

# İNCE-TABAKA KROMATOĞRAFI

Düzlemsel kromatografi yöntemleri:

- ince-tabaka kromatografi (TLC)
- kağıt kromatografi (PC)
- elektrokromatografiyi

Durgun faz

düzgün ya kendi kendini destekleyen ya da bir cam, plastik veya metal yüzeye kaplanmış ince bir tabakadır

Hareketli faz

durgun faz içinde kapiller etkisi ile hareket eder, bazen

yer çekimi veya elektriksel potansiyel bu harekete yardım eder.

Düzlemsel kromatografi bazen iki-boyutlu kromatografi olarak adlandırılır.

Günümüzde, birçok düzlemsel kromatografi, ince tabaka tekniğine dayanmaktadır; bunun sebebi, TLC'nin

- hızlı olması
- daha iyi ayırma gücüne sahip olması
- kağıttan daha duyarlı olması

# İNCE-TABAKA KROMATOĞRAFİ

Bu teknik 1800 lerde keşfedilmiştir.kromatografi nren yazımı anlamına gelir. Tüm kromatografik yöntemleriki faz arasında seçici dağılıma dayanır.sodyum klorürü ele alalım. Tuz suda çözünür yağda çözünmez.eğer tuz salata sosuna eklenir ve karıştırılırsa tuz sosun sirke kısmında kalır yağda çözünmez. Tuzun suya affinitesi yüksektir.

# İnce-Tabaka Kromatografinin Kapsamı

Teorik olarak durgun ve hareketli fazların tipleri ve uygulamaları açısından, ince-tabaka ve kolon sıvı kromatografi oldukça benzerdir.

Gerçekte, ince tabaka kromatografinin önemli bir uygulaması ve bu konunun bu bölüme konmasının sebebi, kolon sıvı kromatografi ile ayırmaların gerçekleştirmek için en uygun şartların geliştirilmesi için bir yol gösterici olmasıdır.

Bu işlemin avantajları:

- hızlı olması
  - ince tabaka denemeleri ile yapılan araştırmaların düşük maliyeti
- Bazı çalışmacılar, ince tabaka deneylerini daima kolon deneylerinden önce kullanmaktadırlar.

- İnce tabaka kromatografi,  
Kriminal laboratuvarlarında,
- ilaç sanayisinde ürün saflığı tayininde
    - klinik laboratuvarlarda
  - biyokimyasal ve biyolojik çalışmalarda
    - endüstriyel laboratuvarlarda
- kullanılmaktadır

Bu yaygın uygulama alanının bir sonucu olarak, TLC ile, en az HPLC'deki kadar çok sayıda analiz yapıldığı hesaplanmıştır.

# İnce-Tabaka Ayırmaları Nasıl Gerçekleştirilir

Tipik ince-tabaka ayırmaları, iyice öğütülmüş partiküllerden meydana gelen ince ve yapışık bir tabaka ile kaplanmış düzgün bir cam veya plastikten yapılmış plakalarda gerçekleştirilir.

Partiküller,  
adsorpsiyon  
normal veya ters-faz dağılma  
iyon-değiştirme  
boyut-eleme  
kolon kromatografide  
anlatılanlara benzemektedir.

Aynı zamanda hareketli faz da, yüksek-performanslı kolon sıvı kromatografide kullanılanlara benzer.

# İnce-Tabaka Plakaları

İnce-tabaka plakaları, piyasadaki farklı kaynaklardan tabaka başına 1\$-10\$ fiyatlarla temin edilebilmektedir.

Genel olarak kullanılan plaka boyutları:

5×20 cm

10×20 cm

20×20 cm

Piyasadaki plakalar,

- Klasik:** partikül boyutu 20  $\mu\text{m}$  veya daha büyük olan nispeten kalın tabakalara (200-250  $\mu\text{m}$ ) sahiptir ve 25 dakikalık bir yürütme süresi için, 12 cm içinde, 2000 teorik tabaka vardır.
- Yüksek-performanslı:** film kalınlığı 200  $\mu\text{m}$  ve partikül çapı 5  $\mu\text{m}$  veya daha küçük taneciklere sahiptir ve 10 dakikalık bir yürütme süresi gerektiren 3 cm'lik bir kısımda 4000 teorik tabaka mevcuttur.

Yüksek-performanslı tabakalar daha kısa sürede daha keskin ayırmalar sağlarlar.

Yüksek-performanslı plakaların, numune kapasitesinin çok küçük olması gibi bir dezavantajı vardır.



## Numune Uygulaması

Numune uygulaması, özellikle kantitatif ölçmelerde belki de ince-tabaka kromatografinin en kritik konularından birisidir.

- Numune, genellikle % 0,01-% 0,1'lik çözeltisi halinde, plakanın bir kenarından 1-2 cm mesafede bir nokta halinde uygulanır.

En iyi ayırma verimi için,

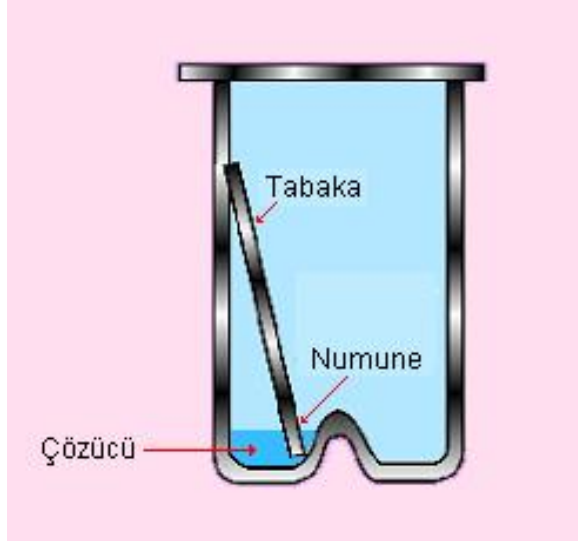
- Nokta minimum bir çapa sahip olmalıdır (kalitatitif çalışmalar için yaklaşık 5 mm ve kantitatif çalışmalar için daha küçük çaplı).
- Seyreltik çözeltiler için aralarda kurutma yapılarak üç veya dört defa üst üste numune uygulanır.

Numunenin el ile uygulanması, numune içeren kılcal bir borunun ucu plakaya değdirilerek veya bir hipodermik şırınga kullanılarak yapılır.

Numune uygulamasının doğruluğunu ve kesinliğini artırmak için artık piyasada birkaç tip mekanik numune uygulama sistemleri bulunabilmektedir.

# Plakaların Yürütülmesi

Plaka yürütme, numunenin durgun fazda, hareketli bir faz yardımıyla taşınması işlemidir.



Şekil 3-30.  
Tipik bir yürütme kabı.

Bu işlem, sıvı kromatografideki elüsyon ile benzer anlamdadır.

Bir plakanın yürütülmesi için en genel yol,  
•plakanın bir kenarına yakın bir yere numuneyi damlatmak ve bu noktayı bir kurşun kalemle işaretlemektir.

•Numunenin çözücüsü buharlaştıktan sonra, plaka, geliştirme çözücüsünün buharıyla doymuş kapalı bir kap içine yerleştirilir.

•Plakanın bir ucu, yürütücü çözücüye daldırılır; numune lekesinin yürütücü sıvıya doğrudan temasından da kaçınılır.

- Yürütme sıvısı, küçük partiküller arasında kapiler etkileşme olayı ile yukarı doğru tırmanır
  - Geliştirme çözücüsü numunenin uygulandığı noktadan geçerken numuneyi çözer
    - numuneyi plakanın üst kısmına doğru taşır
    - bu sırada numune hareket eden çözücü ve durgun faz arasında kendiliğinden dağılmaya uğrar
    - Yürütücü çözücü, plaka uzunluğunun yarısını veya üçte ikisini geçtikten sonra plaka kap içinden çıkartılır ve kurutulur
    - Daha sonra bileşiklerin konumları herhangi bir yolla tayin edilir

## Plaka Üzerinde Analitlerin Yerinin Belirlenmesi

Ayrılmadan sonra, numune bileşenlerinin yerinin belirlenmesi için çeşitli yöntemler kullanılır.

Birçok organik karışım için

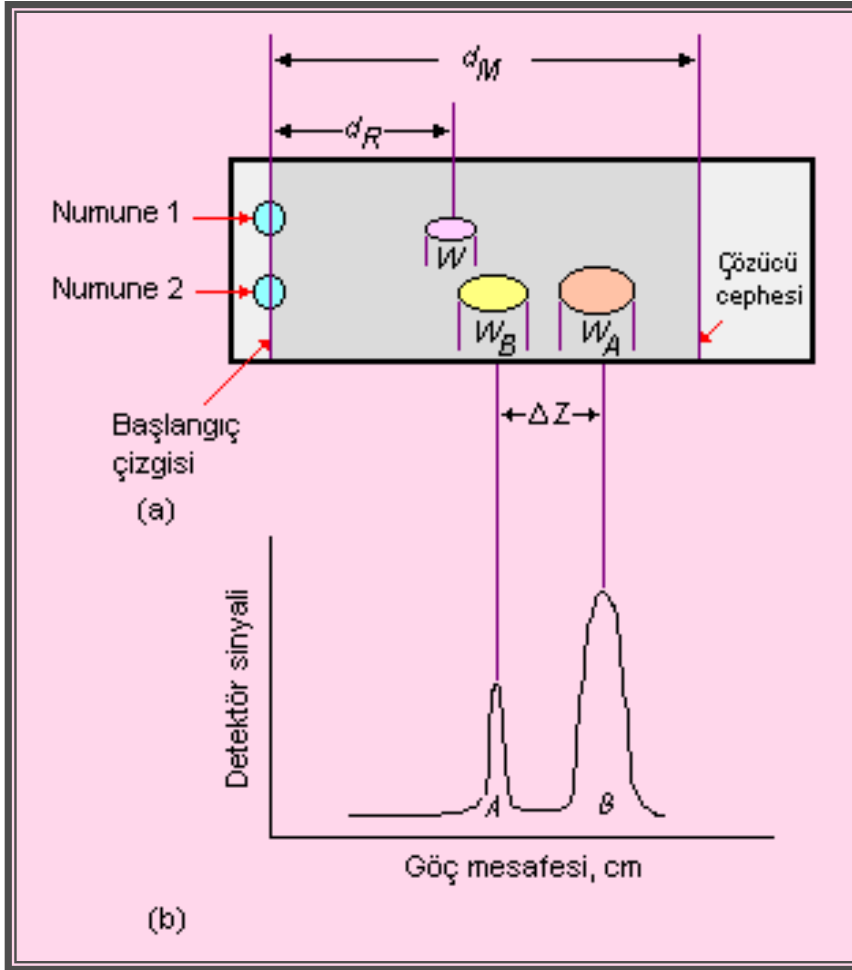
- iyot çözeltilerinin
  - sülfürik asit çözeltilerinin
- sprey halinde püskürtülür

Bu reaktiflerin her ikisi de organik bileşenlerle koyu renkli ürünler oluşturmaktadır

Aynı zamanda birkaç özel reaktif de (ninhidrin gibi) ayrılmış bileşenlerin yerlerinin belirlenmesi için kullanışlıdır.

Bir diđer belirleme yöntemi,  
durgun faza floresans özelliđi olan bir madde emdirilmesi  
esasına dayanır.

- Yürütme işleminden sonra, plaka ultraviyole işığı altında incelenir.
- Numune bileşenleri floresans özelliğindeki maddenin floresansını bastırır ve bütün plaka floresans işması yapar.
- Sadece numune bileşenlerinin bulunduđu yerler yapmaz.



Şekil yürütme işleminden sonra bir plakadaki görüntünün ideal olarak çizilmiş halini göstermektedir.

Numune 1 : bir bileşenli  
Numune 2 : iki bileşenli

Genellikle gerçek plakadaki lekeler, şekilde görüldüğü gibi simetrik olmayan, kuyruklanmış lekelerdir.

Şekil 3-31. İnce-tabaka kromatogramları.

## İnce-Tabaka Plakalarının Performans Özellikleri

Kolon kromatografi ile ilgili, Bölüm 1B'de geliştirilen terimlerin ve ilişkilerin bir çoğu küçük değişikliklerle ince-tabaka kromatografiye de uygulanabilir.

Yeni bir terim olan geciktirme faktörü veya  $R_F$  faktörü, TLC'ye özgüdür.



# Geciktirme Faktörü

Bu madde için geciktirme faktörü şöyledir

$$R_F = \frac{d_R}{d_M} \quad (3-12)$$

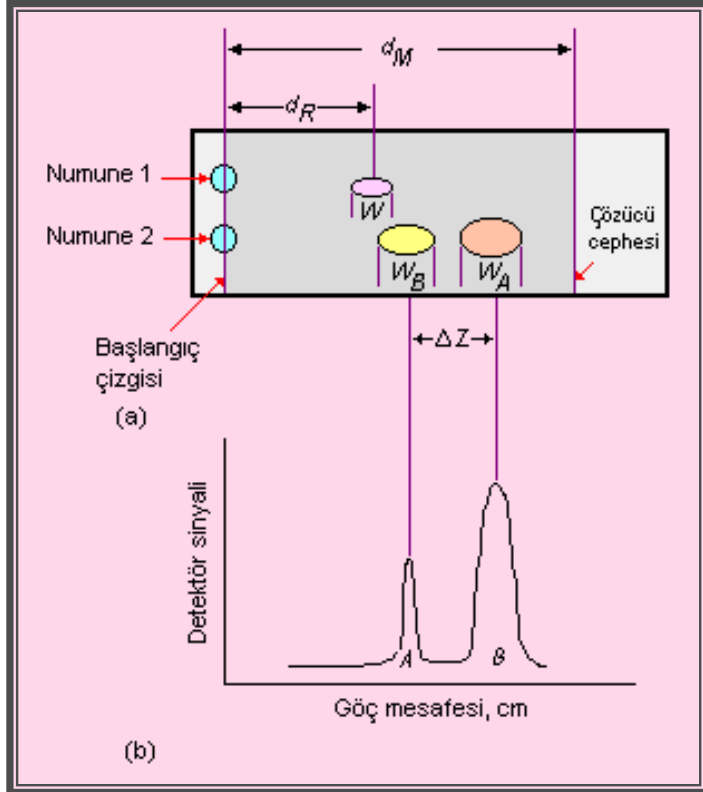
Burada  $d_R$  ve  $d_M$ , başlangıç noktasından itibaren, lekenin ve sıvı ön cephesinin doğrusal uzaklıklarıdır.

$R_F$  değerleri,

alınmayan maddeler: 1

hiç yürümeyenler: 0

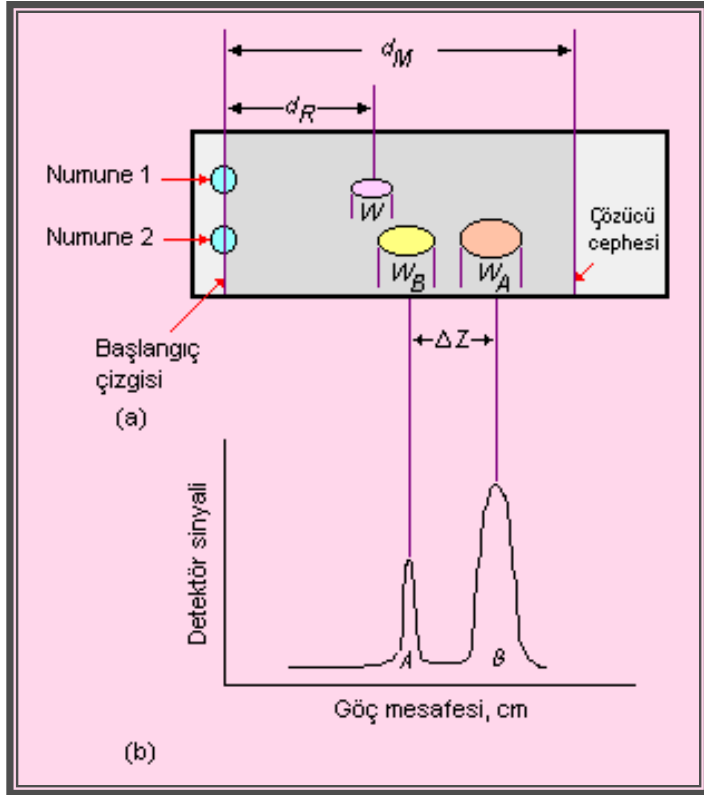
Lekelerin simetrik olmadığı durumlarda  $d_R$  mesafesinin maksimum şiddetin olduğu konumdan ölçülmesi gerekir.



# Alıkonma Faktörü

Çizelge 1-5'deki bütün eşitlikler ince-tabaka kromatografiye kolaylıkla uyarlanabilir. Bu eşitliklerin uygulanabilmesi için sadece Şekil 3-31'de tanımlanan  $d_R$  ve  $d_M$ 'nin, tanımlanan  $t_R$  ve  $t_M$  ile ilişkilendirilmesi gereklidir.

Bu ilişkileri elde edebilmek için Şekil 3-31'deki kromatogram 2'deki tek maddeyi ele alalım. Burada  $t_R$  ve  $t_M$  zamanları, hareketli fazın ve çözünen maddenin sabit bir mesafeye gelebilmeleri için (bu durumda  $d_R$ ) gerekli olan süredir. Hareketli faz için bu süre, mesafenin doğrusal hızı ( $u$ ) bölümüne eşittir veya;



$$t_M = d_R / u \quad (3-13)$$

Ancak çözünen madde, hareketli faz  $d_M$  mesafesine erişinceye kadar bu noktaya ulaşamaz. Bu sebeple;

$$t_R = d_M / u \quad (3-14)$$

Eşitlik 3-13 ve 3-14, Eşitlik 1-8'de yerine konulacak olursak, şu bağıntı ele geçer:

$$k' = \frac{d_M - d_R}{d_R} \quad (3-15)$$

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

Alıkonma faktörü  $k'$ , Eşitlik 3-15'in aşağıdaki gibi yazılmasıyla geciktirme faktörü cinsinden de ifade edilebilir:

$$k' = \frac{1 - d_R / d_M}{d_R / d_M} = \frac{1 - R_F}{R_F} \quad (3-16)$$

Bu yolla elde edilen alıkonma faktörleri, kolon kromatografinin geliştirilmesi için bir yöntem olarak kullanılabilir.

Ancak, alıkonma faktörlerinin ince-tabaka kromatografi ile elde edilmesi, genellikle bir kolondaki verilerden elde edilmesinden daha basit ve çok daha hızlıdır.

$$k' = \frac{d_M - d_R}{d_R}$$

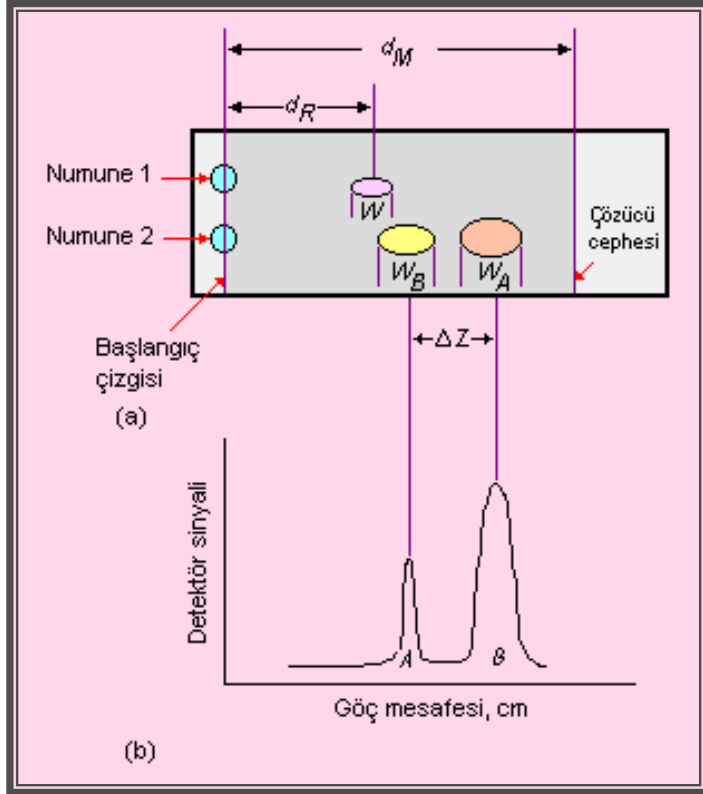
## Plaka Yükseklikleri

Verilen bir dolgu maddesi için yaklaşık plaka yükseklikleri, ince-tabaka kromatografi ölçümleri ile türetilebilir. Buna göre Şekil'de numune 2 için tabaka sayısı aşağıdaki eşitlikle verilir.

$$N = 16 \left( \frac{d_R}{W} \right)^2 \quad (3-17)$$

Buna göre tabaka yüksekliği ise şöyledir:

$$H = d_R / N \quad (3-18)$$



# İnce-Tabaka Kromatografinin Uygulamaları

## Kalitatif İnce-Tabaka Kromatografi

$R_F$  değeri,

- numune miktarı
- ince-tabaka plakası
- yürütme sırasındaki şartlara bağlıdır.

Tek bir kromatogramdan elde edilen veriler, genellikle bir karışımdaki farklı türlerin belirlenmesi için yeterli bilgi sağlamaz.

Ayrıca,

iki farklı çözücünün, verilen şartlar altında, tamamen aynı veya oldukça yakın  $R_F$  değeri vermeleri mümkün olabilmektedir.

## $R_F$ Deęerini Etkileyen Deęişkenler

$R_F$  değerleri, ancak iki anlamlı sayı ile tekrar elde edilebilir değerlerdir.

Birden çok plaka kullanılıncaya, anlamlı rakam sayısını bir indirerek daha geçerli bir kesinlik elde edilebilir.

$R_F$  deęerinin büyüklüğünü tayin eden en önemli faktörler:

- durgun fazın kalınlığı
- hareketli ve durgun fazın nem içerięi
  - sıcaklık
- yürütme kabının hareketli faz buharı ile doygunluk derecesi
  - numunenin miktarı

Bu faktörlerin tamamının kontrolü genellikle pratik değildir.

Ancak  $R_F$  yerine bağıl geciktirme faktörü ( $R_X$ ) konulmasıyla bu etkilerde kısmi iyileştirmeler elde edilebilir. Burada;

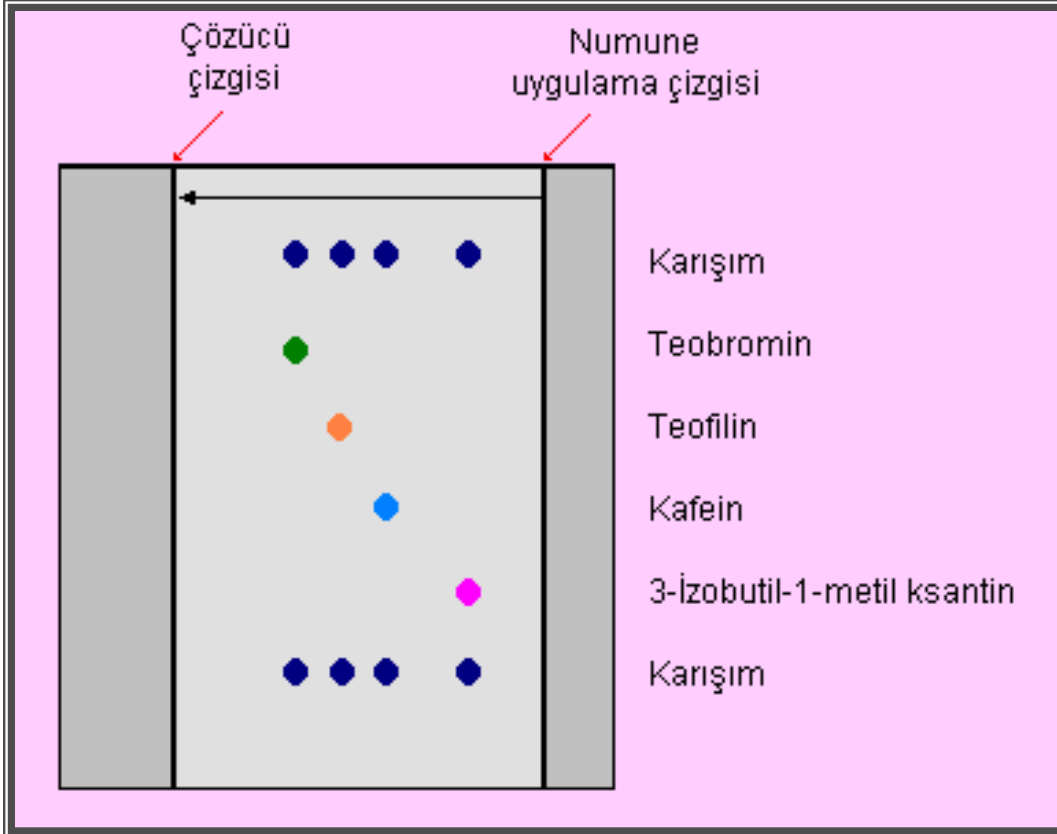
$$R_X = \frac{\text{analitin göç yolu}}{\text{standart maddenin göç yolu}}$$

tanımlaması geçerlidir.



## Standart Maddelerin Kullanılması

Bir numunedeki bileşenlerin çoğu zaman denemelerle belirlenmesini sağlayan bir yöntem, bilinmeyen numunenin ve bilinmeyen numunedeki türlere benzeyen saf maddelerin aynı plakaya uygulanmasıdır.



**Şekil 3-32.** Ksantin türevlerinin bir C-18 ters-faz plakada ayrılmaları. Hareketli faz metanol /0,1 M  $K_2HPO_4$  -55:45 v/v). Deteksiyon, iyot buharı. Geliştirme süresi: 1 saat,  $R_F$  değerleri: teobromin 0,68; teofilin 0,56; kafein; 0,44 3-izobütil-metil ksantin 0,21.

Bilinmeyen madde ve standart için elde edilen  $R_F$  değerlerinin karşılaştırılması, numunedeki bir bileşenin belirlenmesi için kuvvetli deliller ortaya koyar (Şekil).

Ancak daima, başka yollarla bunun kanıtlanması gereklidir.

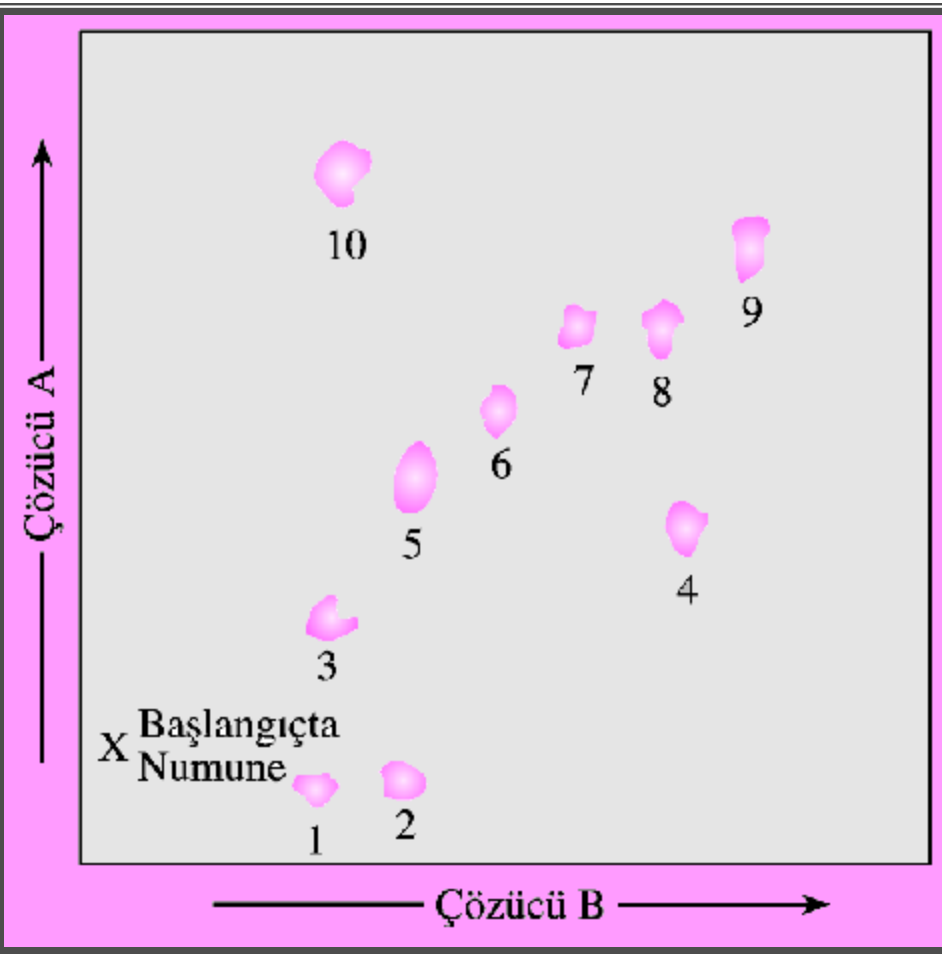
Uygun bir kanıtlama deneyi, farklı durgun fazlar ve hareketli fazlarla birlikte farklı görünürleştirme reaktifleri de kullanarak deneyi tekrarlamaktır.

## Elüsyon Yöntemleri

Ayrılmış farklı analit türlerinin belirlenmesi, lekenin kazınması ve çözme teknikleri kullanılarak da kanıtlanabilir veya doğrulanabilir:

- Analitin oluşturduğu alan, bir jilet veya bir spatül ile plaka üzerinden kazınarak ince parlak bir kağıt üzerine toplanır.
- Bunlar bir deney tüpüne veya daha başka kap içine aktarılır Analit uygun bir çözücü ile çözülür.
- Santrifüjlenerek veya süzülerek durgun fazdan ayrılır.
- Kütle spektrometri, nükleer manyetik rezonans veya infrared spektroskopi gibi tekniklerle teşhis işlemleri uygulanır.

# İki-Boyutlu Düzlemsel Kromatografi



Numune kare şeklindeki bir plakanın bir köşesine uygulanır ve yukarı yönde A çözücüsü uygulanarak geliştirme işlemi gerçekleştirilir. Daha sonra bu çözücü buharlaştırılarak uzaklaştırılır ve plaka 90 derece döndürüldükten sonra yürütme işlemi B çözücüsü ile yukarı yönde tekrar uygulanır. Çözücü uzaklaştırıldıktan sonra, amino asitlerle pembeden mora kadar değişen renkler veren ninhidridin reaktifi püskürtülerek amino asitlerin yerleri tayin edilir. Bu lekeler, bunların yerleri ile, bunların standartlarının yerleri karşılaştırılarak belirlenir.

**Şekil 3-33.** Bazı amino asitlerin iki-boyutlu ince-tabaka kromatogramları (Silikajel) çözücü: toluen/2-kloroetanol/piridin çözücü B: kloroform/benzilalkol/asetik asit. Amino asitler: (1) aspartik asit, (2) glutamik asit (3) serin, (4)  $\beta$ -alanin, (5) glisin, (6) alanin, (7) metiyonin, (8) valin (9) izolösin ve (10) sistein.

## Kantitatif Analiz

Numunede bulunan bileşenlerin miktarının yarı kantitatif tayini,  
lekelerin alanı standarda ait lekenin alanı ile karşılaştırılarak yapılabilir.

Daha iyi veriler,

- plaka üzerindeki lekenin kazınması
- analitin durgun fazdan ekstraksiyonu
- analitin uygun bir fiziksel veya kimyasal yöntemle ölçülmesiyle elde edilebilir.

Üçüncü bir yöntemde ise,  
tarayıcı bir dansitometre, lekenin yaydığı floresans veya yansıma ışınlarını ölçmekte kullanılabilir.