

- 7) Ön kolon ve koruyucu kolonlar ne amaçla kullanılırlar?
- 8) Kolon verimliliği nasıl tayin edilebilir?
- 9) Ters faz ve normal faz HPLC arasındaki farklılıkları açıklayınız.

3.6. KAPİLLER ELEKTROFOREZ (CE)

Elektroforez, bir elektrik alandaki iyonların mobilitesine dayanan bir ayırma tekniğidir. Bir komponentin hızı (mobilitesi), büyüklüğüne ve yüküne bağlıdır.

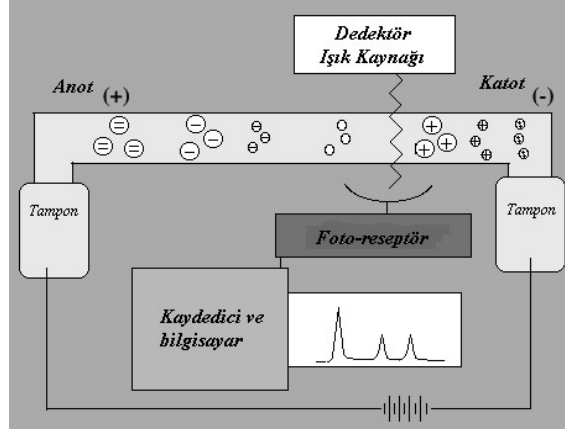
Elektroforetik teknikler 3 gruba ayrılır:

- 1- Kapiller elektroforez
- 2- Disk elektroforez
- 3- Jel elektroforez

Kapiller elektroforez (CE), yüklü taneciklerin (iyonlar, koloidal tanecikler gibi) elektrik alanda farklı hızlarda hareket etmelerinden yararlanılarak ayrılmasına yarayan bir metottur. İlk kapiller elektroforez cihazı Tiselius tarafından geliştirilmiş ve bu çalışmanın karşılığı olarak da kendisine Nobel ödülü verilmiştir.

Temel aletsel yapı; bir yüksek voltaj güç desteği, bir erimiş silika kapiller, iki tampon rezervuarı, iki elektrot ve bir dedektörden oluşur (Şekil 3.5). Ayrıca bu alete otomatik numune verici, enjeksiyon apereyi, dedektör çeşitleri ve ısı kontrolü sağlayıcı bölümler ilave edilebilmektedir.

Kapiller elektroforezde bir kapiller boru belli pH'da iletken bir sıvı ile doldurulur. Bu, numunenin ayrılacağı tampon çözeltidir. Numune kapillere enjeksiyonla uygulanır. Kapiller üzerinde bir yüksek voltaj meydana getirilir ve oluşan elektrik alandan dolayı, numune bileşenleri kapiller boyunca farklı hızlarda hareket ederler. Pozitif bileşenler negatif elektroda, negatif bileşenler pozitif elektroda göç ederler. Kapillere belirli bir yerden bir dedektörle bakıldığında, önce hızlı olan bileşenlerin, daha sonra da yavaş olanların geçtiği görülür.



Şekil.3.5. Kapiller elektroforezin şeması

HPLC ve gaz kromatografisinde ayırıcı güç, numune bileşenlerinin stasyonere faza karşı olan affiniteleri arasındaki fark ya da kaynama noktaları arasındaki farktır. Her iki teknikte de en önemli faktör numune bileşeninin polaritesidir. Kapiller elektroforezde ise ayırıcı güç, iyonların büyüklüğüne karşı yüklerin oranıdır. Kolon boyunca olan bir akış değil, elektrik alan ayırmayı sağlar. Elektroforezin küçük çaplı kapillerlerde yapılması, yüksek elektrik alanlarının kullanımına olanak sağlar. Çünkü küçük çaplı kapiller üretilen ısıyı etkili şekilde dağıtır. Elektrik alanının artması etkin bir ayırma ve ayırma süresinin kısalmasını sağlar.

3.6.1. Sistem Elemanları

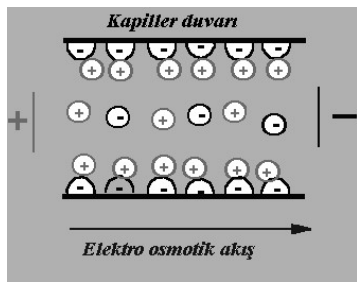
Kapiller borular, tipik olarak 50-75 µm iç çapında ve 0.25-1 m uzunluğundadırlar. Uygulanan potansiyel 20-30 kV'tır. Elektro osmotik akış nedeniyle, bütün numune bileşenleri negatif elektrot doğrultusunda hareket ederler. Numunenin çok küçük bir miktarı (pikolitre ve nanolitre düzeyinde) kapillerin pozitif ucuna enjekte edilir ve ayrılmış bileşenler kapillerin negatif ucu yakınında teşhis edilir. Kapiller elektroforez için genelde iki enjeksiyon yöntemi kullanılır: Hidrodinamik ve elektrokinetik. Hidrodinamik enjeksiyon kapillerin iki ucu arasında basınç farkı uygulanarak gerçekleştirilir. Elektrokinetik enjeksiyonda, kapillerin pozitif ucu küçük bir kaptan numuneye daldırılır ve birkaç sn 5 kV'luk bir gerilim uygulanır. Böylece elektro osmotik akış ve iyonik göçün etkisi ile kapiller içine numunenin

alınması sağlanmış olur. CE dedektörleri ise, HPLC’de kullanılanlara benzer ve bunlar absorpsiyon, floresans, elektrokimyasal dedektörlerdir.

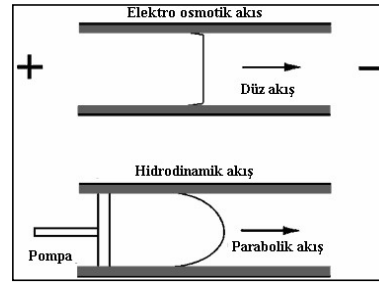
3.6.2. Endo Osmotik Akış (EOA)

Kapillerler erimiş silikadan yapılıdır. Elektro osmotik akışın nedeni, silikada ve çözelti yüzeyleri arasında meydana gelen elektriksel çifte tabakadır. Silika, yüzeyinde silanol gruplarına sahiptir (Si - O - H). Bu gruplar asidiktir. Tampon çözeltide yüksek pH değerlerinde, kapiller duvarında birçok negatif yük bulunur (Si - O⁻). Kapiller borunun yüzeyindeki bu negatif yük, tampon çözeltiden pozitif iyonları çeker. Bunun sonucu adı geçen elektriksel çifte tabaka meydana gelir. Kapiller borunun orta kısımlarında toplanan hareketli pozitif tanecikler, kapiller üzerine yüksek voltaj uygulandığında, negatif elektrot doğrultusunda göç etmeye başlar. Bunlar tampon sıvısını da beraberlerinde sürükler. Bu akışa **Endo (Elektro) Osmotik Akış** (EOA) denir. EOA negatif elektrot doğrultusundadır. pH ne kadar yüksek ise, daha çok negatif yük kapiller duvarında birikir ve daha çok pozitif yük de tampon sıvıda yer alır. Bu, daha güçlü bir EOA meydana getirir.

EOA’nın akış profili tamamen düzdür (Şekil 3.6). Bu, HPLC ve GC’deki parabolik akış profilindeki gibi yaygın piklere neden olmaz (Şekil 3.7). Bu da CE’de yüksek bir rezolüsyon elde edilmesinin nedenlerinden biridir.



Şekil.3.6. (Elektro) Endo Osmotik Akış



Şekil.3.7. HPLC ve CE’de akış tipleri

3.6.3. Kapiller Elektforez İle Ayrılabilen Molekül Tipleri

Proteinler, peptidler, amino asitler, nükleik asitler, inorganik iyonlar, organik bazlar ve organik asitlerdir.

3.6.4. Kapiller Elektforezin Avantajları

Hızlı ve verimli ayırma sağlaması (1-45 dak.), küçük numune miktarının yeterli olması (0.1-1nl), yüksek selektivite, otomasyon, miktar tayini (lineer), tekrarlanabilirlik ve mass spektrometresiyle beraber kullanılabilir olmasıdır.

3.6.5. Kapiller Elektforezin Uygulamaları

3.6.5.1. Serbest Solusyon Kapiller Elektforez (Free Solution Capillary Electrophoresis-FSCE)

Ayrımlar çoğunlukla çözünen üzerindeki bazik grupların protanasyonu veya asidik grupların pH kontrollü disosiyasyonuna bağlıdır. Bu iyon türleri, yük/kütle oranlarındaki farklılıklarına bağlı olarak ayrılırlar. Örneğin asidik ilaçların anyonlar gibi yüksek pH'larda ayrılmalarına rağmen bazik ilaçlar, katyonlar gibi düşük pH'larda ayrılırlar. Nötral moleküller ayrılamazlar.

3.6.5.2. Kapiller Zon Elektforez (Capillary Zone Electrophoresis-CZE)

Numune, tampon tarafından çevrelenen dar bir zon (şerit) halinde uygulanır. Elektrik alan uygulandığında, numune zonundaki her bir bileşen kendi mobilitelerine göre göç ederler. Bütün numune komponentleri saf materyale ait zonlar oluşturmak üzere ayrılırlar. Nötral moleküller ayrılamazlar.

3.6.5.3. Kapiller Jel Elektforez (Capillary Gel Electrophoresis-CGE)

Bu teknikte kapiller iç tarafında bir jel matris materyal vardır. Farklı büyüklükte, fakat aynı mobiliteye sahip bileşenler bu teknikte ayrılır. Daha büyük olan komponentler jel içinde yavaş ilerleyecek ve kapiller içinden daha sonra geçecektir. Özellikle DNA ve protein ayırmaları için sık kullanılan bir yöntemdir.

3.6.5.4. Miseller Elektokinetik Kapiller Kromatografi (Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography-MECC)

Nötral tanecikler kapiller boru içinde elektro osmotik akış hızında hareket ederler. Bundan dolayı da yüksüz taneciklerin ayrılması pek mümkün olmaz. Ancak ortama bir miktar surfaktan ilavesiyle düşük konsantrasyonlarda misel oluşumu ile nötral maddeler de ayrılabilirler.

3.6.5.5. Kapiller İzoelektrik Odaklama (Capillary Isoelectric Focusing-CIEF)

CIEF'de ayırma, bileşenlerin hızlarından çok izoelektrik noktalarındaki farklılıklara dayanır. Amfolitler adı verilen zwitter iyon, kapillerin iç tarafında bir pH gradienti oluşturmak için kullanılır. Bu yöntem; proteinler, peptidler, amino asitler gibi amfoterik maddelerin ayrılmasında kullanılır.

3.6.5.6. Kapiller Elektro Kromatografi (Capillary Electro Chromatography-CEC)

Kapiller elektroforezin yüksek etkinliği mikro-HPLC'nin yüksek seçiciliği ile kombine edilebilir. CEC tekniğinde ayırım mekanizması, kromatografik ayrılma ve elektroforetik migrasyonun bir kombinasyonudur. HPLC ve CEC arasındaki tek fark, mobil fazın sürüklenmesi için HPLC'deki gibi bir basınç pompası değil, bir yüksek voltajın kullanılmasıdır.

3.6.5.7. Kapiller İzotakoforez (Capillary Isotachopheresis-CITP)

İzotakoforez "iso" (aynı) + "tacho" (hız) + "phoresis" (elektroforez) kelimelerinden meydana gelmiştir. CITP'de ayırma, numune bölgesi içindeki iyonların hızlarındaki farklılığa dayanır.

Sorular

1. Elektro osmotik akış nedir? Neden meydana gelir?
2. Kapiller elektroforezde nötral moleküller nasıl ayrılır?
3. Elektroforezde amino asitlerin ayrılmalarını pH neden etkiler?
4. Kapiller elektroforez ve HPLC'de maddelerin ayrılması hangi esaslara göre olmaktadır?
5. Kapiller elektroforezin uygulamalarını sınıflandırınız ve herbirini kısaca açıklayınız.