

KROMATOGRAFİK YÖNTEMLER

Kromatografi

- Kromatografiyi (adsorbsiyon kromatografisi) Rus botanikçi Mikhail Tsvett 1900'lü yılların başında bitki pigmentleri üzerine yaptığı araştırmalar sırasında keşfetmiştir.
- Tsvett bu yöntemi bitki pigmentlerinin renkli bileşenlerini ayırmakta kullanmıştır. Kullandığı kolonda **renkli** bandlar olduğundan, bu ayırma yöntemine **kromatografi** adını vermiştir.

Kromatografi sözcüğü yunanca **chromatus = renk** **graphin = yazmak** sözcüklerinden türetilmiştir.



Ünlü Botanikçi kalsiyum karbonat (adsorban) ve petrol eteri/etanol karışımını (elüent) kullanarak (bugün adsorbsiyon kromatografisi olarak bilinen yöntem) bitki pigmentlerini (klorofiller ve karotenoidler) ayırmıştır.

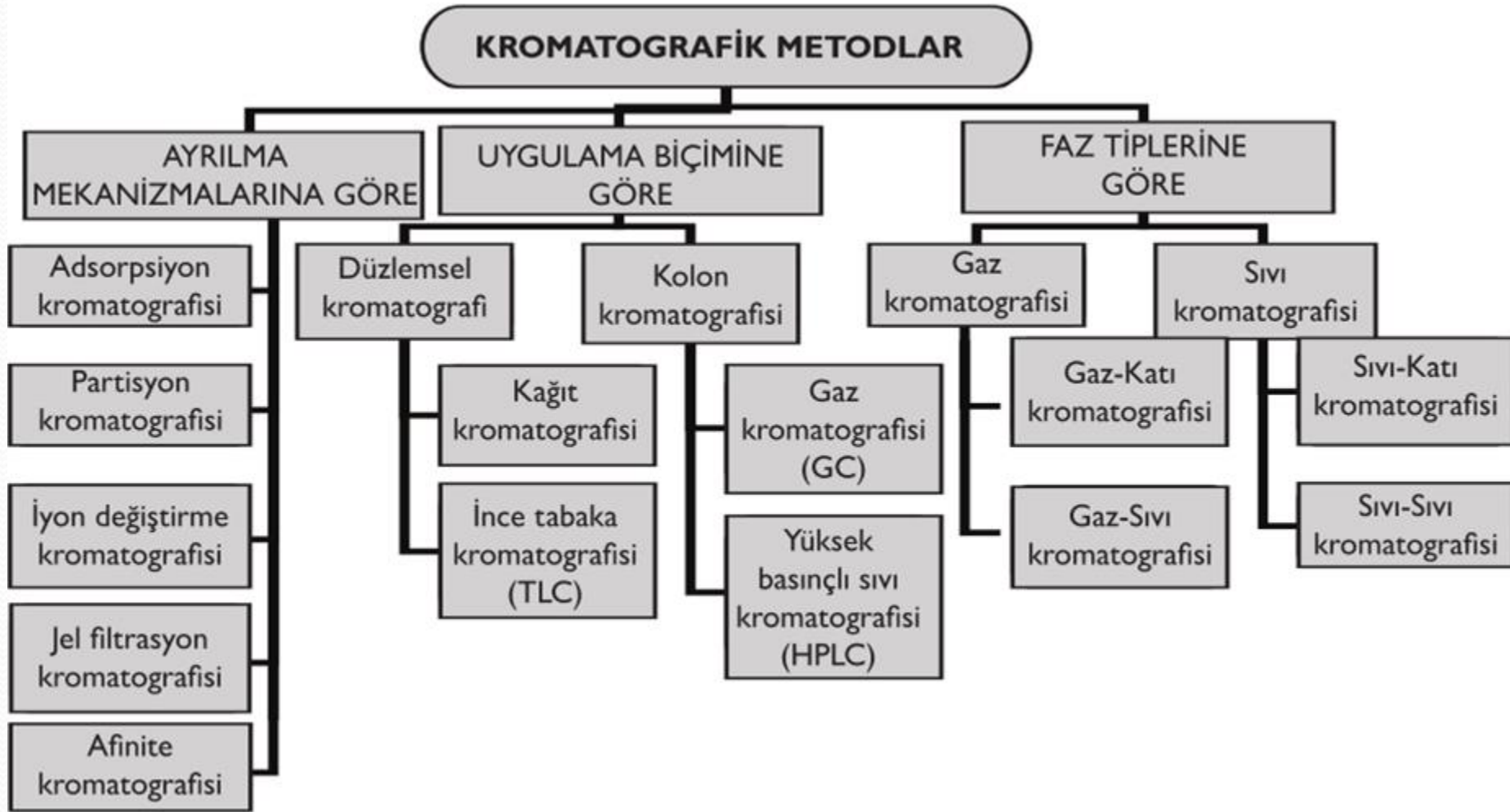
Kromatografi nedir?

- Kromatografi, bir karışım örneğindeki çözünmüş yapıların (biyomoleküller) iki fazda (**sabit ve hareketli fazlar**) farklı dağılımlarına dayanan **fiziksel bir ayırma yöntemidir**.
- Kromatografi, kalitatif ve kantitatif analiz amacıyla yapılan ayırmalarda sıklıkla kullanılan ve oldukça duyarlı (sensitif) bir tayin yöntemidir.

Kromatografide iki temel faz bulunur

- ***Sabit (durgun, durağan) faz:*** Üzerinde ayrılma işleminin yapıldığı faz olup moleküller için destek ortamı görevi görür (kolon, kağıt, ince tabaka vs)
- ***Hareketli (mobil) faz (yürütücü):*** Moleküllerin yürümesini sağlayan fazdır(organik çözücüler).
- Hareketli faz, sabit fazın içinden geçtikçe çözünmüş moleküller iki faz arasında dağılırlar. Sabit faza ilgisi fazla olanlar hareketli faza ilgisi az olanlara oranla sabit fazda daha uzun süre kalırlar. Hareketli faza ilgisi yüksek çözünmüş moleküller daha hızlı göç ederek, sabit faza ilgisi çok olan moleküllerden ayrılırlar. Hareketli fazın fiziksel veya kimyasal özelliklerinin değiştirilmesiyle sabit faza kuvvetli bir şekilde bağlanmış olan çözünmüş moleküller de yerlerinden ayrılırlar.

Kromatografinin Sınıflandırılması



Ayrılma Mekanizmalarına Göre Kromatografi

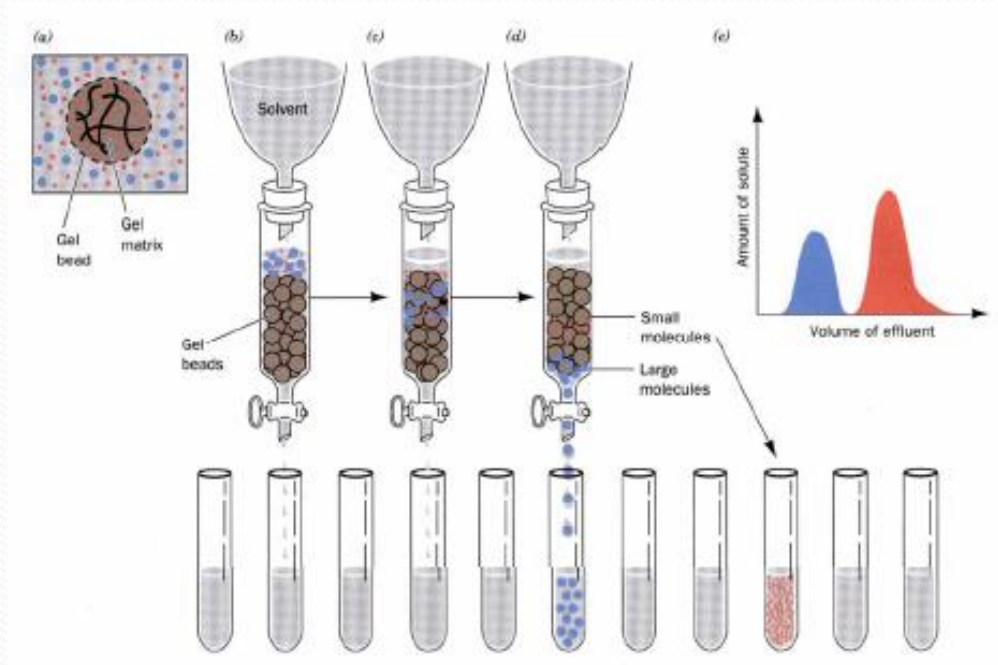
Kromatografik teknikler, uygun ortamlar sağlanarak moleküllerin **adsorblanma, çözünme, yük, büyüklük, şekil, kütle ve affinite (spesifik ilgi)** gibi özelliklerindeki farklılıklara göre ayrılmasını sağlayan fiziksel bir analiz metodudur.

1. Adsorpsiyon kromatografisi
2. Dağılma (paylaşım, partisyon) kromatografisi
3. İyon değiştirme kromatografisi
4. Jel filtrasyon (Moleküler eleme) kromatografisi
5. Afinite kromatografisi

Adsorbsiyon Kromatografisi

- Moleküllerin, mangal kömürü, alüminyum oksit ve hidroksi apatit gibi inorganik **adsorban** maddeler tarafından **fiziksel kuvvetlerle** (Van der Waals kuvvetleri, hidrofobik etkileşmeler, iyonik etkileşmeler ve hidrojen bağlarıyla) tutulmaları esasına dayanır.
- Tutulan bu moleküller daha sonra uygun çözücülerle serbest bırakılarak diğerlerinden ayrılır.

Jel Filtrasyonu



- Karışımındaki moleküllerin, **molekül büyüklüklerine** göre ayrılması esasına dayanır.
- Kullanılan jeller: polisakkarid ve poliakrilamid polimerleri.

- Moleküller, belirli konsantrasyonlarda hazırlanabilen ve bir kolon içerisine doldurulan şişirilmiş (hidrate) jel tarafından ayrılır. Hidrate jelin konsantrasyonu, ayrımı yapılacak olan molekülün büyüklüğüne göre seçilir. Ayrılacak moleküller **por** denilen gözeneklerde tutulur, diğer moleküller atılır. Tutulan moleküllerin daha sonra uygun bir tampon veya sıvı (hareketli faz yardımı ile kolondan ayrılmaları sağlanarak tüplere alınır.



Dağılma (Partisyon) Kromatografisi

- Dağılma kromatografisinde; maddeler sıvı olan sabit faz ile sıvı veya gaz olan hareketli faz arasında dağılır.
- Birbiriyle karışmayan iki fazdan oluşan bir faz sistemi içine konulan madde bu fazlardaki **çözünürlüğüne** bağlı olarak iki faz arasında **dağılır** ve dengeye ulaşır. Böyle bir sistemde maddelerin dağılması sabit olup dağılma katsayısı ile ifade edilir ve K_d ile gösterilir. Böylece K_d değerleri birbirinden farklı olan maddeler kromatografik sistem içerisinde farklı hızlarda ilerleyerek birbirlerinden ayrılırlar.

$$K_d = C_1/C_2$$

C_1 : Maddenin 1. fazdaki derişimi

C_2 : Maddenin 2. fazdaki derişimi

- Faz tiplerine göre partisyon kromatografisi
 - **Sıvı - sıvı**
 - **Sıvı - gaz** kromatografisi şeklinde ayrılır.

İyon Değiştirici Kromatografi

- İyonik türden moleküllerin **büyüklik ve yük** farklılıklarından hareketle bir karışımda çözünmüş maddelerin ayrımını gerçekleştiren bir kromatografi çeşitidir.
- Sabit fazı, silikatlar veya selüloz türevleri taşıyan bir reçine oluşturur. Reçine suda çözünmez. Reçinede bulunan anyonik veya katyonik gruplar, ayrılması planlanan pozitif veya negatif grupları bağlar. Daha sonra uygun pH'da bir tampon yardımı ile bağlanan gruplar uzaklaştırılıp değişik tüplerde toplanabilirler.

Reçineye tutunan (ayrılacak) maddenin **yüküne** göre iki çeşittir:

- **Katyon değiştirici kromatografi:** Reçineye eksi (-) yüklü gruplar [RCOO^- , karboksilmetil (CM)-selüloz] bağlı olup karışımdaki katyonları bağlar.
- **Anyon değiştirici kromatografi:** Reçineye artı (+) yüklü gruplar [kuaterner amonyum: RNH_4^+ , Dietil amino etil (DEAE)-selüloz] bağlı olup karışımdaki anyonları bağlar.

Affinite kromatografisi

- Antijen-Antikor, Enzim-Substrat, DNA-Histon, Reseptör-Hormon gibi oldukça spesifik (özgül) etkileşimlere dayanır.
- Seçiciliği en fazla olan yöntemdir.
- Kolonun yüzeyine (sabit faza) veya kolondaki dolgu maddesine (dekstran, poliakrilamid, selüloz vb), ayrılacak olan maddeyle spesifik kompleks yapabilen bir **ligand** bağlanır:

katı destek

selüloz
sepharoz
dekstran

ligand

DNA
IgG

antibody

antijen

substrat

kosubstrat

Konkavalin A
reseptor

+

spesifik protein



histon
protein A

antijen

antibody

enzim

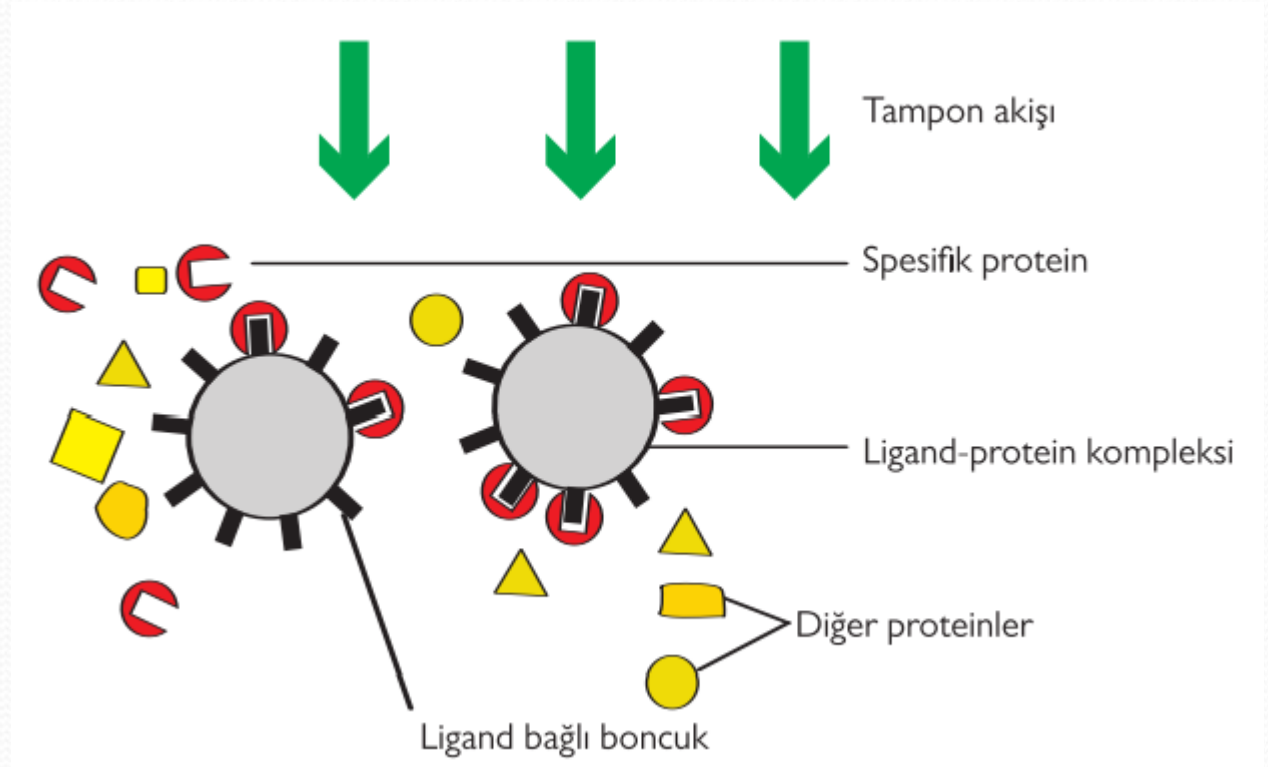
enzim

glikoprotein
hormon

Affinite kromatografisi



Ligand-protein kompleksi



Tampon akışı

Spesifik protein

Ligand-protein kompleksi

Diğer proteinler

Ligand bağlı boncuk

Serbest proteinler

Uygulama Biçimine Göre Kromatografi

1. Düzlemsel kromatografi

- Kağıt kromatografisi
- İnce tabaka kromatografisi (TLC)

2. Kolon kromatografisi

- Gaz kromatografisi (GC)
- Likit (Sıvı) kromatografisi (LC) (HPLC)

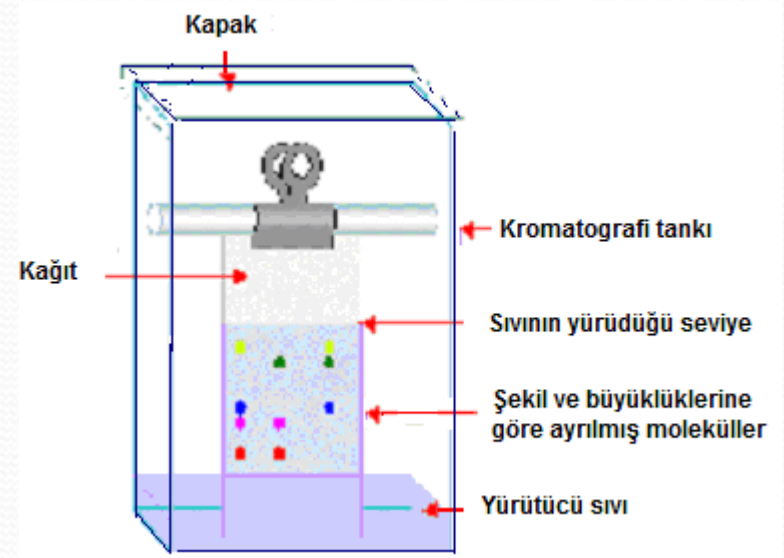
Düzlemsel kromatografi

- Sabit faz (düzlem şeklinde olan) olarak kağıt; cam veya plastik plaklar üzerine yayılmış jel vb. tabakaların kullanıldığı kromatografi çeşididir.
- Sabit fazın çeşidine göre ikiye ayrılır:
 - Kağıt kromatografisi
 - İnce tabaka kromatografisi (TLC)

Kağıt Kromatografisi

- Sabit faz olarak kâğıt, hareketli faz olarak bütanol vb. organik çözücülerin kullanıldığı kromatografi çeşididir.
- Artık pek kullanılmayan bir tekniktir.

- Numune ve standart sabit faza (kromatografi kağıdına) tatbik edilir.
- Sabit faz, içinde belli düzeyde hareketli faz bulunan tanka yerleştirilir (örneklerin uygulandığı noktanın altında).
- Belli bir süre hareketli faz yürütülür (kapiler etki ile).
- Hareketli faz sabit faz üzerinde ilerlerken sabit faza uygulanmış maddeleri beraberinde sürükler (göç ettirir).
- Her bir maddenin **şekli, büyüklüğü, sabit faz ve hareketli faza ilgisi farklı olduğundan göç hızları da farklı** olup böylece bileşenler birbirinden ayrılır.



Maddelerin kromatografi esnasında belirli koşullarda **katettikleri yol** her bir madde için karakteristiktir. Göç hızının ölçüsü olarak alıkonulma faktörü (Retard faktör = R_f) kullanılır.

$$R_f = \frac{x(\text{maddenin katettiği yol})}{y(\text{yürütücünün katettiği yol})} < 1$$

İnce Tabaka Kromatografisi

- Bazı adsorban (alumina, silika jel, sellüloz, sefadeks vb.) maddelerin bir cam veya plastik plak üzerine yayılması ile elde edilmiş tabakaların sabit faz olarak; organik bazı çözücülerin ise hareketli faz olarak kullanıldığı kromatografi çeşididir.
- Uygulama şekli kağıt kromatografiye benzer. En önemli fark sabit faz olarak kağıt yerine ince tabaka kullanılmasıdır.

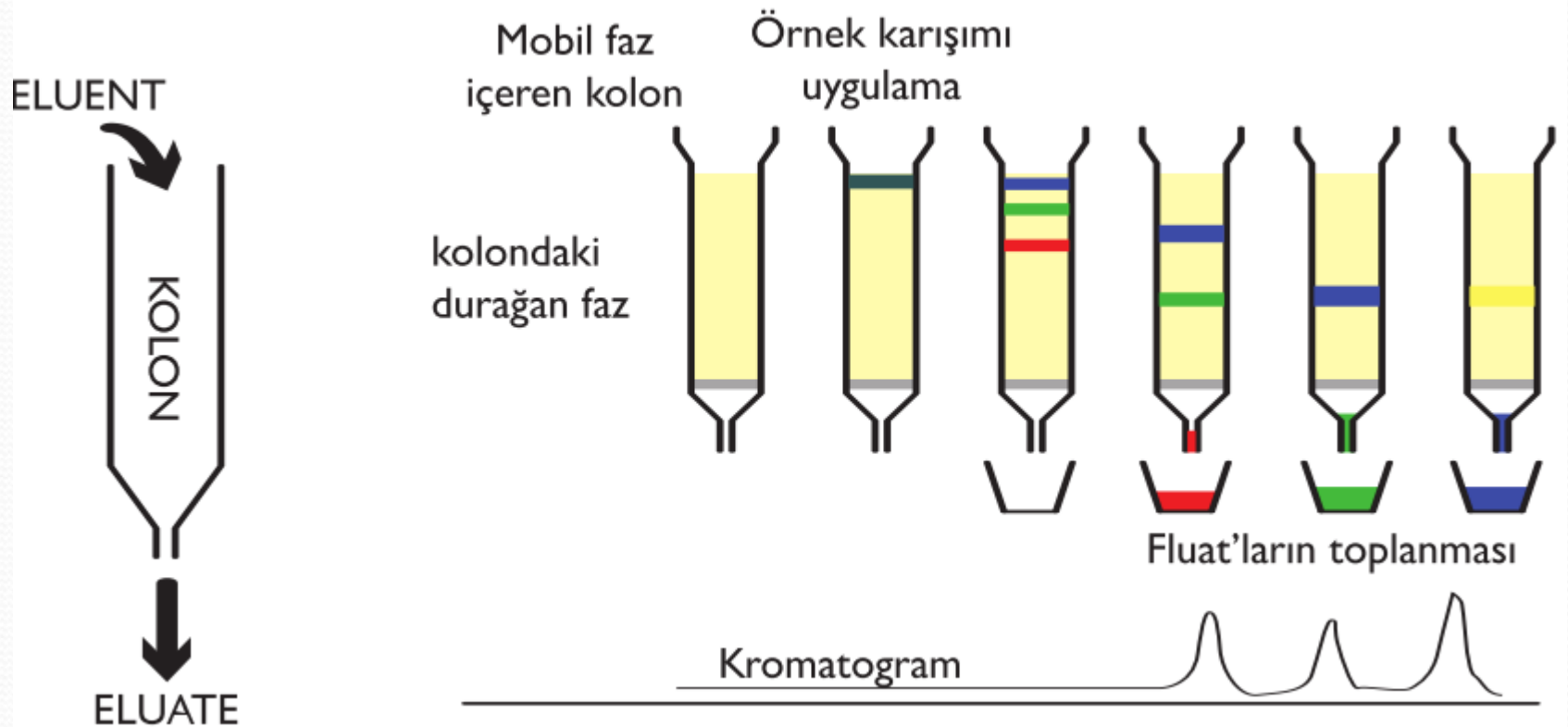
KOLON KROMATOĞRAFİSİ

- Cam, plastik veya metal bir kolon içinde bulunan katı veya sıvı bir sabit(durağan) faz ile sıvı veya gaz mobil fazdan (bir çözücü veya tampon veya taşıyıcı gaz) oluşur.
- Bu tekniklerde (kullanılan kolona bağlı olarak) ayırma mekanizmalarının hepsi geçerlidir.
- Hareketli fazın özelliğine göre ikiye ayrılır
 - Gaz kromatografisi (GC)
 - Gaz-katı kromatografisi
 - Gaz-sıvı kromatografisi
 - Likit (Sıvı) kromatografisi (LC) (HPLC)

İlişkili terimler

- **Elüsyon:** Bir kolondan çözücü (hareketli faz) geçirerek çözünmüş bileşenlerin sabit fazdan taşınması veya sökülmesi işlemi.
- **Elüent:** Sabit faz tarafından alıkonan (tutunan) bileşeni hareket ettirmek için kullanılan çözücü.
- **Eluat:** Elüsyon işlemi sonucu elde edilen ilgili bileşeni içeren fraksiyon(kısım).

KOLON KROMATOĞRAFİSİ



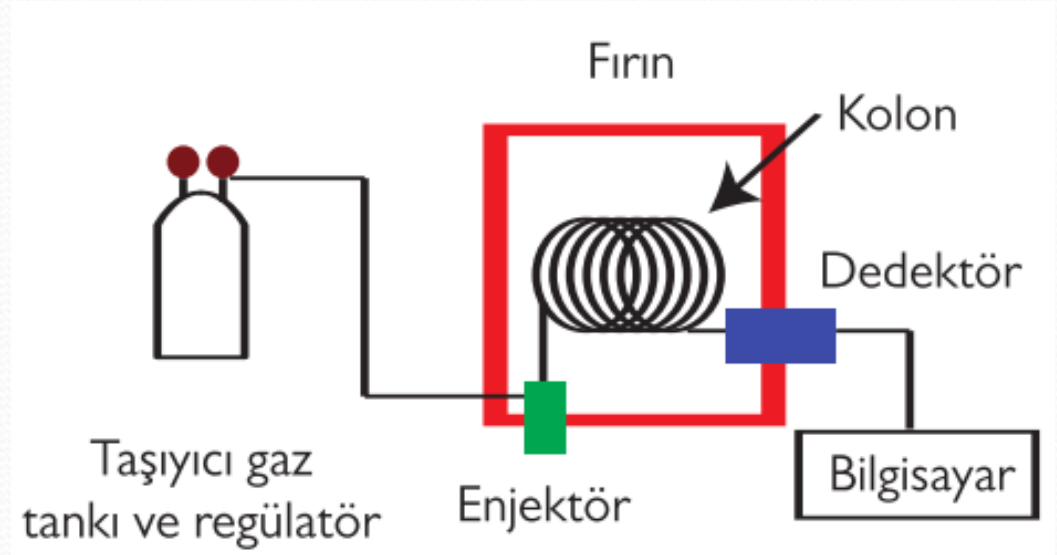
Kromatogram:

Gaz Kromatografisi (GC)

- Hareketli faz olarak **gazın** kullanıldığı bir kromatografi çeşididir.
- **Uçuçu** olan veya **uçucu forma dönüştürülebilen bileşiklerin** ayrılıp tayin edilmesinde kullanılır.
- Sabit faz olarak, içerisi değişik maddelerle doldurulmuş cam veya metal kolonlar kullanılır.
- Hareketli faz, He, Ar, Ne veya N₂ gibi taşıyıcı bir gazdır.
- Diğer kromatik yöntemlerden farklı olarak hareketli faz ayrılacak olan maddelerle etkileşmez sadece maddeleri taşır bu yüzden **taşıyıcı gaz** adını alır.

- Sabit fazın katı ve sıvı oluşuna göre ikiye ayrılır:
 - **Gaz-katı kromatografisi:** Sabit faz silikajel, alimüna ve aktif kömür gibi adsorbanlardır.
Mekanizma=adsorbsiyon
 - **Gaz-sıvı kromatografisi:** Porlu madde etrafına kaplanmış yüksek ısıda buharlaşmayan sıvıdır.
Mekanizma =partisyon

- Yöntemin uygulanmasında çok gelişmiş otomatik cihazlar kullanılır.
- Kolon boyunca değişik hızlarla yürütülen **uçucu** maddeler, dedektörde verdikleri pikler yardımıyla değerlendirilirler.



Gaz kromatografisi cihazını oluşturan bileşenler:

- Mobil faz kaynağı olan silindir ve gazın sistemdeki akışını düzenleyen regülatör (akış kontrol aygıtı),
- Numune enjeksiyonunun yapıldığı kısım (enjektör)
- Isıtma bölümü (fırın),
- Ayırma kolonu,
- Dedektör,
- Bilgisayar

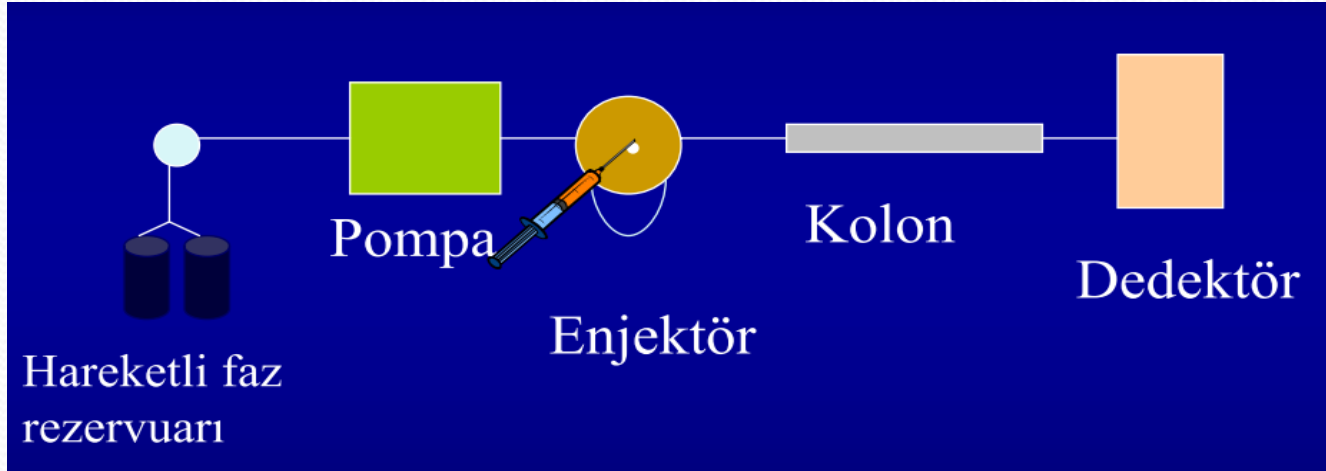
YÜKSEK PERFORMANSLI SIVI KROMATOGRAFİSİ (High Performance Liquide Chromatography, HPLC)

- HPLC, bir karışımdaki bileşenlerin **sıvı hareketli** fazda çözünmeleri ve **yüksek basınç altında** kromatografi kolonundan(**çapı çok küçük dolgu maddesi** içerir)geçerken ayrılmaları prensibi ile çalışan bir tekniktir.

- (HPLC), yaygın olarak kullanılan analitik tekniklerden bir tanesidir. Klinikte bir çok test için **referans yöntem** olarak önerilmektedir.
- HPLC cihazı, diğer sıvı kromatografisi tekniklerinden kolon giriş ve çıkışları arasında oluşturulması gereken yüksek basınç nedeniyle farklılık gösterir.
- Bu teknikte bileşenler, ilk olarak çözgünde çözünür ve daha sonra yüksek basınç altında çok küçük çapta dolgu maddesi (μm düzeyde) içeren kromatografi kolonundan geçmeye zorlanır.

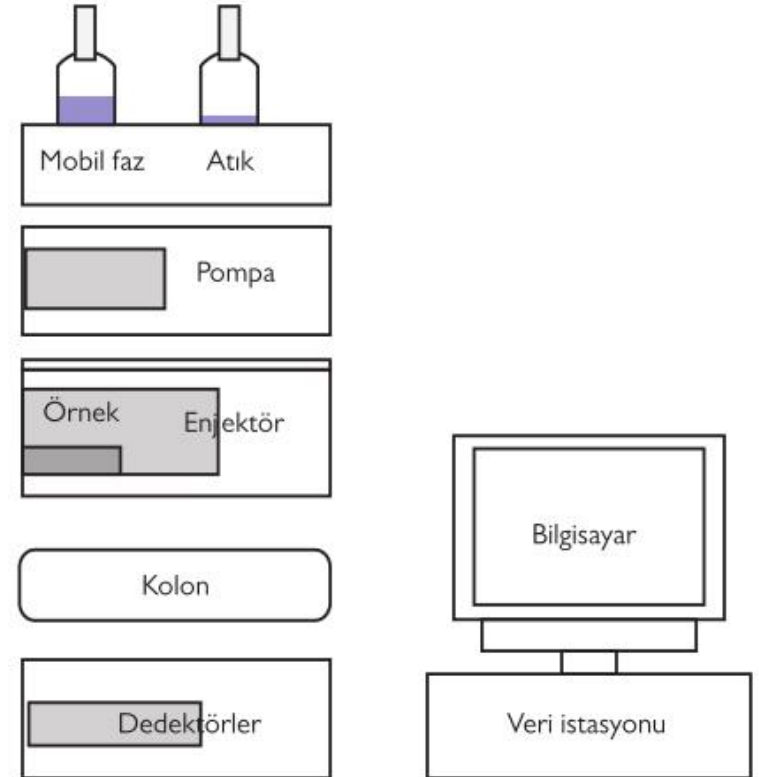
- Sıvı kromatografisinin özel bir uygulaması olan HPLC’de, sabit faz olarak kullanılan dolgu maddesinin **tanecik boyutunun küçültülmesi** sonucu hareketli faz ile etkileşen sabit faz **yüzey alanı büyür** ve böylece **kolonun etkinliği arttırılmış** olur. Çok sıkı olarak doldurulmuş kolondan hareketli fazın belirli bir hızla geçebilmesi için **basınç** uygulanması gerekir

HPLC Cihazının bileşenleri



- Solvent Rezarvuari (Çözücü tankı): Hareketli faz(lar) için depo görevi görür.
- Pompa: Yüksek basınç sağlar.
- Enjeksiyon Sistemi: Numunelerin cihaza verildiği kısım
- Kolon: Sabit fazı içeren ve bileşenlerin ayrıldığı kısım (paslanmaz çeliktendir)
- Dedektör: UV/VIS, Diod array, Floresans dedektörleri, Elektrokimyasal dedektörler, Refraktif indeks dedektörleri ve Kütle Spektrometrisi dedektörleri
- Bilgisayar

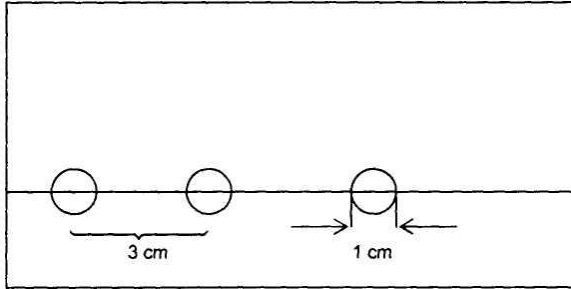
Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografi (HPLC)



Kâğıt Kromatografisi ile Aminoasitlerin Analizi (Deneysel İşlem)

Deneysel Kısım

- **a. Kromatografi kağıdının hazırlanışı:** Bir kromatografi kağıdı alınır. Kurşun kalemle alt kenarından (kâğıt üzerinde sıvının yürüme yönünü gösteren ok yukarı gelecek şekilde) 3 cm yükseklikte bir çizgi çizilir. Bu çizgi üzerinde örneklerin damlatılacağı yerler 3 cm aralıklarla belirlenir. Bu noktalar üzerine her bir standart ve örnek için bir adet olmak üzere 1 cm çaplı daireler çizilir. Kâğıdın hazırlanışı sırasında elin temasıyla oluşacak kirlilikler istenmeyen lekeler oluşturacağı için kâğıdın hazırlanışı sırasında çıplak elle temastan kaçınılmalıdır.



Kromatografi kâğıdı

- ***b. Örneklerin uygulanması:*** Kağıt üzerinde çizilen 1 cm çaplı dairelerin merkezine, daireyi aşmayacak şekilde 10 µL aminoasit standart çözeltisi (0,2 M) veya örnek (serum, idrar vb) yavaş yavaş, gerekirse kurutularak damlatılır. Hangi noktaya hangi standardın ve örneğin konulduğu bilinmelidir.
- ***c. Yürütme işlemi:*** Standart ve örnekler uygulandıktan sonra kağıt rulo şekline getirilerek içerisinde yüksekliği 1,5 cm kadar olan yürütücü sıvının [butanol-asetikasit-su karışımı (12/3/5)] bulunduğu kapaklı kromatografi tanklarına yerleştirilir. Yürütücü sıvı kağıdın boyunu aşmayacak şekilde kağıt tankta 6-18 saat bekletilir.

- **d. Değerlendirme:** Kromatografi tankından çıkarılan kağıt düz bir zemine yayılarak uygun bir boya (genellikle ninhidrin) ile boyanır.
- Kağıt üzerinde ortaya çıkan aminoasidlere ait lekeler iki şekilde değerlendirilir.
 - Kalitatif değerlendirme
 - Kantitatif değerlendirme

Kalitatif Değerlendirme

- Maddelerin kromatografi esnasında belirli koşullarda katettikleri yol her bir madde için karakteristiktir. Göç hızının ölçüsü olarak alıkonulma faktörü (Retard faktör = R_f) kullanılır. R_f belirli koşullarda maddenin katettiği mesafenin çözücünün (yürütücü sıvı) katettiği mesafeye oranıdır. R_f 'nin sayısal değeri her zaman 1'den küçüktür. Başlangıç çizgisinden itibaren yürütücü sıvının kağıt boyunca aldığı yol (y) ve amino grup asit lekelerinin merkezinin başlangıç çizgisine olan uzaklığı (x) ölçülür.
- $R_f = x/y$
- formülünden her bir standart ve numune için R_f değerleri bulunur. R_f değerlerinin karşılaştırılması ile numunedeki aminoasitlerin cinsi kalitatif olarak belirlenir

Kantitatif Değerlendirme

- Leke, büyüklük ve koyuluk yönünden, fotodansitometrik olarak (pikler çizilerek) veya leke kesilip uygun bir çözücü ortamına alındıktan sonra spektrofotometrik olarak değerlendirilebilir