

Kristalizasyon Uygulaması:

Saf Olmayan Asetanilidin Kristalizasyonu

0.1 g kirlili asetanilid tartılır, üzerine 20ml distile su konur kaynayan dek bek alevinde ısıtılır, pileli süzgeç kağıdından süzülür. Süzüntü kristallenmek üzere serin bir yere bırakılır. Oluşan kristaller darısı alınmış düz süzgeç kağıdından süzülür, etüvde veya oda ısısında kurutulur. Maddenin saflığını kontrol etmek için erime noktası tayini yapılabilir.

Asetanilid: $C_6H_5NHCOCH_3$

Asetanilid E.N.: 113-115°C

Sorular

1. Kristallendirme işleminde safsızlıkların ayrılması nasıl yapılabilir, yazınız.
2. Kristalizasyonda kullanılacak çözücünün özelliklerini sıralayınız.
3. Kristalizasyonda renkli ürünün renginin giderilmesi ve yağ oluşumunun önlenmesi için neler yapılabilir?

3.4. KROMATOĞRAFI

Kromatografinin ilk kez 1900'lü yılların başında Rus botanikçi Michael Tswett tarafından geliştirildiği ve kullanıldığı kabul edilir. Tswett, cam bir kolonda, $CaCO_3$ adsorbanı üzerinden bitki ekstresinin petroleterli çözeltisini geçirmiş ve kolonda sarı, yeşil bantlarla bir ayırma işleminin olduğunu görmüştür. Bu alandaki ilk yayınların Rusça olması nedeni ile diğer araştırmacıların ilgisini çekerek gelişme sağlaması 1930'lu yılları bulmuştur.

Kromatografi, bir karışımı oluşturan farklı kimyasal maddelerin, birbiri ile karışmayan iki faz arasındaki dağılım dengelerine veya farklı etkileşmelerine dayanarak birbirlerinden ayrılmalarını sağlayan bir yöntemdir. Diğer bir tanım ile kromatografi, bir karışımdaki farklı kimyasal maddelerin, iki ayrı faz arasında adsorbsiyon, çözünürlük, kapillarite, iyon

değişimi veya moleküler eleme gibi esaslara dayanarak ayırma ve ayrı ayrı elde edebilme işlemlerine verilen genel isimdir.

Kromatografi ile ayrılan maddeler teşhis edilebilirler, izole edilebildikleri için de bu, aynı zamanda bir saflaştırma yöntemidir. Başka bir ifade ile ayrılan maddelerin teşhislerini ve miktar tayinlerini mümkün kıldığı için kromatografi, kalitatif ve kantitatif tayin yöntemidir.

Kromatografik yöntemlerin hepsinde ortak olan nokta:

Stasyoner faz: Sabit (durgun) fazkatı veya sıvı,
Mobil faz: Hareketli faz.....sıvı veya gaz olabilir.

Karışımı (*numune*) oluşturan komponentler: Karışımı (*numune*) oluşturan komponentler, birbiri ile karışmayan bu iki faz (stasyoner-mobil) arasında farklı göç sergiler ve böylece birbirlerinden ayrılabilirler.

3.4.1. Kromatografik Analizlerin Sınıflandırılması

3.4.1.1. Dayandıkları Prensiplere Göre Sınıflandırma

- a- Adsorbsiyon kromatografisi
- b- Dağılıma kromatografisi
- c- İyon değiştirici kromatografi
- d- İyon çifti kromatografisi
- e- Moleküler eleme kromatografisi
- f- Affinite kromatografisi
- g- Elektro kromatografi

a- Adsorbsiyon Kromatografisi: Adsorbsiyon, katı bir madde ile sıvıda çözünen bir bileşik arasındaki bir yüzeysel etkileşimdir. Burada stasyoner faz adsorbsiyon kapasitesi yüksek bir katı (Al_2O_3 , Silicagel), mobil faz ise gaz veya çoğunlukla olduğu gibi sıvıdır. Adsorbsiyon olayında rol oynayan bağlar;

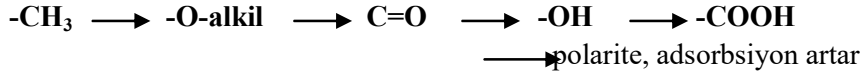
- Van-der-Waals bağları
- Dipol-dipol etkileşim gücü
- Hidrojen bağı

- İyonik bağlar
- Kelat bağları
- nadiren de irreversible (geri dönüşümsüz) kovalan bağlardır.

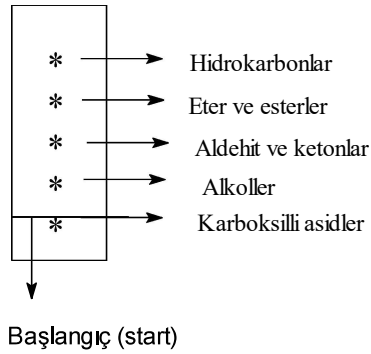
Bu tür kromatografinin temel ilkeleri şunlardır:

a) Doymuş hidrokarbonlar hemen hemen hiç adsorblanmazlar, bu nedenle çok hızlı göç ederler. Doymamış hidrokarbonların adsorbsiyonu çifte bağ sayısı ve ayrıca bunların konjugasyon sayılarının artması ile artar. Sonuç olarak ayırma için aktif bir adsorban ile non-polar bir solvan gerekir.

b) Genel olarak bir hidrokarbona fonksiyonlu grup oluşturulması ile adsorbsiyon affinitesi artar. Fonksiyonlu gruplar arasında şöyle bir sıralama yapılabilir.



Örneğin, çözücü olarak benzen kullanılırsa, eterler ve esterler kromatografi plağında; plağın üst kısımlarında, keton ve aldehitler nisbeten ortasında, alkoller bunların aşağısında ve asitler ise başlangıçta kalır. Böylece ayırma bileşiklerin polaritelerine göre olur.



c) Eğer bir molekülde bir çok sübstitüent varsa adsorbsiyon affinitelerinin kabaca birbirlerini etkilediği söylenebilir. Özellikle sterik etkinin aromatik halkalardaki fonksiyonlu gruplar yönünden önemi vardır.

b- Dağılma Kromatografisi: Dağılma kromatografisinde genellikle her iki faz da sıvıdır. Bu nedenle sıvı-sıvı kromatografisi de denmektedir. Stasyoner faz çoğunlukla mobil fazdan daha polardır (çoğunlukla su) ve katı bir destek (kieselguhr, selüloz vb.) üzerine ince bir film tabakası halinde adsorbe ettirilmiştir. Mobil faz ise stasyoner fazdan daha az polar ve onunla karışmayan bir başka sıvıdan ibarettir. Sıvı-sıvı kromatografisinde bazen stasyoner fazın daha az polar olması istenir. Bu kromatografi şekline “ters faz sıvı-sıvı kromatografisi” denir. Bu yöntem homolog seri maddeleri birbirinden ayırmak için oldukça sık kullanılır. Dağılma kromatografisinde mobil faz bazen gaz olabilir. Bu durumda stasyoner faz, adsorban özelliği olmayan inert bir katıya emdirilmiş sıvıdır. Bu yöntem ile kolay uçucu özellikteki veya gaz olan maddenin kromatografik ayırımı sağlanmaktadır.

Dağılma kromatografisinde Nerst’in dağılma katsayısı geçerlidir. Nerst’e göre; “bir biri ile karışmayan iki sıvı madde karışımında çözünen üçüncü bir maddenin iki ayrı sıvı fazdaki konsantrasyonunun birbirine oranı sabittir.”

$$K = C_s / C_m$$

K: Dağılma (partisyon) katsayısı

C_s: Stasyoner fazdaki konsantrasyon

C_m: Mobil fazdaki konsantrasyon

K değeri büyük ise stasyoner fazdaki konsantrasyon, mobil fazdakinden daha fazladır. Molekül stasyoner fazda daha uzun süre kalıyor anlamına gelir.

c- İyon Değiştirici Kromatografi: Bazı katı maddeler, iyonize olabilen madde çözeltileri ile temasa geldiklerinde solut (bileşenlerine ayrılacak karışım) ile katı madde arasında bir iyon değişimi söz konusu olabilmektedir. İşte bu katı maddelere; iyon değiştiriciler denir. İyon değiştiriciler inorganik veya organik olabilirler. İnorganik olanlara örnek olarak kil ve zeolit verilebilir. Organikler ise analiz işlemlerinde sık kullanılırlar ve “iyon değiştirici reçineler” olarak adlandırılırlar. İyon değiştirici reçineler, iyonlaşabilen gruplar içeren polimer bileşiklerdir ve çoğunlukla küçük kürecikler veya granüller şeklinde bulunurlar. Katyon

değiştirici reçineler ve anyon değiştirici reçineler olmak üzere ikiye ayrılırlar. Katyon değiştirici reçinede, polimerin reçine bölümü anyonik karakterdedir ve polimere ait katyon çözeltildeki başka bir katyon ile yer değiştirir. Anyon değiştirici reçinede ise reçine bölümü katyonik karakterdedir. İyon değiştirici reçineler genellikle stiren ve divinil benzen kopolimerleridir. İyon değiştirici kromatografide stasyoner fazı reçine oluşturur. Mobil faz ise sadece sıvıdır. Bu yöntemde; analizlenen çözeltil, mobil ve stasyoner faz arasında iyonik denge kurallarına göre dağılım gösterir.

d- Moleküler Eleme Kromatografisi: Bu yöntem makro moleküllerin ayrılması için kullanılır. Stasyoner faz ile mobil faz aynı yapı ve bileşimdedir. Bu yöntemde stasyoner faz için destek görevi yapan poröz bir yapıya ihtiyaç vardır. Bu amaçla hidrofilik veya hidrofobik jeller kullanılır.

Hidrofilik jeller: Sulu solvan ile kullanılırlar ve sulu ortamda şişerler. Bu tür moleküler elemeye “Jel filtrasyon kromatografisi” denir. Özellikle protein çözeltilsinin tuzunu gidermek için biyokimya uygulamalarında sıkça kullanılır.

Hidrofobik jeller: Organik solvan ile kullanılırlar. Bu kromatografik uygulamaya “Jel permeasyon kromatografisi” denir.

e- Kaynaşma (affinite) Kromatografisi: Kaynaşma (affinite) kromatografisinde stasyoner faz olarak poliamid kullanılır.

Analizlenecek karışımda bulunan fenoller veya nitro bileşikleri ile poliamid stasyoner faz arasında hidrojen bağları oluşur ve böylece adsorbsiyon gerçekleşir. Burada mobil faz çoğu kez sıvı, nadir olarak da gazdır.

3.4.1.2. Uygulama Tekniğine Göre Sınıflandırma

Kromatografik yöntemler farklı uygulama teknikleri ile zengin bir analiz alanı olarak görülebilir.

A- Yüzey (planar) kromatografi

A₁-İnce tabaka kromatografisi

A₂-Kağıt kromatografisi

A₃-Preparatif kalın tabaka kromatografisi

A₄-Elektrokromatografi (elektroforetik kromatografi)

B- Kolon kromatografi

B₁- Kolon (sütun) kromatografisi

B₂- Gaz kromatografisi

B₃- Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)

B₄- Kapiller elektro kromatografi

A₁ - İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

İTK bir fizikokimyasal ayırma yöntemidir. Hızlı sonuç vermesi, iyi bir rezolasyon (ayırım) sağlaması ve ekonomik uygulama avantajları nedeni ile önemli bir yere sahiptir. Stasyonier faz olarak en çok kullanılan adsorbanlar silicagel, alüminyum oksit, kieselguhr, selüloz ve türevleri ile poliamidlerdir. İTK'da stasyonier faz olarak kullanılan adsorban madde cam, plastik ya da alüminyum plakalar üzerine ince bir tabaka halinde ve homojen kalınlıkta kaplanır. Plakların kaplanması için adsorban madde, 1 : 1.5 oranında distile su ile geniş ağızlı bir balonda hava kabarcığı oluşmamasına özen göstererek, homojen bir karışım elde edinceye kadar iyice karıştırılır. Üzerine yaklaşık 0.5 oranında daha distile su ilave edilir ve tekrar karıştırılır. Tüm bu karıştırma süresi 90 sn. geçmemelidir. Bu şekilde hazırlanan süspansiyon yayma aleti yardımıyla plak üzerine tatbik edilir. Hazırlanan plaklar 110°C lik etüvde 30' tutularak aktive edildikten sonra kullanılır. Aktivasyon önemlidir. Çünkü adsorbanın içerdiği nemin ayırma üzerinde önemli bir etkisi vardır.

İTK'da kullanılan mobil faz bir ya da bir kaç çözücüden ibaret olabilir. Adsorbsiyon kromatografisinde çözücüler elüsyon etkilerine göre yani sürüklenme güçlerine göre eluotop seri olarak adlandırılan bir grup

altında toplanmıştır ve bir çözücünün elüsyon etkisi polaritesi ile artmaktadır. Polarite ise bir bileşiğin “Dielektrik sabiti” ile orantılıdır. O halde dielektrik sabiti büyük bir maddenin polaritesi fazla ve buna bağlı olarak da elüsyon etkisi yüksektir.

Çözücü	20°C deki ϵ (dielektrik değişmezi)	Çözücü	20°C deki ϵ (dielektrik değişmezi)
<i>n</i> -hekzan	1.890	Etilasetat	6.02 (25 °C)
Heptan	1.924	Piridin	12.30 (25 °C)
Siklohekzan	2.023	Aseton	20.70 (25 °C)
CCl ₄	2.238	Etanol	24.30 (25 °C)
Benzen	2.284	Metanol	33.62
CHCl ₃	4.806	Su	80.35
Eter	4.34		

Bilinmeyen bir madde için başlangıçta benzen veya kloroform seçilebilir. Madde startta kalıyor ise kullanılan solvana daha güçlü elüe eden ikinci bir solvan ilave edilir. Aksine madde hızla göç ediyor ve fronta yakın sürükleniyorsa daha zayıf bir elüan seçilmelidir.

Developman olayını etkileyen bazı faktörler bulunmaktadır. Bunlar:

a- Maddenin Polaritesi: Madde ne kadar polar ise adsorban tarafından o kadar çok tutulur.

b- Mobil fazı oluşturan solvanın polaritesi: Mobil faz solvanı ne kadar polar ise madde molekülleri ile stasyonere faz arasındaki bağ o kadar zayıflar. Yani madde plak üzerinde o kadar çok sürüklenir.

c- Adsorbanın Aktivitesi: Adsorban ne kadar çok aktif ise madde ile olan etkileşimi o kadar fazla olur.

İTK kuvvet veya tankları: Yüksek hassasiyet gerektiren çalışmalarda iyi bir atmosfer doygunluğu sağlamak önemlidir. Bu da süzgeç kağıdından faydalanılarak sağlanabilir. Minimum hacim ve buna bağlı avantajları nedeni ile küçük tanklar tercih edilir.

Kromatografik analizlerde kullanılan bazı terimler şunlardır:

Solut: Bileşenlerine ayrılmak istenen maddeler karışımı (numune).

Start: Solutun stasyoner faz üzerinde tatbik edildiği nokta.

Front: Mobil fazın stasyoner faz üzerinde ulaştığı uzaklık.

Developman : Ayrılacak maddeler karışımının uygun bir çözücüdeki çözeltisi küçük damlalar şeklinde plak üzerine uygulanır ve bu plak, uygun bir çözücü sistemi (mobil faz) içeren, sıkı kapatılmış bir tankın içine yerleştirilir. Mobil faz adsorban üzerinde kapiller hareketle yükselirken karışımdaki maddeler de birbirinden ayrılır. Buna plağın developpe edilmesi denir.

Normal bir developmanda start ile front arasındaki uzaklık 10 cm dir. Mobil fazın bir kez 10 cm yükselmesi ile gerçekleştirilen basit developmandan başka daha iyi ayırım sağlayabilen dereceli, çift yönlü ve dairesel developmandan da yararlanılmaktadır.

İTK Uygulama Yöntemi

Mobil faz tank içinde 5-8 mm yüksekliğinde doldurulduktan sonra, tank iç duvarını çepeçevre saracak şekilde temiz bir süzgeç kağıdı yerleştirilir. Böylece tankın çözücü buharı ile doyması sağlanır.

Numunenin uygun çözücüdeki çözeltisi adsorbanla kaplı plağın yan kenarından 1 cm ve alt kenarından 1.5 cm uzakta olacak şekilde plak üzerine uygulanır. Lekeler arası uzaklık 10 mm den az olmamalı ve lekelerin çapları 3-5 mm olmalıdır. Bu şekilde plağın alt kenarından 1.5 cm uzaklıkta bir doğru üzerinde olacak şekilde çözelti, kapiler cam borularla plağa uygulanır.

Hazırlanmış olan plak, doyurulmuş tank içine yerleştirilir ve tabaka üzerinde mobil fazın yükselmesi (maddeler karışımının birbirinden ayrılması işlemi yani developman) sona erdikten sonra plak tanktan çıkarılır. Front sivri uçlu bir kalem ile işaretlenir.

Burada önemli olan, numune çözeltisi ile referans karışım daima plak üzerinde yan yana uygulanmasıdır. Aksi takdirde yani referans çözelti tatbik

edilmemiş ise yorum yapılamaz veya yan yana değillerse hatalı yorumlara gidilebilir.

Herhangi bir sentez ortamı kromatografik olarak incelendiğinde, aşağıda yer alan bilgilere ulaşılabilir.

- a. Reaksiyon ilerlemiyor (kromatogramda sadece başlangıç maddelerine ait lekeler mevcut ise)
- b. Reaksiyon zaman içinde ilerliyor (kromatogramda hem başlangıç maddeleri hem de ürüne ait lekeler varsa)
- c. Başlangıç maddesi veya maddeleri bitmiş ya da tamamen ürüne dönüşmüş,
- d. Bir ara ürün üzerinden sonuç maddeye geçiş söz konusu vb.

Yukarıda anlatıldığı şekilde ayırımı sağlanan madde veya maddelerin tanınması bir başka deyişle lekelerin ortaya çıkarılması için;

- a. Fiziksel yöntemler
- b. Kimyasal yöntemler
- c. Biyolojik ve enzimatik yöntemler uygulanır.

Eğer ayrılan madde UV bölgede kendisi absorpsiyon yapıyorsa ya da 254 nm veya 366 nm dalga boyundaki UV ışınlarına tutulduklarında floresans gösteriyorsa kromatogramda lekelerin belirlenmesi basittir. Aksi halde maddelerin bir kimyasal reaksiyonla renkli türevlerinin oluşturulması işleminden yararlanılarak kromatograma bir belirteç püskürtülür ve madde lekeleri belirgin hale getirilir. Bazı durumlarda biyolojik yöntemlerle de lekeler ortaya çıkarılabilir.

Maddenin tanınması için; görülebilir hale getirilmiş lekelerin orta noktası ile start arasındaki uzaklık hassas olarak bir milimetrik cetvel ile ölçülür (A). Bu uzaklık start ile front arasındaki uzaklık olan developman mesafesine (B) oranlanır.

R_f (Resolusyon faktörü), bir maddenin bir İTK plağında pozisyonunu belirleyen belli koşullarda sabite olabilen bir veridir.

$$R_f = \frac{\text{start ile lekenin orta noktası arası uzaklık (A)}}{\text{start ile front arası uzaklık (Developman mesafesi) (B)}}$$

Daima $R_f < 1$ dir.

Belli koşullar altında, bir bileşiğin R_f değeri fiziksel bir sabitedir ve bileşiğe ait diğer özelliklerinin de belirlenmesi ile maddenin tanınmasına yardımcı olur. Yalnız mutlak bir R_f değerinden söz etmek doğru olmaz. Çünkü şartlara bağlı olarak değişiklik gösterebilir.

R_f Değerine Etki Eden Faktörler:

Adsorban kalitesi: Adsorban partikül büyüklüğü önemlidir. Ancak bu developman süresini etkilerken R_f değeri üzerinde etkisi yoktur.

Tabaka kalınlığı: Sulu yöntemle kaplama tekniğinde standart kalınlık 0.25 mm dir. Ancak kurutma sonucunda bu değer altına düşmekle birlikte Stahl'e göre tekrarlanabilir bir R_f için kalınlık < 0.15 olmamalıdır. Preparatif çalışmalarda 5mm kalınlığa kadar yükselebilir. Tabaka kalınlığının R_f I değiştirmedigi ancak developman hızını değiştirdiği belirtiliyor.

Tabakanın aktifliği: 30-60 dakika – 105-110°C de kurutmak, desikatörde saklamak gereklidir. (Selüloz ise 10 dakika 105 °C de)

Madde miktarı: Bir çok madde için 10-20 µg dır. Fazla madde tatbiki R_f değerinin artmasına veya azalmasına neden olabilir.

Solvan kalitesi: Analiz için pür solvan kullanılmalıdır. Buharlaşmaya bağlı olarak solvan sisteminin oranı değişeceği için sık aralarla yenilenmelidir.

Sıcaklık: Adsorbsiyon kromatografisi, Dağılma kromatografisine oranla sıcaklıktan daha az etkilenir. Genellikle sıcaklıkla R_f değerlerinde artma gözlenir. (18-38 °C arasında önemli değil)

Tank atmosferi: Tank veya kuvet atmosferi önceden solvan sistemi ile doyurulursa developman süresi kısalmır. Doymamış atmosferde R_f değeri yükselir.

Uygulama tekniği: Tanka yerleştirilen kromatoğrafi plağının eğimi az da olsa R_f değerini değiştirebilir. Ancak çıkan, inen veya yatay teknikle farklı R_f değerlerine ulaşılır.

Adsorbanın solvan buharlarını pre-adsorbsiyonu: Daęılma kromatografisi teknięi için önemlidir. R_f deęerlerinde dūřmeye neden olur.

Developman boyutu: Mesafe arttıka R_f biraz artar.

Yan maddeler: Özellikle adsorbsiyon tekniğinde R_f 'i değiştirir.

İTK'nın Avantajları

- 1- Kullanılan temel aletler oldukça basit ve ekonomik,
- 2- Ayırımalar oldukça hızlı (kolon ve kağıttan daha iyi),
- 3- Lekelerin belirlenmesi için korrosif reaktifler kullanılabilir,
- 4- Bir çok uygulama için kesin ve tekrarlanabilir sonuçlar verir,
- 5- Çok değişik adsorban kullanma olanağı sunar,
- 6- Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografisi (HPTLC) sistemi ile
 - a- Densitometrik kromatogram taraması,
 - b- Kantitatif hesaplama ve sonuçların yazdırılması mümkündür.

A₂ - Kağıt Kromatografisi

Başlangıçta çok önemli bir analiz yöntemi olmasına rağmen (özellikle polar-hidrofil bileşikler için) bugün büyük ölçüde yerini İTK'ne bırakmıştır.

Genelde süzgeç kağıdına adsorbe ettirilen maddelerin, uygun bir çözücü yardımı ile kağıt üzerinde farklı olarak hareket etmeleri esasına dayanan bir ayırma yöntemidir. Süzgeç kağıtları yapılarında doğal olarak bir miktar su içerirler. Bu nedenle bu yöntem sıvı-sıvı dağılma kanununun geçerli olduğu bir kromatografidir. Kağıda uygulanan maddelerin birbirlerinden ayrılmaları kağıt üzerinde hareket eden çözücü ile kağıdın içerdiği su arasındaki dağılma farkına bağlıdır. Burada stasyonere (durgun)

faz su molekülleridir, kağıt sadece destek görevi görür. Mobil faz ise bir çözücü ya da çözücüler karışımından ibarettir.

Kağıt kromatografisi ve İTK uygulama yönünden benzerdirler. Hem İTK hem de kağıt kromatografisinde bilinmeyen maddenin tanısını yapabilmek üzere 3 ayrı çözelti hazırlanır.

- Analizlenecek maddeyi içeren çözelti,
- Standart (referans) maddeyi içeren çözelti,
- Hem örnek hem de referans maddeyi eşit konsantrasyonda içeren çözelti.

$$R_f = \frac{R_f (\text{ö})}{R_f (\text{c})} = 1 \longrightarrow \text{Numune referans ile aynı maddedir.}$$

İTK ve Kağıt kromatografilerinden yararlanarak R_m değeri de hesaplanmaktadır.

$$R_m = \log \frac{1 - R_f}{R_f} = \log \frac{1}{R_f} - 1 \quad \text{Formülü ile gösterilir.}$$

Kağıt kromatografisinde değişik developman yöntemleri uygulanır.

- * İnen yöntem: solvan sistemi yukarıdan aşağıya doğru verilir.
- * Çıkan yöntem: solvan sistemi aşağıdan yukarıya doğru verilir.
- * Tek yönlü ve çift yönlü kromatografi
- * Sirküler kromatografi

Sirküler kağıt kromatografisinde, önce daire şeklinde kesilmiş özel kromatografi kağıdının merkezi işaretlenir. Merkezin yaklaşık 1 cm uzağına dairesel şekilde ayrılacak maddeler karışımının çözeltisi uygulanır. Daha sonra merkezde yaklaşık 2 mm çaplı bir halka açılır. Bu sırada uygun çözücü sistemini içeren bir petri kutusunun solvan buharı ile doyması sağlanır. Bunu takiben çözücü ile kromatografi kağıdı arasında köprü vazifesi görecektir şekilde rulo yapılmış bir kağıt ya da pamuk fitil, kromatografi kağıdının

merkezinine açılmış olan halkaya yerleştirilir ve kromatografi kağıdı petri kutusunun ağzına kapatılır. Böyle çözücü bir merkezden kaynaklanan daireler çizerek stasyoner fazda ilerler. Bu arada karışımdaki maddeler, farklı göç ederek R_f leri farklı leke çemberleri oluştururlar.

Çıkan yöntem ise en çok tüp tekniğine göre uygulanır. Burada yine özel kromatografi kağıdı şeritler şeklinde kesildikten sonra, madde çözeltisi alt kenarın yaklaşık 1 cm yukarısına tatbik edilir. Boyutları belli bir cam tüp içine uygun solvan sistemi koyulduktan sonra kağıt şerit bu solvan sistemi yani mobil faz ile temas edecek şekilde tüp içine yerleştirilip ağzı sıkıca kapatılır. Bu şekilde karışımdaki maddelerin ayırımı sağlanmış olur.

Kağıt kromatografisinde de sonuçların değerlendirilmesi için yine R_f değerinden yararlanılır. R_f değeri çeşitli faktörlere bağlı olarak değişkenlik gösterir. Bunlar:

- 1- Kullanılan kağıdın cinsi
- 2- Kullanılan yöntem
- 3- Kullanılan solvan
- 4- Maddenin konsantrasyonu ve tatbik alanı
- 5- Developman yönü
- 6- Sıcaklık

Belli koşullar sağlanmışsa R_f değerleri kağıt kromatografisinde daha güvenilirdir.

A₃ - Preparatif Kalın Tabaka Kromatografisi

İTK'nın esasına dayanan diğer bir kromatografik yöntemdir. İTK'dan farkı adsorban tabaka kalınlığının ve uygulanan madde miktarının fazla olmasıdır. Bu nedenle miligram ya da gram düzeyinde maddelerin ayrılıp izole edilebilmeleri mümkündür. Bu yöntemde, kalın olarak çekilmiş bir adsorban plağına şerit halinde madde çözeltisi tatbik edilir ve developmanın sona ermesinden sonra sürüklenme sonucu oluşan bantlar bir spatülle ayrı ayrı kazınarak alınır, uygun bir solvanla ekstre edilir, süzülür. Sıvı kısım uçurulduktan sonra kalan madde temiz ve uygun bir çözücüde çözülerek kristallendirilir.

B₁ - Kolon (Sütun) Kromatografisi

Ayrılacak karışımdaki maddelerin, bir cam boruya doldurulmuş çok ince parçacıklar halindeki bir adsorbana karşı farklı adsorbsiyon değışmezlerine sahip olmalarına dayanır. Cam borudaki adsorbana stasyonier faz, ayrılmak üzere sütuna konan maddeler karışımını içeren çözeltiye solut, solutun sütun içinde ilerleyip adsorbe ve desorbe olmasını sağlayan taze çözücüye de mobil faz adı verilir. Solut, mobil fazın etkisiyle adsorbe ve desorbe olarak, derece derece aşağı doğru yer alan bandlar meydana getirir. Eğer solutun içerdığı maddeler renkli ise, bunlar sütunda renkli bandlar halinde görülür; floresan özelliğine sahip iseler UV ışıkla görünebilir hale getirilebilirler.

Kolon kromatografisinde adsorbanın iyi bir ayırım yapabilmesi için;

* Yüksek fakat seçici bir adsorbsiyon gücüne sahip olması,

* Yüzey alanının büyük (ince parçalara bölünmüş, partikül çapı çok küçük) olması gerekir.

Kolon kromatografisinde stasyonier faz olarak en çok sellüloz, silicagel, aktif magnezyum silikat, aktif alüminyum oksit kullanılır.

Kolon sütunu kuru ve yaş olmak üzere iki şekilde hazırlanır.

Yaş yöntemine göre sütun hazırlanması: 25 g kadar adsorban madde 75 ml organik çözücü ile iyice karıştırılarak bulamaç haline getirildikten sonra temizlenmiş ve alt kısmına pamuk ve yuvarlak kesilmiş süzgeç kağıdı yerleştirilmiş sütuna yavaş yavaş ve dikkatlice boşaltılır. Sütuna uzun bir cam baget sokularak karıştırmak suretiyle hava kabarcıklarının oluşması önlenir. Sütun bulamaç halindeki adsorbanla dolunca adsorbanın dibe yerleşmesi için beklenir. Cam borunun iç duvarına yapışıp kalmış adsorban tanecikleri de aynı organik çözücü ile yıkanarak sütuna gönderilir. Sütun homojen olarak dolduktan sonra adsorban üzerine yine yuvarlak kesilmiş bir süzgeç kağıdı yerleştirilir. Organik sıvı seviyesinin süzgeç kağıdından en az 4-5 cm yükseklikte olmasına dikkat edilerek numunenin mobil fazdaki çözeltisi bir baget yardımıyla sütunun kenarından dikkatlice ilave edilir. Musluğun damlatma hızı ayarlanır. Üstten devamlı şekilde taze çözücü

ilavesi ile, solutun sütun içinde ilerlemesi sağlanır. İTK ile gözlenerek toplanan farklı madde fraksiyonları elde edilir. Ayrılacak maddelerin yapılarına göre gerektiğinde çözücü karışımları ile elüsyona devam edilebilir. İşlem son fraksiyonun İTK da hiç bir leke vermediği noktada bitirilir.

3.4.1.3. Faz Tiplerine Göre Sınıflandırma

- 1- Sıvı Kromatografisi a- Sıvı / katı kromatografisi (LSC)
b- Sıvı / sıvı kromatografisi (LLC)
2- Gaz Kromatografisi a- Gaz / katı kromatografisi (GSC)
b- Gaz / sıvı kromatografisi (GLC)

Tablo 3.1. Kromatografik yöntemlerin özetlenmesi

Stasyonier faz	Mobil faz	Uygulama şekli	Dayandığı fiziksel prensip
Katı	Sıvı	İTK, Kolon K.	Adsorbsiyon (katı faz iyon değiştirici reçine ise iyon değişimi)
Sıvı	Sıvı	İTK, Kolon K., Kağıt K., HPLC	Dağılma
Katı	Gaz	Gaz / Katı krom.	Adsorbsiyon
Sıvı	Gaz	Gaz / Sıvı krom.	Dağılma

Kiral Bileşiklerde Enansiyomer Ayırımı

(+) ve (-) enantiomerlerin eşit orandaki karışımına rasem şekli denir. Enantiomerlerin polarize ışığı çevirme açısı dışında diğer fizikokimyasal özellikleri aynıdır. Enantiomerlerin çözünürlükleri birbirinin aynı olduğundan rasem bileşiklerin rezolüsyonu (enantiomerlerine ayırma işlemi), diğer karışımların ayrılması kadar basit değildir. Genelde, enantiomerlerin diastereomer tuzlara dönüştürülmesi ile fizikokimyasal özelliklerinde oluşturulan farklarla ayırımları kolaylaştırılmaktadır. Kromatografik çalışmalarda da bu amaçla uygulanan bazı yöntemler aşağıda yer almaktadır. Yine bu yöntemlerde de esas amaç, diastereomer tuzların oluşturulmasıdır.

a- Kiral Türevleme Bileşikleri Kullanılarak Yapılan Ayırım: (Chiral Derivatizing Agent=CDA): Akiral stasyonel fazda; CDA ile karışım maddelerinin (rasem şekli) reaksiyonu sonucu oluşan diastereoizomer türevlerinin ayrılması sağlanır.

b- Kiral Mobil Faz Additifleri (CMA) Kullanılarak Yapılan Ayırım: Akiral stasyonel fazda; CMA ile karışım maddelerinin (rasem şekli) reaksiyonu sonucu oluşan diastereoizomer türevlerinin ayrılması sağlanır. Burada mobil faza Chiral-Counter-Ions (CCI) ilavesi gerekmektedir.

c- Kiral Stasyonel Faz Kullanılarak Yapılan Ayırım: Kiral stasyonel fazda, karışım enantiomerlerin verdiği diastereomerik birleşme kompleksleri ile ayırım sağlanır.

Kromatografi Uygulamaları:

1- **İTK Uygulaması:** Laboratuvar çalışmaları esnasında kafein, teofilin ya da kafein + teofilin numuneleri referanslarla karşılaştırılarak numune teşhis edilir. Solvan sistemi olarak, aseton : kloroform : *n*-butanol : amonyak (30 : 30 : 40 : 10) kullanılır.

2- **Kolon (Sütun) Kromatografisi Uygulaması:** Laboratuvar çalışmaları esnasında, gentian violet, eosin B.A., dimetil yellow ve naftol green'den oluşan numune karışımının, aseton : kloroform : *n*-butanol : amonyak (30 : 30 : 40 : 10) solvan sistemi kullanılarak bileşenlerine ayrılması sağlanır.

Sorular

1. Adsorbsiyon kromatografisinde rol oynayan bağlar nelerdir ve bu tür kromatografinin temel ilkelerini açıklayınız.
2. Uygulama tekniğine göre kromatografik yöntemleri sınıflandırınız.
3. Solut, start, front, R_f ve developman ne demektir, tanımlayınız.
4. R_f değerine etki eden faktörleri sıralayınız.