

## KROMATOGRAFI İŞLEMİ

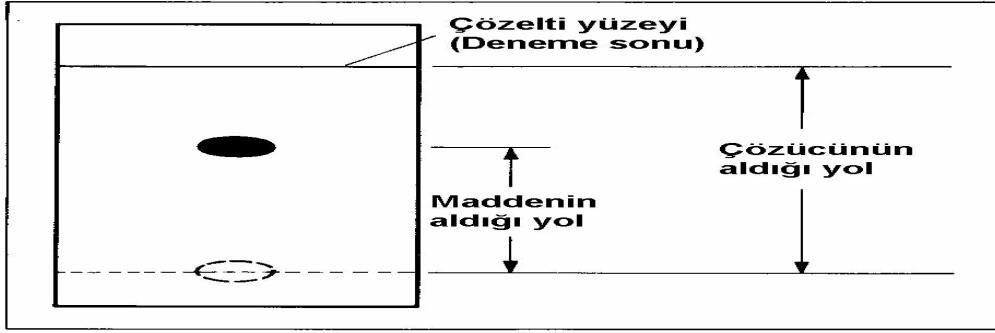
A ve B maddelerinden oluşan karışım, sabit fazla birlikte kolonun başlangıç bölgesine uygulanır ve hareketli faz (sıvı veya gaz) akmaya bırakılır. Numunede bulunan bileşimler farklı yürüme veya hareket hızlarına göre hareketli faz içerisinde ilerlerler.

Yürüme hızı, **Rf** değeri ile ifade edilir ve substansın yürüme mesafesinin, çözücünün yürüme mesafesine oranından hesaplanmaktadır. Rf değeri **0 ile 1** değerleri arasındadır.

### Rf Değeri

Hızlı yürüyen komponentler için büyük  
Daha yavaş yürüyenler için küçüktür

$$R_f = \frac{\text{Bileşiğin uygulama noktasından itibaren aldığı yol}}{\text{Çözücünün orijinden itibaren aldığı yol}} = \frac{d_{\text{madde}}}{d_{\text{çözelti}}}$$



Sekil 4: Rf değerinin hesaplanmasının gösterimi (Krieg)

Bir kantitatif analiz tekniği olan kromatografide amaç, **anamlı bir süre** içinde iyi bir ayırma yapmaktır.

\*Ayırmayı etkileyen parametreler özetlenecek olursa

Kolon ile ilgili olanlar	Hareketli faz ile ilgili olanlar	Ölçüm ile ilgili olan	Örnek ile ilgili olanlar
Tür	Tür- Bileşim	Dedektör türü	Örnek derişimi
Boyut	Akış hızı	Dalga boyu	Örnek hacmi

## KROMATOGRAFI' NİN SINIFLANDIRILMASI

- Ayrılma Mekanizmalarına Göre
- Uygulama Biçimine Göre
- Faz Tiplerine Göre

### AYRILMA MEKANİZMALARINA GÖRE

- Adsorpsiyon kromatografisi
- Partisyon kromatografisi
- İyon deęiřtirme kromatografisi

- Jel filtrasyon kromatografisi
- İyon çifti kromatografisi
- Afinite kromatografisi

## FAZ TIPLERİNE GÖRE

- **Sıvı kromatografisi**
  - Sıvı-Katı kromatografisi
  - Sıvı-Sıvı kromatografisi
- **Gaz kromatografisi**
  - Gaz-Katı kromatografisi
  - Gaz-Sıvı kromatografisi

## UYGULAMA BİÇİMİNE GÖRE

- **Düzlemsel kromatografi**
  - Kağıt kromatografisi
  - İnce tabaka kromatografisi
- **Kolon kromatografisi**
  - Gaz kromatografisi
  - Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi

- **Düzlemsel kromatografi**

Kolon kromatografisinin çok uzun zaman alması, paketleme (kolonun sabit fazla doldurulması) işleminin hatalı yapılabilir olması ve işlem sonrası sabit fazın kolondan boşaltılmasındaki güçlükler gibi nedenlerle kolon kromatografisi yerine bazen düzlemsel kromatografi tercih edilebilmektedir.

- **Düzlemsel kromatografi**
  - Kağıt kromatografisi

Sıvı-sıvı dağılma kromatografisinin temel prensiplerini uygulayan kağıt kromatografi metodunda, inert bir sabit faz (kağıt) ile örnek bileşenlerini birbirinden ayırma görevini yürüten bir hareketli faz mevcuttur

**Kağıt kromatografisinde üç temel bölüm mevcuttur**

- a) Kağıt (sabit faz)**
- b) Küvet (kromatografi ortamı)**
- c) Hareketli faz (solvent)**

**Kağıt**, fazla miktarda **su bağlama** özelliğine sahip olduğu için çözücü içindeki su moleküllerini tutmakta ve bu **su** sabit faz olarak görev yapmaktadır. Kağıt kromatografisinde sabit faz olarak ince bir tabaka halindeki **süzgeç kağıtlarına** benzer kağıtlar kullanılmaktadır.

**Hareketli faz** olarak da su ya da suyla karışabilen bir solvent tercih edilmektedir.

Çözücü su ile karışmıyorsa, hem su hem de çözücü ile karışabilen madde ilave edilerek hareketli faz hazırlanabilmektedir.

Genellikle,

- su-fenol
- su-bütanol-NH<sub>4</sub>OH
- aseton-su gibi çözeltiler kullanılmaktadır.

Kağıt kromatografisinde kullanılan solvent karışımına örnek olarak; *n*-butanol (% 40) + asetik asit (% 10) + su (%50)'dan oluşan karışım verilebilir.

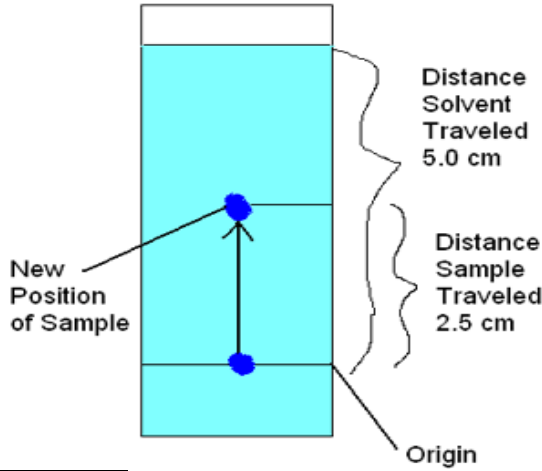
Yürütme ortamının (küvet) üst kısmı, kapalı olmalı, kağıt konmadan önce küvet ortamı doymun hale getirilmeli ve kağıt içeriye konulduktan sonra kapağı **kapatılmalıdır**.

Uygulanan örnek, bir mikro-pipet yardımıyla kağıdın uç kısmına önceden çizgi ile belirlenmiş yerlere çok küçük noktalar halinde konulmalı ve yürütme öncesi kurutulmalıdır.

**Enjekte edilen örnek, kesinlikle yürütücü solvent ile direkt olarak temas etmemelidir.**

Ayırma işleminin bitiminden sonra kalitatif veya kantitatif analizler için **renklendirme** yapılır. Ayırılan birimlerin **Rf** değerleri **hesaplanır**.

$$f = \frac{\text{distance traveled by the sample component}}{\text{distance traveled by the solvent}}$$

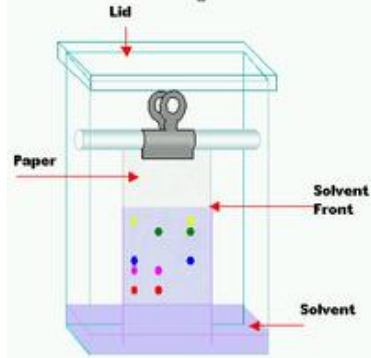


$$f = \frac{.5 \text{ cm}}{5.0 \text{ cm}} = 0.5$$

## Kağıt Kromatografisi Çeşitleri

a. Yukarı Doğru Kağıt Kromatografisi

b. Aşağı Doğru Kağıt Kromatografisi



## . Yukarı Doğru (Ascending) Kağıt (20x25 cm) Kromatografisi

1. Kağıda alttan 2 cm yüksekliğinde kurşun kalemle bir çizgi çizilir ve çizgi üzerine bir mikro-pipet ile numuneden damlalar halinde (1-2µL ya da 10-50 µL) örnek veya örnekler belirli aralıklarla (15-25mm) konulur.

2. Örneğin emilmesi için kurutulur.
3. Yürütme ortamına bir miktar solvent konulur.
4. Örnek enjekte edilen kağıt, önceden satüre edilmiş bir küvet içerisinde 1 cm kadar solvante daldırılarak yerleştirilir ve küvetin kapağı kapatılır.
5. Kağıt kapilarite ile solventi yukarı doğru çeker ve örnek içindeki farklı moleküller de farklı yüksekliklere kadar solvante birlikte yukarı doğru gider.
6. Yürütme işlemi tamamlandıktan sonra kağıt hemen kurutulur ve UV lambaları veya çeşitli maddelerle muamele edilerek (ayrılan maddeler) renklendirilir ve oluşan renge göre maddedeki farklı moleküller, kalitatif veya kantitatif amaçlı olarak tayin edilirler.

#### **b. Aşağı Doğru (Descending) Kağıt Kromatografisi**

Bu sistem ascending kromatografi ile hemen hemen aynıdır, sadece **yürütme yönü farklıdır**. Hem yer çekimi ve hem de kapilaritenin etkisi ile yürütme olduğu için ayırma işlemi daha hızlıdır.

Ayrıca kağıt boyutları da diğerine kıyasla daha büyüktür. Böylece daha iyi bir ayırma gerçekleşir.

**1.**Kağıt, bir küvete yerleştirilir ve solventin üstten alınması sağlanır.

**2.**Kağıdın kıvrılan yatağı solvent içerisinde daldırılarak üzerine çözücünün aşağı doğru yürütmesi sağlanır.

Ayrılması istenen moleküllerin yine aşağıya doğru hareket hızları farklı olacağına iyi bir ayırma, yani resolusyon (resolution) gerçekleşir.

**3.**Renk maddeleriyle ayrılan bileşiklerin kağıt üzerindeki yerleri tayin edilerek kalitatif veya kantitatif analizleri yapılabilir.