

## **KOLON** **KROMATOĞRAFİSİ ELİF YILDIZ**

Biyomoleküllerin saflaştırılmasında kullanılan bir yöntemdir.

İlk kez Rus botanikçi Mikhail Tsvett (1903) tarafından geliştirilmiştir.

mobil faz  
(tampon)  
elüent

(tampon)  
sabit faz  
(katı porlu matriks)

depo

Protein  
karışımı

Tsvett bu yöntemi bitki pigmentlerini (klorofil A, klorofil B ve ksantofil) ayırmakta kullanmıştır.

Kolon, biyomolekülleri seçici adsorblayan bir maddeyle (katı porlu matriks) doldurulur .  
**SABİT FAZ**

Biyomolekül karışımı kolona ilave edilir. **HAREKETLİ FAZ**

Tampon çözelti **MOBİL FAZ** ile yıkanan kolon tarafından, adsorbe edilmeyenler önce, adsorbe edilenler ise daha geç kolonu terkeder.

### **Kolon Kromatografi Tipleri**

Kolondaki dolgu maddesi ve seçilen elüsyon metoduna göre gruplandırılır:

- Jel filtrasyonu
  - İyon değişim
  - Affinite
- büyükük  
yük  
bağlanma

#### **1- Jel Filtrasyon Kromatografisi**

Karışımındaki moleküllerin, molekül büyüklüklerinde göre ayrılması esasına dayanır.

Kolon, jel boncuklar ile doldurulur. (Belirli büyüklüğe sahip ve karışımındaki bileşenlerle etkileşmeyen bir madde olmalıdır.)

Karışımı içeren tampon, kolondan geçirilir.

- Küçük moleküller, jel boncuklar arasındaki boşluklara girdiği için kolondan geç çıkarken,
- Büyük moleküller, jel boncuklar arasındaki boşluklara giremediği için kolondan hızlı bir biçimde sürüklenerek, önce çıkmaktadır.

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

**Avantaj** Büyük miktarda biyomolekül karışımı saflaştırılabilir.

**Dezavantaj** Yavaş ayırım

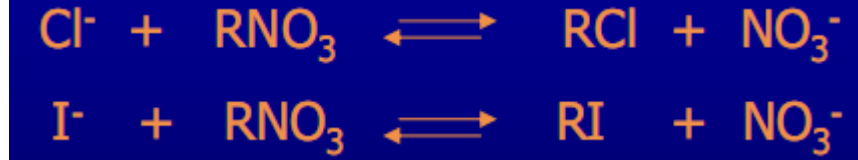
#### **2- İyon Değiştirme Kromatografisi**

Maddelerin iyonik grupları ile iyon değiştiricideki iyonik grupların eşdeğer miktarlarının karşılıklı yer değiştirmesi esasına dayanır.

İyon değiştirme kromatografisi, kullanılan iyon değiştiricinin anyon veya katyon aktarmasına göre sırasıyla anyon değiştirme kromatografisi veya katyon değiştirme kromatografisi olarak adlandırılır.

Anyon değiştirme kromatografisinde,kolon içindeki sabit tabaka olan matrikse kovalent bağlı iyonlar pozitif yüklüdür,bu iyonlar kolondan geçirilen çözeltideki anyonları kendine çekmekte,çözeltideki anyonlar ayrılmakta,sadece katyonlar ortamdan çıkmaktadır. Katyon değiştirme kromatografisinde ise,benzer sistemle çözeltideki katyonlar ayrılmakta,anyonlar ortamdan çıkmaktadır. Cl- ve I- karışımının nitrat bağlanmış anyon değiştirici RNO<sub>3</sub> ile bileşenlerine ayrılmasında geçerli dengeler aşağıdaki biçimdedir:

**R: Çözünmeyen Matriks**  
**RNO<sub>3</sub> : Anyon Değiştirici**



3- Affinite Kromatografisi

**Enzim, hormon gibi spesifik proteinlerin saflaştırılmasında kullanılır.**

Kolonun dolgu maddesine,(dekstran, poliakrilamid, selüloz vb) belirli bir protein ile kompleks yapabilen bir ligand bağlanır.

Ligand ile kompleks yapan protein, katı desteğe bağlanarak kolonda tutulurken; serbest proteinler kolonu terk ederler.

Bağlı protein, daha sonra, pH değişikliği - tuz çözeltileri veya ligand ilavesiyle kolondan elüe edilir.

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

## **Gaz Kromatografisi**

Gaz kromatografisi, bir karışımında gaz halinde bulunan ya da kolayca buharlaştırılabilen bileşenlerin birbirinden ayrılması amacıyla kullanılan kromatografi yöntemlerinin genel adıdır.

Bu yöntemde ayrılma, bileşenlerin farklı katı yüzeylerdeki farklı adsorbsiyon ilgilerine göre gerçekteşir.

Numunede bulunan bileşenler bir cihazla spektrum haline getirilir ve bu spektrumda bulunan her pik ayrı bir bileşeni gösterir.

Gaz kromatografisi ilk defa olarak James ve Martin tarafından 1952 yılında uçucu yağ asitleri karışımlarının analizlerinde ve ayrılmasında kullanılmıştır.

Kimya alanında gazların ve uçucu maddelerin analizleri ve ayrılmasında yaygın bir şekilde kabul edilmiştir.

Kromatografik metodların ayırma cihazının daha basit oluşu, çalışma kolaylığı ve dikkate değer şekilde az zamana ihtiyaç göstermesi bakımından üstünlükleri vardır.

**Laboratuvarda kromatografinin kullanılış şekilleri şunlardır :**

- Kalitatif olarak bir karışımın bileşenlerinin tanınmasında ve kantitatif olarak tayininde analitik metot olarak,
- Partisyon katsayıları, adsorpsiyon izotermeleri gibi bazı fiziksel miktarların tayininde araştırma metodu olarak,
- Karışımlardan bileşenleri izole etmek için hazırlayıcı usul olarak.

**Gaz kromatografisi**

- Yağ asitleri
- Triaçilgliseroller
- Kolesterol
- Steroller
- Alkoller
- Basit şekerlerle birlikte oligosakkaritler
- Amino asitler
- Vitaminler
- Pestisitler
- Gıda katkı maddeleri,
- Nitrozaminler
- İlaçlar ve daha birçok maddenin analizinde kullanılmaktadır.

Gaz kromatografisi

- Gaz-katı kromatografisi
- Gaz-sıvı kromatografisi

Temel çalışma prensibi itibariyle gaz-sıvı ve gaz-katı kromatografileri arasında tek fark **sabit fazın tipidir.**

Gaz kromatografisinin kısımları

- *taşıyıcı gaz*
- *enjeksiyon bloğu*
- *kolon*
- *dedektör*
- *kaydedici*

**Taşıyıcı Gaz**

**Gaz kromatografisinde** kullanılan gazların kuru, inert ve %99,99 saflıkta olması gerekir. Bu nedenle genelde *helyum* ya da *azot* gazı kullanılmaktadır.

Elektron tutucu, He iyonlaşma dedektörü gibi dedektörler gaz içindeki safsızlıklara karşı çok duyarlı iken alev iyonlaşma dedektörleri küçük safsızlıklara karşı daha hassastır.

Taşıyıcı gazın kuruluğu da kolon performansına etki eden önemli faktörlerdendir. Taşıyıcı gazda bulunan su, kolon sabit fazını bozmakta ve polar sıvı fazda bu olay daha sık gözlenmektedir. Bu nedenle poliestherler gibi polar sabit fazlı kolonlarla çalışırken bu noktaya özen göstermek gerekir. Bu durumu önlemek için tüm gaz hatlarına filtre yerleştirilmeli ve filtreler belirli aralıklarla temizlenmelidir. Silikajel ve moleküler elekler ise yılda bir kez değiştirilmelidir.

Taşıyıcı gazın akış hızı, kolonun özelliklerine göre değişmekle birlikte 25-150 ml/dk iken, kapiler kolonlarda 1-25 ml/dk'dır.

**Enjeksiyon Bloğu**

*Sıvı örnekler* ve uygun çözücü ile çözüldürüldükten sonra *katı örnekler*, silikon kauçuğundan yapılmış bir septumdan şırıngalar ile örnek odasına enjekte edilir. *Gaz örnekler* için gaz sızdırmayan özel enjektörler kullanılır. Enjeksiyon miktarı genellikle 0,1-5,0 µl arasında değişir.

Örneğin gaz haline dönüşmesi için enjeksiyon bloğunun, örnekteki bileşenlerin kaynama noktası en yüksek olanının kaynama sıcaklığından 50°C daha fazla ısıtılması gerekir.

Gaz kromatografisinde tekrarlanabilir sonuçlar elde etmek için enjektörle örnek verme işlemi çok önemlidir. Her örnek enjeksiyonundan sonra enjektör uygun çözücü ile iyice

temizlenmelidir. Enjektörlerin temizliği ve bakımları analiz üzerinde etkili olduğundan iyi korunmalı, bakımları ve temizlikleri özenle yapılmalıdır.

Kolon

Gaz kromatografisinde kullanılan

kolonlar bakır, alüminyum, nikel, paslanmaz çelik ya da cam olabilir. Ancak cam kolonlar, kırılğan olmaları ve cihaza bağlanma zorlukları gibi dezavantajlara sahip olmalarına karşın inert olmaları bakımından daha çok tercih edilir. Kolon çapları 1/16", 1/8" ve 1/4" olabilir.

Kolonlar ikiye ayrılır:

- Dolgulu Kolon
- Kapiler Kolon

En çok kullanılan dolgulu kolonlar 1,2-2,5 m boyunda ve 2-4 mm iç çaplıdır.

Kapiler kolonlar ise 10-100 m uzunluğunda ve 0,1-0,7 mm iç çaplıdır.

Kapiler kolonlarda destek maddesi bulunmazken dolgulu kolonlarda dolgu maddesi mevcuttur.