

DENEY 8

8. KOLON KROMATOĞRAFİSİ

8.1. GİRİŞ VE TEORİ

Genel bir tanım olarak *kromatografi*, akış halindeki gaz veya sıvı bir fazla birlikte (hareketli faz) karışımdaki bileşenlerin, durgun faz (sabit faz) üzerinden geçirilip, bileşenlerin alıkonma sürelerine bağlı olarak ayırımların gerçekleştirildiği ve kalitatif kantitatif analiz yapıldığı güçlü bir analitik yöntemdir.

Kromatografi 1903 yılında Rus bilim adamı Tswett tarafından keşfedilmiştir. Tswett bitki pigmentlerini ayırmak için kromatografiyi kullanmıştır. Yaptığı çalışmada toz kalsiyum karbonat ile doldurulmuş bir cam kolon kullanmıştır. Bu cam kolondan bitki pigmentlerini içeren çözeltiyi geçirerek klorofil ve ksantofil gibi birçok bitki pigmentini ayırmayı başarmıştır. Ayrılan maddeler kolonda renkli bantlar halinde gözüktüğü için yöntem kromatografi adını vermiştir. Yunanca’ da *chroma* “renk” ve *graphein* “yazmak” anlamına gelmektedir.

Kromatografi; laboratuvarlarda pek çok organik ve anorganik maddenin tayininde (karbonhidrat, lipit, yağ asitleri, aminoasitler, proteinler ve türevleri, vitaminler) doping kontrollerinde, kanda, alkol ve zehirli gazların tespitinde, sentezlenen veya ayrıştırılan maddelerin saflıklarının kontrolünde başarıyla kullanılan bir metottur. Kromatografik çalışmaların ortak amacı; madde karışımlarını analitik veya preparatif amaçla birbirlerinden ayırmaktır ve kromatografik metotların bütün farklı modellerinde esas olan; hareketli (mobil) bir fazın, sabit (stasyoner, hareketsiz) yapıda bir faz içerisinden akması veya geçmesidir. ***Bütün kromatografik yöntemler numune içerisindeki maddelerin sabit ve hareketli fazla etkileşimi sonucu ayrışmaları esasına dayanır.*** Bu ayrışmanın nedeni, maddelerin hareketli veya sabit faza olan farklı ilgileridir.

8.1.1. Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Kromatografi çok çeşitli şekillerde sınıflandırılabilir. Bunlardan en genel sınıflandırma hareketli faza göre olan sınıflandırmadır ve üç’e ayrılır;

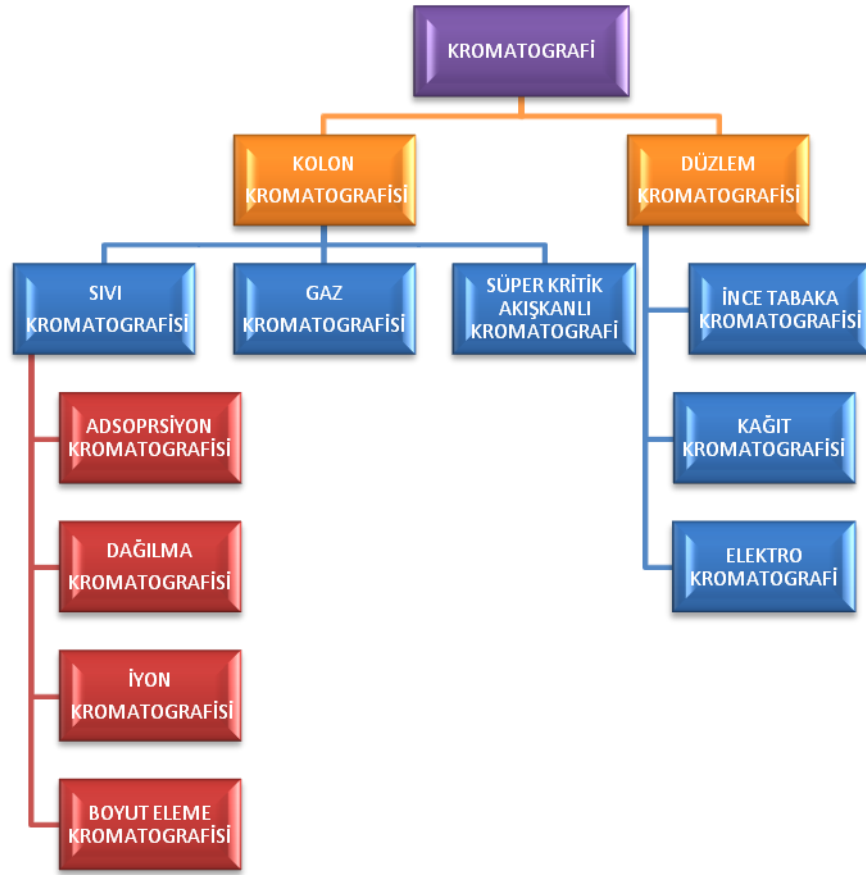
- *Gaz kromatografisi*
- *Sıvı kromatografi*
- *Süperkritik akışkanlı kromatografi*

Bir diğer sınıflandırma ise kromatografi uygulama ortamına (kromatografik ortamın fiziksel şekline göre) göre;

- **Kolon Kromatografisi**
- **Düzlem Kromatografisi**

Kolon kromatografisinde, sabit faz yüksek basınca dayanıklı bir kolona tutturulur ve hareketli faz basınç altında, bu sabit faz arasından geçmeye zorlanır.

Düzlem kromatografisinde, sabit faz düz bir plaka üzerine veya bir kağıdın gözenekleri arasına tutturulur ve hareketli faz sabit faz arasından kapiler etkisiyle veya yer çekimi etkisiyle hareket eder. Şekil 8.1’de kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması verilmiştir.

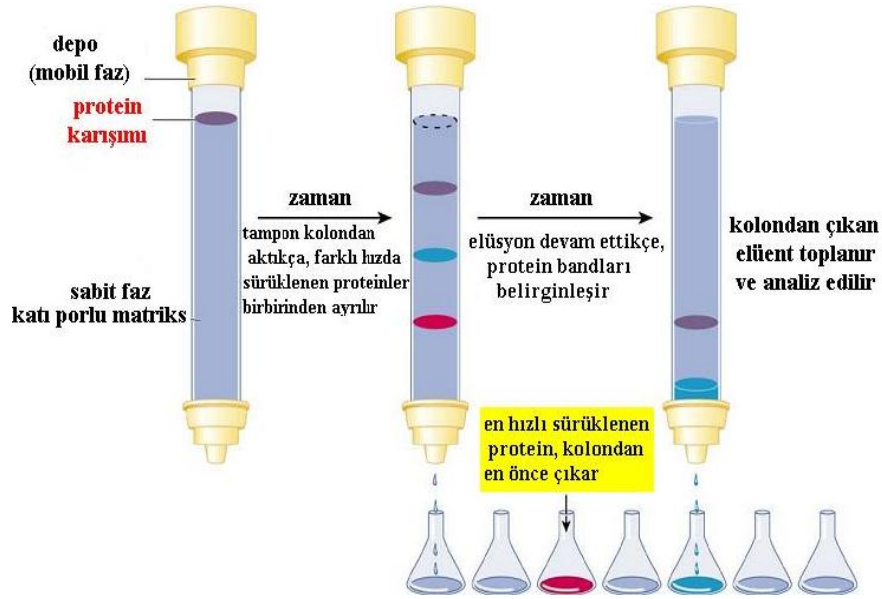


Şekil 8.1. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

8.1.1. Kromatografik Ayırma Tekniği

Hareketli fazın ilerlemesiyle çözünen maddelerin sabit faz üzerinden sürüklenmelerine **elüsyon**, kullanılan çözücüyü **elüent** adı verilir. Şekil 7.2’de bir protein karışımının kromatografi tekniği ile ayrılmasının şematik gösterimi görülmektedir. Kolona çözücünün sürekli verilmesi, hareketli ve sabit faz arasında sürekli madde aktarımı yaparak, çözünen madde taneciklerini kolondan sürükler. Numune enjeksiyon sonrasında kolona gelir ve numunenin bileşenleri kolonun iki fazı

arasında dağılır. Kolona katılan hareketli faz numune taneciklerini içeren çözücüyü kolonda ilerlemeye zorlar.



Şekil 8.2. Kromatografik ayırma tekniğinin şematik gösterimi

8.1.2. Kromatografide Ayırmayı Etkileyen Parametreler

Kolon kromatografisinin etkinliği çeşitli faktörlerin düzgün ayarlanmasına bağlıdır. Bu faktörler şöyle sıralanabilir:

- ❖ Adsorban (sabit faz) seçimi
- ❖ Hareketli fazın (çözücü) polaritesi, bileşimi, akış hızı
- ❖ Kullanılacak kolonun türü, boyu ve çapı
- ❖ Örneğin hacmi ve derişimi
- ❖ Detektör türü, dalga boyu vb.

Kolon dolgu maddesi veya sabit faz olarak bağlama kapasitesi farklı çeşitli adsorbanlar kullanılmaktadır. Bağlanma kapasitesi, adsorban ve ayrılacak maddenin polaritelerine bağlıdır. Polar bir dolgu maddesinde ayrılacak maddenin polaritesi ne kadar fazlaysa bağlanma da o kadar güçlü olacak ve bu maddenin kolon ya da ince tabaka boyunca ilerlemesi zor olacaktır. Polaritesi aynı olan maddelerden molekül ağırlığı fazla olan daha yavaş ilerler. Adsorbanla moleküller arasında Van der Waals etkileşimleri, dipol-dipol etkileşimleri, hidrojen bağları, koordinasyon kompleksi oluşumu, tuz oluşumu gibi etkileşimler olabilmekte, bu etkileşimlerin varlıkları ve oranları değişik moleküllerin farklı oranlarda adsorblanmasına yol açmaktadır. Bu etkileşimlerden en güçlü olanı tuz oluşumudur. Daha sonra koordinasyon kompleksi

oluşumu, hidrojen bağları, dipol-dipol etkileşimleri ve Van der Waals etkileşimleri gelir.

Kolon kromatografisinde çeşitli adsorbanlar (sabit faz) kullanılabilmesine rağmen en yaygın olarak kullanılan adsorbanlar silika jel ($\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) ve aluminadır ($\text{Al}_2\text{O}_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$). Selüloz ve nişastanın adsorblama gücü zayıftır. Alumina ve silika ile ayrılamayan çok polar bileşiklerin ayrılmasında kullanılırlar.

Kolon kromatografisinde kullanılacak olan sabit fazın özellikleri şunlar olmalıdır;


- Ayrılması gereken maddeleri parçalamamalı,
- Ayrılması beklenen maddeler ile kimyasal tepkime vermemeli,
- Adsorpsiyon kapasitesi yüksek olmalı,
- Kullanılacak hareketli fazda çözünmemeli,
- Adsorpladıkları maddeleri kolaylıkla geri vermelidir.

Kromatografide hareketli faz (yürütücü) olarak kullanılacak olan çözücülerin özellikleri şunlardır:


- Adsorbanı çözmemelidir,
- Adsorban ve ayrılacak maddelerle tepkime vermemelidir,
- Ayrılacak maddelerin desorbsiyonu için iyi bir seçiciliği olmalıdır,
- Ayrılacak maddeleri yeteri kadar çözebilmelidir,
- Ayrımdan sonra kolay uzaklaştırılabilmek için düşük kaynama noktasına sahip olmalıdırlar
- Toksik olmamalı ve ucuz olmalıdırlar.

Genellikle, polar çözücüler maddeleri daha kolay yürütürler. Polar maddeler için polar, apolar maddeler için apolar çözücüler uygundur. Adsorbanın bağlama kuvveti ile çözücünün polaritesi arasındaki denge maddelerin adsorbandan ve dolayısıyla kolondan ayrılma hızını kontrol eder. Çizelge 8.1, 8.2 ve 8.3 de sırasıyla organik bileşiklerin adsorblama yetenekleri, sabit fazların adsorblama yetenekleri ve hareketli fazların yürütme yetenekleri gösterilmektedir.


Çizelge 8.1. Organik bileşiklerin adsorblanma yetenekleri

Alkanlar	$R-CH_2-CH_2-R'$	HIZLI YÜRÜME
Alkenler	$R-CH=CH-R'$	<div style="text-align: center;"> <p>Artan Adsorblanabilme Yeteneği</p>  </div>
Dienler	$R-CH=CH-CH=CH-R'$	
Aromatik Bileşikler		
Halojenürler	$R-CH_2-X$ (X= F, Cl, Br, I)	
Eterler	$R-CH_2-O-CH_2-R'$	
Esterler	$R-(C=O)-O-R'$	
Amidler	$R-(C=O)-NR_2'$	
Ketonlar	$R-(C=O)-R'$	
Aldehitler	$R-(C=O)-H$	
Alkoller	$R-CH(OH)-R'$	
Aminler	$R-CH(NR_2')-CH_2-R'$	
Karboksilik Asitler	$R-(C=O)-OH$	YAVAŞ YÜRÜME

Çizelge 8.2- Sabit fazların adsorblama yetenekleri

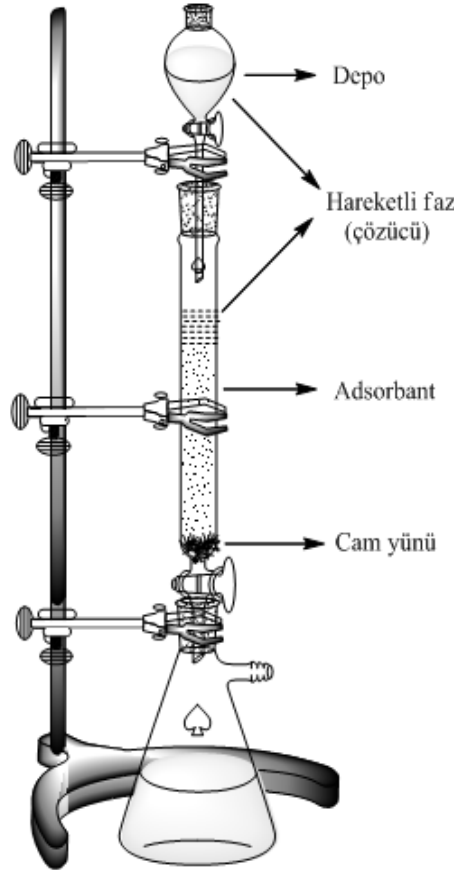
Selüloz	<div style="text-align: center;"> <p>ARTAN BAĞLAMA KAPASİTESİ</p>  </div>
Nişasta	
Sodyum karbonat	
Kalsiyum karbonat	
Kalsiyum fosfat	
Magnezyum karbonat	
Magnezyum hidroksit	
Silika jel	
Magnezyum silikat (Florosil)	
Aktif karbon	
Alumina	

Çizelge 8.3-Hareketli fazların yürütme yetenekleri

Alkanlar (Petrol eteri, hegzan, siklohegzan vb)		APOLAR
Karbon tetraklorür	CCl_4	<div style="text-align: center;"> <p>Artan Yürütme Kuvveti</p>  </div>
Toluen		
Diklorometan, dietil eter	$CH_2Cl_2, C_2H_5-O-C_2H_5$	
Kloroform	$CHCl_3$	
Aseton	$CH_3-(C=O)-CH_3$	
Etil asetat	$CH_3-(C=O)-O-CH_2-CH_3$	
Etil alkol	CH_3CH_2-OH	
Metil alkol	CH_3-OH	
		POLAR

8.2. KOLON DOLDURMA YÖNTEMLERİ

Kromatografinin en basit uygulamalarında, (1) alt kısmında adsorbantın kolonda kalmasını sağlamak için cam pamuğu yerleştirilmiş musluklu uzun cam tüp ve (2) toplama kabı kullanılmaktadır. Bu uzun cam tüp toplama kabına mantar veya lastik tıpa ile bağlanabilir (Şekil 7.3). cCm tüp içerisine adsorban doldururken, adsorbanın üst kısmına çözelti ve çözücü ilavelerini yapabilmek için yeteri kadar boşluk bırakılmalıdır.



Şekil 8.3. Adsorpsiyon kromatografî düzeneği

Kolon kromatografisindeki işlemlerden en önemlisi ayırma işleminde kullanılacak olan kolonun paketlenmesidir. Kullanılacak adsorban kolona iyi yerleştirilmediği zaman yapılan deneylerden birbirini tutmayan sonuçlar elde edilir. Adsorbanın kolona düzgün ve sıkıştırarak yerleştirilmesi ve de adsorban içerisindeki hava kabarcıklarını uzaklaştırmak için uzunluğu kolondan biraz daha büyük ve ucuna lastik hortum parçası geçirilmiş bir cam baget kullanılmalıdır.

Kromatografik kolonların doldurulmasında birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden bir tanesi “yaş yöntem” olarak bilinmektedir. Cam yünü çözücü ile ıslatıldıktan sonra kolonun içerisine yerleştirilir ve kolon çözücü-adsorban karışımı ile doldurulur. Bu işlemten sonra yer çekiminin etkisiyle adsorbanın kolon içerisine

yerleşmesi ve adsorban ile dolu kısmın deney için yeterli olup olmadığını kontrol etmek amacıyla bir müddet beklenir. Kolon içerisindeki hava kabarcıkları kolonun iyi çalışmasını engellediğinden, bu kabarcıklar yukarıda belirtilen uzun cam baget yardımıyla ortamdan uzaklaştırılır. Diğer yaş yöntem de ise kolona çözücü ile ıslatılmış cam yünü yerleştirildikten sonra adsorban ve daha sonra çözücü konulur. Adsorbanın kolon içine yerleşmesi için kolonun alt ucundaki vana açılarak çözücünün düzenli ve yavaş akması paketleme işleminin iyi olduğunu gösterir.

Kolon paketlemesinde kullanılan “kuru yöntem” da kolona 1 cm yüksekliğinde dolduracak kadar adsorban kolona doldurulur. Kolona hafif vurmak suretiyle doldurulan adsorbanın yerleşmesi sağlanır. Bu işlem tamamlandıktan sonra bir miktar daha adsorban ilave edilir ve adsorbanın yerleşmesi için kolona hafif hafif vurma işlemi tekrarlanır. Adsorbanın sıkıştırılması işleminde uç kısmında lastik veya mantar bulunan uzun boylu cam baget kullanılır. Kolonun dolgulu kısmının yüksekliği yeterli olduğunda, adsorbanın yüzeyini ve dolgunun korunması için adsorbanın üst kısmına süzgeç kağıdı veya cam yünü yerleştirilir. Çözücü ile adsorbanın doyurulması için kolona çözücü dikkatlice dökülerek doldurulur. Bu kolon işlem bittikten sonra ileride yapılacak çalışmalar için kurutulmamalıdır.

8.3. RENKSİZ MADDELERİN KROMATOGRAMLARI

Kromatografik adsorpsiyon kolonlarında renksiz bileşik de iyi tanımlanabilir bandlar oluşturabilirler. Buna rağmen bu bantların yerlerini belirlemek ve karışımın bileşenlerine ayırmak için özel yöntemler uygulanmalıdır. Adsorplanan maddelerin yerlerini belirlemede kullanılan en önemli metotlardan birisi ultraviyole lambası metodudur. Bu yöntemin temeli; normal ışıktaki renksiz görünen maddelerin ultraviyole ışık altında kuvvetli floresans vererek görünür olmalarına dayanmaktadır. Bu nedenle, kısmi olarak karanlık olan bir yerde kolon ultraviole ışını ile ışınlanırsa kolonda oluşmuş olan renksiz maddelerin bantları kolaylıkla görülebilir. Aktif karbon gibi koyu renkli adsorbanlar kullanılsa dahi ultraviyole ışını bu adsorbanlar üzerinde oluşmuş olan renksiz bantları görünür hale getirebilmektedir. Floresans vermeyen renksiz maddeler farklı yöntemler kullanılarak tayin edilebilir. Örneğin; kolonda adsorblanan madde ile uygun bir reaktif tepkimeye sokularak maddenin renkli bir bileşiğinin oluşması sağlanır. İki veya daha fazla alkenin adsorplandığı kolona seyreltik potasyum permanganat çözeltisi ilave edilerek kolonun iç çeperi boyanır. Oksidant alken ile

tepkimeye girdiğinde permanganatın mor rengi kaybolur. Kaybolan mor rengin yerine mangan dioksitin kahve rengi alır. Bu işlemten sonra kolon kısımlara bölünür. Oksitlenen alken ve mangan dioksit tabakası kazınır. Uygun bir çözücü yardımıyla alken adsorbanttan alınır.

Adsorbe olmuş karışımın farklı fraksiyonlarının yerlerini belirlemek amacıyla “deneme yanılma” yöntemi de kullanılabilir. Örneğin; kolonda adsorbe olan bileşenler polaritesi gittikçe artan çözücüler kullanılarak kolondan alınmaya çalışılır. Süzüntüler küçük kaplarda toplanır. Kaplardaki çözeltilerin çözücüleri buharlaştırarak ayrılan organik maddeler elde edilir. Bu organik maddelerin kaynama noktalarına ve diğer özelliklerine bakılarak bileşikler tanımlanır. Özellikleri birbirine benzeyenler birleştirilir.

8.4. KOLON ADSORPSİYON KROMATOĞRAFİSİNİN KULLANIM ALANLARI

Adsorpsiyon kromatografisi genellikle karışımların bileşenlerine ayrılmasında kullanılır. Yalnız kolon kromatografisinin diğer kulamın alanları da bulunmaktadır. Bu alanlar;

1. Bileşiklerin saflaştırılmasında, bileşiklerin içermiş oldukları küçük miktarlardaki safsızlıkların uzaklaştırılması,
2. Kimyasal maddelerin homojenlik tayinleri,
3. Bileşiklerin birbirinin aynı olup olmadıklarının mukayesesi,
4. Kök, kabuk, bitki veya ağaç yapraklarından organik çözücüler ile ekstrakte edilen derişimi oldukça küçük maddelerin derişik hale getirilmesi dir.

8.5. KOLON KROMATOĞRAFİ DENEYLERİ

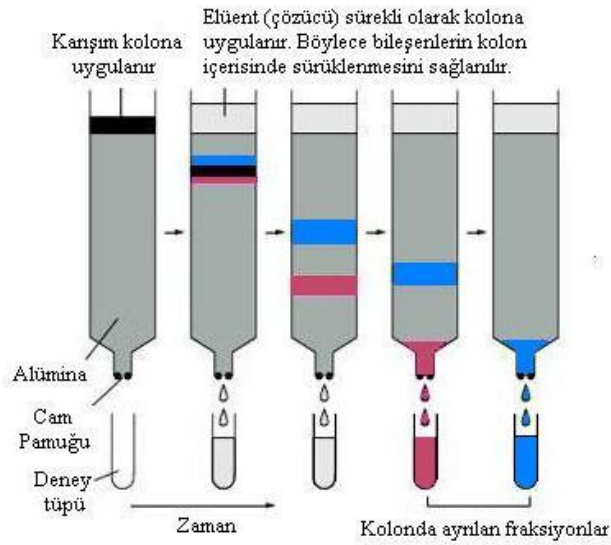
8.5.1. Kurşun-Cıva ve Bakır Kobalt Ayırımı

Gerekli Aletler ve Kimyasal Maddeler

- ✓ 0.1 M $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$, KI çözeltileri
- ✓ Bazik alüminyum oksit,
- ✓ Sülfonik asit,
- ✓ Demir(III) amonyum sülfat,
- ✓ Hidrojen peroksit.

Deneyin Yapılışı

1) Cam kolonun dibine cam pamuğu yerleştirilir (Cam pamuğu elle tutulmamalıdır, bir pens ile yerleştirilmelidir) ve kolona adsorban olarak 3.8 g Al_2O_3 konulur. Daha sonra 0.1 M Cu^{2+} ve 0.1 M Co^{2+} iyonlarını içeren çözeltiden 0.5 mL kolona uygulanır. Bu çözeltinin adsorban içine girmesinden sonra 5 mL su konulur. Çözelti kolondan geçirilir. Gerekirse su eklenir. Böylece bir kromatogram oluşur. Üstte açık mavi Cu^{2+} bölgesi ve altta açık pembe Co^{2+} bölgesi gözlenir. Şekil 8.4’ de ayırım şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 8.4. Bakır ve kobalt iyonları karışımının kolon kromatografisi ile ayırımının şematik gösterimi.

2) İki tane kolon alınız. Kolonların her ikisini de deney 1’ de olduğu gibi hazırlayınız.

- a. Kolonlardan birine 0.5 mL 0.1 M Hg^{2+} ve 0.1 M Pb^{2+} içeren çözeltiyi koyunuz. Hareketli faz olarak su koyunuz. 10 dakika bekleyiniz. Daha sonra üzerine 0.1 M KI çözelti ilave ediniz. Üstte sarı PbI_2 bölgesi ile altta kırmızı HgI_2 bölgesini gözleyiniz.
- b. Kolona aynı çözeltiden 5 mL koyunuz. 1’ er mL beherlerde toplayınız. Her bir beherin üzerine 0.1 M KI ilave ediniz ve renkleri gözleyiniz.

Sonuçların Değerlendirilmesi

Cu^{2+} ve Co^{2+} Ayırımı:

Kullanılan elüent:
Elüsyon çeşidi:
Kolondan ilk ayrılan madde:
Kolonu en son terk eden madde:
Yorum:

Hg^{2+} ve Pb^{2+} Ayırımı:

Kullanılan elüent:
Elüsyon çeşidi:
Kolondan ilk ayrılan madde:
Kolonu en son terk eden madde:
Yorum:

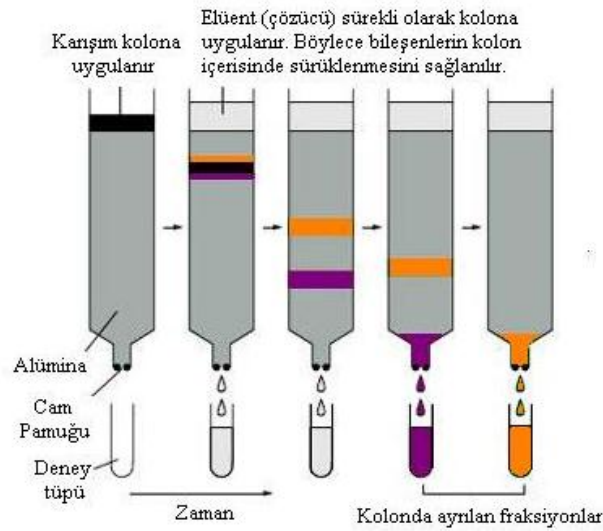
8.5.2. Permanganat- Dikromat İyonlarının Ayırımı

Gerekli Aletler ve Kimyasal Maddeler

- ✓ Alumina,
- ✓ 0.5 M HNO_3 ,
- ✓ 0.02 M KMnO_4 ,
- ✓ 0.016 M $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$.
- ✓ Cam kolon
- ✓ Deney tüpü

Deneyin Yapılışı

Kolona yaklaşık 2.5 g alumina koyup 0.5 M nitrik asit ile yıkanır. Kolonda hava kabarcıkları kalmamasına dikkat edilir. Daha sonra eşit hacimde karıştırılmış permanganat ve dikromat çözeltisinden 2 mL adsorban üzerine koyunuz. 2 mL/dk. hız ile kolondan nitrik asit geçiriniz. Dikromat kolonda kalırken permanganat kolonda ilerler. Nitrik asit vermeye devam ederek kolon altından permanganat toplayınız. Sonra nitrik asit yerine 1.0 N H_2SO_4 u hareketli faz olarak kolona verilir. Kolon altından dikromat toplanır. Şekil 8.5’ de permanganat ve dikromat iyonlarının ayırımı şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 8.5. Permanganat ve dikromat iyonları karışımının kolon kromatografisi ile ayırımının şematik gösterimi

Sonuçların Değerlendirilmesi

MnO_4^- ve $Cr_2O_7^{2-}$ Ayırımı:

Kullanılan elüent:
Elüsyon çeşidi:
Kolondan ilk ayrılan madde:
Kolonu en son terk eden madde:
Yorum:

8.5.3. Metil Oranj-Metilen Mavisinin Ayırımı

Gerekli Aletler ve Kimyasal Maddeler

- ✓ Bazik alumina (Al_2O_3),
- ✓ Metilen mavisini
- ✓ Metil oranj
- ✓ Etil alkol (%95)
- ✓ Cam kolon
- ✓ Deney tüpü

Deneyin Yapılışı

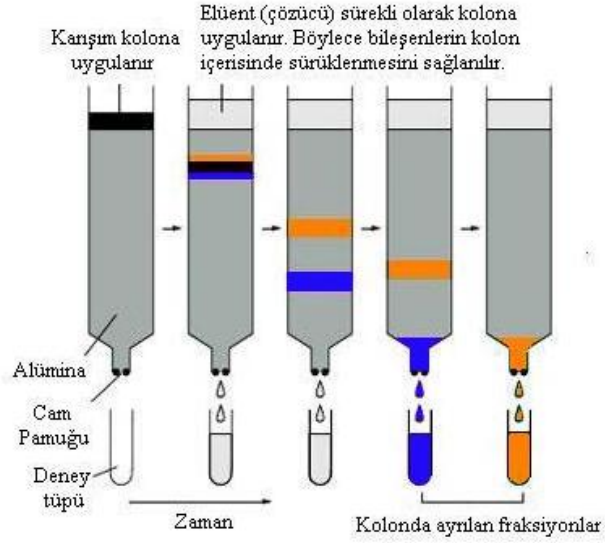
1–2 mg metil oranj ve 5 mg metilen mavisini 2.5 mL etanol içinde çözülerek ayrılacak karışım çözeltisi hazırlanır. Kolonun dolgu maddesi (alümina) hareketli faz olarak kullanılacak etanol ile doyurulur.

Hazırlanan metilen mavisini ve metil oranj karışım çözeltisinden yaklaşık 50 mL, adsorbanla sıkı bir şekilde doldurulmuş dikey kolonun en üst kısmından uygulanır ve etanol ilavesi ile yürütme işlemine başlanır.

Kolon boyunca metilen mavisinin metil oranjdan daha hızlı ilerlediği gözlemlenince daha çok etanol eklenerek işleme devam edilir. Kolondan gelen toplama kabında metilen mavisini biriktirilir, çözelti renksiz bir hal alıncaya kadar işleme devam edilir ve metilen mavisini ayrılır.

Metil oranj, kolon dolgusu tarafından çok daha fazla adsorblandığı için, yürütücü çözeltiyi daha polar bir çözelti ile değiştirerek deneye devam edilir. Bu sebepten ayırma hunisindeki etanol saf su ile değiştirilerek işleme devam edilir.

Metil oranj tamamen kolondan temizlenene kadar saf su ilavesine devam edilir. Deneyin sonunda metil oranj da ayrılır ve ayrı kaplarda iki farklı boyaya sahip olunur. Şekil 8.6' da ayırımın şematik gösterimi yer almaktadır.



Şekil 8.6. Metilen mavisi ve metil oranj karışımının kolon kromatografisi ile ayırımının şematik gösterimi

Sonuçların Değerlendirilmesi

Metilen mavisi ve Metil oranj ayırımı:

Kullanılan elüent:
Elüsyon çeşidi:
Kolondan ilk ayrılan madde:
Kolonu en son terk eden madde:
Yorum:

8.5.4. Bitki Pigmentlerinin Kolon Kromatografisiyle Ayırımı

Gerekli Aletler ve Kimyasal Maddeler

- | | |
|---------------------------|---------------------|
| ✓ 3-4 yaprak taze ıspanak | ✓ Sodyum sülfat |
| ✓ Petrol Eteri | ✓ Kalsiyum karbonat |
| ✓ Metanol | ✓ Alüminyum oksit |
| ✓ Benzen | ✓ Pudra şekeri |

Deneyin Yapılışı

3-4 tane taze ıspanak yaprağı 45 mL petrol eteri, 5 mL benzen, 15 mL metanol karışımında 1 saat bekletilir. Süre sonunda yeşil renkli çözelti süzülerek alınır ve ayırma hunisinde birkaç kez su ile çalkalanmadan yıkanarak metanol uzaklaştırılır. Çözelti bundan sonra sodyum sülfat ile kurutulur.

20 cm boyunda 1 cm çapında kolona önce cam pamuğu yerleştirilir sonra dikkatle sırasıyla 2 cm yüksekliğinde Al_2O_3 , 4 cm yüksekliğinde $150^\circ C$ ' de kurutulmuş $CaCO_3$ ve 6 cm yüksekliğinde pudra şekeri doldurulur. Bu şekilde hazırlanan kolondan sabit ve hafif vakum altında önce petrol eteri sonra da hazırlanan yeşil çözelti geçirilir. Kısa zaman sonra kolonda değişik renklerde dört bölge oluşacaktır. En üstteki bant sarı-yeşil renkte olup **Klorofil b'** yi, onun altındaki tabaka mavi-yeşil renkte olup **Klorofil a'** yi, onun altındaki sarı bant **Ksantofil'** i ve en alttaki sarı bant ise **Karoten'** i içerir.

Eter ile elue edilen maddeler fraksiyon fraksiyon ayrı kaplara alınır. Her bantın ortasına isabet eden bölge ayrı fraksiyon edilerek işaretlenir. Bütün fraksiyonlar aynı Kieselgel ince tabaka plağına 1.5 cm aralıkta tatbik edildikten sonra 9 mL petrol eteri + 1 mL benzen çözücüsünde yürütülür. Her fraksiyonda kaç leke olduğu kontrol edilir. Her bantın ortasından alınmış fraksiyonlar tek leke verirlerse, o zaman Klorofil a, Klorofil b, Ksantofil ve Karoten spektrumları 900nm-200nm arasında çekilir (referans olarak petrol eteri kullanılır).

Sonuçların Değerlendirilmesi

Kullanılan elüent:
Elüsyon çeşidi:
Kolondan ilk ayrılan madde:
Kolondan ikinci olarak ayrılan madde:
Kolondan üçüncü olarak ayrılan madde:
Kolonu en son terk eden madde:
Yorum:

8.6. ARAŞTIRMA SORULARI

1. Kolon kromatografisinde kalitatif ve kantitatif analiz nasıl yapılır?
2. Gradient elüsyon ve izokratik elüsyon nedir?
3. Bant genişlemesi ne demektir? Bant genişlemesini etkileyen faktörler nelerdir?
4. Genel elüsyon sorununu açıklayınız.
5. Kolon kromatografisinden elde edilen bir kromatogramda alıkonma süresi 59 s ve taban genişliği 8.3 s olarak ölçülmüştür. Kolonun boyu 50 cm dir. Kolonun kuramsal plaka sayısını ve plakanın yüksekliğini hesaplayınız. Bir kromatogram çizerek üzerinde kolonun yüksekliğini (h), alıkonma zamanını(t) ve pik taban genişliğini gösteriniz?
6. Preparatif kromatografi ne demektir?

KAYNAKLAR

- Aydın, H., Ayırma Metotları Laboratuvarı, Eylül, 1999, Ankara.
- Özöğüt D., Organik Kimya Lab. Notları, ESOGÜ Fen-Edebiyat Fak. Kimya Bölümü.
- Skoog, D. A., Holler, F.J., Nieman, T. A., Enstrümental Analiz İlkeleri, 5. Baskı, Bilim Yayıncılık, Ankara.