

SELÇUK UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

LYCOPODIUM CLAVATUM'DAN ELDE EDİLEN LİGAND-DEĞİŞTİRİCİ
REÇİNELERİN HAZIRLANMASI VE SIVI KOLON KROMATOĞRAFİSİNDE
KULLANILARAK NÜKLEOSİT, NÜKLEİK ASİT BAZLARI, AMİNLERİN
AYRILMASI VE KİNETİĞİNİN İNCELENMESİ

EROL PEHLİVAN

DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi

Bu çalışma, S.Ü.Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Öğretim Üyesi Pof. Dr. Salih Yıldız' ın danışmanlığında
tamamlanarak S.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsüne Doktora Tezi
olarak sunulmuştur.

Kasım, 1990

TEŐEKKÜR

Doktora çalıőmalarım sũresince reçinelerin hazırlanması ve kromotografi ayırma işlemlerinde bana metodlar tavsiye eden, karőılaőtıđım problemlerin özũmũnde yakın teővik ve desteklerini esirgemeyen Sayın Hocam Prof.Dr. Salih Yıldız'a sonsuz saygılarımı ve őũkranlarımı sunmayı burada bir kadirbilirlik olarak ifade etmeyi borç bilirim.

Ayrıca Kimya Bölũmũndeki yakın mesai arkadaşlarıma ve hocalarıma yardımlarından dolayı teőekkũr ederek, anmak istiyorum.

İ Ç İ N D E K İ L E R

	<u>Sayfa No:</u>
SUMMARY	I
ÖZET	II
I. GİRİŞ	1
II. İYON-DEĞİŞTİRME	2
II.1. İYON-DEĞİŞTİRME TEKNOLOJİSİ VE ÖNEMİ	3
II.2. İYON-DEĞİŞTİRİÇİ REÇİNELERİN ÖZELLİKLERİ VE YAPISI	6
III. LİGAND(ŞELAT)-DEĞİŞTİRME	8
III.1. LİGAND-DEĞİŞTİRME TEKNOLOJİSİ	8
III.2. LİGAND-DEĞİŞTİRME NEDİR?	10
III.3. LİGAND-DEĞİŞTİRME KROMATOGRAFİSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ	12
III.4. LİGAND-DEĞİŞTİRİCİLERDE FONKSİYONEL GRUPLAR	16
III.5. LİGAND-DEĞİŞTİRİCİLERDE MATRİKS SEÇİMİ VE ŞELATLAŞMA	17
III.6. KOMPLEKSLEŞME VE KOMPLEKS İYONLARIN OLUŞUMU	20
IV. SENTETİK REÇİNELER VE CHELEX-100 LİGAND-DEĞİŞTİRİCİ REÇİNESİ	22
V. TABİİ REÇİNELER-LYCOPODIUM CLAVATUM (SPOROPOLLENİN)	23
V.1. SPOROPOLLENİNİN İYON-DEĞİŞTİRİCİ OLARAK UYGUNLUĞU	26
VI. LİGAND-EXCHANGE KROMATOĞRAFİ'DE AYRILAN MADDELER VE AYIRMA İŞLEMLERİ	29
VI.1. KOLONDA AYRILAN MADDELER	29
VI.2. KOLON DOLGU MADDELERİ VE YÜRÜTÜCÜ FAZ	31
VI.3. AYIRMA İŞLEMLERİ	32

VII.	LİGAND-DEĞİŞTİRİCİ REÇİNELERİN HAZIRLANMASI VE AYIRMA İŞLEMLERİ	33
	++	
VII.1.	Cu YÜKLÜ KARBOKSİMETİL-SPOROPOLLENİN(Cu Yüklü KMDAE-Sporopollenin)	33
	++	
VII.2.	Ni YÜKLÜ KARBOKSİMETİLDİAMİNOETİL-SPOROPOLLENİN(Ni Yüklü KMDAE-Sporopollenin)	39
	++	
VII.3.	Co YÜKLÜ KARBOKSİMETİLDİAMİNOETİL-SPOROPOLLENİN(Co ⁺ Yüklü KMDAE-SPOROPOLLENİN)	45
	++	
VII.4.	Cu YÜKLÜ anti-DİAMİNOETİLGİOKSİM-SPOROPOLLENİN(Cu ⁺ Yüklü aDAEG-Sporopollen)	48
	++	
VII.5.	Ni YÜKLÜ anti-DİAMİNOETİLGİOKSİM-SPOROPOLLENİN(Ni ⁺ Yüklü aDAEG-SPOROPOLLENİN)	52
	++	
VII.6.	Co YÜKLÜ anti-DİAMİNOETİLGİOKSİM-SPOROPOLLENİN(Co ⁺ Yüklü aDAEG-SPOROPOLLENİN)	55
	++	
VII.7.	Cu YÜKLÜ bis-DİAMİNOETİLGİOKSİM-SPOROPOLLENİN(Cu ⁺ Yüklü b-DAEG-SPOROPOLLENİN)	59
VII.7.i.	DİFFERANSİYEL REFRAKTOMETRE İLE AYIRMA İŞLEMLERİ	61
VII.7.ii.	UV-SPEKTROFOTOMETRE İLE AYIRMA İŞLEMLERİ	66
	++	
VII.8.	Ni YÜKLÜ bis-DİAMİNOETİLGİOKSİM-SPOROPOLLENİN(Ni ⁺ Yüklü bDAEG-SPOROPOLLENİN)	68
	++	
VII.9.	Co YÜKLÜ bis-DİAMİNOETİLGİOKSİM-SPOROPOLLENİN(Co ⁺ Yüklü bDAEG-SPOROPOLLENİN)	71
VII.10.	p-klor BENZALDOKSİMDİAMİNOETİL-SPOROPOLLENİN(p-kBDAE-SPOROPOLLENİN)	74
	++	
VII.11.	Cu YÜKLÜ CHELEX-100 REÇİNESİ	79
	++	
VII.12.	Ni YÜKLÜ CHELEX-100 REÇİNESİ	81
	++	
VII.13.	Co YÜKLÜ CHELEX-100 REÇİNESİ	84
VIII.	KOLON ELÜSYONU ÜZERİNE ETKİ EDEN FAKTÖRLER	88
IX.	LİGAND-DEĞİŞTİRME KİNETİĞİ	98
X.	DENEY SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ VE TARTIŞMA	109
XI.	SONUÇ	122
XII.	KAYNAKLAR	125
XIII.	ÖZGEÇMİŞ	129

ÖZET

Fonksiyonel gruplar eklenerek yeni, modifiye edilen "Lycopodium Clavatum" tabii ligand-değiştiricisi sıvı kolon kromatografisinde kullanılarak nükleositlerin, nükleik asit bazlarının ve aminlerin hızlı bir şekilde ayırımı gerçekleştirilebilir. Lycopodium Clavatum'dan elde edilen ve tabii bir polimer olan Sporopollenin, pratik olarak sentetik reçinelere nazaran avantajlara sahiptir. Sporopollenin sabit tanecik büyüklüğüne sahiptir, kimyasal reaktiflere karşı kararlıdır, ticari olarak elde edilebilir ve sabit bir molekül sel yapıya sahiptir.

Biz bu çalışmamızda; Bakır, Nikel ve Kobalt yüklü fonksiyonlaştırılmış Sporopollenin reçinesinin ligand-değiştirme kromatografisinde, nükleositlerin, nükleik asit bazlarının ve aminlerin ayrılmasında kullanılabilme imkanlarını araştırdık.

Sporopollenin, 1,2 diaminoetan ile muamele edilerek aminleştirilir ve bromoasetik ile reaksiyona tutularak karboksidiaminosporopollenin elde edilir. DAE-Sporopollenin anti-klorglioksim ve antidiklorglioksimle reaksiyona tabii tutularak anti-DAEG-Sporopollenin ve bis-DAEG-Sporopollenin reçinesi elde edilir. Elde edilen farklı bu reçineler metal yüklü hale getirilir. Bu şekilde geçiş elementi olan Cu^{++} , Ni^{++} ve Co^{++} , ligand-değiştirici kalıbına sabitleştirilir.

Mevcut çalışmada, Bakır-, Nikel-, ve Kobalt- yüklü Chelex-100 reçinesi ligand değiştirici olarak kullanılarak nükleositlerin ve nükleik asit bazlarının ayrılması tamamlanmıştır. Tabii reçine, Sporopollenin, ve sentetik reçine, Chelex-100, kromatografi kolonlarında kullanılarak elde edilen sonuçlar karşılaştırılmıştır.

Eluant akış hızı, eluant konsantrasyonu, kolon yüksekliği ve ligand konsantrasyonunun kromatografik ayırmalar üzerine etkisi çalışılmıştır.

Tabii ligand-değiştirici reçinedeki ligand-değişim kinetiği incelenmiştir. Hız ölçümleri, pH metre tekniğiyle yapılarak reaksiyon kinetik parametreleri bulunmuştur. Reaksiyon başlangıcında, reaksiyon hız kontrol adımı, reçine ile şelat oluşturan ligandlarla olan kimyasal değişim reaksiyonu olduğu tesbit edilmiştir. Reaksiyon ligandların sıkı bağlanışına bağlı olup karıştırma hızıyla etkilenmemiştir.

SUMMARY

Rapid separation of nucleotides, nucleic acid bases and amines can be carried out by liquid column chromatography, using new modified "Lycopodium Clavatum". Sporopollenin obtained from Lycopodium Clavatum, a natural polymer has important practical advantages over syntetic resins. It has constant mesh size, it is stable to chemical reagents, it is commercialy available and has a constant molecular structure.

We search here that ligand-exchange chromatography on Copper-, Nickel- and Cobalt- loaded functionalized Sporopollenin can be a useful alternative method for the separation of nucleotides, nucleic acids and amines.

Sporopollenin was aminated by the treatment with 1,2 diaminoethane and treatment with bromoacetic acid gave carboxylated diaminosporopollenin. Treatment of DAE-Sporopollenin with anti-chloroglyoxime and anti-dichloroglyoxime gave anti-DAEG-sporopollenin. These obtained different types of resin were converted to the metal-loaded form. So that transition elements such as Cu^{++} , Ni^{++} , and Co^{++} were immobilized on the ligand-exchanger lattice.

At the present study, it has been completed the separation of nucleotides and nucleic acid bases by using Copper-, Nickel-, and Cobalt- loaded Chelex-100 as a ligand-exchange medium. The results obtained by using synthetic Chelex-100 resin and natural Sporopollenin resin were compared with each other.

The effect of the flow rate of the eluant, the concentration of the eluant, the column height and the concentration of ligands on the chromatographic separations were investigated at this study.

The kinetics of the exchange of ligands in natural ligand-exchange resin has been searched. The rate measurements have been made by pH meter technique and kinetic parameters of the reaction were determined. The rate controlling step at the beginning of the reaction, has proved to be the chemical exchange reaction for ligands giving a chelate with the resin. The reaction was found to be depend upon how tightly the ligands bind and it was unaffected by the stirring rate.

I. GİRİŞ

Ligand-değiştirme kromatografi alışmaları organik, inorganik ve biyokimyasal maddelerin saflaştırılmasında ve ayrılmasında, son yıllarda önemi hızla artan bir metod olmuştur. Maddelerin, fiziksel ve kimyasal özelliklerinden faydalanarak birbirinden ayrılması, iyon-değiştiriciler kullanmak suretiyle gerçekleştirilebilir.

Ayırma metotları; mekanik ayırma, hız farkıyla ayırma ve denge ile ayırma olarak e ayrılır. İyon- ve ligand-değiştirme çalışmaları denge ile ayırma işlemleri sınıfına girmektedir. Ligand-değiştirme işlemlerinde ayırıcı faz katı reçinedir. Kolona ayırılmak istenen karışımlar sıvı halde injekte edilir. Kolondan yürütücü ve sökücü faz olarak uygun eluantlar kullanarak ayırma işlemleri gerçekleştirilir.

Son yıllarda sentetik ve tabii reçineler ile ilgili değişik çalışmalar yapılmaktadır. Bu tezin amacı bitki sporlarından elde edilen, mukavemeti büyük olan Lycopodium-Clavatum'a uygun fonksiyonel gruplar eklemek suretiyle yeni ligand-değiştiriciler elde etmek ve bu ligand-değiştiricileri sıvı kolon kromatografisinde kullanarak bazı organik ve biyokimyasal maddelerin ayrılmasını gerçekleştirmek, ayırma üzerine etki eden kolon parametrelerini incelemek; kinetik çalışmalar yapmak ve ayrıca bu yeni tabii ligand-değiştirici reçineleri, sentetik

reçinelerden olan Chelex-100 reçinesi ile karşılaştırmaktır.

Lycopodium-Clavatum'a diaminoetan, asetat ve glioksim fonksiyonel grupları takılarak elde edilen yeni reçinelere, geçiş metallere olan Cu^{++} , Ni^{++} ve Co^{++} yüklenerek kompleks yapı kazandırılmıştır. Elde edilen bu yeni Cu^{++} , Ni^{++} ve Co^{++} yüklü ligand-değiştirici reçinelerle nükleositlerin, nükleik asit bazlarının ve aminlerin ayırılması sağlanmıştır.

II. İYON-DEĞİŞTİRME

İyon-değiştirme ile ilgili çalışmaların başlangıç tarihi tam olarak bilinmemektedir. Bilim adamları iyon-değiştirme başlangıcının Hz.Musa A.S.'a dayandığını söylemekte. Hz. Musa A.S. çölde bulunan Mara şehrinin acı sularını yumuşatarak içilebilir tatlı su haline getirmiştir(1). Eski kaynaklara göre iyon değiştiriciler ile ilgili diğer bir deneme, Aristotle'nin çalışmalarında bazı kumlardan, tuzlu suların bir kaç defa geçirilmesi ile su içerisinde bulunan tuz miktarının azaldığını tesbit etmesidir(2). Bu çalışma halkası 1850-1852 yıllarına, Thompson ve Way'e kadar devam etmiştir(3). Endüstrileşme ile birlikte iyon-değiştirme teknolojisi, tabii ve sentetik inorganik reçineler üzerine ilginin artmasına doğru kaymıştır. Diğer önemli buluşlar, 1940 yılında I. G. Farben Industrie tarafından Almanya'da Wofatit adlı reçinenin elde edilmesiyle gerçekleşmiştir. II. Dünya savaşı sırasında

Manhattan projesi ile iyon-deđiřtirme teknolojisi nadir toprak elementlerinin ve fizyon ürünlerinin ayrılmasına kaymıřtır(4). Savař sonrası yapılan ilk önemli sentetik rećineler sitiren-divinil benzen polimeri(5) temeline dayanılarak yapılan kuvvetli-baz anyon deđiřtiricilerden olan kuarternler amonyum gruplu rećinelerdir(6). Diđer iki önemli yenilik ise zeolitler halindeki inorganik iyon-deđiřtiriciler ve büyük gözenekli sentetik rećinelerin yapılmasıdır(7). İyon-deđiřtirme olayı topraklarda ve bir çok biyolojik proseslerde tabii haliyle mevcuttur.

II. 1. İYON-DEĞİŞTİRME TEKNOLOJİSİ VE ÖNEMİ

İyon-değiştirme tekniğinin gelişmesine neden olan temel kaynaklardan birisi su'dur. Susuz hayat düşünülemez. Suyun temizlenmesi çok önemli olup, saf su bir ihtiyaçtır. İyon-değiştirme teknolojisine giriş, Arap yarım adasındaki suların temizlenmesi ihtiyacıyla başlamıştır.

Endüstrileşme ile birlikte buhar istasyonları için kullanılan kazan besleme sularının temiz olması, nükleer teknolojideki suların arıtılması işlemleri, uzay teknolojisi ile birlikte minyatür elektrik güç istasyonları için, suyun temizlenmesi çok önemli hale gelmiş olup iyon-değiştirme olayının önemini artırmıştır. Günümüzde yeni kıymetli kaynakların keşfine ve çevreyi korumaya ihtiyaç duyulmaktadır.

Bir çok alanda, iyon-değiştirme teknolojik

gelişmeye direk etki edip, kimya, mühendislik ve biyoloji içerisine yeni görüşler getirmiştir. Biyokimya, biyofizik bilim dallarında canlı membran içerisine nakil, Teorell(8), K.M. Meyer(9), ve Schlogl(10) gibi bilim adamlarının öncülüğünde gelişmesini, iyon-değiştirme olayına borçludur. Günümüzde böbrek makinesi olarak çalışan diyalizler iyon-değiştirme teknolojisine dayanır. Bugün petrolün yer altından çıkarılması olayı, bir iyon-değiştirme teknolojisi olup, rezervuar akışkan ile kil arasındaki iyon-değiştirme olayıdır.

İyon-değiştirme prensip olarak kimyasal ayırmalar için iyi bir metottur. Önceleri nadir toprak elementlerinin ayrılması imkansız gibi görülürken şimdi iyon-değiştiriciler vasıtasıyla optik ayırmalar bile mümkün hale gelmiştir(11).

İyon-değiştiricilerin en önemli uygulamalarından birisi de katalizleme olayıdır. Birçok organik kimya reaksiyonu, çözültideki iyonlar tarafından katalizlenir. Sakkarozun hidrojen iyonları ile katalizlenerek inversiyona uğrayarak çok fazla miktarda glikoz ve früktoz vermesi buna örnek olarak gösterilebilir. Bugün, iyon-değiştirme ile katalizleme özel bir önem kazanmıştır. Otomobil benzinlerinde katkı maddesi olarak kullanılan tetraetil kurşun etkili bir şekilde vuruntuyu önlemektedir. Diğer bir örnek ise alümina-silikatlar(zeolitler) üzerinden gaz fazında, hidrokarbon ürünlerinin katalitik olarak parçalanmasıdır. İyon-değiştiricilerin, iyon-katalizleme reaksiyonlarında kullanılması ilgi çekicidir. Heterojen

kataliz içerisine çözelti içerisindeki homojen katalizin bir iyon değiştirici ile taşınması, seçimli ve etkili katalizlemenin gelişmesini sağlamıştır. Örneğin, katı katalizleme öyle yapılabilir ki sadece küçük molekülleri kabul edip, büyük molekülleri kabul etmez veya belli şekildeki molekülleri kabul edip, diğerlerini kabul etmiyerek bünyesine alacağı molekülleri seçimli bir şekilde katalizler(12).

İyon-değiştiricilerin diğer yeni bir uygulaması da dezinfektanlardır. Reçineler, bakterileri kuvvetlice tutma yeteneğine sahip olup anti bakteri grubu olan quarternner amonyum iyonları veya diğer fonksiyonel gruplar ihtiva ederler(13).

İyon-değiştiricilerin diğer bir kullanılışı ise organik sentezler içinde kalıp görevi yapmasıdır. Burada uygun fonksiyonel gruplarla donatılan bir katı, istenilen bir reaksiyon için, bir reaktantın, bir başka ajanı doğru kofigürasyon ve yer içerisinde tutması için kullanılır. Katı faz peptit sentezi olarak isimlendirilen bu olayın homojen çözeltilerdeki sentezleme alanında büyük avantajları vardır. Böylece proteinlerin sentezinde çok yüksek verim elde edilir(14).

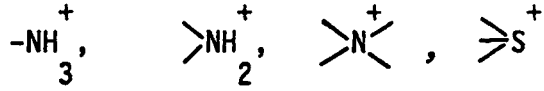
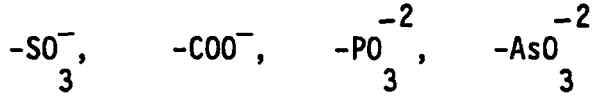
İyon-değiştirici reçineler, son yıllarda kimyanın hemen her dalında başarıyla kullanılmıştır. Bugün, özel amaçlar için laboratuvarlarda, rafinerilerde, katalizlerden organik sentezlere kadar, biyomedikal uygulamalarda, kimyasal analizlerde ve buna benzer birçok önemli sahada kullanılabilen, geliştirilmiş özel organik ve

inorganik reçineler yapılmış ve hâlâ yapılmasına devam edilmektedir. Reçineler konusunda; kolon elüsyon hızının, kolona verilen numune miktarının, iyon-değiştirici iskeletinin, eluant içerisindeki kompleksleşmenin tabiatındaki değişiklikler üzerinde çalışmalara devam edilmektedir.

II.2. İYON-DEĞİŞTİRİCİ REÇİNELERİN ÖZELLİKLERİ VE YAPISI

İyon-değiştirme; katı ve sıvı faz arasındaki iyonların tersinir bir şekilde yer değiştirmesi olarak tanımlanır. Bir iyon-değiştirici reçinenin çalışma prensibi; hareketli faz olan ve zıt iyonlar taşıyan faz ile, sabit yüklü gruplar ihtiva eden çözünmeyen maddeler arasındaki elektrik yüklerinin dengelenmesi şeklindedir.

Birçok farklı tabii ve sentetik reçine iyon değiştirme özelliği gösterir. Mineral iyon-değiştiriciler, iyon değiştirici kömürler, sentetik inorganik iyon-değiştiriciler örnek olarak gösterilebilir. Bunlar arasında en çok kullanılanları organik iyon-değiştirici reçinelerdir. Bu tip reçinelerin iskeleti üç boyutlu hidrokarbon zincirlerinden oluşan matrikslerdir. Bu matriksler aşağıdaki iyonik grupları taşırlar.



İyon-değiştirici rećineler temelde iki sınıfa ayrılırlar.

1. Katyon dećiřtirici rećineler

- a) Kuvvetli asidik katyonlar
- b) Zayıf asidik katyonlar

2. Anyon dećiřtirici rećineler

- a) Kuvvetli bazik anyonlar
- b) Zayıf bazik anyonlar

Kuvvetli asidik katyon dećiřtirici rećineler sitiren-divinilbenzenin slfonlařtırılmıř kopolimerleridir. Slfrk asit, slfrtrioksit ve klorosulfonik asit, slfolama reaksiyonu için kullanılabilir. Zayıf asidik katyon dećiřtirici rećineler akrilik veya metakrilik asitlerin, divinil-benzen gibi iki fonksiyonlu guruplarla baćlanmasıyla veya fenolik, ve fosfonik gurplardan yapılabilirler.

Kuvvetli baz anyon dećiřtirici rećineler sitiren-divinilbenzen kopolimerinin, klorometil-metil eter ile, kloro metilasyon reaksiyonundan sonra trimetilaminin reaksiyona girmesiyle elde edilir. Zayıf baz anyon dećiřtirici rećineler, aminlerin, sitiren-divinil kopolimerine baćlanmasıyla elde edilirler.

III. LİGAND(ŞELAT)-DEĞİŞTİRME

"Ligand-değişirme" terminolojisi ilk olarak 1961 yılında F.G. Helfferich(15) tarafından, Walton ve Stokes'un(16) 1954 yılındaki araştırmalarından faydalınarak ortaya atılmıştır. Helfferich bakır(II) yüklü karboksilik kation-değişirici reçine kolonları kullanarak sulu çözeltilerde 1,3 diaminin absorplanmasını sağlamış ve kolonu amonyak çözeltisi ile rejenere etmiştir(17). Ligand-değişirici reçinelerin diğer uygulamalarına alifatik aminlerin, diaminlerin ve hidrazinlerin ayırılmasıyla devam edilmiştir(18,19).

Ligand-değişirme kromatografisinde sulu ortamda bulunan aminler, amino asitler, ve bunlara benzer ligandlar katı gövdeye tutturulan geçiş metalleri ile kompleksleşme yaptırılarak çok iyi ayırmalar yapılmıştır(15).

III.1. LİGAND-DEĞİŞTİRME TEKNOLOJİSİ

Organik çözeltilerindeki bileşenlerin ayrılması ve saflaştırılması için ligand-değişirme kromatografisi son yılların popüler konusu olmuş olup, bu konudaki çalışmalar artmaya başlamıştır, bu da bize bu konunun önemini gösterir. Yaklaşık 15 yıldan beri ligand-değişirme kromatografisi,

saflaştırma konusunda ortaya çıkan birçok problemin çözümünü kolaylaştırmıştır. Bundan başka ligand-değiştirme kromatografisi kinetik değişmeye meyilli karışımların araştırılması için güçlü ve güvenilir bir metod olmuştur.

Nadir toprak elementlerini ayırmada ortaya çıkan en büyük zorluk; dış elektron kabuklarındaki benzer yapıdan dolayı, kimyasal ve fiziksel özelliklerindeki benzeşlerdi. Bir elementten diğer bir elemente değişen ayırıcı özellikler; atomik çap ve bunu izleyen bu elementlerin şelat yapıcılarla olabilecek kompleksleridir. Bu özellik iyon değiştiricilerde şelat yapıcılar kullanma fikrini geliştirmiştir. Daha sonraki yıllarda şelatlaşma yanında kullanılacak olan elüsyon çözeltilerin önemi artmış ve şelat reçinelerinde hangi çeşit eluant kullanılması gerektiği üzerindeki çalışmalar yoğunluk kazanmıştır. Eluant, kolondan ayrılmak istenen maddeler ; bir piston hareketi şeklinde çıkarmaktadır. Eluant seçimindeki gelişmeler ayırma piklerinin de istenilen piklerin elde edilmesini sağlamıştır. Aynı ayırma işleminde aynı reçinede kullanılan aynı eluanttaki pH değişimlerinin bile ayırma üzerine etkisi büyük olmuştur.

Ligand-değiştiricilerin ilk kullanım dönemlerinde bir kompleks yapıcı ile çözelti içerisindeki iyonların kompleksleri yapılıyordu. Sonraları, kompleks yapıcılar iyon-değiştirici üzerine yerleştirmek daha etkili olduğu için şelatların çözelti içerisine değil reçine üzerine oturtulması tercih edilmiştir. Bu düşünceyle yeni reçine geliştirme çabaları başlamıştır. Dowex-A1 gibi özel amaçlı karboksilat gruplu sentetik reçinelerin üretilmesine

geçilmiştir. Karboksilat grupları hidrojen iyonlarıyla metal katyonlarını kuvvetli bir şekilde tutarlar.

Ligand-değiştiriciler, değişik fonksiyonel gruplarla kompleks teşkil eden metal iyonlarını taşıyan maddelerdir. Bugün, ligand-değiştiriciler, standart bir kromatografik teknik haline gelmiş olup, aminlerin, amino asitlerin, v.b. ayırılmasında kullanılmaktadır.

Ligand-değiştirme, kromatografi tekniğinde kullanılmaya başlamasından sonra biyokimyacılar kendi amaçları için tekrar yeni denemeler yaparak "Metal Şelat Affinite Kromatografisi" adı altında yeni çalışmalara başlamışlardır(20). Şelat reçineler ve ligand-değiştirme olayı iyon-değiştirmenin kimyasal reaksiyonlarla kompleks teşkil ettirmesini amaçlayan genel bir düşüncenin sonucudur.

III.2. LİGAND-DEĞİŞTİRME NEDİR?

Ligand-değiştirme kromatografisi, bir katı destek içine oturtulan kompleksin parçası olan bir molekülün, farklı bir molekülün veya iyonun bu komplekse girmesi ve daha kararlı bir kompleks oluşturmasıyla bu molekülün serbest hale geçmesi olayıdır. Diğer bir ifadeyle ortamın değişmesiyle kompleksin dağılarak bir molekül veya iyonun kurtulup yerine bir başkasının geçmesidir.

Ligand-değiştirme kromatografisi(LEK), iyon-değiştirme, adsorpsiyon, kararlı faz ve tutulacak maddelerin türüne göre farklıdır. Kompleks oluşturan metal iyonu,

koordinasyon küresi vasıtasıyla sabit halde tutturulur. Burada ligand-değiştirme metalin merkezi iyonuna bağlı bulunan ligandların yer değiştirmesidir.

LEK'deki tutan ve tutulanların, yapısı ve etkisi iyi kavranılabılırsa LEK'e daha yeni boyutlar getirilebilir. LEK metal iyonunun sabit faza yerleştirilmesine veya metal iyonunun değişken faz tarafından hareket ettirilmesine bağlı olarak ikiye ayrılır:

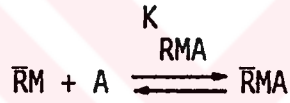
- 1) Ligandların kromatografisi
- 2) Komplekslerin kromatografisi

Birinci durumda metal iyonu sabit bir kompleks olan RM'yi oluşturmak için elektrostatik, koordinasyon veya başka bağlar vasıtasıyla sabit faz tarafından tutulur. Eğer bu metal iyonun koordinasyon küresi doyurulmazsa (genelde serbest koordinasyon uçları geğici olarak zayıf bağlı solvent yada eluant molekülleri tarafından doludur) hareketli faz eluantında bulunan farklı ligandları tersinir bir şekilde absorplar. Kromatografik kolonda ligandlar koordinasyon iyon kürelerine girme yeteneklerine göre çözünürler.

İkinci durumda kompleks oluşturan metal iyonu katı fazda yer almış ligandlardan daha çok, hareketli fazdaki erimiş ligandlara kuvvetli bağlıdır. Bu yüzden hareketli faz genellikle aynı merkezi metal iyonuyla çeşitli kompleksleri içine alır. Bu tür LEK, iyon-değiştirici kromatografiden farklıdır. Burada kompleksin koordinasyon halkasına giren fonksiyonel gruplar kalıcı ligandlar şeklinde(21).

III.3. LİGAND-DEĞİŞTİRME KROMATOĞRAFİSİNİN GENEL ÖZELLİKLERİ

Bütün kromatografik prosesler adsorpsiyon olayı esasına dayanır. Tutunma olayı koordinasyon bağlarının teşekkülü sebebiyle LEK içerisinde yer alır. A, B şeklindeki iki ligandın M geçiş metali yüklü şelatlandırılmış \bar{R} reçinesine tutunması, $\bar{R}M$ şeklinde kararlı bir kompleks koordinasyon küresi oluşturur. Bu proses:



Şeklinde gösterilebilir.

LEK, sadece değişken ligandla sabit faza etkisinin tersinir bir işlem olduğu sistemlerde mümkündür. Koordinasyon bağları kendiliğinden kırılabilir ve yeniden oluşmalıdır, yani tutunan kompleksler kinetik olarak değişebilir olmalıdır.

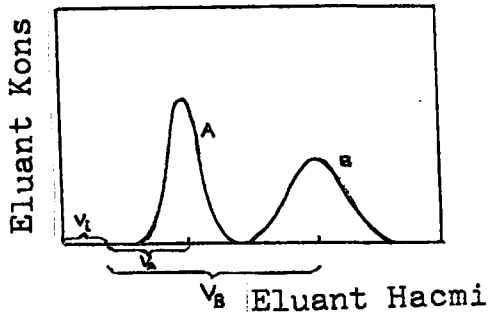
Denge şartları altında, A ve B ligandları, oluşan tutunmuş komplekslerin dengelerine göre değişken ve katı fazlar arasında tamamen dağılır. Ayırma esnasında oluşmuş olan bu komplekslerin kararlılığı ne kadar fazla olursa, kromatografinin seçiciliği de o kadar yüksek olur. İdeal durumda ligand A ve B aynı andaki elusyonuyla, kolonun

seçiciliği(a), tutunan komplekslerin oluşma oranlarına eşittir(22).

$$a = \frac{V_B}{V_A} = \frac{K_{RMB}}{K_{RMA}}$$

Pratikte seçicilik: Tutucu yapı zincirlerinin karşılıklı düzenlenmesinden, çözücünün metal iyonlarına kısmi koordinasyonundan, eluant moleküllerinden ve diğer faktörlerden etkilenebilir.

LEK'in temeli kompleks meydana getirmedir. Yüksek seçici özelliğinden dolayı, fiziksel adsorpsiyon ve iyon-değiştirme işlemlerinden büyük ölçüde farklı olan bir prosestir. Halbuki yüklü parçacıkların elektrostatik kuvvetlerle etkileşimi, belli bir sterik yönden mahrumdur. Tanecikler arasındaki mesafe üzerindeki ciddi ihtiyaçlara cevap vermez. Elektron veren ligand gruplarının bir kompleks içerisinde, merkezi metal iyonu ile olan etkileşimi yalnız belli bir yönde ve sıkıca yerleştirilmiş uzaklıkta oluşur. Aşağıdaki grafikte görüldüğü gibi:



Kompleks teşekkülünün bir özelliği, ligand-değiştirme teknikleri kullanılarak yapılarında büyük ölçüde fark bulunan ligandları ayırmak için değil, aynı zamanda benzer özelliklere sahip karışımların iyi bir şekilde ayırılmasını sağlar. Geometrik durumdaki izomerler, izotoplar ve optik izomerler bunlara örnektir.

Ligand-değiştirme kromatografisinin avantajları şunlardır:

a) Oluşan komplekslerin yüksek kararlılığı sebebiyle, tutucular (sorbentler) çözelti içinde tuzlar ve elektrolit olmayan maddeler olmasına rağmen hareketli fazdaki ligandları seçici bir şekilde tutabilirler. Bu yolla, ligand tutma donör grupları bulunmayan her tür maddeden kompleks teşekkül edebilen bileşenlerin ayrılması için ve sulu ligand çözeltilerin konsantre edilebilmesi için kullanılabilir.

b) LEK esnek bir prosestir. Çünkü kompleks oluşturan özelliklere sahip olan metal seçim aralığının geniş olması, tutulacak maddelerin özelliğine göre geçiş elementinin seçme imkanını artırır.

c) Farklı koordinasyon değerli ligandların ayırımında, bu ligandların tutucular ile etkileşim seçiciliği, ayarlanabilir veya çıkan çözeltideki ligandların toplam konsantrasyonlarını değiştirmek suretiyle kolayca tersine çevirebilir.

LEK ligand-değiştirme kromatografisi: Kompleks teşkil eden katyonla ligand özelliği gösteren tutulacak maddeler

arasında değişebilen kompleks oluşunu ile ilgilidir. Bu gerçekten yararlanılarak; $\overset{++}{\text{Cu}}$, $\overset{++}{\text{Ni}}$, $\overset{++}{\text{Co}}$, $\overset{++}{\text{Zn}}$ gibi geçiş elementlerini ihtiva eden iyonlaşan veya şelatlaşan katyon-değişiciler yapılmıştır. Burada kompleks teşkil eden iyon katı kararlı sabit faz içerisine iyonik, kovalent veya koordinasyon bağlarıyla bağlanıp sabitleştirilmiştir. Bazı koordinasyon uçları hala serbest olacaktır ve ligandlar koordine metalle birleşeceklerdir. Eğer farklı ligandlar bu metaller için farklı ilgiye sahipse bu ligandların kolondan aşağıya sürükleme hızlarıda farklı olacaktır, bundan dolayı ayırma meydana gelecektir. Örnek olarak sulu çözeltilisinde $\overset{++}{\text{Cu}}$ katyon değiştiricisiyle tutulan amonyağı göz önüne alalım üstü çizilmiş maddeler kararlı fazı gösterir(23).



Amonyak ve su farklı ligandlarla yer değiştirilebilir. Bu ligandlar, aminler, amino asitleri, nükleosidler, nükleik asit bazları, alkoller ve karboksilik asitler gibi birçok serbest elektron çifti bulunan maddeler olabilir. Eğer L tek dişli bir ligand ise:



Ligand-değiştirici reçinelerin seçimi ligand gruplarının bir, iki veya çok dişli olmasıyla ilgilidir. Seçici ligand-değiştiricilerde aşağıdaki özellikler

istenir(24):

1. Çapraz bağı olmaması veya az olması
2. Kopolimer üzerinde maksimum sayıda aktif fonksiyonel grupların olması
3. Aktif fonksiyonel gruplar üzerinde aktif donör atomların sayısının çok olması
4. Metalin liganda ilgisinin fazla olması
5. Metal-ligand bağlarının çok kuvvetli olması

Metal iyonlarının çözelti içindeki aktivitesi ise:

- 1) İyonun elektronik konfigürasyonuna
- 2) Metal-iyonunun iyonik çapına
- 3) Ligandların veya metal iyonlarının asit-baz durumuna bağlıdır.

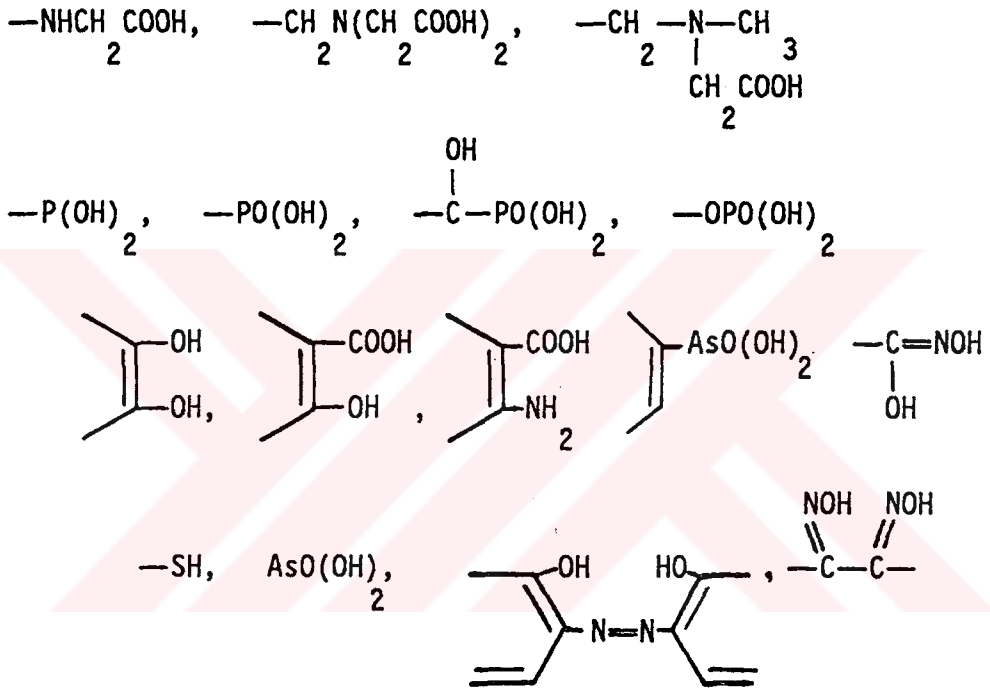
S ve P orbitalindeki elektronlara sahip iyonlar (alkali ve toprak alkali metaller) kimyasal reaksiyonlarında sınırlı bir değişirme gösterirken, d ve f orbitallerinde elektron bulunduran metaller kompleks davranışlar gösterirler(25).

III.4. LİGAND-DEĞİŞTİRİCİLERDE FONKSİYONEL GRUPLAR

Ligand-değişirici reçinelerde fonksiyonel gruplar, değişirici küresinde elektron verici olarak görev yaparlar. Koordinasyon yapan kopolimerler, metallerle koordinasyon bağı yapmaya yeteneği olan ve bünyesinde bir donör atomu taşıyan fonksiyonel gruplar ile kovalent bağlar yaparak

polimere bağlanmışlardır(26). Koordinasyon iyon-değiştirmeyle sağlanır ve bu kopolimerler özel ve seçici ligand-değiştiriciler olarak kullanılır.

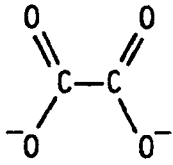
Fonksiyonel gruplar içinde elektron verici görevi yapan elementler; oksijen, azot, kükürt, fosfor ve arseniktir. Aşağıda bazı fonksiyonel gruplar gösterilmiştir:



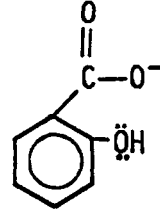
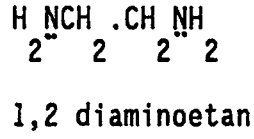
III.5. LİGAND-DEĞİŞTİRİCİLERDE MATRİKS SEÇİMİ VE ŞELATLAŞMA

Ligandların çoğu bir katyon ile koordinasyon bağı oluştururlar. Bunlardan bir koordinasyon bağı oluşturan ligandlara tek dişli ligandlar denir ve tek bir dişle kendilerini merkez metal katyonuna tuttururlar. Bazı durumlarda ise her bir ligand molekülü merkez metal

kationuna birden fazla dişle tutunurlar. Bu tip liganlara çok dişli ligandlar denir. Aşağıda gösterilen maddeler çok dişli ligandlara birer örnektir:

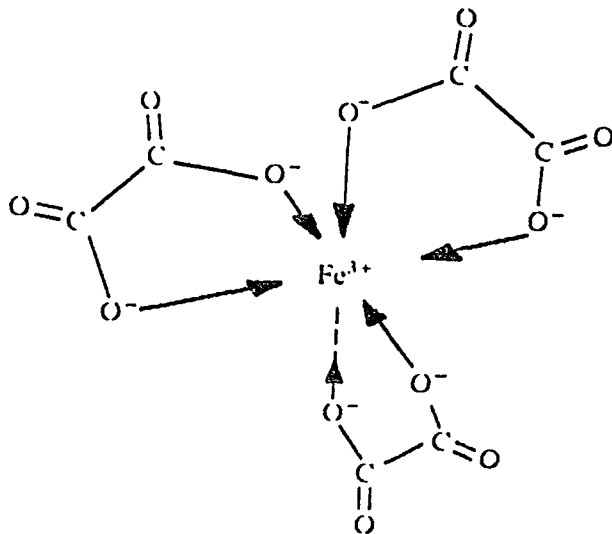


okzalat

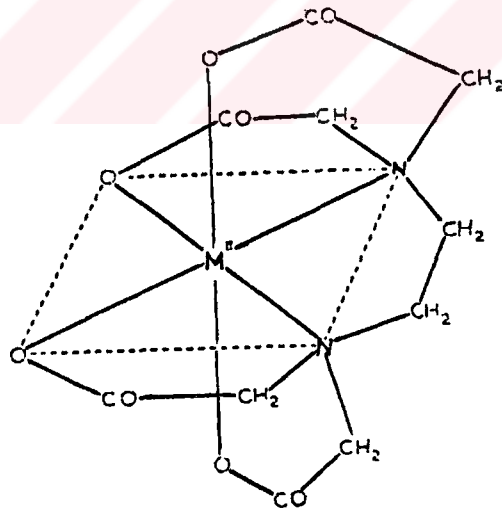


Salisilat

Bazı ligandlar ise (etilendiamin tetraasetat gibi) merkezi iyonla altı dişle yani çok dişle bağlanabilir. Çok dişli ligandlar ve kationlar arasında teşkil eden bu kompleks iyonlara şelat kompleksleri denir. Bu tür komplekslerde ligandlar, metal iyonu üzerine kısıkaç gibi tutunurlar. Aşağıdaki şekilde demir(III) ve oksalat iyonları arasında oluşan şelatlaşma görülmektedir(27).



Genelde çok dişli ligandlar tek dişli ligandlardan daha güçlüdür. Çok dişli ligandlar metal iyonuna akrep kısıkağı gibi tutunurlar. Metal iyonlarını tutan katı desteğin ve şelatların seçimi çok önemlidir. İki dişli ligandlar metal iyonlarını bağlama yönünden zayıftırlar. Üç dişli ligandlar ise metalleri bağlama açısından uygundur. İki dişli ligandların tutmuş oldukları metaller eluantla söküldükleri halde üç dişli ligandlar için böyle bir durum söz konusu değildir. Metaller kolondan eluantla birlikte sürüklenmezler. Bu olay göz önüne alınarak fonksiyonel gruplar seçilirken üç dişli ligandlar veya çok dişli ligandlar tercih edilir.

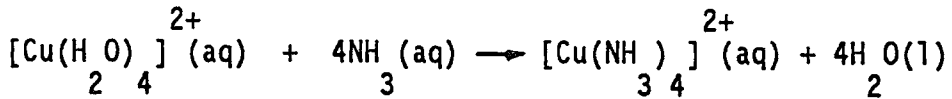


EDTA Şelatı

Reçineleri tutan ligandların(şelatların) kuvvetli metal koordinasyon kompleksi teşkil etmesi yanında, görünür ışığı tamamen geçiren özelliğede sahip olması gerekir. Ni⁺⁺, Co⁺⁺ ve Cu⁺⁺ gibi metal iyonları adsorpsiyonu ve desorpsiyonu göz yardımıyla kolayca takip edilebilir. Böylece kolondan sızmalar görülebilir(21).

III.6. KOMPLEKSLEŞME VE KOMPLEKS İYONLARIN OLUŞUMU

Kompleks reaksiyonları, metal katyonları ile farklı ligandlar arasındaki ilgidir. Fazla miktardaki amonyak çözeltisi, sulu bakır(II) sülfat çözeltisine eklenirse, amonyak çözeltisi su ile yer değiştirir yani hidratlanmış bakır(II) iyonlarındaki su molekülünün yerine geçerek [Cu(NH₃)₄]²⁺ kompleksleri meydana getirir. Yer değiştirme şöyle olur.

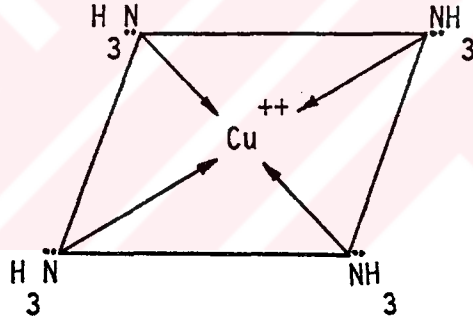


Bu durumda amonyak sudan daha güçlü bir ligand gibi davranır. Genelleştirme yaparsak kuvvetli ligandlar daha az kuvvetli ligandlarla yer değiştirir.

Kompleks iyonlar, metal iyonlarının anyonlar veya serbest elektron çifti bulunduran maddelerle çevrelenmesinden meydana gelen ligandlardır. Geçiş metal komplekslerinde, üzerinde bağ yapmamış elektron çifti

bulunduran ligandlar, merkezi kationla koordinasyon bağları meydana getirirler. Bu ortaklanmamış elektron çiftleri geçiş metallerinin boş orbitallerine girerler. Merkezi iyonla ligandların meydana getirdiği koordinasyon bağ sayısına koordinasyon sayısı denir. Cu^{++} iyonları $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_4]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_4]^{2+}$, $[\text{CuCl}_4]^{2-}$ ve $[\text{Cu}(\text{NH}_2)_4]^{2+}$ komplekslerinde dört koordinasyon sayısına sahiptir.

6 koordinasyon sayısına sahip kompleksler oktahedral pozisyonundadır. Sadece bakırın çok az kompleksleri kare düzlem yapısındadır. Bunlar $[\text{Cu}(\text{H}_2\text{O})_2]^{2+}$, $[\text{Cu}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ gibi komplekslerdir. Koordinasyon sayısı iki olan kompleksler ise lineer düzlemedir.



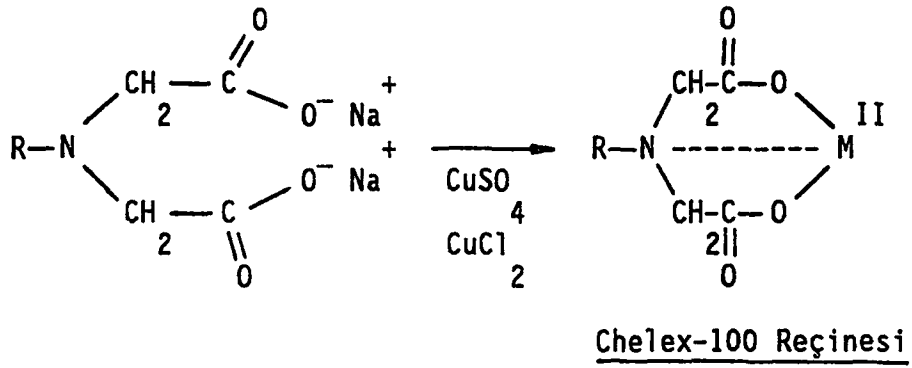
Her ligand en azından bir çift elektronlu atomdan ibarettir. Bu elektronları koordinasyon bağı oluşturacak merkez kationuna verirler. Ligandlar merkez iyonuna koordine edilmişlerdir.

IV. SENTETİK REÇİNELER VE CHELEX-100 LİGAND-DEĞİŞTİRİCİ REÇİNESİ

Chelex-100 reçinesi metal iyonların bağlanmasıyla şelat halkası meydana getiren iminodiasetat fonksiyonel grupları ihtiva eden stiren-divinilbenzen polimerlerinden oluşan sentetik bir reçinedir. Chelex-100 reçinesi Na⁺ atomuna bağlıdır. "R" stiren-divinilbenzen birlikte polimer matriksidir(28).

Bu reçine ile asidik çözeltiler çalışılırsa, reçine azot atomu üzerinden anyon-değiştirici gibi davranır ve klor bileşikleri ile çalışmalar yapılabilir. Chelex-100 reçinesine bakırın tutunması ile iki farklı değiştirme reaksiyonu oluşturulabilir. Konsantre asidik çözeltilerde anyon değiştirici gibi ve diğer çözeltilerde ise yavaş değiştirici tiplerinden olan ligand-değiştiriciler gibi kullanılabilir(29).

Bu reçine değişik büyüklüklere sahip olup küresel şekildedir. Bu reçinenin 200-400 mesh büyüklüğünde olanı ligand-değiştirme işlemleri için çok uygundur. Farklı ayırmalar için farklı büyüklükteki Chelex- reçineleri kullanılabilir. Bu reçine çok yüksek konsantrasyonlu çözeltilerde kullanıldığı zaman metal iyonu sızıntısı olabilir.



V. TABİİ REÇİNELER-LYCOPODIUM CLAVATUM(SPOROPOLLENİN)

Sporopollenin tabii olarak meydana gelen ligand-değiştirici kromatografide kullanılabilen yeni alternatif bir ligand-değiştiricidir. Sporopollenin birçok pollen taneciklerin ve mikro sporların dış yüzeyi olan exine'ni oluşturan maddedir.

Sporopollenin tabii bir madde olup dış etkilere karşı büyük bir dirence sahiptir. Sporopollenin, spor kaynaklarının dış kısmında kalan zarar görmemiş hücre zarlarında olduğu gibi 500 milyon yıldan beri eskimiş tortular ve kayalar üzerinde yaşayan canlılardan meydana gelen fiziksel ve kimyasal kararlılığa dayanıklılığa sahip maddelerdir. Bu canlıların sellülozdan meydana gelen intine ismi verilen iç katmanları boşalmıştır(31).

Sporopollenin, pollen veya sporların organik çözücüler, alkali ve %80 sıcak fosforik asit ihtiva eden kuvvetli asitlerle bir hafta boyunca muamele edilerek bitki intine'larından çıkarılabilir. Bu işlemden sonra orijinal

sporların değişmeden kalan dış yapıları *Lycopodium-Clavatum* sporlarıdır(32).

Lycopodium-Clavatum yurdumuzda Trabzon A-7 bölgesinde bulunan dağlık arazideki eğrelti otları familyasından olan kurt pençesi, kurt ayağı bitkilerinden elde edilebilir(Şekil 1).



Şekil 1. *Lycopodium-Clavatum* Bitkisi(Kurt Pençesi).

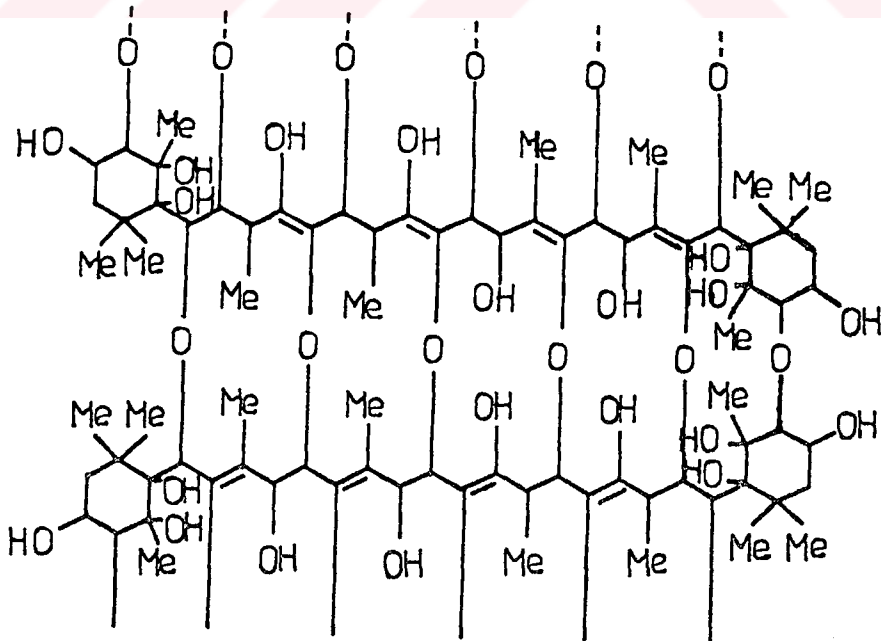
Sporopollenin tabii olarak bitki duvarlarında bulunmaktadır. Spor duvarları hücrenin iç kısımlarını çevreleyen iç içe geçmiş iki ana duvardan oluşmuştur. Hücrenin iç duvarları intine denilen sellülozdan oluşan protein-polisakkaritlerden meydana gelmiştir. Daha dıştaki duvarlar ise exine adı verilen sporopollenini oluşturan maddelerdir(33).

Sporopolleninin belli bir özelliği spor büyüklüğünün tanecikten taneciğe değişmemesidir. *Lycopodium-Clavatum* sporları 20 mikronluk bir çapa sahip olup düzgün bir yapıdadır(34).

Pollen taneciklerinin exine üzerinde John (1814) ve

Bracoonot (1829) yıllarında çalışmalarda bulunmuşlar ve hücre duvarı bileşenlerinin kimyasal reaktifleri karşı dirençleri konularını geliştirmişlerdir (35). 1928 yıllarında Zetzschhe bitki duvarlarını oluşturan Lycopodium-Clavatum sporları üzerinde çalışmış ve sporopolleninin pollen ve hücre duvarlarında mevcut olan kimyasal maddelerden meydana geldiğini açıklamıştır. Daha sonraları Brooks(1971) yılında Sporopolleninin çok yüksek bir dirence sahip kimyasal bir madde olduğunu ve spor duvarlarını teşkil eden exosproim içerisinde olduğunu ileri sürmüştür(35).

Sporopollenin Lycopodium-Clavatumdan elde edilen karbon, hidrojen ve oksijen ihtiva eden $C_{90}H_{144}O_{27}$ şeklinde bir stokiyometriye sahip kimyasal maddedir. Yapılan deneyler sporopolleninin karotenoitlerin oksitleyici polimerleşmesinden elde edildiğini göstermiştir(36). Şekil 2 de karotenoitlerden türetilmiş kimyasal yapısı gösterilmiştir.



Şekil 2. Sporopolleninin Karotenoitlerden Türetilmiş Yapısı

V.1. SPOROPOLLENİNİN İYON-DEĞİŞTİRİCİ OLARAK UYGUNLUĞU

İdeal bir değiştiricinin bazı önemli özellikleri aşağıda sıralanmıştır:

1. Düzenli bir yapıda olmaları
2. Kontrollu ve etkin iyon- değiştirici kapasiteye sahip olmaları
3. Hızlı değişme
4. Kimyasal kararlılık
5. Fiziksel kararlılık
6. Isısal kararlılık
7. Tanecik büyüklüğünün uygun olması

Sentetik iyon-değiştiricilerde şişme olayı fazladır. Aşağıdaki faktörler sentetik reğinelerdeki şişme olayını etkiler.

1. Çevreleyen ortam (çözücü tabiatı, elektrolit konsantrasyonu)
2. Reçine matriksinin tabiatı
3. Kaunter iyonun çeşiti
4. İyonojenik grubun konsantrasyonu

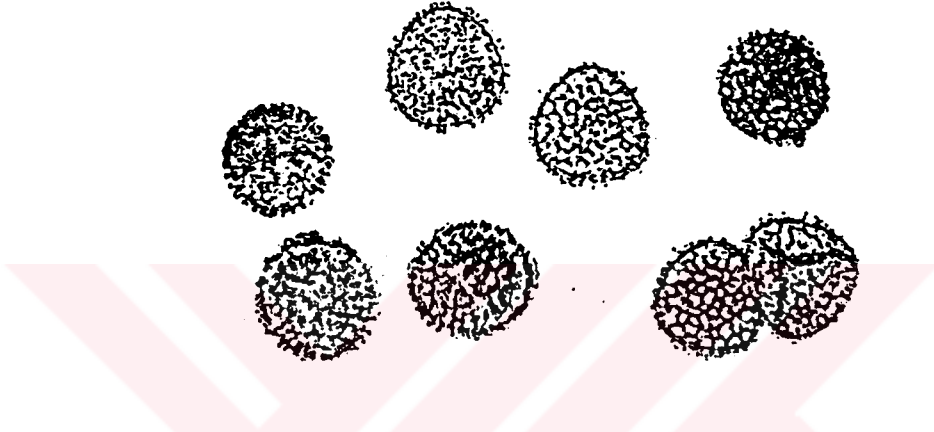
Sporopolleninde şişme olayı yoktur. Sporopolleninin sentetik reçinelere karşı önemli avantajları şunlardır.

1. Elde edilebilirliği: Sporopollenin tabii olarak bitkilerde mevcut olduğundan dolayı kolayca elde edilebilir ve pahalı değildir. Bitkilerdeki intine organik çözücülerle, alkali ve kuvvetli asitlerle

reaksiyona sokularak elde edilebilir. Bu reaksiyondan sonra elde edilen sporopollenin orijinal sporunun yapısı aynı kalır.

2. İyon-değiştirme kapasitesi: Sporopollenin iyon-değiştirme kapasitesi çeşitli organik maddeler ekliyerek artırılabilir. Kapasite artırma içi sporopollenin ligand-değiştirme işleminde anlatılmıştır.
3. Kimyasal kararlılığı: Sporopolleninin kimyasal kararlılığı çok sağlam olup, çeşitli çözücülerle reaksiyona sokulduğu halde bir çözüme görölmemiştir. Sporopollenin hidroklorik asit, sülfürük asit ve ortafosforik asit ile tepkimeye sokulmasına rağmen, yapısında hiç bir değişiklik olmamıştır(37). Klorosulfonik asitle reaksiyona sokularak mikroskopla incelendiği zaman görölebilen bir kayıp olmadığı yapılan denemelerle anlaşılmıştır. Sporopollenin ozon ve hidrojen peroksitle temas ettirilince çok önemsiz yapı değişikliği görölmüştür. Diaminoetil-sporopollenin yapısına karbondioksitin girmesi ayırma işlemini zorlaştıran bir küçük dezavantaj gibi görölebilir. Bu problemde HCl ile muamele edilmek suretiyle giderilebilir.
4. Fiziksel ve ısı yönünden kararlılığı: Sporopollenin fiziksel ve ısı yönünden kararlılığa sahip olan büyük moleköl ağırlıklı çapraz bağlarla bağlı tabii bir polimerdir. Brooks ve Shaw(38) gaz kromatografisinde prolizini ve infrared spekroskopisinde yapı tayinini yaparak dayanıklılığını ölçmüştür.
5. Tanecik büyüklüğu: Sporopollenin 20 mikron çapında

sabit çok ince tanecikli homojen bir yapıya sahiptir. Bu sabit mesh büyüklüğü Sporopolleninin önemini artırır. Sporopolleninin diğer bir özelliği çözücülerle muamele edildiği zaman şişmemesidir. Kabarma iyon-değiştiriciler için bir dezavantajdır. Sporopollenin 800 US mesh, 610 BSS mesh büyüklüğündedir.



Şekil 3. Sporopollenin Tanecik Fotoğrafı

Sporopolleninin homojen sabit bir tanecik büyüklüğüne sahip olması çok istenilen bir durumdur. Akış hızının düzgün olması ve net ayırmalar, tanecik büyüklüğünün düzgün olmasına bağlıdır.

Sporopolleninin yapısını incelersek şekil(2), OH grubu geçirgenliği artırır, O oksitleyicidir. Halkalı yapıda olması reçinenin uzun süre kullanılmasını sağlar. Sporopolleninin birim zar yapısı metilleştirilmiştir.

VI. LIGAND-EXCHANGE KROMATOĞRAFI'DE AYRILAN MADDELER ve AYIRMA İŞLEMLERİ

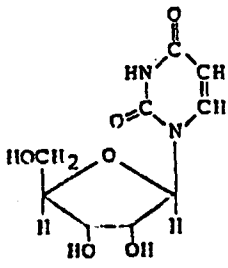
VI. 1. KOLONDA AYIRILAN MADDELER

Nükleositler ve Nükleik Asit Bazları:

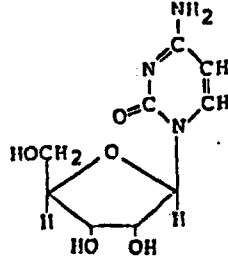
Doğal olarak kromozomlarda bulunan uzun zincirli ve çizgisel yapıda olan nükleik asitlerden olan <DNA> ve <RNA> son yıllarda biyokimyada büyük önem kazanmış, birçok hücre içi olayın aydınlatılmasına yardımcı olmuştur. (DNA) deoksiribonükleik asitin, (RNA) ise Ribonükleik asitin kısaltılmış sembolleridir. RNA hücrelerde protein sentezi için gerekli bilgileri DNA dan alarak ilgili yerlere taşır. Bu nedenle yoğun olarak stoplazmada bulunur. Birer polinükleotid olan DNA ve RNA moleküllerinin yapısında organik baz molekülü ile şeker ve fosfat grupları bulunmaktadır. Organik baz molekülleri şeker halkasına 1 yerinden bir glikozid bağı ile bağlanarak nükleozidleri oluşturur. Nükleozidlere fosfat grubunun eklenmesiyle nükleotidler meydana gelir.

Nükleik asit bazlarının temelini pirimidin ve pürin halkaları oluşturmaktadır. Bu halkadaki hidrojen atomları yerine yeni gruplar geçmesi ile nükleik asit bazları meydana gelir.

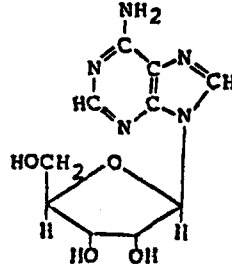
Nükleosidler



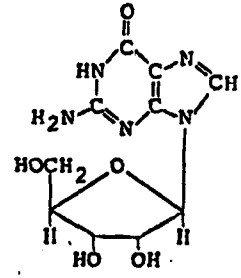
(Uridine)



(Cytidine)

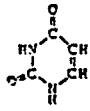


(Adenosine)

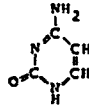


(Guanosine)

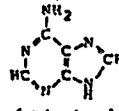
Nükleik Asit Bazları



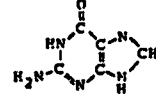
(Uracil)



(Cytosine)



(Adenine)



(Guanine)

Nükleik asit türevlerinin karışımlarının

L.E.K. (Ligand-Exchange Chromatography) kullanarak ayırılması bu maddelerin biyosentezde kullanılması açısından önemlidir. Bu maddelerin kimyasal özelliklerini incelemek isteyen araştırmacılar için saflaştırılması çok istenir.

Nükleik asitlerden türetilen pürin ve primidin bazları çözeltideki pH ya ve reçinenin özelliğine bağlı olarak anyon, katyon veya ligand teşkil etme yeteneği vardır(30).

Kolona injekte edilen nükleik asitlerin ve nükleositlerin $\lambda_{\text{mak}}(\text{nm})$ değerleri aşağıda gösterilmiştir.

$\lambda_{\text{mak}}(\text{nm})$

Üridin	267
Sitidin	270
Guanozin	270
Adenozin	260
Urasil	272
Guanin	263
Adenin	266

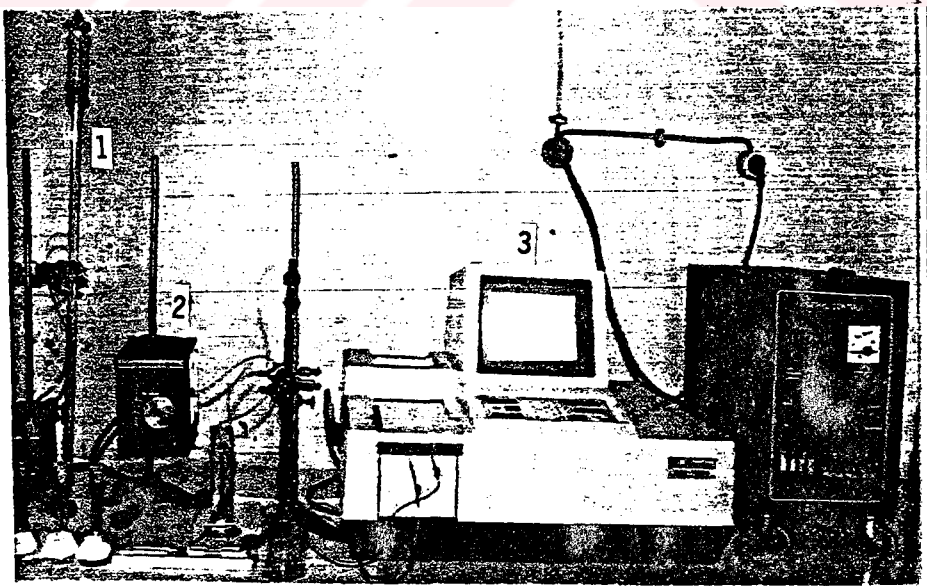
VI. 3. AYIRMA İŞLEMLERİ

Kullanılan Aletler

1. UV-160 A, UV-Visible Spectrophotometre: Shimadzu
2. Differential Refractometer : Water Associates
3. Peristaltic Pump P1 : Pharmacia Fine Chemicals
4. Mikroskop : Vickers Ins.
5. Kromatografi Kolonları : Pharmacia Fine Chemicals

Kolonun Hazırlanması ve Çalıştırılması:

Ligand değiştiriciler saf su ile suspansiyon haline getirilerek kolona yardımcı bir kolon ile doldurulur. Reçine kolona sıkıca paketlenildikten sonra birkaç saat kolondan eluant geçirilir. UV Spektrofotometre istenilen dalga boyuna ayarlanır. Kolona bir injektor ile ayırılması istenen maddeler injekte edilir. Peristaltik pompa çalıştırılarak kolona eluant gönderilir. Kolondan çıkan çözelti UV Spektrofotometre veya Refraktometre ile tesbit edilerek pikler kaydedilir.

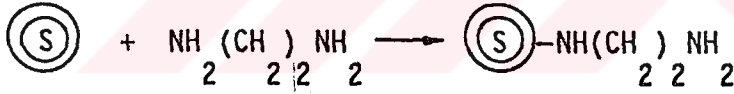


Şekil 3. Ayırma Sistemi: 1. Kolon, 2. pompa, 3. UV-Sp.

VII. LIGAND-DEĞİŞTİRİCİ REÇİNELERİN HAZIRLANMASI
VE AYIRMA İŞLEMLERİ

VII. 1. Cu^{++} YÜKLÜ KARBOKSİMETİLDİAMİNOETİL-SPORO-
POLLENİN(Cu^{++} Yüklü KMDAE-Sporopollenin)

Lycopodium-Clavatum bitki sporlarından hazırlanan 54 gr lık bir örnek 450 ml lik susuz toluen ile karıştırılır. Daha sonra bu süspansiyona 150 ml 1,2 diaminoetan eklenir. Bu süspansiyon 20 saat kadar bir geri soğutucu ile ısıtılır. Süspansiyon kaynama sıcaklığında ısıtma ve geri soğutma yapılır. Bu şekilde 1,2 diaminoetan Sporopollenine bağlanmış olur. Reaksiyon:

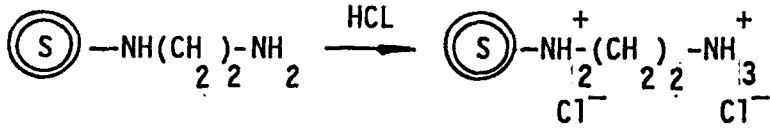


Diaminoetil-Sporopollenin
(DAE-Sporopollenin)

Daha sonra süspansiyon soğutulmaya bırakılır. Soğutma işlemi yapıldıktan sonra vakum filtresiyle süspansiyon süzülür ve toluenle yıkanır. Böylece Diaminoetil-Sporopollenin(DAE-Sporopollenin) elde edilir.

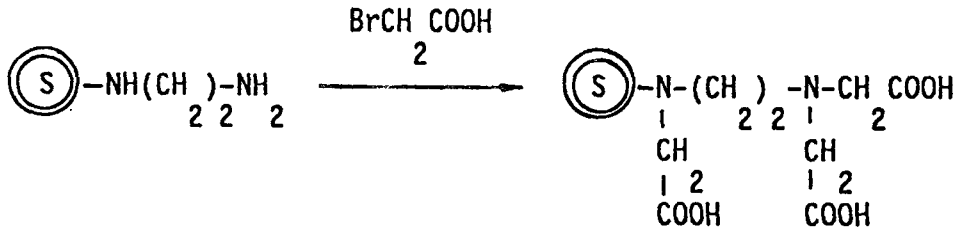
Depolonması gereken DAE-Sporopollenin hidroklorik asit ilave edilmesi gerekir. Aksi halde DAE-Sporopollenin hava atmosferinde bulunan CO ile reaksiyona girerek

bünyesindeki aminleri karbonatlarına çevirir. Sporopolleninin HCl ile reaksiyonu için, 2 M HCl ile reaksiyona sokulur. Daha sonra su ile yıkanır, son olarak etanol ve eter ile yıkandıktan sonra kurumaya bırakılır. Aminoetil-Sporopollenin klorik asit ile reaksiyonu:



Klorik asit formundaki DAE-Sporopollenin kullanılmak istenildiği zaman alkollü sodyum hidroksit ile muamele edilir, su, etanol ve diklorometan ile sırayla yıkanır.

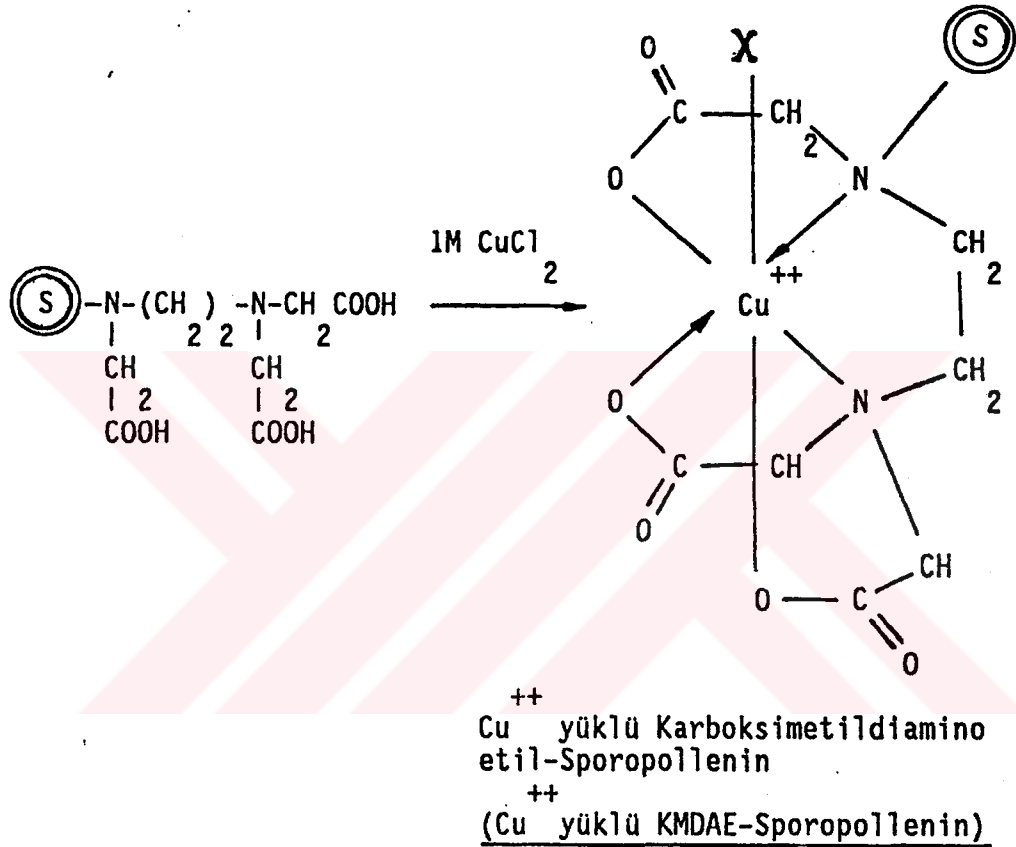
Bir reaksiyon kabına 48 gr DAE-Sporopollenin eklenir. 32 ml, 2 M NaOH VE 32 ml, 1 M NaHCO₃ ile nötrleştirilen bromoasetik asit reaksiyon kabına eklenir. Oda sıcaklığında bu suspansiyon bir gece boyunca karıştırılır. Reaksiyon tamamlanarak reaksiyon kabındaki süspansiyon sırasıyla su, sulu asetik asit çözeltisi ve tekrar su ile yıkanır ve kurutulur. Reaksiyon:



KMDAE-Sporopollenin

1 M CuCl₂ çözeltisi bir beher içerisine hazırlanır. Bu çözelti Bromoasetik asitli-DAE-Sporopollenine(KMDAE-

Sporopollenin) eklenir. Süspansiyon pH sı 3.5 yapılır. Bir karıştıma kabına alınan bu çözelti bir gece boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılır. Elde edilen süspansiyon süzülerek saf su ile yıkanır. Meydana gelen reaksiyon aşağıdaki gibi olur:



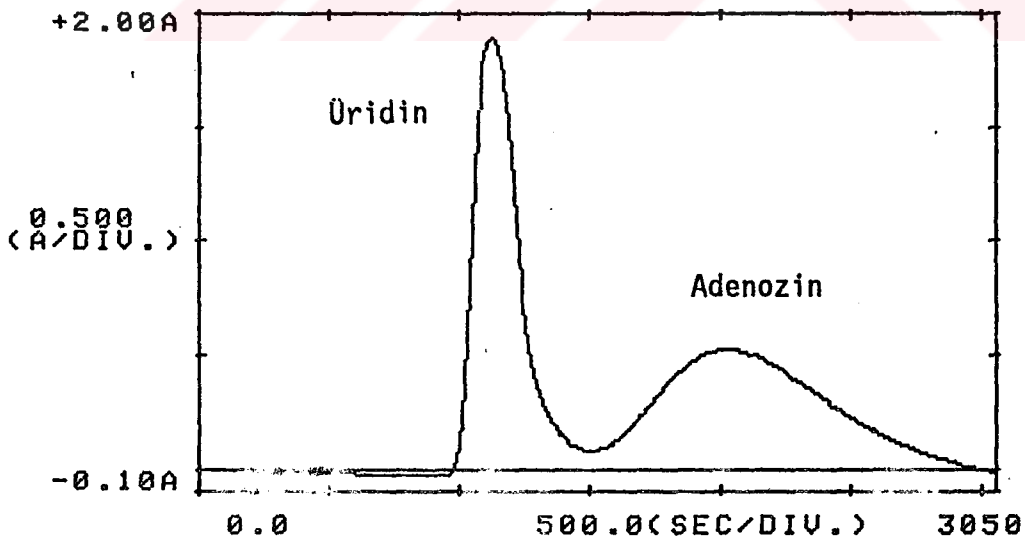
Hazırlanan bu reçine kolona doldurulur. Kolon bir saat kadar yürütücü ve sökücü faz olan amonyak çözeltisi ile dengeye getirilir. UV spektrofotometre dalga boyu seçilerek sıfır ayarlaması yapılır. Eluant 10 dakika kadar UV spektrofotometreden geçirilerek sıfır ayarlaması tekrar yapılır. Ayırılması istenen ligandlar bir mikropipet ile belirli hacimlerde alınarak karıştırılır. Bu karışımlardan

alınan ligandlar kolona bir injektor ile verildikten sonra, bir peristaltik pompa yardımı ile kolona sürekli olarak amonyak eluantı gönderilir. Kolondan çıkan eluant UV spektrofotometre ile incelenerek kromatogramlar kaydedilir.

Cu⁺⁺ Yüklü Karboksimetildiaminoetil-Sporopollenin
(KMDAE-Sporopollenin)

A- Nükleositlerin Ayırılması

Reçine ile dolu kolona üridin ve adenozin çözeltilerinden hazırlanan karışım injekte edilir. Amonyak eluantı kolondan geçirilerek ayırma işlemi yapılır(Şekil:4)



Şekil.4. Nükleositlerin Elüsyonu: 0.5M NH₃, ϕ =1x30 cm,
D,L
V=38 ml, λ =260 nm

Tablo:1

Nükleositlerin Retensiyon Hacimleri

<u>Nükleositler</u>	<u>Pik</u>	
	<u>t(san)</u>	<u>V(ml)</u>
Üridin (0.02 M, 30 ml)	1130	14
Adenozin(0.02 m, 30 ml)	2040	25.4

KMDAE-Sporopollenin ile ayırmada; üridin ve adenozin ligandları Cu^{++} metal iyonuna karşı farklı ilgilere sahiptir. Bunun sonucunda bu ligandların kolondan aşağıya amonyak eluantıyla sürüklenmeleri farklı hızlarda olacak, böylece Şekil(4) de görüleceği gibi ligandlar birbirinden ayrılacaktır. Piklerden anlaşılacağı gibi adenozin, Üridine nazaran reçineye daha kuvvetli bağlanmış olduğundan, kolondan çıkmasında gecikmiştir.

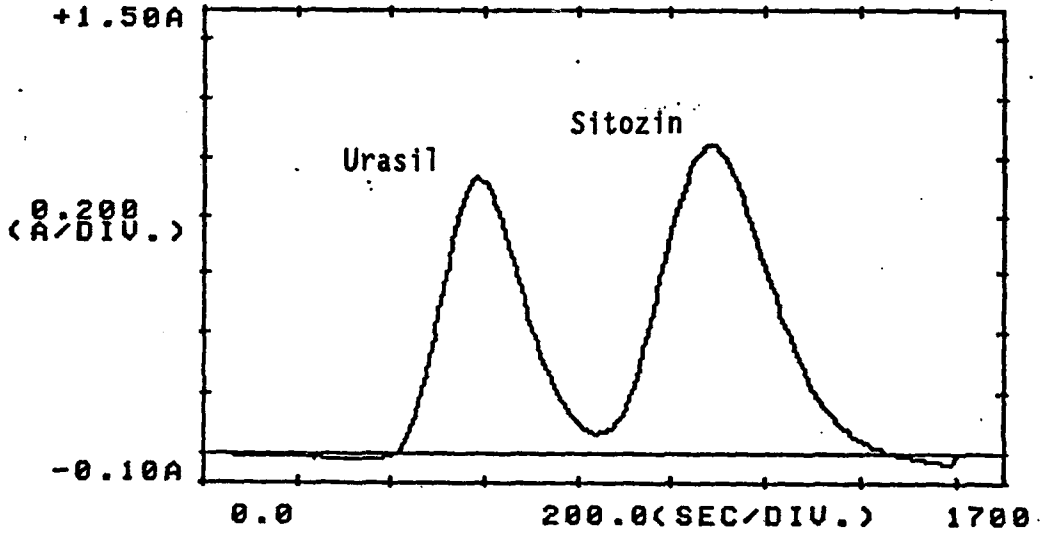
B- Nükleik Asit Bazlarının Ayırılması:

Kolona urasil ve sitozin çözeltilerinden hazırlanan karışım injekte edilir. Amonyak çözeltisi eluant olarak kullanılarak ayırma yapılır(Şekil 5).

Tablo:2

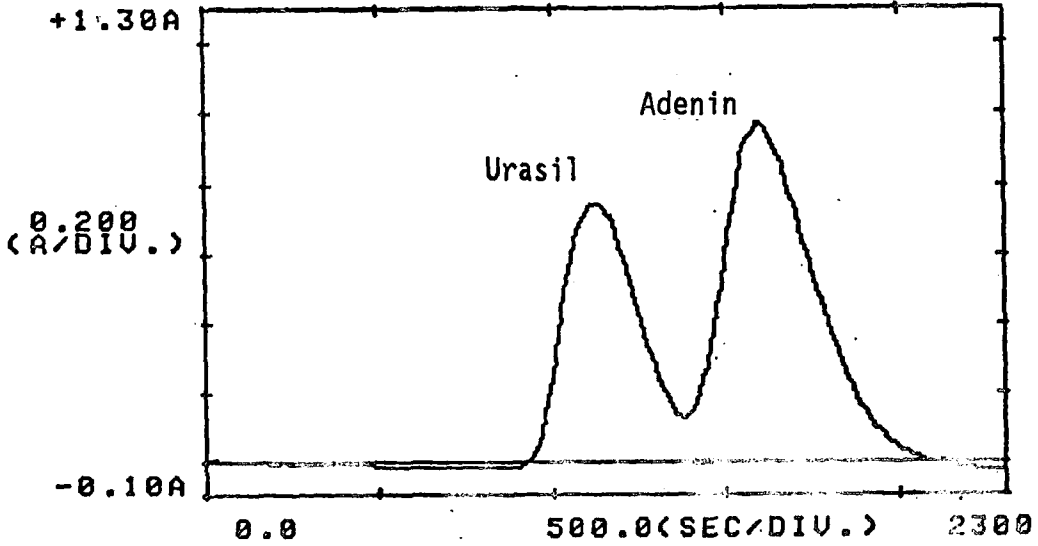
Nükleik Asit Bazlarının Retensiyon Hacimleri

<u>Nükleik Asit Bazları</u>	<u>Pik</u>	
	<u>t(san)</u>	<u>V(ml)</u>
Urasil (0.02 M, 30 ml)	580	13.0
Sitozin(0.02 M, 30 ml)	1080	24.1



Şekil 5. Nük. Asit Bazları Elüsyonu: 0.5 M Amonyak, $\phi=1 \times 30$,
 $V=260$ ml, $\lambda=260$ nm

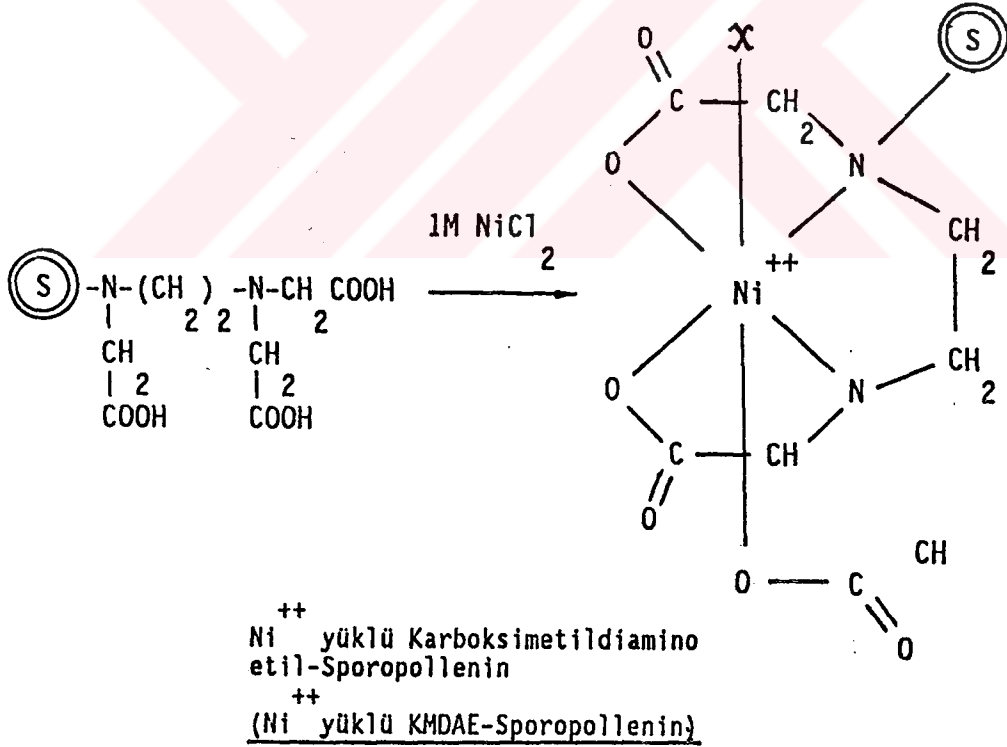
Kolona urasil ve adenin çözeltilerinden hazırlanan karışımlar injekte edilir. Amonyak çözeltisi eluant olarak kullanılmak suretiyle ayırma yapılır.



Şekil 6. Nükleik Asit Bazlarının Elüsyonu: 0.5 M Amonyak,
 $\phi=1 \times 30$ cm, $V=30$ ml, $\lambda=260$ nm

VII. 2. Ni⁺⁺ YÜKLÜ KARBOKSİMETİLDİAMİNOETİL-SPOROPOLLENİN(Ni⁺⁺ Yüklü KMDAE-Sporopollenin)

Bir beher içerisinde 1 M NiCl₂ çözeltisi hazırlanır. Bu çözelti, daha önce elde edilen ve kurutulmuş BADA-E-Sporopollenine eklenir. Süspansiyon pH si 6.5-7 oluncaya kadar amonyak çözeltisi damlalar halinde eklenir. Daha sonra bu çözelti bir manyetik karıştırıcı ile bir gece boyunca karıştırılır. Elde edilen süspansiyon süzülür, saf su ile yıkanır. Reaksiyon:

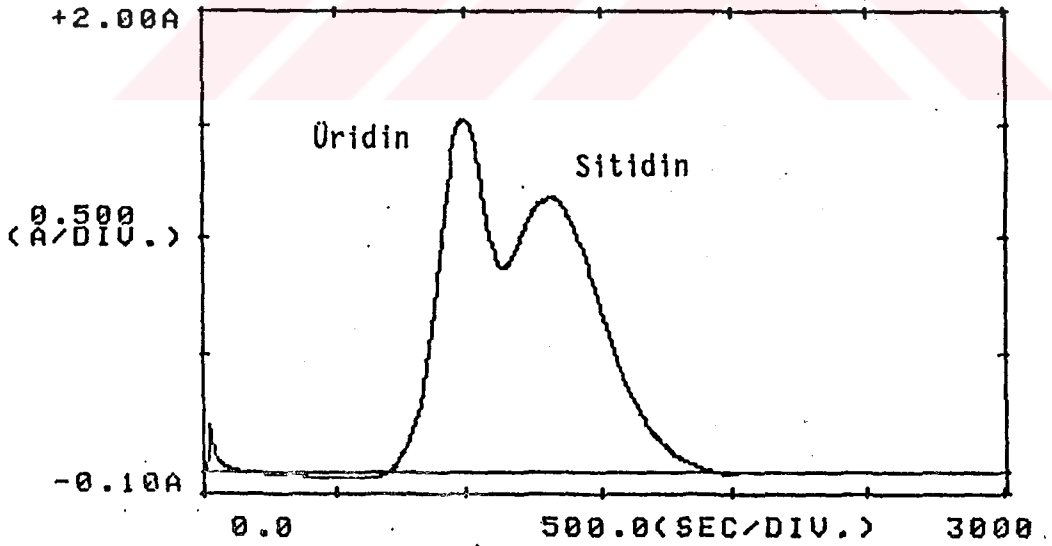


Hazırlanan bu reçine kolona doldurulur. Önceden bahsedildiği gibi ayırma işlemleri yapılır.

⁺⁺
Ni Yüklü KMDAE-Sporopollenin ile Ayırma İşlemleri:

A- Nükleositlerin Ayırılması:

Nükleosit çözeltilerinin değişik hacim ve konsantrasyondaki numuneleri kolona injekte edilerek elde edilen elüsyon kromatogramları şekil 7 de gösterilmiştir. Ayırılacak bu maddelerin reçineye tutunması, reçineye bağlanma kuvvetlerinin bir fonksiyonudur. Kolona tutunma ve kolondan eluantla sökülme farklı zamanlarda olduğu için, kolona injekte edilen nükleositler birbirinden ayrılmıştır. Üridin, sitidine göre kolonu daha erken terk etmiştir. Benzer şekilde guanozin, adenozinden önce kolondan çıkmıştır.

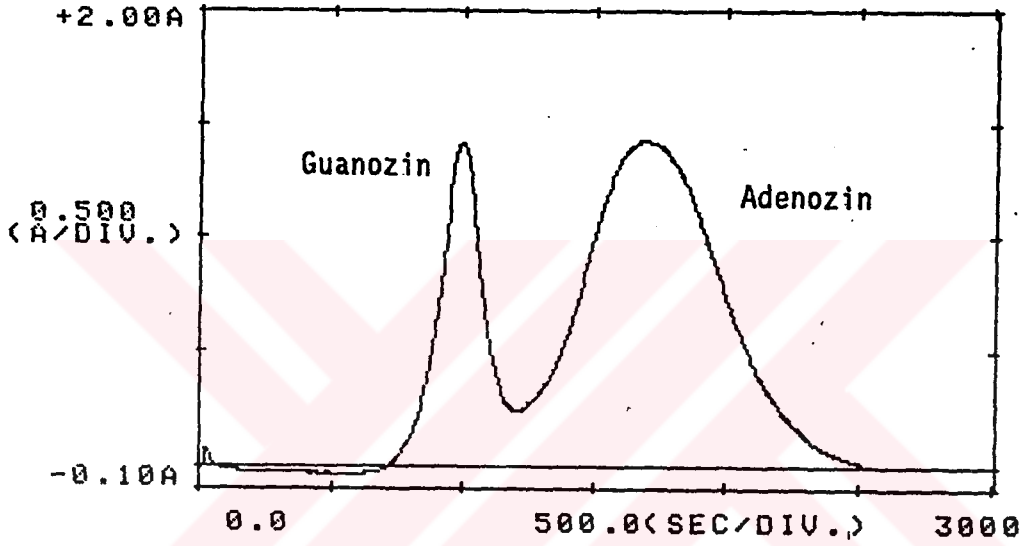


Şekil 7. Nükleositlerin elüsyonu: 1 M NH₃, $\phi=1 \times 30$ cm,
V=36 ml, $\lambda=260$ nm.

Tablo:4

Nükleositlerin Retensiyon Hacimleri

<u>Nükleik Asit Bazları</u>	<u>t(san)</u>	<u>V(ml)</u>
Üridin (0.02 M, 50 ml)	995	17.90
Sitidin(0.02 M, 50 ml)	1330	23.90



**Şekil 8. Nükleositlerin Elüsyonu: 1 M NH₃, $\phi=1 \times 30$,
 $V = 39$ ml, $\lambda=260$ nm**

Tablo:5

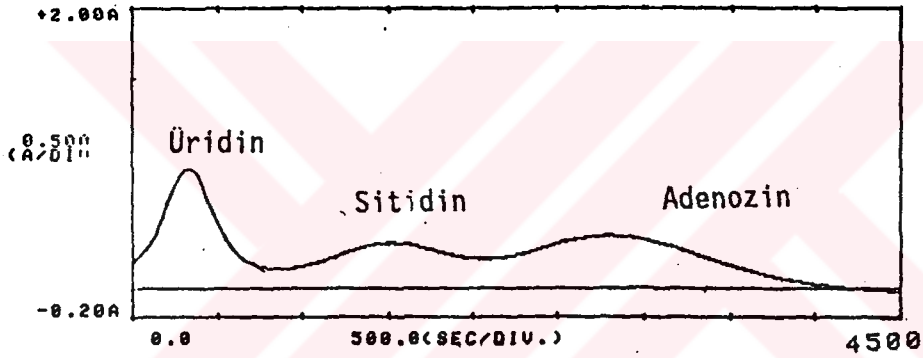
Nükleosidlerin Retensiyon Hacimleri

<u>Nükleik Asit Bazları</u>	<u>t(san)</u>	<u>pik</u> <u>V(ml)</u>
Guanozin(0.02 M, 50 ml)	1000	15.6
Adenozin(0.02 M, 50 ml)	1750	27.3

Tablo: 6

Nükleositlerin Retensiyon Hacimleri

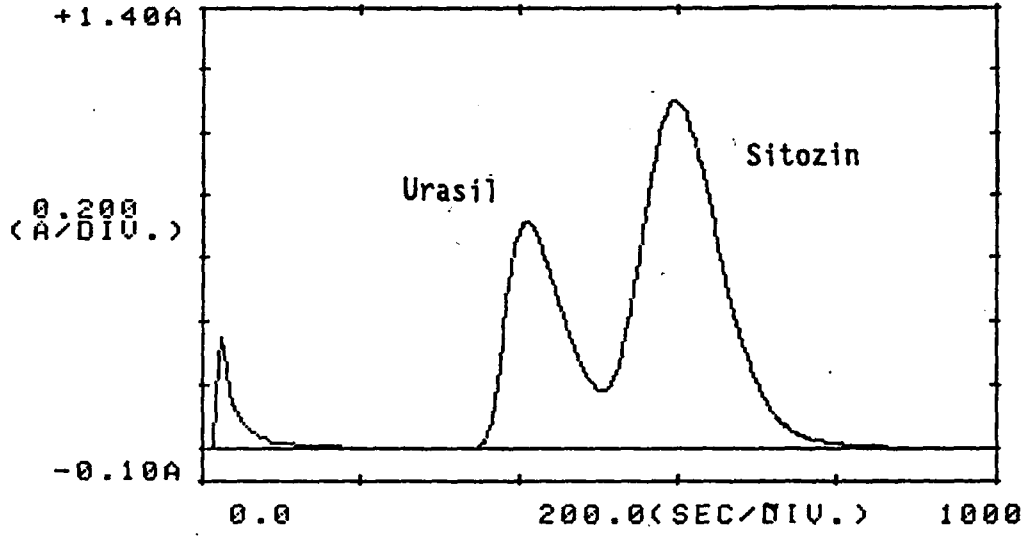
<u>Nükleik Asit Bazları</u>	<u>pik</u>	
	<u>t(san)</u>	<u>V(ml)</u>
Üridin (0.02 M, 20 ml)	400	5.0
Sitidin (0.02 M, 20 ml)	1500	18.7
Adenozin(0.02 M, 20 ml)	2900	36.2



**Şekil 9. Nükleositlerin Elüsyonu: 1 M NH₃, $\phi=1 \times 60$,
V = 50 ml, $\lambda=254$ nm
t**

B- Nükleik Asit Bazlarının Ayırılması:

Kolona değişik hacim ve konsantrasyonunda urasil, sitozin ve adenin çözeltileri karıştırılarak injekte edilir. Çıkan eluant UV spektroskopide analiz edilerek kromatogramlar kaydedilir.



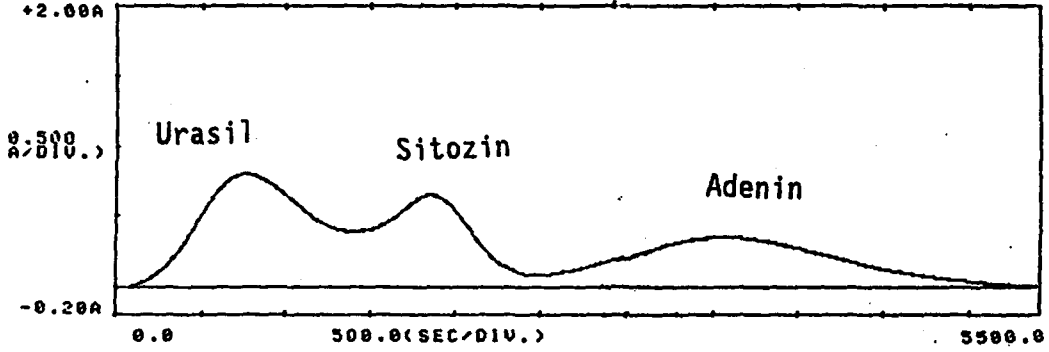
Şekil 10. Nükleik Asit Bazlarının Elüsyonu: 1 M NH₃,
 $\phi=1 \times 20$ cm, $V_t=20$ ml, $\lambda=254$ nm

Tablo: 7

Nükleik Asit Bazlarının Retensiyon Hacimleri

<u>Nükleik Asit Bazları</u>	<u>t(san)</u>	<u>V(ml)</u>
Urasil (0.02 M, 20 ml)	140	9.7
Sitozin(0.02 M, 20 ml)	595	14.0

Kolona injekte edilen urasil ve sitozin karışımının kolondan çıkış sırası urasil, sitozin şeklindedir(Şekil 10).



Şekil 11. Nükleik Asit Bazlarının Elüsyonu: 1 M NH₃, $\phi=1 \times 60$
 $V_t = 50$, $\lambda = 254$ nm

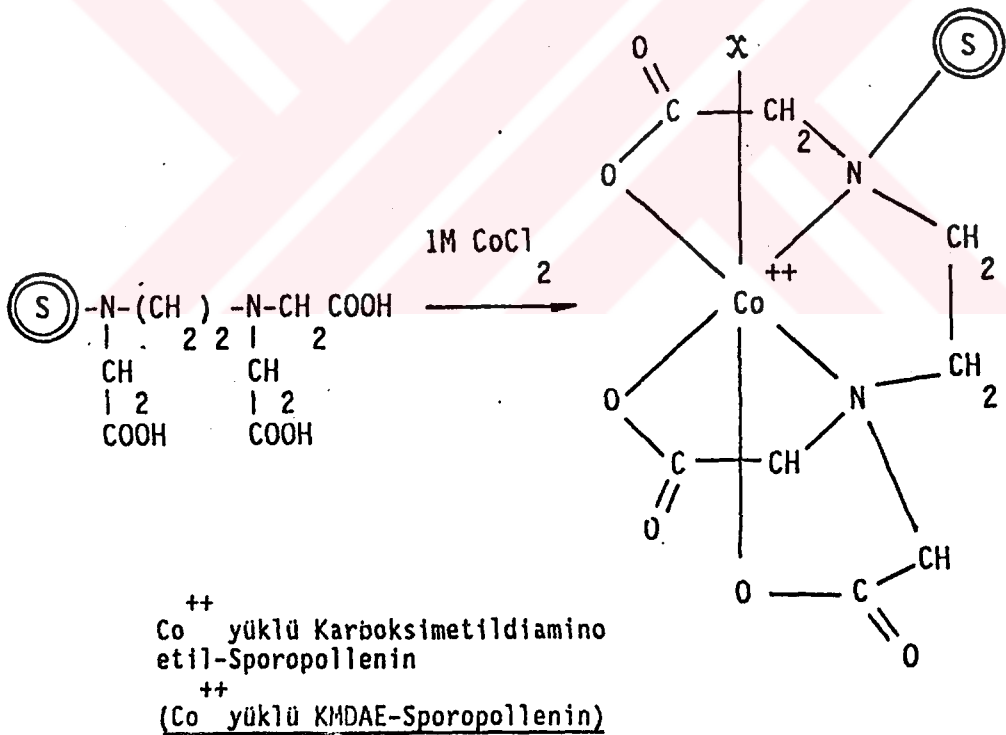
Tablo: 8

Nükleik Asit Bazlarının Retensiyon Hacimleri

Nük. Asit Bazları	<u>pik</u>	
	<u>t(san)</u>	<u>V(ml)</u>
Urasil (0.02 M, 40 ml)	750	6.8
Sitozin(0.02 M, 40 ml)	1900	17.2
Adenin (0.02 M, 40 ml)	4100	37.0

VII. 3. Co^{++} YÜKLÜ KARBOKSİMETİLDİAMİNOETİL-SPOROPOLLENİN
 (Co^{++} Yüklü KMDAE-Sporopollenin)

1 M CoCl_2 çözeltisi hazırlanır. Daha önce elde edilen ve kurutulmuş BDAE-Sporopollenine hazırlanan CoCl_2 çözeltisi eklenir. Süspansiyon pH sı 6-6.5 ayarlanarak bir manyetik karıştırıcı ile bir gece boyu sıcaklık 60 C ye ayarlanarak karıştırılır. Süspansiyon süzülerek saf su ile bir kaç kere yıkanır.

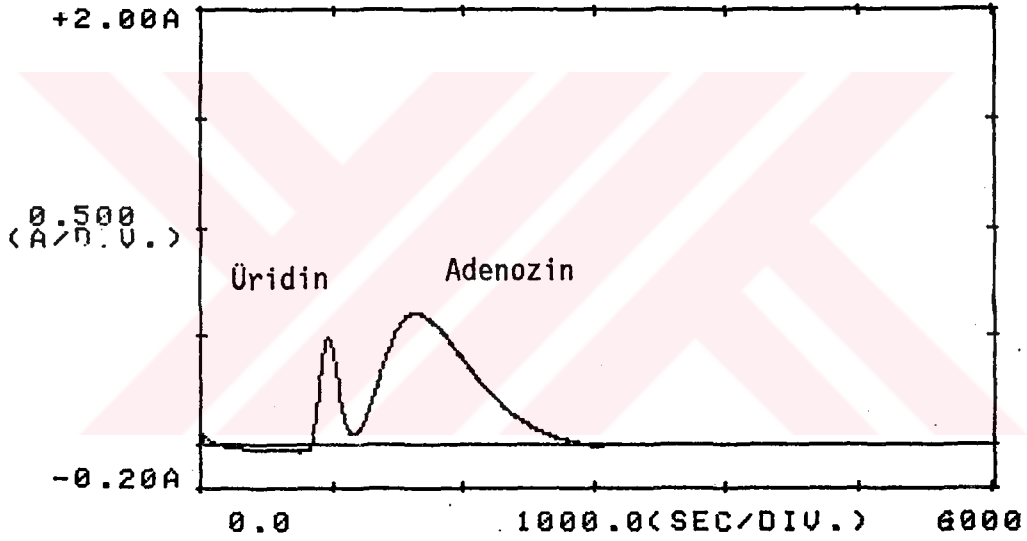


Hazırlanan bu reçine kolonlara doldurulur. Bölüm de anlatıldığı gibi ayırma işlemleri yapılır.

Co⁺⁺ Yüklü KMDAE-Sporopollenin ile Ayırma İşlemleri

A- Nükleositlerin Ayırılması:

Kolona injekte edilen Üridin ve adenozin karışımları birbirinden net bir şekilde ayrılmıştır(Şekil 12). Co⁺⁺ yüklü KMDAE-Sporopollenin nükleositlerin ayırılmasında oldukça uygun bir reçinedir. Şekilden görüleceği gibi her iki maddenin kolonda tutunmaları ve bırakılmaları farklı zamanlarda olmuştur.



Şekil 12. Nükleositlerin Elüsyonu: 0.02 M, Amonyak, $\phi=1 \times 30$,
 $V=41$ ml, $\lambda=260$ nm

Tablo: 9

Nükleositlerin Retensiyon Hacimleri

Nükleositler	t(san)	<u>pik</u> V(ml)
Üridin (0.02 M, 30 ml)	970	13.20
Adenozin(0.02 M, 30 ml)	1630	22.20

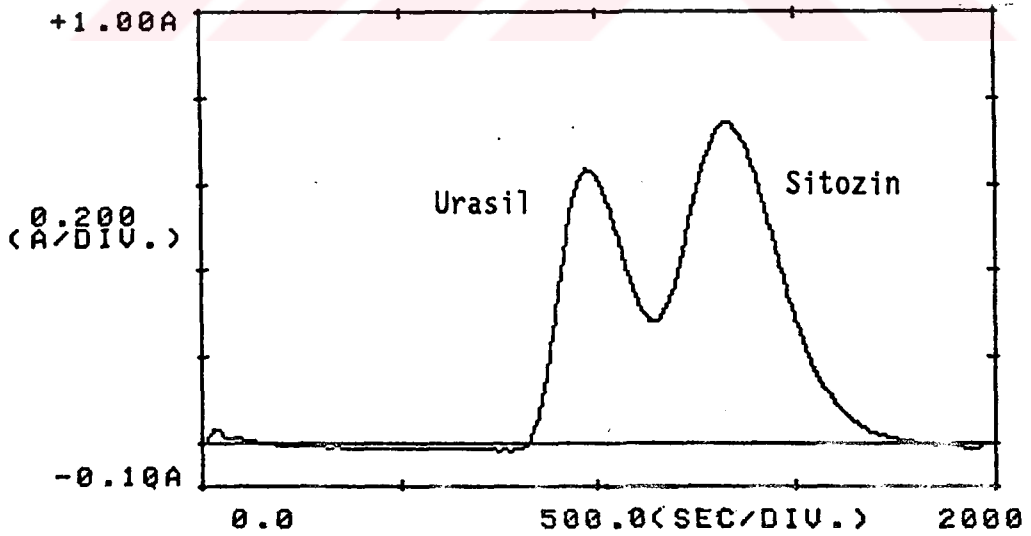
B- Nükleik Asit Bazlarının Ayırılması

Kolona injekte edilen urasil ve sitozin çözeltileri 0.2 M amonyak, yürütücü ve sökücü eluant olarak kullanılmak sureti ile birbirinden ayrılmıştır.

Tablo: 10

Nükleik Asit Bazlarının Ayırılması

Nük. Asit Bazları	pik	
	t(san)	V(ml)
Urasil (0.02 M, 30 ml)	970	16.1
Sitozin(0.02 M, 30 ml)	1320	22.0

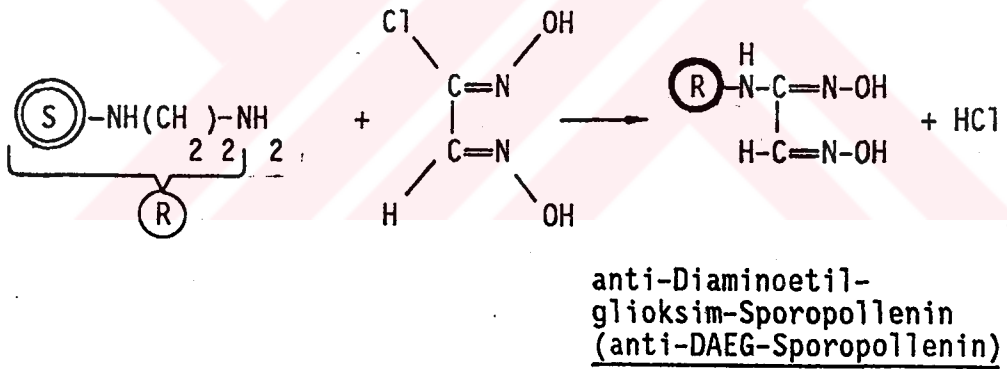


Şekil 13. Nük. Asit Bazları Elüsyonu: 0.2 M Amonyak, $\phi=1 \times 30$,
 $V=30$ ml, $\lambda=260$ nm

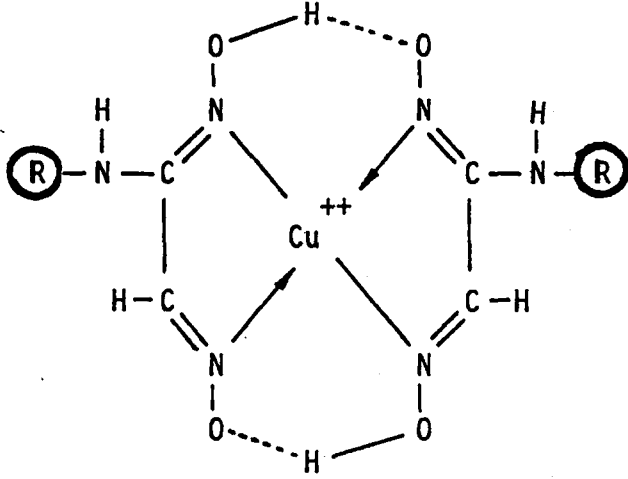
VII. 4. Cu^{++} YÜKLÜ anti-DİAMİNOETİLGİOKSİM-SPORO-
POLLENİN(Cu^{++} Yüklü aDAEG-Sporopollen)

Hazırlanışı:

Anti-Klorogliksim literatürlerde belirtilen şekilde elde edilir(46,47). Elde edilen bu madde eter veya kloroform içerisinde çözülüp Diaminoetil-Sporopollenin süspansiyona eklenir. Çözelti bir gece boyunca karıştırılır, süzülür ve saf su ile bir kaç defa yıkanır. Reaksiyon:



Elde edilen reçineye 1 M CuCl_2 çözeltisi eklenerek bir gece boyunca karıştırılır ve süzülerek saf su ile bir kaç defa yıkanarak aşağıda gösterilen metal-ligand kompleksi elde edilir. Daha sonra bu reçine kolonlara doldurularak ayırma işlemleri yapılır.



Cu^{++} Yüklü anti-Diaminoetilglioksim-Sporopollenin
 (Cu^{++} Yüklü anti-DAEG-Sporopollenin)

Cu^{++} Yüklü anti-DAEG-Sporopollenin Reçinesi ile

Ayırma İşlemleri:

A- Nükleosidlerin Ayırılması:

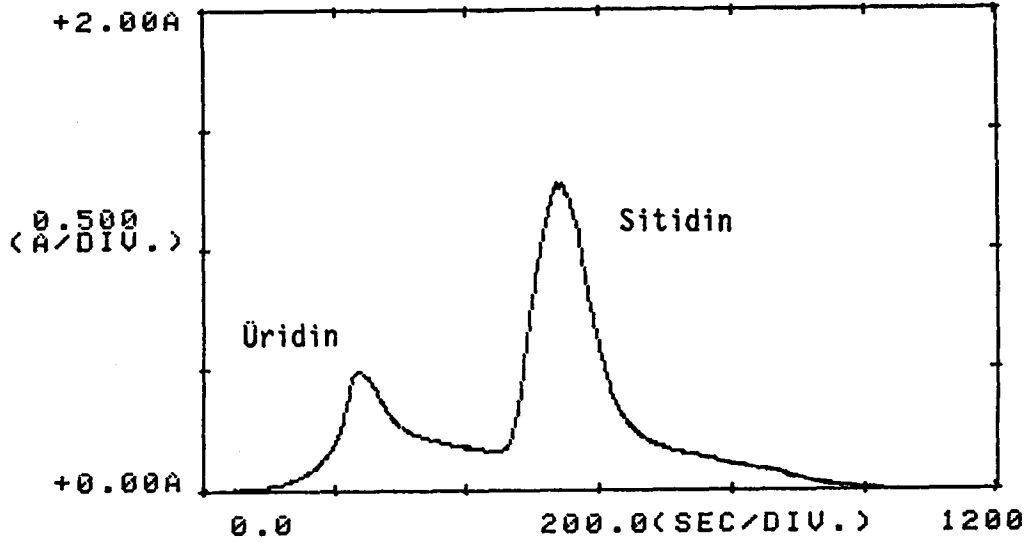
Cu^{++} Yüklü aDAEG-Sporopollenin ile doldurulmuş

bulunan kolona üridin ve adenozin çözeltilerinden belirli miktarlarda alınarak karıştırıldıktan sonra bir injektör ile kolona verilir. Eluant olarak 0.1 amonyak çözeltisi kullanılmak suretiyle kolondan çıkan eluant analiz edilerek ayırma tesbit edilir(Şekil 11).

Tablo: 11

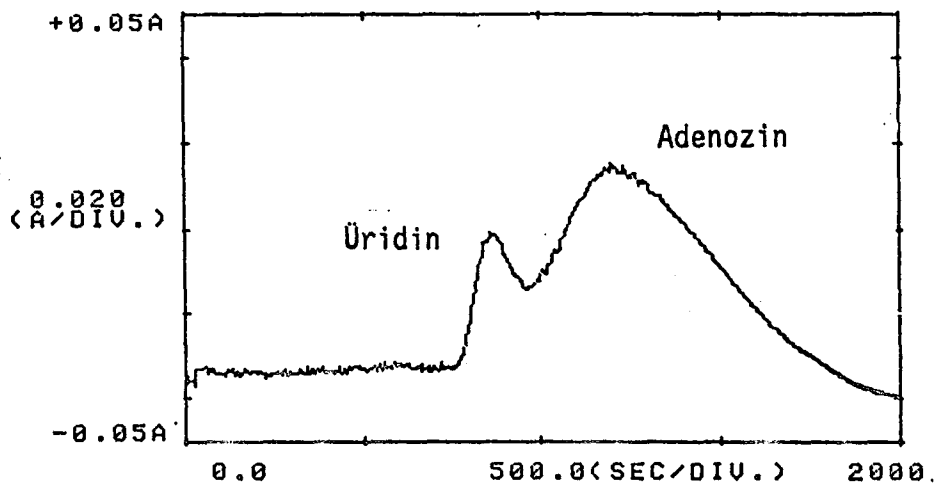
Nükleositlerin Ayırılması

<u>Nükleositler</u>	<u>t(san)</u>	<u>V(ml)</u>
Üridin (0.02 M, 30 ml)	220	13.7
Sitidin(0.02 M, 60 ml)	480	30.0



Şekil 14. Nükleositlerin Elüsyonu: 0.1 M NH₄, $\phi=1 \times 30$ cm,
V=50 ml, $\lambda=280$ nm

Aynı reçine ile dolu olan kolona nükleositlerden üridin ve adenozin verilerek kromatogramlar kaydedilir(Şekil 15).

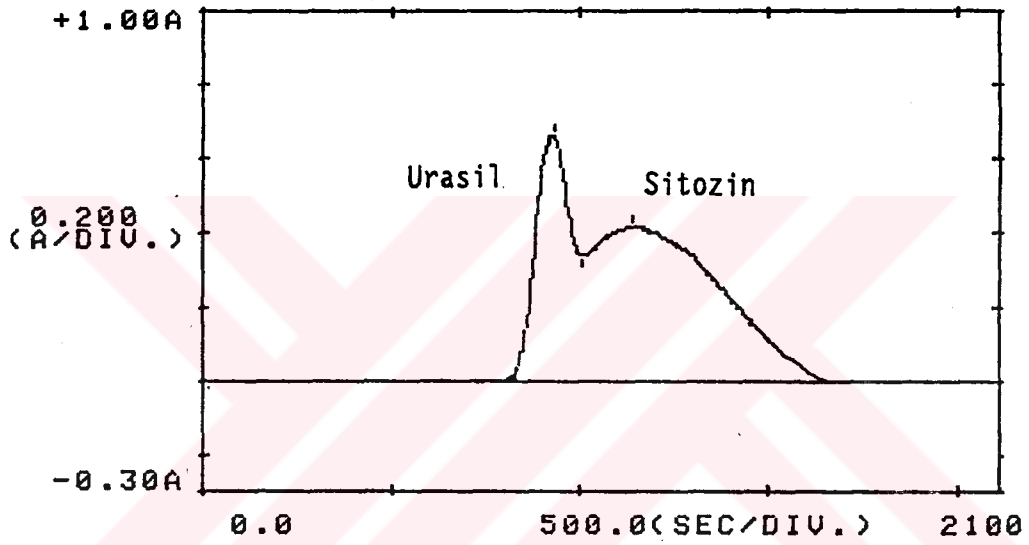


Şekil 15. Nükleositlerin Elüsyonu: 0.1 M NH₄, $\phi=1 \times 30$ cm,
V=32 ml, $\lambda=280$ nm

Tablo: 12

Nükleositlerin Elüsyonu

Nükleositler	pik	
	t(san)	V(ml)
Üridin (0.02 M, 20 ml)	900	9.6
Adenozin(0.02 M, 20 ml)	1200	12.8



Şekil 16. Nükleik Asit Bazlarının Elüsyonu: 0.1 M NH₃,
 $\phi=1 \times 30$ cm, V=31 ml, $\lambda=260$ nm

Tablo: 13

Nükleik Asit Bazlarının Elüsyonu

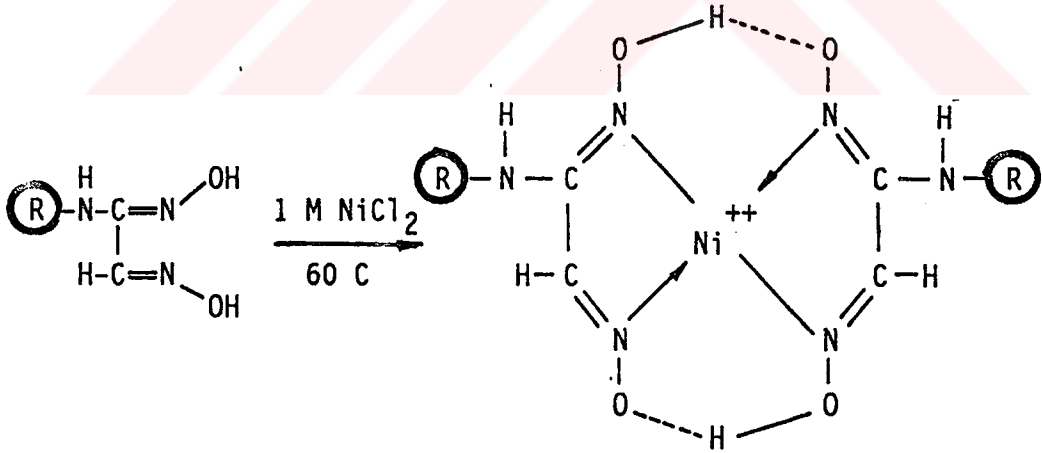
Nük. Asit Bazları	pik	
	t(san)	V(ml)
Urasil (0.02 M, 100 ml)	930	13.7
Sitozin(0.02 M, 100 ml)	1140	16.8

VII. 5. Ni⁺⁺ YÜKLÜ anti-DİAMİNOETİLGİOKSİM-SPORO-
POLLENİN(Ni⁺⁺ Yüklü aDAEG-Sporopollenin)

Hazırlanışı:

Daha önce hazırlanan aDAEG-Sporopollenine, hazırlanan 1 M NiCl₂ çözeltisi eklenir. Süspansiyonun pH si 6-7 ye gelinceye kadar damlalar halinde seyreltik amonyak eklenir. Bir manyetik karıştırıcı ile sıcaklık 60 C ye ayarlanarak süspansiyon bir gece karıştırılır. Daha sonra süzme ve saf su yıkama işlemleri yapılarak elde edilen reçine kolonlara doldurularak ayırmak istenilen ligandların elüsyonu yapılır.

Reaksiyon:



Ni⁺⁺ Yüklü anti-Diaminoetilglioksim-Sporopollenin
(Ni⁺⁺ Yüklü anti-DAEG-Sporopollenin)

Ni⁺⁺ Yüklü aDAEG-Sporopollenin ile Ayırma İşlemleri

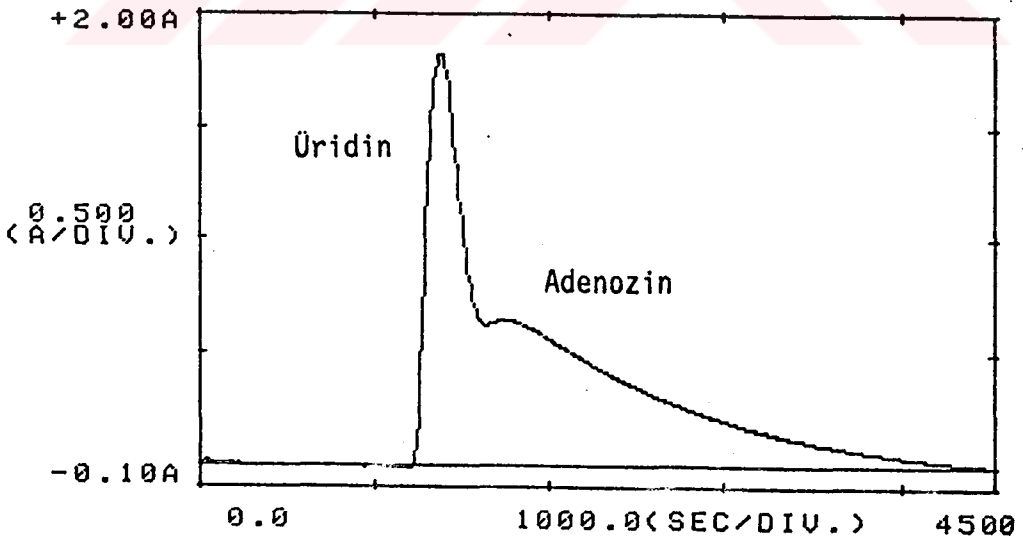
A- Nükleositlerin Ayırılması:

Reçine ile doldurulan kolona Üridin ve adenozin çözeltisinden alınan numuneler bir injektor ile kolona verilir. Amonyak çözeltisi eluant olarak kullanılarak ayırma işlemleri gerçekleştirilir(şekil 17).

Tablo: 14

Nükleositlerin Ayırılması

Nükleositler	pik	
	t(sn)	V(ml)
Üridin (0.02 M, 25 ml)	1400	14.3
Adenozin(0.02 M, 50 ml)	1800	13.4



Şekil 17. Nükleositlerin Elüsyonu: 0.5 NH₃, $\phi=1 \times 30$ cm,
V=46 ml, $\lambda=260$ nm

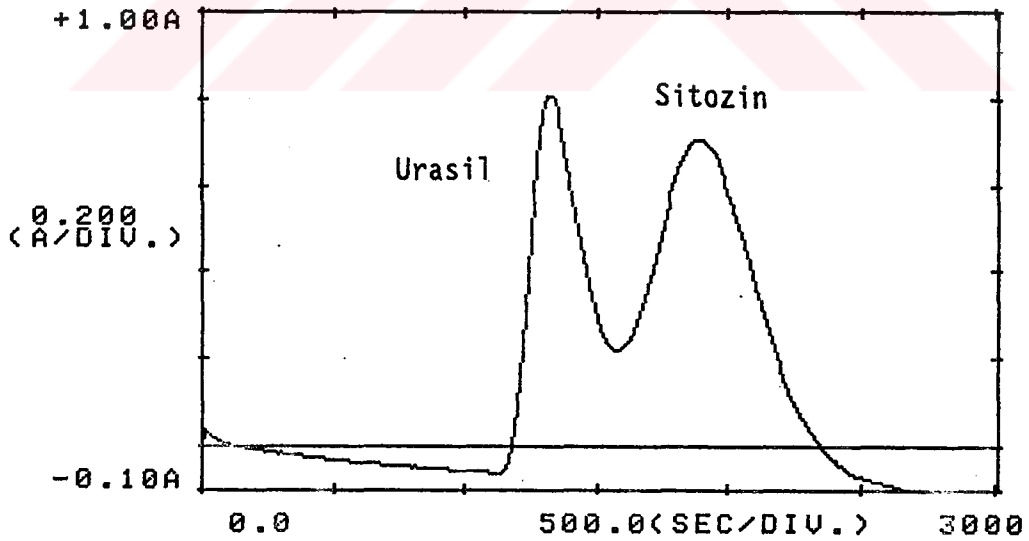
B- Nükleik Asit Bazlarının Ayırılması:

Ni^{++} yüklü α -DAEG-sporopollenin ile doldurulmuş kolona urasil ve sitozin çözeltisinden belirli miktarlarda alınarak kolona verilir. Kolondan çıkan eluant UV spektrofotometresi ile analiz edilir(şekil 18).

Tablo: 15

Nükleik Asit Bazlarının Elüsyonu

<u>Nük. Asit Bazları</u>	<u>pik</u>	
	<u>t(sn)</u>	<u>V(ml)</u>
Urasil (0.02 M, 30 ml)	1320	15.8
Sitozin(0.02 M, 30 ml)	1890	22.6

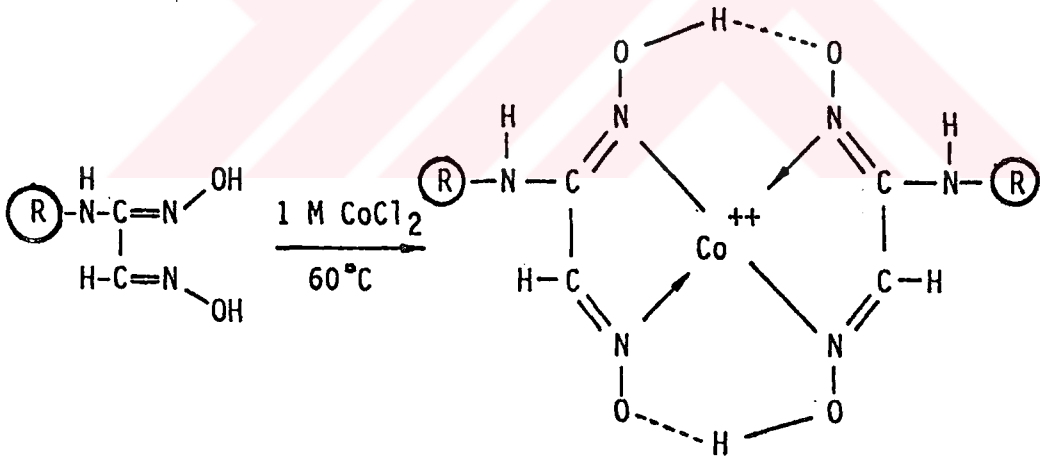


Şekil 18. Nükleik Asit Bazlarının Elüsyonu: 0.5 M NH_3 ,
 $\phi=1 \times 30$ cm, $V=30$ ml, $\lambda=260$ nm

VII. 6. Co^{++} YÜKLÜ anti-DİAMİNOETİLGİOKSİM-SPORO-
POLLENİN(Co^{++} Yüklü aDAEG-Sporopollenin)

Hazırlanışı:

1 M Kobalt(II) klorür çözeltisi hazırlanır. Bu çö-
zelti aDAEG-Sporopollenine eklenir. Süspansiyonun pH sı 6.5
ve sıcaklığı 60°C ye getirilerek bir gece boyunca bir manye-
tik karıştırıcı ile karıştırılır. Süspansiyon süzülerek saf
ve eter ile yıkanır. Daha sonra elde edilen bu reçine kolon-
lara doldurularak ayırma işlemleri yapılır. Reaksiyon:



Co^{++}
Yüklü anti-Diaminoetilglioksim-Sporopollenin
(Co^{++} Yüklü anti-DAEG-Sporopollenin)

Co⁺⁺ Yüklü aDAEG-Sporopollenin Reçinesi ile Ayırma İşlemleri:

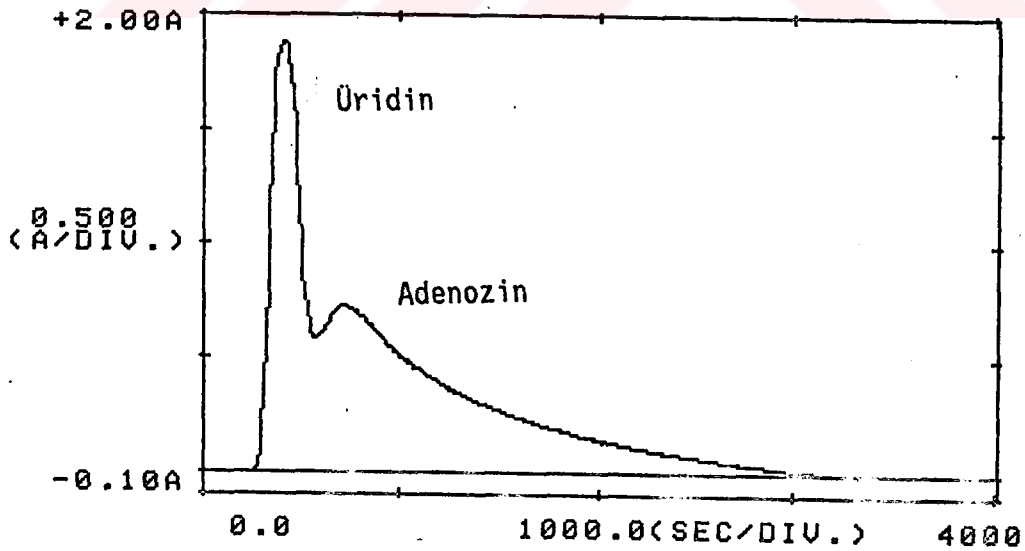
A- Nükleositlerin Ayırılması:

Reçine ile dolu kolona uridin ve adenozin çözeltilerinden hazırlanan karışım injekte edilir. Amonyak eluantı kolondan geçirilmek suretiyle ayırma işlemleri gerçekleştirilir(Şekil 19).

Tablo: 16

Nükleositlerin Elüsyonu

Nükleositler	pik	
	t(sn)	V(ml)
Üridin (0.02 M, 25 ml)	500	6.6
Adenozin(0.02 M, 50 ml)	800	10.6



Şekil 19. Nükleositlerin Elüsyonu: 0.5 M NH₃, $\phi=1 \times 30$ cm,
V=40 ml, $\lambda=260$ nm

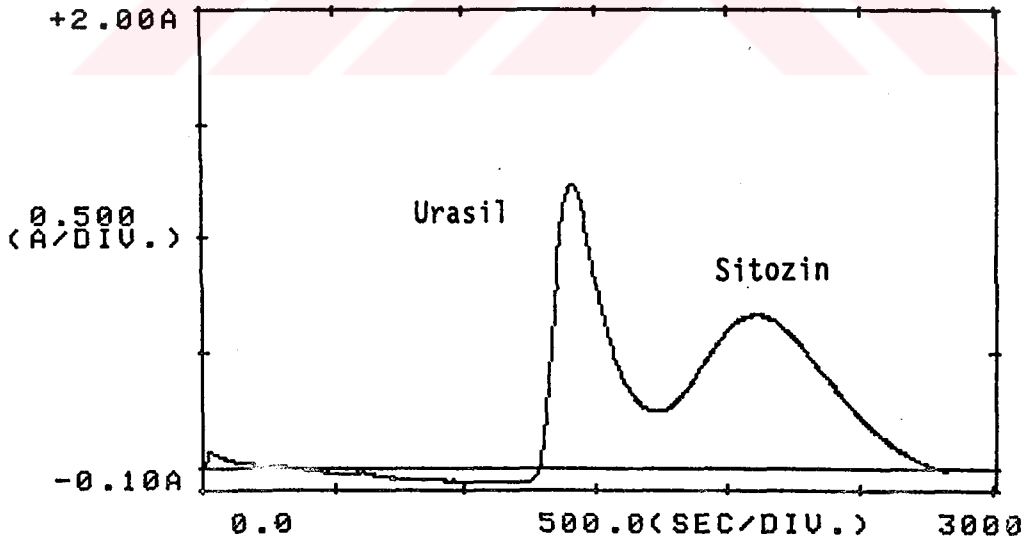
B- Nükleik Asit Bazlarının Ayırılması:

Kolona urasil ve sitozin çözeltisinden hazırlanan karışım injekte edilir. Amonyak çözeltisi eluant olarak kullanılarak ayırma yapılır(Şekil 19).

Tablo: 16a

Nükleik Asit Bazlarının Ayırılması

Nük. Asit Bazları	pik	
	t(sn)	V(ml)
Urasil (0.02 M, 30 ml)	1410	20.1
Sitozin(0.02 M, 30 ml)	2110	30.1



Şekil 19. Nükleik Asit Bazlarının Elüsyonu: 0.5 M NH₃

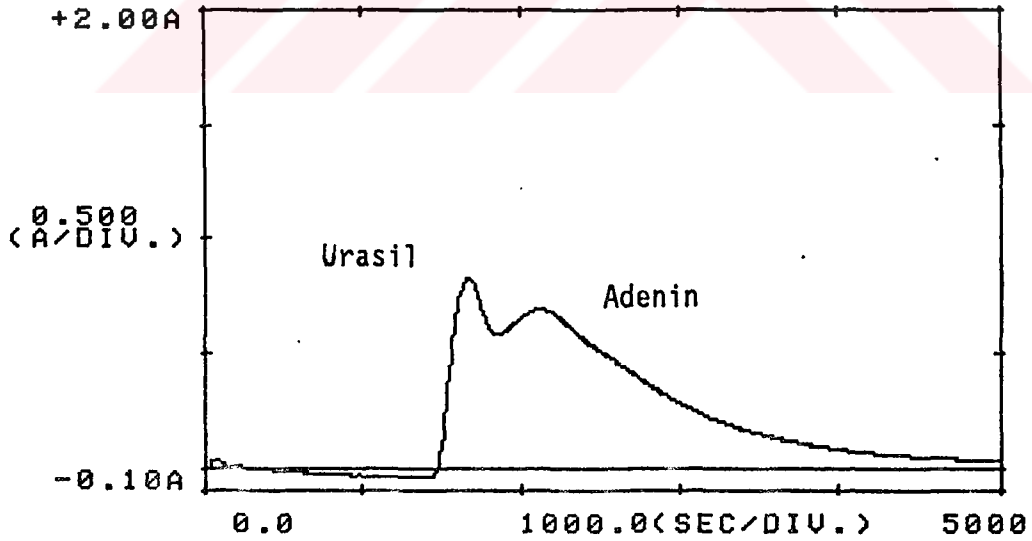
$\phi=1 \times 20$ cm, $V=40$ ml, $\lambda=260$ nm

Kolona urasil ve adenin çözeltilerinden hazırlanan karışımlar injekte edilir. Eluant olarak amonyak kullanılır. Kolondan çıkan çözelti UV Spektrofotometreyle analiz edilir (Şekil 20).

Tablo: 17

Nük. Asit Bazları

Nük. Asit Bazları	pik	
	t(sn)	V(ml)
Urasil (0.02 M, 30 ml)	900	6.7
Adenin (0.02 M, 30 ml)	1200	9.0



Şekil 20. Nükleik Asit Bazlarının Elüsyonu: 0.05 M NH₃,
 $\phi=1 \times 30$ cm, V=30 ml, $\lambda=260$ nm

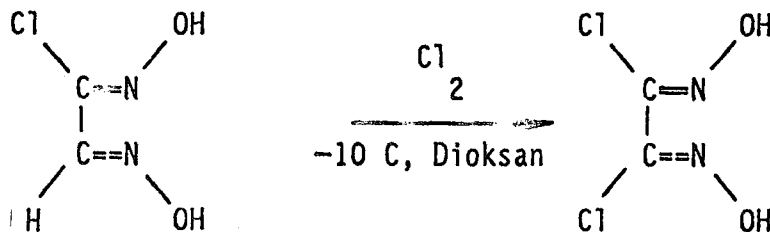
VII. 7. Cu^{++} YÜKLÜ bis-DİAMİNOETİLGİOKSİM-SPORO-
POLLENİN(Cu^{++} Yüklü b-DAEG-Sporopollenin)

Nükleositlerin, nükleik asit bazlarının ve aminlerin ligand-değiştirici reçine ile ayrılması, Lycopodium Clavatumun, gliksimle fonksiyonel hale getirilip yeni bir reçine olarak kullanılması ile gerçekleştirilebilir. Gliksimli Lycopodium Clavatum ligand-değiştirici reçinesi ligandların ayrılmasında kullanışlı bir metottur.

Hazırlanışı:

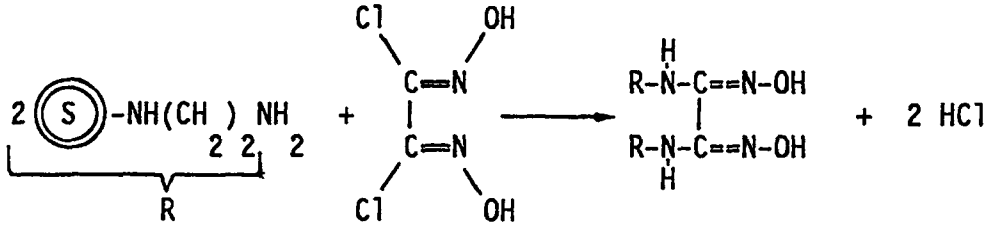
1- Diklor-anti-Gliksimin Hazırlanması:

Diklor-anti-gliksim şöyle elde edilir: 10 gr klor-antigliksim 70 ml dioksan içerisinde çözünür. Çözelti sıcaklığı yaklaşık -10°C ye ayarlanır ve klor gazı çözelti içerisinde yarım saat kadar geçirilir. Deneyler güneş ışığında yapılır. Kap içerisinde beyaz kristaller oluşur. Çökelek süzülür ve dioksanla yıkanarak kurutulur. Reaksiyon:



2- bis-Diaminoetilgliksim-Sporopollenin Hazırlanması

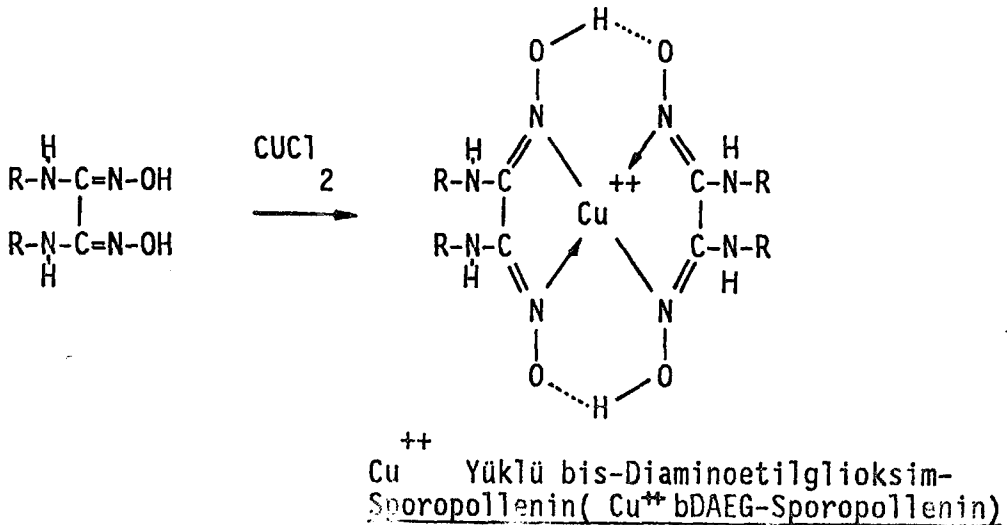
30 gr toz halindeki diaminoetil-Sporopollenin bir reaksiyon kabına konur. 10 gr diklor-antiglyoxime bu reçineye eklenir. Süspansiyon 24 saat oda sıcaklığında karıştırılır. Daha sonra reçine saf su ile, sulu asetik asit çözeltisi ile ve tekrar su ile yıkanır. Reaksiyon:



3- Cu⁺⁺ Yüklü Gliksimaminoetilporopollenin

Hazırlanması:

bis-Diaminoetilgliksim-Sporopollenine, 1 M CuCl₂ çözeltisi eklenerek metal yüklü hale getirilir. Süspansiyon bir gece CuCl₂ çözeltisi ile karıştırılır. Böylece Cu⁺⁺ metali reçine iskeletine girer. Fazla CuCl₂ saf su ile yıkanır. Metal-ligand kompleks reaksiyonu aşağıda gösterilmiştir:



Kolonun Doldurulması:

Tüm deneyler oda sıcaklığında yapılmıştır. Kullanılacak ligand-değiştirici 1 M amonyak çözeltisi ile muamele edilir. Bu süspansiyon bir resorvar ile ayırma yapacağımız kolona doldurulur. Peristaltik pompa yardımı ile amonyak çözeltisi kolondan geçirilir. Bir kaç saat bu işleme devam edilerek reçinenin kolona sıkıca doldurulması sağlanır.

VII. 7. i. DIFFERANSİYEL REFRAKTOMETRE İLE AYIRMA

İŞLEMLERİ

Numune elüsyon için kullanacağımız çözücü ile hazırlanır. Ayırma tesbiti iki hücreli differansiyel refraktometre ile yapılır. Eluant peristaltik pompa yardımı ile önce refraktometrenin referans hücresinden, daha sonra kolondan ve tekrar refraktometre hücreden geçirilerek ayırma işlemi gerçekleştirilir. Kolondan çıkan eluant, bazen toplanarak, reçineden metal sızıntısı olup olmadığı kontrol edilir. Yapılan testlerde metal kaçağı olmadığı görülmüştür.

A- Nükleosidlerin ve Nükleik Asit Bazların

Ayırılması:

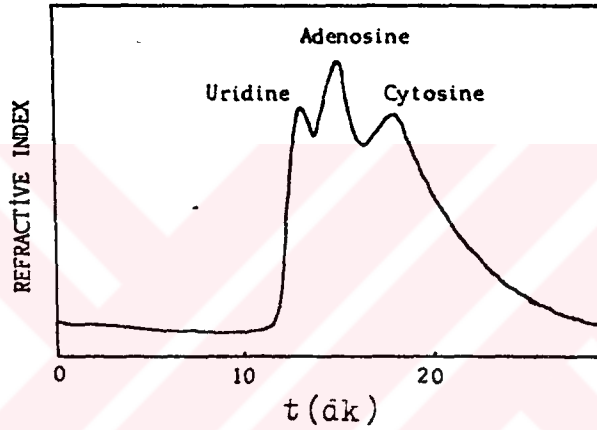
Üridin, Adenozin ve Sitozin çözeltilerinden belirli miktarda mikropipetle alınarak kolona injekte edilir.

Kolondan çıkan eluant differansiyel refraktometreden geçirilerek pikler kaydediciden alınır(Şekil 21).

Tablo 18

Nükleositlerin ve Nük. Asit Baz. Retensiyon Hacimleri

<u>Nükleositler ve Nük. A. Bazları</u>	<u>pik</u>	
	<u>t(dk.)</u>	<u>V(ml)</u>
Üridin (0.02 M, 0.05 ml)	13.0	11.8
Adenozin(0.02 M, 0.35 ml)	15.0	13.6
Sitozin (0.02 M, 0.50 ml)	18.0	16.3



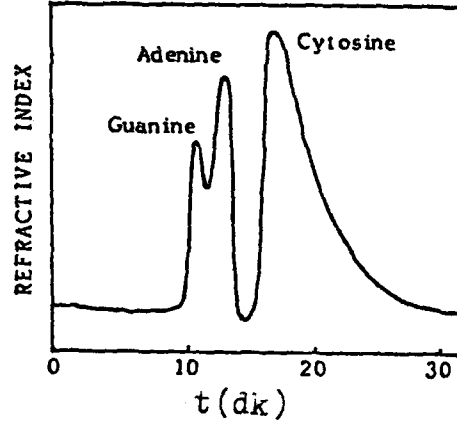
Şekil 21. Nükleositlerin ve Nük. Asit Baz. Elüsyonu: 1 M NH₃
 $\phi=1 \times 30$ cm

Kolona adenin, guanin ve Sitozin çözeltisi bir mikropipetle injekte edilir. Amonyak eluant olarak kullanılarak kolondan çıkan çözelti refraktometre ile analiz edilir.

Tablo: 19

Nükleik Asit Baz. Re.Hacimleri

<u>Nük .Asit Bazları</u>	<u>t(dk)</u>	<u>pik</u>
		<u>V(ml)</u>
Guanin (0.02 M, 0.1 ml)	13.0	12.6
Adenin (0.02 m, 0.1 ml)	15.0	14.5
Sitozin(0.02 M, 0.1 ml)	19.0	18.4



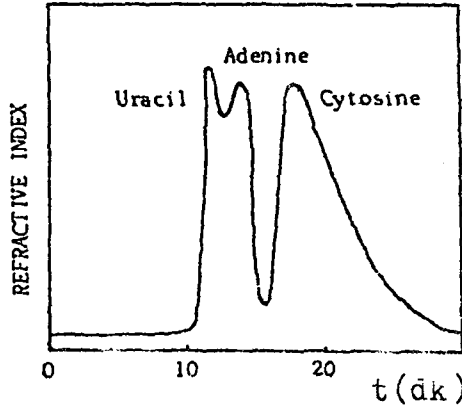
Şekil 22. Nükleik Asit Baz. Elüsyonu: 1 M NH_3 , $\phi=30$ cm

Reçine ile dolu kolona urasil, adenin ve sitozin çözeltileri injekte edilir ve kolondan çıkan eluant analiz edilerek kromatogramlar kaydedilir(Şekil 23).

Tablo: 20

Nük. Asit Bazlarının Retensiyon Hacimleri

Nük. Asit Bazları	t(dk)	pik V(ml)
Urasil (0.02 M, 0.50 ml)	12.0	11.2
Adenin (0.02 M, 0.10 ml)	14.0	13.1
Sitozin(0.02 M, 0.40 ml)	18.0	16.8



Şekil 23. Nükleik Asit Bazlarının Elüsyonu: 1 M Amonyak

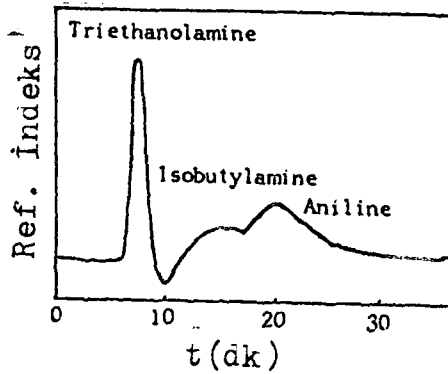
B- Aminlerin Ayırılması

Trietanolamin, isobutilamin, anilin ve dietilamin çözeltilerinden alınan belli miktardaki nünuneler karıştırılıp kolona bir injektör ile verilir. Kolondan çıkan eluant refraktometre ile sürekli analiz edilerek kromatogramlar kaydedilir(Şekil . 24).

Tablo: 20

Aminlerin Elüsyonu

Aminler	t(dk)	pik V(ml)
Trietanolamin(0.25 mmol)	7.30	7.3
İzobutilamin (1.25 mmol)	15.00	15.0
Anilin (1.25 mmol)	20.00	20.0

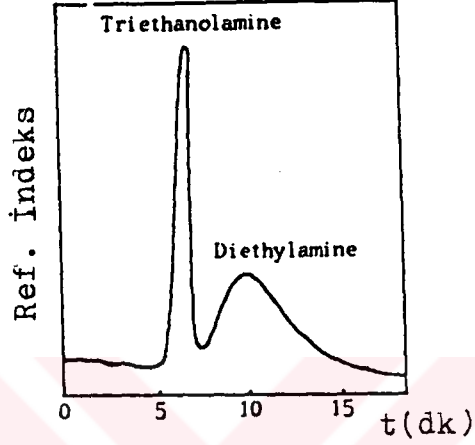


Şekil 24. Aminlerin Elüsyonu: 2.5 M Amonyak

Tablo: 21

Aminlerin Elüsyonu

<u>Aminler</u>	<u>t(dak)</u>	<u>pik</u> <u>V(ml)</u>
Trietanolamin(0.05 mmol)	6.0	5.7
Dietilamin (0.25 mmol)	11.0	10.5

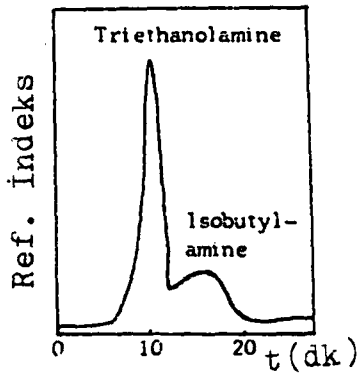


Şekil 25. Aminlerin Elüsyonu: 2.5 M Amonyak

Tablo: 22

Aminlerin Elüsyonu

<u>Aminler</u>	<u>t(dak)</u>	<u>pik</u> <u>V(ml)</u>
Trietanolamin(0.05 mmol)	10.30	8.8
İzobütilamin (0.05 mmol)	16.30	13.9



Şekil 26. Aminlerin Elüsyonu: 2.5 M Amonyak

VII. 7.ii. UV-SPEKTROFOTOMETRE İLE AYIRMA İŞLEMLERİ

Nükleositlerin ve nükleik asit bazlarının ayırılması UV-spektrofotometre kullanılarak tamamlanmıştır. Cu^{++} yüklü bis-DAEG-Sporopollenin reçinesi kolona doldurulur. Amonyak çözeltisi eluant olarak kullanılarak ayırma işlemi yapılır.

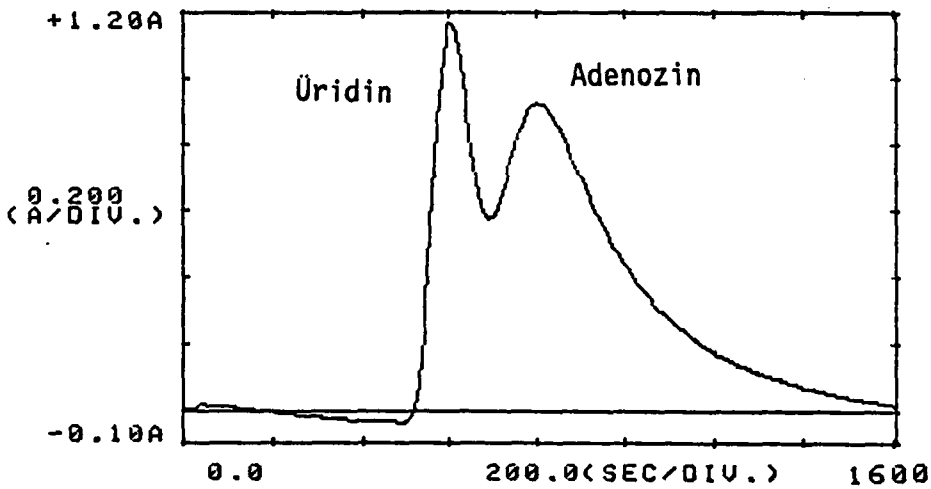
A- Nükleositlerin Ayırılması

Kolona üridin ve adenozin çözeltisinden alınan numuneler bir injektör ile verilir. Eluant olarak amonyak çözeltisi kullanılır. Kolondan çıkan eluant UV-Spektrofotometre ile analiz edilir(Şekil 270).

Tablo: 23

Nükleositlerin Ret. Hacimleri

Nükleositler	t(sn)	pik V(ml)
Üridin (0.02 M, 5 ml)	600	5.0
Adenozin(0.02 M, 35 ml)	800	6.7



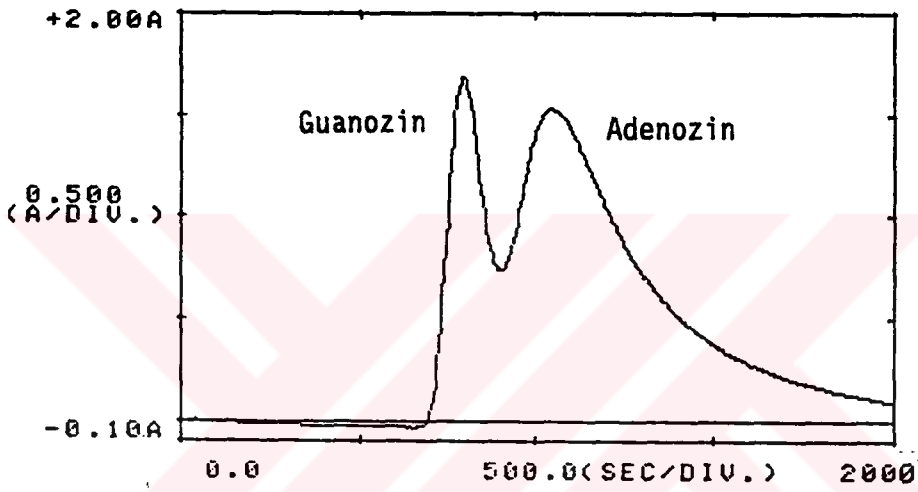
Şekil 27. Nükleositlerin Elüsyonu: 1 M NH_3 , $\phi=15$ cm, $\lambda=254$

Guanozin ve adenozin çözeltilerinden alınan numuneler kolona verilir ayırma işlemleri yapılır.

Tablo: 24

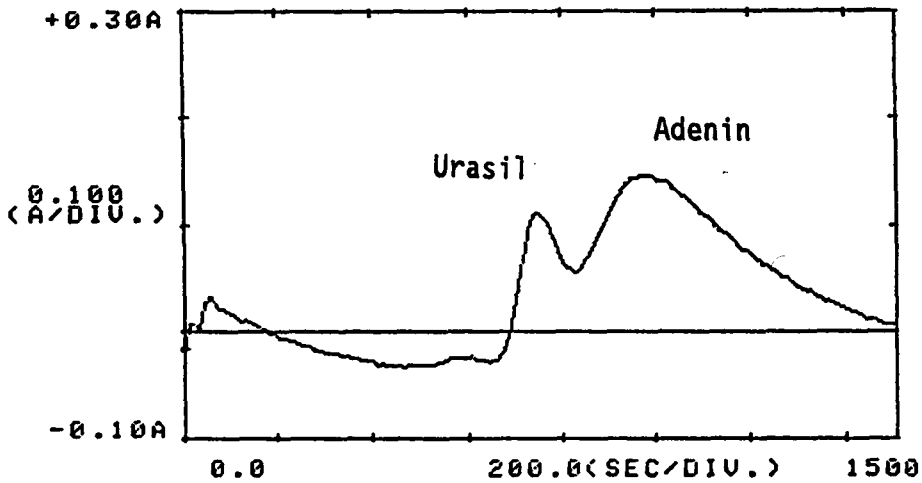
Nükleositlerin Ret. Hacimleri

<u>Nükleositler</u>	<u>t(sn)</u>	<u>V(ml)</u>
Guanozin(0.02 M, 20 ml)	800	6.6
Adenozin(0.02 M, 40 ml)	1100	9.1



Şekil 28. Nükleositlerin Elüsyonu: 1 M NH₃, $\phi=1 \times 15$, $\lambda=254$ nm

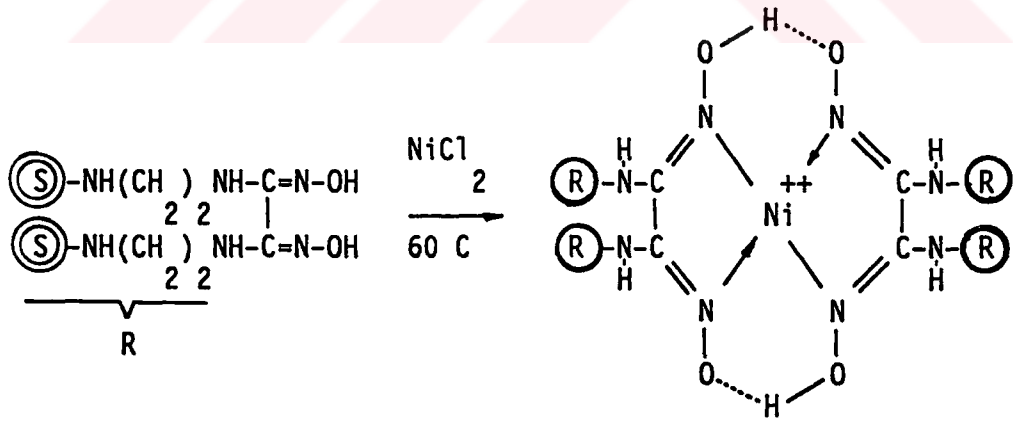
B- Nükleik Asit Bazlarının Elüsyonu



Şekil 29. Nük. Asit Baz. El.: 1 M NH₃, $\phi=15$, V=13.5, $\lambda=254$

VII. 8. Ni⁺⁺ YÜKLÜ bis-DİAMİNOETİLGİOKSİM-SPORO-
POLLENİN(Ni⁺⁺ Yüklü bDAEG-Sporopollenin)

1 M NiCl₂ çözeltisi hazırlanır. NiCl₂ çözeltisi daha önceden hazırlanan bDAEG-Sporopollenin reçinesi ile karıştırılır. Süspansiyon pH sı 6-6.5 arasında ayarlandıktan ve sıcaklık 60°C ye getirildikten sonra bir manyetik karıştırıcı ile bir gece boyunca karıştırılarak geçiş metali olan Ni⁺⁺ in reçine yapısına girmesi sağlanır. Elde edilen reçine saf su ile süzüntüden Ni⁺⁺ iyonları çıkmayınca kadar yıkanır. Daha sonra reçine kurutulmaya bırakılır. Reaksiyon:



Ni⁺⁺ Yüklü bis-Diaminoetilgliksim-
Sporopollenin(Ni⁺⁺ Yüklü bDAEG-Spr.)

Ni⁺⁺ Yüklü bis-Diaminoetilglioksim-Sporopollenin ile
Ayırma işlemleri

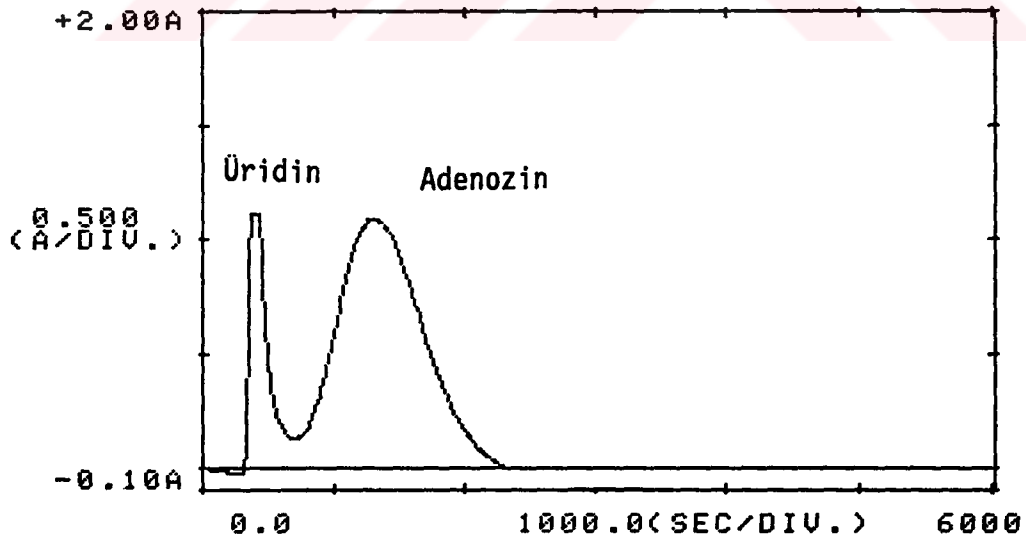
A- Nükleositlerin Ayırılması:

Bir mikropipet ile üridin ve adenzin çözeltisinden hazırlanan karışım kolona injekte edilir. Amonyak çözeltisi eluant olarak kullanılır ve kolondan çıkan maddeler UV-Spektrofotometre ile tesbit edilerek pikler kaydedilir.

Tablo: 25

Nükleositlerin Elüsyonu

<u>Nükleositler</u>	<u>t(sn)</u>	<u>V(ml)</u>
Üridin (0.02 M, 40 ml)	370	3.5
Adenzin(0.02 M, 40 ml)	1710	12.4



Şekil 30. Nükleositlerin Elüsyonu: 1 M NH₃, $\phi=1 \times 15$ cm,
V=20 ml, $\lambda=254$ nm

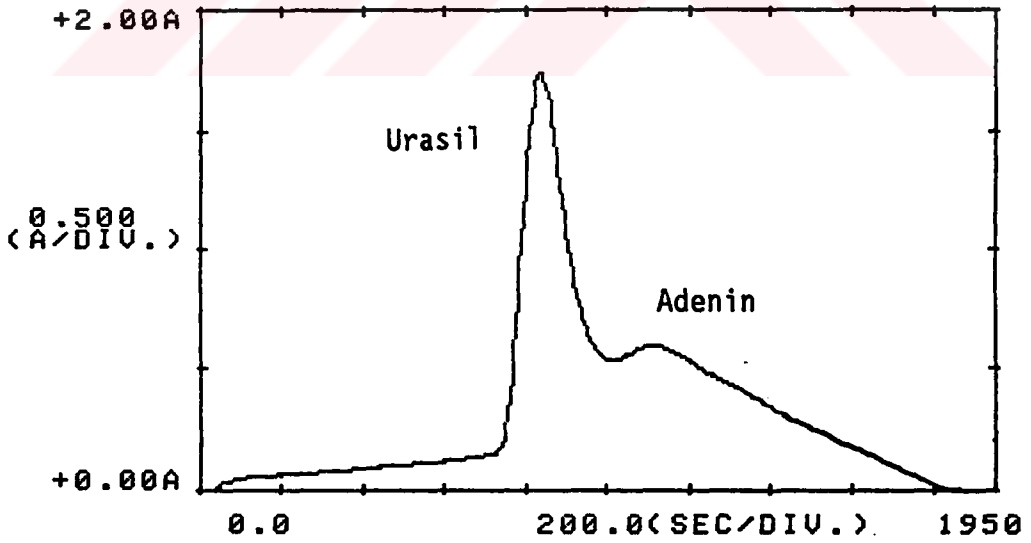
B- Nükleik Asit Bazlarının Ayırılması:

Ni⁺⁺ yüklü bDAEG-Sporopollenin ile doldurulmuş bulunan kolona urasil ve adenin çözeltisinden belli miktar alınarak kolona injekte edilir. UV-Spektrofotometre ile kromatogramlar kaydedilir(Şekil 31).

Tablo: 26

Nükleik Asit Baz. Elüsyonu

<u>Nük. Asit Bazları</u>	<u>pik</u>	
	<u>t(sn)</u>	<u>V(ml)</u>
Urasil(0.02 M, 40 ml)	835	7.9
Adenin(0.02 M, 40 ml)	1110	1.0

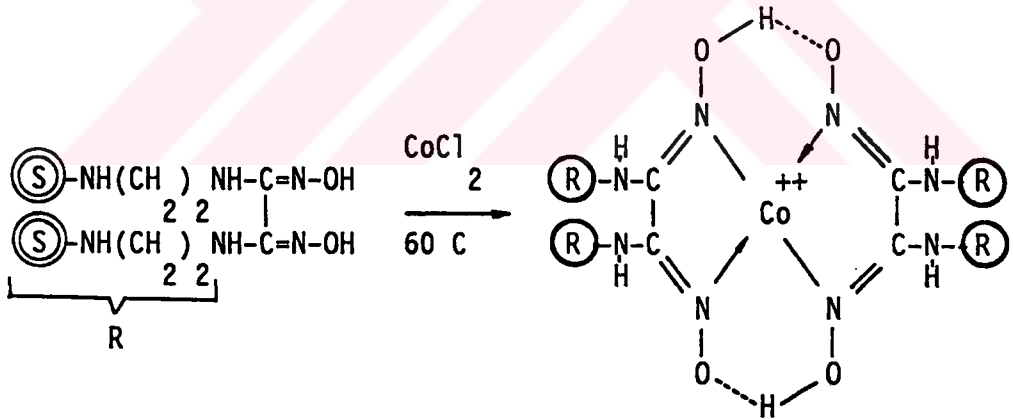


Şekil 31. Nük. Asit Bazlarının Elüsyonu: 1 M NH₄, $\phi=1 \times 15$ cm, V=19 ml, $\lambda=254$ nm

VII. 9. Co^{++} YÜKLÜ bis-DİAMİNOETİLGİOKSİM-SPORO-
POLLENİN(Co^{++} Yüklü bDAEG-Sporopollenin)

bDAEG-Sporopollenin reçinesine, 1 M CoCl_2 çözeltisi eklenir. Suspansiyon pH sı 6.5-7 ye ve sıcaklığı 60°C ye getirilerek bir manyetik karıştırıcı ile gece boyunca karıştırılır. Bu şekilde geçiş metali Co^{++} reçineye tutunur. Daha sonra süspansiyon, süzüntüden kobalt çıkmayınca kadar saf su ile yıkanır. Süzülen reçine kurutulmaya bırakılır

Reaksiyon:



Co^{++} Yüklü bis-Diaminoetilglioksim-
Sporopollenin(Co^{++} Yüklü bDAEG-Spr.)

++
Co Yüklü bis-Diaminoetilglioksim-Sporopollenin ile
Ayırma işlemleri

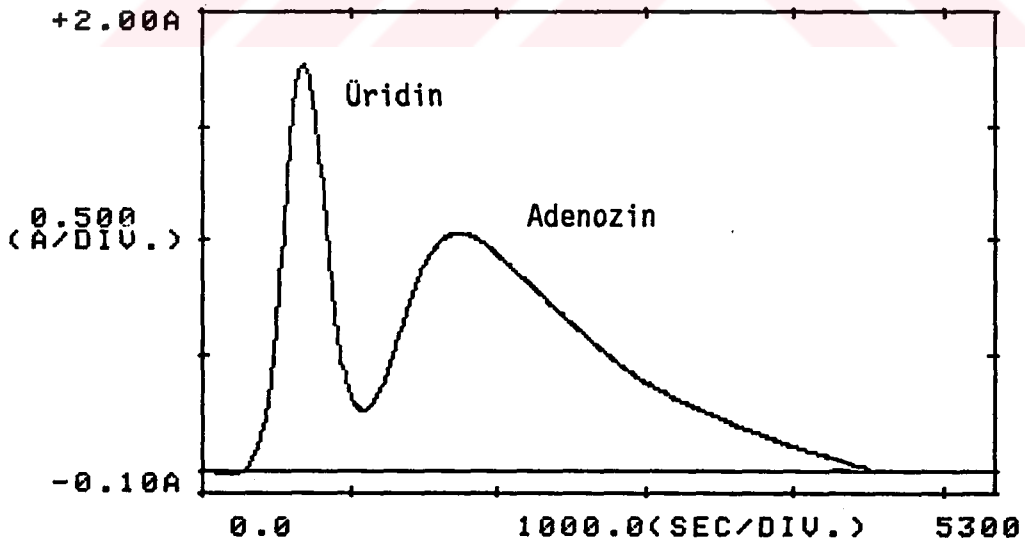
A- Nükleositlerin Ayırılması:

Bir mikropipet ile üridin ve adenozin çözeltisinden hazırlanan karışım kolona injekte edilir. Amonyak çözeltisi eluant olarak kullanılır ve kolondan çıkan maddeler UV-Spektrofotometre ile tesbit edilerek pik kaydedilir.

Tablo: 27

Nükleositlerin Elüsyonu

<u>Nükleositler</u>	<u>pik</u>	
	<u>t(sn)</u>	<u>V(ml)</u>
Üridin (0.02 M, 25 ml)	680	6.8
Adenozin(0.02 M, 50 ml)	1740	17.4



Şekil 32. Nükleositlerin Elüsyonu: 1 M NH₃, $\phi=1 \times 30$ cm,
V=40 ml, $\lambda=260$ nm

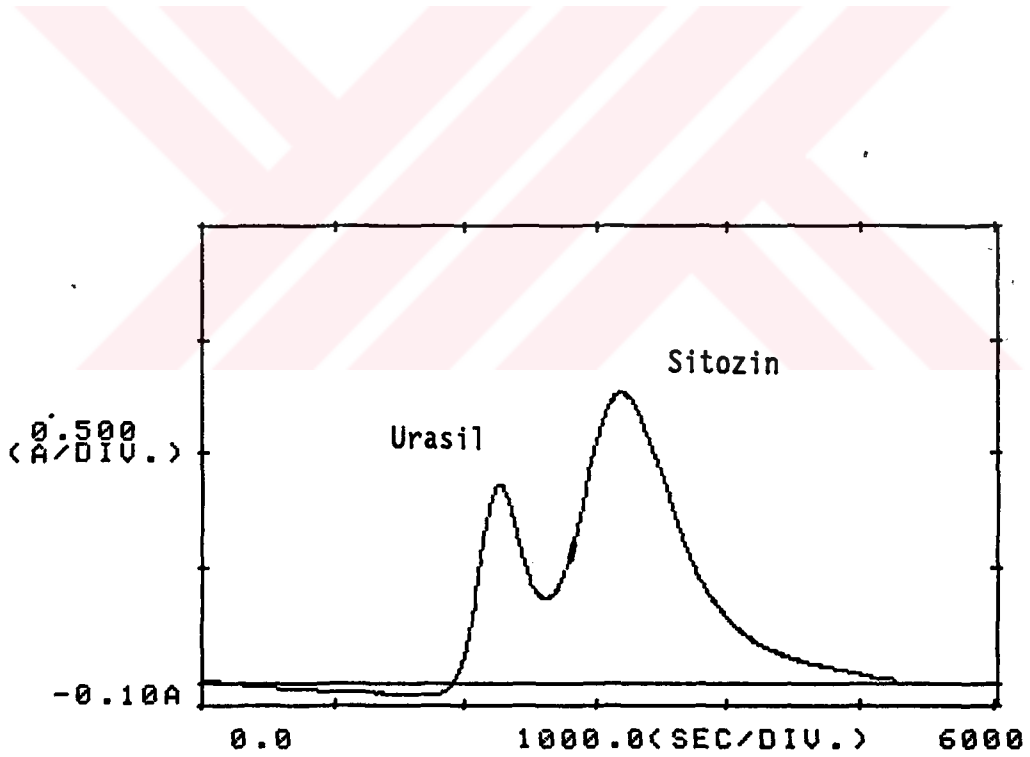
B- Nükleik Asit Bazlarının Ayırılması:

Urasil ve sitozin çözeltisinden bir karışım hazırlanarak kolona injekte edilir. Kolondan çıkan eluant UV Spektrofotometre ile analiz edilir(Şekil 33).

Tablo: 28

Nükleik Asit Baz. Elüsyonu

<u>Nük. Asit Bazları</u>	<u>pik</u>	
	<u>t(sn)</u>	<u>V(ml)</u>
Urasil(0.02 M, 30 ml)	2250	20.7
Adenin(0.02 M, 30 ml)	3190	29.3

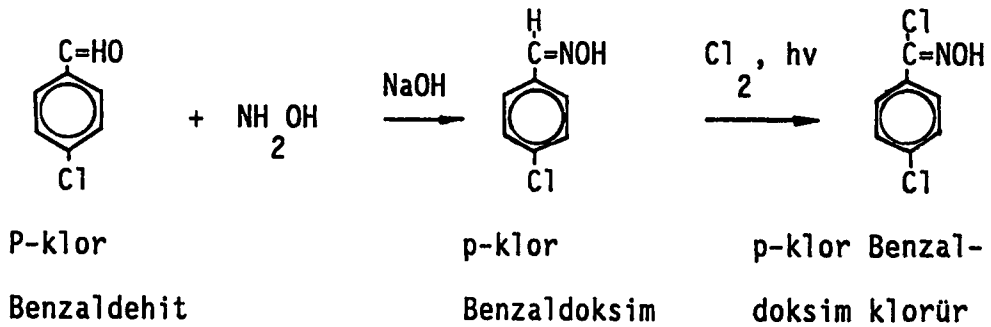


Şekil 33. Nük. Asit Bazlarının Elüsyonu: 1 M NH₃, $\phi=1 \times 30$ cm,
V=46 ml, $\lambda=260$ nm

VII. 10. p-klor BENZALDOKSİMDİAMİNOETİL-SPOROPOLLENİN(P-kBDAE-Sporopollenin)

Hazırlanışı:

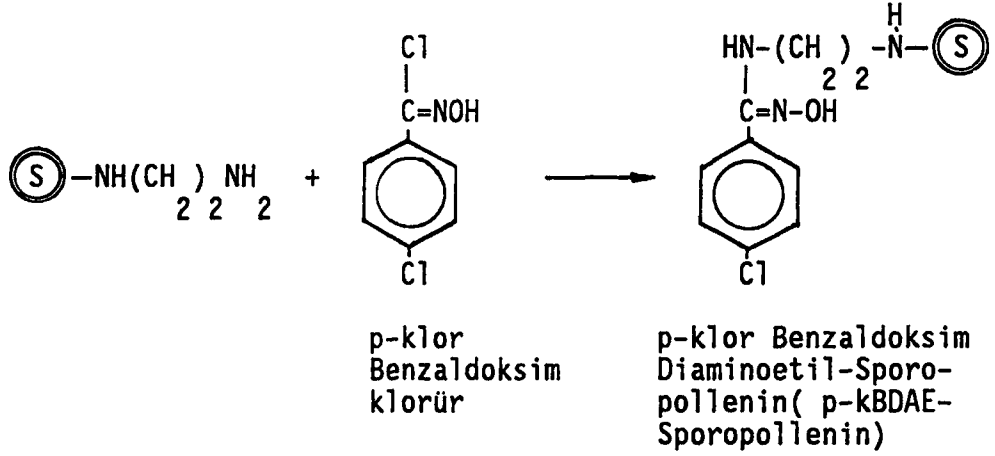
12 gr Hidroksilamin hidroklorür saf su içerisinde çözülür. Bir beher içerisinde hazırlanan 2 M, 200 ml NaOH çözeltisi, hidroksilamin hidroklorür çözeltisi ile karıştırılır. Çözelti soğutulduktan sonra içerisine 20 gr p-klor benzaldehit bir pipetle yavaş yavaş ilave edilir. Çözelti bir saat geri soğutucu ile kaynatılır. Bu çözelti soğutulur ve 2 N lik seyreltik HCl asit çözeltisi çökeltme meydana gelinceye kadar çözeltiye eklenir. Çökeltinin birkaç kere olması için fazlasıyla HCl çözeltisi ilave edilir. Çökelek saf su ile yıkanarak süzülür. Daha sonra çökelek sıcak su içerisinde çözülür. Eğer çözülme az ise üzerine yavaş yavaş etil alkol ilave edilir. Çözelti soğutulularak kristaller elde edilir. Reaksiyon:



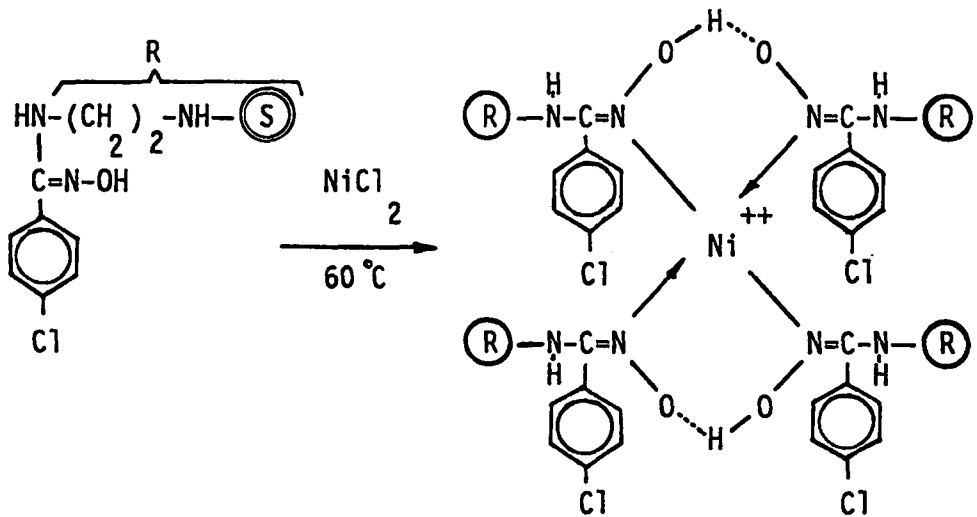
Elde edilen p-klor benzaldoksim klorür alkolde çözü-

nerek daha önce hazırlanmış olan DAE-Sporopollenine eklenir. Bu süspansiyon bir gece boyunca bir manyetik karıştırıcı ile karıştırılır. Süspansiyon süzülür ve saf su ile yıkanır.

Reaksiyon:



Daha sonra elde edilen süspansiyona 1 M NiCl₂ çözeltisi eklenir. Süspansiyon bir gece boyunca sıcaklık 60 °C ve pH 6-6.5 getirilerek bir manyetik karıştırıcı ile karıştırılır. Süspansiyon süzülerek saf su ile bir kaç kere yıkanır ve kurutulmaya bırakılır. Reaksiyon:



++
Ni Yüklü p-klor Benzaldoksimdiaminoetil-Sporopollenin(p-kBDAE-Sporopollenin)

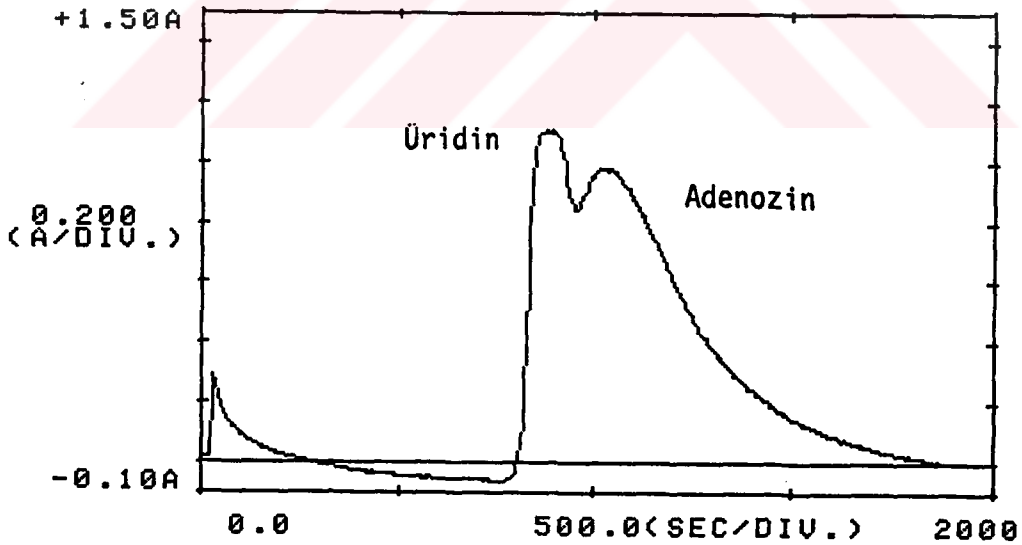
Ni⁺⁺ Yüklü p-klor Benzaldoksimdiaminoetil-Sporopol-
lenin ile Ayırma İşlemleri

A- Nükleositlerin Ayırılması:

Reçine ile doldurulmuş olan kolona üridin ve adenzin çözeltisinden alınarak injekte edilir. UV-Spektrofotometre ile kolondan çıkan eluant analiz edilir(Şekil 34).

Tablo: 29

<u>Nükleositler</u>	<u>t(sn)</u>	<u>V(ml)</u>
Üridin (0.02 M, 30 ml)	875	14.5
Adenzin(0.02 M, 30 ml)	1030	17.1

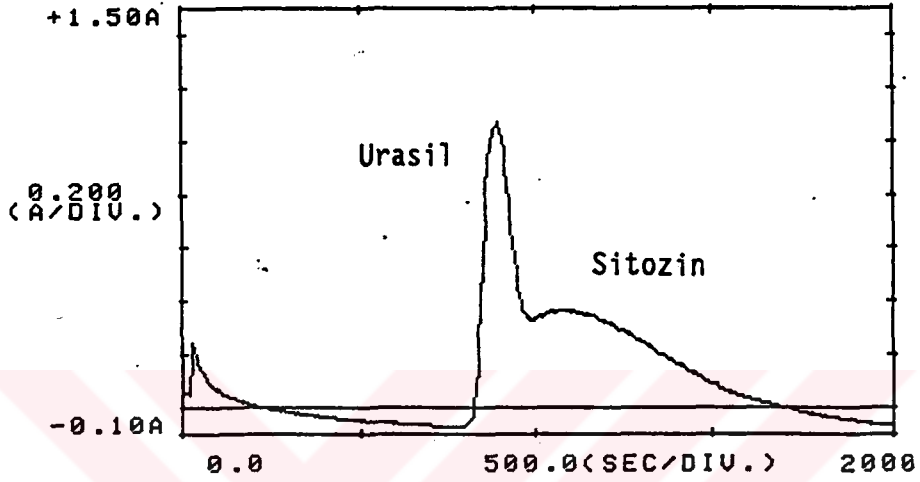


Şekil 34. Nükleositlerin Elüsyonu: 0.2 M Amonyak, $\phi=1 \times 30$ cm,
V=30 ml, $\lambda=260$ nm

B- Nükleik Asit Bazlarının Ayırılması:

Tablo: 30

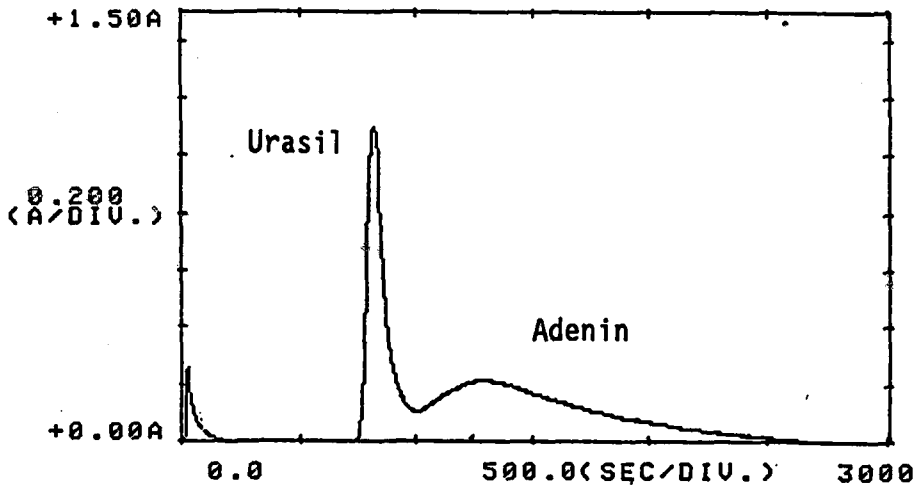
	$t(\text{sn})$	$V(\text{ml})$
Urasil (0.02 M, 30 ml)	460	7.36
Sitozin(0.02 M, 30 ml)	700	11.20



Şekil 35. Nük. Asit Bazlarının Elüsyonu: 0.2 M Amonyak, $\phi=1 \times 30$ cm, $V=32$ ml, $\lambda=260$ nm

Tablo: 31

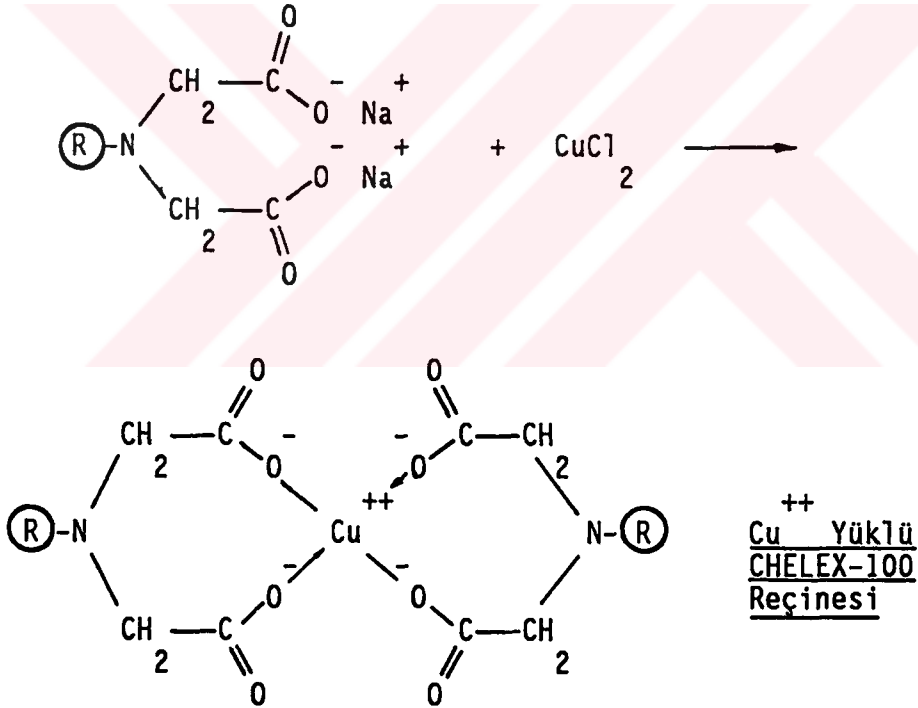
	$t(\text{sn})$	$V(\text{ml})$
Urasil(0.02 M, 30 ml)	815	15.6
Adenin(0.02 M, 30 ml)	1295	24.8



Şekil 36. Nük. Asit Baz.: 0.2 M Amon., $\phi=30$, $V=48$ ml, $\lambda=260$

VII. 11. Cu^{++} YÜKLÜ CHELEX-100 REÇİNESİ

20 gr Chelex-100 reçinesine 1 M, 100 ml CuSO_4 eklenir. Süspansiyon gece boyunca bir manyetik karıştırıcı ile karıştırılır. Reçine süzülerek saf su ile yıkanır ve 1 M amonyak çözeltisi ile şişmeye bırakılır. Şişen reçine kolonlara doldurulur. Kolon içerisinde birkaç saat 1 M lık amonyak peristaltik pompa ile geçirilir. UV Spektrofotometre ile kolondan çıkan eluant analiz edilir. Reaksiyon:



Cu^{++} Yüklü Chelex-100 Reçinesi ile Ayırma İşlemi

A- Nükleositlerin Ayırılması:

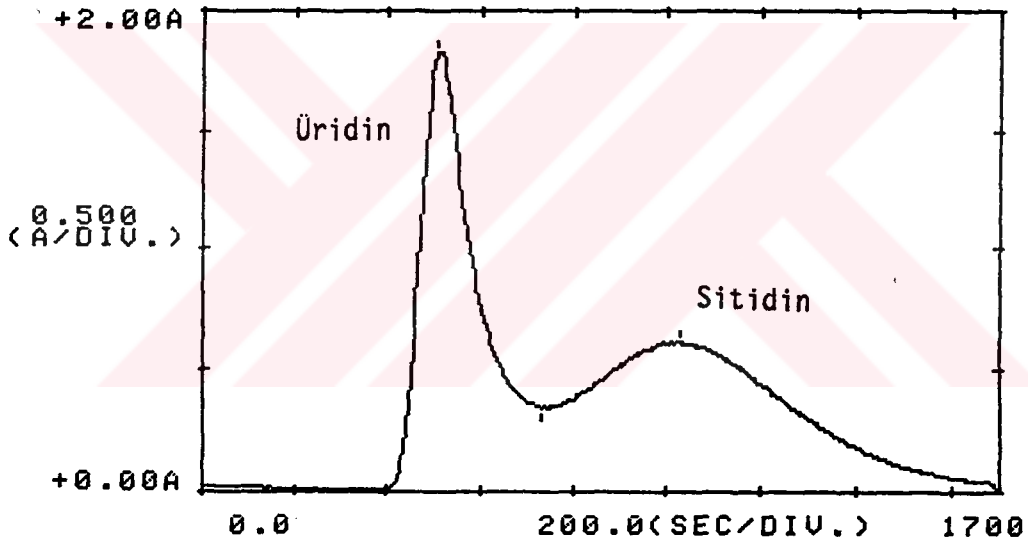
Bir mikropipet yardımı ile önceden hazırlanmış bulunan üridin ve sitidin çözeltisinden alınarak kolona injekte

edilir. 1 M amonyak çözeltisi eluant olarak kullanılarak ayırma yapıp, kromatogramlar kaydedilir(Şekil 37).

Tablo: 32

Nükleositlerin Ret. Hacimleri

Nükleositler	pik	
	t(sn)	V(ml)
Üridin (0.02 M, 30 ml)	505	7.7
Sitidin(0.02 M, 30 ml)	1025	15.6



Şekil 37. Nükleositlerin Elüsyonu: 1 M NH₃, $\phi=1 \times 30$ cm,
V=26 ml, $\lambda=260$ nm

B- Nükleik Asit Bazların Ayırılması:

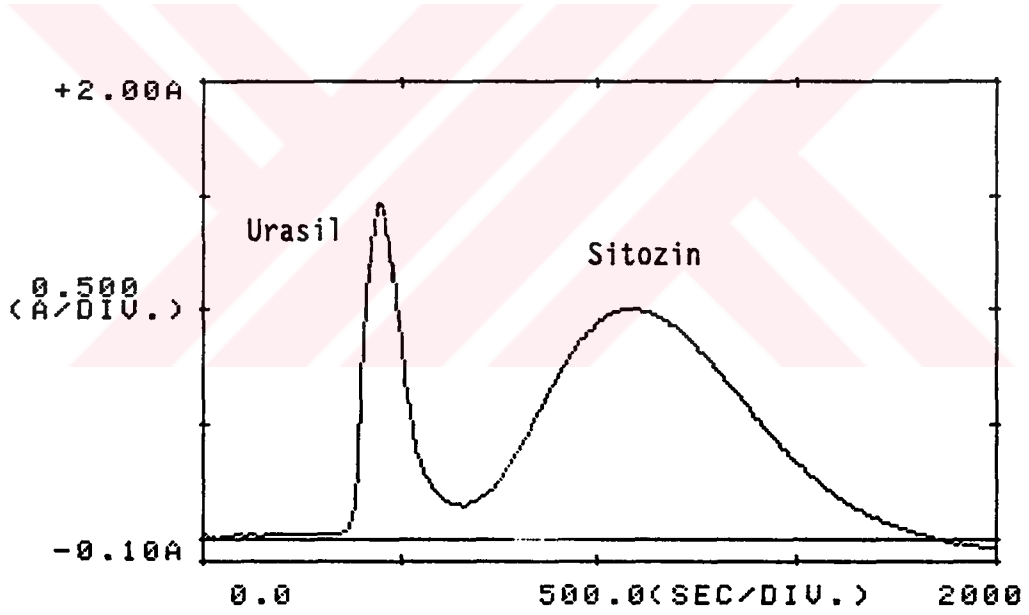
Cu⁺⁺ yüklü Chelex-100 reçinesi ile doldurulmuş bulunan kolona önceden hazırlanan urasil ve sitozin bir mikropipet ile injekte edilir. Kolondan çıkan eluant UV

Spektrofotometre ile tesbit edilerek absorbans pikleri kaydedilir(Şekil 38).

Tablo: 33

Nük. Asit Baz. Retensiyon Hacimleri

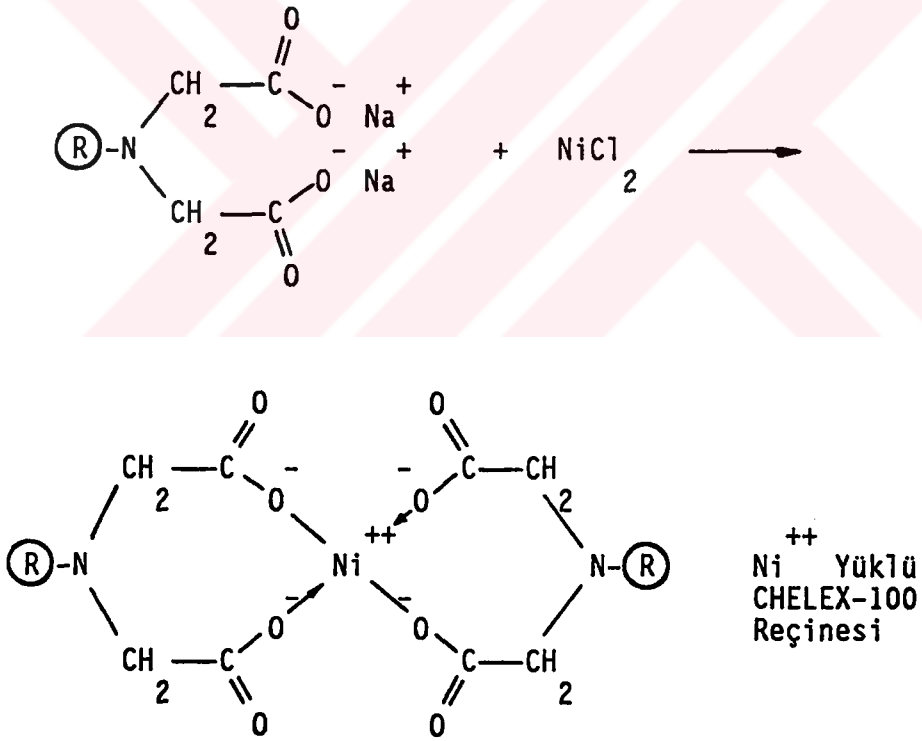
Nük. Asit Bazları	pik	
	t(sn)	V(ml)
Urasil (0.02 M, 50 ml)	420	13.6
Sitozin(0.02 M, 50 ml)	1090	35.4



Şekil 38. Nük. Asit Bazların Elüsyonu: 0.5 M NH₃, $\phi=1 \times 30$ cm,
V=65 ml, $\lambda=254$ nm

VII. 12. Ni⁺⁺ YÜKLÜ CHELEX-100 REÇİNESİ

20 gr Chelex-100 reçinesine 1 M, 100 ml CuCl₂ çözeltisi eklenir. Reçineyi Ni⁺⁺ yüklü hale getirmek için gece boyunca bir manyetik karıştırıcı ile karıştırılır. Metal yüklü hale gelen reçine süzülür ve süzüntüden Ni⁺⁺ iyonları görünmeyecek hale gelinceye kadar yıkama işlemine devam edilir. Reçine kolonlara doldurularak ayırma işlemi gerçekleştirip kromatogramlar kaydedilir. Reaksiyon:



Ni⁺⁺ Yüklü Chelex-100 Reçinesi ile Ayırma İşlemi

A- Nükleositlerin Ayırılması:

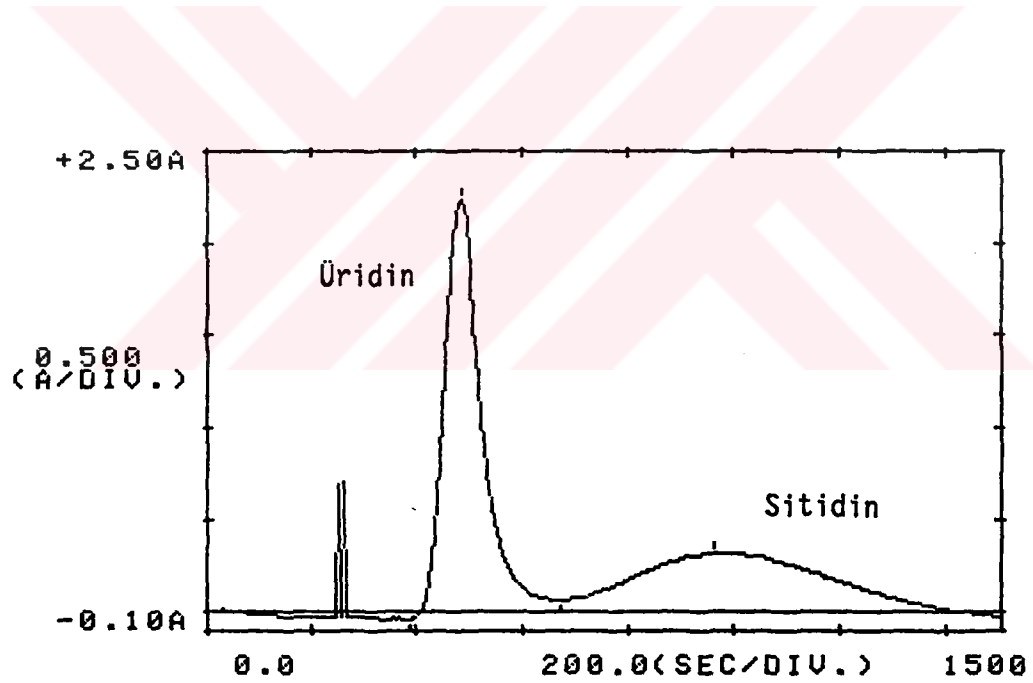
Üridin ve sitidin çözeltisinden alınan numuneler kolona in-

mekte edilir. Kolondan çıkan eluant analiz edilir(Şekil 39). Üridin, sitidine göre kolondan daha önce çıkmıştır. Sitidin reçineye üridinden daha kuvvetli bağlanarak kolondan daha geç çıkmıştır.

Tablo: 34

Nükleositlerin Retensiyon Hacimleri

<u>Nükleositler</u>	<u>t(sn)</u>	<u>V(ml)</u>
Üridin (0.02 M, 30 ml)	485	7.7
Sitidin(0.02 M, 30 ml)	965	15.4



Şekil 39. Nükleositlerin Elüsyonu: 1 M NH₃, $\phi=1 \times 30$ cm,
V=24 ml, $\lambda=260$ nm

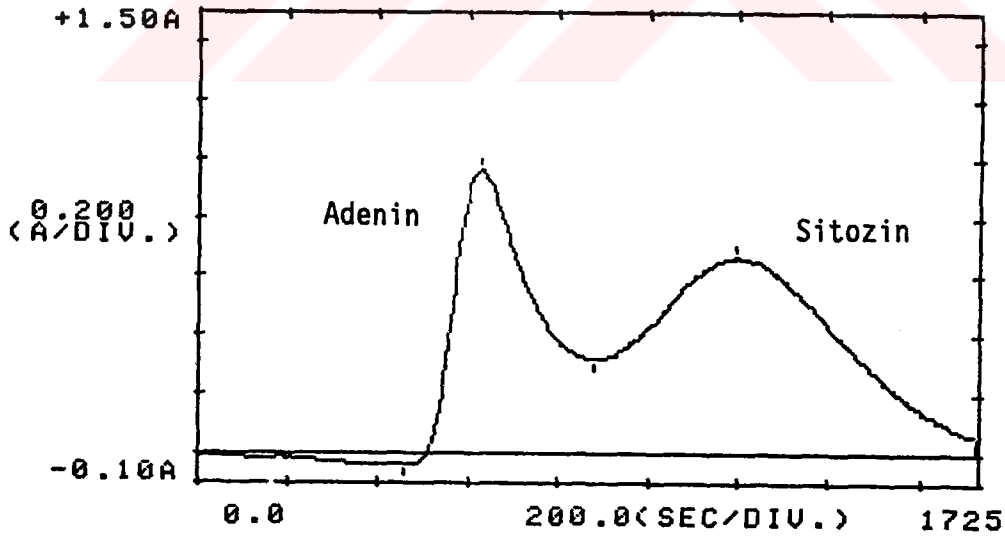
B- Nükleik Asit Bazlarının Elüsyonu:

Reçine yüklü kolona adenin ve sitozin çözeltisi karıştırılarak injekte edilir. 1 M amonyak çözeltisi eluant olarak kullanılır. Şekil 40 da görüleceği gibi reçineye tutunma kuvvetine bağlı olarak komponentlerin ayırılma sırası adenin ve sitozin şeklinde olacaktır.

Tablo: 35

Nük. Asit Baz. Retensiyon Hacimleri

Nük. Asit Bazları	pik	
	t(sn)	V(ml)
Adenin (0.02 M, 20 ml)	625	8.3
Sitozin(0.02 M, 40 ml)	1195	15.9



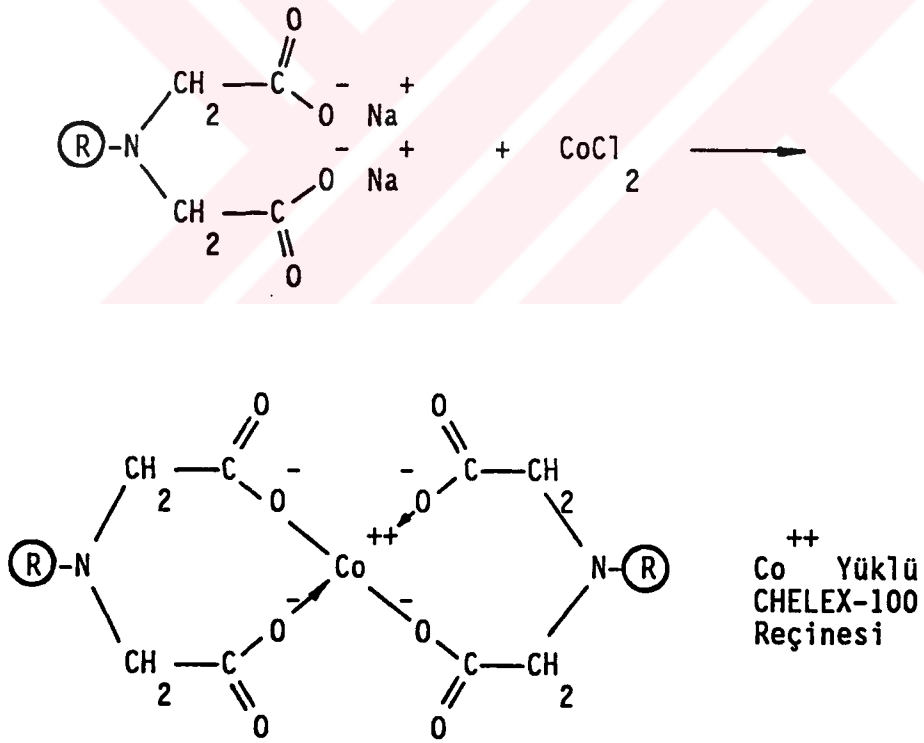
Şekil 40. Nük. Asit Bazlarının Elüsyonu: 1 M NH₃, $\phi=1 \times 30$ cm,
V=23 ml, $\lambda=260$ nm

VII. 13. Co^{++} YÜKLÜ CHELEX-100 REÇİNESİ

Hazırlanışı:

20 gr Chelex-100 reçinesine 1 M 100 ml CoCl_2 çözeltisi eklenerek elde edilen çözelti gece boyunca bir karıştırıcı ile karıştırılır. Elde edilen Co^{++} yüklü Chelex-100 reçinesi filitre edilir ve bir kaç kere saf su ile yıkanır. Reçine 1 M amonyak çözeltisi ile şişmeye bırakılır.

Reaksiyon:



Co⁺⁺ Yüklü Chelex-100 Reçinesi ile Ayırma İşlemi

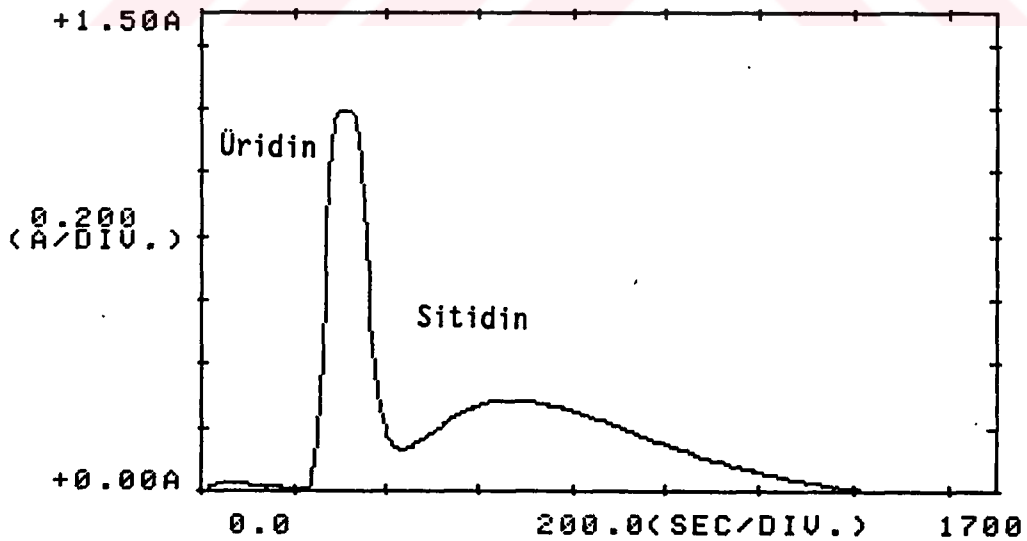
A- Nükleositlerin Ayırılması:

Üridin ve sitidin çözeltilerinden belirli miktarda alınarak kolona karışım halinde injekte edilir. Ligandlar, amonyak eluantı ile kolonda yürütülür. Şekil 41 de görüldüğü gibi üridin, sitidine göre reçineye daha zayıf tutunduğu için kolondan önce çıkmıştır.

Tablo: 36

Nükleositlerin Retensiyon Hacimleri

Nükleositler	pik	
	t(sn)	V(ml)
Üridin (0.02 M, 30 ml)	310	8.1
Sitidin(0.02 M, 30 ml)	665	17.2



Şekil 41. Nükleositlerin Elüsyonu: 1 M NH₃, $\phi=1 \times 30$ cm,
V=39 ml, $\lambda=260$ nm

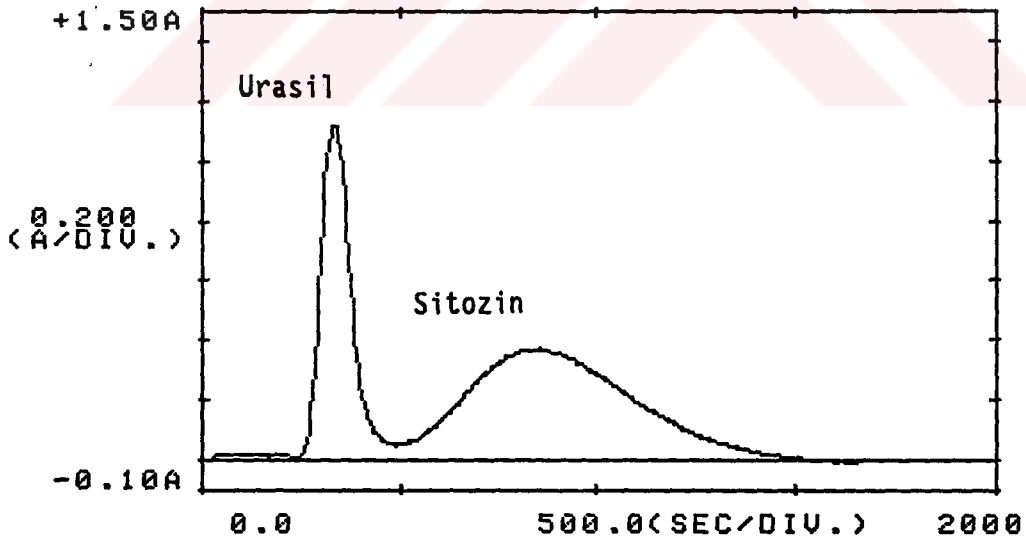
B- Nükleik Asit Bazlarının Ayırılması:

Co^{++} yüklü Chelex-100 reçinesi ile dolu olan kolona urasil ve sitozin karışımları bir injektor ile verilir. 1 M amonyak çözeltisi eluant olarak kullanılarak reçine ile ayırma yapılır(Şekil 42).

Tablo: 37

Nük. Asit Baz. Ret. Hacimleri

Nük. Asit Bazları	pik	
	t(sn)	V(ml)
Urasil (0.02 M, 30 ml)	310	7.6
Sitozin(0.02 M, 30 ml)	665	16.4



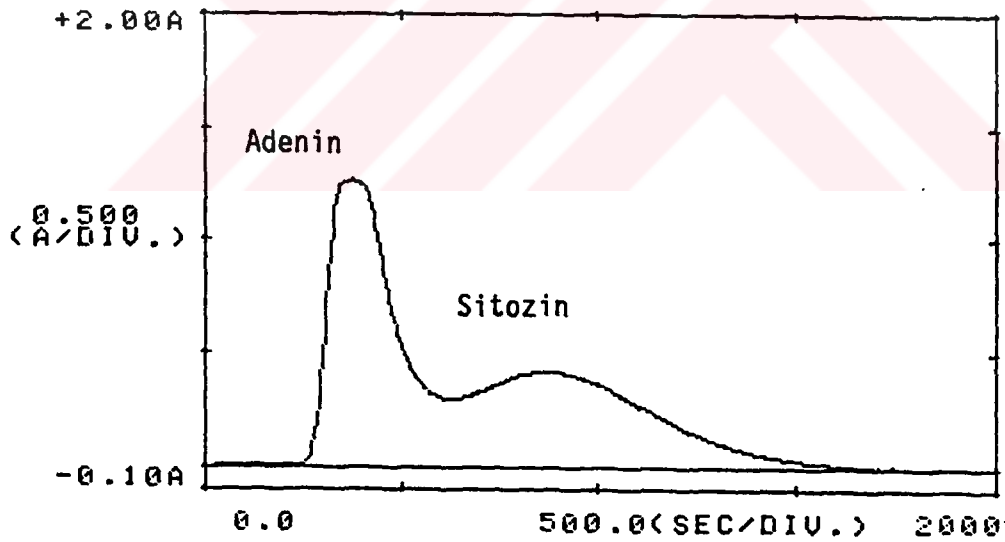
Şekil 42. Nük. Asit Baz. Elüsyonu: 1 M NH_3 , $\phi=1 \times 30$ cm,
 $V=37$ ml, $\lambda=260$ nm

Reçine dolu kolona adenin ve sitozin karışımları verilir. Kolondan çıkan maddeler UV Spektrofotometre ile analiz edilerek kromatogramlar kaydedilir(Şekil 43).

Tablo: 38

Nük. Asit Baz. Ret. Hacimleri

<u>Nük. Asit Bazları</u>	<u>pik</u>	
	<u>t(sn)</u>	<u>V(ml)</u>
Adenin (0.02 M, 30 ml)	375	10.0
Sitozin (0.02 M, 30 ml)	870	23.2



Şekil 43. Nük. Asit Bazları Elüsyonu: 1 M NH₃, $\phi=1 \times 30$ cm,
V=40 ml, $\lambda=260$ nm

VIII. KOLON ELÜSYONU ÜZERİNE ETKİ EDEN FAKTÖRLER

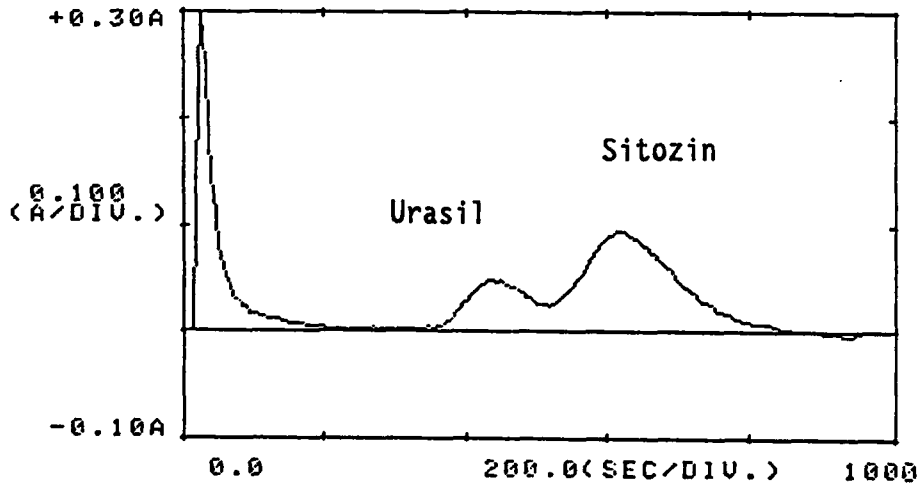
1- AYIRILACAK MADDELERİN KONSANTRASYONUNUN AYIRMA ÜZERİNE ETKİSİ:

Urasil ve sitozin çözeltilerinden alınan değişik miktarlardaki numuneler karıştırıldıktan sonra kolonlara verilerek amonyak çözeltisi ile elüsyon işlemleri tamamlanır (Şekil 44).

Tablo: 39

Nük. Asit Bazları Elüsyonu

<u>Nük. Asit Bazları</u>	<u>t(san)</u>	<u>V(ml)</u>
Urasil (0.02 M, 10 ml)	435	10.8
Sitozin(0.02 M, 10 ml)	620	15.5

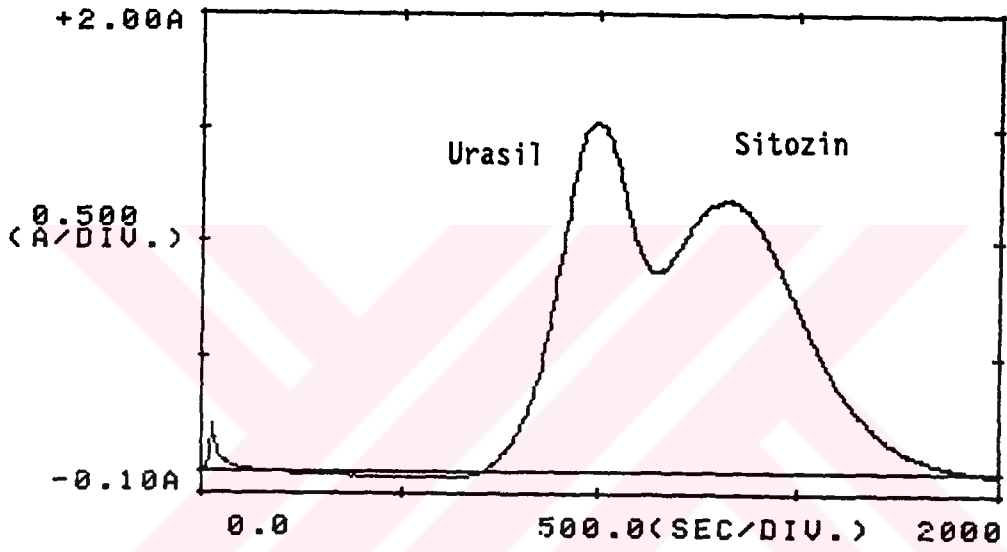


Şekil 44. Nük. Asit Bazlarının Elüsyonu: 1 M NH₃, $\phi=1 \times 20$ cm, V=20 ml, $\lambda=254$ nm.

Tablo: 40

Nük. Asit Baz. Retensiyon Hacimleri

<u>Nükleik Asit Bazları</u>	<u>pik</u>	
	<u>t(sn)</u>	<u>V(ml)</u>
Urasil (0.02 M, 20 ml)	995	9.95
Sitozin (0.02 M, 20 ml)	1330	13.3

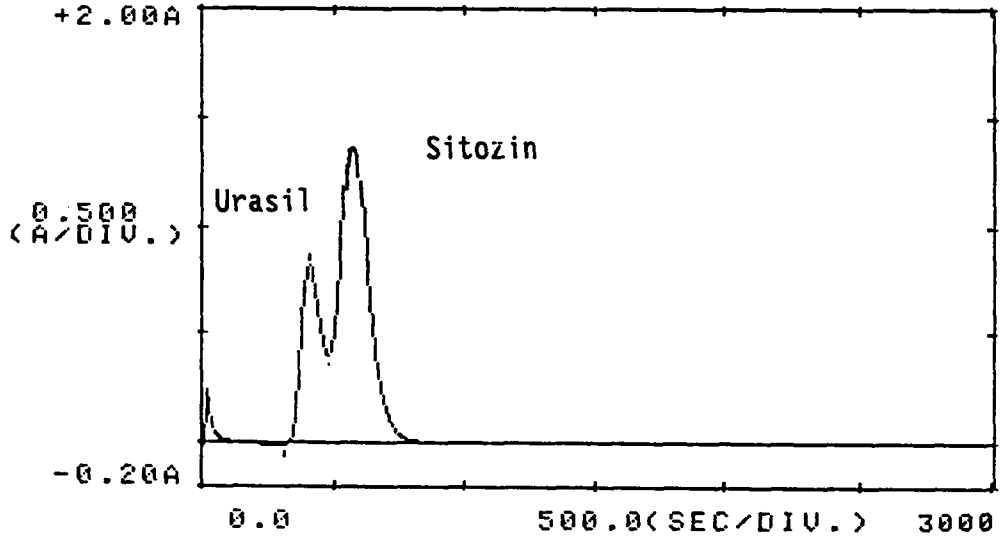


Şekil 45. Nükleik Asit Bazlarının Elüsyonu: 1M NH₃, $\phi=1 \times 20$ cm
V=20 ml, $\lambda=254$ nm

Tablo: 41

Nükleik Asit Bazları Elüsyonu

<u>Nük. Asit Bazları</u>	<u>pik</u>	
	<u>t(sn)</u>	<u>V(ml)</u>
Urasil (0.02 M, 40 ml)	405	10.1
Sitozin(0.02 M, 40 ml)	540	13.5



Şekil 46. Nük. Asit Bazları Elüsyonu: 1 M NH₃, $\phi=1 \times 20$ cm,
V=20 ml, $\lambda=254$ nm

Yukarıdaki şekillerden görüldüğü gibi ayrılacak maddelerin miktarları arttıkça pik yüksekliği artmakta ve madde miktarlarının artmasına orantılı olarak pik yüksekliği ve alanları orantılı olarak artmaktadır. Üç elüsyonda maddelerin birbirinden ayrılması net bir şekilde olmaktadır.

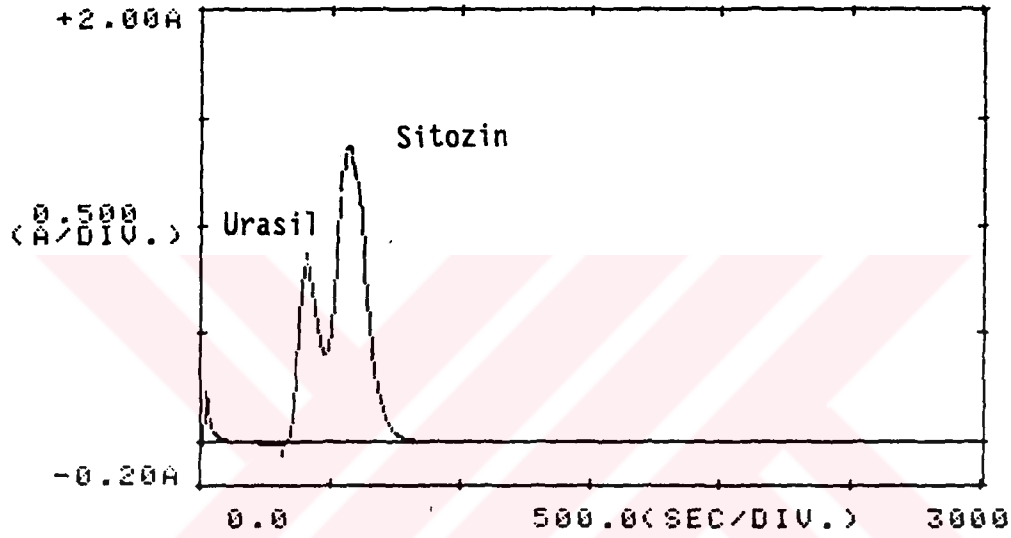
2- KOLON UZUNLUĞUNUN AYIRMA ÜZERİNE ETKİSİ

Değişik uzunluklardaki reçine ile doldurulmuş kolonlara urasil-sitozin ve üridin-sitidin karışımları verilmiştir. 1 M NH₃ çözeltisi eluant olarak kullanılarak kolonlardan çıkan çözeltiler UV spektrofotometre ile tesbit edilmiştir(Şekil 47).

Tablo: 42

Nükleik Asit Bazları Elüsyonu

Nükleik Asit Bazları	pik	
	t(sn)	V(ml)
Urasil(0.20 M, 40 ml)	400	10
Stozin(0.20 M, 40 ml)	600	15

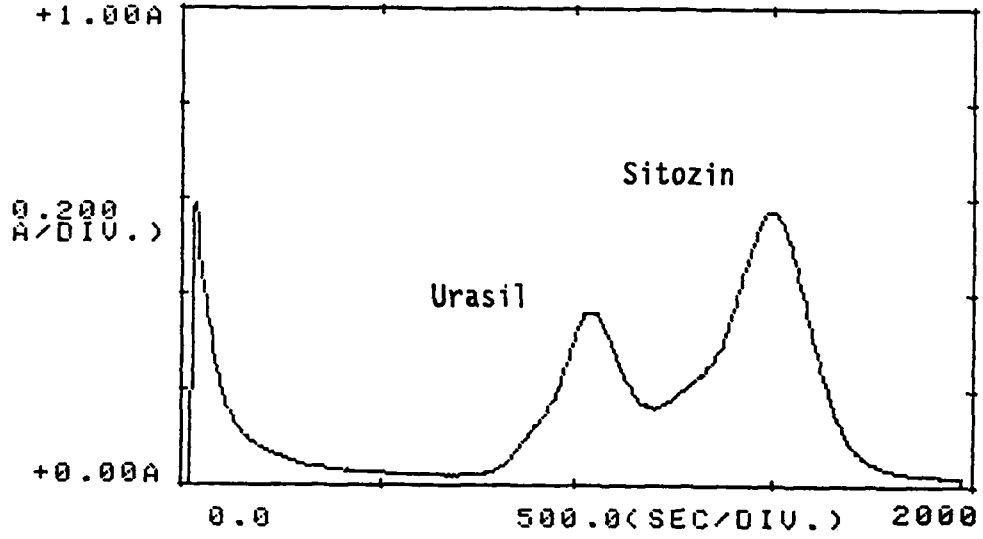


Şekil 47. Nükleik Asit Bazları Elüsyonu: 1M NH₃, $\phi=1 \times 15$ cm
V=20 ml, $\lambda=254$ nm

Tablo: 43

Nükleik Asit Bazları Elüsyonu

Nükleik Asit Bazları	pik	
	t(sn)	V(ml)
Urasil (0.02 M, 40 ml)	600	9.3
Sitozin(0.02 M, 40 ml)	1500	23.3



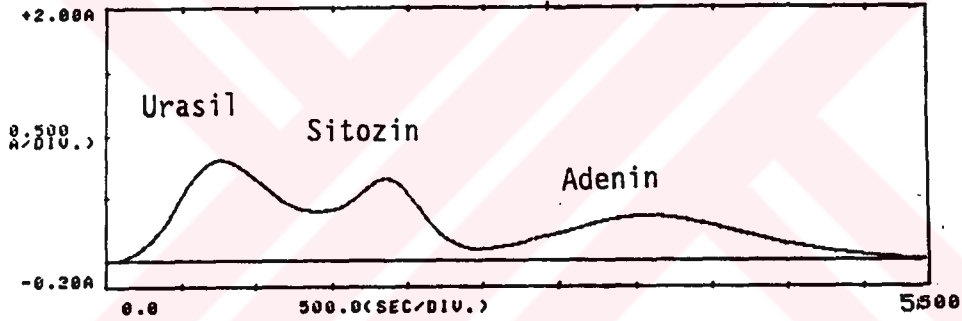
Şekil 48. Nük. Asit Bazları Elüsyonu: 1M NH₄, $\phi=1 \times 30$ cm
V=28 ml, $\lambda=254$ nm

Şekillerden görüleceği gibi urasil ve sitozinin biribirinden ayrılması her iki kolondada aynı sayılır. Kolon uzunluklarının değişmesiyle maddelerin kolondan çıkmaları biraz daha gecikmiş olur. Kolondaki reçine çok aktif olduğu için, kolon uzunluğunun değişmesiyle ayırmada meydana gelen değişiklikler sadece kolon boyunca ayrılacak olan maddelerin alıkonma sürelerinin uzamasıdır. Uzun kolonda maddeler daha uzun süre tutunmuştur. Ligand-Değiştirme olayı burada çok hızlı olmaktadır. Kolon uzunluğu küçük olsa bile maddeleri iyi bir şekilde ayırmak mümkündür. Kolon uzunluğunun artmasıyla reçinede tutunan ligandların eluantla kolondan sökülmesi gecikmektedir(Şekil 49).

Tablo: 44

Nükleik Asit Bazları Elüsyonu

<u>Nükleik Asit Bazları</u>	<u>pik</u>	
	<u>t(sn)</u>	<u>V(ml)</u>
Urasil (0.02 M, 40 ml)	745	7.4
Sitozin(0.02 M, 40 ml)	1855	18.5
Adenin (0.02 M, 40 ml)	3500	35.0



Şekil 49. Nükleik Asit Bazları Elüsyonu: 1M NH₃, $\phi=1 \times 60$ cm
V=50 ml, $\lambda=254$ nm

3. YÜRÜTÜCÜ VE SÖKÜCÜ FAZ (ELUANT) KONSANTRASYONUNUN DEĞİŞTİRİLMESİNİN AYIRMA ÜZERİNE ETKİSİ

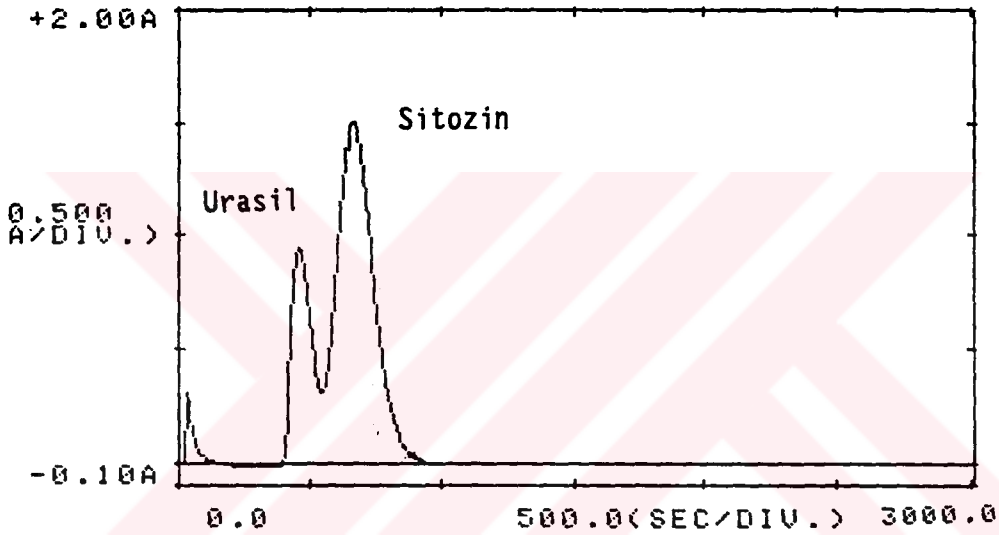
Reçine ile yüklü kolona urasil ve sitozin çözeltilerinden alınan karışım injekte edilir. Daha sonra eluant olarak kullanılan amonyak çözeltisi konsantrasyonu

değiştirilerek ayırmalar tamamlanır(Şekil 50).

Tablo: 45

Nükleik Asit Bazları Elüsyonu

Nükleik Asit Bazları	pik	
	t(sn)	V(ml)
Urasil (0.02 M, 50 ml)	460	5.7
Sitozin(0.02 M, 50 ml)	635	7.9

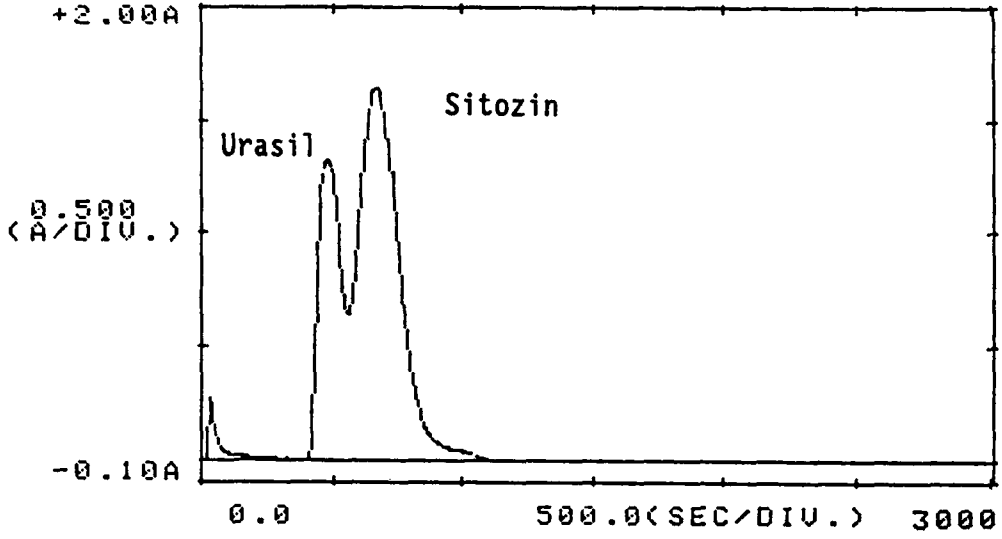


Şekil 50. Nük. Asit Bazları Elüsyonu: 1 M NH₃, $\phi=1 \times 15$ cm,
V=10 ml, $\lambda=260$ nm

Tablo: 46

Nük. Asit Bazları Elüsyonu

Nük. Asit Bazları	pik	
	t(sn)	V(ml)
Urasil (0.02 M, 50 ml)	465	5.2
Sitozin(0.02 M, 50 ml)	615	6.8



Şekil 51. Nük. Asit Bazları Elüsyonu: 2 M NH₃, $\phi=1 \times 15$ cm,
V=10 ml, $\lambda=260$ nm

Şekil 50 ve 51 den görüleceği gibi eluant olarak kullanılan amonyak konsantrasyonu artırılması kolondan çıkış süresini biraz kısaltmaktadır. Ayırma üzerine etkisi sınırlı olmuştur. Farklı eluant konsantrasyonlarında yapılan elüsyonlarla elde edilen pikler net olup yukarıda gösterilmiştir.

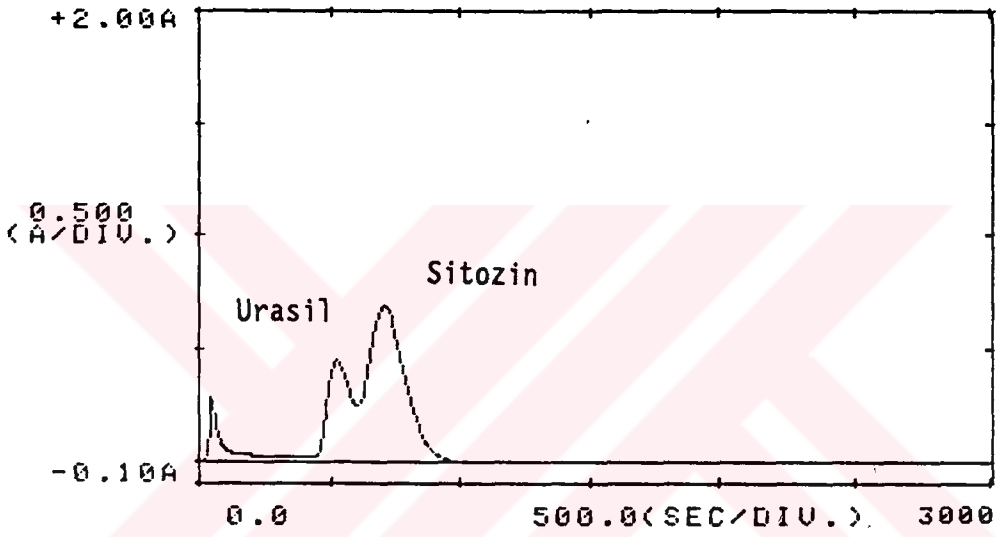
4- KOLONDAKİ AKIŞ HIZININ AYIRMA ÜZERİNE ETKİSİ

Reçine ile yüklü kolona urasil ve sitozin çözeltisinden bir mikropipet ile belirli hacimlerde alarak kolona injekte edilir. Daha sonra Peritaltik pompa hızı değiştirilmek suretiyle kolona gönderilen eluant hızı değiştirilir. Kolondan çıkan eluant, UV Spektrofotometresi ile analiz edilerek kromatogramlar kaydedilir(Şekil 52).

Tablo: 47

Nük. Asit Bazları Ret. Hacimleri

<u>Nük. Asit Bazları</u>	<u>pik</u>	
	<u>t(sn)</u>	<u>V(ml)</u>
Urasil (0.02 M, 20 ml)	600	7.2
Sitozin(0.02 M, 20 ml)	750	9.0



Şekil 52. Nük. Asit Bazları Elüsyonu: 2 M NH₃, $\phi= 1 \times 20$ cm,
V=12 ml, $\lambda=260$ nm

5- KOLONLARIN SERİ BAĞLANMASININ AYIRMA ÜZERİNE ETKİSİ

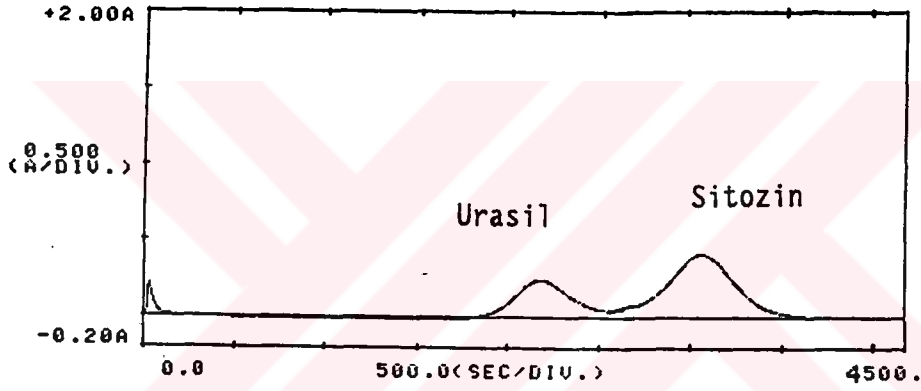
Ayırma işleminde 30 cm ve 15 cm uzunluktaki kolonlara Ni⁺⁺ yüklü KMDAE-Sporopollenin doldurularak birbirine seri bağlanmıştır. 30 cm uzunluğundaki kolona urasil ve sitozin injekte edilerek bir peristaltik pompa ile amonyak çözeltisi kolona verilir. 15 cm uzunluğundaki kolondan çıkan

eluant UV Spektrofotometresi ile analiz edilir(Şekil 53).

Tablo: 48

Nük. Asit Bazları Ret. Hacimleri

<u>Nük. Asit Bazları</u>	<u>pik</u>	
	<u>t(sn)</u>	<u>V(ml)</u>
Urasil (0.02 M, 25 ml)	2250	22.5
Sitozin(0.02 M, 25 ml)	3300	33.0



Şekil 53. Nük. Asit Bazları Elüsyonu: 2 M NH₃ . $\phi=1 \times 30$ cm,
V=38 ml, $\lambda=254$ nm

Ayırma işleminde elde edilen neticeler 50 cm lik uzun bir kolon kullanarak yapılan elüsyon işlemine benzemektedir. Elüsyon küçük uzunluktaki kolonlarla mukayese edildiği zaman çok bir fark yoktur. Seri bağlı kolonların kullanılması kolonda ayırmak istediğimiz maddelerin, sadece kolondan çıkışını geciktirmektedir. Ayırma üzerinde fazla bir değişiklik olmamıştır.

IX. LİGAND-DEĞİŞTİRME KİNETİĞİ

Ligandlar reçineye bağlandığı zaman, ligandların konsantrasyonuna bağlı olarak üç alternatif hız tayin etme metodu vardır.

1. Çözeltideki iyonların difüzyonu veya transportasyonu
2. İyon-Değiştirici reçine içindeki iyonların difüzyonu
3. İyon-değiştiricide bulunan fonksiyonel gruplardaki kısımlarda iyon-değiştirme olayı

Çözeltideki iyonların difüzyon olayına filim difüzyonu denir, hızı kontrol eden basamak iyon değiştiriciyi çevreleyen sıvı film arasından olan transportasyondur. İyon-değiştirici içinde olan difüzyona tanecik difüzyonu denir. Değiştirici tarafında kimyasal değişmeler olmaktadır. Tanecik difüzyonu veya kimyasal değiştirme; teşekkül eden komplekslerin tabiatına bağlı olan çok yavaş reaksiyon adımıdır(51).

Eğer reaksiyon, ligandların sıkıca nasıl bağlandığına bağlı ise gerçek kimyasal değiştirme reaksiyonu, hız tayin etme adımı olarak kullanılır. Yukarıdaki bahsedilene bağlı değilse, buna alternatif olarak reçine taneciğinden veya reçine taneciğine çevreleyen filimdeki difüzyon; hız tayin etme adımı olacaktır. Bu iki alternatifte açıkça ayırt edilebilir; çünkü ilkindeki olay karıştırma olayından etkilenmeyecektir; halbuki ikincisinde, karıştırma hızının

etkisi büyük olacaktır. Tanecik çapının reaksiyon hızı üzerine etkisi büyüktür. Bu nedenle reçine taneciklerinin homojen büyüklükte olması gerekmektedir(52).

Çalışmalarda ligand-değiştirici reçinelere yüklenmiş olan katyonlar ile şelat-değiştirme olarak nükleosit ve nükleik asit bazlarının tutunması ve bırakılması incelenmiştir. Ayırmalarda kullanılan Cu^{++} , Ni^{++} ve Co^{++} yüklü reçinelerde yavaş adım, (reaksiyon hızını tespit eden reaksiyon), kimyasal yer değiştirme reaksiyonudur. Reaksiyon hızını tayin etmek için, ligand-değiştirme esasında reçine çapında değişiklik olup olmadığını tespit edebilmek için; hazırlanan tabii ve sentetik reçinelere nükleosidlerden, üridin ve sitidin eklenerek reçine çapları mikroskop ile ölçülmüştür. Tablo(49) da görüleceği gibi ortalama reçine çaplarında değişiklik olmamıştır. Bu da lycopodium-Clavatum ligand değiştiricilerinde, hız tayin etmek için difüzyonu yerine, kimyasal yer değiştirme reaksiyonu hızı tayin etmedeki adım olarak seçilmiştir. Tablo (49) da ligand-değiştirme öncesi ve sonrasındaki ortalama reçine çapları gösterilmiştir.

Kinetik deneylerde yapılan işlemler şöyledir: Belli bir miktar kurutulmuş reçine bir beher içerisine konur. Belli miktar saf su ligand-değiştirici reçineye eklenir. Bir manyetik karıştırıcı ile reçine karıştırılır. Beher içerisine pH metrenin elektrodu daldırılır. Beher içindeki suspansiyona nükleik asitlerin veya nükleosidlerin herhangi bir çözeltisinden belli hacimde alınan numuneler suspansiyona eklenir. Zamana karşı çözeltinin pH ı ölçülür.

Çözelti pH sı sabitleşinceye kadar kaydedilir. Beher içeri-
sinde bulunan reçine ile, eklenen nükleosit veya
nükleik asit bazı arasında bir ligand değiş-tirme olayı
olacaktır. Ligand-Değiş-tirme reaksiyonu:



Hız denklemi şöyle olur:

$$V = \frac{d[\text{L-H O}_2]}{dt} = k_{\text{exp}} [\text{S-H O}_2]^{n_1} [\text{L}]^{n_2}$$

veya



$$V = \frac{d[\text{L-NH}_3]}{dt} = k_{\text{exp}} [\text{S-NH}_3]^{n_1} [\text{L}]^{n_2}$$

Reaksiyonun meydana geldiği çözeltinin pH sı yarım
saata yakın ölçülür. Ölçümlerden elde edilen datalarla a_{H^+}
karşı t grafiği çizilir. Grafikteki ilk noktalar doğrudur.
Doğrunun eğimi reaksiyon başlangıç hızı V_0 kabul edilebilir.
Sonuçlar analiz edildiğinde V_0 değeri reçinenin ve ligandın,
çözeltideki kinetik mertebesini bulmak için kullanılabilir.
Yukarıdaki hız denkleminde $[\text{S-H O}_2]$ reçine fazındaki aktif
Ligand-konsantrasyonu ve $[\text{L}]$ çözeltideki ligand konsantras-
yonudur. Sonuçlardan $n_1 = n_2 = 1$ kabul edilebilir.

Tablo: 49

Elde Edilen Yeni Reçinelerin Ortalama Çaplarının Mikroskop ile Ölçülmesi:

<u>REÇİNE ADI</u>	D(µm) Yüksüz	D(µm) Üridin Yüklü	D(µm) Sitidin Yüklü
++ Cu Yüklü KMDAE-Sporopollenin	31.5	31.5	31.5
++ Co Yüklü KMDAE-Sporopollenin	31.5	31.5	31.5
++ Cu Yüklü aDAEG-Sporopollenin	31.5	31.5	31.5
++ Cu Yüklü bDAEG-Sporopollenin	30.6	30.6	30.6
++ Ni Yüklü bDAEG-Sporopollenin	30.6	30.6	30.6

IX. 1. A. Co⁺⁺ Yüklü KMDAE-Sporopollenin Reçinesi-
Sitidin Ligand-Değiştirme Kinetiği:

0.5 gr kurutulmuş Cu⁺⁺ yüklü KMDAE-Sporopollenin reçinesi saf su ile suspansiyon haline getirilir. Bu suspansiyona 0.02 M, 6 ml sitidin ilave edilerek pH değişimi kaydedilir(Tablo:50).

a_{H^+} karşı t grafiği çizilir(Şekil 54). Eğri eğiminden $V_0=0.6$ bulunur. $n_1 = n_2 = 1$ düşünülerek ligand-değiştirme reaksiyonu için birinci mertebeden kinetik denklemi kullanılır.

KMDAE -Sporopollenin: 0.5 gr

Guanin : 0.02 M, 6 ml

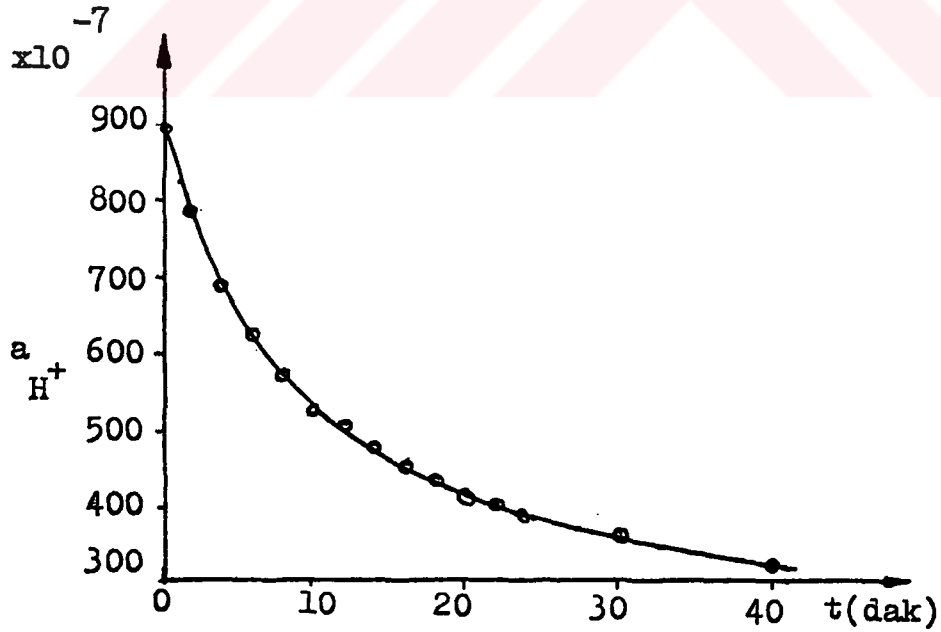
Çözelti Hacmi : 70 ml

Reaksiyon Baş. Hızı : 0.6

Tablo: 50

Sitidin Ligand-Değiştirme Reaksiyonu pH Değişimi

<u>t(dak)</u>	<u>pH</u>	<u>H x10⁵</u>
0	4.03	9.33
4	4.16	6.91
8	4.24	5.75
12	4.29	5.13
16	4.33	4.68
20	4.37	4.27
24	4.40	3.98
28	4.42	3.80
32	4.44	3.63
36	4.46	3.47
40	4.48	3.31
44	4.48	3.31



Şekil 54. a_{H+} nın Zamana Bağımlılığı: 0.5 gr reçine, 25 °C

IX. 1. B- Cu⁺⁺ Yüklü KMDAE-Sporopollenin Reçinesi-
Guanin Ligand-Değiştirme Kinetiği:

2 gr kurutulmuş Cu⁺⁺ yüklü KMDAE-Sporopollenin re-
çinesi saf su ile suspansiyon haline getirilir. Suspansiyona
guanin çözeltisi eklenerek zamanla değişen çözelti pH sı
kaydedilir.

KMDAE-Sporopollenin: 2 gr

Guanin : 0.02 M, 25 ml

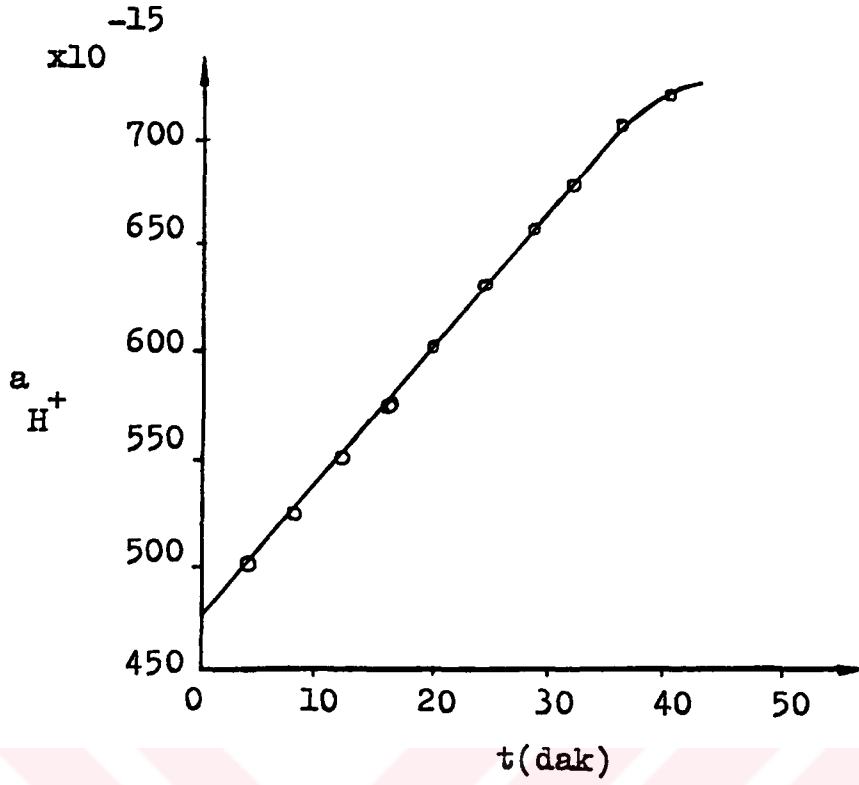
Çözelti Hacmi : 100 ml

Reak. Baş. Hızı : 0.55

Tablo: 51

Guanin Ligand-Değiştirme Reak. pH Değerleri

t(sn)	pH	[H] x10 ⁺¹³
0	12.32	4.79
4	12.30	5.01
8	12.28	5.25
12	12.26	5.50
16	12.24	5.75
20	12.22	6.03
24	12.20	6.31
28	12.18	6.61
32	12.17	6.76
36	12.15	7.08
40	12.14	7.24



Şekil 55. a_{H⁺} nın Zamana Bağımlılığı: 2 gr reçine, 25°C

IX.2. ⁺⁺ Co Yüklü aDAEG-Sporopollenin Reçinesi-
Sitidin Ligand-Değiştirme Kinetiği:

0.5 gr kuru aDAEG-Sporopollenin reçinesi suspansiyon haline getirildikten sonra, 0.02 M, 12 ml sitidin çözeltisi suspansiyona ilave edilerek reaksiyonun pH değişimi ölçülür.

aDAEG-Sporopollenin: 0.5 gr

Sitidin : 0.02 M, 12 ml

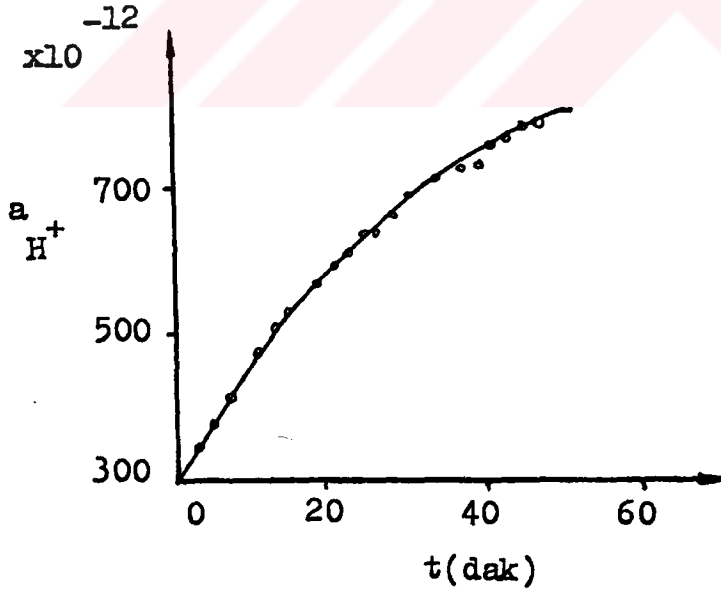
Çözelti Hacmi : 62 ml

Reaksiyon Baş. Hızı: 0.152

Tablo: 52

Sitidin Ligand-Değişirme Reak. pH Değişimi

t(dak)	pH	$[H^+] \times 10^{12}$
0	11.50	3.16x10
4	11.42	3.80x10
8	11.35	4.47x10
12	11.30	5.01x10
16	11.26	5.50x10
20	11.23	5.89x10
24	11.20	6.31x10
28	11.18	6.31x10
32	11.16	6.61x10
36	11.15	6.92x10
40	11.13	7.08x10



Şekil 56. Co^{++} Yüklü aDAEG-Sporopollenin - sitidin Reçinesi
 a_{H^+} nun zamana bağımlılığı: 0.5 gr reçine, 25°C

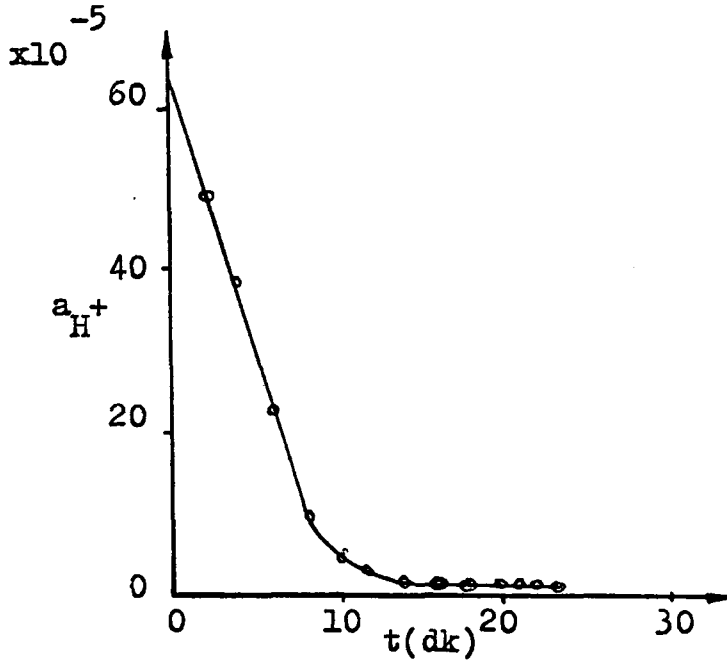
IX.3.A. Co⁺⁺ Yüklü bDAEG-Sporopollenin Reçinesi ile
Ligand-Değiştirme Kinetiğinin İncelenmesi:

bDAEG-Sporopollenin: 0.563 gr
Üridin : 0.0025 M, 20 ml
Çözelti Hacmi : 40 ml
Reak. Baş. Hızı : 0.67

Tablo: 53

Üridin Ligand-Değiştirme Reak. pH Değişimi

<u>t(dak)</u>	<u>pH</u>	<u>[H⁺]</u>
0	3.20	6.30x10 ⁻⁴
4	3.41	3.89x10 ⁻⁴
8	4.06	8.70x10 ⁻⁵
12	4.58	2.63x10 ⁻⁵
16	4.75	1.77x10 ⁻⁵
20	4.88	1.31x10 ⁻⁵
24	5.00	1.00x10 ⁻⁵
28	5.08	8.31x10 ⁻⁶
32	6.90	6.90x10 ⁻⁶
36	5.22	5.90x10 ⁻⁶
40	5.27	5.26x10 ⁻⁶
44	5.33	4.67x10 ⁻⁶
48	5.34	5.33x10 ⁻⁶



Şekil 57. ⁺⁺Co yüklü bDAEG-Sporopollenin Reçinesi - üridin a nın zamana bağımlılığı: 0.563 gr reçine, 25°C
H⁺

IX.3. B- ⁺⁺Co bDAEG-Sporopollenin Reçinesi-Guanin
Ligand-Değiştirme Kinetiği:

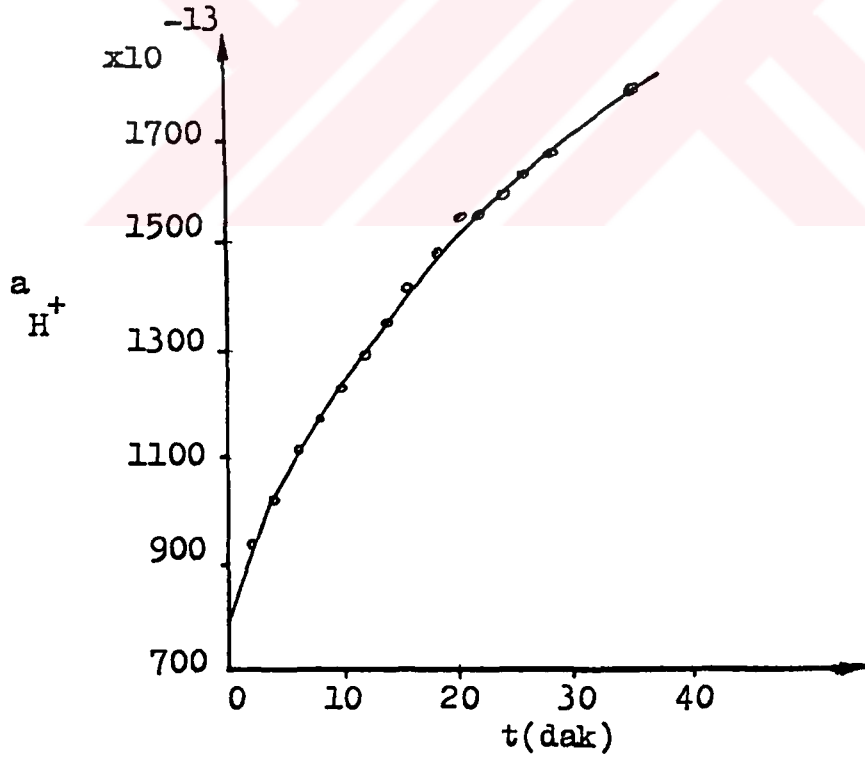
0.5 gr kurutulmuş ligand- değiştirici reçine saf su ile suspansiyon haline getirilir. Suspansiyon, 0.02 M, 10 ml guanin çözeltisi ile karıştırılır. Reaksiyonun pH sının zamana göre değişimi bir pH metre ile kaydedilir (Tablo:54).

bDAEG-Sporopollenin: 0.5 gr
Guanin : 0.02 M, 10 ml
Çözelti Hacmi : 40 ml
Reak. Baş. Hızı : 0.57

Tablo: 54

Guanin ligand-Değişirme Reak. pH Değişimi

<u>t(dak)</u>	<u>pH</u>	<u>[H⁺] x10¹²</u>
0	12.11	0.776
4	11.98	1.050
8	11.93	1.170
12	11.89	1.290
16	11.85	1.410
20	11.81	1.550
24	11.80	1.580
28	11.78	1.660
32	11.75	1.780



Sekil 58. a_{H+} nın Zamana Bağımlılığı: 0.5 gr reçine, 25°C

X. DENEY SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ VE TARTIŞMA

Ligand-değiştirme kromatografisi nükleosid, nükleik asit, aminler ve benzer maddelerin analizinde kullanılan tercihlî bir metottur. Son yıllarda gaz kromatografisi nükleik asitlerin analizinde kullanılmaya başlanmıştır. Gaz kromatografisi analiz için buharlaşabilen bileşenler ister ve ayırma işlemi birkaç basamakla olur. Sıvı kromatografisinde ise nükleik asitler ve benzer maddeler direkt olarak kolana injekte edilebilir, buharlaşmaya gerek kalmadan ayırma işlemleri yapılabilir(37).

Nükleik asitlerin ayırılması genelde gradient-elüsyon kullanarak kuvvetli anyon-değiştiricilerle analiz edilmiştir. Bu çalışma metodu hidroliz sistemler için iyi ayırma metodu olmasına rağmen çok zaman alıcıdır ve yaklaşık 24 saat tamamlama için gerekli olduğundan çok sıkıcıdır(37). Halbuki elde ettiğimiz reçinelerde ise nükleik asitlerin ayırılması çok hızlı bir şekilde olmakta ve sadece tek bir eluant kullanılarak ayırmaları mümkün olmaktadır.

Çalışmalarımızdaki ayırma işlemlerinde eluant olarak amonyak kullanılmıştır. Kolon, rejenerasyona gerek kalmadan yeni ayırmalar için kullanılır. Hazırladığımız ligand-değiştiricilerde pH ın, eluant konsantrasyonunun

değişmesiyle kolondaki reçine paketinde gözle görülür bir değişiklik görülmemiştir. Reçinenin yapısı değişmemiştir.

Etilendiamin kompleksleriyle, amonyak komplekslerinin disasiasyonunu ele alalım. Etilendiamin ve amonyağın elektronik etkileri aynıdır. Eğer amonyak molekülü kompleksten parçalanırsa çözelti içerisine kolayca girer; yani kompleks haline tekrar dönme ihtimali uzaktır. Halbuki etilendiaminin yapmış olduğu komplekslerde amino gruplarının birisi kompleksten ayrılırsa diğer ucundaki amino grupları kalır ve tekrar metale bağlanır. Kompleksten ayrılan azot atomu ancak birkaç yüz pikometre uzaklaşabilir ve metal katyona tekrar geri salınım yaparak bağlanır. Bu şunu göstermektedir: Etilendiamin kompleksleri çok sağlam yapıdadır, çok az bir ihtimalle dissosiyeye olabilir, çok kararlıdır. Bu özelliklerinden faydalanarak Lycopodium-Clavatum'a etilendiamin eklenmiş olup, yürütücü faz olarakta amonyak kullanılmıştır.

Sulfolanmış reçineler ile mukayese edildiği zaman sentezlediğimiz reçineler büyük avantajlara sahiptir. Sulfolanmış reçinelerde metal iyon kaybı çok fazladır. Halbuki karboksilik reçineler kendilerine bağlanan metal iyonlarını daha sıkı tutarlar, böylelikle bu tip fonksiyonlu reçineler ligand-değiştirme kromatografisinde kararlı fazları oluşturan reçineler olması niteliğiyle çok kullanışlıdır.

Polimer tipinde elde edilen sentetik reçinelerin bir diğer dezavantajı mekanik kuvvetlerinin zayıf olması nedeniyle yüksek basınçlı sistemlerde kullanılmazlar(38).

Yüksek basınçlı sistemlerde, sentetik reçineler kullanılırsa deforme olmakta veya yapışarak kolonun geçirgenliğini azaltmaktadır. Kararlılığın artması için, katı materyalin basınca karşı dayanıklı olması sağlanmalıdır. Bu özellik tabii reçinelerin kullanılmasını önemli hale getirmiştir. Sporopollenin sabit bir kimyasal yapıya sahiptir. Pollen taneciklerinin morfolojisine bakıldığı zaman tanecik büyüklüklerinin homojen bir yapıya sahip olduğu ve sabit bir yapıda olduğu görülmüştür.

L.Clavatum yaklaşık 25 mikronluk bir çapa sahip olup elipsel bir şekildedir. Bu büyüklük tüm taneciklerde mevcuttur. Bundan dolayı, kolondan akış hızı sabit olup, bir dalgalanma mevcut değildir. Tabiatında L. Clavatumun 10 mikrondan 250 mikrona kadar değişik taneciklerde bulunduğu bilinmektedir(40).

Ayrıca bu reçineler kimyasal ve fiziksel kararlılığa sahiptir. Sıcak alkali ve asitik çözeltilere karşı kararlılığını korur. Sıcak oksitleyicilere karşı kararlılığını korur. Sıcak oksitleyicilere karşı karardır. 250°C ye kadar dayanıklıdır(41).

Şelat, sülfonik ve selülozik iyon-değiştiricilerin ligand-değiştirme kromatografisinde karşılaştırılması yapılacak olursa, Şelat ligand-değiştiriciler metal iyonunu en iyi tutan reçinelerdir. Elde ettiğimiz tabii şelat ligand-değiştiricilerin Cu^{++} , Ni^{++} , Co^{++} gibi geçiş elementlerini tutma özelliği çok büyüktür. Sentetik ligand-değiştiricilerden olan Chelex-100 reçinesi uzun süre kullanıldığı zaman reçineden metal sızdığı görülmüştür.

Ligand-değiştirici Sporopollenin reçinelerinde metal sızıntısı olmamaktadır.

Ayırma işleminde differansiyel refraktometre ve sürekli analiz yapabilen UV spektrofotometre kullanılmıştır. Eluant olarak amonyak seçilmiştir. Ayırma piklerine bakıldığı zaman, piklerin bazen base line üzerinde yürümediği görülmüştür. Kolon sıcaklığı ayarlanıp, akış hızındaki deviasyonlar azaltılırsa; pikler base line üzerinde yürüyecektir. Yine bazen başlangıçta küçük bir pik görülmektedir. Bunun nedeni reçinede aminlerle veya diğer ligandlarla yer değiştiren amonyak konsantrasyonunun, yürütücü olarak kullanılan amonyak konsantrasyonundan büyük olmasındandır. Eğer, reçine daha önce amonyak ile doyurulmuşsa; bu pulse eluantla birlikte aynı hızda hareket edecektir. Eğer reçine amonyak ile doyurulmamışsa; bu pulse daha yavaş hareket edecektir ve kolondan çıkışıda gecikecektir. Bizim yaptığımız ayırma işlemlerinde ikinci durum görülmemiştir. Kolondan sürekli olarak amonyak geçirdiğimiz için, ayırma işlemlerinde pulse, kromatogramların başlangıcında çıkmıştır.

Orijinal Lycopodium-Clavatum ile ayırma işlemleri denendiği halde ayırma gerçekleşmemiştir. Fonksiyonel grubu olmayan L. Clavatum ayırma yapmamaktadır. L. Clavatum kolona doldurularak nükleositler ve nükleik asit bazları injekte edilip amonyak eluantıyla elüsyon yapılmıştır. Elde edilen kromatogramlarda tek pik görülmüştür. Fonksiyonel gruplar L. Clavatum yapısına girmediği müddetce ayırma olmayacağı bir gerçektir.

CO₂ in reçine bünyesine girmemesi sağlanmalıdır. CO₂ Diaminoetil-Sporopollenin bünyesine girmişse reçinedeki aminler karbonatlarına dönüşeceğiinden dolayı, reçineye yüklenen fonksiyonel grupların reçine tarafından tutma ve bırakılma özelliği ortadan kalkacaktır. Yapılan denemelerde CO₂ tutmuş reçine ile ayırma olmadığı görülmüştür.

X. 1. Nükleositlerin ve Nükleik Asit Bazlarının Ligand-Değiştirici Sporopollenin Reçineleri ile Ayırılması:

Son yıllarda pürin ve pirimidin karışımları genelde katyon-değiştirici reçineler kullanılarak ve gradient elüsyon tekniği yöntemi ile ayırılmaları yapılmıyordu(48,49). Bu tip reçine yüklü kromatografide yapılan ayırmalar, taşıyıcı çözeltinin iyonik kuvvetini sürekli artırarak yapılmıştır. Nükleositlerin ve nükleik asit bazlarının katyon-değiştirici reçineler ile ayırılması da oldukça zaman alıcıdır(37).

Çalışmalarımızda elde edilen reçineleri ligand-değiştirme kromatografisinde kullanarak yapmış olduğumuz ayırmalar bir saat gibi kısa zamanlarda olmuştur. Nükleik asit ve nükleositlerin bizim elde ettiğimiz reçinelerle ayırılması , katyon-değiştirici reçinelere göre 20-25 kat daha kısa sürede olmuştur. Ayırmalarda 15x1 cm ve 30x1 cm çaplı kolonlar ve 3 M 'a kadar değişen amonyak çözeltisi

eluant olarak kullanılmıştır.

Elde edilen tüm ligand-değiştiricilerde, sadece tek çeşit eluant lineer elüsyon işlemlerinde kullanılmıştır. Rejenerasyona gerek yoktur. Çözeltinin pH sı değiştiği zaman kolon verimliliği artmaktadır. 50°C de yapılan denemelerde nükleositlerin ve nükleoik asit bazlarının kolondan çıkmaları daha kısa zamanda olmuştur.

Cu⁺⁺ KMDAE-Sporopollenin ile ayırmalardan elde edilen piklere bakıldığı zaman şekil(4) üridin, adenozin, sitozin ve adenin gibi serbest elektron çifti bulunduran ligandların Cu⁺⁺ yüklü metal iyonuna karşı farklı ilgilere sahip olmasından dolayı bu ligandların reçine yüklü kolondan aşağıya doğru sürüklenmeleri farklı hızlarda olacak ve birbirinden ayrılacaktır.

Cu⁺⁺ yüklü KMDAE-Sporopollenin reçinesiyile yapılan ayırma işlemlerinde eluant olarak kullanılan amonyanın ligand-değiştirme işleminde büyük önemi vardır. Kolona ligandlar injekte edilmeden önce, kolon boş olarak sadece amonyak çözeltisi ile çalışırken, reçine gövdesine bağlı olan bakır(II) geçiş metallerinin boş koordinasyon uçlarına amonyak girmektedir. Daha sonra kolona ayırmak istediğimiz ligandlardan nükleosit ve nükleik asit bazları yüklendiği zaman, metal iyonuna önceden bağlanmış olan amonyak, yeni ligandlarla yer değiştirecektir. Yer değiştiren ve Cu⁺⁺ katyonuna tutunan ligandların kolondan sökülmeleri farklı zamanlarda olacak ve sonuçta ligandlar birbirinden ayrılacaktır.

Şekil(4) elde edilen piklere bakıldığı zaman

adenozin, üridine göre reçineye daha kuvvetli bağlanmış olduğundan kolondan daha geç çıkmıştır. Nükleik asit bazlarından olan urasil-sitozin ve urasil-adenin piklerinden(şekil 5,6) da görüleceği gibi sitozin ve adenin, urasile nazaran ligand-değiştirici reçineye daha kuvvetli tutunmasından dolayı kolondan geç çıkmıştır.

Urasil, guanin ve adenin pK değerleri sırasıyla 9.5, 9.4, 9.8 dir. Üridin ve guanozin ise 9.2 ve 9.5 dır(50). Urasil ve adenin piklerine baktığımız zaman (Şekil 7) pK değerleri büyük olan kolondan daha geç çıkmıştır. Kolondan geç çıkmanın diğer bir ölçüsünde; -NH₂ grubu içeren maddelerin reçineye daha sıkı tutunması nedeniyle kolonda daha uzun süre kalmasıdır. Sitozin ve adenin şekil (11) de görüldüğü gibi -NH₂ grubu ihtiva ettiklerinden reçineye daha kuvvetli tutunarak kolondan urasile göre daha geç çıkmışlardır. Benzer şekilde sitidin ve adenozin -NH₂ grubu ihtiva ettiğinden şekil(9) da görüleceği gibi kolonu daha geç terk etmiştir. Kolondan maddelerin geç çıkmasını etkileyen diğer bir faktör halkanın 7, 9 numarasında -N atomu bulunduran maddelerin, reçineye bağlanması daha kuvvetli olacağı için kolonu terk etmeleride daha geç olacaktır(50). Guanin ve adenin halkalarının 9. numarasında -N atomu bulundurmaları nedeniyle kolonu daha geç terk etmişlerdir. Aynı şekilde adenozin bulundurduğu -N atomu sebebiyle kolonu üridine göre daha geç terk etmiştir(Şekil 4).

X. 2. Aminlerin Ni⁺⁺ Yüklü b-DAEG-Sporopollenin
Reçinesi ile Ayırılması:

Aminlerin ayrılmasında kullanılan kolonlar Ni⁺⁺ yüklü b-DAEG-sporopollenin reçine ile doldurulmuştur. Reçine kullanılmadan önce 1 M amonyak çözeltisi ile yıkanır. Böylece metal-amonyak kompleksli ligand-değiştirici ayırma için hazır hale getirilmiş olur. Daha sonra çok küçük amin miktarları kolonun yukarı kısmından verilir ve sulu amonyak çözeltisi kullanarak kolonun aşağısına doğru aminler sürüklenir. Farklı aminler farklı hızlarda kolon boyunca hareket ederler. Aminlerin kolondan çıkış sırası trietanolamin, isobutilamin ve anilin sırasında (Şekil 24) ve Şekil 25 de görüleceği gibi trietanolamin ve dietilamin şeklindedir. Aminlerin ayrılması net bir şekilde olmuştur. Aminlerin R_f değerlerindeki farklılıktan dolayı refraktometre ile ayırmalar tesbit edilmiştir. Ayrıca, amin etrafındaki siterik engel ve hidrofilik substütüentler bağlanma kuvvetini zayıflatırlar.

Aminlerin ayrılması sırasına bakarsak çok büyük karbon zincirine sahip ve dallı olan aminler kolondan daha önce çıkmışlardır. Düz zincirli aminler kolonda daha sıkı tutunurlar ve böylece kolondan geç çıkarlar. Reçine gözeneklerine düz zincirli aminlerin girmesi daha kolay olup tutunmasında kuvvetli olmaktadır(45). Primer aminler; segonder, tersiyer ve hetorosiklik aminlerden daha kuvvetlice reçineye tutunurlar. Trietanolamin ve dietil-

amin ayırılma piklerine bakarsak (Şekil 25), trietanolamin dietilamine göre daha çok dala sahiptir. Bu nedenle trietanolamin kolondan daha önce çıkmıştır.

Aminlerin ayırılmasını etkileyen faktör sadece bu değildir. Değerlendirme baz kuvvetiyle de olabilir. Fakat bu tam açık değildir. Etilenaminin elüsyon sırası baz kuvveti ile ters orantılıdır. Bu düşüncede tam geçerli değildir. pK değerlerine bakarsak mono, di ve trimetilamin pK değerleri 3.45, 3.39 ve 4.53 olmasına rağmen elüsyon hacimleri aynı sırayı takip etmemektedir. Bazı durumlarda aminlerin elüsyon hacimleri amonyak konsantrasyonunun karesi ile orantılı olabilir. Yani bir hidrazin molekülü iki amonyak molekülü ile yer değiştirebilir. Bu da hidrazinin Cu⁺⁺ ile ikili köprü yapmasıyla oluşabilir. Bazende elüsyonda; amonyak konsantrasyonunun 1-2 katı arası orantılı olarak elüsyon hacimleri artabilir(39).

X. 3. Nükleositlerin ve Nükleik Asit Bazlarının Chelex-100 Reçinesi ile Ayırılması

Ligand-değiştirme tekniğindeki zorluklardan birisi reçineye yüklü metal iyonların sökücü ve taşıyıcı olarak kullanılan eluantla iyon-değiştirme prensibine göre sıyrılmasıdır. Bu gerçek, metal iyonların seçimine sınırlılık getirir. Sulfolanmış polisitiren reçinelerine eklenen Ni⁺⁺ iyonları eluantla birlikte çok az bir miktarda yer değiştirdiği halde, aynı reçine Cu⁺⁺ yüklenmesi

durumunda, kolondan sıyrılan Bakır(II) nin Nikel(II) den daha fazla olduğu görülmüştür(45). Metal sızıntılarını önlemek için, iminodiasetat fonksiyonel grubu ihtiva eden ligand-değiştiriciler yapılmıştır. Bu tip fonksiyonel grupları ihtiva eden Chelex-100 reçinesinde dahi metal iyon sızıntısı zamanla meydana gelebilmektedir. Daha sonraları büyük molekülleri ayırmak için kullanılan sellulozik reçineler iyi ayırmalar vermesine rağmen, reçinedeki metal iyonları kaçağının çok olması büyük şanssızlıktır(45).

Dowex A-I, Dow Chemical Co. den alınan reçinelere geçiş elementleri ekliyerek, metal yüklü-Chelex-100 reçineleri elde edilir. Bu reçinede fonksiyonel grup olarak imino-diasetatlar bulunmaktadır. Polimer matriksi polisiti- ren olup divinilbenzenle çapraz bağlanmıştır. Ligand-değiştirici olarak Chelex-100 un kullanıldığı ligand-değiştirme kromatografisi nükleik asit bileşenlerinin ayrılmasında kullanılan bir ayırma metodudur. Chelex-100 'e nükleik asitlerin bağlanma kuvvetinin çok büyük olması sebebi ile ayırma işlemleri çok hızlı olmamaktadır. Chelex-100 reçinesinin bağlanma kuvveti 8-12 (kJ/mol) dur(42). Yavaş ayırma özelliği bir dezavantaj gibi görünmekle beraber bu reçinenin: a) Büyük bir kimyasal kararlılığa sahip olması b) Geçiş metalleri yüklenmiş halde bir kaç ay uzun süre kullanılabilmesi önemli avantajlarındandır. Bu reçinenin dezavantajlarını sıralarsak; eluant olarak amonyak kullanıldığı zaman, amonyaklı ortamda hidroliz olma eğiliminde olan bazı bileşiklerin ayrılmasının güçleşmesi ve halojen tuzların ve asidik çözeltilerin bakır

reçineden çekebilmesidir.

Chelex-100 reçinesi ile absorplanan metallerin miktarı pH'nın bir fonksiyonudur. pH 2 den küçükse absorpsiyon çok düşük, 2-4 arası ise absorpsiyon artmakta ve pH 4 olduğu zaman maksimuma ulaşmaktadır(43).

Chelex-100 reçinesine alkali toprak elementleri kation olarak eklendiği zaman, bu elementler reçinede bulunan iminodiasetat ile zayıf kompleksler vermekte, halbuki bu reçine, geçiş elementlerinden olan Cu^{++} , Ni^{++} ve Co^{++} ile reaksiyona girdiği zaman çok kuvvetli kompleksler meydana getirmektedir(44).

Şekil(37) de elde edilen piklere bakıldığında; sitidin, üridine göre reçineye daha kuvvetli bağlanmış olup kolondan daha geç çıkmıştır. Nükleik asit bazlarından olan urasil-sitozin elüsyonunda, sitozin kolona kuvvetli tutularak kolonu geç terk etmiştir(Şekil 38).

X. 4. Kolon Parametrelerinin Değiştirilmesi

1- Ayırılacak Madde Konsantrasyonlarının Ayırma Üzerine Etkisi:

Nükleositlerin ve nükleik asit bazlarının konsantrasyonu artırıldığı zaman ayırma işlemindeki değişiklik sadece pik yüksekliğinin artmasıdır(Şekil 44,45). Ayırılacak madde miktarının artmasına orantılı olarak pik yüksekliği ve pik alanları artmaktadır.

2- Kolon Uzunluğunun Ayırma Üzerine Etkisi:

Değişik uzunluklardaki reçine ile doldurulmuş kolonlara nükleosit ve nükleik asit bazları injekte edilerek yapılan ayırmalarda elde edilen piklerden(Şekil 47) çıkan sonuç şudur: Kolon uzunluklarının değişmesiyle maddelerin kolondan çıkmaları gecikmiştir. Hazırladığımız reçine çok aktif olduğu için kısa kolonlarda dahi ayırmalar mümkündür. Kolon yüksekliği artmasıyla nükleosid ve nükleik asit bazlarının kolonda kalma süreleri ve resolüsyonu artarak kolondan daha geç çıkmışlardır.

3- Eluant Konsantrasyonunun Değiştirilmesinin Ayırma Üzerine Etkisi:

Kolondan ayrılacak ligandların koordinasyon seçiciliği pH ya bağlıdır. Ayırma prosesinin verimini artırmak istiyorsak eluant olarak kullanılacak çözeltinin pH sı üzerinde değiştirmeler yaparak uygun pH aralığında en iyi ayırma yapılabilir. Eluant bileşiminin değiştirilmesi adsorbe edilecek maddelerin adsorpsiyon hızını değiştirecektir.

Reçine ile yüklü kolona injekte edilen nükleosit ve nükleik asit bazları, amonyak eluantı kullanılarak reçineden sökülmüşlerdir. Amonyak konsantrasyonları değiştirilerek elde edilen kromatogramlar Şekil 50,51 de gösterilmiştir. Piklerin çıkışı zamana bağlıdır. Yapmış olduğumuz ayırma işlemlerinde absorpsiyon ve desorpsiyonun zamana karşı pikleri alınmıştır. Çıkan piklerin alanlarına bakılacak olursa, amonyak konsantrasyonu arttıkça piklerin yükseklik-

leri azalmaktadır. Çünkü derişik amonyak daha kuvvetli bir sökücü olduğu için kolona injekte edilen maddeleri daha kısa zamanda çıkaracaktır. Bu da piklerin boyunun kısa olmasına sebep olur. Ayırma işleminde kullandığımız kolonlar, özel olarak boro-silikatlardan yapılmış kolonlar olduğu için amonyak konsantrasyonunu 3 M üzerine çıkarmadık. Çünkü derişik amonyak kolona zarar vermektedir. Amonyak konsantrasyonu 0.2 - 2 M arasında değiştirilmiştir.



XI. SONUÇ

1. Tabii bir polimer olan Sporopollenine diaminoetan ve bromo asetik asit fonksiyonel grupları eklenerek reçineye sağlam bir yapı kazandırılır. Bu reçinelere geçiş metalllerinden Cu^{++} , Ni^{++} ve Co^{++} yüklenerek kompleks yapıya sahip ligand değiştirici reçineler elde edilir.

2. Cu^{++} , Ni^{++} ve Co^{++} yüklü KMDAE-Sporopollenin ligand- değiştirici reçineler, yapılarında etilendiamin bulunduğu için çok sağlam bir yapıya sahip olup, oldukça kararlıdır. Cu^{++} , Ni^{++} ve Co^{++} yüklü KMDAE-Sporların reçineleri nükleosidlerin ve nükleik asit bazlarının ayrılması için oldukça uygun reçinelerdir. Bu ligand değiştiricilerde metal sızıntısı olmamaktadır. Bu reçineler uzun ömürlü olup, kuvvetli asit ve bazlara karşı oldukça dayanıklıdır.

3. Geçiş elementleriyle yüklenen karboksilik reçine kolonları ligand-değiştirme kromatografisinde çok güzel ayırmalar vermektedir. Bakır (II) yüklü bromoasetik asit bağlı ligand değiştirici kolonlar keskin pikler vermektedir. Metal iyon yüklü kolonlardan elüsyon sırası şöyle olmaktadır: Kuvvetli bazlar, zayıf bazlara nazaran daha kuvvetli tutunurlar.

4. Lycopodium-Clavatum, diaminoetan ve dikloranti-glioksim bağlanmasıyla elde edilen reçine ile ligandların ayrılmasına yeni imkanlar getirilmiştir. bis-DAEG - Sporopollerin adı verilen bu reçineye geçiş elementlerinden Cu^{++} , Ni^{++} ve Co^{++} eklenerek kararlı kompleks reçineler elde edilmiştir. Bu reçineler ile nükleosidlerin ve nükleik asit bazlarının ayrılması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen reçinelerle net ayırmalar yapılabilir ve bu reçinelerin, ligand-değiştirici reçine olarak kolon kromatografi çalışmalarında alternatif bir metod olarak kullanılabilir.

5. Lycopodium-Clavatum polimerine diaminoetan ve antikloroglioksim bağlanmasıyla elde edilen yeni reçinelere Cu^{++} , Ni^{++} ve Co^{++} gibi geçiş elementleri eklemek suretiyle elde edilen kompleks, ligand-değiştirici reçine olarak nükleik asitlerin ve nükleosidlerin ayrılmasında kullanılabilir.

6. $Cu(II)$ yüklü bDAEG-Sporopollerin reçinesi ile aminlerin ayrılması gerçekleştirilebilir. Aminlerin ayrılmasında aminlerin primer, segonder, tersiyer heterosiklik olması; amin tarafındaki siterik engel gibi etkiler ayırma üzerine etki etmiştir. Aminlerin R_f değerindeki farklılıktan dolayı refraktometre ile ayırmalar tesbit edilebilir.

7. Lycopodium-Clavatum polimerine diaminoetan ve p-klorbenzaldoksim bağlanarak elde edilen yeni reçine,

geçiş elementleri ile kuvvetli kompleks yapar. Bu, kompleks reçine ligand değiştirici olarak kromatografi çalışmalarında kullanılabilir. Kompleks`de koordinasyon uçlarında serbest (boş) uç sayısı az olduğu için ayırmalar çok net olmamakla beraber nükleosit ve nükleik asitlerin ayrılmasında kullanılabilir.

8. Şelat reçinelerinden olan Chelex-100 reçinesine geçiş elementleri bağlanarak, ligand-değiştirici olarak kromatografide kullanılmak suretiyle nükleositlerin, nükleik asitlerin ve aminlerin ayrılması yapılabilir. Reçinenin pahalı olması ve uzun süre kullanıldığı zaman kolondan metal sızıntısı olması bir dezavantaj gibi görünüyorsa da ligand-değiştirici kromatografide alternatif olarak kullanılabilen bir reçinedir.

9. Hazırlanan tabii ligand-değiştirici kolonlarda yapılan çalışmalarda uygun eluant olarak amonyak seçilmiştir. 0,1-2,5 M amonyak konsantrasyonlarında yapılan ayırmalar net olmaktadır. Yapılan ayırma işlemlerinde kısa kolon kullanmak ayırma için pratik olmaktadır.

10. Tabii bir polimer olan Lycopodium-Clavatum ; kolay elde edilmesi , ucuz olması , çözücüler içerisinde şişmemesi, homojen bir yapıya sahip olması ve kimyasal reaktiflere karşı kararlı olması gibi avantajlı özelliklerinden dolayı kolon kromatografi çalışmalarında ligand-değiştirici reçine olarak kullanılması oldukça uygundur.

XII. KAYNAKLAR

1. Helfferih G. F., Ion-Exchange Science and Technology, NATO ASI Series (1980).
2. Aristotler, Works, Vol.7, 933, Clarendon Press, London (1927).
3. Thompson H. S. and Roy J., Agr. Soc. Engl., Vol.11, 68 (1850)
4. Tompkins E. R., Khym J. X. and Cohn W. E., J. Am. Chem., Vol. 69, 2769 (1947).
5. D'Alerio G. F., General Elektrik Co., US Patentz, 077, 366 (1944).
6. Wheaton R. M. and Bauman W. C., I and EC., Vol. 43, 1088 (1951).
7. Farbenfabriken Bayer AG, Ger. Patents, 1.045, 1.113, 1088 (1957).
8. Teorell T., Proc. Soc. Exptl. Biol., Vol.33 (1935).
9. Meyer K. H. and Sievers J. F., Helv. Chim. Acta, Vol. 19 649 (1935).
10. Schlogl R., Stofftransport Durch Membranen, Steinkopff, Darmstadt, 1964).
11. Davankov V. A., Pure Appl. Chem., Vol. 54, 2159 (1982).
12. Weisz P. B. and Frilette V. J., J. Phys. Chem., Vol. 64 382 (1960).
13. Kril M. B., Janauer G. E., Wilber G. and Kresge B., Streat M., Ion-Exchange Technology, 407, London (1984).

14. Merrifield R. B., *Biochem.*, Vol. 3, 1385 (1964).
15. Helfferich F., *Nature*, 189, 1001 (1961).
16. Walton H. F. and Stokes R. H., *Metal Amine Complexes in Ion-Exchange*, *J. Am. Chem. Soc.*, 76, 3327 (1954).
17. Helfferich F., *Ion-Exchange*, Mc. Graw Hill, 222, New York (1962).
18. Hill A. G., Sedgeley R. and Walton H. F., *Anal. Chim. Acta*, 33, 84 (1965).
19. Walton H. F., *Ligand-Exchange Chromatography in Advances in Ion-Exchange*, Marinsky, Ed. Marcel Derker (1973).
20. Porath J., Carkson J., Olsson I. and Belfrage G., *Nature* Vol. 258, 598 (1975).
21. Davankov V. A. and Semechkin A. V., *Journal of Chromatography*, 141, 313 (1977).
22. Davankov V. A., Rogazhin S. V., Semechkin A. V., Baranov V. A. and Sannikova G. S., *J. Chromatography*, 93, 363 (1974).
23. Caude M. H., Jardy A. P. and Rasset R. H., *CRC Handbook of HPLC for the Separation of Amino Acids and Proteins*, Vol. 1, 411 (1982).
24. Hudjun M. J., *Coordination Chemistry of Selective Ion-Exchange Resins*, UK (1976).
25. Warshawsky A., *Modern Research in Ion-Exchange*, The Weizmann Institute of Science (1976).
26. Boef D. and Hulanicki A., *Pure Appl. Chem.*, 55, 54 (1983).
27. Hill G. and Holman J., *Chemistry in Context*, 1989.
28. Grimshaw R. W. and Hardland C. E., *Ion-Exchange*

- Introduction to Theory and Practice, Published by the Chem. Society, Burlington House, London (1975).
29. Helfferich F., *J. Am. Chem. Soc.*, 84, 3237 (1962).
 30. Calmon C. and Kresman T. R. E., *Ion-Exchange in Organik and Biochemistry*, 345, New York (1957).
 31. Brooks J. and Shaw G., *Nature*, 220, 678, London (1972).
 32. Brooks J. and Shaw G., *Chem. Geol.*, 10, 678, London (1977).
 33. Brooks J. and Shaw G., *Trans. Bose. Res. Inst.*, Vol. 40(2), London (1977).
 34. Shaw G. and Yeadon A., *Grann Polynologien*, Vol. 5(2), London (1964).
 35. Brook J., *Sporopollenin*, Acedemic Press, 305, London and New York (1971).
 36. Shaw G., in *Sporopollenin*, Acedemic press, 350, London and New York (1972).
 37. Kirland J. J., *High Speed Separation of Nucleotides and Nucleic Acid Bases by Column Chromatography*, *J. Chromotog. Sci.*, 8, 72, (1970).
 38. Berthod D. M., Poitrenaud C. and Tremillon B., *Journal of Chromatography*, 179, 37 (1979).
 39. Chu B., Whitney D. C. and Diamond R. M., *J. Inorg and Nucl. Chem.*, 24, 1405 (1962).
 40. Brooks J. and Shaw G., *Origin and Devolopment of Living Systems*, Acedemic Press, London and New York (1973).
 41. Shaw G., *Sporopollenin* in, J. B. Harborne (Ed.), Acedemic Press, New York (1970).
 42. Goldstein G., *Anal. Biochem.*, 20, 477 (1967).

43. Lehninger A. L., Biochemistry, Worth Publishers Inc. New York (1977).
44. Turse R. and Rieman W., J. Phys. Chem., 65, 1821 (1961).
45. Shimamura K., Dickson L., Walton H. F., Amine Separation by Ligand-Exchange, Analytical Chemical Acta., 37, 102 (1967).
46. Hourben J. und Kaufmann H., Ber. Dtsch. Chem. Ges., 46, 2821 (1913).
47. Ponzio G. and Baldrocco F., Gazz. Chim. Ital., 60, 415 (1930).
48. Cohn W. E., Science, 109, 377 (1949).
49. Crompton C. F., Frankef F. R., Benson F. R. and Wede A. Anal. Biochem., 1, 249 (1960).
50. Calmon C. and Kresman T. R. E., Ion-Exchanger in Organic and Biochemistry, New York (1957).
51. Grimshaw R. W. and Hardland C. E., Ion-Exchange Introduction to Theory and Practice, Chem. Society, Burlington House, London (1975).
52. Liberti L., in Mass Transfer and Kinetics of Ion-Exchange, 181, Boston (1983).



VIII. ÖZGEÇMİŞİM

1959 Konya doğumluyum. 1984 yılında Orta Doğu Teknik Üniversitesi Kimya mühendisliğinden mezun oldum. 1984 yılında Selçuk Üniversitesi Eğitim Fakültesi Kimya Bölümünde araştırma görevlisi olarak çalıştım. 1986 yılında dünya bankası projesi ile İngiltere'ye Petrokimya programı eğitimi için gönderildim. İngiltere'de dokuz ay eğitim gördükten sonra Ankara Üniversitesi K.M.Y.O. Petrokimya programında öğretim görevlisi ve koordinatör olarak çalışmaya başladım. 1986 yılında Selçuk Üniversitesi Kimya Bölümünde yüksek lisansımı tamamlayıp aynı üniversitede doktora çalışmasına başladım, halen Ankara Üniversitesi K.M.Y.O'da öğretim görevlisi olarak çalışmaktayım. Bilgisayar dillerinden basic ve fortranı ayrıca yabancı dil olarak İngilizce bilmekteyim. Evli ve bir çocuk babasıyım.

T. C.
Yükseköğretim Kurulu
Dokümantasyon Merkezi