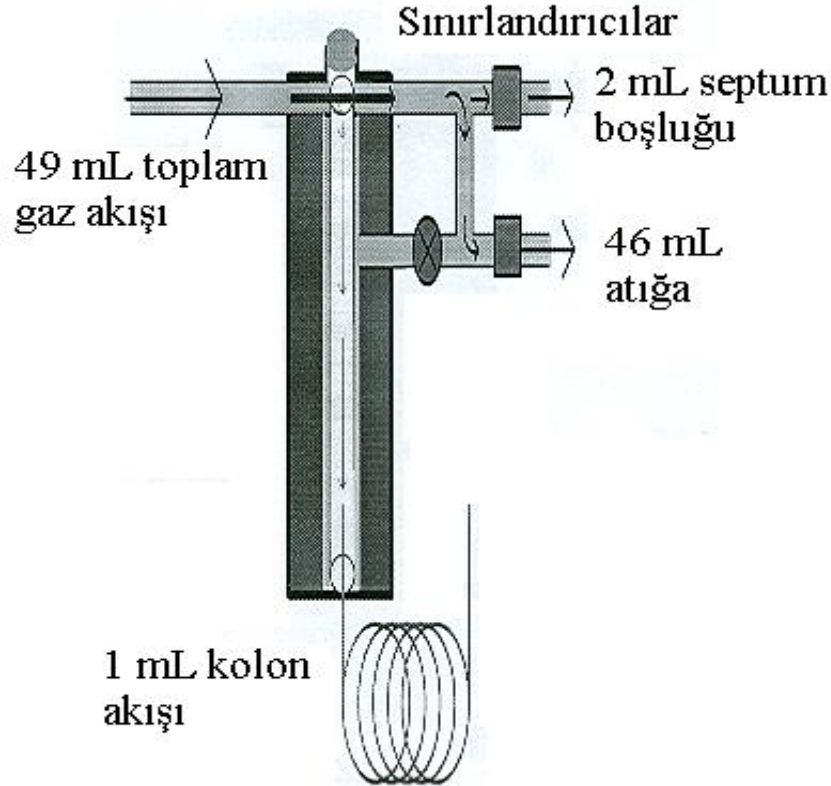
Örnek enjeksiyon sistemi

Örneğin kolona uygun miktarda ve gaz fazında tek defada verilmesi gerekir.



Enjeksiyon bölmesinin kesiti

Kapiler kolonlarla bölünmeli, dolgu kolonlarla bölünmesiz enjeksiyona olanak sağlayan **split/splitless** enjektörlerin kullanımı modern cihazlarda çok yaygındır



Split/Splitless enjektör

Kolonlar ve sabit fazlar

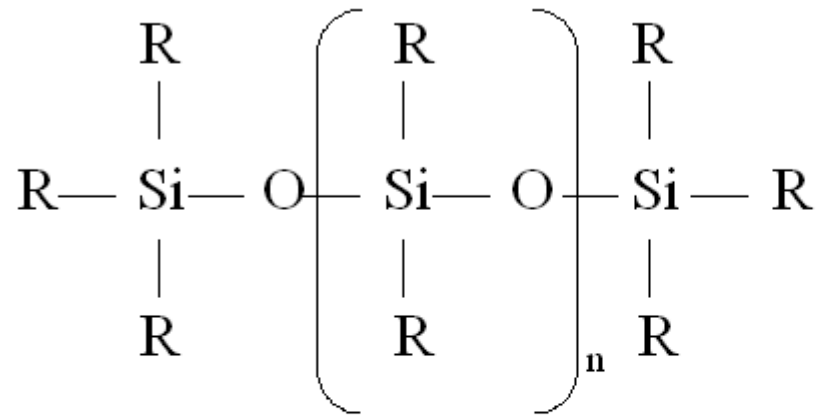
Dolgulu kolonlar :

- 1) Açık borusal (kılcal) kolonlar
- 2) Duvar kaplı açık borusal kolonlar (WCOT)
- 3) Destek kaplı açık borusal kolonlar (SCOT)
- 4) Erimiş silis açık borusal kolonlar (FSOT)

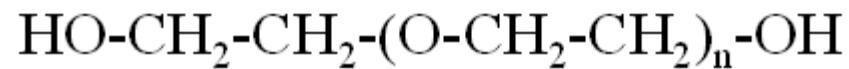
Ticari gaz kromatografik kolonların karşılaştırılması

	Kolon tipi			
	FSOT	WCOT	SCOT	Dolgulu
Uzunluk, m	10- 100	10-1000	10-1000	1-6
İç çap, mm	0,1-0,53	0,25-0,75	0,5	2-4
Verim, tabaka/m	2000-4000	1000-4000	600-1200	500-1000
Toplam tabaka sayısı	$(20-400) \times 10^3$	$(10-400) \times 10^3$	$(6-120) \times 10^3$	$(1-10) \times 10^3$
Örnek miktarı, ng	10-75	10-1000	10- 1000	$10-10^6$
Bağıl geri basınç	Düşük	Düşük	Düşük	Yüksek
Bağıl hız	Hızlı	Hızlı	Hızlı	Yavaş
Kimyasal inertlik	En iyi	→		
Esneklik	Var			
		Yok	Yok	En kötü Yok

Polidimetilsiloksan



Polietilen glikol



Gaz-Sıvı Kromatografisinde çok kullanılan sabit fazlar

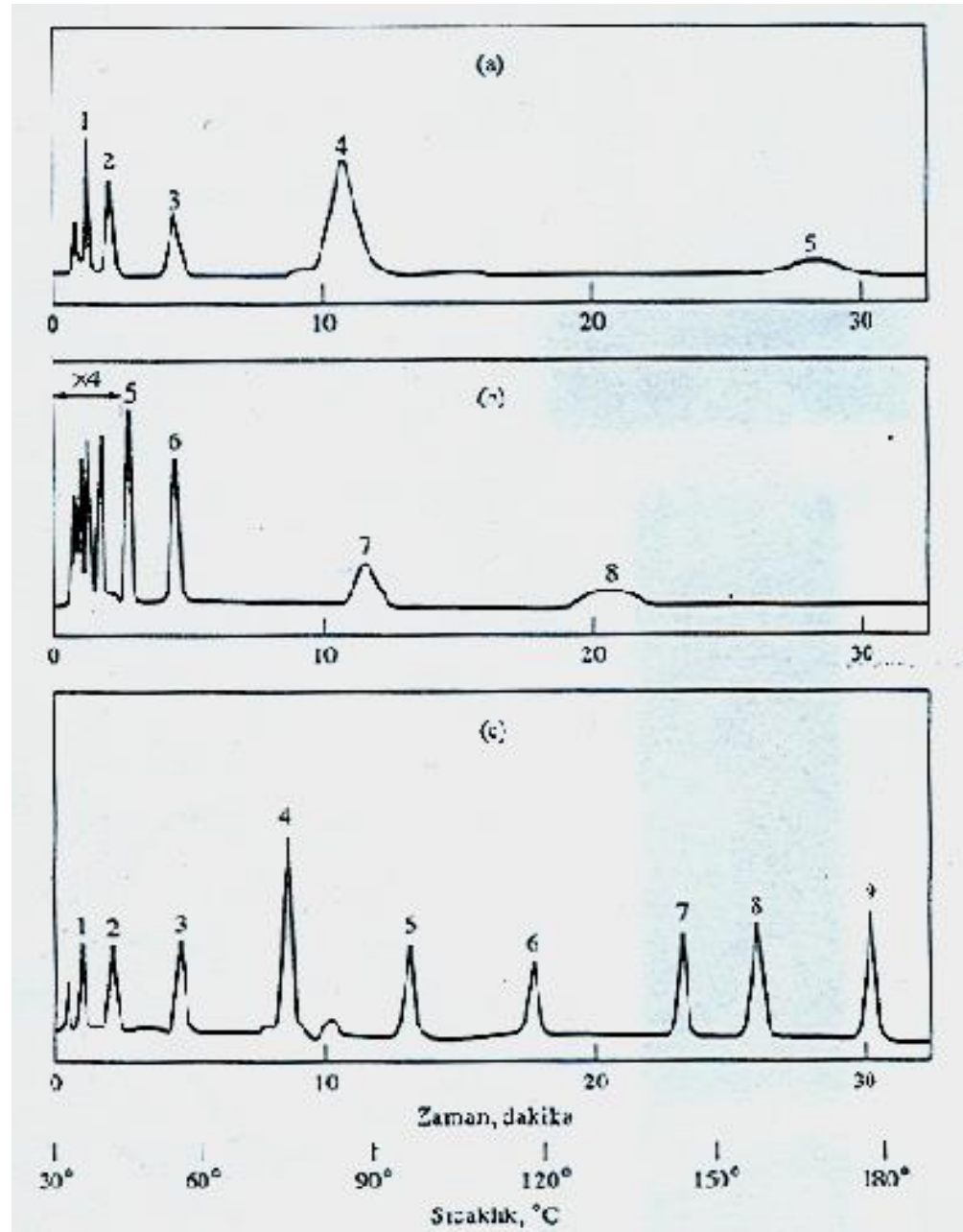
Sabit Faz	Ticari Adı	Polarite	Yaygın Uygulamalar	Maksimum Sıcaklık (°C)
%100 Dimetil polisiloksan $\left[\text{O} - \text{Si} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \right]_n$	OV-1 SE-30	Apolar	Genel amaçlı kullanım. Hidrokarbonlar, poliaromatikler, PCB'ler.	320
Difenil, dimetil polisiloksan $\left[\text{O} - \text{Si} \begin{array}{c} \text{C}_6\text{H}_5 \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} \right]_{x\%} - \left[\text{O} - \text{Si} \begin{array}{c} \text{CH}_3 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \right]_{100-x\%}$	OV-3 OV-17 SE-52	%5 Düşük %35, %65 Orta %65, %35 Orta	Genel amaçlı, yüksek sıcaklıklarda kullanıma uygun. Pestisitler	320 300 370
%14 Siyanopropilfenil-%86 dimetilsiloksan $\left[\text{O} - \text{Si} \begin{array}{c} \text{CH}_2\text{CH}_2\text{CN} \\ \\ \text{C}_6\text{H}_5 \end{array} \right]_{14\%} - \left[\text{O} - \text{Si} \begin{array}{c} \text{H}_3\text{C} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} \right]_{86\%}$		Orta	EPA 608 ve 8081 yöntemlerinde belirtilen organik klorlu pestisitlerin ayrılması. Nem ve oksijen ile bozulmaya duyarlı.	280

Gaz-Sıvı Kromatografisinde çok kullanılan sabit fazlar

%80 Bissiyanoetil-%20 Siyanopropilfenil polisiloksan	OV-275	Yüksek	Serbest asitler, çoklu doymamış yağ asitleri, alkoller. Su ve metanol gibi polar çözücülerden kaçınılmalı.	275
Arilenler		R'ye bağlı olarak polarite yukarıdaki gibi değişir.	Yüksek sıcaklık, düşük sabit faz kaybı	300-350
Karboranlar		R'ye bağlı olarak polarite yukarıdaki gibi değişir	Yüksek sıcaklık, düşük sabit faz kaybı	430
Poli(etilenglikol)(Karbovaks)	(Carbowax 20M)	Yüksek	Alkoller, Aldehitler, Ketonlar, Ksilen gibi aromatik izomerlerin ayrılması	250

Gaz kromatogramlarına sıcaklık etkisi

- (a) 45 °C'da izotermal,
- (b) 145 °C'da izotermal,
- (c) 30 °C'dan 180 °C'ye programlanmış



GC de Kullanılan Dedektörler

Bir gaz kromatografisi dedektörü kromatografik işlem uygulanan bir karışımdaki bileşenleri süratle ve hassasiyetle algılayabilen bir aygıttır. Dedektör kısa bir periyot içinde algılama gücünü gösterebilmelidir. Ayrıca dedektörün doğrusal ve muntazam algılamalar yapabilmesi ve uzun süre kararlılığını koruyabilmesi istenir. 400 oC gibi sıcaklıklarda çalışabilmeli, her tür analite benzer cevap vermeli, geniş bir doğrusal çalışma aralığına sahip olmalı ve numuneyi parçalamamalıdır. En çok kullanılan 4 tip dedektör tipleri: termal iletkenlik (TCD), alev iyonizasyon (FID), azot-fosfor (NPD), ve elektron yakalama (ECD) dedektörleridir.

- Alev iyonlaşma dedektörü (FID)
- Termal iletkenlik dedektörü (TCD)
- Elektron yakalama dedektörü (ECD)
- Atomik emisyon dedektörleri (AED)
- Kükürt Kemilüminesans dedektörü (SCD)
- Termiyonik dedektörler (TID)
- Alev fotometrik dedektör (FPD)
- Fotoiyonlaşma dedektörü (PID)
- Kütle spektrometresi (MS)*
- Fourier dönüşümlü infrared spektrometresi (FTIR)

GC Dedektörleri ve Algılama Limitleri

Dedektör Tipi	Uygulanabilir Örnekler	Algılama
Termal iltkenlik (TCD)	evrensel	500 pg/ml
Alev iyonizasyon (FID)	hidrokarbonlar	1 pg/s
Nitrojen fosfor (NPD)	N, P içeren örnekler	P: 10^{-12} , N: 10^{-11} (g/ml)
Elektron yakalama (ECD)	halojenli hidrokarbonlar	5 fg/s
Atomik emisyon (AED)	element seçici	1 pg
Fotoiyonizasyon (PID)	gaz ve buhar bileşikler	0.002-02 μ g/L
Kütle spektrometre (MSD)	ayarlanabilir örnek	0.25-100 pg

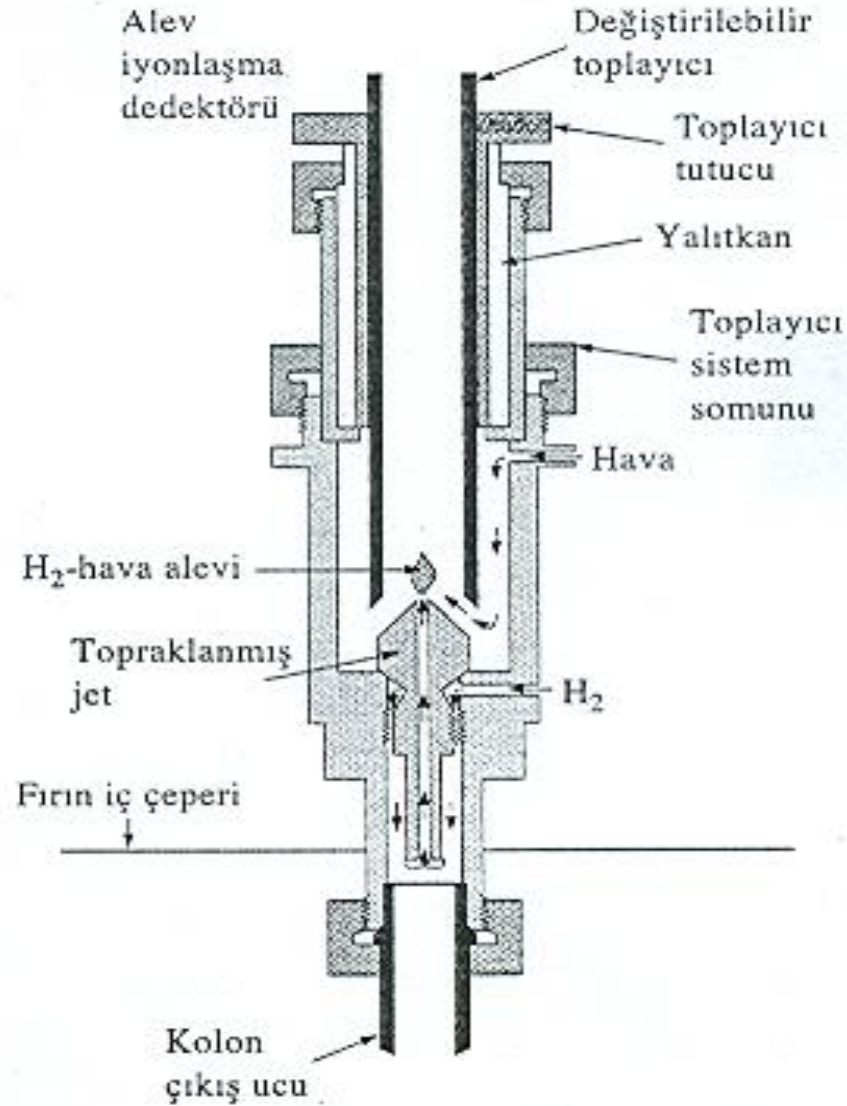
Alev iyonlaşma dedektöründe (FID) analit, hidrojen ve hava ile karıştırılıp yakılır. Bu esnada karbonlu bileşikler alevde iyonlaşarak, elektrik potansiyeli varlığında 10^{-12} A gibi bir akım akım geçmesine sebep olurlar. Sinyal büyüklüğü, karbon sayısıyla doğru oranlıdır. Kütle duyarlı bir dedektör olan FID, karbonil, alkol, halojen ve amin gibi gruplar hemen hemen hiç iyon vermediklerinden bunlara karşı duyarlı değildir. Ayrıca, CO_2 , NO_2 ve SO_2 gibi yanmayan gazlara da duyarlık göstermez.

Termal İletkenlik Dedektörü, (TCD) GC de ilk olarak kullanılan dedektördür. Dedektöre ulaşan gazın, analit tarafından iletkenliğinin değişmesine dayanan bu yöntemde, Pt veya W gibi bir tel ısıtılarak, etrafından geçen gaz nedeniyle iletkenliğinde meydana gelen değişim ölçülür. He ve H₂ gazları, ısı iletkenlikleri yüksek olduğundan, duyarlılık açısından tercih edilir. Pek çok organik ve inorganik türler için uygundur. Numuneyi, FID den farklı olarak parçalamaz. Kılcal kolonlar, bu dedektör ile kullanılmaması dezavantajıdır.

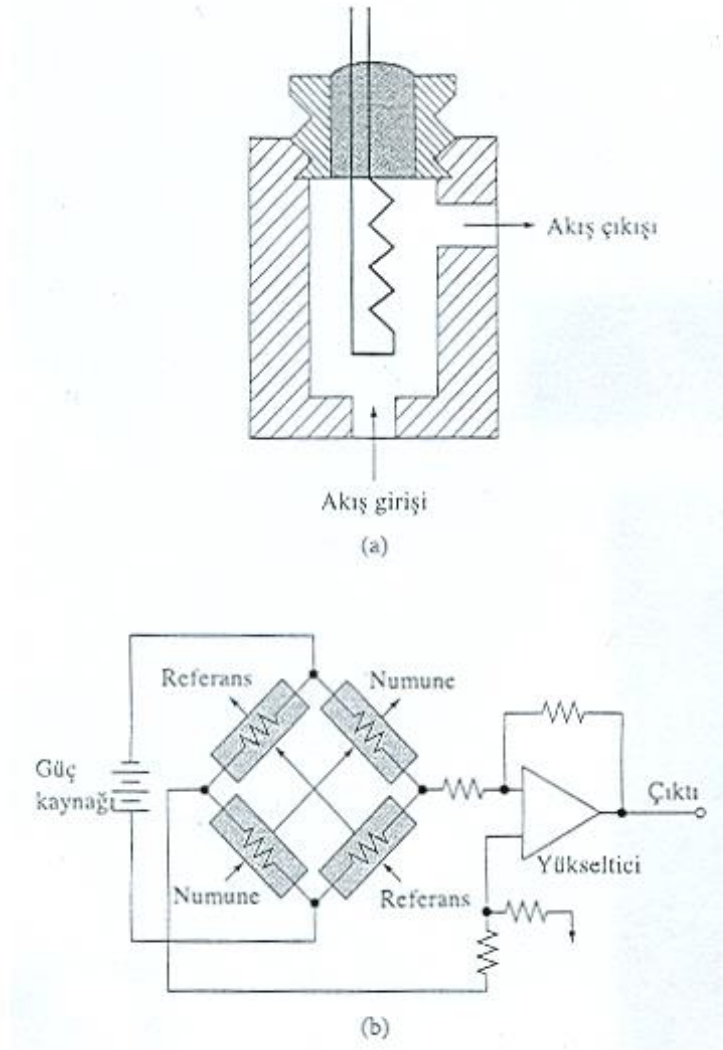
Elektron Yakalama Dedektörü (ECD) Halojen içeren maddeler için seçimli tayin imkanı sunar. Özellikle pestisiler için yaygın kullanılır. Azot gazı taşıyıcısında gerçekleşen ve iki elektrot arasına uygulanan potansiyel ile üretilen akım, organik madde varlığında düşer. Özellikle elektronegatif fonksiyonel gruplara karşı duyarlı bir dedektör sistemidir.

Kükürt Kemilüminesans Dedektörü (SCD) Son zamanlarda geliştirilen bu dedektörün temelinde, bazı kükürtlü bileşiklerin ozonla verdikleri tepkime yatar. Tepkime ile üretilen ışın şiddeti, kükürt miktarıyla oranlıdır. Takip eden bir FID dedektör kullanılarak, SCD den çıkan gazlar doğrudan yeniden analizlenebilir. Merkaptanlar gibi kükürtlü bileşikler için duyarlıdır.

Alev iyonlaşma dedektörü (FID)

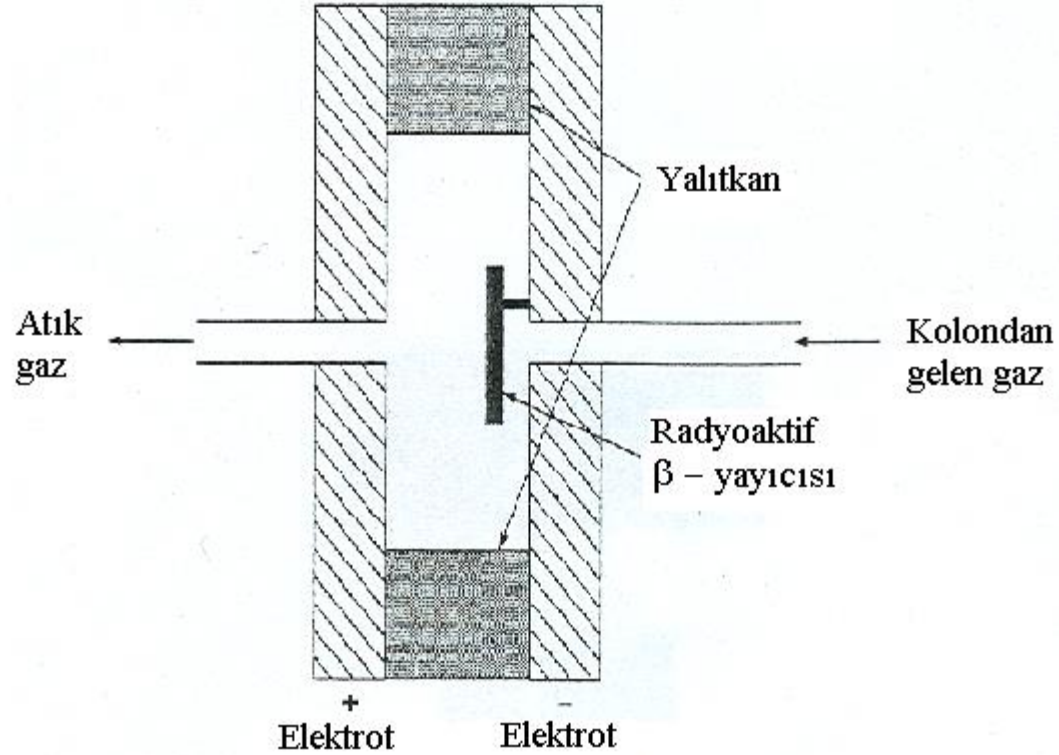


Termal iletkenlik dedektörü (TCD)

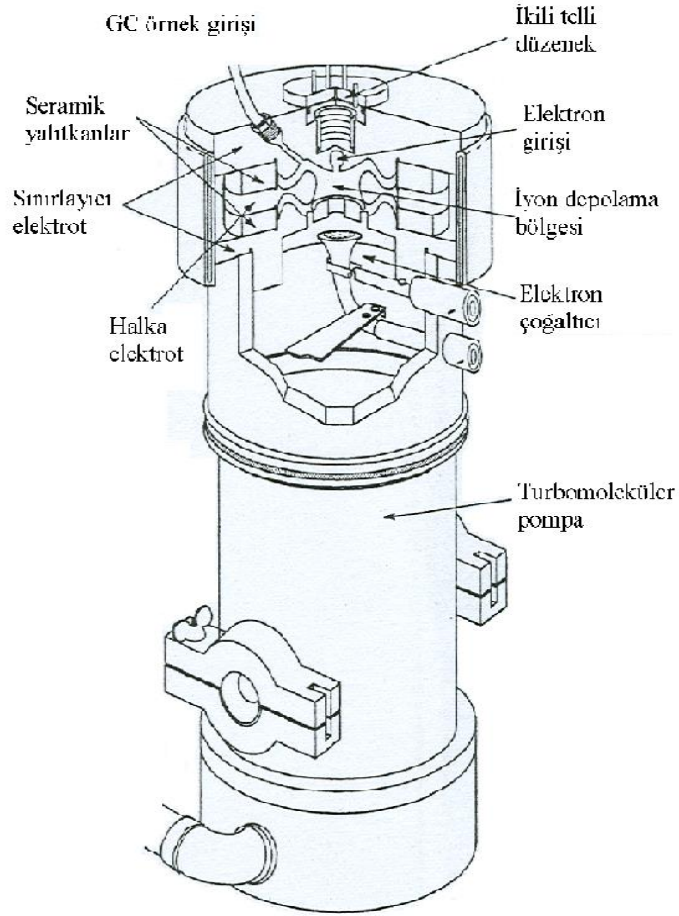


Termal iletkenlik dedektörünün (a) dedektör hücresi, (b) çift kanallı hücre düzeneği

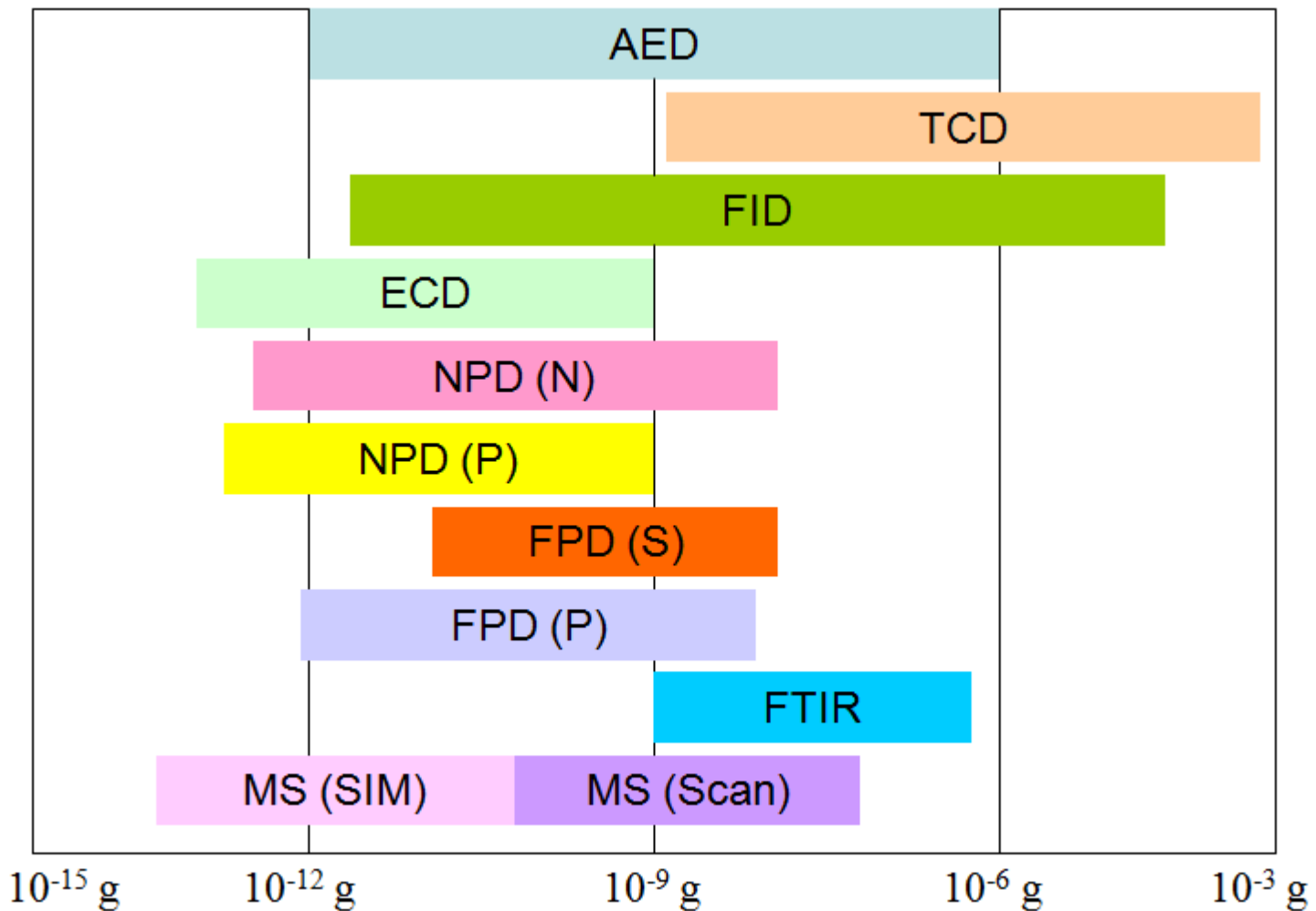
Elektron yakalama dedektörü (ECD)



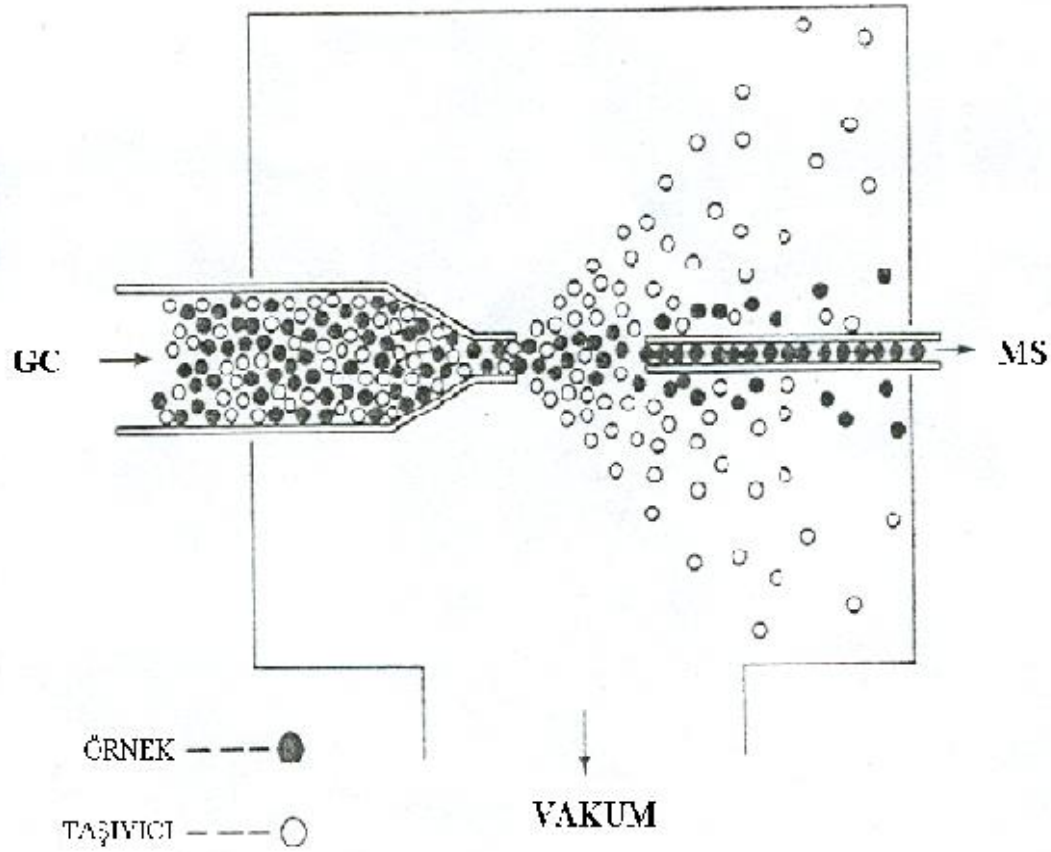
İyon yakalama dedektörü



GC dedektörlerinin duyarlılık ve doğrusallık aralıklarının karşılaştırılması



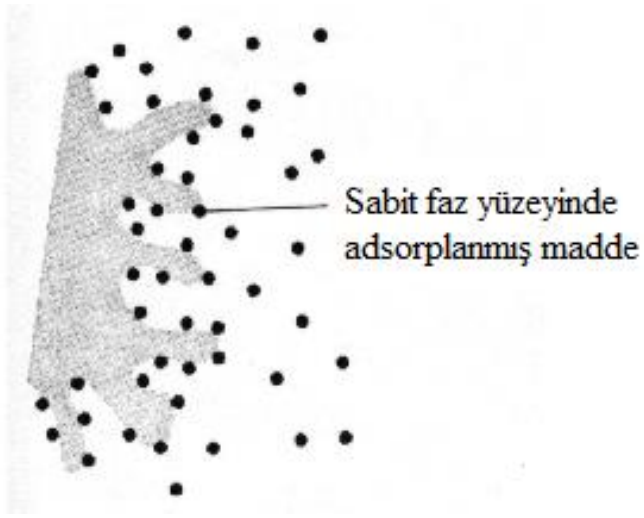
GC/MS



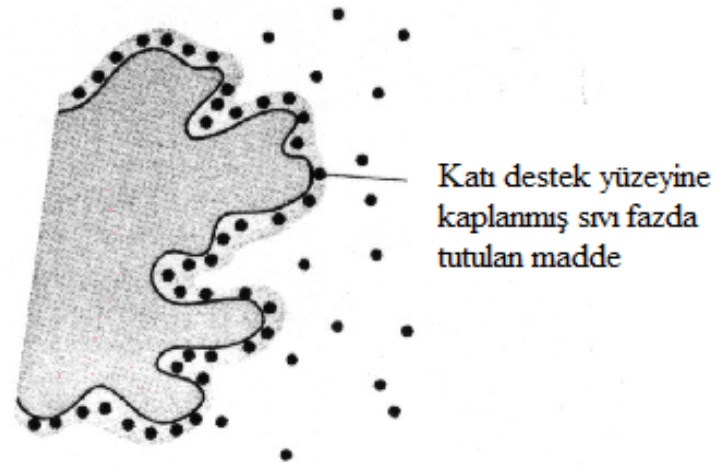
Spray ayırıcı

SIVI KROMATOĞRAFİSİ (LC)

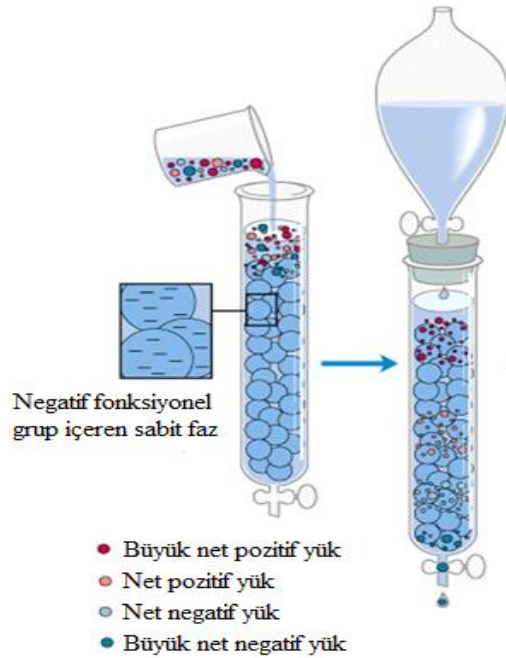
- (1) Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)
- (2) Adsorpsiyon veya sıvı-katı kromatografisi
- (3) Dağılım kromatografisi
- (4) İyon kromatografisi
- (5) Boyut eleme veya jel kromatografisi
- (6) Affinite kromatografisi



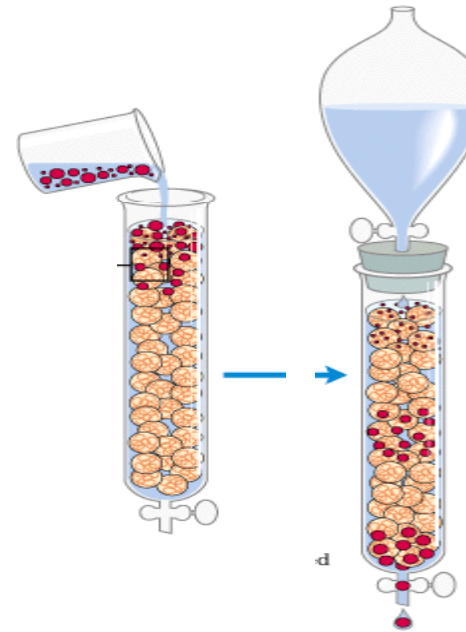
Adsorpsiyon kromatografisi



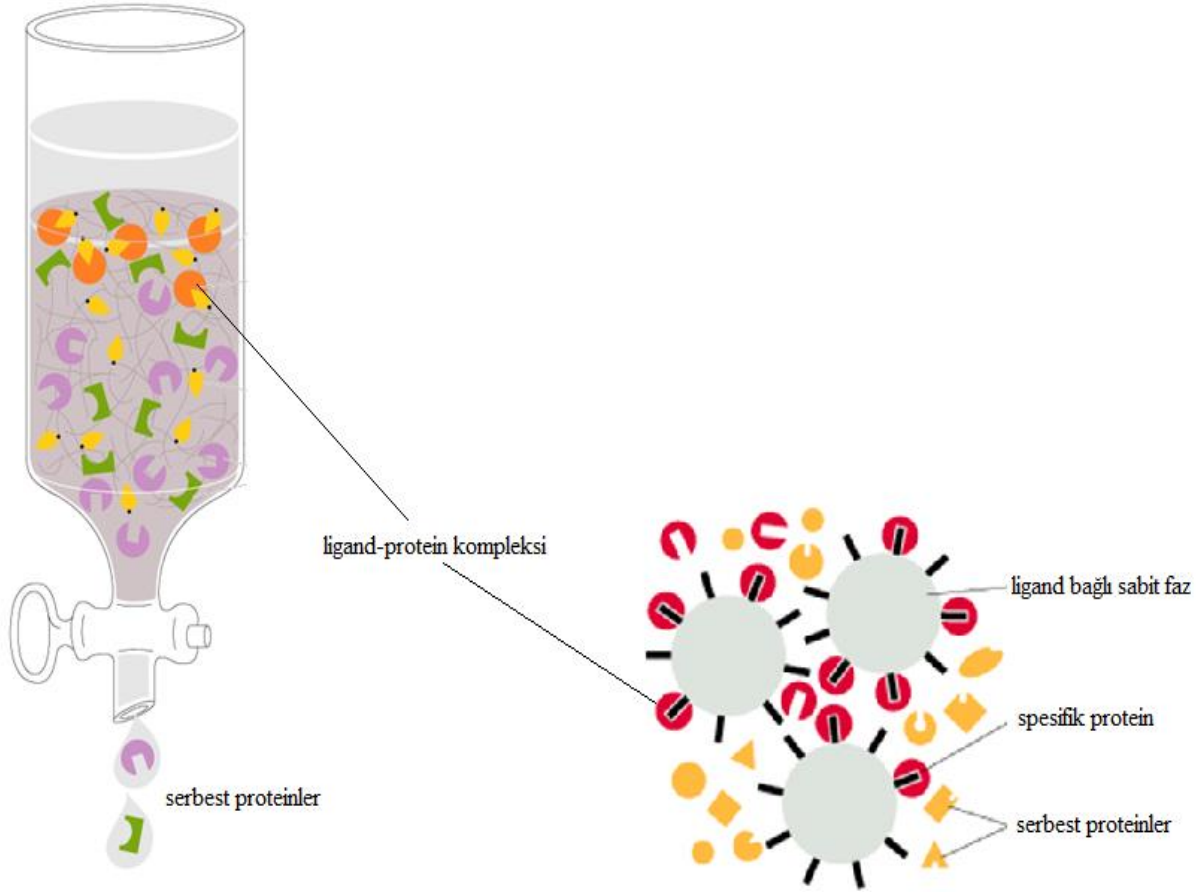
Dağılım kromatografisi



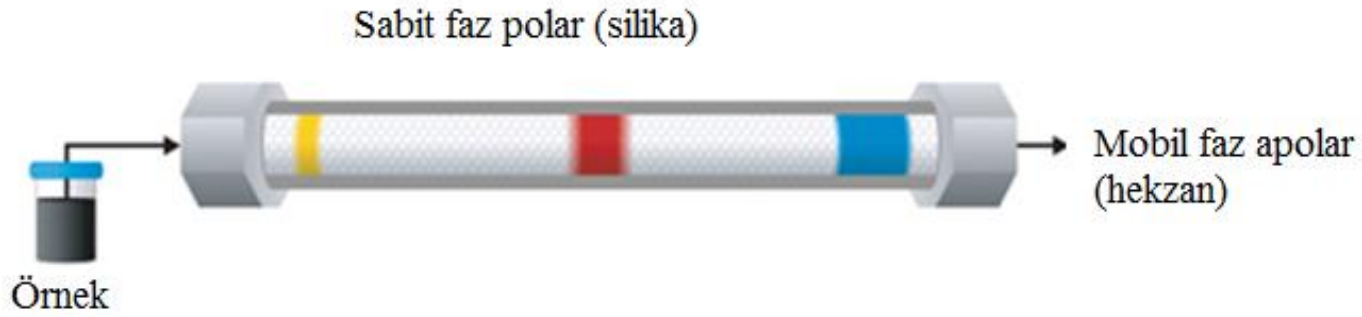
İyon kromatografisi



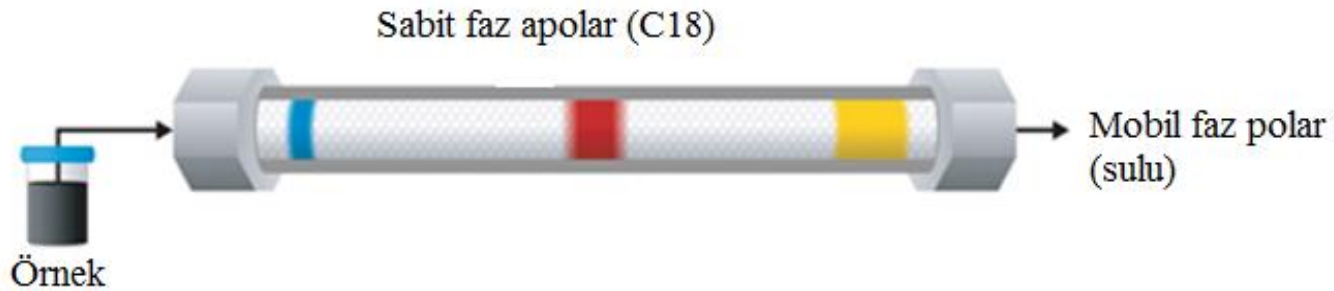
Jel filtrasyon kromatografisi



Affinite kromatografisi

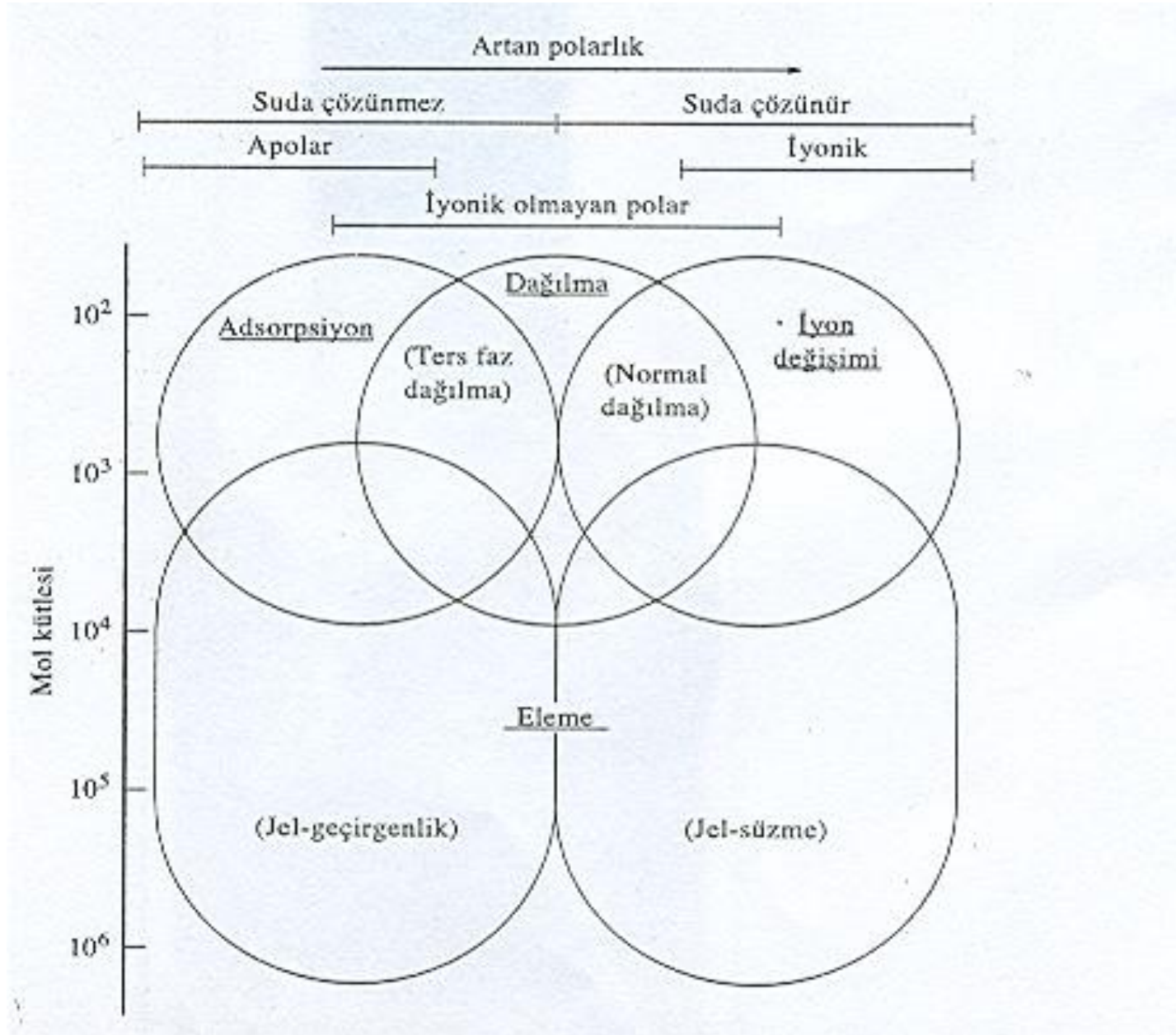


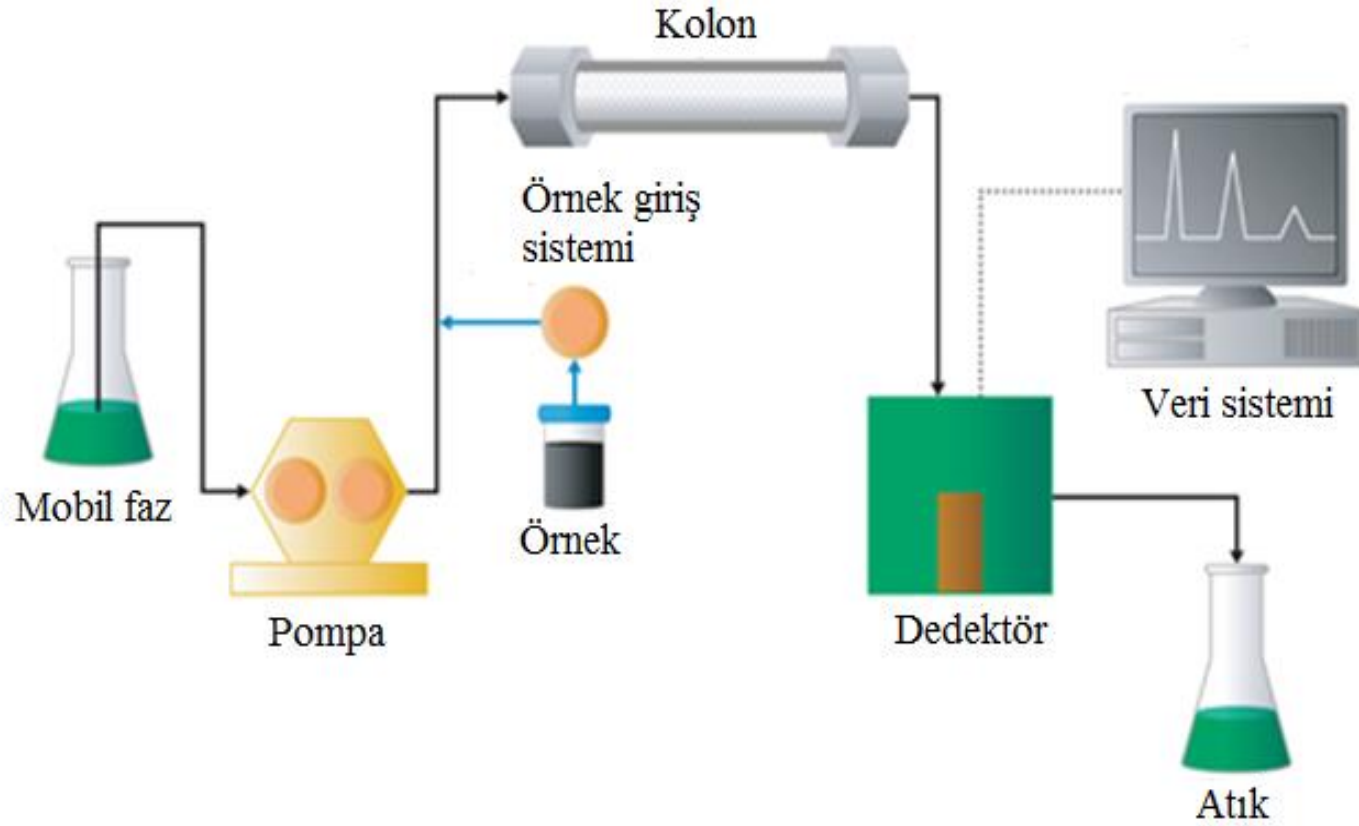
Normal faz kromatografisi



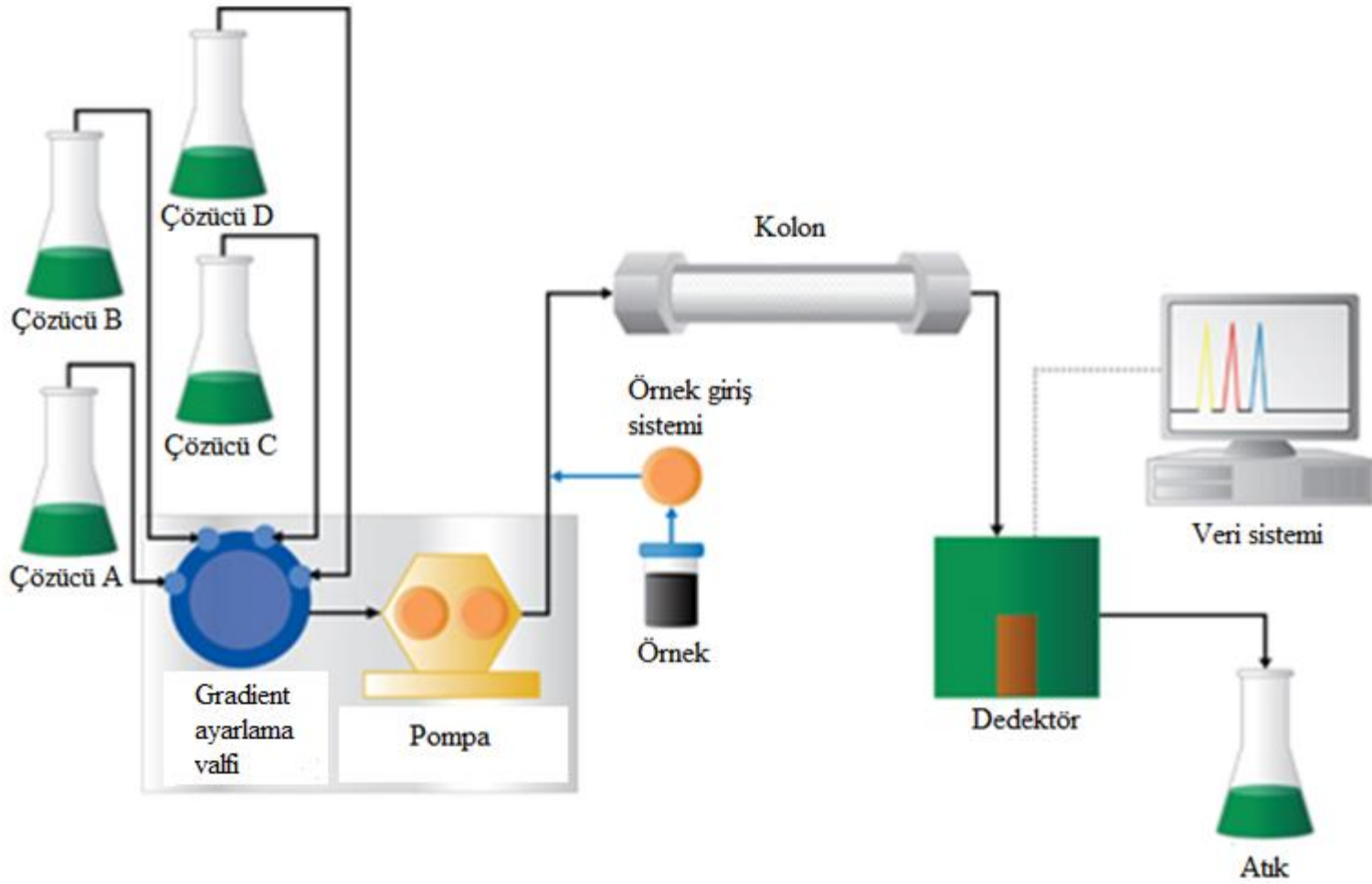
Ters faz kromatografisi

Sıvı kromatografisinin uygulamaları



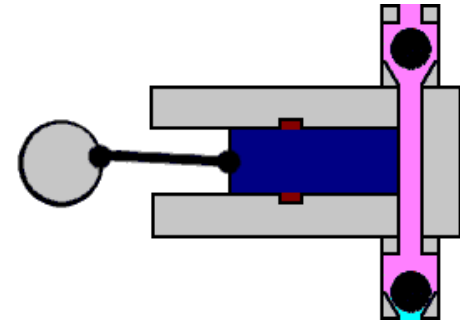
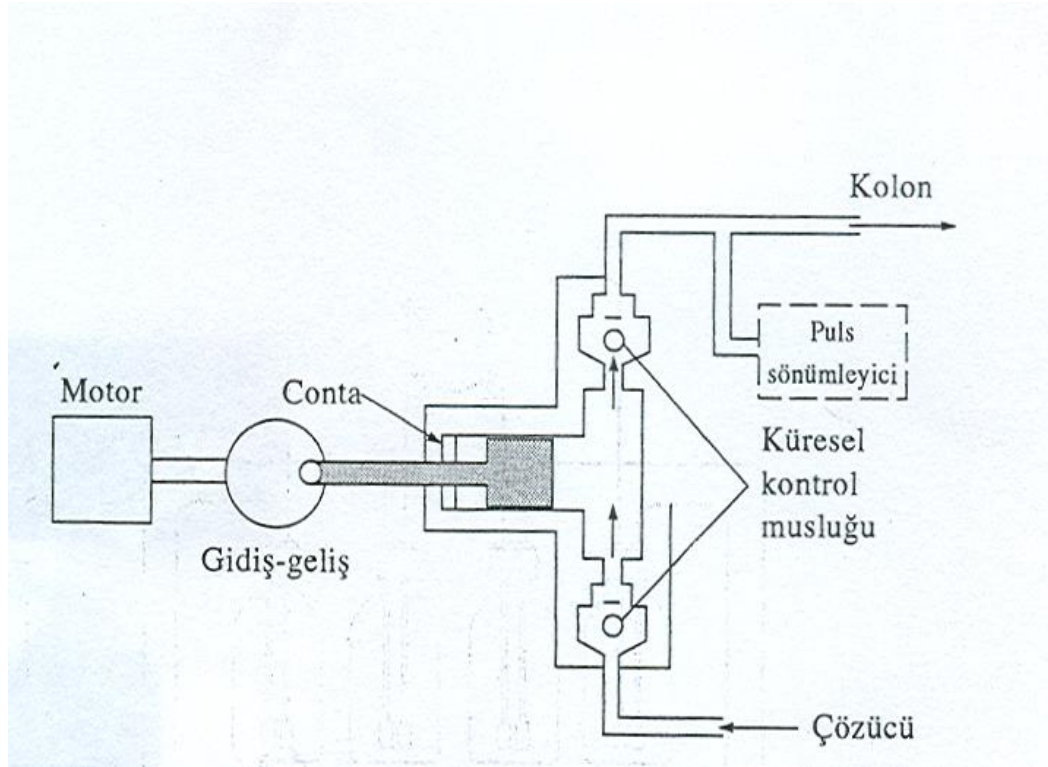


HPLC sistemi



Gradient HPLC sistemi

Pompalar



Pistonlu pompa

Pompa Özellikleri

Akış hızı

Standart analitik kolonlar için 0.1-10 mL/dakika

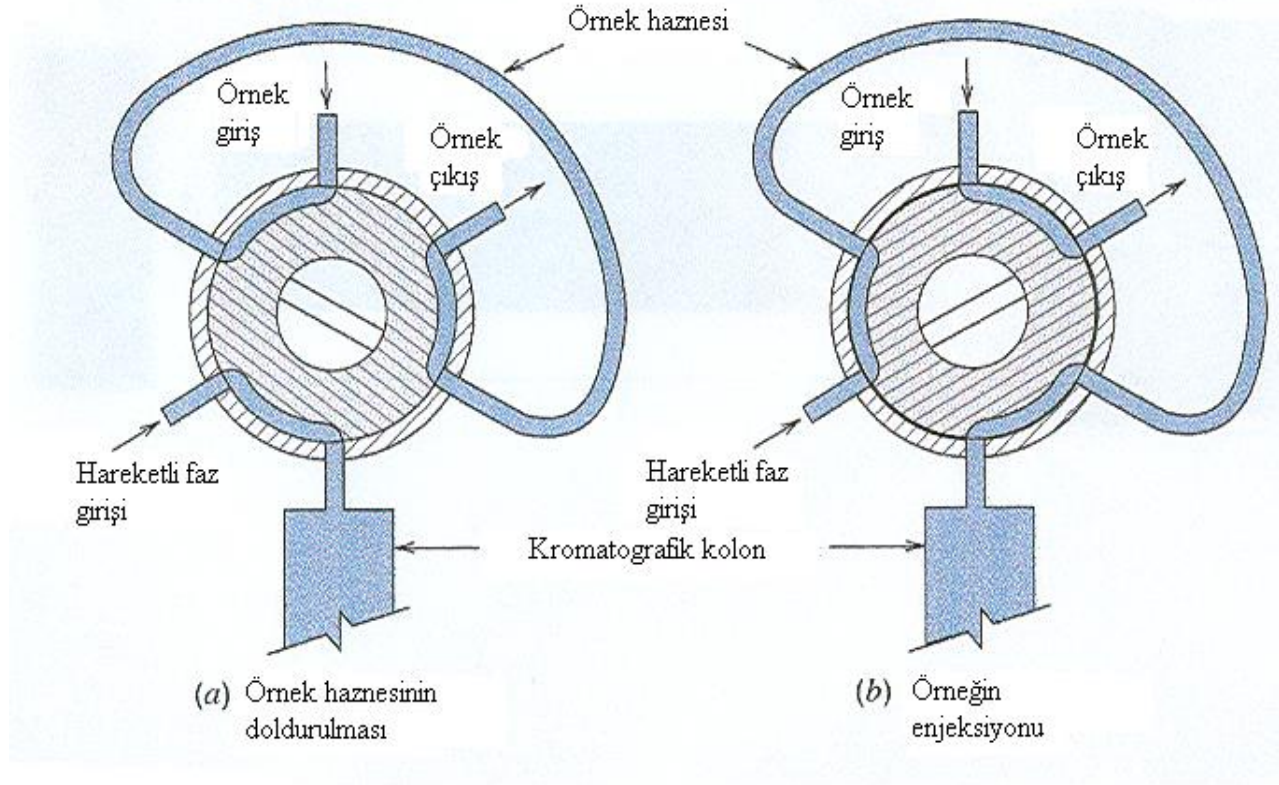
Mikrobor kolonlar için 0.01-0.2 mL/dakika

Preparatif çalışmalar için kullanılan kolonlarda 50 mL/dakika

5000 psi'a kadar basınç altında, istenen akış hızını sağlayacak kapasiteye sahip olmalıdır.

Tuz, tampon ve düşük kaynama noktalı çözücüler içeren hareketli faz bileşenlerine uyumlu olmalıdır.

Enjeksiyon Üniteleri



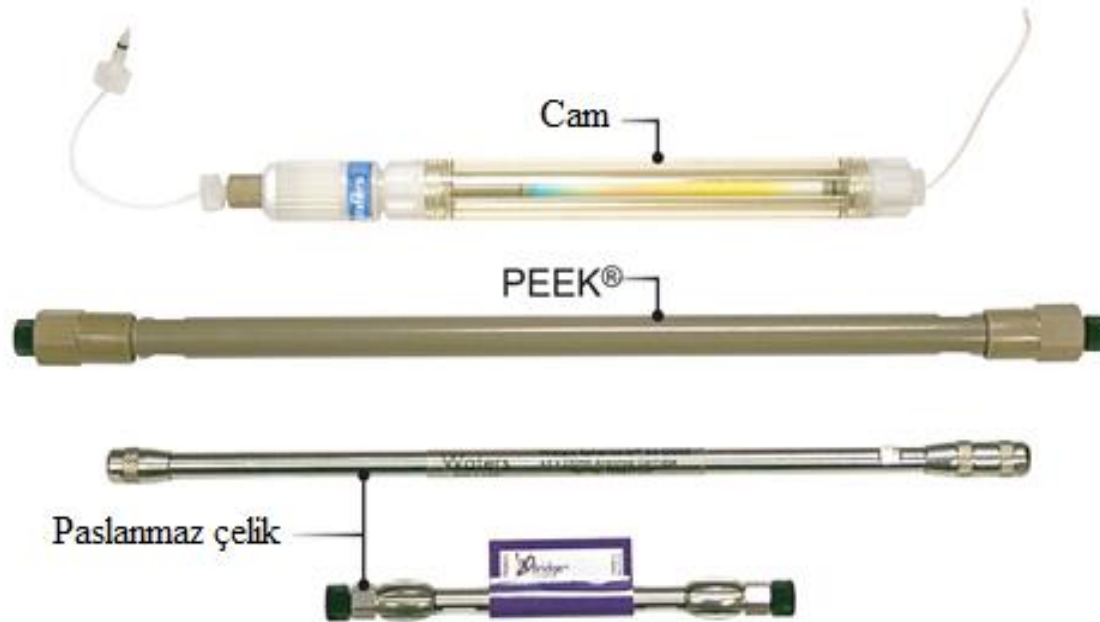
Enjeksiyon valfi

Kolonlar

Mikrobor analitik kolonlar,

Standart analitik kolonlar

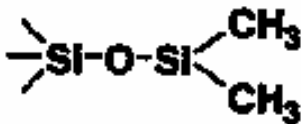
Preparatif kolonlar



Ters faz dolgu maddeleri

Oktadesil - 

Oktil - 

Dimetil - 

Normal faz dolgu maddeleri

Siyanopropil - 

Aminopropil - 

Dedektörler

Absorbans Dedektörleri

Filtreli

Monokromatörlü

Diyot serili

IR

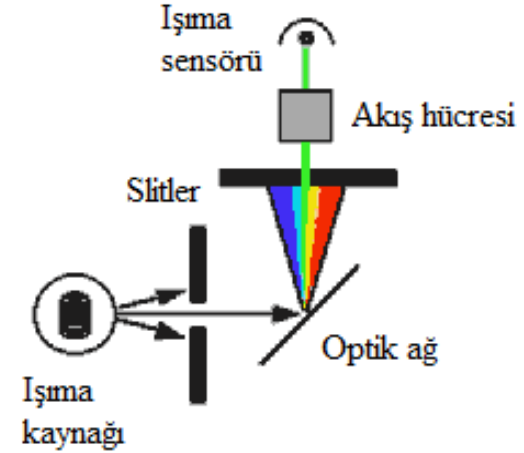
Floresans Dedektörü

Kırma İndisi Dedektörü

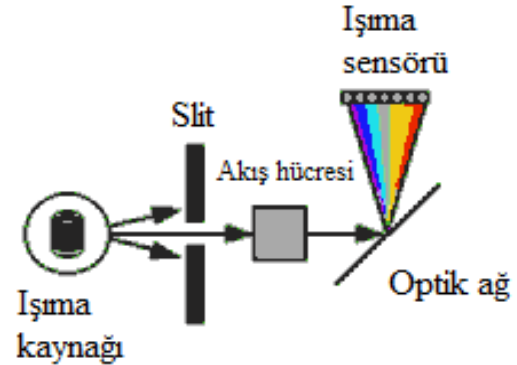
Elektrokimyasal Dedektörler

Kütle Dedektörü

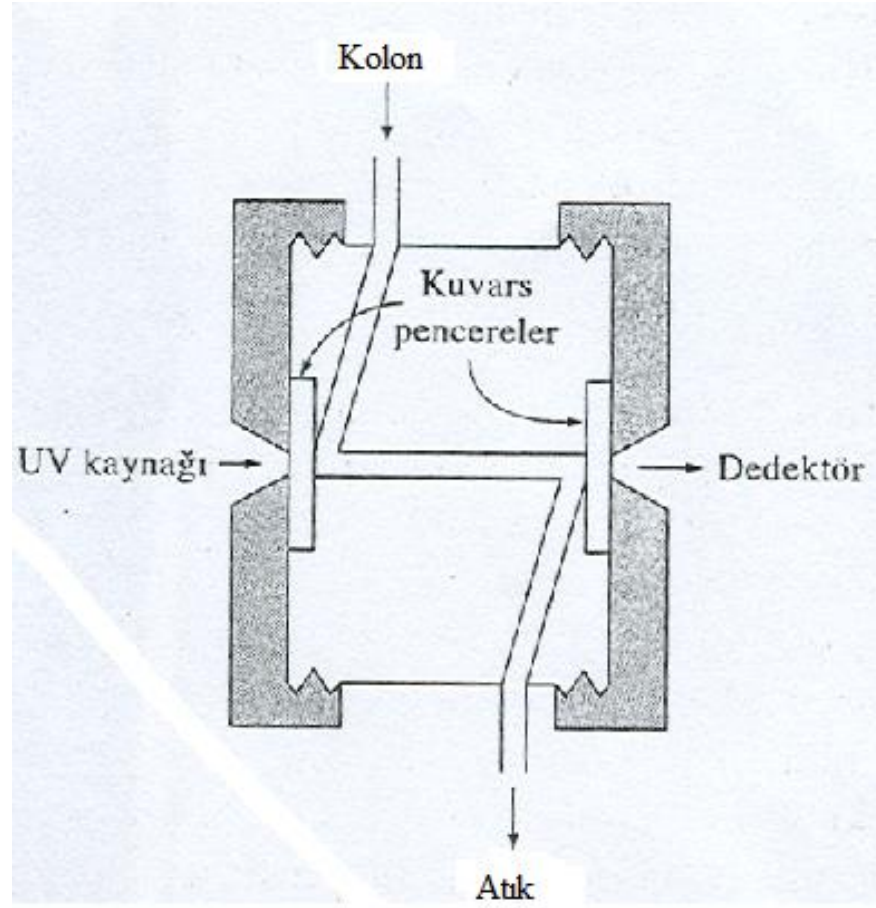
Elektrik iletkenlik Dedektörü



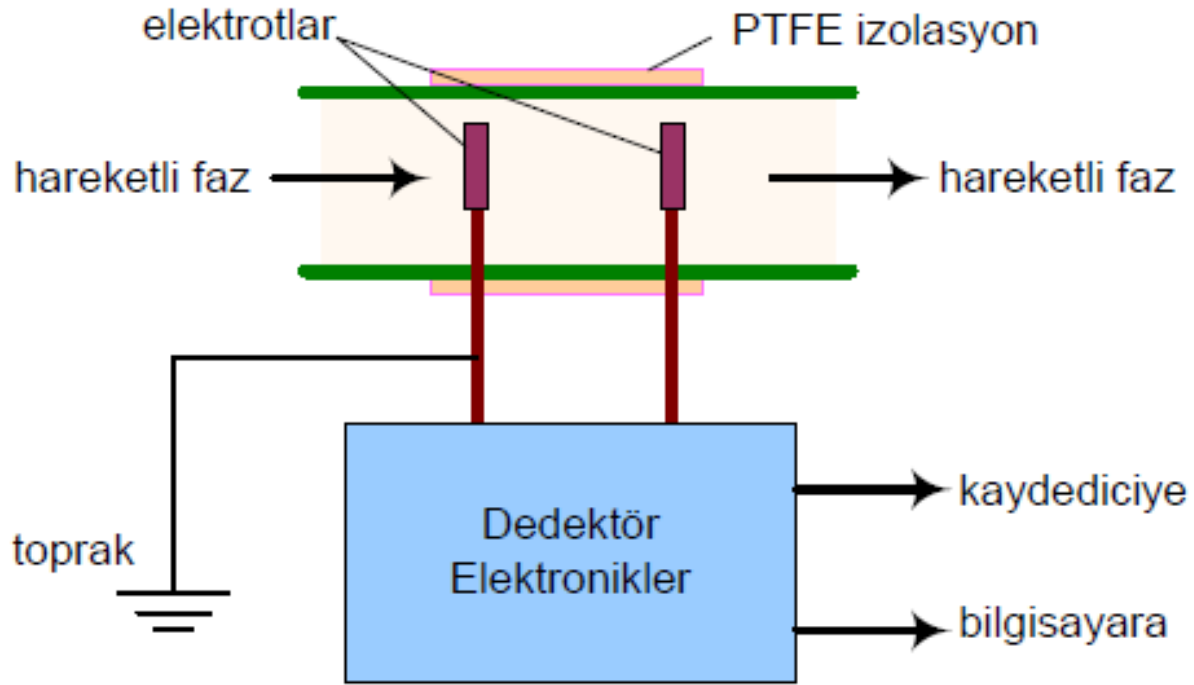
Monokromatörlü dedektör



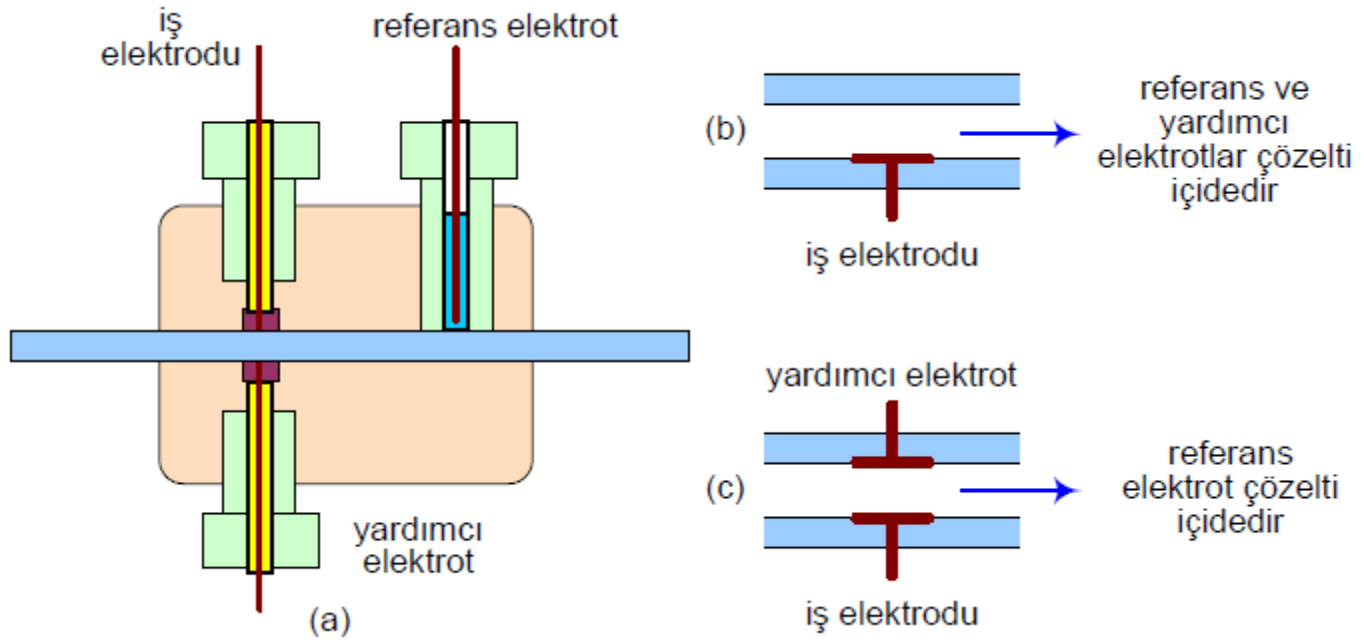
Diyot serili dedektör



Absorbans dedektörü hücresi



Elektrik iletkenlik Dedektörü



(a) Bir elektrokimyasal dedektör, (b), (c) farklı elektrod konfigürasyonları

Elektrokimyasal Dedektör

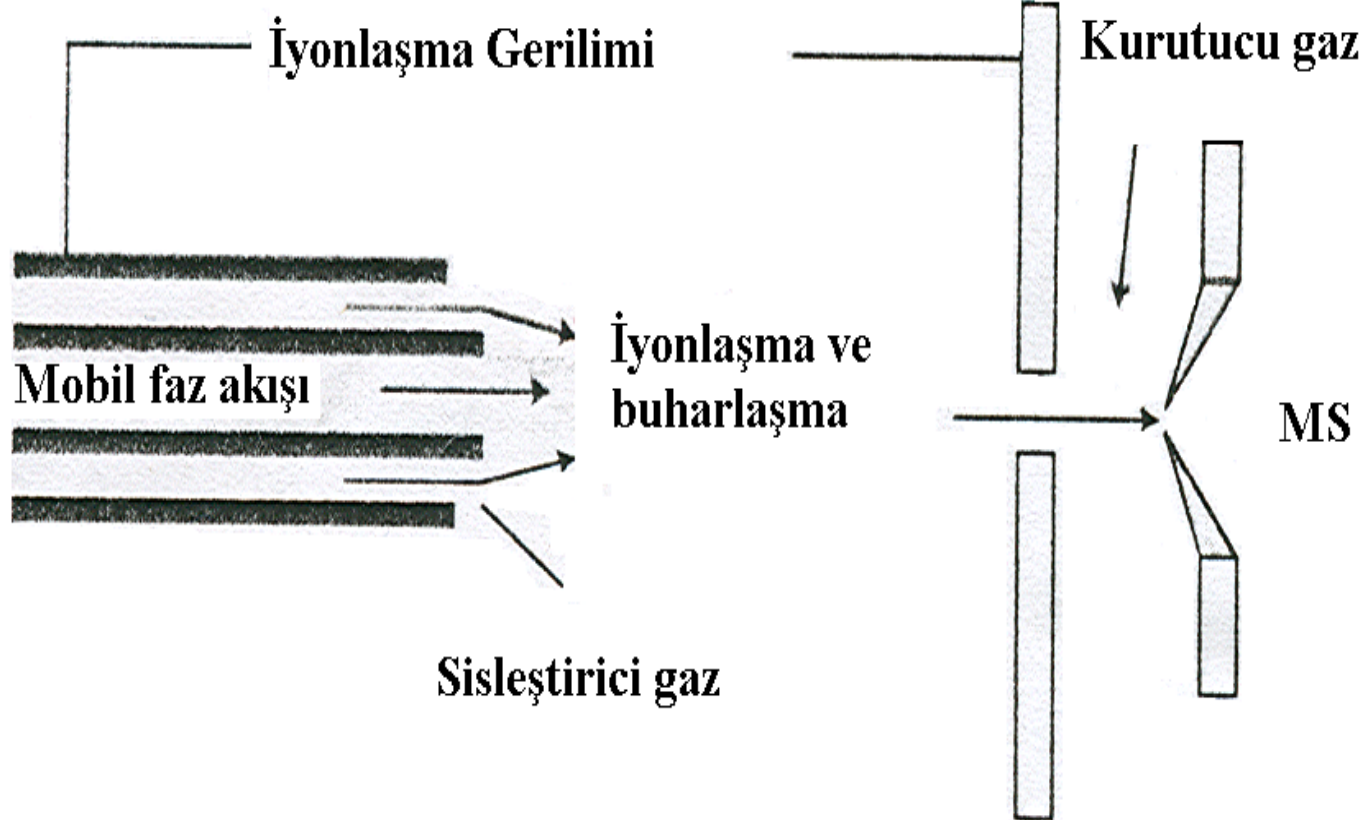
LC Dedektörlerin Performans Karşılaştırması

LC Dedektör	Kütle LOD, aralık	Min Kütle LOD
Absorbans	100 pg – 1 ng	10 pg
Floresans	1 – 10 pg	10 fg
Elektrokimyasal	10 pg – 1 ng	100 fg
Kırma indisi	100 ng – 1 µg	10 ng
İletkenlik	500 pg – 1 ng	500 pg
Kütle Spektroskopisi	100 pg – 1 ng	1 pg
FT-IR	1 µg	100 ng
Işık saçma	10 µg	500 ng
Optikçe aktiflik	-	1 ng
Element seçici	-	10 ng
Fotoiyonlaşma	-	1 pg – 1 ng

LC (HPLC) de kullanılan dedektörlerin kullanım alanları ve özellikleri

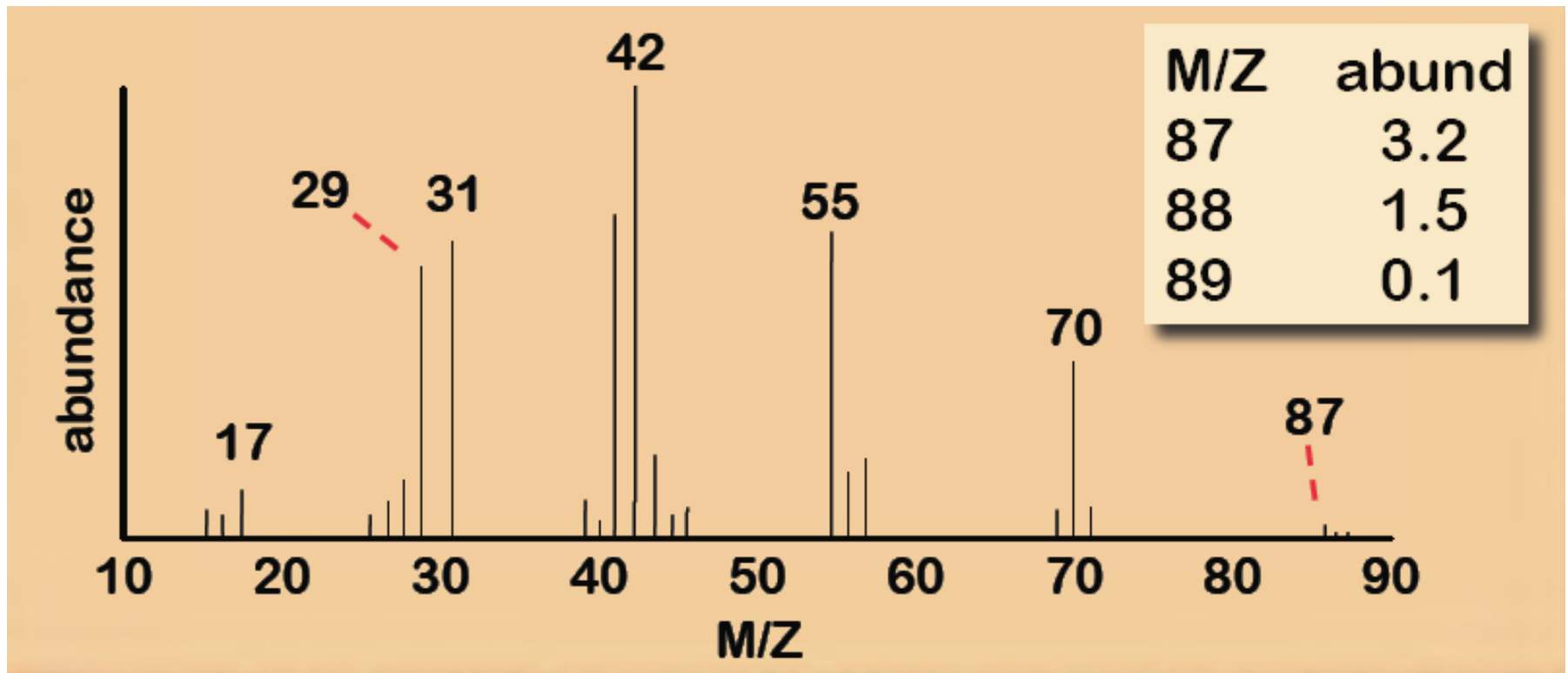
Dedektör	Analitler	Çözücü gereksinimleri	Yorumlar
UV -görünür bölge	Kromoforlardan herhangi biri	UV saflığında, çalışılan dalga boyunda UV absorpsiyonu olmayan çözücüler	Dereceli bir seçimlilik. HPLC uygulaması için elverişlidir.
Floresans	Floresans özelliği olan bileşikler	UV saflığında, çalışılan dalga boyunda UV absorpsiyonu olmayan çözücüler	Yüksek seçimlilik ve duyarlılık. Genellikle türev bileşiklerin analizinde kullanılır.
Kırma indisi	Hareketli faza göre farklı kırma indisi değerine sahip bileşikler	Gradient elüsyonda kullanılamaz	Gerçekte universal bir dedektör olup duyarlılığı sınırlıdır.
İletkenlik	Yüklü ve polar bileşikler	Hareketli faz iletken olmalıdır	İyon değişim metodları için mükemmeldir.
Elektrokimyasal	Yükseltgenmiş veya indirgenmiş bileşikler, özellikle biyolojik örnekler	Hareketli faz iletken olmalıdır	Çok duyarlı ve seçimli
Kütle spektrometresi (MS)	Bileşiklerin büyük bir kısmı	Uçucu çözücüler ve uçucu tamponlar kullanılmalıdır.	Yüksek duyarlılığa sahip ve analitik cihazlar içinde 2nci derecede güçlüdür. Tecrübeli operatörlere ihtiyaç vardır.

LC/MS



Kütle Spektroskopisi Örnekleri

Örnek - 1



$$\text{Rings} + \text{Double bonds} = X - 1/2 Y + 1/2 Z + 1$$

$X = \# \text{ C \& Si}$

$Y = \# \text{ H \& halogens}$

$Z = \# \text{ N \& P}$

87 ve 89 ancak N ve P gibi elementler içeren moleküller için mümkün bir Mol kütleleridir. 88 olduğu durumda ise C, H ve O gibi elementler bulunabilir.

C_6H_{16} için doymamışlık sayısı -1 dir. Bu ise imkansızdır.

C_6O da ise 7 çıkar ve karbon sayısından bile fazla olan doymamışlık imkansızdır.

Bu durumda C_6 olası bir yapı değildir. C_7 de aynı şekilde, mümkün olamaz.

Bu durumda, C_5 ve daha küçük karbon sayıları araştırılmalıdır.

	m/e	rel. abund	Norm abund	NF	C_5	C_6	C_7
A	88	1.5	100	66.7	60	72	84
A+1	89	0.1	5.1	6.7	5.5	6.6	7.7

5 karbon için, karbonlar 60 iyon eder. Kalan 28 iyonu düşünürsek;

- H_{28} , mümkün olmaz
- N_2 , olabilir ama C/N oranı çok küçük
- ✓ $H_{12}O$, *mümkün*

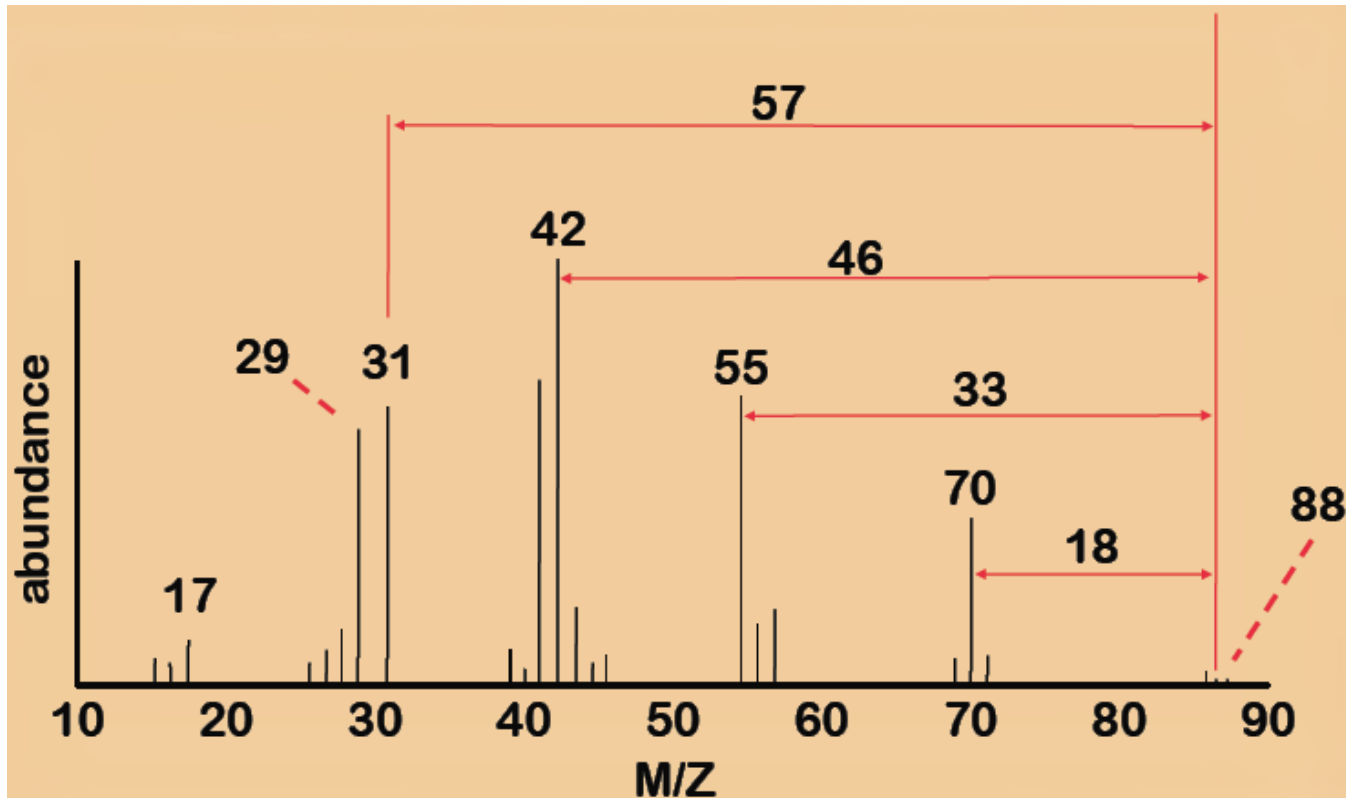
$$\begin{aligned}C_5H_{12}O \text{ için doymamışlık testi yaparsak} &= X - \frac{1}{2} Y + \frac{1}{2} Z + 1 \\&= 5 - 12 \cdot \frac{1}{2} + 0 + 1 \\&= 0\end{aligned}$$

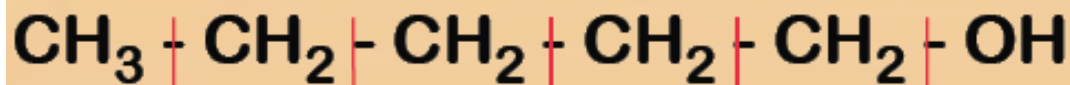
Yapıdan kopan
fragment iyonlarının
kütleleri

17 OH
29 C₂H₅, CHO
31 CH₂OH
42 C₃H₆, C₂H₂O
55 C₄H₇
70 C₅H₁₀

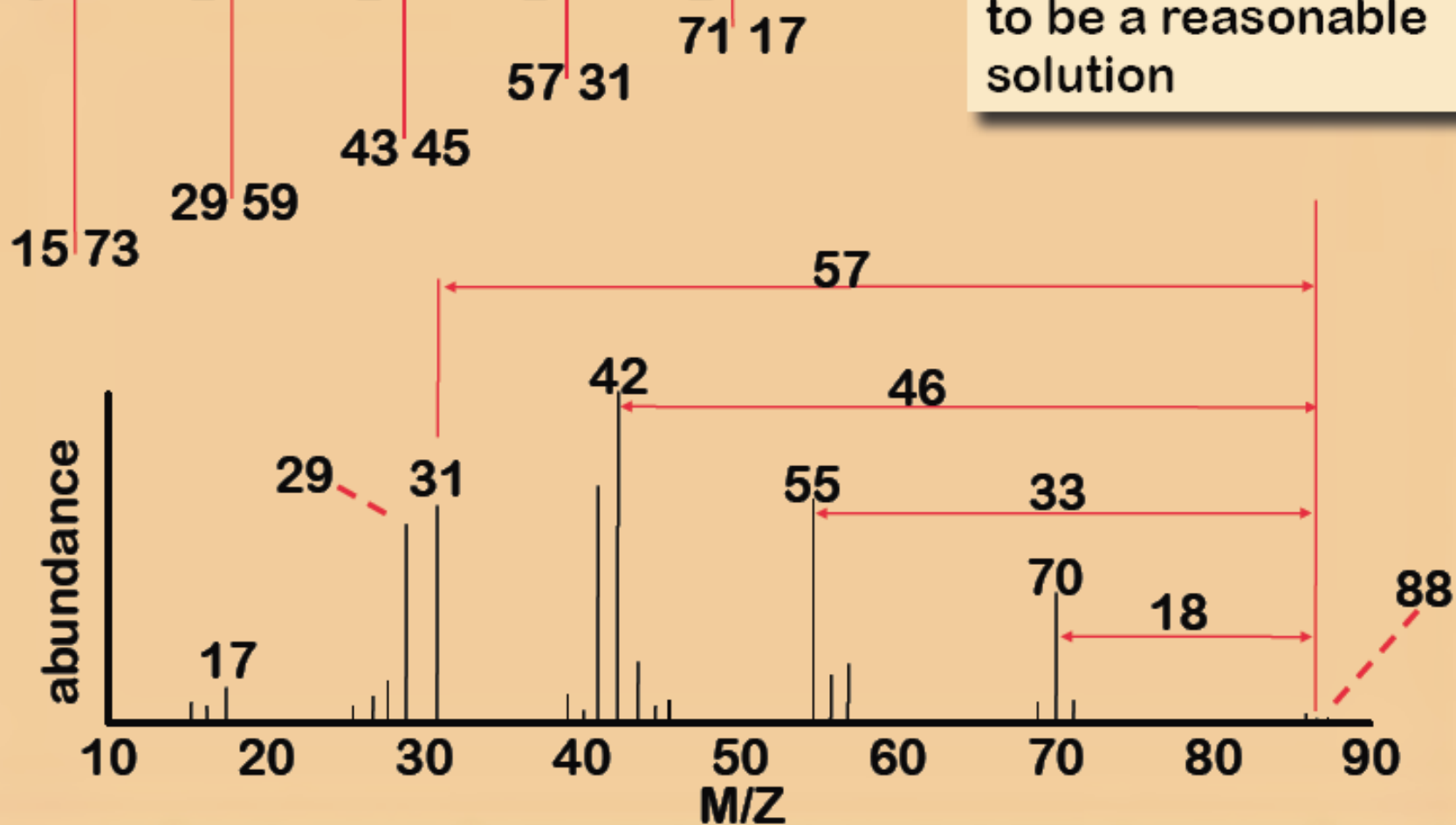
Yapıdan kopan
fragment moleküllerin
kütleleri

18 H₂O
33 CH₃ + H₂O
46 CH₃CH₂OH
57 C₄H₉

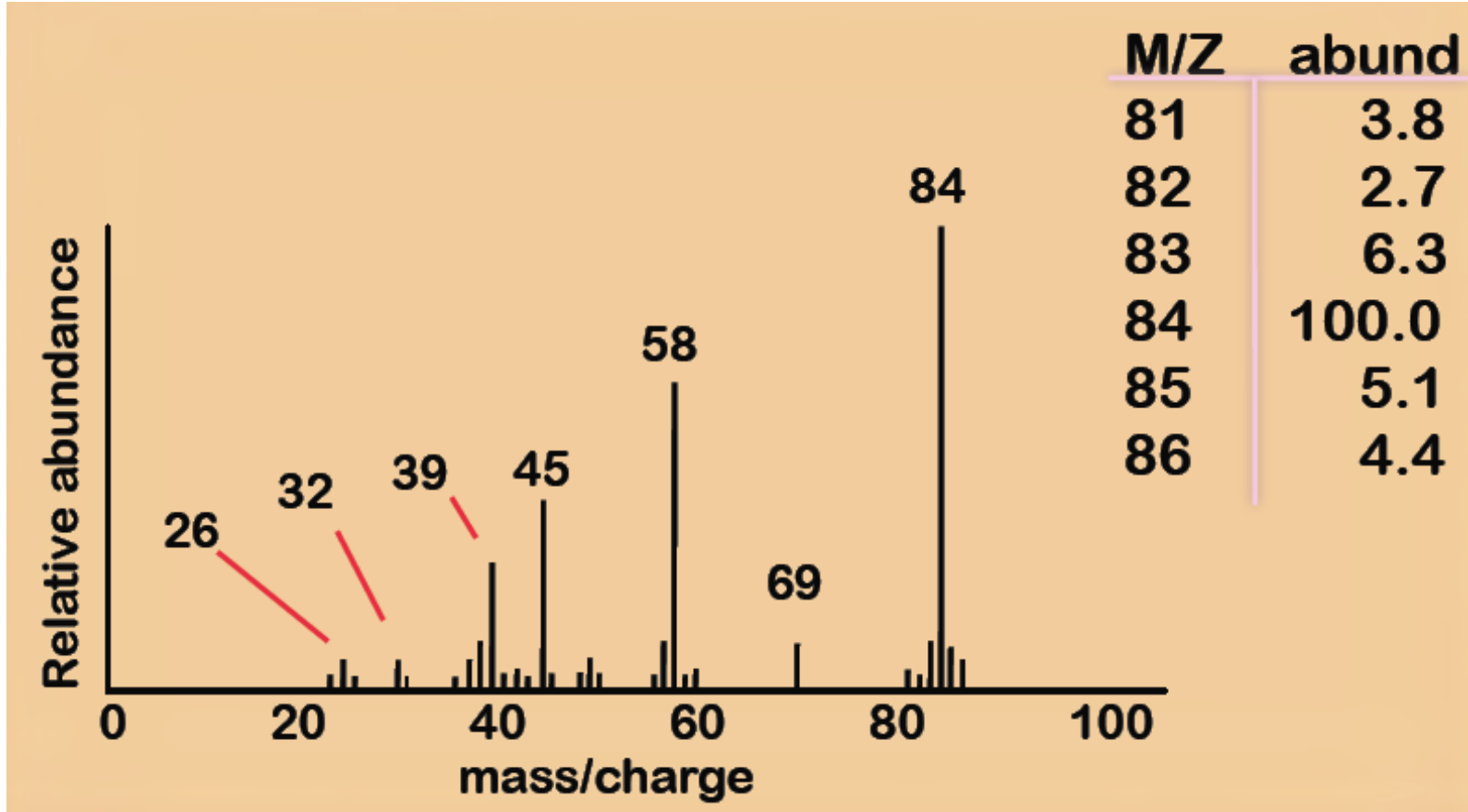




1-pentanol appears to be a reasonable solution



Örnek - 2



Molekül iyon piki 86 olamaz çünkü izotopların doğal bolluğunu da düşünmeliyiz. 85 veya 84 ihtimal dahilinde olarak görülüyor.

Bir karbon atomunun %1,1 i A+1 deki iyonla sebep olur. Bu nedenle, C₅ için bolluk oranı % 5,5 olur ki spektrumun verdiği oran ancak 5,1 kadardır. Bu durumda, C₄ ve altı karbon sayıları mümkündür.

	m/e	rel. abund	Norm abund	NF	C ₃	C ₄	C ₅
A	84	100	100	1	36	48	60
A+1	85	5.1	5.1		3.3	4.4	5.5
A+2	86	4.4	4.4				

	Mass	RB	Mass	RB	Mass	RB	Class
O	15.9949	100			17.9992	0.2	A+2
S	31.9720	100	32.9715	0.8	33.9679	4.4	A+2
Cl	34.9989	100	36.9659	32.5			A+2
Br	78.9183	100	80.9163	98			A+2

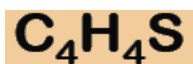
Molecular ion 84

4 carbon -48

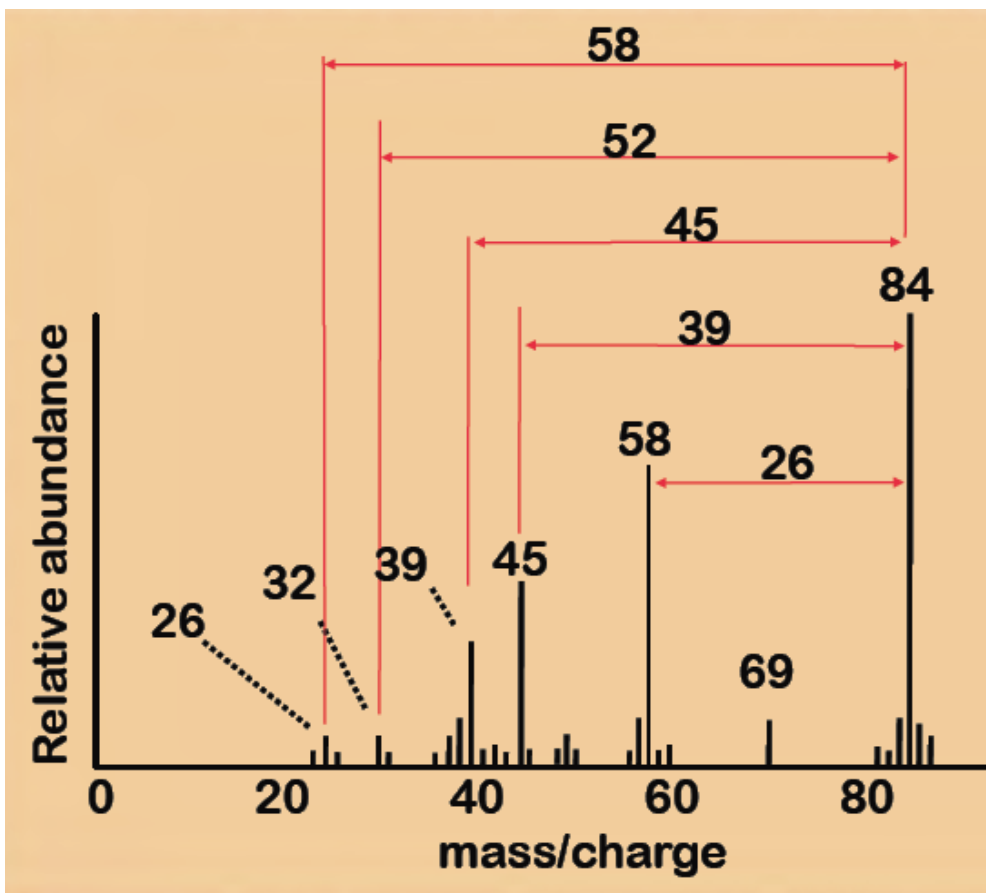
1 sulfur -32

Mass remaining 4 (most likely 4 H)

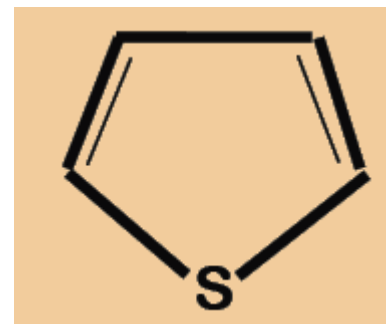
Potential formula: C₄H₄S



$$\begin{aligned}\text{Rings} + \text{Double bonds} &= X - 1/2 Y + 1/2 Z + 1 \\ &= 4 - 4/2 + 0 + 1 = 3\end{aligned}$$

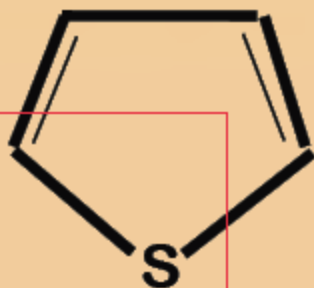


M/Z	Logical losses
26	C_2H_2
39	C_3H_3
45	CHS
52	C_4H_4
58	$\text{C}_2\text{H}_2\text{S}$



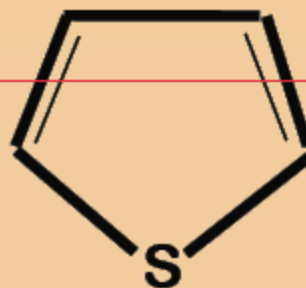
39
 C_3H_3

45
CHS



26
 C_2H_2

58
 C_2H_2S



52
 C_4H_4

32
S

