

Kromatografide İç Standart Tekniği

Dr. Yaşar HIŞIL

E.Ü. Müh. Fak., Gıda Müh. Böl., Gıda Bilimi Anabilim Dalı — İZMİR

ÖZET

Kromatografik analizin verimliliğine iç standart tekniğinin nasıl etkilediğini istatistiksel olarak tesbit etmek mümkündür. Tekniğin kullanılışı bir örnekle gösterilmiştir.

İç standart tekniği kromatografide yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Analizden önce, örnek çözeltisine bilinen bir bileşiğin belli miktarı ilave edilir. Böylece iç standart tekniği, tayinin verimliliğini dikkate değer ölçüde düzeltir. Analiz sırasında örnekteki herhangi bir kayıp, iç standardın eşit miktarda kaybıyla dengelendiğinden analitik ölçümde hatalar ekseriya azaltılır. Bilinmeyen örneğin kalibrasyonunda ve tayininde, kromatogramdaki pikin alanının mutlak değeri yerine, bileşenin pik alanının iç standardın pik alanına oranı kullanılır.

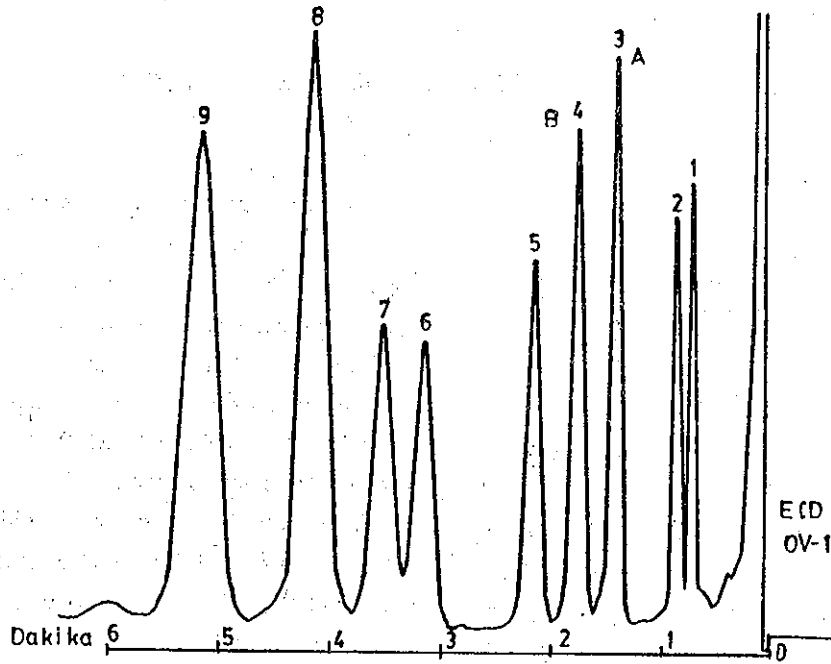
GİRİŞ

İç standart (internal standard) tekniği kromatografide yaygın bir şekilde kullanılır. Gaz Kromatografik (GLC) analizlerde kolona çok küçük miktarlar (ekseriya bir veya birkaç mikrolitre) verildiğinden, iç standart tekniği tayin metodunun verimliliğini önemli ölçüde düzeltir. Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisinde (HPLC) analizlerde, modern örnek enjektörle-
duğundan, daha iyi bir enjeksiyon kesinliği (precision) elde edilir.

Yüksek Basınç Sıvı Kromatografisiyle (HPLC) analizlerde, modern örnek enjektörle-
riyle enjeksiyon blokundaki lup (loop) hacmi kısmen doldurulduğunda, enjeksiyon prezisyonunun % 0,3; tamamen doldurulduğunda ise enjeksiyon prezisyonunun % 0,05 olduğu rapor edilmiştir (HAEFELFINGER, 1981). Bu mükemmel sonuçlar iç standart katmadan modern örnek enjektörleri kullanılarak elde edilmektedir. Bu yüzden HPLC metodlarında iç standart ilavesi gerekli mi yoksa değil mi sorucu ortaya atılmaktadır.

Bu yayında iç standardın deneyin verimliliğine nasıl etki ettiği bir örnekle açıklanmış ve bazı durumlar tartışılmıştır.

Kromatografik usullerin kantitatif açıdan kesinliği hakkında bilgi elde etmek için bazı formüller kullanılabilir. Şekil 1 de, Gaz Kromatografisinden alınan pestisid analiz kromatogramı görülmektedir. Böyle bir kromatogram HPLC den veya İnce Tabaka Kromatografisinden (TLC) de alınmış olabilir. Pik A, tayin edilecek bileşenin, pik B ise iç standardın pikidir. Kromatogramdaki pikler : 1 — Alfa BHC, 2 — Gama BHC (Lindane), 3 — Heptachlor, 4 — Aldrin, 5 — Haptachlorepoxyde, 6 — Dieldrin, 7 — Endrin, 8 — O, P' - DDT, 9 — P, P' - DDT dir. Yani tayin edilecek bileşen Heptachlor (A piki), iç standart olarak da Aldrin (B piki) olsun. A ve B piklerinin alanlarını ise a ve b ile gösterelim.



Şekil 1. GLO den alınan pestisid analiz kromatogramı.

Aynı örnek defalarca Gaz Kromatografisine enjekte edildiğinde, bileşenlerin pik alanları değişik varyasyonlar gösterirler. Tablo 1 de 10 enjeksiyon sonucu elde edilen değerler verilmiştir.

ÖRNEK

Şekil 1 de kromatogramı gösterilen örnek

Gaz Kromatografisine 10 defa üstüste enjekte edilmiş, alınan kromatogramlarda A ve B bileşenlerinin alanlarının değişik varyasyonları Tablo 1 de gösterilmiştir. Burada tayin edilecek pestisid heptachlor (A pikli), iç standart ise aldrin (B pikli) dir.

Tablo 1. Pestisid Analizinde Gaz Kromatografik Bulgular

Enjeksiyon sayısı	Heptachlor pikinin (A) alanı (a) (mm ²)	Aldrin pikinin (B) alanı (a) - İç Std. - (mm ²)	Pik alanları oranı Q
1	247	209	1.1818
2	261	223	1.1704
3	257	220	1.1682
4	258	223	1.1570
5	253	218	1.1606
6	260	223	1.1659
7	257	218	1.1789
8	251	216	1.1620
9	253	217	1.1659
10	261	224	1.1652
1	247	209	1.1818
	a = 255.8	b = 219.1	Q = 1.1676
	S = % 1.82	S = % 2.09	S = % 0.66
	a,nis.	b,nis.	Q,nis.
Korelasyon katsayısı, r = + 0.953			

Sonuçları yorumlamak için Heptachlor (A) ve Aldrin (B) piklerinin ayrı ayrı nisbi standart sapmalarını ve korelasyon katsayısını

hesaplamak zorunludur. Bunların nasıl hesaplandığı aşağıdaki tablolarda gösterilmiştir (DÜZGÜNEŞ, 1963).

Tablo 2. Heptachlor (a) ve Aldrin (b) pik alanlarının standart sapmalarının hesaplanması.

Enj.	a			b			Q		
	sayısı	mm ²	(a - a)	(a - a) ²	mm	(b - b)	(b - b) ²	oranı	(Q - Q)
1	247	— 8.8	77.44	209	— 10.1	102.01	1.182	+ 0.014	1.96x10 ⁻⁴
2	261	+ 5.2	27.04	223	+ 3.9	15.21	1.170	+ 0.002	4.00x10 ⁻⁶
3	257	+ 1.2	1.44	220	+ 0.9	0.81	1.168	0.000	0.00
4	258	+ 2.2	4.84	223	+ 3.9	15.21	1.157	— 0.011	1.21x10 ⁻⁴
5	253	— 2.8	7.84	218	— 1.1	1.21	1.161	— 0.007	4.90x10 ⁻⁵
6	260	+ 4.2	17.64	223	+ 3.9	15.21	1.166	— 0.002	4.00x10 ⁻⁶
7	257	+ 1.2	1.44	218	— 1.1	1.21	1.179	+ 0.011	1.21x10 ⁻⁴
8	251	— 4.8	23.04	216	— 3.1	9.61	1.162	— 0.006	3.60x10 ⁻⁵
9	253	— 2.8	7.84	217	— 2.1	4.41	1.166	— 0.002	4.00x10 ⁻⁶
10	261	+ 5.2	27.04	224	+ 4.9	24.01	1.165	— 0.003	9.00x10 ⁻⁶
	2558		195.60	2191		188.9	11.676		5.44x10 ⁻⁴
	a = 255.8		b = 219.1			Q = 1.168			

Tablo 3. Korelasyon katsayısının hesaplanması

Enj.	a	b	(ab)	a ²	b ²
sayısı	(mm ²)	(mm ²)			
1	247	209	51623	61009	43681
2	261	223	58203	68121	49729
3	257	220	56540	66049	48400
4	258	223	57534	66564	49729
5	253	218	55154	64009	47524
6	260	223	57980	67600	49729
7	257	218	56026	66049	47524
8	251	216	54216	63001	46656
9	253	217	54901	64009	47089
10	261	224	58464	68121	50176
	2558	2191	560641	654532	480237

Sırasıyla aşağıdaki formüllerden rakamlar yerlerine yerleştirilerek a, b ve Q nun standart sapmaları bulunur.

$$S_a = \frac{\Sigma (a - a)^2}{n - 1} = \frac{195.6}{10 - 1} = 4.66$$

$$S_b = \frac{\Sigma (b - b)^2}{n - 1} = \frac{188.9}{10 - 1} = 4.58$$

$$S_Q = \frac{\Sigma (Q - Q)^2}{n - 1} = \frac{0.000544}{10 - 1} = 0.000775$$

Nisbi standart sapmaları (Varyasyon katsayıları) ise :

$$S_{a,nis.} = \frac{S_a}{a} \times 100 = \frac{4.66}{255.8} \times 100 = \% 0.66$$

$$S_{b,nis.} = \frac{S_b}{b} \times 100 = \frac{4.58}{219.1} \times 100 = \% 2.09$$

$$S_{Q,nis.} = \frac{S_Q}{Q} \times 100 = \frac{0.00775}{1.168} \times 100 = \% 1.82$$

a, b ve Q değerlerinin nisbi standart sapmaları Tablo 1'in altına kaydedilmiştir.

Korelasyon katsayısı ise aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır (DÜZGÜNEŞ, 1963).

$$\begin{aligned} \Sigma S_a S_b &= \Sigma ab - \frac{\Sigma a \cdot \Sigma b}{n} \\ &= 560641 - \frac{2558 \cdot 2191}{10} \\ &= 183.2 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \Sigma S_a^2 &= \Sigma a^2 - \frac{(\Sigma a)^2}{n} \\ &= 654532 - \frac{2558^2}{10} \\ &= 195.6 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \Sigma S_b^2 &= \Sigma b^2 - \frac{(\Sigma b)^2}{n} \\ &= 480237 - \frac{2191^2}{10} \\ &= 188.9 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} r_{ab} &= \frac{\Sigma S_a S_b}{\sqrt{\Sigma S_a^2 \Sigma S_b^2}} \\ &= \frac{183.2}{\sqrt{195.6 \times 188.9}} \\ &= + 0.953 \end{aligned}$$

Bu örnekte, tayin edilecek olan Heptachlor isimli pestisidin nisbi standart sapması ($S_{a,nis.} = \% 1.82$), $S_{b,nis.} = \% 0.66$ değerinden daha büyük olduğundan, enjeksiyon hacminin prezisyonu sınırlayıcı faktördür ve iç standart tekniği verimliliği düzeltir. Bu, enjeksiyon hacminin değişikliğinden ileri gelen hatanın iç standart kullanılarak büyük ölçüde ortadan kaldırılabilirdiğini ortaya koyar. Burada

a ve b pik alanları arasında ve aynı şekilde $S_{a,nis.}$ ve $S_{b,nis.}$ değerleri arasında yüksek bir korelasyon (+ 0.953) mevcuttur. Bu yüzden iç standart kullanılması uygundur.

TARTIŞMA

Enjeksiyon hacmindeki değişmeler, örnekte gösterildiği gibi, iç standart kullanılarak ortadan kaldırılabilir.

Korelasyon katsayısının değerine bakılarak aşağıdaki yorumlar getirilebilir (HAEFEL-FINGER, 1981).

Korelasyon katsayısı $r = + 1$ olduğunda : a ve b pik alanları arasında kuvvetli korelasyon vardır. Burada, $S_{b,nis.} < 2 S_{a,nis.}$ bağıntısı vardır. Örneğimizde de bu durum mevcuttur.

Aksi takdirde, en iyi korelasyon altında bile, eğer iç standardın nisbi standart sapmasından iki kat daha fazla ise; bu, bir metodun prezisyonunun iç standartla düzeltilemez olduğunu ifade eder.

Korelasyon katsayısı r , eksi değer aldığımda : Kullanılan iç standart deneyin prezisyonunu önemli ölçüde bozar. Yani iç standart kullanımı fayda yerine zarar veriyor demektir. Çünkü A ve B maddeleri arasında bir korelasyon yoktur. Fakat pek çok kromatografik deneylerde metodolojik değişiklik kaynağı olarak sadece enjeksiyon hacmi gösterilemez. İç standardın nisbi standart sapması, tayin edilen maddenin nisbi standart sapmasından iki kat daha fazla ise, iç standart için optimal olmayan kromatografik şartlar söz konusudur. Tayin edilecek madde ve iç standart birbirine benzer maddeler olmalıdır.

Tayin edilen maddelerin ve iç standardın nisbi standart sapmaları eşit olduğunda : ($S_{a,nis.} = S_{b,nis.}$) : Bu durumda formül $r > 0.5$ dir. Sadece a ve b arasındaki korelasyon katsayısı 0.5 den daha büyük ise iç

standardın kullanılışı, presizyonu düzeltecektir. Aksi halde iç standart kullanımı belirli bir avantaj sağlamaz.

Tayin edilen maddenin nisbi standart sapması iç standardinkinin iki katı olduğunda : $r > 0.25$ ise, iç standart kullanımı presizyonu düzeltecektir.

Kromatografik analizlerde iç standart tekniğinin uygulanması için tavsiyeler :

Aşağıda iç standardın genel şartları verilmiştir.

1. İç standart, kromatogram üzerinde bilinen ve bilinmeyen maddelerden tamamen ayrılmış olmalıdır.
2. İç standart, ilgilenilen madde pikinin yakınında elute edilmiş olmalıdır.
3. İç standardın pik alanı (veya pik yüksekliği) tayin edilecek maddeninkine yakın olmalıdır.
4. İç standart kimyasal olarak ilgilenilen maddeye benzemelidir.
5. İç standart, kimyasal olarak stabil olmalıdır.

Aşağıdaki hususlar biyolojik materyallerden kromatografik analizde mutlaka gözetilmelidir.

1. İç standart biyolojik materyale analizden önce çözeltide ilave edilmelidir. İlaveden sonra iç standardın üniform dağılımını sağlamak için iyice karıştırılmalıdır.
2. Örneğe iç standart ilavesi ekstraksiyondan önce yapılacaksa, iç standart analiz edilen maddeye benzer özellik göstermelidir. Yani, partiyon katsayıları eşit olmalıdır.
3. İç standart, ilgilenilen maddenin bir metaboliti olmamalıdır.
4. İç standart, maddenin metabolitleriyle veya örnekteki diğer bileşiklerle girişim yapmamalıdır.

Uygun olmayan yaklaşımlar aşağıda verilmiştir.

1. İç standardın organik çözücüsünün evaporasyonundan sonra, kalıntıya biyolojik örneğin ilave edilmesi ve daha sonra karıştırılması uygun değildir. Bu şartlar altında iç standardın tamamen çözünmesini her durumda garanti etmek mümkün değildir.
2. PHLC ile analizden önce, örneğin ekstraksiyonunu takiben ekstrakta bir iç standart ilavesi, modern enjektörlerle enjeksiyon hacminde mükemmel presizyon sağlandığından sadece HPLC de mutlak gerekli olmamaktadır. İstisna olarak ekstrakt uçucu bir çözücüyle enjekte ediliyorsa, iç standart ilavesi evaporasyon kayıplarını karşılayabilir.

SONUÇ

Bu yayının amacı, iç standart tekniğinin denemenin presizyonunu nasıl etkilediğini göstermektir. Herhangi bir durumda, analiz edilen bileşenin ve iç standardın nisbi standart sapmaları ve korelasyon katsayısı dikkate alınmalıdır. Bu yolla, metodun presizyonunun harici (external) kalibrasyonla mı yoksa iç standartla mı daha iyi olduğunu tesbit etmek mümkündür. İç standardın kullanılışı bir düzeltme sağlamadığı veya hatta presizyonu bozduğu zaman, analiz metodu irdelenerek kritik işlem basamakları tesbit edilir. Eğer bu basamaklar düzeltilebilir veya ortadan kaldırılabilir ise, iç standart tekniği kullanılmalıdır. Bu mümkün olmazsa, daha kolay tatbik edilebilen harici (external) kalibrasyon tekniğini iç standart tekniğine tercih etmek gerekecektir. Tarımsal ürünlerde ilaç kalıntısının kromatografik analizinde, iç standart tekniğinin kullanılması istendiğinde; metodun presizyonunu bozmadığı önceden tetkik edilmelidir.

SUMMARY

INTERNAL STANDARD TECHNIQUE IN CHROMATOGRAPHY

It is possible to determine by use of the some statistical formulas how the internal standard technique affects the reproducibility of a given chromatographic method.

The internal standard technique is widely used in chromatography. An accurate amount of a known compound is added to the sample solution prior to analysis. The internal standard technique considerably improves the reproducibility of determinations. Errors are often reduced in the analytical measurement

since any loss of sample is compensated by the loss of an equivalent amount of internal standard. Instead of the absolute value of the peak area (or peak height), the ratio of the peak area of the compound to the peak area of the internal standard is used in calibration and in the evaluation of the unknown samples.

KAYNAKLAR

1. DÜZGÜNEŞ, O. 1963. Bilimsel Araştırmalarda İstatistik Prensipleri ve Metodları, Ege Üniversitesi Matbaası, İzmir. 375 s.
2. HAEFELFINGER, P. 1981. Limits of the internal standard technique in chromatography. *Journal of Chromatog.* 218: 73 - 81.
3. MACLEOD, A.J., 1973. Instrumental Methods of Food Analysis. Paul Elek (Scientific Books) Ltd, 54 - 58 Caledonian Road, London N. 1, 9RN. pp. 802.
4. PARRIS, N.A., 1976. Instrumental Liquid Chromatography-A Practical Manual on High-Performance Liquid Chromatographic Methods-Journal of Chromatography Library - Vol. 5 - Elsevier Scientific Publishing Company, Amsterdam, The Netherlands. pp. 329.
5. SKOOK, D.A. and D.M. WEST., 1971. Principles of Instrumental Analysis, Holt, Rinehart - Winson Inc. London. pp. 710.