

# KETO ASİTLERİN KROMATOĞRAFİK YOLLA AYIRIMINDA ÇEŞİTLİ SOLVENTLERİN MUKAYESESİ (x)

Dr. Ender YANARATEŞ (xx)

Dr. Tevfik Aslan AKSU (xxx)

## ÖZET

*Bu çalışmada keto asitlerin değişik solvent sistemleriyle kromatografik ayırmaları yapıldı. n- Butanol, etanol, su (Bu/Et/Su) ve isopropanol, amonyak su (Ipr/Am/Su) sistemlerinin bizim laboratuvar şartlarımızda en faydalıları olduğuna karar verildi.*

## I. Giriş :

Bilindiği gibi ketoasitler, bilhassa alfa ketoglutarik asit ile piruvik asit insan vücudunda çeşitli metabolizma olaylarına iştirak etmektedir. Bunlar içinde en önemlilerinin de glikozun indirekt oksidasyonu ile transaminasyon olduğunu hatırlayacak olursak keto asitlerin çeşitli materyelde ayırımlarının ne derece ehemmiyet arzettiği kendiliğinden ortaya çıkmış olur.

Zamınımıza kadar keto asit tayini için çeşitli metodlar üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Üzerinde en çok uğraşılan da kolorimetrik (I) ve kromatografik (2) metodlardır. Keto asitlerin çok değişik türlerinin bulunmasına rağmen dinitrofenilhidrazonlarla (DNP) kromatografik tesbitleri hem kolay ol-

makta, hem de daha ucuza mal olduğundan sıklıkla kullanılmaktadır. Bu Yazıda keto asitlerin kromatografik ayırımları sırasında muhtelif solventlerde alınan sonuçlardan bahsedilecektir.

## 2. Materyal ve Metod :

### - Materyal

Aşağıda tarif olduğu şekilde hazırlanan standartlar ve reaktifler (1) materyal olarak kullanıldı:

### 1. 0,2 M Disodyum Glutarat Standartları:

7,8 gram alfa - Ketoglutarik asit 100 ml. soğuk distile suda eritilir. 100 ml. IN sodyum hidroksit

(x) Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biokimya Bölümü Çalışmalarından,

(xx) Dr. Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biokimya Bölümü Asistanı.

(xxx) Doç. Dr. Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Doçenti, Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Biokimya Bölümü Öğretim Üyesi.

ilâve edilir. Ph sı 6-7 arasında ayarlanır. Buzdolabında saklanır.

2. 0,2 M Sodyum Piruvat Standardı: Bir miktar distile suda çözülen 5,5 gram sodyum piruvat süzül-  
dükten sonra distile su ile 250 cc ye tamamlanır. pH sı 7 civarında ayarlanıp buzdolabında muhafaza edilir.
- 3, 2,4 Dinitrofenilhidrazin Reaktifi: 0,0396 gram 2,4 dinitrofenilhidrazin 200 cc I N hidroklorik asidde ertitilip buzdolabında saklanır.
4. Alkali reaktifi: 2 gram sodyum hidroksit 4 cc distile suda eritilip % 90 lik etanol ile 100 cc ye tamamlanır.

- **Metod :**

Ivor Smith tarafından tarif olunan ve esası standart solusyonlardaki ketoasitlerin Whatman No. 4 kâğıdı üzerinde 2,4 dinitrofenilhidrazin ile yaptığı DNP hidrazonların çeşitli solventlerde kromatografik olarak tesbiti esasına dayanan metod tatbik edildi.

- **Deneyin Yapılışı :**

**a- Kâğıtların hazırlanması :**

Whatman No. 4 kâğıdı 21 x 28 ebadında kesildi. Kâğıdın alt kenarından 3 cm. yukarıya tabana paralel olmak üzere bir doğru çizildi. Bu doğru üzerinde birbirine 10 cm. ara ile iki nokta tesbit edilerek noktalar merkez olmak üzere her ikisinin de etrafına kurşun kalemle 0,5 cm. çapında iki daire işaretlendi. Birinin üzerine K (Ketoglutarik asit), diğ-  
erinin üzerine de P (Piruvik asit) yazıldı.

**b- Kromatografi kâğıtlarına numunenin tatbiki :**

Kâğıdın tatbik noktalarını işaretlediğimiz kısmı altına bir pipet konarak yükseltilmesi temin edildi. 0,1 ml. lik pipetler kullanılarak K işaretli yere hazırlanan alfa - ketoglutarik asit ihtiva eden 0, 2 M disodyum ketoglutaratın, P işaretli yere de 0,2 M sodyum piruvattan 0,01 ml. ye tamamlanmaya kadar (takriben 1 damla) damlatıldı, kurutuldu. Sonrada hem K, hem de P işaretli yerlere çekilen 0,05 ml. 2,4 dinitrofenilhidrazinin tamamı bitinceye kadar azar azar kurutulularak damlatıldı. İşlemin sonunda kâğıtlar oda ısısında kurumağa terk edildi. Her solvent için birisi alkali ayrıaca batırmadan, diğeri batırarak olmak üzere iki defa çalışılacağından iki kâğıt hazırlandı-ve her ikisi de aynı işlemlere tabi tutuldu.

**c- Alkali ayırıcın tatbiki :**

2,4 dinitrofenilhidrazin 0,05 ml. sinin tamamen tatbikinden ve kurumasından sonra kâğıtlardan biri alalen ayrıaca batırılıp çıkarıldı. Kurutucuda 60°C de 20 dakikâ tutulduktan sonra diğerkâğıt ile birlikte kromatokablara yerleştirildi.

**d- Kromatokablardaki solventlere koyma (Assandan Teknik) :**

Bu maksatla kullanılan solventler aşağıdaki şekilde hazırlandı:

**1- n- Butanol, Etanol, Su (Bu/Et/Su) :**

350 cc n-Butanol, 50 cc Etanol 100 cc Distile Su konur, karıştırılır. Soğuk havada bırakılan karışım

Alkali ayıraca batırılmamışsa 4 saatde. Kâğıt üzerinde tepeye kadar yürür.

**2- n-Butanol, Etanol, 0 5 N Amonyak (Bu/Et/Am) :**

350 cc n-Butanol, 50 cc Etanol, 100 cc 0,5 N Amonyak karıştırılır.

Alkali ayıraca batırılmışsa 7 saatde.

Alkali ayıraca batırılmamışsa 6,5 saatde kâğıt üzerinde tepeye kadar yürür.

**3- İsoopropanol - su - Amonyak (IPr/Am):**

200cc isopropil alkol, 20cc distile su, 10cc amonyak karıştırılarak hazırlanır. Takriben 7 saatde kâğıt üstünde tepeye kadar ilerler.

Bu şekilde hazırlanmış solventleri ihtiva eden kromatokablara her solvent için iki defa çalışılmış (alkali ayıraca batırılmış ve batırılmamış) ve kurumuş kâğıtlar silendir şeklinde kıvrılıp, işaretli kısımlar dışa gelecek şekilde iğnelenerek konuldu. Her solvent için tesbit edilen zaman sonunda kâğıtlar çıkarılıp 60°C deki kurutucuda 20 dakika tutularak kurutuldu.

**3. Bulgular :**

Kâğıt üstündeki lekeleri incelediğimiz zaman şunları tesbit ettik:

- 1- Rf değerleri her kâğıttaki çalışma için ayrı ayrı bulundu. Ortalaması alınarak kaydedildi (Tablo: 1).

bulunur fazla birkaç damla etanol ilâve edince düzelir.

Alkali ayıraca batırılmışsa 5,5 saatde

Tablo 1. Her Solvent için Elde Edilen Rf Değerleri :

Keto asit DNP hidrazon	Bu/Et/Su	Bu/Am/Su	IPr/Am/Su	Rengi
Alfa-Ketoglutarik Asit (0,2 M disodyum keto glutarat)	0,26	0,21	0,13	Yeşil
Piruvik asit (0,2 M Sodyum Piruvat)	0,38	0-4	0,5-0,6	Kahverengi

2- n-Butonal, Etanol, Su (Bu/Et/Su) solventlerinde daha net, daha düzenli lekeler husule geldi (Resim 1 ve Resim II).

3- IPr/Am/Su solventi bilhassa molekül yapısında ikinci bir karboksil grubu bulunan (dikarboksillik) ketoasitlerin ayırmalarına daha uygundur.

4- Bütün solventlerde piruvik asit hizasında iki leke görüldü.

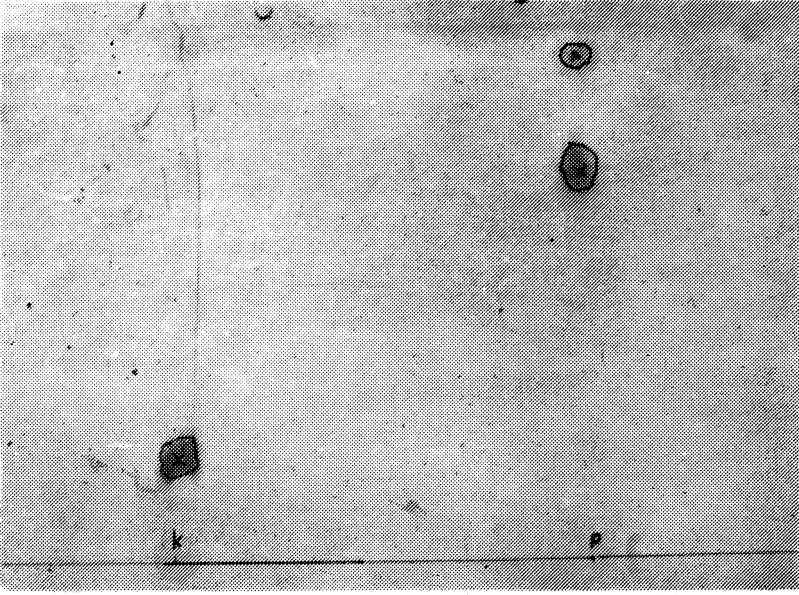
5- Alkali ayıraca batırılmış kâğıtlarda alfa - ketoglutarik asitin emdirildiği kısım yeşil, pi-

ruvik asitin emdirildiği kısım ise kahverengi olarak açığa çıktı.

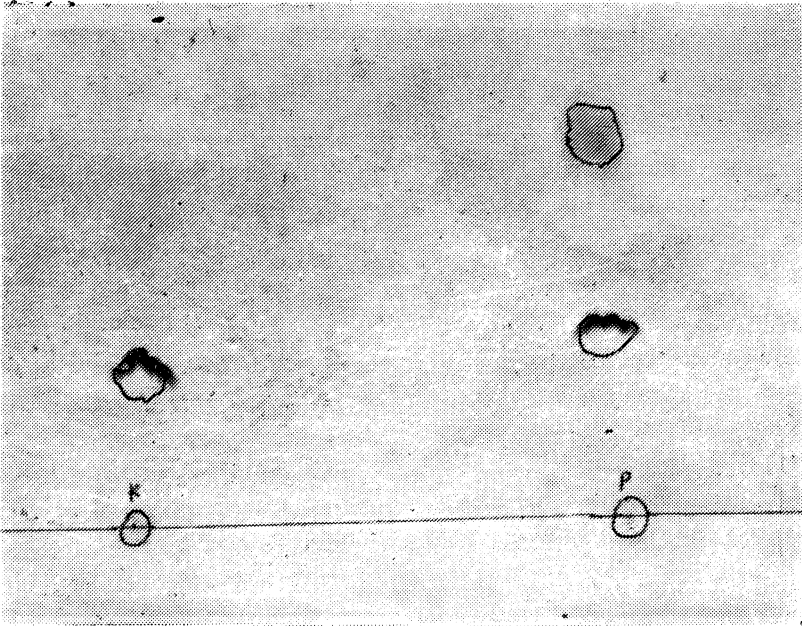
- 6- Alkali ayıraca batırılan kâğıtlarda batırılmayana göre solvent daha geç yürüdü.

**4. Tartışma :**

Tablo 1 de elde ettiğimiz Rf değerlerini tablo 2 deki (2) orijinal metodun Rf değerleri ile karşılaştırırsak neticelerin birbirine çok yakın olduğunu görürüz. Piruvik asit hizasında iki leke elde edilmesi hususunda şimdiye kadar yapılan çeşitli izahları aşağıdaki şekilde sıralayabiliriz:



Resim 1. Bu/Et/Su Solventinde lekelerin görünümü:



Resim II. Ipr/Am/Su Solventinde lekelerin görünümü.

a) Keto asit DNP hidrazonların syn ve anti formlarının tesbiti, bugün kolon kromatografisi ile mümkün olabilmektedir. Tek yönlü kromatografide 2, iki yönlü ise de 4 leke elde edilmesini de hesaba katacak olursak, bu düşünüş tarzı bir izah izah olabilir.

b) Bir solvent içindeki bir madde için 1, iki madde içindeki için 2 leke elde edilmektedir.

c) Ketoasitlerdeki veya onların hidrazonlarındaki dekompozisyon husulü.

Kondansasyondan dolayı bazen piruvik asit üçüncü bir nokta halinde de ortaya çıkmaktadır. Elde ettiğimiz Rf de değerleri klasik verilere tamamen uyarlık göstermektedir. Bilindiği gibi bütün hidrazonlar kromatografiden sonra 5-10 mikrogram gibi miktarlarda sarı renk vermektirler. (2). 1-2 mikrogram gibi daha az miktarlarda ise alkalın ayırac kullanılması le-

keyi daha belirli hele geirdiğinden tercih edilecek bir ayırım vasıtasıdır diyebiliriz. 1 mikrogramdan daha az olan değerler için de DNP hidrazonları ultraviyoleye absorbe ettirecek kromatografi yapılması denenebilir. Bu takdirde kromatografide karanlık lekeler husule gelir. Fakat çalışmamızda bu kadar düşük konsantrasyonlar kullanılmadığından alkalın ayırac ile tesbit yeterli olmuştur.

Netice olarak diyebiliriz ki, Bu/Et/Su solventi hem temin kolaylığı hem de azami 5,5 saat gibi bir sürede hazırladığımız kâğıtlarda tepeye kadar yürümesinden dolayı zamandan tasarrufa da sebep olduğu için ketoasit kromatografisinde en elverişli solventtir. Ipr/Am/Su solventi de 7 saatlik bekleme süresini bir mahzur kabul etmeyecek olursak, Bu/Et/Su solventi yerine ayrı gaye ile kullanılabilir.

Tablo II, Orijinal metoda göre her solvent için verilen Rf değerleri:

Keto asit DNP hidrazon	Bu/Et/Su	Bu/Am/Su	Ipr/Am/Su	Rengi
Alfa--Ketoglutarik asit	0,28	0,22	0,16	Yeşil
Piruvik asit	0,38	0,45	0,52-0,65	Kahverengi

## S U M M A R Y

### *THE COMPARISON OF THE VARIOUS SOLVENT SYSTEMS IN THE CHROMATOGRAPHIC SEPARATION OF KETO ACIDS*

In this study, the chromatographic separations of two keto acids have been done by using various solvent systems. It was concluded that n-

Butanol-Ethanol-Water (Bu / Et / Wat) and (Isoprophanol - Ammonia - Water (Ipr/Am/Wat) were the most useful systems in our laboratory conditions.

## KAYNAKLAR

- 1- Colowick, P. Sidney and Kaplan. O. Nathan: Methods in Enzymology. Academic Press Inc., Publishers New-york 1957. Volume: 3, Section: 3. pp: 414-418.
- 2- Smith Ivor: Chromatographic and electrophoretic techniques. Printed in Great Britain At The Pitman Press, Bath, 1969. Third Edition. Volume: 1. Chapter: 14. pp: 330-341.