

GAZ KROMATOĞRAFİSİ YÖNTEMİ VE İLÂÇ ANALİZLERİNE UYGULANMASI

Dr. Erendiz SAYRON

Kromatografi Nedir?

Kromatografi, kimyasal karışımların nitel ve nicel analizlerinde bugün çok kullanılan temel bir separasyon (ayırım) yöntemidir. Bir analizcinin kromatografiye başvurmadan çalışması günümüzde olanaksızdır. Çok geniş bir konu olan kromatografi çeşitli biçimlerde sınıflandırılabilir. Uygulamanın dayandığı ilkelere göre adsorbsyon ve partiyon (dağılıma) kromatografisi; uygulama şekline göre kâğıt, kolon, ince tabaka ve gaz kromatografisi olarak sınıflandırmak mümkündür.

Kromatografinin tarihi 1850'de Runge'nin kâğıt kromatografisi çalışmalarıyla başladı. Tswett, 1906'da kolon kromatografisini geliştirdi. 1942'de Martin ve Syngge partiyon (dağılıma) kromatografisini ileri sürdüler. Partiyon kromatografisinde çok ince taneciklerden oluşmuş toz görünümünde bir katı madde (= "adsorban", "katı destek"), her taneciğin yüzeyini ince bir tabaka gibi kaplayan bir sıvı, ve bu sıvının içinden akıp giden diğer bir sıvı söz konusudur. Adsorban taneciklerini kaplayan sıvıya "sabit faz"; onun içinden akıp giden sıvıya da "mobil (hareketli) faz" denir. Sabit faz ve mobil faz birbirleriyle karışmayan sıvılardır. İşte kimyasal bir karışımın nitel analizi, karışımı oluşturan bileşiklerin bu iki sıvı arasında dağılmasıyla gerçekleşir. Adsorban, ayırırda bir rol oynamaz.

Gaz Kromatografisi ve Önemi Nedir?

1952'de Martin ve Syngge, kromatografi alanında bir devrim yaparak, mobil fazın bir sıvı değil, de bir gaz olduğu yeni bir yöntem öne sürdüler. Böylece kromatografinin en geniş dallarından biri "gaz/sıvı partiyon kromatografisi" ya da kısaca "gaz kromatografisi" gerçekleşmiş oldu.

Gaz kromatografisinin önemi çok hassas ve çabuk sonuç veren bir yöntem olması, çok küçük miktarda (mikrolitre) nümuneyle çalışılabilmesi, çok değişik yapıda kimyasal bileşiğe uygulan-

bilmesi, uygulamanın analizciye büyük bir külfet yüklememesidir.

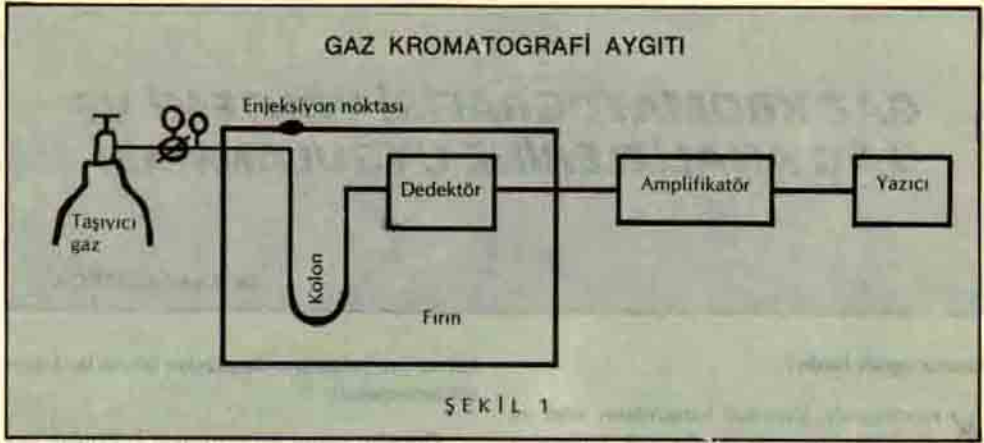
Önceleri petrol endüstrisinde kullanılan gaz kromatografi yöntemi ve aygıtları son 20 - 25 yılda büyük ilerlemeler kaydetmiş, çeşitli kimyasal maddelerin analizinde kullanılmaya başlanmıştır. Özellikle gelişmiş ülkelerde araştırma laboratuvarlarına özgü olmaktan çıkıp rutin analizlerin bir parçası haline gelmiştir. Ülkemizde gaz kromatografisinin kullanımı yenidir ama süratle yaygınlaşma eğilimindedir.

Gaz kromatografisi önce uçucu bileşiklere uygulanmış ve bunların analizinde gerçekten büyük başarı sağlamıştır. Ama şimdi tekniğin gelişmesiyle aslında uçucu olmayan büyük moleküllü bileşikler, bu arada pek çok ilâç da gaz kromatografisi ile başarıyla analizlenmektedir.

Gaz Kromatografisi Aygıtı

Bir gaz kromatografisi aygıtında yüksek basınçlı bir taşıyıcı gaz (mobil faz) kaynağı, nümune verme sistemi, kromatografi kolonu, kolondan geçen kimyasal bileşiklere sinyal veren bir dedektör, dedektör sinyalini yazıcıya yansıtan amplifikatör, kromatogramı çizen bir yazıcı, kolon ve dedektörü içeren fırın bulunur. Adsorban ve sabit faz kolonun içerisinde yer alır. Nümune bu kolona verilir ve bileşiklerin ayırımı kolonda olur. Nümune ya gaz halindedir ya da bir sıvıdır. Katı nümuneler uygun bir organik çözücüde çözünerek aygıtta verilir. Sıvı halindeki nümune ısıyla buharlaştırılarak kolona sevk edilir. Yani nümunenin esas özelliği ne olursa olsun kolona verilirken gaz halinde olması gereklidir. Nümuneyle birlikte mobil faz (taşıyıcı gaz) da kolona sevk edilir. Nümune karışımının kolonda ayrılan bileşiklerini taşıyıcı gaz birer birer kolondan dedektöre sürükler. Her bileşik için dedektör bir sinyal verir ve bu sinyal aygıtın yazıcısında üçgen şeklinde bir pik ya da bir basamak olarak çizilir. Yazıcının çizdiği bu şekillere kromatogram denir.

GAZ KROMATOĞRAFİ AYGITI



ŞEKİL 1

Aygıtın Ayrıntıları

a) **Taşıyıcı Gazlar:** Oksijen dışında tüm gazlar taşıyıcı gaz olarak kullanılabilir. Gazın saf olması şarttır. Genellikle azot kullanılır. Helium ve argonun kullanımı da vardır.

b) **Kolon:** Aygıtın en önemli kısmıdır. İyi hazırlanmamış bir kolonla iyi sonuç almak olanaksızdır. Genellikle kolonlar camdan ya da metalden 1,5 - 4 metre boyunda ve 0,5 - 4 mm. iç çapında imal edilir. Aygıtta monte edilebilir ve çıkartılabilir.

Gaz/likit kromatografisinde adsorban ayırım işleminde rol oynamaz. Adsorban olarak genellikle diatome toprağı, ateş tuğlasından türetilen bileşikler kullanılır. Küçük cam bilyalar da bu amaçla kullanılabilir. Adsorbanın aranan özellikleri, kimyasal reaksiyona girmemesi, yüzey alanının geniş olması, kolona doldurulurken kırılmaması, sabit fazı tutabilmesidir.

Sabit fazın seçimi analizlenecek nümuneye bağlıdır. Polar nümuneler için polietilen glikoller gibi polar sıvılar, nonpolar nümuneler için SE 30, SE 52 gibi silikon yağları, apiezon yağları gibi nonpolar sıvılar seçilir. Sabit faz olarak kullanılacak sıvıda aranan özellikler aygıtın çalışma ısısında buharlaşmaması, termal ve kimyasal stabilite, nümune için iyi bir çözücü olma, adsorban taneciklerinin yüzeyinde ince bir tabaka oluşturabilmedir.

Sabit faz uygun bir organik çözücüde çözünür ve adsorban bu çözelti ile muamele edilir. Organik solvan vakumda ortamdaki uzaklaştırılır. Böylece hazırlanan materyal kolona homojen olarak doldurulur. Homojenitenin sağlanması için doldurma işlemi sırasında kolonun bir ucuna bir vakum motoru bağlanır ve kolon sarsılır. Homojen doldurulmamış bir kolonla ayırım olanaksızdır.

c) **Nümuneye Verilişi:** Nümunenin tekrar tekrar aynı miktarlarda verilebilmesi gaz kromatografisinin üstünlüklerindedir. Gaz nümuneler özel bir valfle kolona verilir. Sıvı haldeki nümuneler için 0,1 - 10 µl hacimleri büyük bir doğrulukla verebilen enjektörler kullanılır. Enjeksiyon noktasının ısısı nümunenin anı buharlaşmasını sağlamak üzere kolon ısısından yüksektir.

d) **Dedektör:** Kolondan gelen bileşikleriyaptayan elektronik kısımdır. Kolondan gelen bileşiğe her an sinyal veren dedektörlere "diferansyel" dedektör denir. Bu durumda kromatogram piklerden oluşmuştur. Genellikle bu tip dedektörler kullanılır. Bileşiğin tümüne sinyal veren dedektörlere "integral" dedektör denir. Bu durumda kromatogram basamaklardan oluşmuştur.

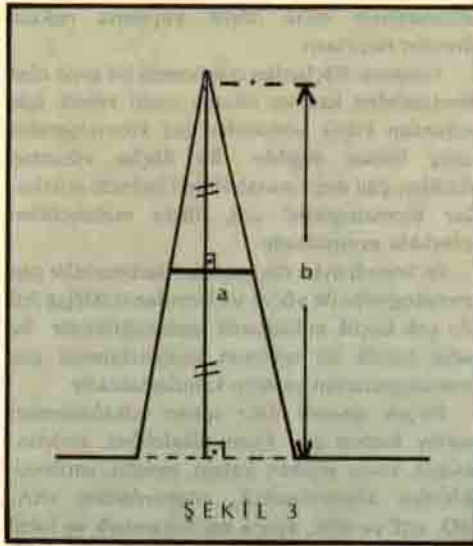
En çok kullanılan diferansyel dedektörlerden bazıları "Alev iyonizasyon dedektörleri" ve "α iyonizasyon dedektörleridir".

Alev iyonizasyon dedektörü (FID): Dedektör, iki elektrot ve hidrojen alevinden oluşmuştur. (Böyle bir aygıtta taşıyıcı gaz yanında hidrojen gazına da gerek vardır). Alev iyonlaşmayı sağlar. Kolondan gelen organik bileşik buharlarının alevle teması büyük ölçüde iyonlaşmağa neden olur. İki elektrot arasındaki akım şiddeti artar. Bu artış amplifiye edilip yazıcıda kaydedilir.

α iyonizasyon dedektörleri: Kolondan gelen taşıyıcı gazın ve bileşik buharlarının α ışını radyasyonuna tutulmasına dayanır. Işınları kaynağı ve elektrotlardan oluşmuştur. Radyasyon sonucu iyonizasyon artar ve akım şiddetinde de artış olur. Argon dedektörü, elektron çekim dedektörü gibi örnekleri vardır.

Kolonda Ayırım Nasıl Olmaktadır?

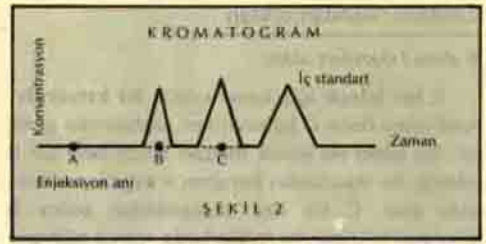
Kolonda nümunenin bileşiklerine ayrıldığı kısım sabit fazdır. Sabit faz molekülleriyle bileşik



ŞEKİL 3

molekülleri arasındaki çekim ne denli kuvvetliyse bileşik sabit fazın içinde o denli uzun süre kalır. Bu çekimi etkileyen faktörler, kohezyon kuvvetleri, hidrojen bağları ve polaritedir. Böyle bir bileşiğin kolondan akıp gitmesi uzun zaman alır. Oysa sabit fazla arasındaki çekim zayıf olan diğer bir bileşik kolaylıkla sabit fazdan mobil faza (taşıyıcı gaza) geçer ve kolondan çıkar. Böylece biz kromatogramda önce sabit faza fazla ilgi duymayan bileşiklere ait pikleri, sonra sabit fazla arasında kuvvetli çekim olan bileşiklerin piklerini görürüz. Sabit faz ile arasındaki çekim çok zayıf olan bir karışımı analizlediğimizi düşünelim: O zaman ayırım tümüyle bileşiklerin kaynama noktalarına bağlıdır. Düşük kaynama noktalı bileşikler önce, yüksek kaynama noktalı bileşikler daha sonra kolondan dedektöre ulaşır.

Analizci kromatogramda ince uzun pikler görmeyi ister. Yazıcının çizdiği kromatogram aslında bileşiklerin her anki konsantrasyonlarının (taşıyıcı gaz içinde) zamana göre çizilmiş bir grafiğinden başka bir şey değildir. Şu halde bir bileşik kolondan çabuk geçerse piki de dar ve uzun olur. Bileşik kolonda uzun süre kalırsa pik yayvanlaşır. Ayırımın süratli olması ısının yükseltilmesine ve taşıyıcı gaz hızının artmasına bağlıdır. Bu durumda bileşikler daha çabuk kolonda sürüklenir. Yalnız sürat sağlayalım derken bileşiklerin birbirlerinden kesinlikle ayrılmadan kolonu terketmelerine neden olmamak gerekir. Kolonun uzunluğu ayırımı etkileyen bir diğer faktördür. Yeterinden kısa bir kolonda ayırım iyi olmayacağı gibi fazla uzun bir kolonda bileşikler uzun zaman kalacakları için difüzyona uğurlar ve gene iyi bir ayırımdan söz edilemez.



Ayırımın en iyi belirtici kromatogramdır. Birbirinden kesinlikle ayrılmış, dar uzun simetrik pikler başarılı bir ayırımı gösterir.

Nitel Analiz

Belirli şartlarda bir bileşiğin kolondan geçmesi için belirli hacimde taşıyıcı gaza ihtiyaç vardır. Bu hacma "retansyon hacmi" denir.

$$V = tr F$$

V = Retansyon hacmi

tr = Retansyon zamanı

F = Taşıyıcı gaz hızı

Tr, Şekil 2'deki B bileşiği için cm. cinsinden AB' uzunluğudur. Yani enjeksiyon anı ile pikin maksimumu arasındaki uzunluk. Retansyon zamanı belirli şartlarda her bileşik için karakteristiktir. İşte nitel analiz bu özelliğe dayanır. Standartların numuneyle birlikte kolona enjekte edilmesinden sonra bileşik pikinin yüksekliğinde belirgin bir artış bileşik standardın idantik olduğunu gösterir. Örneğin nane esansını analizliyoruz: Esansta mentol var mıdır, yok mudur? Bunu saptamak için ne yaparız? Esansa saf mentol katarak aygıtı veriyoruz. Mentolün tr'sini biliyoruz. Esansta bu tr'deki pik mentol ilâvesiyle büyümüşse o pik mentolü gösteriyor demektir. Kesinlikle emin olmak için bir kaç değişik kolon denemek gerekir.

Nicel Analiz

Pik yükseklik ve alanının bileşik konsantrasyonuna orantılı olmasına dayanır.

Pik yüksekliği ile, yüksekliğin yarısındaki pik genişliğinin, yani Şekil 3'deki a ile b'nin çarpımını pik alanı kabul etmek en doğru yoldur. İşte burada simetrik, ince uzun piklerin yararı bir kez daha ortaya çıkar.

Nicel analiz için pekçok değişik yöntem öne sürülmüştür. Bunlardan en çok kullanılanı ve en güvenilir sonuç veren "iç standart" (internal standart) yöntemidir. Burada analizlenecek numuneye miktarı bizce belli bir standart katılır. Diyelim Şekil 2'deki B pikine tekabül eden bileşiğin nicel analizini yapmak istiyoruz. O halde

B miktarı / standart miktarı = C

B alanı / standart alanı

C her bileşik için karakteristik bir katsayıdır. Analizden önce C katsayısının saptanması gerekir. Bu işlem de ancak miktarı bizce belli saf B bileşiği ile standardın beraberce aygıtta verilmesiyle olur. C bir kez saptandıktan sonra B bileşiğini bilinmeyen miktarlarda içeren nümune karışımları kolaylıkla analizlenir.

Yalnız sonuçların istatistik yönden değerlendirilmesi, standart sapmaların hesap edilmesi gereklidir.

İlaçlara Uygulanması

Gaz kromatografisi eczacılık alanında önce kokulu tıbbi bitkilerden elde edilen esanslara (uçucu yağlara) uygulandı ve bugün bu bileşiklerin birincil analiz yöntemidir. Eczacılık dışında esansların (gül, nane, lāvanta, çilek, narenciye meyveleri esansları v.s.) gıda endüstrisi ve parfümerideki kullanımı göz önünde bulundurulursa gaz kromatografisinin buradaki önemi açıktır.

Ancak gaz kromatografisinin tıp, eczacılık ve toksikolojideki önemi hayatî ilaçlara da uygulanabilmektedir.

İlaçların gaz kromatografisine uygulanması 1962'lerde başladı. O zamandan beri bu konuda araştırmalar sürmektedir.

İlaçlar çeşitli müstahzarlardan, kan, idrar, serum gibi vücut sıvılarından, dokulardan çekilerek gaz kromatografisine uygulanabilir. Bir çoğu hiç bir bozunma olmadan analizlenebilir. Isıyla

bozunanların daha düşük kaynama noktalı türevleri hazırlanır.

Yatıştırıcı ilaçlardan çok önemli bir grup olan fenotiazinleri kan ve idrarda tayin etmek için kullanılan klâsik yöntemler gaz kromatografisi kadar hassas değildir. Bu ilaçlar vücuttan oldukları gibi değil metabolitleri halinde atılırlar. Gaz kromatografisi ana ilaçla metabolitleri kolaylıkla ayırmaktadır.

En önemli uyku ilaçlarından barbituratlar gaz kromatografisi ile vücut sıvılarından 0,002 µg/µl gibi çok küçük miktarlarda saptanabilmektedir. Bu kadar küçük bir miktarın saptanabilmesi gaz kromatografisinin yararını kanıtlamaktadır.

Birçok önemli ilacı içeren alkaloidlerden morfin, kodein gibi Afyon alkaloidleri, striknin, atropin, kinin, efedrin, kafein, emetin; antibiyotiklerden kloramfenikol; vitaminlerden vitA, vitD, vitE ve vitK; ayrıca antihistaminik ve lokal anestetik ilaçlar ve adrenalin benzeri kateşolaminler gaz kromatografisine uygulanabilir.

Esrarın etkin maddesi tetrahidrokannabinol tayininde gaz kromatografisi kullanılması bugün rutinleşmiştir.

KAYNAKLAR

1. *Gudnizowicz, B.* : Gas Chromatographic Analysis of Drugs and Pesticides, New York 1967, Marcel Dekker Inc.
2. *Linkens, H.F.; Tracey, M.V.* : Modern Methods of Plant Analysis. Vol. 5. Springer Verlag. Berlin-Göttingen-Heidelberg, 1962.
3. *Simpson, C.* : Gas Chromatography. Kogan Page Ltd. London 1970.

- *Dünyayı güzeli bulmak için dolaşırken onu yanımızda götürmeliyiz, yoksa onu bulamayız.*
- *Coşkunsuz olmadan büyük hiçbir şey meydana çıkarılamaz.*
- *Arkadaş, samimi olabildiğin, yanında yüksek sesle düşünebildiğin kişidir.*
- *Doğruluğun tek mükâfatı doğruluktur, arkadaş sahibi olmanın tek yolu ise bir tane olmaktır.*
- *Hiç muntazam bir tarih yoktur, sadece biyografidir.*
- *Toplum bir insanın uzatılmış gölgesidir.*
- *Bir yaşında olmayan kitabı katiiyen okumayın.*
- *Hepimiz değişik derecelerde kaynarız.*

Ralph Waldo EMERSON