

KLİNİK BİYOKİMYADA GAZ KROMATOĞRAFI METODU

Dr. Kemal Özkan^(x)

ÖZET

Bu makalede gaz kromatografi metodunda kullanılan aletler prensip ve işleyiş tarzı bakımından gözden geçirildi. Kolonlar ile dolgu maddeleri, hareketsiz ve hareketli fazların tahlil sonuçlarına etkileri açıklandı.

Kimyasal maddelerin separasyonuna etki eden faktörler, sıcaklık derecesi, kolon boyutları, taşıyıcı gaz ve hareketsiz fazların nitelikleri belirtildi. Tahlil edilecek maddelere göre seçilerek detektörlerin özellikleri ve cinsleri anlatıldı.

SUMMARY

Gas Chromatography in the Clinical Biochemistry.

In this paper the gas chromatographic system and various components associated with a chromatograph have been reviewed. The effect of column's dimension, supporting materials, mobile and stationary phases on the separation results have been pointed out. The characteristics of the most commonly used detectors were cited.

Biyokimyada çeşitli kimyasal bileşiklerin birbirinden ayrılması (separasyon) işlemi için uzun zamandan beri kullanılan metotlardan bir bölümü kromatografi genel adı altında toplanabilir. Kâğıt, ince tabaka ve kolon kromatografileri en çok kullanılan metotlardır. Oldukça ufak miktarlarda numuneyle çalışma olanağı verirler. Genellikle, kapiler etki ya da ağırlığa bağlı olarak meydana gelen bir sıvı (solvent) akımı, dışardan uygulanan basınç ve kısmen

(x) Bursa Tıp Fakültesi Biyokimya Kürsü Başkanı

maddenin kendi ağırlığı sonucu, kimyasal bileşikler, bir yerden ötekine taşınırlar. Taşınma hızları farklı olan maddeler böylelikle birbirinden ayrılmış olurlar. Kromatografide başlıca iki faz vardır: Hareketli (mobile) solvent fazı ve katı ortamı tabaka halinde kaplayan hareketsiz (stationary) sıvı fazı. Kimyasal bileşiğin hareketli faz tarafından taşınma hızı, iki faz arasındaki bölüşüm (partition) olayına, katı ortamın absorplamasına ve bileşiğin molekül yapısına bağlıdır.

Gaz kromatografi (GC veya GLC) metodundaysa hareketli faz gazdan ibarettir. Dolgu maddesiyle doldurulmuş bir kolondan gaz akımı geçirilir. Dolgu maddesi ince toz halinde ve kimyasal bakımdan etkisizdir. Bu madde kuru (aktif) ise gaz kromatografi, bir sıvıyla ıslatılmış ve ince tabaka halinde hareketsiz sıvı fazı meydana getirilmişse, gaz likid (GLC) kromatografiden bahsedilir. Kolon boyunca ilerleyen hareketli faz (gaz) içinde farklı taşınma hızı gösteren bileşiklerin kolondan çıkışları da farklı zamanlarda olur. Kolon çıkışında bulunan uygun bir detektör, kendisine değişik zamanlarda gelen kimyasal bileşiklere karşı elektriksel sinyaller verir. Bu sinyaller ise amplifikatörden sonra kaydediciye aktarılır. Bu şekilde çeşitli bileşiklerin kolondan çıkış anları saptanmış olur. Özel yapılı detektörlerin geliştirilmesi sayesinde öteki metotlarda henüz ulaşılmıyan duyarlık derecelerine (sensitivity), örneğin 10^{-12} grama (pikogram) kadar inilebilir. Bu kadar az miktardaki maddelerin kantitatif ölçümü mümkün olabilir.

Bir kimyasal bileşiğin gaz kromatografi metoduyla tahlil edilebilmesi için onun harabolma (decomposition) sıcaklık derecesinin altında iken, yeterli buhar basıncı göstermesi gereklidir. Başka deyişle, ısıtıldıkları zaman, harabolmadan önce buharlaşabilen maddeler gaz kromatografiyle

incelenebilirler. Bu özelliğe sahip olmayan maddeler, uygun kimyasal işlemlerle buharlaşabilen türevlere çevrilebilirler^(1,2).

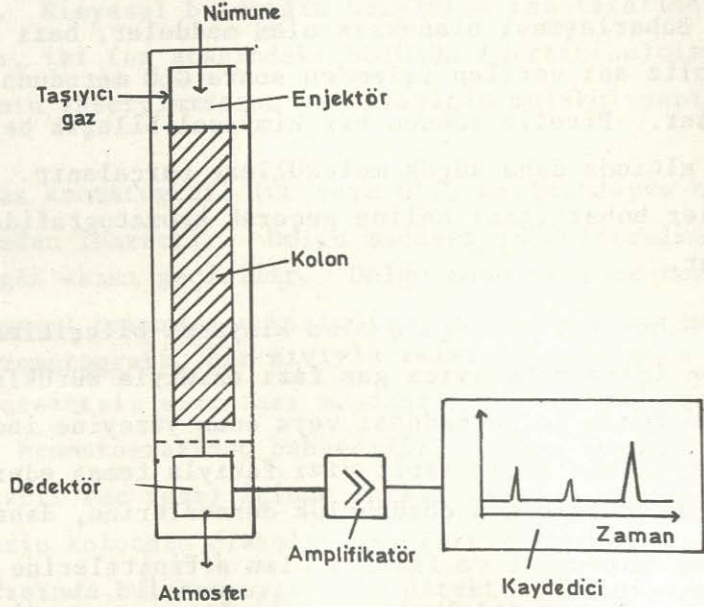
Buharlaşması olanaksız olan maddeler, bazı durumlarda, piroliz adı verilen işlemde sonra GLC metoduna uygulanabilirler. Piroliz sonucu bir kimyasal bileşik belirli şartlar altında daha küçük moleküllere parçalanır. Bu küçük molekül buhar (gaz) haline geçerek kromatografide tahlil edilirler.

Buhar haline geçmiş olan kimyasal bileşikler ısıtılmış kolon içinden taşıyıcı gaz fazı akımıyla sürüklenip geçerken, kolonda dolgu maddesi veya onun yüzeyine ince bir film gibi tabakalanmış sabit sıvı fazıyla temas ederler. Her iki faz karşısında çözünürlük derecelerine, daha doğru - su bölüşüm katsayısı ve fazlara olan affinitelerine göre bu fazlar arasında dağılırlar. Buharlaşma yeteneği fazla olan (volatile) maddeler, hareketli gaz fazına daha fazla karışır ve buharlaşma yeteneği az olanlara göre kolondan daha önce çıkarlar. Bir başka deyişle, az volatil olanlar kolonda daha uzun süre kalırlar. Daha uzun retansiyon zamanı gösterirler.

Gaz kromatografide bileşiklerin hareketli ve hareket-siz fazlar arasında dağılımına etki eden faktörleri özetle şu tarzda sıralayabiliriz :

- a) Kolonda sıcaklık derecesi
- b) Hareketsiz fazda çözünürlük veya absorplama yeteneği
- c) Hareketli fazda çözünürlük yeteneği- fazın viskozitesi, akış hızı, kolon boyunca basınç düşme oranı.

Gaz kromatografi cihazında başlıca şu kısımlar vardır: Kolon, detektör, amplifikatör ve kaydedici (Şekil: 1).



ŞEKİL : 1

Kolonlar:

Genellikle kolonlar cam, bakır, çelik, alüminyum veya benzeri maddelerden yapılmış ince uzun borulardır. Kapiller denecek kadar ince (0,2-1,0 mm) olabildikleri gibi birkaç santimetreye kadar genişleyen ve preparatif amaçlarla kullanılan geniş kolonlar da vardır. Çok ince kapiller kolonlarda ayrıca dolgu maddesine gerek olmadan iç cidarlar çok ince bir sıvı (hareketsiz faz) tabakasıyla kaplanır.

Klasik dolgu kolonları adı da verilen ve en çok kullanılan tiplerde çok çeşitli dolgu maddeleri kullanılır. Kolon, bütünüyle uygun sıcaklıkta bir fırın içinde bulunur.

Bir kolonun separasyon yeteneği (resolution), nispi retansiyon ve kolon etkinliği kavramlarıyla tanımlanır^(3,4).

Nispi retansiyon (separasyon faktörü): Bir bileşiğin kolondan çıkış zamanının başka bir bileşiğine oranıdır. Aynı anda kolondan çıkan iki madde için separasyon faktörü 1 dir. Bunun anlamı, bahis konusu maddelerin birbirlerinden ayrılmadan kromatogramda tek bir maksimum eğri (peak) göstermeleridir. Nispi retansiyon hareketsiz faz ve sıcaklık derecesiyle ilgilidir. O halde bunları değiştirerek, nispi retansiyon değerini değiştirmek ve dolayısıyla maddeleri birbirinden daha iyi ayırmak mümkün olabilir.

Kolon etkinliği : Bir kromatografi kolonu uç uca dizilmiş yüzlerce segmentten (plaklardan) oluşmuş farzedilebilir. Teorik olarak düşünülen bu plaklardan her birinde ayrı ayrı hareketli ve hareketsiz fazlar vardır. Analiz edilecek madde karışımı (nümune) buhar halinde kolona girdiğinde, birbiri arkasından bu teorik plaklardan geçer ve sonuncu plaktan dışarı çıkar. İlk segmente gelen madde hareketli ve hareketsiz fazlar arasında dağılıma uğrar, ikinci segmente, değişik konsantrasyonda olarak hareketli gaz fazı gelir. Burada yeniden dağılım olur, sonuncuya kadar bu olaylar dizisi sürer gider. Arkadan gelen ve madde içermeyen, saf taşıyıcı gaz, kolona girdiğinde birinci teorik segmentte hareketsiz faza önceden bağlanmış maddelerin bir kısmını geri alır, yeni bir dağılım olur. Bundan sonraki segmentlerde de kolon boyunca sonuncuya kadar bu işlem olur. Hareketsiz faz içinde çözünürlük yeteneği fazla olanlar orada uzun süre kalır ve kolondan geç çıkarken, bu yeteneği az olanlar daha önce kolonu terkedip detektöre ulaşırlar.

Bir kimyasal bileşiğin kolona girdiği an ile çıktığı an arasında geçen zamana retansiyon zamanı adı verilir. Maddenin girdiği an, nümunenin kolona enjekte edildiği andır. Çıkış zamanı ise kromatogramda maksimum eğrinin (peak) çizildiği yerle ölçülür.

W = Maksimum eğrinin yarı yükseklikte genişliği
(cm.)

t = Retansiyon zamanı (dakika) olan bir durumda kolonun teorik plak sayısı (n),

$$n = 5,54 \left(\frac{t}{w} \right)^2 \quad \text{formülüyle ifade edilir}^{(7)}.$$

t değeri ne kadar büyük, w küçükse teorik plak sayısı o kadar fazla olur. Teorik plak sayısının fazla oluşu kolonun separasyon yeteneğinin iyi olduğunu gösterir. (genellikle 1 metre kolon uzunluğu için 600 den yüksek n değeri kolonun kabul edilebilir separasyon etkinliğini gösterir.)

Kolonun boyu uzadıkça teorik plak sayısı ve retansiyon zamanı da artar. O halde uzun boylu bir kolon uzun tahlil zamanı ve o oranda iyi separasyon elde etmek demektir.

Analiz edilecek nümunedeki madde miktarları kolonun çapıyla orantılıdır. Örneğin, 4 mm. yarı çapında bir kolonda yaklaşık olarak 3 mg. lık maddeler, 2-3 mm. çapındakilerde ise 1 mg. lık maddeler uygulanabilir. Kolon daraldıkça separasyon daha iyi olur. Ancak bu durum detektör duyarlılığının (sensitivity) yüksek olmasını gerektirir.

Kolonda Dolgu (destek) Maddesi: Dolgu maddesi mümkün olduğu kadar fazla yüzeyli olmalıdır. Bu amaçla ince toz halinde ve gözenekli (porous) madde tanecikleri kullanılır. Taneciklerin benzer biçimli (uniform) ve

yaklaşık 0,2 mm. büyüklükte olması tercih edilir. Gözenekli taneciklerdeki delikler ne çok fazla derin, ne de çok fazla küçük olmamalıdır. Çünkü çok derin gözenek boşluklarına giren madde molekülleri çok uzun bir yayılma yolu izlemek zorunda kalırlar. Gözenekli yüzey, dolgu maddesinin gramı başına yaklaşık olarak 1 m^2 . kadar olmalıdır ($1 \text{ m}^2/\text{gr}$).

Çok ince tanecikli tozdan ibaret bir dolgu maddesi, taşıyıcı gaz akışına karşı çok fazla direnç gösterir ve bunu yenmek için uygulanan gaz basıncı sonucu, kolonun giriş ve çıkışlarında ileri derecede basınç farkı meydana gelebilir.

Dolgu maddesi kolonun, hareketsiz sıvı fazına, hareketli gaz fazına ve analiz edilen bileşiklere karşı kimyasal bakımdan etkisiz (inerte) olmalıdır. (Kieselguhr, Kil, cam tanecikleri, reçine veya benzer preparatlar, celite, chromosorb, gas-chrom, fire-brick v.b. çok kere kullanılan dolgu maddeleridir.)

Kolonda sıcaklık programlaması: Kolonun ısıtılmasında amaç, analiz edilecek nümune maddelerin buharlaşabilmesidir. Sıcaklık derecesi termostat yardımıyla bileşiğin kaynama noktasına yakın derecede tutulur. Taşıyıcı gaz basıncı yüksekliğinin kaynama noktasını da yükselttiğini akılda tutmak gerekir. Bir nümune içinde kaynama dereceleri birbirinden farklı bileşiklerin birarada incelenmesi pekçok güçlükler doğurur. Kaynama noktaları düşük olanlar düşük sıcaklık derecelerinde kolondan kolayca ve hızla geçerek separasyona uğrarlar. Kaynama noktaları yüksek olanlar ise yavaş yavaş geçer ve kolonun uzunca bir bölümüne yayılırlar ve birbiri üzerine binerek iyi bir separasyon gösteremezler. Bu gibi maddelerin bir kısmı kolonun başlangıcında enjeksiyon yerinde yoğunlaşıp kalır. Böyle durumlarda separasyonun iyi olması için analiz süresince

sıcaklık doğru orantılı olarak yükseltilir. Bu işleme sıcaklık programlanması adı verilir. Programlamayla kaynama noktası yüksek olan ve zor buharlaşan maddelerin kolonu hızla geçmeleri ve birbirlerinden ayrılmaları sağlanır.

Sıcaklık yükseldikçe kolondaki hareketsiz sıvı tabakasında da buhar basıncı yükselir ve sonuç olarak detektöre gelen miktar yükselir, hareketsiz faz kayba uğrar. Bu kayıpları ikinci bir (referans) kolon ve detektörle kompanse etmek gerekir.

Çalışma esnasında sabit sıcaklık kullanıldığında (izotermal şartlarda) hareketsiz sıvı fazında yine bir miktar buharlaşma olur. Ancak bu kayıp değişken olmadığından referans kolona gereksinim olmadan sadece detektörün sıfır ayarı ile kompanse edilebilir.

Gaz kromatograf aletlerinde çok kere ön ısıtma sistemi vardır. Kolonun nümune enjekte edilen ucu ve detektör ısıtılarak bileşiklerin soğuması ve buralarda yoğunlaşıp kalınmaları böylelikle önlenmiş olur.

Kolonda Hareketsiz Faz : Sabit sıvı fazı seçiminde dikkate alınması gereken bazı faktörler vardır. Sıcaklık dolayısıyla meydana gelen buharlaşmanın bu fazda azalmaya neden olduğundan yukarıda bahsedilmişti. Sıcaklık derecesi yüksek tutuldukça bu kayıp daha fazla olacaktır. Bu nedenle hareketsiz faz için kullanılacak sıvının kaynama noktası yüksek bir sıvı olması gereklidir^(5,6)

Sabit fazda kimyasal bileşiklerin çözünürlük yeteneklerinin kromatografide, separasyonu etkilediğine işaret edilmiştir. Çözünürlük ise faz ve bileşiklerin polaritesiyle ilgili bir olaydır: Polar (moleküllerinde elektrik yükleri olan) bileşikler için polar sıvılar, polar olmayan

(moleküllerinde elektrik yükü olmayan) bileşikler içinse polar olmayan sıvılar en uygun sabit fazları meydana getirirler^(4,5). Sabit faz da tıpkı onun desteği olan dolgu maddesi gibi, bileşiklere karşı kimyasal bakımdan etkisiz olmalıdır.

Hareketsiz faz ısının etkisi ve üzerinden geçen hareketli gaz fızının yardımıyla sürekli olarak, az da olsa buharlaşır, bir tür sızıntı tarzında kayba uğrar. Kolon sıcaklığı yükseldikçe bu kayıp arttır. Analizden önce kolonu bu şartlara göre dengelemek için çalışma derecesinin biraz üzerinde tutup içinden gaz geçirilerek sızıntıyı sürükleyip atmak ve muhtemel kirliliklerden temizlemek uygun olur. Sabit faz için bir kolona gerekli sıvı miktarı yaklaşık olarak dolgu maddesinin % 10-30 u kadardır. Sabit fazın fazla konması kolonun separasyon yeteneğini azalttığı gibi, az konması da analiz edilecek madde miktarının azaltılmasını gerektirir^(5,6).

Hareketsiz faz olarak en çok kullanılan sıvılaşıbilen maddeler polietilen glikol, polipropilen glikol, poliamid, apiezon, silicone gibi bileşiklerdir⁽⁷⁾. Bunlar uçucu olmayan, düşük viskoziteli ve ısıya dayanıklı maddelerdir.

Kolondan geçen taşıyıcı gaz: Hareketli gaz fazının akışı düzenli, viskozitesi az, saf halde olması, hem sabit faza hem de tahlil edilecek bileşiklere karşı kimyasal bakımdan etkisiz olması gerekir.

Katarometre tipi detektör kullanılıyorsa bu fazın ısı iletkenliği yüksek (helyum,vb.) olmalıdır. Alevli iyonlaşma detektörleri için azot gazı uygundur. Argon gazı elektron yakalayıcı detektöre bağlanmış kolonlarda başarıyla kullanılır.

Kolonun separasyon etkinliği taşıyıcı gaz akımıyla

yakından ilgilidir. Genellikle 25-100 ml/dakika hızında bir gaz akımı kullanılır. Uygun sonuçlar alabilmek için uygun şartların ve taşıyıcı gaz akım hızının bulunması gereklidir. Isı programlaması yapılan durumlarda, sıcaklık artışıyla birlikte kolonda hava direnci artacağı için taşıyıcı gaz basıncında düşme olabilir. Bunu önlemek için uygun tarzda basınç regülatörü kullanılmalıdır.

Detektörler :

Gaz kromatografide kullanılan detektörler analiz edilecek bileşiklerin kimyasal yapısına göre çeşitli tiplerde yapılmışlardır⁽⁷⁾.

a) Alevli İyonlaşma Detektörleri (FİD): Bu tip detektörlerde belirli elektriksel gerilimi olan iki elektrod arasında devamlı bir hidrojen alevi yanar. Kolondan çıkan taşıyıcı gazla birlikte gelen kimyasal bileşikler bu alevde yakılarak bir iyon akımı ve dolayısıyla elektrodlar arasında bir gerilim farkı oluşur. Bu tür detektörler uygulama alanı en fazla olan ve en çok kullanılan detektörlerdir. Bütün organik (karbon içeren) maddeler (formaldehit, formik asit, karbonmonoksit ve dioksit dışında) bu tür detektörlerle hassas olarak saptanabilirler. Buharlaşabilen inorganik maddeler ise elektriksel sinyal oluşturamaz ve dolayısıyla bu detektörlerle saptanamazlar.

b) Katarometre veya Isısal İletkenlik Detektörleri (TCD): Bu tür detektörlerde ısıtılmış platin telden geçen belirli elektrik akımı, buraya gelen ve tele temas eden taşıyıcı gaz ve onun içindeki bileşiklerin ısısal iletkenliklerinin farklı oluşuyla değişikliğe uğrar. O halde ısısal iletkenlikleri taşıyıcı gazdan farklı olan bütün bileşikler bu tür detektörlerde elektriksel sinyaller meydana getirebilirler. Taşıyıcı gaz olarak helyum kullanıldığı takdirde,

inorganik bileşiklere bu tip detektörler çok iyi cevap verirler. Bunlarda detektöre gelen bileşikler harabolmadıkları için çıkan maddeler başka tahlil amacıyla başka detektör veya aletlere gönderilebilirler.

c) Elektron Tutucu Detektörler (ECD): Kolondan çıkan hareketli gaz fazı, aralarında belirli bir elektriksel gerilim olan iki elektrod arasından geçer. Negatif elektrod tarafından salınan elektron akımı eğer taşıyıcı gaz içinde elektron yakalayıcı maddeler varsa değişmeler gösterir. İşte bu değişmeler detektöre gelen kimyasal maddelerin göstergesi olurlar. Uygun tarzda amflifikatörden geçtikten sonra kaydedici alette maksimum eğriler halinde görülebilirler. Molekül yapılarında halojenler (Cl, I, Br...) ve oksijen içeren kimyasal bileşikler, yüksek elektron affinitesi özelliğine sahip maddeler olarak bu tür detektörlerle kolayca saptanabilirler.

d) Termiyonik Detektörler (TD): Fosforlu bileşikler için özel olan bu tür detektörler, organik fosfor bileşiklerinin (özellikle pestisid ve ensektisidlerin) araştırılmasında kullanılırlar.

Yukarda anlatılan detektörlerde oluşan elektriksel sinyallerin amplifikasyonu ve kaydedilmesi prensip bakımından öteki ölçü aletlerinden (spektrofotometreler, pH metreler vb.) fazla farklı değildir. Bu nedenle üzerinde durulmayacaktır.

Tahlil Maddesinin Alete Verilişi :

Tam ve doğru miktarda nümunenin alete tatbik edilmesi özel metotları gerektirir. Katı maddeler (ısı etkisiyle ergime noktasına getirilmiş) eritilmiş ya da (bir çözelti içinde) çözülmüş halde alete verilirler. Nümune, bir gaz

akımı içine gireceği için kauçuk bir zardan batırılan ince bir iğneden faydalanılır. Çok kere bir kaç mikrolitreden ibaret olan nümuneyi tam ve doğru miktarda tatbik etmek için mikroenjektörler kullanılır. Nümunenin tamamının aynı anda buharlaşabilmesi için enjeksiyon işleminin çok çabuk yapılması gerekir. Gaz kromatografi metodu tıbbi biyokimya rutin çalışma ve araştırmalarında pek çok yerde kullanılabilir. Lipidler, steroidler, karbonhidratlar ve ilaç olarak verilen birçok kimyasal madde bu metotla incelenebilirler. Aminoasitler için ancak sınırlı şartlarda bu metottan faydalanılabilir.

KAYNAKLAR

1. Jellum,E.: *Gas chromatography-mass spectrometry. Application in clinical chemistry, Scand. J. Clin. Lab. Invest. 26: 327, 1970*
2. Jellum,E.,Close,W., Patton,W.: *A gas liquid chromatographic method for the determination of phenylalanine in serum. Anal. Biochem. 31: 227, 1969*
3. Meinertz,H.: *Şahsi görüşme (Nisan 1971)*
4. Keulemans,A.I.M.: *Gas chromatography, Reinhold, New-York (1959)*
5. Dal Nogare,S.: *Gas liquid chromatography, Interscience Publishers Inc. New-York (1962)*
6. Race,G.J.: *Laboratory Medicine Vol: 1 (11-7) Harper Row. Publishers New-York, London (1973)*
7. Curtius,H.Ch.: *Clinical Biochemistry, principles and methods Vol. 1 Walter de Gruyter, Berlin, New-York (1974)*