# KAĞIT KROMATOGRAFİSİ VE İNCE TABAKA KROMATOGRAFİSİ

En basit ve en eski kromatografi yöntemlerinden biri kağıt kromatografisidir. Kromatografi kağıdı uzun lifli, saf selülozdan yapılmış bir tür süzgeç kağıdı olup su ve diğer polar çözücülerle hidrojen bağları oluşturarak bunları belli oranda yüzeyine adsorbe etme özelliğine sahiptir. Kağıt kromatografisinde sabit faz, kağıdın selüloz ağ şebekesine bağlanmış olan su molekülleridir. Hareketli faz olarak ise farklı çözücüler ve bunların karışımı kullanılabilir.

İnce tabaka kromatografisinin (İTK) kağıt kromatografisinden tek farkı sabit faz olarak düzgün bir yüzeye ince bir tabaka halinde kaplanmış silika, alumina gibi bir adsorbanın kullanılmasıdır. Bu sabit faz düzeneği İTK plakası olarak adlandırılır. Bu plakalar genellikle cam, plastik ya da metal bir yüzeye alumina ya da silika kaplanması ile elde edilir. İTK için farklı boyut ve kalınlıklarda, gerçekleştirilecek analize uygun olarak istenen polaritede farklı maddelerle kaplama yapılmış ticari plakalar bulunmaktadır.

Kağıt ve ince tabaka kromatografisinde numuneler kağıdın/plakanın üzerine, bir ucuna yakın olacak biçimde küçük hacimlerde tatbik edilir ve numune çözücülerinin kuruması beklenir. Sonrasında kağıt/plaka, örneklerin tatbik edildiği seviyeden daha düşük bir seviyeye kadar hareketli fazın içine daldırılır. Hareketli fazdaki sıvı molekülleri adhezyon kuvveti (kapiller etki) ile yukarı doğru, yani kağıdın/plakanın üst ucuna doğru hareket etmeye başlarlar. Hareketli faz molekülleri, numunelerin tatbik edildikleri noktalara ulaştıklarında numune moleküllerini çözüp kendileri ile sürüklerler. Numunelerdeki farklı maddelerin sabit ve hareketli fazlara ilgisi farklı olacağı için farklı hızlarda sürüklenerek birbirlerinden ayrılırlar. Hareketli faza ilgisi yüksek olan maddeler daha hızlı ilerleyerek üst kısımlara ulaşırlar. Sabit faza ilgisi yüksek olan maddeler ise daha yavaş ilerler ve kağıdın/plakanın daha alt kısımlarında bulunurlar.

Kağıt ve ince tabaka kromatografisinde yürütme tankı olarak adlandırılan kapalı cam malzemeye yaklaşık 0.5 cm yüksekliğe kadar hareketli faz konulduktan sonra kapağı kapatılarak tankın içindeki tüm hacmin hareketli fazla dengeye gelmesi sağlanır. Kağıdın/plakanın alt ucundan 1.5 cm üstüne bir çizgi çizilerek bu çizgi üzerinde standartların ve numunelerin tatbik edileceği yer işaretlenir. Numuneler ve referans maddeler bu çizgi üzerine tatbik edilir ve kodları işaretlenir. Kromatografik kağıda ve plakaya hiç bir zaman tükenmez kalemle bir işaretleme yapılmaz, kurşun kalem kullanılır. Daha sonra kağıt/plaka tankın içine yerleştirilir ve tankın kapağı kapatılır. Hareketli faz kağıt/plaka üzerinde belli bir yüksekliğe geldiğinde, tanktan çıkarılarak hareketli fazın ulaştığı çizgi seviyesi de işaretlenir. Analiz edilen numunede bulunan maddelerin bıraktıkları lekelerin dış sınırları da kurşun kalemle işaretlenir. Eğer analiz edilen maddeler renkli ise ulaştıkları nokta rahatça görülecektir. Renksiz maddelerin ne kadar ilerlediklerini tespit etmek için kağıda/plakaya bir reaktif püskürtülmesi, ya da UV ışığın altında bakılması gerekebilir.

Bu işlemler sonucunda elde edilen kağıt/plaka artık bir kromatogramdır. Bu kromatograma bakılarak hangi maddelerin hangi faza ilgisinin daha yüksek olduğu, bir numunenin saf olup olmadığı (Saf numuneler tek bir leke verirken karışım halindeki numuneler birden fazla leke oluşturacaktır), iki farklı numunenin aynı kaynaktan gelip gelmediği (Benzer numunelerin verdikleri kromatogram desenleri benzer olacaktır), tespit edilebilir. Aynı zamanda numunenin verdiği lekeler standartların lekeleri ile karşılaştırılarak bir numunenin hangi maddeleri içerdiği tespit edilebilir. Bu gibi analizler için en objektif yaklaşım alıkonma faktörlerinin karşılaştırılmasıdır.

Kağıt ve ince tabaka kromatografisinde bir maddenin alıkonma faktörü (Rf), maddenin katettiği mesafenin hareketli fazın başlangıç çizgisinden itibaren katettiği mesafeye oranıdır.

Örneğin yandaki şekilde ideal bir kromatogram verilmiştir. (Gerçekte lekeler daha asimetrik ya da kuyruklu olabilirler.) Bu örnekteki maddelerin sabit faza ilgileri küçükten büyüğe doğru A, B ve C şeklindedir.

A maddesinin alıkonma faktörü şöyle hesaplanır:

$$R\_{f\_{A}}=\frac{R\_{A} (cm)}{M (cm)}$$

Kağıt ve ince tabaka kromatografisinde maddelerin alıkonma faktörleri karşılaştırılarak bu maddelerin aynı maddeler olup olmadıkları tespit edilebilir. Örneğin yukarıdaki kromatogramda D numunesinin verdiği iki leke vardır. Bu lekelerin alıkonma faktörleri A ve C maddelerinin alıkonma faktörleri ile aynı veya çok yakın olduğuna göre, D numunesinin A ve C maddelerini içerdiğini söyleyebiliriz.

Bir maddenin alıkonma faktörü maddenin fizikokimyasal özelliklerine, kullanılan sabit faza, sabit fazın kalınlığına, kullanılan hareketli faza, ortam sıcaklığına, tankın doygun olup olmamasına bağlıdır. Maddenin kağıt/plakada katettiği mesafe ise hareketli fazın tanktaki seviyesine, kağıdın/plakanın tankta geçirdiği zamana ve dolayısıyla hareketli fazın katettiği mesafeye bağlıdır. Bu yüzden kağıt ve ince tabaka kromatografisinde bilinmeyen numuneler ve referanslar karşılaştırılacaksa aynı anda, aynı düzenekte deney yapılması tercih edilir.

**Kağıt ve İnce Tabaka Kromatografisi Uygulaması : Olay Yeri İnceleme**

Using Paper Chromatography, Oregon State University, Environmental Health Sciences Center (blogs.oregonstate.edu/hydroville/files/2014/06/paper\_chrom1.doc) ve Drug Analysis Using Thin-Layer Chromatography, Annina Carter, (http://www.terrificscience.org/lessonpdfs/DrugAnalysis.pdf)’tan uyarlanmıştır.

**Senaryo :** Bir intihar vakasında maktulün başucunda bir mektup ve yastığında tablet parçaları bulunmuştur. Polis olayın intihar değil cinayet olduğundan şüphelenmektedir. Polis, size incelemeniz için bu tablet parçalarını, mektuptaki mürekkep lekesini ve üç şüphelinin üzerinde bulunan siyah mürekkepli kalemleri göndermiştir. Savcılığa vermeniz gereken raporda mektuptaki mürekkebin hangi şüphelinin üzerinde bulunan kaleme ait olduğunu, parçalanmış olarak bulunan tablet parçalarında hangi etken maddelerin bulunduğunu ve bu karara nasıl vardığınızı açıklamanız gerekmektedir.

Üçer kişilik gruplar halinde çalışılacaktır. Öğrenciler laboratuvara kişisel korunma malzemeleri (önlük, gözlük, eldiven) ile geleceklerdir.

**İzlenecek Adımlar:**

* Biri İTK biri kağıt kromatografisi için çözücü tankı olarak kullanacağınız iki behere sıvı seviyesi 0.5 cm olacak kadar etanol koyduktan sonra üzerini bir saat camıyla kapatınız.

**Mürekkep analizi : Kağıt kromatografisi**

* Kromatografi kağıdı olarak başlangıç çizgisi ve olay yerinde bulunan mürekkep lekesi (X) bulunan bir süzgeç kağıdı teslim alacaksınız. Bu kağıdı kenarlarından tutup olabildiğince yüzeyine değmemeye çalışınız.
* Başlangıç çizgisinde A, B ve C olarak işaretli olan kısımlara, A, B ve C kodlu şüphelilerden alınan kalemlerle mürekkep lekesini oluşturunuz. Oluşturacağınız lekelerin, X kodlu leke ile aynı şekil, kalınlık ve uzunlukta olmasına dikkat ediniz.
* Kağıdı yavaşça çözücü tankına (behere) yerleştiriniz. Beherdeki etanol çalkalanır haldeyken yerleştirirseniz hareketli fazınız plakada aynı seviyede ilerlemeyecektir. (DİKKAT! Tanktaki etanol seviyesi kağıdın alt ucunu ıslatacak kadar yüksek, oluşturduğunuz lekelere değmeyecek kadar alçak olmalıdır. Bu yüzden 0.5 cm yükseklikte olduğunu kontrol ediniz.) Beherin ağzını saat camıyla kapatınız.
* Hareketli fazın kağıdın yaklaşık 4/5’ine kadar çıkmasını bekleyiniz.
* Kağıdı beherden çıkarıp hareketli fazın ulaştığı seviyeyi (bitiş çizgisi) kurşun kalemle işaretleyiniz.
* Kağıdın kurumasını bekleyiniz.
* Kromatografi kağıdınızı rapor sayfanızda belirtilen yere bantlayınız. (Gruptaki diğer öğrenciler kromatografi kağıdını ve oluşan lekeleri rapor sayfasına temsili olarak çizeceklerdir.)
* Rapor sayfasındaki soruları yanıtlayınız.

**İlaç analizi : İnce Tabaka Kromatografisi**

* Size verilen İTK plakasına alt kenarın 1.5 cm üzerinde olacak biçimde bir başlangıç çizgisi çiziniz. (Kurşun kalem ile!)
* Standart madde olarak plakaya uygulayacağınız üç etken madde bir bilinmeyen numune olacaktır. Bu yüzden başlangıç çizgisine kenarlardan ve birbirinden eşit uzaklıkta 4 küçük işaretleme yaparak altlarına örneklerin kodlarını yazınız. (Plakaları kenarlarından tutup olabildiğince yüzeyine değmemeye çalışınız.)
* Standart madde ve numune çözeltilerini plaka üzerinde belirlediğiniz noktalara uygulamak için cam kılcal borular (kapiler) kullanacaksınız. Her biri için aynı hacimde çözelti almaya dikkat ediniz, bunun için kapileri çözeltiye daldırdığınızda çözeltinin kapilerde nereye kadar çıktığına, ve plakaya uygularken nereye kadar indiğine dikkat etmeniz gerekir.
* Lekelerin kurumasını yani numunelerin çözücülerinin buharlaşmasını bekleyiniz.
* Plakayı yavaşça çözücü tankına (behere) yerleştiriniz. Beherdeki etanol çalkalanır haldeyken yerleştirirseniz hareketli fazınız plakada aynı seviyede ilerlemeyecektir. (DİKKAT! Tanktaki etanol seviyesi plakanın alt ucunu ıslatacak kadar yüksek, oluşturduğunuz lekelere değmeyecek kadar alçak olmalıdır.)
* Beherin ağzını saat camıyla kapatarak hareketli fazın plakanın yaklaşık 4/5’ine kadar çıkmasını bekleyiniz.
* Plakayı beherden çıkarıp hareketli fazın ulaştığı seviyeyi (bitiş çizgisi) kurşun kalemle işaretleyiniz.
* Plakanın kurumasını bekleyiniz.
* Kuruyan plakayı UV lambası altına yerleştirip oluşan lekelerin sınırlarını kurşun kalemle çiziniz.
* Plakanızı rapor sayfanızda belirtilen yere bantlayınız. (Gruptaki diğer öğrenciler İTK plakasını ve oluşan lekeleri rapor sayfasına temsili olarak çizeceklerdir.)
* Rapor sayfasındaki soruları yanıtlayınız.

**Kağıt Kromatografisi Deney Raporu**

Ad, Soyad: Grup adı:

Öğrenci No: Grup üyelerinin numaraları:



1. Olay yerinde bulunan mektup hangi kalemle yazılmış olabilir? Veya hangi kalemle yazılmış olamaz? Buna nasıl karar verdiniz?

2. Savcılığa vereceğiniz raporda yukarıdaki cevabınıza nasıl karar verdiğinizi belirtmeniz gerekmektedir. Kromatografi prensiplerinden bahsederek gerçekleştirdiğiniz deneyi savcılığa açıklayınız.

3. X kodlu numunedeki mürekkebi oluşturan renkleri hareketli faza ilgilerine göre büyükten küçüğe sıralayınız.

**İnce Tabaka Kromatografisi (İTK) Deney Raporu**

Ad, Soyad: Grup adı:

Öğrenci No: Grup üyelerinin numaraları:



1. Her bir leke, yani her bir etken madde için Rf değerlerini hesaplayınız.

2. Olay yerinde bulunan tablet parçalarında hangi etken maddeler vardır?

3. Bu sonuca nasıl karar verdiniz? Kromatografi prensiplerinden ve bulduğunuz Rf değerlerinin ne anlama geldiğinden bahsederek açıklayınız.

4. Etken maddeleri sabit faza ilgilerine göre büyükten küçüğe sıralayınız.

5. Etken maddeleri hareketli faza ilgilerine göre büyükten küçüğe sıralayınız.

6. Etken maddeleri alıkonma faktörlerine göre büyükten küçüğe sıralayınız.

7. Alıkonma faktörü ile fazlara ilgi arasında bir ilişki var mıdır? Açıklayınız.