

KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLER

Gürol EMEKDAŞ* Sabri GÜNGÖR** Hüseyin GÜN*** Ömer KOCABEYOĞLU***

Anahtar Kelime: Kromatografi

Key Words: Chromatography

ÖZET

Kromatografi, gerek mikrobiyoloji ve gerekse tıbbın diğer dallarında büyük kullanım alanı bulan ve kendisini çok süratli bir şekilde yenileyen bir tekniktir. Bu yazı kromatografik yöntemlerin temel mekanizmalarını içermekte ve prensiplerinden söz etmektedir. Kromatografik yöntemler, gelecekte yapılacak ileri çalışmalar ve geliştirilecek yeni yöntemlerle halen çözümlenmemiş sorunlara da cevap bulmada yardım olacaktır.

SUMMARY

Chromatographic Methods

Chromatography is a technique which is widely used in microbiology and also in the other medical branches and renews it self in a very short period of time. This article comprises the basic mechanisms of the chromatographic methods and treats of their principles. Chromatographic methods will give an opportunity to solve in some complicated problems with further studies and with new er techniques which will improve in the next future.

GİRİŞ

Kimyasal ve biyolojik karışımlardan saf fraksiyonlar elde edilebilmesi ötedenberi araştırmacıların zihinlerini işgal eden ve ilgilerini çeken cazip bir konu olmuştur. Ancak çoğu kez fraksiyonlu distilasyon veya fraksiyonlu kristalizasyon gibi işlemlerle sonuca gitmek mümkün olmamıştır. Oysa geliştirilen kromatografi teknikleri sayesinde biyolojik bir karışımda çok düşük konsantrasyonlarda bulunan hormon, pigment, amino asit lipid gibi maddelerin ayrıştırılması ve tanınması mümkündür. Bu nedenle kromatografi, kimyasal ve biyolojik karışımların nitel ve nicel analizlerinde bugün çok kullanılan temel bir separasyon yöntemidir.

* GATA ve As. Tıp Fak.Mikrobiyoloji ve Kl.Mik.ABD Mikrobiyoloji Uzm.

** Gaziantep Üniversitesi Tıp Fakültesi Mik. ve Kl.Mik.ABD Prof.Dr.

*** GATA ve As. Tıp Fak.Mikrobiyoloji ve Kl.Mik.ABD Doç.

KROMATOĞRAFİNİN TANIMI VE TARİHİ GELİŞİMİ

Kromatografinin kelime anlamı renk yazımıdır. Grekçe'de Chromatus = renk, Graphin = yazmak anlamına gelmektedir (1).

Kromatografi, kimyasal bir karışımı oluşturan farklı yapıdaki maddelerin birbiriyle karışmayan iki faz arasındaki dağılım dengelerine yada seçici etkileşmelerine dayanarak ayrışmalarını sağlayan ve aynı zamanda bu maddelerin nitel, nicel analizlerini gerçekleştiren temel bir işlemdir (1).

Proteinler üzerinde büyük çalışmalar yapan Emil FISCHER zamanında proteinin bugün için yeterli kabul edilemeyecek analizi altı ay sürerken, bugün bu analiz kromatografi teknikleri yardımıyla 24 saatte % 2'den az bir hata ile yapılabilmektedir.

Kromatografinin kronolojik evrimi 1848'lere kadar uzamaktadır. 1848'de WAL ve THOMPSON katılarda iyon değişiminin mümkün olabileceğini belirtmiştir. 1850-1900 yılları arasında Alman Kimyacı Runge değişik renkli boyaların ayrımı için filtre kağıdı ve bir çözücü kullanmıştır. Bu teknik, bugün de uygulama alanı olan kağıt kromatografisi olarak bilinmektedir. 1892'de REED, ilk defa kolon yardımıyla ayırımların olabileceğini kaydetmiş ve bakır sülfattan demir-3 -klorür'ün ayırımında kaolin içeren kolonlar kullanmıştır. Kromatografinin tanımı 1906 yılında bir Rus Botanikçisi olan Micheal TSWETT tarafından yapılmış ve basit bir aygıt kullanarak bitki ekstratlarında kullanılan klorofilleri diğer pigmentlerden ayırmıştır. TSWETT tarafından uygulanan yöntem sıvı-katı adsorbsiyon kromatografisi olarak bilinmektedir (1,2,3).

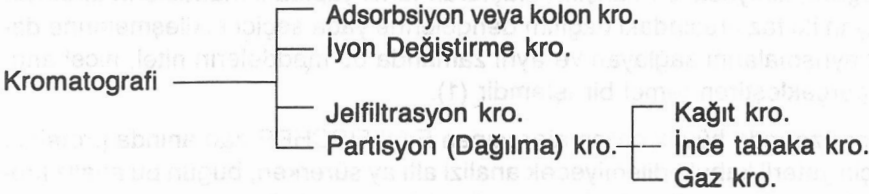
1935 yılında HOLMES ve ADAMS, organik iyon değiştirici reçinelerin sentezini gerçekleştirmiş; bunu 1938'de REICHSTEIN'in elüsyon kromatografisi üzerindeki araştırmaları izlemiştir. 1939'da BROWN, ilk olarak sirküler kromatografisini kullanmıştır. 1940 yılında da TISELIUS, frontal analiz ve yer değiştirme olayını ortaya atmıştır. 1941'de MARTIN ve SYNGE, kolon dağılım kromatografisinin kuramsal ilkelerini bulmuşlardır. 1951'de KIRCHNER, bugün pratikte uygulanan ince tabaka kromatografisini tanıtmıştır. 1951'de MARTIN ve JAMES, kromatografi alanında bir ilerleme yaparak, hareketli fazın sıvı yerine gaz olduğu bir yöntem geliştirmişler ve bugün gaz-sıvı kromatografisi olarak bilinen bu buluşları ile Nobel ödülünü almışlardır. Aynı yıl ALM, çözücü programlamasını (= Gradient elution), 1953'de ise WHEATON ve BAUMAN eleme (= Exclusion) prensibini ileri sürmüşlerdir. 1956'da SOBER ve PETERSON ilk olarak iyon değiştiren sellülozları hazırlamışlardır. 1959'da PORATH ve FLODIN, polidekstranların GPC (= Gel Permeation Chromatography)'de, 1962 yılında da MOORE sert polistrenlerin GPC'de kullanılması öne sürmüşlerdir (4,5,6,7).

1967'de HUBER ve HULSMAN, kolon teknolojisindeki gelişmeler, yüksek basınçlı pompa sistemleri ve duyarlı dedektörlerin kullanılması ile yüksek basınçlı sıvı kromatografisinin temel öğelerini ortaya koymuşlardır (6).

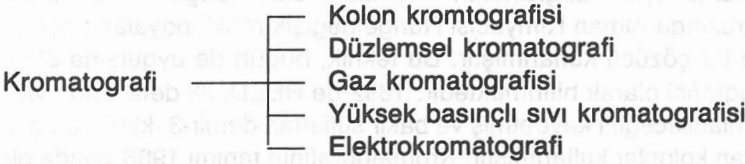
KROMATOGRFİK YÖNTEMLERİN SINIFLANDIRILMASI

Günümüzde kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması faz tiplerine, uygulama biçimine yada ayrılmanın dayandığı ilkelere göre yapılmaktadır.

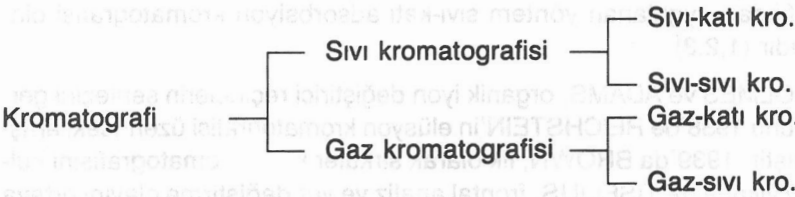
a) Klasik sınıflandırma (4).



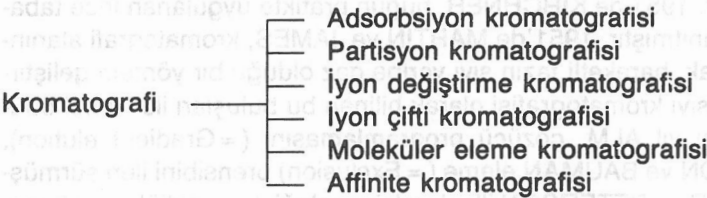
b) Uygulama biçimine göre sınıflandırma (6).



c) Faz tiplerine göre sınıflandırma (6).



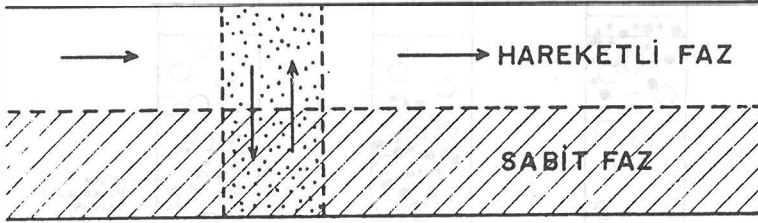
d) Ayrılma mekanizmalarına göre sınıflandırma (6).



KROMATOGRFİNİN MEKANİZMASI

Kromatografik yöntemle çeşitli biyolojik ve biyolojik olmayan moleküllerin ayrıştırılması, moleküllerin absorban madde ile olan farklı ilişkisi esasına dayanır. Başka bir deyişle kromatografi, iki faz arasındaki örnek bileşenlerinin farklı bir şekilde dağılımlarına dayanmaktadır. Kromatografik yöntemle moleküllerin büyüklükleri, ağırlıkları, şekilleri, elektriksel yük ve adsorbsiyon gibi özelliklerindeki farklılıklardan

faydalanılarak ayrılmaları sağlanır. Kromatografide moleküllerin ayrılmasını sağlayan sabit (= Stasyoner) bir faz ile bunun üzerinde hareket eden hareketli (= Mobil) bir faz vardır (2,4,6). Ayrılacak maddelerin molekülleri hidrodinamik veya elektriksel bir kuvvetle, hareketli ve hareketsiz fazlar içinde veya üzerinde hareket ederler. Çözünürlük, molekül büyüklüğü gibi özelliklerinin farklılığı nedeniyle sabit faz üzerinde farklı şiddette tutulur veya hareketli faz içinde farklı hızlarla hareket ederler. Sabit faz, çok ince partiküllerden oluşmuş toz görünümünde bir katı olabileceği gibi geniş bir yüzey alanı sağlamak üzere katı destek (-adsorban) üzerine emdirilmiş bir sıvı da olabilmektedir. Hareketli faz ise, karışımın kolondan geçmesini sağlayan bir sıvı yada gazdır (6,8). Şekil-1'de görüldüğü gibi örneğimiz sabit ve hareketli fazlar arasında dağılmaktadır. Burada hareketli faz, moleküllerin taşınmasında sürükleyici, sabit faz ise geciktirici olarak görev yapmaktadır.



Şekil-1: Kromatografik bir kolon kesiti

JEL FİLTASYON KROMATOĞRAFİSİ (= Gel Filtration Chromatography).

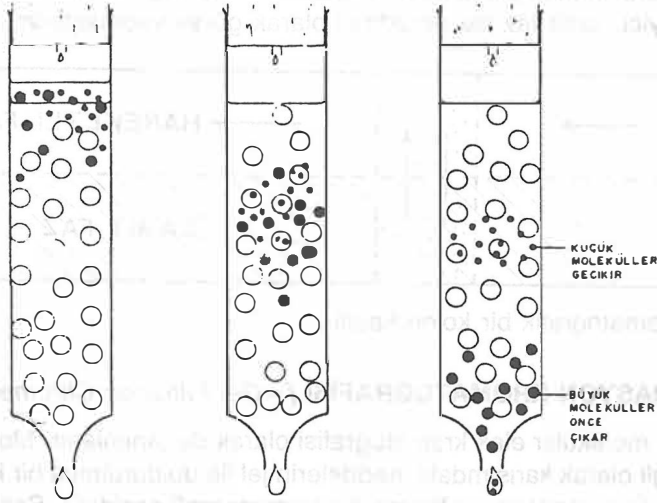
Bu yöntem moleküler elek kromatografisi olarak da tanımlanır. Moleküler büyüklüğüne bağlı olarak karışımdaki maddelerin jel ile doldurulmuş bir kolondan elenmek suretiyle ayırılmalarını sağlayan bir kromatografi çeşididir. Sabit faz hidrofilik bir jel, hareketli faz sulu bir çözücü ise jel filtrasyon kromatografisi (GFC); sabit fazın hidrofob bir jel, hareketli fazın da organik bir çözücüde olduğu kromatografiye jel permeasyon kromatografisi (GPC) adı verilmektedir. Jel kromatografisi özellikle biyokimyada makromoleküllerden tuzların ve küçük moleküllerin ayrılması (= desalting) işlemlerinde kullanılır. Protein, peptid, nükleik asit, polisakkarit, enzim ve hormonların analizi de bu yöntemle yapılmaktadır. Polimer karışımlarda ise, molekül ağırlıklarının dağılımını saptamak üzere jel kromatografisinden yararlanılmaktadır (2,6,9).

Bu metod için PORATH ve FLODIN çapraz bağlanma yoluyla elde ettikleri dextran, agarose ve akrilamit türevlerini kullanmışlardır. Kullanılan bu jel maddeleri ile delik büyüklüğüne bağlı olarak farklı molekülleri süzerek ayırmak mümkün hale gelmiştir. Hazırlanan protein karışımı delik çapı tedrici olarak değişen bir jel ile doldurulmuş bir kolondan geçirilir. Protein çözeltisi kolondan aşağıya doğru süzülürken büyük çaplı olan ve porlardan geçemiyen moleküller daha küçük çaplı olan ve çapına göre de değişik büyüklükteki porlardan geçebilen moleküllere nazaran daha hızlı hareket ederler. Böylece protein karışımındaki çeşitli proteinler molekül büyüklüğüne göre kolonda üst üste tabakalanmış olur. Sonuç olarak da molekül

ağırlığı büyük olan proteinler kolondan ilk önce süzülürler (Şekil-2) (1,5,6,8,9,10,11, 12,13,14).

Jel filtrasyon kromatografisinde önemli nokta, kolonu çalıştıran sıvı basıncı yükseklidir. Yüksek basınçta jel partikülleri birbirine yapışarak katı bir ortama getirebileceğinden, kolona giren sıvı ile çıkan sıvı arasındaki yükseklik farkıyla meydana gelen basınç, jel'in kolon içine paketlenildiği basınçtan fazla olmamalıdır (8,9,10,13,15,16).

Jel kromatografi yöntemi iyi bir ayırıştırma yöntemi olmasının yanında, molekül ağırlığı tayininde de kullanılabilen bir tekniktir (9,10,15,16)



Şekil-2: Jel filtrasyonunda moleküllerin ilerleyişi

İYON DEĞİŞTİRME KROMATOĞRAFİSİ (= Ion Exchange Chromatography).

Bir karışımda bulunan iyonik bileşiklerin, dolgu maddesinin iyonları ile geçici olarak yer değiştirmesi sonucu meydana gelen ayırma işlemidir (6,17). Sabit fazdaki maddenin yer değiştirebilen iyonik gruplarının özelliklerine bağlı olarak yer değiştirme olayı meydana gelebileceğinden çeşitli molekül gruplarının sabit faz üzerinde birbirinden ayrılabilmesi için amaca uygun bir sabit faz maddesi seçilir. Genellikle bu işlem için sentetik reçineler kullanılır. Bu reçinelerin iyonik karakterleri pH'a göre değişeceğinden belli bir molekül grubu belli bir reçinenin belli pH'daki iyonik özelliklerinden faydalanılarak komponentlerine ayrılır. Bu metotta kullanılan reçineler belli pH'da ortama anyon veya katyon gruplarını değiştirdiklerinden, anyon değiştirici veya katyon değiştirici reçineler diye iki grupta toplanan reçinelerden biri ile ayırma işlemine tabi tutulurlar (5,6,14,17,118). Ayrılacak olan molekül grubu içindeki komponentlerin belli sıcaklık ve pH'da belli iyon değiştirme eğilimleri oluşu nedeniyle bazı komponentler kolayca, diğerleri daha zor olarak iyon

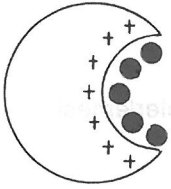
değiştirir ve kromatografi sırasında birbirlerinden ayrılırlar. Ayrılmadan sonra resin'in pH'ı değiştirilerek komponentlerin teker teker kolondan yıkanması sağlanır ve bu şekilde tek tek elde edilebilirler.

Bu metodla proteinlerin ayrıştırılmasında anyon yada katyon değiştiriciler kullanılır. Kimyasal yapı olarak destek maddesine (Sellüloz veya sefaroz) eklenen fonksiyonel gruplar yardımıyla ayrıştırma yapılır (Şekil-3,4).

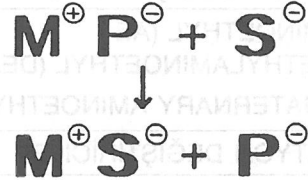
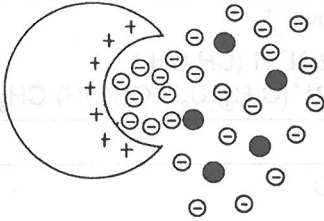
Katyonik ve anyonik değiştiricilerin fonksiyonel grupları Tablo-1'de gösterilmiştir.

ADSORBSİYON KROMATOĞRAFİSİ (= Adsorption Chromatography).

Ayrılmayı sağlayan olay, bir çözücü içindeki maddelerin kolloidal ve çözücüde çözülmeyen katı faz tarafından adsorbe edilerek tutulmasıdır.



SALIVERİLME

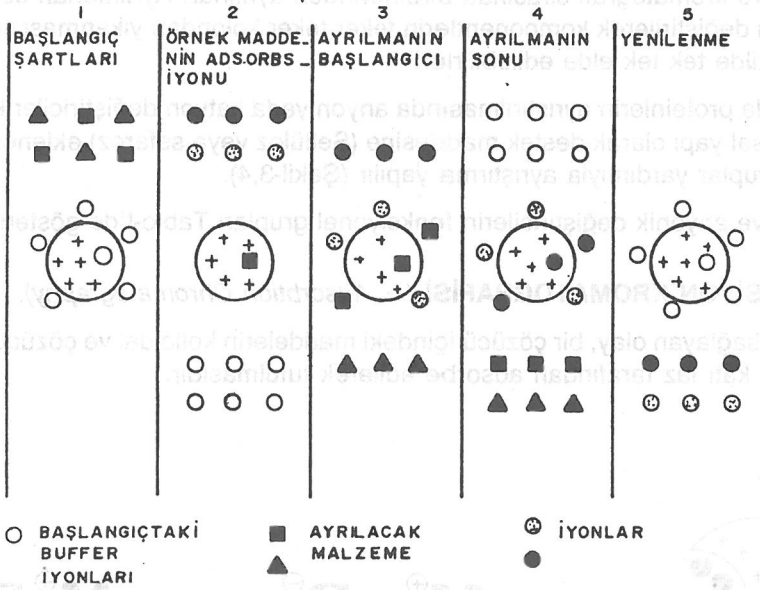


M = İYON DEĞİŞTİRİCİNİN YÜKLÜ TARAFI

● P = ÖRNEK PROTEİN

- S = OLAYA KARIŞAN TUZ İYONU

Şekil-3 : İyon değiştirme kromatografisinin temel prensibi



Şekil-4: İyon değiştirme kromatografisinde iyonların tutulma ve ilerlemesi

Tablo-I
Kationik ve anyonik değiştiricilerin fonksiyonel grupları

ANYON DEĞİŞTİRİCİLER	FONKSİYONEL GRUBU
AMINOETHYL (AE-)	- $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{NH}_3^+$
DIETHYLAMINOETHYL (DEAE-)	- $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+\text{H}(\text{CH}_2\text{CH}_3)_2$
QUATERNARY AMINOETHYL (QAE-)	- $\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{C}_2\text{H}_5)_2\text{C}_2\text{H}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_3$
KATYON DEĞİŞTİRİCİLER	
CARBOXYMETHYL (Cm-)	- OCH_2COO^-
PHASPHO	- PO_4H_2^-
SULPHOPROPYL (SP-)	- $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$

Adsorbsiyon; katı, sıvı veya gaz gibi herhangi bir durumda bulunan bir maddenin üst yüzeyinde, sıvı, katı veya gaz tabiatında maddelerin tutulması olayına denir. Üst yüzeylerdeki bu tutunma olayında, ya fiziksel veya kimyasal olaylar veyahutta her ikisi beraber rol oynar, bu durumda fiziko-kimyasal olur (6).

Üst yüzeyinde kendinden başka çeşit maddeyi tutana adsorban, tutulan maddeye de adsorbe edilen madde denir. Fiziksel olan adsorbsiyonda adsorbent ile adsorbe edilen madde arasında Van Der Walls Kuvvetleri rol oynar. Kimyasal adsorbsi-

yonda ise, adsorbsiyon olayı adsorbanın üst yüzeyindeki bazı moleküllerin dışı bakan üst yüzeydeki bağımsız kalmış değerlikleri ile adsorbe edilen maddenin molekül veya iyonları arasında bir ilginin bulunmasından ileri gelir (6).

Bu teknik en eski kromatografi tekniğidir. İyonik özellikleri az veya orta derecede olan yani polariteleri düşük olan maddelerin ayrılmasında kullanılır. Uygulanması jel filtrasyon tekniğine benzer, ancak bu metotta yalnızca ayrılacak maddelerin adsorbe olma özellikleri rol oynar, molekül çaplarının ayrılmada pek bir etkisi olmaz.

Burada kolonların şekilleri genellikle bir bürüte benzer ve adsorban olarak da en çok alümina, silika, kalsiyum karbonat, kalsiyum hidroksit, sakkaroz, nişasta, aktif kömür gibi maddeler kullanılır. Kolon adsorban madde ile doldurulduktan sonra üzerine ayrılacak olan molekül karışımı bulunan çözelti konur ve ayrılması beklenir veya hareketli faz olan çözücü sütundan sürekli geçirilir. Moleküller adsorbanla olan ilişkilerinin büyüklüğüne göre ya hemen tutulurlar yada çözücü ile beraber daha aşağılara doğru inebilirler. Çözücü sürekli geçirilirse zayıf adsorbe olanlar desorbe olarak daha aşağı inerler. Dolayısıyla da kolon üzerinde birbirinden ayrılmış, maddelerin özelliğine göre renkli veya renksiz bandlar halinde toplanırlar. Ayrılma tamamlanınca yıkama işlemiyle gene adsorbanla ilişkilerinin kuvvetine göre bandlardaki maddeleri tek tek çözebilecek çözücülerle ayrı ayrı yıkanarak dışarı alınırlar (6).

PARTİSYON VEYA DAĞILMA KROMATOĞRAFİSİ

Bu yöntem, bir maddenin birbirine karışmayan iki değişik fazda farklı şekilde ayrışması esasına dayanır. Eğer biyolojik bir madde çözelti haline getirilip kendisi ile karışmayan bir çözücü ile çalkalanırsa bu maddenin her iki fazdaki partisyon katsayısı farklı olacağından iki ayrı fazda toplanır. Denge durumunda her iki fazdaki solut konsantrasyonunun oranı partisyon katsayısı olarak tanımlanır. Organik çözügenlerde çok, suda az çözünen bileşiklerin birbirinden ayrılması adsorbsiyon kromatografisi ile, suda iyonize olan ve çözünen maddelerin ayrılması iyon değiştirme kromatografisi ile yapılabilir. Hem suda ve benzeri polar çözügenlerde, hem de organik çözügenlerde çözünebilir bileşiklerin birbirinden ayrılabilmesi ise partisyon veya dağılma kromatografisi ile olabilmektedir. Partisyon kromatografisi üç değişik şekilde uygulanabilir;

a) Kağıt kromatografisi: Bu yöntemde, numune Whatman No:1 veya benzeri kromatografi kağıdının bir kenarına yakın bir noktaya damlatılır ve kağıt tankta bulunan solventin içine dikey olarak daldırılır. Solvent kağıtta ilerlerken bileşenleri farklı hızlarda sürükler. Bu işlemin sonunda kağıt kurutulur ve renkli olmayan bileşenlerin görülebilmesi için renklendirici veya fluoresans ve fluoresans verici bir kimyasal reaktif ile muamele edilir. Ayrılan bileşiklerin tanınmaları için standart maddelerin numune ile birlikte yürütülmeleri gerekmektedir. Değerlendirme, spotların rengine ve Rf değerlerine göre yapılır (6,19).

b) İnce tabaka kromatografisi: İnce tabaka kromatografisinde özel bir cihazla çe

şitli adsorban maddelerin cam, alüminyum veya plastik plaklar üzerine kaplanmasıyla elde edilen tabakalar kullanılmaktadır. Ayrılan bileşiklerin nitel ve nicel analizi için spotlar plaktan kazanarak kütle spektrometresi, infrared spektrofotometre, ultraviyolelevisible spektrofotometre gibi cihazlar yada kimyasal yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemde silica gel, alümina, sellüoz, polyamidler, iyon değıştirciler gibi adsorbanlar kullanılmaktadır (19).

Kromatogramda elde edilen renksiz spotların görünür hale getirilmesi için ultraviyole lambası altında fluoresansın incelenmesi, plak üzerine renkli veya fluoresan bileşikler oluşturan kimyasal maddelerin püskürtülmesi, veya plağın ısıtılması gibi teknikler uygulanmaktadır. İnce tabaka kromatografisinde iyi bir ayırma sağlamak amacıyla, dairesel geliştirme, çift boyutlu geliştirme gibi teknikler de kullanılmaktadır (6,19).

c) Gaz kromatografisi: Gaz kromatografisi, sabit faz üzerinde gaz akışı uçucu maddelerin ayrılmasını sağlayan bir tekniktir. Sabit faz sıvı ise, gaz-sıvı kromatografisi; katı ise, gaz-katı kromatografisi adını alır. Sabit faz ile doldurulmuş kolon yüksek sıcaklıkta tutularak ayrılacak maddeler gaz haline geçirilir. Halen geliştirilmiş olan sistemlerde sabit faz olarak kullanılmakta olan sistemlerde sabit faz olarak kullanılmakta olan maddeler 500 C'a kadar dayanıklı olduğundan, kaynama derecesi, bu sıcaklığın altında olan maddeler bu yöntemle ayrılabilir. Gaz kromatografisi sistemi taşıyıcı gaz, enjeksiyon bölümü, kolon detektör ve kaydediciden oluşmaktadır. Ayrılması istenilen maddeler mikroşırınga ile kolon girişine enjekte edilir, yüksek sıcaklık nedeniyle hemen buharlaşır ve taşıyıcı gaz ile sürüklenerek kolonda ilerlerken sabit faz ile hareketli faz arasında devamlı taşınarak birbirlerinden ayrılır, kolondan farklı zamanlarda çıkarlar. Kolonun sonundaki dedektör ile tespit edilen maddeler, miktarlarıyla orantılı olarak kaydedilir ve karışımındaki her bileşik için ayrı bir pik çizilir. Bu piklerin alıkonulma süreleri, yani enjeksiyon anından bileşiğın kolondan çıkarak kaybedilmesine kadar geçen süre belirliği koşullarda çalışıldığında her bileşik için sabittir. Standart maddelerde aynı koşullarda çalışılarak elde edilen piklerin tanınmasında bu özellikten yararlanılır (6,19).

YÜKSEK BASINÇLI SIVI KROMATOĞRAFİSİ (HPLC).

Kolon kromatografisinin geliştirilmiş bir şekli olan bu yöntemde taşıyıcı sıvı, içerisinde adsorban maddenin bulunduğu kolona pompa ile basılarak akış hızı artırılmakta, karışımı oluşturan bileşiklerin ayrılması tam ve hızlı olarak sağlanmaktadır. Ayrılan bileşikler kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektör ile tespit edilerek kaydedilmektedir. Isıya karşı duyarlı ve büyük moleküllü bileşiklerin ayrılmasında kullanılabilen bu sistemin klasik kolon kromatografisinden üstünlükleri, numune hazırlama işlemleri ile analiz süresinin kısa olması ve milyarda bir kısım (1 ppb)'dan az konsantrasyondaki maddelerin dahi hassas ve tekrarlanabilir olarak tayin edilebilmesidir (6,19).

SONUÇ

Biyolojik ve kimyasal bileşiklerin ayırımında distilasyon, süblimasyon, ekstraksiyon, fraksiyonlu kristallendirme ve kromatografi gibi ayırma yöntemlerinden yararlanılmaktadır. Kromatografi, özellikle az miktardaki karışımların ayrılmasında ve bileşiklerin saflaştırılmasında en çok yararlanan bir ayırma yöntemidir.

Kromatografi, en basit şekli olan kolon kromatografisinden başlayarak sürekli gelişim göstermiş, yeni cihaz ve yöntemlerle, bugün analiz laboratuvarlarının vazgeçilmez yöntemlerinden olmuştur.

Modern laboratuvarlarda kullanılan gaz kromatografisi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisine karşılık, kısıtlı olanaklara sahip, küçük laboratuvarlarda uygulanabilecek kağıt, kolon ve ince tabaka kromatografisi gibi yöntemlerin de bulunması, yapılması istenilen hemen her analizi gerçekleştirebilecek bir sistem ve yöntemin var olması, çok az miktardaki maddelerin tayinlerinin hassas ve tekrarlanabilir olarak gerçekleştirilebilmesi, zaman ve eleman tasarruğu sağlaması gibi üstün özellikleri ve sürekli bir gelişme içinde bulunması kromatografinin tüm ülkelerdeki laboratuvarlarda tercih edilmesi ve yaygın olarak kullanılmasının nedenini açıklamaktadır.

Mikrobiyoloji, biyokimyo, farmakoloji ve gıda kontrolü sahasında büyük bir çalışma alanı oluşturan kromatografik yöntemler endüstriyel alanda da büyük bir yer işgal etmekte ve gelişmesini bu alanlarda sürdürmektedir.

Günümüzde yapılan ve gelecekte de yapımı planlanan yeni çalışmalara ve yöntemlere ışık tutacak olan kromatografi, geliştirilecek yeni yöntemlerle halen çözümlenememiş sorunlara da çözüm getirilmesini mümkün kılacaktır.

KAYNAKLAR

1. Tizard, I.A.: Immunology: An introduction, Holy-Saunders Japan, Saunders College Publishing 1984, 80-104.
2. Aras, K., Erşen, G.: Klinik Biyokimya. Beşinci Baskı. Ankara. Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti., 79-82.
3. Pharmacia Fine Chemicals: DEAE-Sepharose CL-6B, CM-Sepharose CL-6B for ion exchange chromatography, Uppsala, Sweden.
4. Determann, H.: Gel chromatography. Springel-Verlag Inc., New York, 1968.
5. Fahey, J.L., Terry, E.W.: Ion exchange chromatography and gel filtration. Immunochemistry. Third Edition Vol. 1 (Ed) Weir, D.M., Blackwell, London 1979, 8.1-8. 16.
6. Şener, B., Orbey, M.T., Temizer, A.: Modern analiz yöntemleri. Seldem Ofset Matbaası, Ankara 1986, 20-56.
7. Whitaker, J.R.: Determination of molecular weights of proteins by gel filtration on sephadex. Analytical chemistry 35 (12): 1950-1953, 1963.
8. Scopes, R.K.: Protein purification. Second printing. Springer-Verlag Inc. New York 1982, 67-182.
9. Pharmacia Fine Chemicals: Sephadex, Gel filtration in theory and practice, Uppsala, Sweden.
10. Billmeyer, F.W. Jr., Altgelt, K.H.: The sizes of polymer molecules and the GPC separation. Gel Permeation Chromatography. (Eds) Altgelt, K.H., Segal, L.. Marcel Dekker Inc. New York 1971, 3-11.

11. Cameron, B.F.: Gel filtration chromatography. Gel Permeation Chromatography (Eds) Altgelt, K.H., Segal, L.. Marcel Dekker Inc. New York 1971, 351-357.
12. Ersoy, E., Bayşu, N., Ertürk, K., Üstdal, M.: Biyokimya. A.Ü. Veteriner Fak. Yayınları No: 358, A.Ü. Basımevi, Ankara 1979, 180-183.
13. Özcel, M.A.: İmmünofluoresans ve parazitolojide uygulanması. E.Ü. Matbaası. Bornova-İzmir 1978, 45-73.
14. Trautwein, G.: Outline of immuno-fluorescence. Institute of Pathology Veterinary School. Hannover 3000, Hannover, F.R.G.
15. Pharmacia Fine Chemicals: Gel filtration theory and practice, Uppsala, Sweden.
16. Yau, W.W., Malone, C.P., Suchan, H.L.: Separation Mechanisms in gel permeation chromatography. Gel permeation chromatography (Eds) Altgelt, K.H., Segal, L.. Marcel Dekker Inc. New York 1971, 105-117.
17. LKB The Incentive Group: A practical guide to ion exchange chromatography, Bromma, Sweden.
18. Pharmacia Fine Chemicals: Ion exchange chromatography principles and methods. Uppsala, Sweden.
19. Şenelt, S: Gıda kalite kontrolünde uygulanan başlıca kromatografik yöntemler. Türk Hij. Den. Biyol. Derg. 44 (2): 191-201, 1987.