

3.3. KRİSTALİZASYON

Organik reaksiyonlar sonucunda elde edilen katı organik bileşikler genellikle saf değildirler. Safsızlık içeren bu organik kimyasal bileşiklerin saflaştırılması genellikle uygun çözücü veya çözücü karışımlarından kristallendirilerek yapılır. Ancak safsızlığı fazla olan ham ürünlere direkt kristalizasyon işlemi uygulanamaz. Çünkü bazı safsızlıklar kristallenme hızını düşürür, hatta kristal oluşumunu tamamen önleyebilirler, böylece önemli miktarda madde kaybı olabilir. Bu nedenle kristalizasyondan önce ekstraksiyon veya distilasyon gibi ön saflaştırma işlemleri uygulanmalıdır.

3.3.1. Kristallendirme İşlemi

Katıların kristallendirilerek saflaştırılmaları uygun çözücü veya karışımlardaki farklı çözünürlük özelliklerine dayanır. Kristalizasyon işleminin safhaları şu şekildedir:

1. Saf olmayan maddenin uygun çözücüde kaynama noktası veya kaynama noktasına yakın bir sıcaklıkta çözülmesi.
2. Sıcak çözeltinin çözünmemiş madde veya tozlardan süzülerek ayrılması.
3. Sıcak çözeltinin soğumaya bırakılıp, çözülmüş maddenin kristalizasyonunun sağlanması.
4. Kristallerin çözücü fazından süzülerek alınması ve kurutulması.

Oluşan kristallerin kurutulduktan sonra saflıkları, erime noktasına bakılarak kontrol edilir, saf değilse çözücü ile yeniden kristallendirilir. Bu işleme rekristalizasyon denir. Erime noktası sabitleşene dek bu işleme devam edilir.

Kristallendirme ile safsızlıkların ayrılması şu şekilde olur:

Örneğin A maddesi içindeki safsızlık B maddesi olsun (Genelde bir maddede %5 kadar safsızlık olduğu kabul edilir). Seçilen belli bir çözücüde ve belli bir sıcaklıkta A'nın ve B'nin çözünürlükleri S_A ve S_B olsun. Bu durumda 3 olasılık söz konusu olabilir;

1. Safsızlık saflaştırılacak maddeden çok çözünebilir. $S_B > S_A$
2. Safsızlık saflaştırılacak maddeden az çözünebilir. $S_A > S_B$
3. Çözünürlükleri eşit olabilir. $S_A = S_B$

Görüldüğü gibi birinci olasılıkta kristallendirme ile saf A elde edilebilir bu durumda safsızlık ana çözeltide kalacaktır.

ÖRNEĞİN: 100g lık bir A maddesinin 15°C da 100 ml lik uygun bir çözücü içindeki çözünürlüğü $S_A = 10\text{g}/100\text{ ml}$ ve $S_B = 5\text{g}/100\text{ ml}$ dir. Bu madde kristalizasyon tekniği ile saflaştırılırsa ;

100 g da (A) 5 g safsızlık (B) , 95 g A maddesi vardır. 15°C da 100 ml çözücüde B'nin tamamı çözünür, A'nın ise 10 g'ı çözünür; buna göre 85 g A maddesi saf olarak kristallendirilebilir.

3.3.2. Kristalizasyonda Kullanılacak Çözücünün Özellikleri

1. Saflaştırılacak maddeyi yüksek sıcaklıkta çok, düşük sıcaklıkta az çözmelidir.
2. Saflaştırılacak maddenin iyi oluşan kristallerini vermelidir.
3. Saflaştırılacak maddenin kristallerinden kolayca ayrılabilmesi ve K.N. 'ı düşük olmalıdır.
4. Saflaştırılacak madde ile reaksiyon vermemelidir.
5. Uçucu, yanıcı ve toksik olmamalı, kolay bulunabilmelidir.

Kristalizasyonda çok kullanılan çözücülerden bazıları şunlardır: Su, eter, aseton, kloroform, metanol, karbondioksit, etilasetat, etanol, benzen, petrol eteri vs. Yanıcı özellikteki eter, aseton, metanol, etanol, etilasetat, benzen, petrol eteri gibi çözücüler kullanılırken ısıtma çıplak alevde yapılmamalıdır, su banyosu kullanılmalıdır.

Kristallendirme işleminde en çok kullanılan çözücüler ve özelliklerini aşağıdaki tabloda gösterilmiştir:

| Çözücü | K.N. | Özellik |
|------------------------|-------|---------------------------------|
| Damıtık su | 100 | Uygun olan her yerde kullanılır |
| Dietileter | 35 | Yanıcı |
| Aseton | 56 | Yanıcı |
| Kloroform | 61 | Yanmaz, buharları zehirli |
| Metanol (% 99) | 64.7 | Yanıcı, zehirli |
| Karbondioksit | 77 | Yanmaz, buharları zehirli |
| Etilasetat | 78 | Yanıcı |
| Metanol (Teknik, % 95) | 77.8 | Yanıcı |
| Etanol | 78 | Yanıcı |
| Petrol eteri | 40-60 | Yanıcı |
| Asetik asit | 118 | Keskin kokulu |

Eter fazla uçucu olduğu için kabın kenarlarından yukarıya doğru tırmanır, bu nedenle kristallendirme işlemlerinde mümkün olduğunca kullanılmaması gerekir. Ayrıca eter kısa sürede uçtuğu için madde kabın dibinde tortu olarak kalır. Karbonsülfür de hava ile parlama noktası düşük karışımlar verdiği için mümkün olduğunca kullanılmamalıdır.

Kristalizasyonda çözücü seçilmesi, çoğunlukla deneysel olarak tespit edilir. Pratikte 0,1 g madde 1 ml solvan ile ısıtılmadan çözünüyorsa veya 0,1 g madde 3 ml solvanla ısıtılarak çözünmüyorsa uygun değildir.

Kristallendirilecek madde bir çözücüde çok kolay, bir başka çözücüde çok az çözünüyorsa iyi bir kristalizasyon işlemi için çözücü çiftleri kullanılabilir. Ancak bu iki çözücünün birbiri ile karışabilir olması gerekir. Bunun için önce madde çok çözündüğü çözücüde çözülür ve daha sonra maddenin az çözündüğü çözücü sıcak olarak azar azar ilave edilir. Hafif bulanıklık meydana gelince ilk çözücüden çok az ilave edilip, soğukta kristallenmeye bırakılır. Alkol-su, benzen-petrol eteri, aseton-petrol eteri en çok kullanılan çözücü çiftleri arasında yer almaktadır. Teorik olarak çözücü seçiminde 2 özellikten yararlanılır;

1. Bir madde kimyasal ve fiziksel özelliklerinin benzer olduğu çözücüde çok çözünür.
2. Polar bir madde polar bir çözücüde, apolar bir çözücüden daha çok çözünür. Polar bileşikler suda çok çözünür. Özellikle hidrojen bağı yapıyorlarsa sudaki çözünürlükleri daha da artar. Karboksilik asit, alkol, amin ve amid içeren organik yapılar için sudaki çözünürlük fazladır. Bunun yanısıra organik maddelerin tuzları da suda kolay çözünür. Tüm hidrokarbonlar ve alkil halojenürler ise suda çözünmezler. Eter, benzen gibi nonpolar solvanlar, noniyonik bileşiklerin birçoğunu çözerler. Genel olarak organik bileşiklerde hidrokarbon kısmı arttıkça yani C sayısı arttıkça sudaki çözünürlükleri azalır, nonpolar solvanlardaki çözünürlükleri artar. Yine molekül ağırlığı arttıkça sudaki çözünürlük azalır. Ancak bunun istisnaları da vardır. Örneğin nonsüstitüe amidler süstitüe amidlere oranla suda daha az çözünürler. Çünkü nonsüstitüe amidlerde H köprüleri aracılığı ile bir assosiyasyon meydana gelir, bu da sudaki çözünürlüğü düşürür. Yine yapıya halojen sokulması da sudaki çözünürlüğü azaltan bir diğer etkidir. Su, formik asit, asetik asit, metanolü polar solvanlara, benzen, aseton, kloroformu da apolar solvanlara örnek olarak gösterebiliriz.

3.3.3. Kristalizasyon Tekniği

Kimyasal bileşik için uygun bir çözücü bulunup çözelti kaynama noktasına ulaşılan dek ısıtılır. Kaynamakta olan çözelti soğumaya bırakılmadan önce hızla süzülmalıdır. Bunun için genellikle pilili süzgeç kağıdı ve geniş kısa boyunlu bir huni kullanılır. Geniş ve kısa boyun çözeltinin soğuyup, kristallerin oluşmasını ve tıkanıklık yaparak süzmede güçlük çıkmasını önler. İyi bir süzme ile süzgeç kağıdında kristal kalmaz. Süzülen çözeltinin üzeri saat camı ile kapatılarak soğumaya bırakılır. Oluşan kristallerin büyüklüğü soğutma işlemine bağlıdır. Hızlı soğutma ile küçük, yavaş soğutma ile büyük kristal oluşumu sağlanır. Büyük kristaller önemli

miktarda solvan içerirler. Küçük kristaller de ise birim yüzey hacim artacağı için daha fazla safsızlık adsorblayabilirler. Bu nedenle, soğutma genellikle orta ısıda yapılmalıdır. Oluşan kristaller süzgeç kağıdından veya vakumda Bühner Hunisi kullanılarak süzülür. Kurutma işlemi, açık havada, erime noktası altında, sabit etüvde veya vakum desikatöründe yapılabilir.

3.3.4. Kristalizasyonda Karşılaşılabilecek Güçlükler

1. Renk giderme: Ham ürün renkli safsızlıklar içerebilir. Bu safsızlıklar kristaller tarafından adsorblanabileceği için renkli ve kirli kristaller elde edilir. Bunlar aktif kömür gibi safsızlıkları adsorblama kabiliyetindeki maddeler kullanılarak ortamdaki uzaklaştırılabilirler. Çözeltiye ham ürünün ağırlığının %1-2'si kadar aktif kömür ilave edilip kaynatılır. Adsorbsiyon gücü fazla olan kömür genellikle büyük moleküllü olan safsızlıkları kolaylıkla adsorblar ve çözeltinin rengini giderir. Aktif kömür fazla miktarda kullanılmamalıdır, aksi takdirde esas madde de adsorblanır ve verim düşer. Çözelti süzülerek aktif kömüründen ayrılabilir.
2. Kristallenme güçlüğü ve yağ halinde ayrılma: Kristalizasyonda madde yağ halinde ayrılmış ise (bu durum çabuk soğutma veya çözeltinin derişik olmasından kaynaklanabilir) ısıtılarak çözülür, daha sonra tek fazlı berrak çözelti yavaş yavaş soğutulur veya yağ halinde ayrılmayı önlemek için soğumakta olan çözelti kuvvetle karıştırılır böylece yağ taneleri oluşsa bile biraraya gelmeleri önlenir ve kristallenme sağlanır. Bazen de doymuş çözeltilerden kristallenme başlamaz, bu durumda kristallenmeyi başlatmak için aşağıdaki işlemler uygulanır;
 - Aşı kristali ilave etmek
 - Cam bagetle kaşıma
 - Çok düşük sıcaklıklara dek soğutma yapmak
 - Çözeltideki çözücü miktarını biraz uçurmak

3.3.5. Kristalizasyonda Süzme İşlemi

Bir karışımda sıvı fazı katı fazdan ayırmak için uygulanan işleme süzme denir. İyi bir kristallenme ile saflaştırma ancak süzme işleminin kusursuz olarak yapılmasına bağlı olduğundan, süzme çok dikkat gerektiren bir işlemdir Kristallendirme sırasında süzme işlemi çoğunlukla 2 kez uygulanır:

Kristallenme başlamadan önce hazırlanan sıcak çözeltinin süzülmesi,

Kristallenme tamamlandıktan sonra kristallerin ana çözeltiden süzülerek ayrılması.

1. Kristallenme başlamadan önce hazırlanan sıcak çözeltinin süzülmesi:

Sıcak çözeltilerin süzülmesi sırasında ısı kaybı elden geldiği kadar önlenmelidir. Aksi takdirde sıcaklık düşmesi ile çözünürlük azalacağından süzgeç kağıdında ve huni borusunda kristaller meydana gelir, bunlar süzmeyi güçleştirir. Soğumayı önlemek için hızlı süzmek, huniyi ve süzgeç kağıdını kaynar çözelti sıcaklığına kadar ısıtmak ve buharlaşmayı elden geldiği kadar önlemek gerekir. Bu koşulları sağlamak için akış borusu kesik huni ve pilili süzgeç kağıdı kullanılır. Huni, çözücü ile ıslatılmış süzgeç kağıdı ile beraber üstüne saat camı konarak içinde biraz saf çözücü bulunan bir beher üzerine oturtulur ve beher alttan ısıtılır. Sonra beher içindeki saf çözücü başka kaba aktarılarak aynı beher içine hemen süzme yapılır. Huniyi ısıtma işlemi, süzülecek çözeltinin kendisi kullanılarak da yapılabilir veya beher veya erlen içindeki çözeltinin üzerine konarak da ısıtılabilir. Böylece, huni geri soğutucu görevini görürken ısınır, bundan sonra çözelti ısınmış olan bu huniden derhal süzülür.

2. Kristallenme tamamlandıktan sonra kristallerin ana çözücüden süzülerek ayrılması:

Kristallerin ana çözücüden ayrılması işlemi, adi süzme ile yapılmayıp, daima vakum uygulanarak yapılır. Vakum musluğa takılmış bir tromp ile sağlanır. Bu işlemde vakum pompası kullanılmamalıdır, çünkü süzütünün buhar basıncı yüksek olduğundan çözücü buharlaşır ve vakum pompasının yağında çözünerek buhar basıncını artırır. Vakum hem süzmeyi hızlandırır, hem de kristallerin ana çözücüden tamamen ayrılmasını sağlar. Fazlaca madde çözülecekse Bühner Hunisi ve Nuçe Erlenini kullanılır. Huniye göre süzgeç kağıdı kesilip huniye yerleştirildikten sonra, önce tromp çalıştırılarak vakum yapılır, sonra süzülecek madde huniye dökülmeye başlanır. Süzme işleminde yavaş emiş, hızlı emişten daha etkilidir, çünkü hızlı emişte çok ince taneler sürüklenerek süzgeç kağıdını üzerine yapışırlar ki bu durum kağıdın geçirgenliğini azaltır. Süzme sonucunda süzgeç kağıdı üzerinde kalan kristallerin üzerinde bir miktar ana çözücü tutunmuştur, bu durum saf çözücünün az bir miktarı ile yıkanarak giderilir. Nuçe Erlenine damlayan çözücü bittiği an vakum kesilir. Hunide kalan kısım bir pens yardımıyla, süzgeç kağıdı ile beraber saat camı üzerine alınır veya huni ağız kısmı saat camı üzerine gelecek şekilde ters çevrilerek konur, huninin boru kısmına bir lastik hortum takılarak, kristaller bir saat camı üzerine üflenir.

Süzgeç kağıdı ile reaksiyona girecek çözeltilerin süzülmesinde (derişik asidik veya bazik özellikteki maddeler için) süzgeç kısmı cam tozlarının sinterleştirilmesi ile yapılmış cam süzgeçler kullanılır (Gooch Krozesi). Pahalı malzeme olduklarından, kullanılmalarında özel dikkat gösterilmeli, fazla vakum yapılmamalı ve temizleyici olarak kromik asit çözeltisi kullanılmalıdır. Az miktardaki maddelerin süzülmesinde porselen Bühner Hunisi yerine, delikli porselen plakalı süzgeçler kullanılır.

UYGULAMA

Saf Olmayan Asetanilidin Kristalizasyonu

0.5 g kirli asetanilid tartılır, üzerine çözünebileceği kadar distile su konur kaynayana dek bek alevinde ısıtılır, bir spatül ucu aktif kömür ilave edilir, pilili süzgeç kağıdından süzülür. Süzüntü kristallenmek üzere pencere kenarına bırakılır. Oluşan kristaller Bühner Hunisi'nden veya düz süzgeç kağıdından süzülür, etüvde veya oda ısısında kurutulur ve tabanca tüp yardımı ile erime noktası (E. N.) tayini yapılır. Her maddenin sabit bir erime noktası vardır. Deney sonucunda bu değere ulaşılammışsa saflaştırma işlemi tekrar yapılır.

E. N. tayini için kılcal borunun bir ucu kapatılıp, diğer tarafından bir miktar madde konur, kılcal boru termometreye bağlanır ve tabanca tüpe konur. Tabanca tüpün içine sıvı vazelin, gliserin, sıvı parafin gibi kaynama noktası (K. N.) yüksek ve ısıyı homojen olarak dağıtabilecek maddelerden biri konur ve tabanca tüp bek alevinde alttan ısıtılır.

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. KROMATOĞRAFİ

Kromatografinin ilk kez 1900'lerin başında Rus-İtalyan botanikçi Mikhael Tsvet tarafından geliştirildiği ve kullanıldığı kabul edilir. Tsvet, cam bir kolonda, CaCO₃ adsorbanı üzerinden bitki ekstresinin petrol eterli çözeltisini geçirmiş ve kolonda sarı, yeşil bantlarla bir ayırma işleminin olduğunu görmüştür. Bu alandaki ilk yayımların 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. KROMATOĞRAFİK ANALİZLERİN SINIFLANDIRILMASI

3.4.1.1. DAYANDIKLARI PRENSİPLERE GÖRE SINIFLANDIRMA

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

a- Adsorbsiyon Kromatografisi:

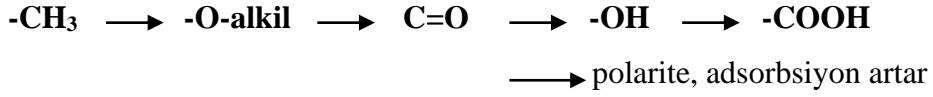
Adsorbsiyon, katı bir madde ile sıvıda çözünen bir bileşik arasındaki yüzeysel etkileşimdir. Burada stasyonere faz adsorbsiyon kapasitesi yüksek bir katı (Al_2O_3 , Silicagel), mobil faz ise gaz veya çoğunlukla olduğu gibi sıvıdır. Adsorbsiyon olayında rol oynayan bağlar;

- 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 süstitüent 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 çözeltideki 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 çözelti, 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 çözeltisinin 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 TEKNİĞİNE GÖRE SINIFLANDIRMA

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 kromatografisi** B₁- Kolon (sütun) kromatografisi
B₂- Gaz kromatografisi
B₃- Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)
B₄- Kapiller elektro kromatografisi

A₁ - İnce Tabaka Kromatografisi (İTK)

İTK bir fizikokimyasal ayırma yöntemidir. Hızlı sonuç vermesi, iyi bir rezolusyon (ayırım) sağlaması ve ekonomik uygulama avantajları nedeni ile önemli bir yere sahiptir. Stasyonier faz olarak en çok kullanılan adsorbanlar silicagel, aluminyum oksit, kieselguhr, selüloz ve türevleri ile poliamidlerdir. İTK’de stasyonier faz olarak kullanılan adsorban madde cam, plastik ya da aluminyum plaklar 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.’yi 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 çözücünden ibaret olabilir. Adsorbsiyon kromatografisinde çözücüler elüsyon etkilerine göre yani sürüklenme güçlerine göre eluotrop 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.

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

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 stasyoner 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 küvet 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 develope 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 Uygulaması

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 çözeltiler, 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 değilse 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 değiştirmedeği 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 küvet atmosferi önceden solvan sistemi ile doyurulursa developman süresi kısalmır. Doymamış atmosferde R_f değeri yükselir.

Uygulama tekniği: Tanka yerleştirilen kromatografi plağının eğimi az da olsa R_f 'i değiştirebilir. Ancak çıkan, inen veya yatay teknikle farklı R_f ' lere ulaşılır.

Adsorbanın solvan buharlarını pre-adsorbsiyonu: Dağılma kromatografisi tekniği için önemlidir. R_f değerlerinde düşmeye neden olur.

Developman boyutu: Mesafe arttıkça R_f biraz artar.

Yan maddeler (second substances) : Özellikle adsorbsiyon tekniğinde R_f 'i değiştirir.

İTK'nin Avantajları:

- 1- Kullanılan temel aletler oldukça basit ve ekonomik,
- 2- Ayırımlar oldukça hızlı (kolon ve kağıttan daha iyi),
- 3- Lekelerin belirlenmesi için korrosif reaktifler kullanılabilir,
- 4- Birçok uygulama için kesin ve tekrarlanabilir sonuçlar verir,
- 5- Çok değişik adsorban kullanma olanağı sunar,
- 6- Yüksek Performanslı İnce Tabaka Kromatografi (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 dağılıma kanununun geçerli olduğu bir kromatografidir. Kağıda uygulanan maddelerin birbirlerinden ayrılmaları kağıt üzerinde hareket eden çözücü ile kağıdın içerdiği su arasındaki dağılıma farkına bağlıdır. Burada stasyoner (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.

$$R_m = \log \left(\frac{1}{R_f} - 1 \right) \text{ formülü ile gösterilir.}$$

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 merkezine açılmış olan halkaya yerleştirilir ve kromatografi kağıdı petri kutusunun ağızına kapatılır. Böyle çözücü bir merkezden kaynaklanan daireler çizerek stasyonere 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 yukarisına 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 değişmezlerine sahip olmalarına dayanır. Cam borudaki adsorbana stasyoner 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 içerdiği 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 stasyoner 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 hiçbir leke vermediği noktada bitirilir.

3.4.1.3. FAZ TİPLERİNE GÖRE SINIFLANDIRMA

- 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 stasyonier fazda; CDA ile karışım maddelerinin (rasem şekli) reaksiyonu sonucu oluşan diastereoizomer türevlerinin ayrılması sağlanır.

b- Kiral Mobil Faz Additifleri (CMA) Kullanılarak Yapılan Ayırım:

Akiral stasyonier fazda; CMA ile karışım maddelerinin (rasem şekli) reaksiyonu sonucu oluşan diastereoizomer türevlerinin ayrılması sağlanır. Burada mobil faza kirale karşıt iyon (Chiral-Counter-Ions = CCI) ilavesi gerekmektedir.

c- Kiral Stasyonier Faz Kullanılarak Yapılan Ayırım:

Kiral stasyonier fazda, karışım enantiomerlerin verdiği diastereomerik birleşme kompleksleri ile ayırım sağlanır.

Laboratuvar 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.