

7. Hafta: Dağılma Kromatografisi ve Kolon Kromatografisi: Kağıt kromatografisi, teknikleri, kolon kromatografisinin hazırlanması.

Prof. Dr. Şule Pekyardımcı

KROMATOĞRAFI

Kromatografi kelimesi Yunanca "Chroma" renk ve "Graphein" yazmak kelimelerinden kaynaklanmıştır. Bu teknik, ilk kez 20. yüzyılın başlarında renkli bitki pigmentlerinin ayrılmasında kullanılmıştır. Kromatografi farklı bileşiklerin farklı fazlarda dağılmasına dayanır. Daima bir sabit faz (stasyoner faz) ve bir hareketli faz (mobil faz) vardır. Hareketli faz sabit fazın üzerinden geçer ve ayrılması istenen maddeyi de beraberinde sürükler. Ayrılacak madde bileşenleri sabit fazla farklı derecede etkileşime girer. Sabit fazla etkileşimi fazla olan bileşenler daha ağır, etkileşimi az olan bileşenler ise daha çabuk hareket ettiklerinden birbirlerinden ayrılır. Sabit faza karşı zayıf ilgi gösteren moleküller burada daha az tutulduklarından hızlı bir şekilde kromatografik sistemden ayrılarak elüe olurlar. Diğer moleküller daha sonra elue olurlar. Bileşiklerin ayrılmasında, sabit faz ile bileşenler arasındaki etkileşimin doğasına göre farklı kromatografik yöntemler geliştirilmiştir. Bu etkileşimler, molekül büyüklüğüne, polariteye, spesifik bağlanma özelliklerine veya elektrostatik çekim gücüne dayanabilir.

Toplanan eluentler analiz edilerek ayrılan maddelerin ne olduğu belirlenir. Böylece etkin bir kromatografik işlemde bileşenlerin fraksiyonlar halinde ayrılması sağlanabilir.

DAĞILMA KROMATOĞRAFİSİ

Kromatografik metodlar ayrılan moleküllerin sabit faza bağlanmasına veya sabit faz ile etkileşmesine bağlı olarak dağılma ve adsorplama kromatografisi olarak ikiye ayrılır. Dağılma kromatografisi ayrılan maddelerin iki sıvı faz arasında dağılması ile ilgilidir. Bu tür kromatografik işlemlerde ya iki sıvı kullanarak doğrudan ekstraksiyon gerçekleştirilir veya kağıt, ince tabaka ve gaz kromatografisinde olduğu gibi katı bir destek malzemesine emdirilmiş veya immobilize edilmiş bir madde kullanılabilir. Birbirine karışmayan maddeler, çözünürlüğüne bağlı olarak bu iki faz arasında dağılacaktır. Eğer sabit faz kağıt kromatografisinde olduğu gibi filtre kağıdı ise, ıslak filtre kağıdı yani selülozun hidroksil

gruplarına bağlı su moleküllerinden oluşan polar tabakayı meydana getirir. Bu ıslak filtre kağının içinde bulunduğu ve polar olmayan organik bir çözücüden oluşan sıvı tabaka da hareketli fazı oluşturur.

Moleküllerin bu iki faz arasındaki dağılımı onların kağıt üzerinde aşığı veya yukarı hareketleri ile sağlanır. Apolar moleküller bu sistemde polar olanlardan daha uzağa gidecektir. Moleküllerin dağılıma kromatografisindeki hareketleri Rf değeri ile gösterilir. Dağılıma kromatografi işlemleri sabit fazın veya destek malzemesinin türüne göre kağıt, ince tabaka ve gaz kromatografileri şeklinde uygulanır. Bu kromatografi tekniği küçük moleküllerin, özellikle amino asit, karbohidrat ve yağ asitlerinin ayrılması ve belirlenmesinde etkin bir şekilde kullanılır.

KOLON KROMATOĞRAFİSİ

Kolon kromatografisinde, ayrılacak moleküller bir katı destek ortamına çeşitli şekillerde bağlanır. Bu kromatografi işleminde ayrılacak moleküllerle sabit faz arasında özel etkileşimler olur. Ayrılacak moleküllerin bu etkileşimleri iyonik, dipol-dipol etkileşimleri, hidrojen bağları veya hidrofobik etkileşmeler şeklinde olabilir. Burada kullanılan sabit faza göre bu uygulamalar adsorplama, afinite, iyon değişimi veya jel filtrasyon kromatografisi şeklinde adlandırılırlar.

Proteinlerin Yüzey Özelliklerinden Yararlanılarak Yapılan Ayırma Teknikleri

Proteinlerin yüzeyinde bulunan yüklerin dağılımı ve bu yüke yaklaşılabilmesi, yan zincir olarak amino asitlerde bulunan hidrofob grupların miktarı ve belirli bir pH da proteinin net yükü proteinlerin yüzey özelliklerini dolayısıyla çözünürlüğünü belirler. Bir protein karışımında farklı çözünürlüğe sahip proteinler kademeli çöktürme işlemleriyle belirli bir dereceye kadar saflaştırılabilir. Bu protein çözeltilerinin iyonik güçleri, dielektrik sabitleri, ortamın pH ve sıcaklığı ve deterjan içeriği gibi özellikleri değiştirilerek ortamda bulunan proteinler seçimli bir şekilde çöktürülebilir. Bunun tersi bir durum uygulanarak da proteinler çözünmez bir durumdan çözünür hale geçirilebilir.

Proteinleri Şekil ve Büyüklüğüne Dayanarak Yapılan Ayırma Yöntemleri

Bu yöntemde en fazla jel filtrasyon kromatografisi kullanılır. Ayrıca molekül büyüklüğü ile ilgili olarak jel elektroforezi kullanılır. Proteinler çok küçük bir polipeptit olabileceği gibi milyonlarca dalton büyüklüğünde de olabilir. Proteinler aktif haldeyken genellikle oligomerler halindedir.

Proteinlerin Net Yüküne Dayanarak Yapılan Ayırma Yöntemleri

Proteinlerin toplam yüküne dayanılarak yapılan iki tür ayırma yöntemi vardır. Bunlar iyon değişim kromatografisi ve elektroforezdir. İyon değişimci materyaller yüklü moleküllere bağlanır. Anyon ve katyon değişimci olmak üzere iki tür iyon değişimci vardır. Bir proteinin net yükü ortamın pH'ına bağlıdır ve çok düşük pH değerlerinde pozitif, yüksek pH değerlerinde negatiftir ve izoelektrik noktasında sıfırdır. İsoelektrik noktada protein üzerinde çok fazla yük vardır ancak pozitif ve negatif yükler dengelendiği için net yük 0'dır.

Saflaştırılan bir proteinin yapı ve fonksiyonunun belirlenmesi için öncelikle karakterize edilmesi gerekir. Bunlar, proteinin molekül kütlesi veya en azından alt ünitelerinin büyüklüğü (bunlar jel filtrasyon kromatografisi veya SDS-poliakrilamid jel elektroforezle belirlenebilir), UV spektrumu (tirozin ve triptofan içeriği), sirküler dikroizm spektrumu (ikincil yapı) ve prostetik grupları belirlenmelidir.

Glikoproteinlerde karbohidratların yapı ve miktarı belirlenmelidir. Ayrıca o proteinin geni belirlenmemişse N-teminal amino asitleri bulunmalıdır. Fonksiyonel proteinlerde bu fonksiyonu gösterip göstermedikleri belirtilmeli ve enzimlerde detaylı kinetik karakterizasyon yapılmalıdır. Sonuçta da proteinin üç boyutlu yapısı verilmelidir, bunun için de proteinin kristallendirilmesi için gerekli çalışmalar yapılmalıdır.

Proteinlerin Biyoözelliklerine Dayanarak Yapılan Ayırma Yöntemleri

Bir proteini saflaştırmak için en güçlü yöntem proteinin spesifik biyoafinitesinden yararlanılarak yapılan işlemlerdir. Bu tür ayırmalar (immünoafinite kromatografisi dışında) sadece spesifik bağlanma özelliği olan proteinlere uygulanabilir. İmmünoafinite kromatografisi, tüm afinite teknikleri arasında en spesifik olarak bilinen tekniktir.