

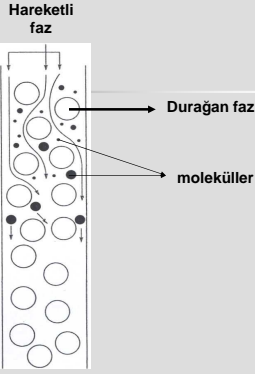
KROMATOĞRAFI METODU

FOTOSENTETİK PİGMENTLERİN İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ İLE AYRIŞTIRILMASI

Kromatografi

Kromatografi; bir karışımdaki bileşikleri birbirinden ayırmak ve maddeleri saflaştırmak için kullanılan bir tekniktir. Özellikle fiziksel ve kimyasal nitelikleri çok benzeyen maddelerin ayrılma işlemlerinde, kromatografi yönteminin kullanımı ile başarılı sonuçlar elde edilmektedir.

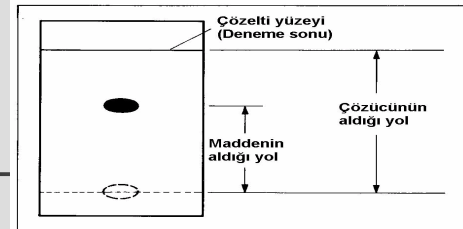
Kromatografi tekniğinde yararlanılan temel prensip, bir karışımdaki çeşitli maddelerin hareketli bir faz yardımı ile sabit bir faz üzerinden geçirilmeleri ve bu geçiş sırasında farklı hızlarla hareket edebilmeleridir.



Kromatografi işlemi

A ve B maddelerinden oluşan karışım, sabit fazla birlikte kolonun başlangıç bölgesine uygulanır ve hareketli faz (sıvı veya gaz) akmaya bırakılır. Bazı kromatografi tiplerinde de madde karışımı hareketli faza karıştırılarak uygulanır. Numunede bulunan bileşimler farklı yürüme veya hareket hızlarına göre hareketli faz içerisinde ilerlerler.

Yürüme hızı, Rf değeri ile ifade edilir ve substansın yürüme mesafesinin, çözücünün yürüme mesafesine oranından hesaplanır. Rf değeri 0 ile 1 arasında bulunur ve doğal olarak hızlı yürüyen bileşimler için alınan mesafe büyük olduğundan Rf değeri büyük daha yavaş yürüyenler için daha küçüktür.



Şekil 4: Rf değerinin hesaplanmasının gösterimi (Krieg)

$$R_f = \frac{\text{Bileşimin uygulama noktasından itibaren aldığı yol}}{\text{Çözücünün orijinden itibaren aldığı yol}} = \frac{d_{\text{madde}}}{d_{\text{çözelti}}}$$

Kromatografi tekniğinin temelinde üç ana unsur yer alır.

❖ Sabit faz: Bu faz daima bir "katı" veya bir "katı destek üzerine emdirilmiş bir sıvı tabakasından" oluşur.

❖ Hareketli faz: Bu faz daima bir "sıvı" veya "gazdan" oluşur.

❖ Sabit faz, hareketli faz ve karışımında yer alan maddeler arasındaki etkileşimin türü: Kromatografide "yüze tutunması veya adsorpsiyon" ile "çözünürlük" olguları temel etkileşim türlerini oluştururlar. Şayet basit faz bir "katı" ise, karışımdaki maddelerle sabit faz arasında "yüze tutunması (adsorpsiyon)" etkileşimi gerçekleşir.

Bu durumda farklı polaritelere (kutuplaşmalara) sahip maddelerin, farklı derecelerde yüze tutunması göstermeleri doğaldır. Buna bağlı olarak, hareketli faz yardımı ile sabit faz üzerinden geçiş hızlarının da farklı olmaları beklenir. Bu tür etkileşim gösteren kromatografik yöntemlerin tümü "adsorpsiyon kromatografisi" genel adı ile anılırlar.

Şayet sabit faz bir "sıvı" ise, karışımdaki maddelerle sabit faz arasında "çözünme" etkileşimi gerçekleşir. Bu durumda farklı maddelerin, sabit ve hareketli fazlarda farklı çözünürlüklere sahip olmaları söz konusudur. Yani farklı maddelerin iki faz arasındaki dağılımları ön plana geçmektedir.

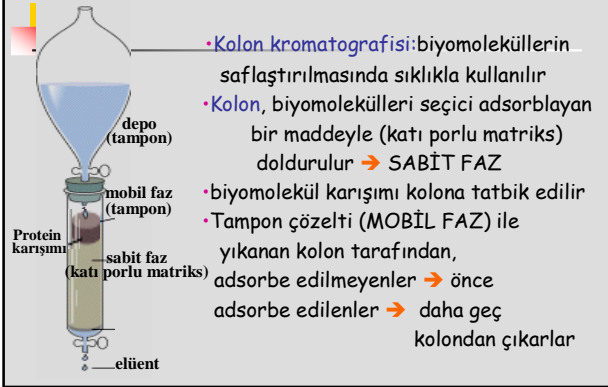
Buna bağlı olarak hareketli faz yardımı ile sabit faz üzerinden geçiş hızlarının da farklı olmaları beklenir. Bu tür etkileşim gösteren kromatografik yöntemlerin tümü "dağılım kromatografisi" genel adı ile anılırlar.

Çeşitli kromatografik yöntemler vardır. Bunlardan bazıları; Kolon kromatografisi, İnce tabaka kromatografisi (ITK), Kağıt kromatografisi, Gaz kromatografisi, İyon değişimi kromatografisi, Jel geçirgenlik kromatografisi, Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, İlgı kromatografisidir.

Bunlardan en çok kullanılanları sıralayacak olursak;

- Kolon kromatografisi
- İnce tabaka kromatografisi (ITK)
- Kâğıt kromatografisi
- Gaz kromatografisi

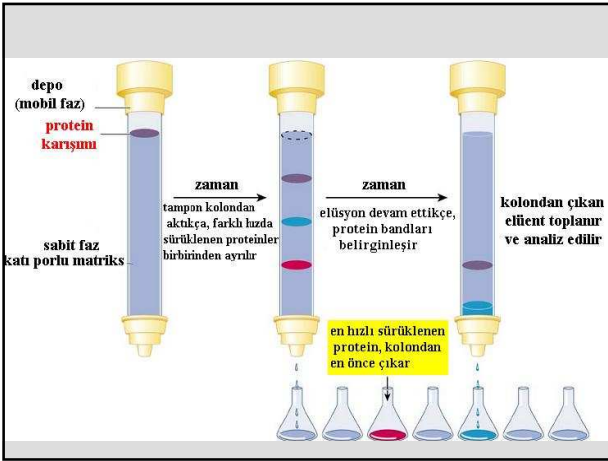
1. KOLON KROMATOĞRAFİSİ



Başlıca katı dolgu maddeleri (hareketsiz faz) şunlardır:

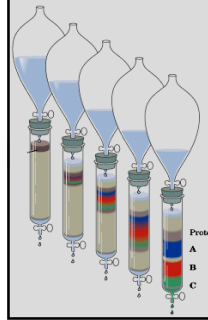
- Silika jel: Genellikle nötr ve asidik yapıdaki bileşikler için uygundur.
- Alumina: Genellikle nötr ve bazik yapıdaki bileşikler için uygundur.
- Sellüloz: Genellikle biyokimyasal maddeler için uygundur.

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.



Kolon Kromatografi Tipleri

Kolondaki dolgu maddesi ve seçilen elüsyon metoduna göre gruplandırılır:

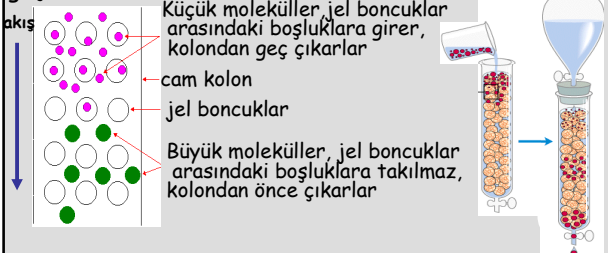


- Jel filtrasyonu → büyüklük
- İyon exchange → yük
- Affinite → (bağlanma)

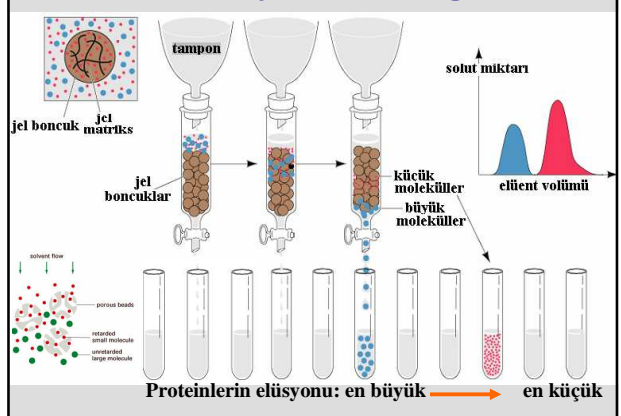
Jel Filtrasyon Kromatografi

Biyomoleküllerin, molekül büyüklüğüne göre ayrılırlar

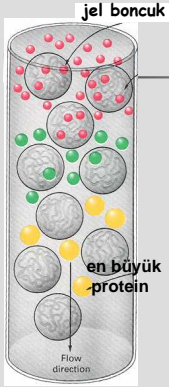
- Kolon, jel boncuklar [polisakkarid veya poliakrilamid polimer] ile doldurulur → katı matris
- Biyomolekül karışımını içeren tampon, kolondan geçirilir



Jel Filtrasyon Kromatografi



Jel Filtrasyon Kromatografi



Biyomeleküllerin, matriksteki porlara takılma yüzdesi, büyüklüğü ile ters orantılıdır

Porlara takılan moleküller daha yavaş sürüklenirler

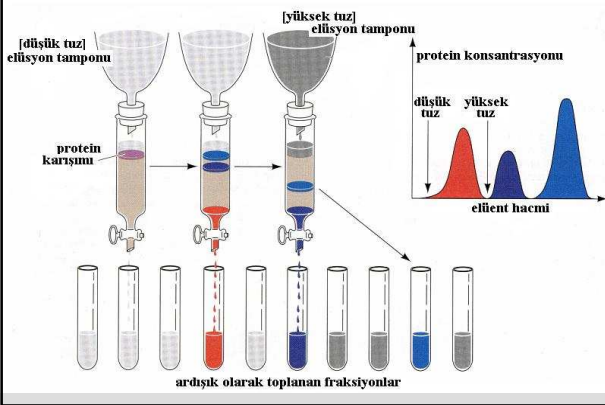
- Avantaj: Büyük miktarda biyomolekül karışımı saflaştırılabilir
- Dezavantaj: Yavaş ayırım

İyon exchange (değiş-tokuş) Kromatografi

Proteinleri, üzerlerinde taşıdıkları net yüke göre ayırır.

- Biyomolekül karışımındaki iyonlar, sabit fazdaki aynı yüklü iyonlarla[(+)→(+) veya (-) →(-) ile] yer değiştirerek, kolona bağlanırlar
- Bağlanmayan proteinler, kolondan en önce çıkarlar
- Daha sonra, iyonik gücü/pH'sı farklı bir tampon kolondan geçirilir bağlı moleküllerin yükü değiştirilerek elüsyonu sağlanır

İyon-Exchange Kromatografi



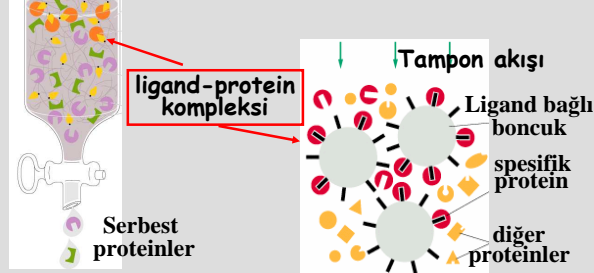
Affinite Kromatografisi

Bir çeşit iyon değişim kromatografisidir. Sabit fazın üst yüzeyine B maddesine karşı afinitesi olan fakat diğer bütün maddelere karşı ilgisiz olan A maddesi ile adsorbe edilirse (kovalent bağlanmasını sağlamak suretiyle) B maddesi A ya sıkıca bağlanması sağlanarak belirgin bir ayırma gerçekleştirilebilir.

Sonra başka bir element yardımı ile B maddesi sabit fazdan çözülebilir. Bu metotla kompleks karışımlardan belirli bir maddeyi küçük miktarlar halinde ayırmak mümkün olur.

Affinite Kromatografisi

Enzim, hormon,vb spesifik proteinlerin saflaştırılmasında kullanılır.Kolonun dolgu maddesine, (dekstran, poliakrilamid, selüloz vb) spesifik protein ile kompleks yapabilen bir ligand bağlanır:

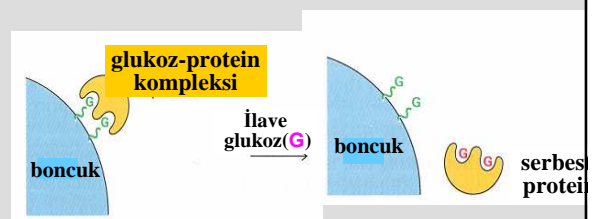


Affinite Kromatografisi

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

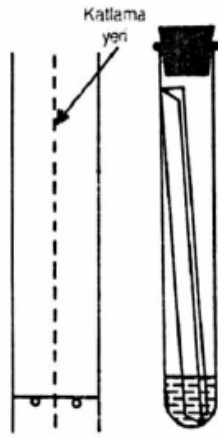
Bağlı protein, daha sonra, pH değişikliği / tuz çözeltileri veya ligand ilavesiyle kolondan elüe edilir

Örnek:



3. Kâğıt Kromatografisi

Bu yöntemde kalın bir süzgeç kağıdı destek ve gözeneklerine yerleşen su ise, sabit "sıvı fazı" oluşturur. Hareketli faz bir yürütücü tank içine yerleştirilmiş uygun bir sıvıdır. Bu durumda, kâğıt kromatografisinin bir "sıvı-sıvı dağılım kromatografisi" olduğunu belirtmeliyiz.



3. Gaz Kromatografisi

Bu teknik laboratuarda basit aletlerle yürütülemez. Yöntemin uygulanmasında çok gelişmiş otomatik cihazlar gereklidir.



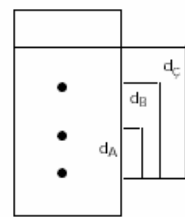
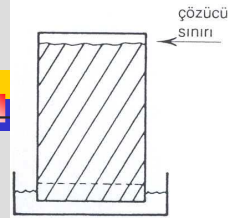
Bu yöntemde sabit faz, cihaz içine yerleştirilen ve içinde katı destek maddesi üzerinde emdirilmiş sıvı bulunan bir kolondur. Taşıyıcı faz ise, He veya N₂ gibi bir gazdır.

Buna göre gaz kromatografinin bir "gaz-sıvı dağılım kromatografisi" olduğunu belirtebiliriz.

4. İNCE TABAKA KROMATOGRAFİSİ (İTK)

İnce tabaka kromatografisi, bir "katı -sıvı adsorpsiyon kromatografisidir." Bu yöntemde sabit faz, çeşitli boyutlardaki "cam plakalar üstüne, ince bir tabaka halinde sıvanmış katı adsorban maddedir." Adsorban madde olarak kolon kromatografisinde kullanılan tüm katılar (alumina, siliko jel, sellüloz vb.) kullanılabilir. Bu yöntemde hareketli fazın sabit faz üzerinden ilerleyişi, aşağıdan yukarı doğru olur. Çözücü kılcılık etkisi ile içerisine daldırılan ince tabaka plakası üzerinde yürür.

Bu işlem sırasında, plakanın alt kesimlerine bir damlalıkla önceden damlatılmış olan karışımı da farklı hızlarla yukarıya sürükler. Ayırım bu şekilde sağlanmış olur. Yürüme hızı maddenin, katı fazın ve çözücünün polaritesine bağlıdır.



DENEYSEL YÖNTEM

FOTOSENTETİK PİGMENTLERİN İNCE TABAKA KROMATOĞRAFİSİ İLE AYRIŞTIRILMASI

MATERYAL

- 1- Yeşil bitki yaprağı
- 2- Havan
- 3- Aseton
- 4- Santrifüj aleti
- 5- Kromatografi tankı
- 6- Kılcal pipet
- 7- Aseton, toluen, metanol
- 8- Silika jel tabaka

SOLVENT HAZIRLANIŞI: Toluen (200 ml)/Metanol (1 ml), V/V

METOT

- 10g yaprağı havan içerisinde iyice ezin. Havana 5ml aseton ekleyip 5 dakika daha ezmeye devam edin.
- Yaprığı süzün ve kalıntıları 5 ml aseton ile yıkayın.
- Süzülen çözeltileri birleştirdikten sonra elde edilen karışıma 10 ml aseton ekleyin.
- Elde edilen çözeltiyi 5 dk 300-400 g'de santrifüj edin.
- Santrifüj edilen çözeltiyi uygun tüplere alın ve su banyosundan bekletin. Bu sayede asetonun fazlası uçurulmuş olur. Konsantre pigment ekstraktı haline gelmesi sağlanır. Bu ekstrakt hem klorofil hem de ksantofil ve karoten pigmentlerini içerir.

Kurşun kalemle silika jel üzerine bir çizgi çekin ve bu çizgi üzerine kılcal pipet yardımıyla düzgünce klorofil ekstraktını yayıp içinde solvent bulunan kromatografi tankına yerleştirin. Belli bir süre sonra solventin ve pigment ekstraktı içindeki 4 farklı pigmentin silika jel tabaka üzerinde farklı hızlarda yürüdüğü gözlemlenir. Cetvel yardımıyla tabaka üzerinde oluşan farklı tabakaların yürüme uzunluklarını ölçerek her bir madde için R_f değerlerini hesaplayın.

Pigment ekstraktının içindeki farklı pigmentlerin solventten üste doğru sırasıyla:

Klorofil b	Zeytin yeşili
Klorofil a	Mavi yeşil
Ksantofil	Sarı
Karoten	Turuncu

şeklinde sıralandığı gözlenir. Böylelikle yaprakların yeşil görünüşlerini sağlayan ve yapraklardan yeşil bir ekstrakt olarak elde edilen çözeltide 4 farklı pigment maddesi farklı absorbe oluş derecelerine göre ayrılmış olurlar.

Sorular

1. Kağıt ve İnce Tabaka kromatografisinde spotları ilk uyguladığınız noktaları işaretlerken tükenmez kalem kullanılmamasının sebebi nedir?
2. İnce Tabaka kromatografisi ile analiz edilen bir karışımdaki iki maddenin R_f değerleri 0.8 ve 0.5 ise, çözücü 12 cm ilerlediğinde iki madde arasındaki mesafe kaç cm olacaktır?