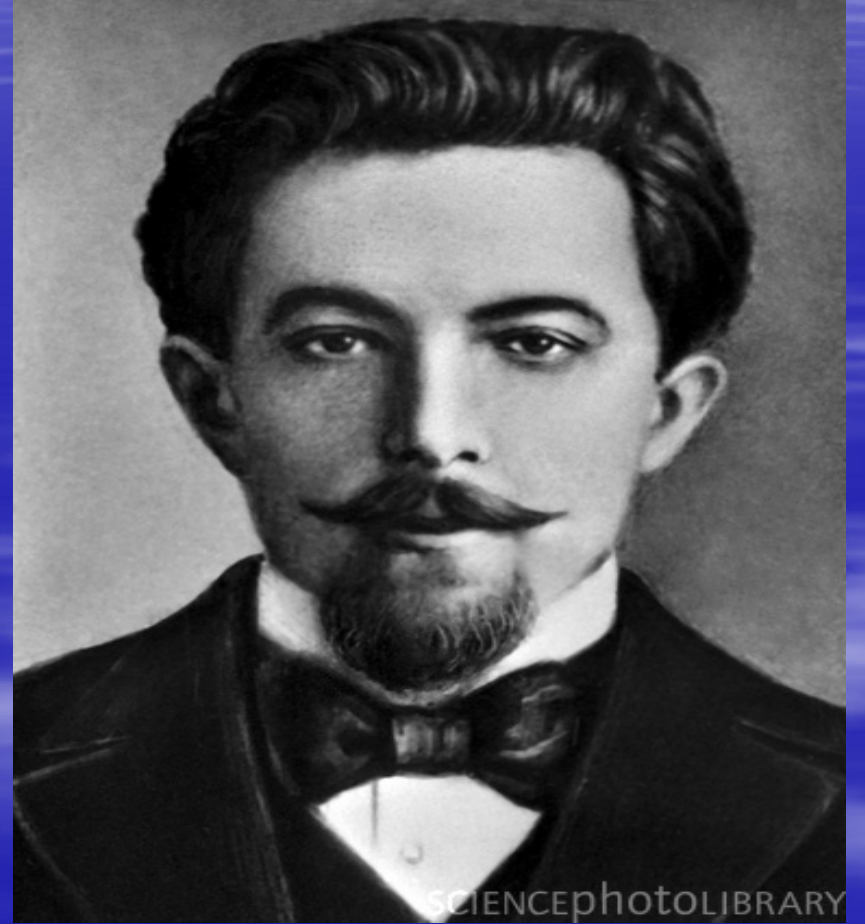


KROMATOGRAFI

- Kromatografi, bir karışımdaki iki ya da daha fazla bileşenin, hareketli (taşıyıcı) bir faz yardımıyla, sabit (durgun) bir faz arasından değişik hızlarda hareket etmeleri esasına dayanır. Kromatografik yöntemlerle, kimyasal ve fiziksel özellikleri birbirine çok yakın bileşenlerden oluşan karışımları, tümüyle, kolayca ve kısa sürede ayırmak olanaklıdır .



- İlk kez Rus botanikçi Mikhail Tsvett(1903) tarafından geliştirilen bir yöntemdir. Tsvett bu yöntemi bitki pigmentlerinin renkli bileşenlerini ayırmakta kullanılmıştır.Kullandığı kolonda renkli bantlar oluştuğundan bu ayırma yöntemine kromatografi adını vermişti.



1-Uygulama Biçimine Göre

- Düzlemsel kromatografi
 - Kağıt kromatografisi
 - İnce tabaka kromatografisi (TLC)
- Kolon kromatografisi
 - Gaz kromatografisi (GC)
 - Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)
 - Süperkritik akışkan kromatografisi

2-Ayrılma Mekanizmalarına Göre

- Adsorpsiyon kromatografisi
- Dağılma kromatografisi
- İyon değiştirme kromatografisi
- Jel filtrasyon (Moleküler eleme) kromatografisi
- İyon çifti kromatografisi
- Afinite kromatografisi

3-Faz Tiplerine Göre

- Sıvı kromatografisi

 - Sıvı-Katı kromatografisi

 - Sıvı-Sıvı kromatografisi

- Gaz kromatografisi

 - Gaz-Katı kromatografisi

 - Gaz-Sıvı kromatografisi

KOLON KROMATOGRAFİSİ



- **Kolon kromatografisi:** biyomoleküllerin
 - saflaştırılmasında sıklıkla kullanılır
- **Kolon**, biyomolekülleri seçici adsorblayan bir maddeyle (katı porlu matriks) doldurulur → **SABİT FAZ**
- biyomolekül karışımı kolona verilir. → **HAREKETLİ FAZ**
- Tampon çözelti (**MOBİL FAZ**) ile
 - yıkanan kolon tarafından, adsorbe edilmeyenler → önce
 - adsorbe edilenler → daha geç
 - kolonu terkeder.



Başlıca **katı dolgu maddeleri** (sabit faz) şunlardır:

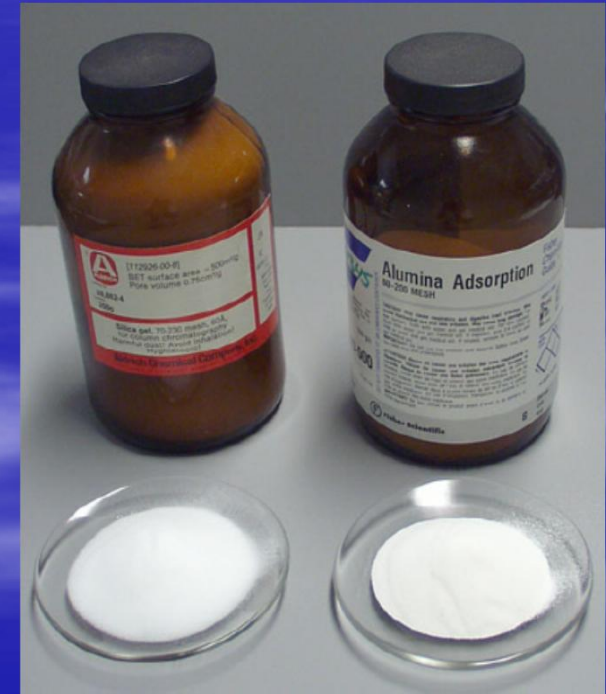
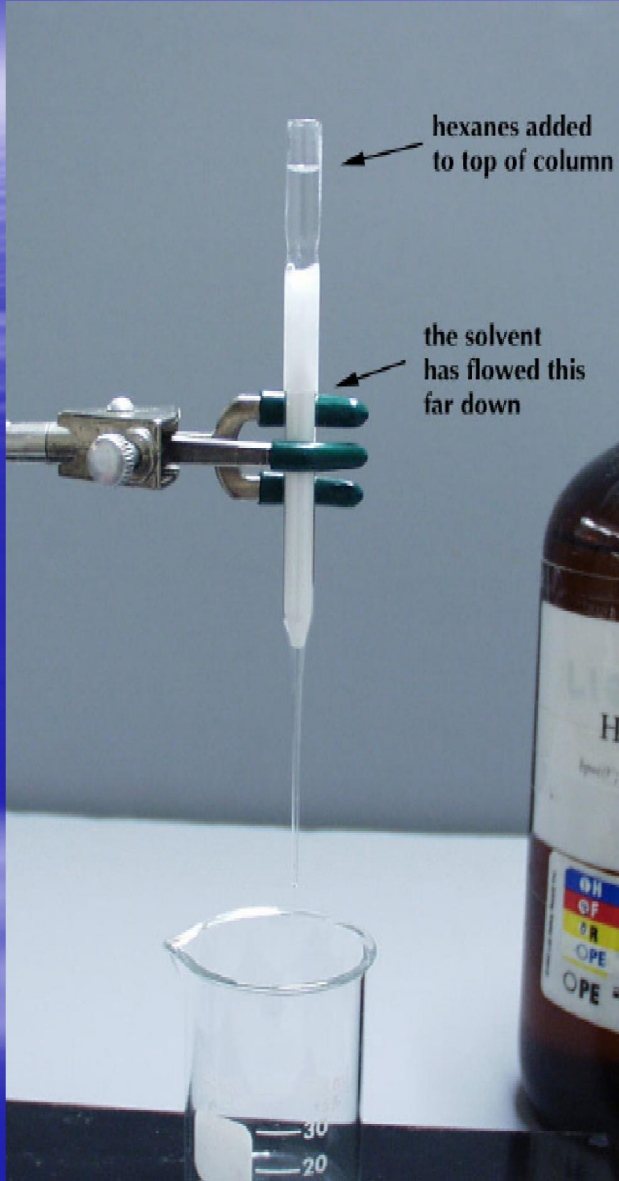
- Silika jel: Genellikle nötr ve asidik yapıdaki bileşikler için uygundur.
- Alumina: Genellikle nötr ve bazik yapıdaki bileşikler için uygundur.
- Sellüloz: Genellikle biyokimyasal maddeler için uygundur.

Hareketli faz görevini üstlenecek **çözücüler**;

Sikloheksan, Kloroform (kanserojen), Metanol, Petrol eter, Metilen klorür, Etanol, Benzen(kanserojen), Etil asetat, Aseton, Toluen, Dietil eter, Karbon tetraklorür(kanserojen), n-Butanol İzopropanol olabilir.

1903 yılında Tsvet bitki pigmentleriyle çalışırken kolon dolgu maddesi olarak kireç kullanmıştı.

Günümüzde ise çoğunlukla **silika jel** ve **alumina** kullanılmaktadır.



SİLİKA JEL

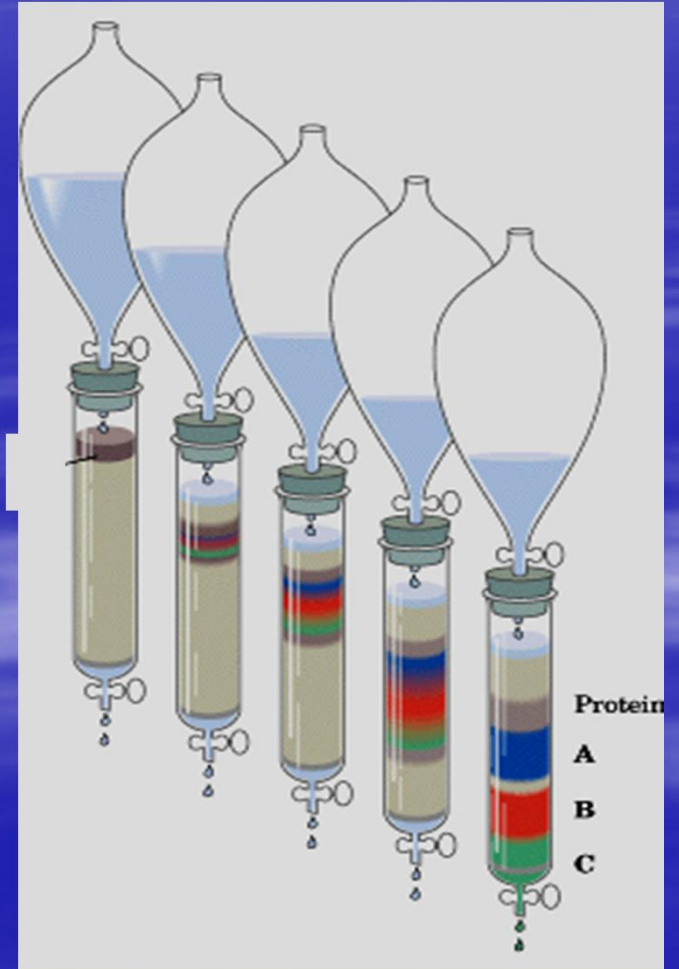
- **Silika jel**, laboratuvar ortamında üretilen, günlük hayatta besinlerin, bitkisel ürünlerin, deri eşyaların, kimyasal boya ve bozulabilecek çoğu şeyin nemini alarak bozulmasını engelleyen bir sodyum silikattır. Madde büyük kumsu yapıdadır, nemle beraber renk değiştirir. Bu madde günlük hayatta ilaçların yanına konularak nemini alır ve böylece bozulmasını engeller, aynı zamanda çoğu bitkisel bazlı sanayi ürünü ve gıda bu şekilde korunur. Silika jel, toksik olmamakla beraber, ayrıca kimyasal olarak yüksek enerji açığa çıkaran bir reaksiyona girmez.



Kolon Kromatografi Tipleri

Kolondaki dolgu maddesi ve seçilen elüsyon metoduna göre gruplandırılır:

- i. Jel filtrasyonu → büyüklük
- ii. İyon değişim → yük
- iii. Affinite → bağlanma



i.Jel Filtrasyon Kromatografi

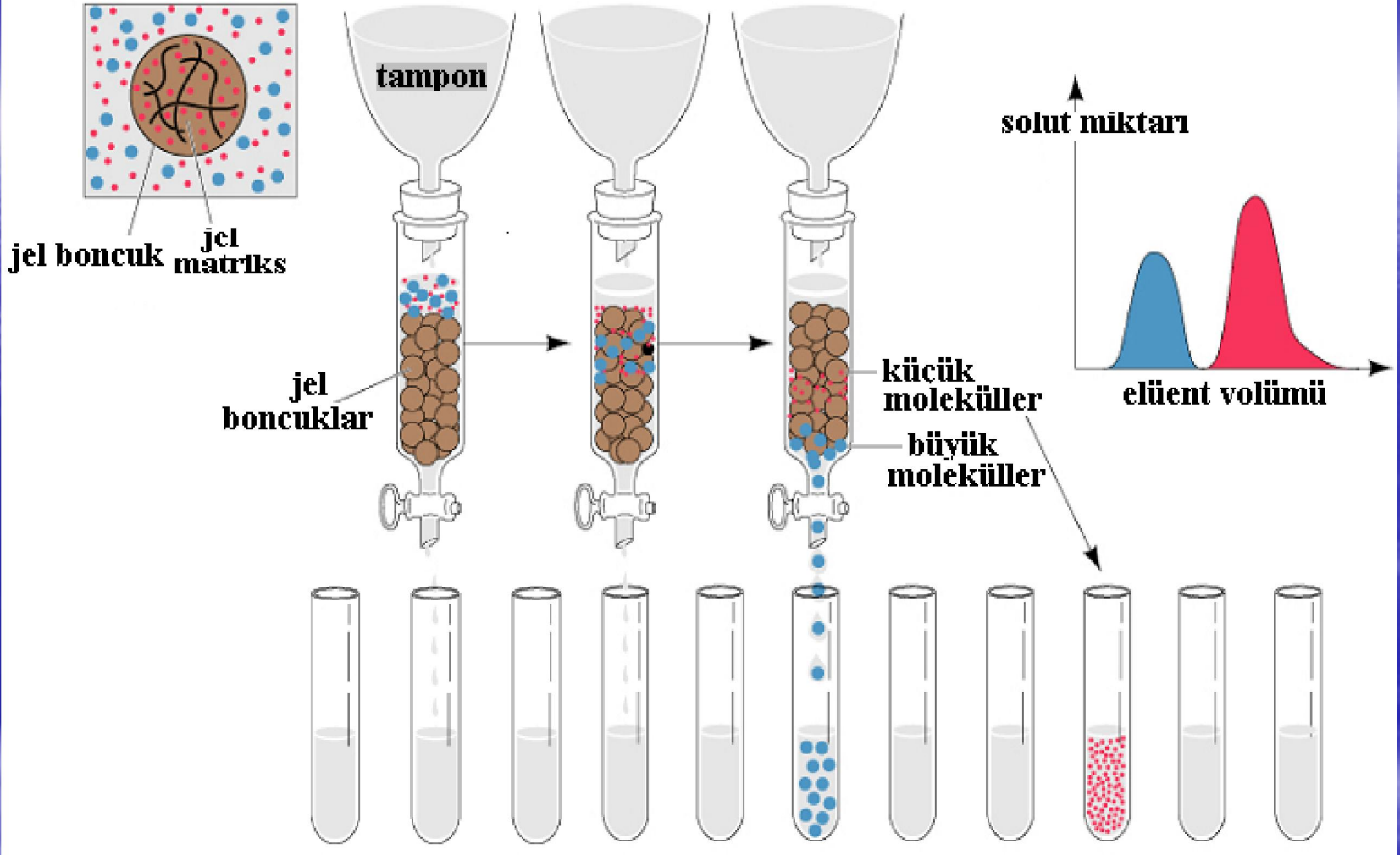
Karışımdaki moleküllerin molekül büyüklüklerinde göre ayrılması esasına dayanır

- Kolon, jel boncuklar ile doldurulur → katı matriks
- Biyomolekül karışımını içeren tampon, kolondan geçirilir
Küçük moleküller,jel boncuklar arasındaki boşluklara girer,kolondan geç çıkarlar.

Büyük moleküller,jel boncuklar arasındaki boşluklara giremez ve kolondan hızlı bir biçimde sürüklenerek önce çıkarlar.

Kromatografik ayırma sırasında bozunması veya değişikliğe uğraması istenmeyen protein ya da enzim gibi biyolojik moleküllerin birbirinden ayrılması için kullanılır.

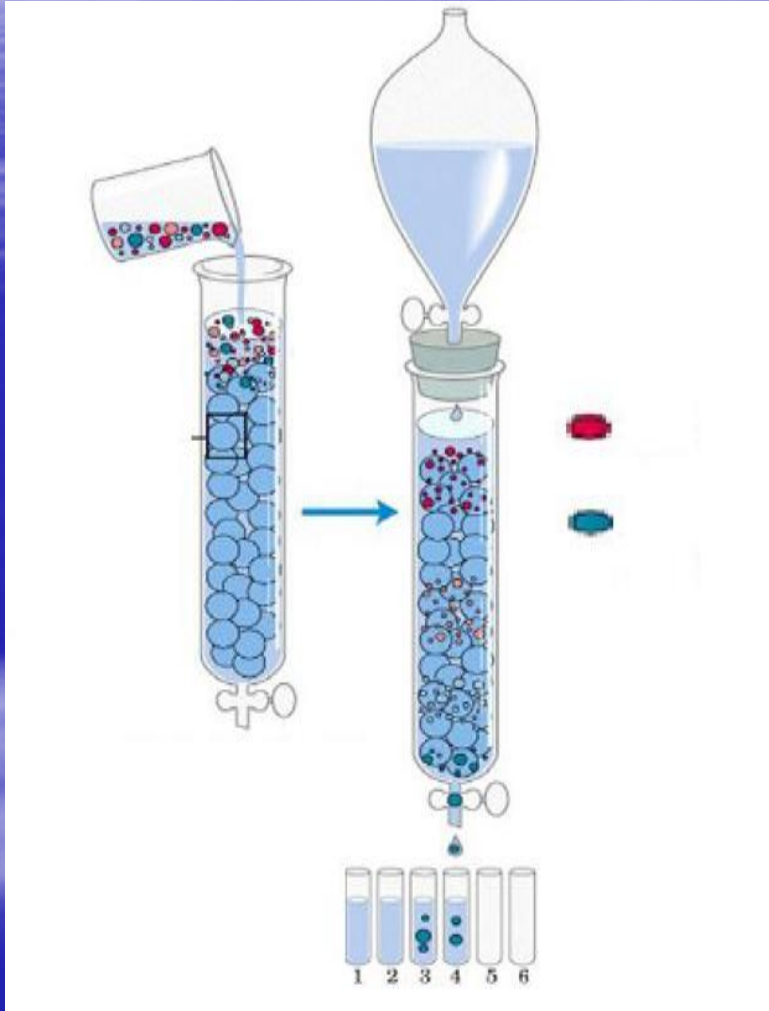
Bu yöntem ile polimerlerin molekül ağırlığı dağılımı da tayin edilebilir



Avantaj: Büyük miktarda biyomolekül karışımı saflaştırılabilir
Dezavantaj: Yavaş ayırma yapar.

ii.İyon Değişim Kromatografisi

- İyon değişimi, katı maddede bulunan, değişebilen iyonlarla, çözeltide bulunan aynı yüklü iyonların değiştirilmesidir.
- İnorganik iyon değiştiriciler: En çok kullanılanları zeloit denilen silikat yapılardır($\text{Na}_2, \text{Al}_2, \text{Si}_4, \text{O}_{12}$). Örneğin; Na değişebilir iyon çözeltide bulunan Mg^{+2} , Mn^{+2} , Fe^{+2} ile yer değiştirir.
- Organik iyon değiştiriciler: anyon değiştirici ve katyon değiştirici reçineler olarak ikiye ayrılır. Sabit yük (-) ise katyon değiştirici, yapıda sabit yüklü grup (+) ise anyon değiştirici reçinedir.



- Cl⁻ ve I⁻ karışımının nitrat bağlanmış anyon
- değiştirici RNO₃ ile bileşenlerine ayrılmasında
- geđerli dengeler ařaęıdaki bięimdedir:



RNO₃ : Anyon Değiştirici
R: Çözünmeyen Matriks

iii.Affinite Kromatografisi

Enzim, hormon,vb spesifik proteinlerin saflaştırılmasında kullanılır.Kolonun dolgu maddesine,spesifik protein ile kompleks yapabilen bir ligand bağlanır.

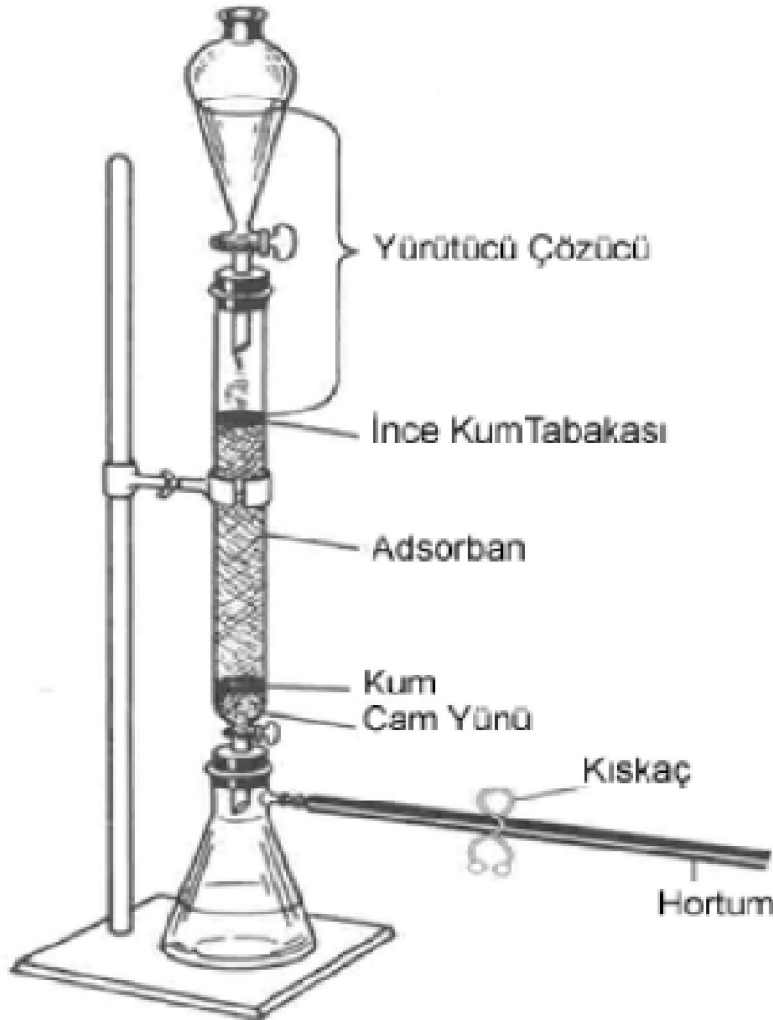
- Seçiciliği fazla olan bu yöntem,kromatografi tekniklerinin en yenisidir.

Antijen – Antikor Enzim – Substrat Reseptör– İlaç
gibi oldukça spesifik etkileşimlere dayanır.

Adsorpsiyon Kromatografisi

Ayrılacak bileşenlerin sabit katı faz üzerinde tersinir olarak adsorplanmaları esasına dayanır. Burada hareketli faz, adsorban üzerinde sıvı olarak hareket eder. Bileşenler birbirlerinden katı yüzeye olan farklı derecede ilgileri nedeniyle ayrılırlar. Adsorpsiyon denge sabiti büyük olan bileşen yüzeyde daha uzun kalırken, küçük olan daha kısa sürede kalmakta, hiç adsorplanmayan bileşen ise kolonda hiç geciktirilmeden hareketli faz ile taşınarak dışarı çıkmaktadır. Yüzeye adsorplanan bileşenler ise yüzeye etkileşmelerine bağlı olarak farklı kalma sürelerinde kolonu terk etmektedir. Adsorpsiyon kromatografisi, polarlıkları farklı bileşenlerden oluşan karışımların ayrılmasında iyi sonuç verir.

KOLON KROMATOGRAFİSİ UYGULAMASI



Temel Prensi

Ayrılacak karışımın çözeltisi dikkatlice, kullanılacak çözücüyle ıslatılmış adsorbanla sıkı bir şekilde doldurulmuş dikey kolonun en üst kısmından uygulanır.

Ayrılacak karışım adsorbana aktarılan kadar yavaş ve dikkatli bir şekilde kullanılacak olan saf çözücü eklenir.

Karışım adsorbanda ilerlemeye başlayınca daha çok çözücü eklenerek işleme devam edilir. Çözücü kolon boyunca ilerlerken karışımdaki bileşikleri de beraberinde taşır. Bu bileşimler, kolondaki adsorbanlarına ve desorbanmalarına bağlı olarak kolonda farklı hızlarda ilerlerler.

Sekil 2 Kolon kromatografisi aparatı

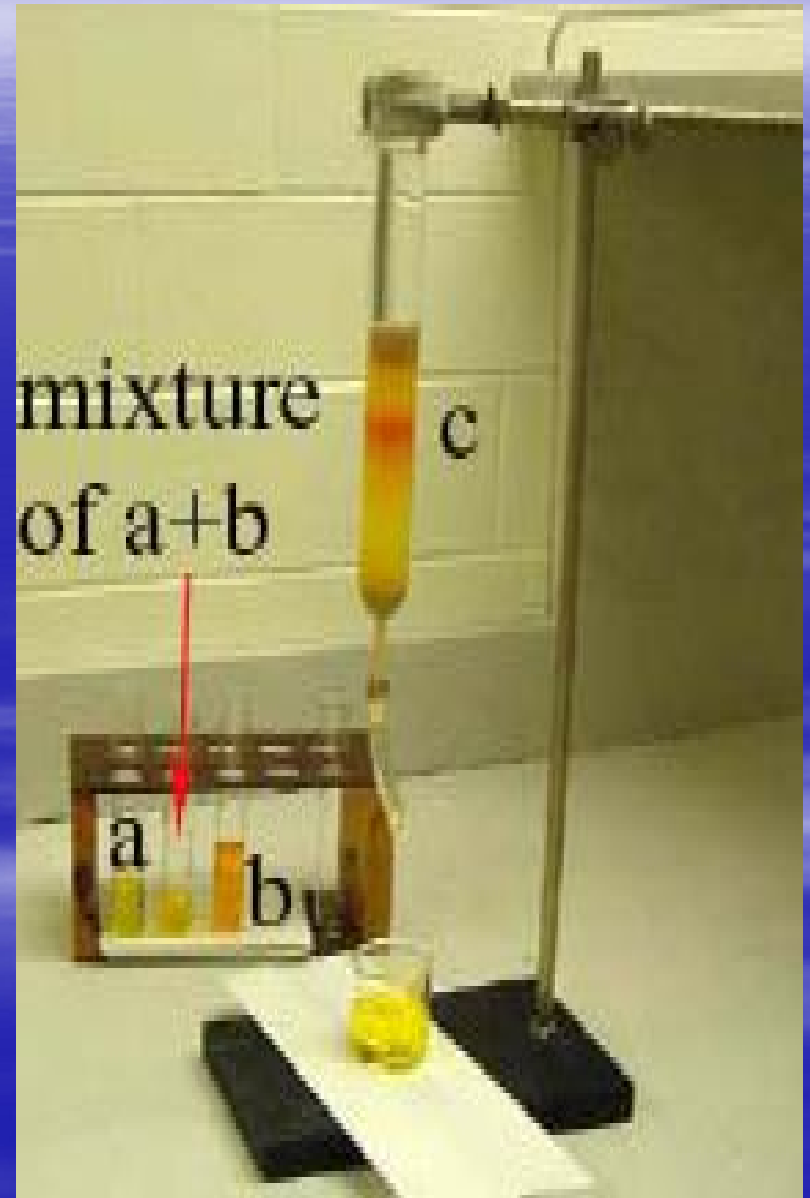
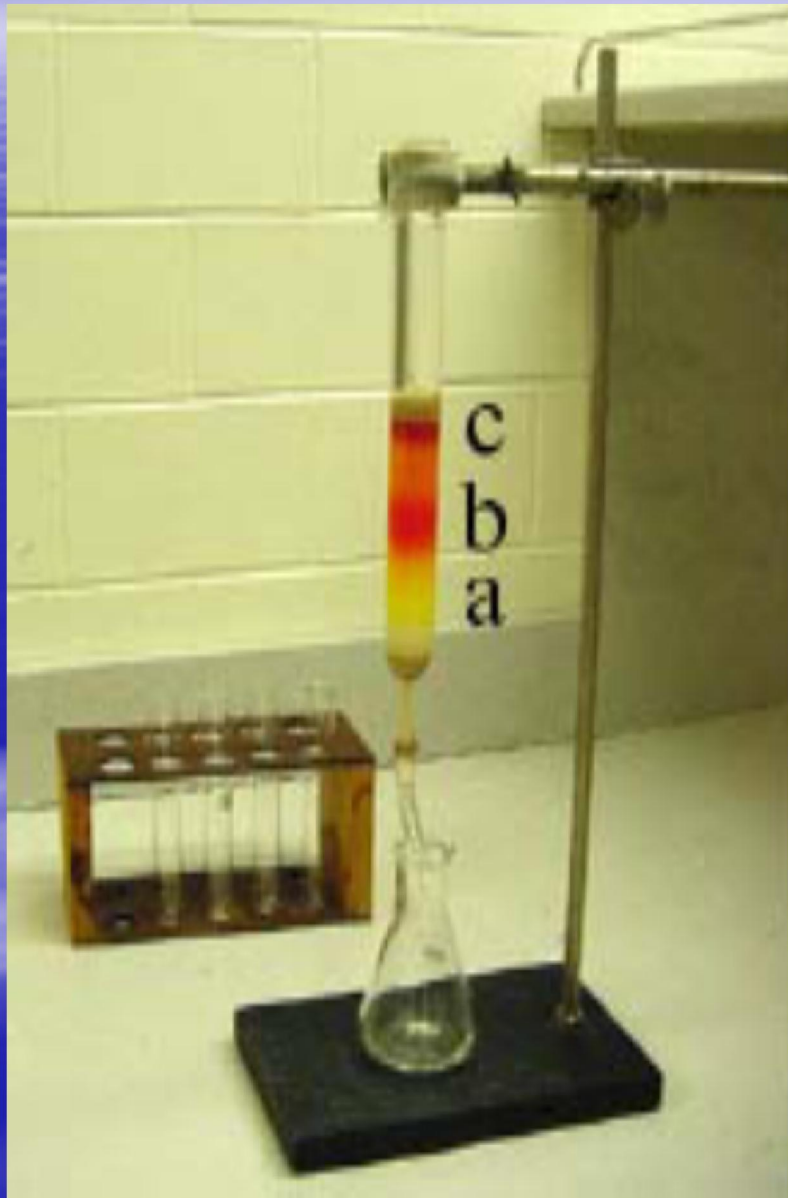
Deney örneđi

DENEYİN YAPILIŐI

Deneyde Metil oranj ve metilen mavisi karışımının kolon kromatografisi yöntemi ile ayrılması incelenecektir.

Deneyde Kullanılacak Araç, Gereç ve Malzemeler:

- Alümina,
- Etanol (%95),
- Metil oranj,
- Metilen mavisi
- Cam Kolon,
- Cam yünü,
- Erlen



Deneyin uygulanması

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

Hazırlanan metilen mavisi ve metil oranj karışım çözeltisinden yaklaşık 50 ml'e, 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 mavisi biriktirilir, çözelti renksiz bir hal alıncaya kadar işleme devam edilir ve metilen mavisi ayrılır.

Metil oranj, kolon dolgusu tarafından çok daha fazla adsorblandığı için, yürütücü çözeltiyi daha polar bir çözelti ile değiştirerek deneye devam edilir. Bu sebepten ayrıma 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.

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

- Adsorban seđimi
- Çözücünün polaritesi
- Kullanılacak kolonun boyu ve çapı
- Çözücünün akış hızı

Kromatografide yürütücü hareketli faz olarak kullanılacak olan çözücülerin zellikleri Şunlardır:

- Adsorbani zmemelidir.
- Adsorban ve ayrılacak maddelerle reaksiyon vermemelidir.
- Ayrılacak maddelerin desorpsiyonu için iyi bir seçiciliği olmalıdır.
- Ayrılacak maddeleri yeteri kadar zebilmelidir.
- Ayrımdan sonra kolay uzaklaŐtırabilmek için düŐük kaynama noktasına sahip olmalıdır.
- Toksik olmamalı ve ucuz olmalıdırlar.

İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

- **Sabit Faz:** Cam bir levha üzerine ince bir tabaka halinde ve homojen olarak yayılan silikajel, selüloz ve türevleri, nişasta, poliamid ve alüminyum oksit gibi organik ve inorganik maddeler
- **Hareketli faz:** Aseton, metanol, hekzan gibi solventler

Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

- **Hareketli faz:** Sıvı (asetonitril, metanol, etanol, tetrahidrofuran, etil asetat, su gibi solventler)
- **Sabit faz:** Çok küçük katı parçacıklar (kolonun dolgu maddeleri olan silisyum dioksit, alüminyum oksit, gözenekli polimer ve iyon değiştirici reçineler gibi),
örn. C-18 kollarları
- **Dedektörler:**
 - Floresans Dedektör: Aflatoksinler (AFM1 dahil), fumonisinler ve Ochratoxin A (OTA) analizlerinde
 - UV veya DAD dedektör: Triketenlerin analizinde
 - Ayrıca mikotoksinler kütle dedektörü (MS/Mass Specrometer) ile de LC-MS veya LC-MS/MS sistemi şeklinde analizi yapılır (kütle dedektörleri diğer dedektörlerden daha pahalıdır)
- **Ekstraksiyon:** İmmuno Affinite kolonlar (İAK)

Gaz kromatografisi/kütle spektrometresi (GC/MS)

- Hareketli faz: Hidrojen, azot ve helyum gibi gazlardan oluşur.
- Sabit faz: Sıvı veya katı olabilir ve çok küçük katı parçacıklardan (kolonun dolgu maddeleri olan silisyum dioksit, alüminyum oksit, gözenekli polimer ve iyon değiştirici reçineler gibi) oluşmaktadır.
- İki tip: Gaz-katı kromatografi (GSC) ve gaz-sıvı kromatografi (GLC)
- Gaz-sıvı kromatografi daha fazla kullanım alanı bulmuş ve prensip olarak analitin gaz halindeki hareketli faz ile bir katının yüzeyine tutturulmuş durgun sıvı faz arasında dağılımı üzerine kurulmuştur. Numune (analit) buharlaştırılır ve kromatografik kolonun girişine enjekte edilir. İnert bir hareketli gaz fazı ile elüsyon yapılır. Diğer kromatografik yöntemlerin aksine gaz faz analitin molekülleri ile etkileşmez; gazın tek işlevi, analiti kolon boyunca taşımaktır.
- Mikotoksinlerin analizinde GC'ye Mass Spectrometry (MS) dedektörü bağlanarak mikotoksinler atomlarına kadar parçalanabilmekte ve böylece ölçümleri yapılabilmektedir.

