

SELCUK ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Co(II) YÜKLÜ SPOROPOLLENİN KULLANARAK AMİNOASİTLERİN  
LİGAND DEĞİŞTİRME KROMATOĞRAFİSİ İLE AYRILMASI VE  
BAZİ PARAMETRELERİN TAYİNİ

Ahmet AYAR  
Kimyager

T. C.  
Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi

YÜKSEK LİSANS TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI

Bu tez, 10.09.1991 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından kabul edilmiştir

imza

Prof.Dr. Salih YILDIZ  
(Danışman)

imza

Doç.Dr. Gazi İREZ  
(Üye)

imza

Yrd.Doç.Dr. A.Dinçer BEDÜ  
(Üye)

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi Co(II) YÜKLÜ SPOROPOLLENİN KULLANARAK AMİNOASİTLERİN LİGAND DEĞİŞTİRME KROMATOĞRAFİSİ İLE AYRILMASI VE BAZI PARAMETRELERİN TAYİNİ

Ahmet AYAR  
Selçuk Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Salih YILDIZ  
1991, Sayfa : 49

Jüri : Prof. Dr. Salih YILDIZ  
Doç.Dr. Gazi İREZ  
Yrd.Doç.Dr. A. Dinçer BEDÜK

Lycopodium Clavatum'dan elde edilen sporopollenin ligand değiştirici olarak hazırlanmıştır. Bu çalışmada sporopolleninin aminoasitlerin ayrılmasında ligand değiştirici olarak kullanılabilmesi imkanları araştırılmıştır. Sporopolleninin kimyasal maddelere karşı kararlı olması ve sabit tanecik büyüklüğü gibi önemli avantajlara sahip olmasından dolayı kolon dolgu maddesi olarak kullanılabilir.

Sporopollenin 1,2-diaminoetan ile ve daha sonra bro-moasetik asit ile muamele edilerek karboksilli diamin-etan sporolenin elde edilmiştir. Elde edilen bu yeni reçine  $Co^{++}$  ile yüklenerek aminoasitlerin ayrılmasında ligand değiştirici olarak kullanılmıştır.

Sporopollenin farklı büyüklükteki kolonlara dol-durularak, kolon uzunluğunun ayırma üzerindeki etkileri araştırılmıştır. Ayrıca hareketli faz pH'ı ve ayrılacak madde konsantrasyonları değiştirilerek bunların kromatog-rafik ayırmalara etkileri incelenmiştir.

Sonuç olarak  $Co^{++}$  yüklü karboksilli diaminosporo-pollenin ligand değiştirme tekniğinin birçok temel amino-asitin ayrılmasında uygun bir kromatografik metot olduğu söylenebilir.

ANAHTAR KELİMELELER : Amino Asit, Ayırma, Kromatografi,  
Ligand Değiştirme.

## ABSTRACT

Master Thesis  
SEPARATION OF AMINO ACIDS BY LIGAND-EXCHANGE  
CHROMATOGRAPHY ON COBALT(II)-LOADED SPOROPOLLENIN AND  
DETERMINATION OF SOME PARAMETERS

Ahmet AYAR  
Selçuk University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry  
Supervisor : Prof. Dr. Salih YILDIZ  
1991, Sayfa : 49

Jury : Prof. Dr. Salih YILDIZ  
Assoc. Prof. Dr. Gazi İREZ  
Assoc. Prof. Dr. A. Dinçer BEDÜK

Sporopollenin obtained from *Lycopodium Clavatum* has been modified as ligand exchanger. In this study, it was investigated the possibility of using sporopollenin as ligand exchanger in the chromatographic separation of aminoacids.

Since sporopollenin has important advantages such as it is stable to chemicals and has constant mesh size, therefore it can be used as column packing material.

By treating sporopollenin, firstly with 1,2-diaminoethane then bromoacetic acid, carboxylated diaminosporopollenin was obtained. This new resin was loaded with  $\text{Co}^{++}$  and then it was used as ligand exchanger in the separation of aminoacids.

By packing this new ligand exchanger in various sized column, it was researched the effect of column size on the separation. It was also investigated the influence of changing pH of eluant composition and concentration of ligand on the chromatographic behavior.

In conclusion, it can be stated that, ligand exchange technique on  $\text{Co}^{++}$  loaded carboxylated diaminosporopollenin is a suitable chromatographic method for the separation of most of the common aminoacids.

KEY WORDS : Aminoacid, Separation, Chromatography, Ligand Exchange.

## TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans çalışmalarım süresince karşılaştığım problemlerin çözümünde yardımlarını esirgemeyen sayın hocam Prof. Dr. Salih YILDIZ ' a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Ayrıca Kimya Bölümündeki Öğretim Üyelerine ve Öğretim Elemanları ile diğer personele yardımlarından dolayı teşekkür ederim.

## İ Ç İ N D E K İ L E R

ÖZET.....	1
ABSTRACT .....	11
TEŞEKKÜR.....	111
İÇİNDEKİLER.....	iv
I. GİRİŞ.....	1
II. LİGAND DEĞİŞTİRME.....	3
II.1. Ligand Değiştiriciler.....	4
II.2. Ligand Değiştirme Kromatografisi.....	5
III. SPOROPOLLENİN.....	7
III.1. Sporopolleninin Elde Edilmesi.....	9
III.2. Sporopolleninin Ligand Değiştirici Olarak Uygunluğu.....	10
IV. MATERYAL ve METOD.....	12
IV.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	12
IV.2. Kullanılan Aletler.....	12
IV.3. Sporopolleninin Ligand Değiştirici Olarak Hazırlanması.....	12
V. LİGAND DEĞİŞTİRME KROMATOĞRAFİSİ ile AYRILAN MADDELER ve AYIRMA İŞLEMLERİ.....	15
V.1. Kolonda Ayrılan Maddeler.....	15
V.2. Kolon Dolgu Maddesi ve Hareketli Fazlar.....	20
V.3. Ligand Değiştirici Kolonu Yükleme.....	20
V.4. Sistemin Çalıştırılması ve Numune Verilmesi.....	21
V.5. Amino asitlerin Co(II) Yüklü Karboksilli..... Diaminosporopollenin ile Ayrılması.....	22
VI. DENEY SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ.....	43
VI.1. Ayrılacak Madde Konsantrasyonunun Ayrılma Üzerine Etkisi.....	43
VI.2. Kolon Uzunluğunun Ayrılma Üzerine Etkisi.....	44
VI.3. pH'ın Ayrılma Üzerine Etkisi.....	44
VII. SONUÇ.....	46
VIII. KAYNAKLAR.....	47
IX. ÖZGEÇMİŞ.....	49

## I. GİRİŞ

Bir bileşiğin incelenmesi, kimyasal yapısının aydınlatılması için diğer maddelerden ayrılması ve saflaştırılması gerekmektedir. Bugün kimyada maddelerin ayrılması ve saflaştırılması için birçok metod bilinmektedir.

Bir maddenin diğerlerinden ayrılması için kullanılacak metodun seçimi çok önemlidir. Kimyasal özellikleri birbirine benzemeyen karışımlar genellikle klasik ayırma metodlarıyla ayrılabilirler. Ancak aynı fonksiyonlu gruba sahip ya da gösterdikleri özellikler bakımından aynı sınıfa giren bileşiklerin klasik ayırma metodlarıyla ayrılması çok zor hatta çoğu zaman imkansızdır.

Klasik ayırma metodlarıyla ayrılamayan bileşikler bugün kromatografik metodlarla ayrılabilirlerdir. Kromatografide kolon dolgu maddesi olarak bugüne kadar çeşitli sentetik ve tabii reçineler kullanılmıştır. Bu reçinelerin seçimi ayrılacak maddelerin özellikleri ile yakından ilgilidir.

Bu çalışmanın amacı bitki sporlarından elde edilen sporopolleninin aminoasitlerin ayrılmasında ligand değiştirici olarak kullanılmasıdır.

Bu çalışmada sporopollenin karboksilli diaminosporopollenin halinde ligand değiştirici olarak hazırlandı. Ligand değiştirici olarak hazırlanan sporopollenin ile aminoasitlerin birbirinden ayrılması üzerine çalışmalar yapıldı, ayrılma üzerinde etkili olan parametreler incelendi. Bunlar,

- 1- Ayrılacak madde konsantrasyonu,
- 2- Kolon uzunluğu,
- 3- Hareketli faz pH'ı.

Aminoasitlerin ayrılmasında etkilerinin araştırıldığı bu üç parametreden en etkili olanının hareketli fazın pH'ı olduğu tesbit edilmiştir.

Sporopolleninin diğer birçok biyokimyasal maddelerin ayrılmasında kullanılabildiği gibi aminoasitlerin ayrılmasında da kullanılabileceği bu çalışmada başarılı sonuçlar alınarak gösterilmiştir.



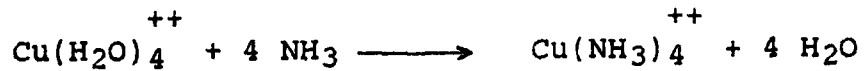
## II. LİGAND DEĞİŞTİRME

Ligand değiştirme terimi ilk defa 1961 yılında F.G. Helfferich tarafından ortaya atılmıştır[1].

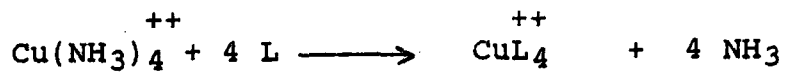
Helfferich Cu(II) yüklü karboksilik katyon değiştirici reçine kullanarak 1,3-diaminin adsorblanmasını sağlamış ve kolonu amonyak ile rejenere etmiştir[2].

Ligand değişimi, ligand gibi hareket edebilen, çözünen ve kompleks oluşturan katyonlar arasındaki kararsız komplekslerin teşkili ile ilgilidir[3]. Burada kompleks oluşturan iyon; iyonik, kovalent veya koordinasyon bağlarıyla kararlı faza bağlanmıştır. Bu bağlanmadan sonra bazı koordinasyon uçları serbest kalmaktadır. Bu durumda ligandlar koordine bağ yapan metal ile birleşebilir. Eğer değişik ligandlar, metal ile farklı ilgiye sahip ise, bunların kolonu terketme hızları da farklı olacak ve ayrılmaları gerçekleşecektir.

$Cu^{++}$  çözeltisi halinde bulunan bir katyon değiştirici tarafından tutulan amonyak aşağıdaki şekilde reaksiyona girer.



Amonyak, aşağıdaki reaksiyonda olduğu gibi değişik bir L ligandıyla yer değiştirebilir.



Burada iyon değiştirme olayı meydana gelmeyip sadece kararlı fazla oluşan ligand değiştirici kompleksler oluşur[4].



## II.1. Ligand Değiştiriciler

Ligand değiştiriciler, değişik fonksiyonel gruplarla kompleks teşkil eden metal iyonlarını taşıyan maddelerdir. Bugün, ligand değiştiriciler, klasik metotlarla ayrılması zor ya da mümkün olmayan aminlerin, aminoasitlerin, v.b. ayrılmasında kullanılmaktadır[5].

Ligand değiştiricilerin, kromatografide kullanılmaya başlamasından sonra biyokimyacılar kendi amaçları için yeni denemeler yaparak " Metal Şelat Affinite Kromatografisi" adı altında yeni çalışmalara başlamışlardır[6].

Ligand değiştirici reçinelerin seçimi ligand gruplarının dış sayısı ile ilgilidir. Seçici ligand değiştiricilerde aşağıdaki özellikler istenir[7];

1. Çapraz bağın olmaması veya az olması,
2. Çok sayıda aktif fonksiyonel grupların olması,
3. Aktif fonksiyonel gruplar üzerinde donör atomlarının sayısının çok olması
4. Metalin liganda ilgisinin fazla 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.

Ligand değiştiricilerde fonksiyonlu gruplar, elektron verici olarak görev yaparlar. Koordinasyon bağı yapan kopolimerler, metallere koordinasyon bağı yapmaya yeteneği olan ve bünyesinde bir donör atomu taşıyan fonksiyonlu gruplar ile kovalent bağlar yaparak polimere bağlanmışlardır[8].

## II.2. Ligand Değişirme Kromatografisi

Ligand değişirme kromatografisi sadece değişken ligandla sabit faza etkisinin tersinir bir işlem olduğu sistemlerde mümkündür. Kararlı faza tutunan kompleksler kinetik olarak değişebilir olmalıdır.

Denge şartları altında, A ve B ligandları, oluşan tutunmuş komplekslerin dengelerine göre değişken ve katı fazlar arasına 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 nin aynı andaki elusyonuyla, kolonun seçiciliği (a), tutunan komplekslerin oluşma oranlarına eşittir[9].

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

Ligand değişirme kromatografisinin temeli kompleks meydana getirmedir. Yüksek seçici özelliğinden dolayı, fiziksel adsorbsiyon ve iyon değişirme işlemlerinden büyük ölçüde farklı olan bir prosestir. Elektron veren ligand gruplarının, bir kompleks içerisindeki merkezi metal iyonu ile olan etkileşimi yalnız belli bir yönde ve sıkıca yerleştirilmiş uzaklıkta oluşur.

Kompleks teşekkülünün bir özelliği, ligand değişirme teknikleri kullanılarak yapılarında büyük ölçüde fark bulunan ligandların ayrılmasını değil, benzer özelliklere sahip karışımların iyi bir şekilde ayrılmasını sağlamasıdır. Geometrik 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 çözeltilerinin konsantre edilebilmesi için kullanılabilir.

b) Ligand değiştirme kromatografisi esnek bir prosesdir. Çünkü kompleks oluşturan özelliklere sahip olan metalin seçim aralığının geniş olması, tutulacak maddelerin özelliğine göre geçiş elementinin seçme imkanını arttırır.

Ligand değiştirme kromatografisi, kompleks teşkil eden katyonla ligand özelliği gösteren tutulacak maddeler arasında değişebilen kompleks oluşumu ile ilgilidir. Bu gerçekten yararlanarak;  $Cu^{++}$  ,  $Ni^{++}$  ,  $Co^{++}$  ,  $Zn^{++}$  gibi geçiş elementlerini ihtiva eden iyonlaşan veya şelatlaşan katyon değiştiriciler yapılmıştır. Burada kompleks teşkil eden iyon katı kararlı sabit faz içerisinde iyonik, kovalent veya koordinasyon bağlarıyla bağlanıp sabitleştirilmiştir. Bazı koordinasyon uçları serbest olacaktır ve ligandlar koordine metalle birleşeceklerdir. Eğer farklı ligandlar bu metaller için farklı ilgiye sahip ise bu ligandların kolondan aşağıya sürüklenme hızları da farklı olacaktır, bundan dolayı ayırma meydana gelecektir[5].

### III. SPOROPOLLENİN

Sporopollenin tabii bir madde olup dış etkilere karşı büyük bir dirence sahiptir. Sporopollenin, spor kaynaklarınının 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[10].

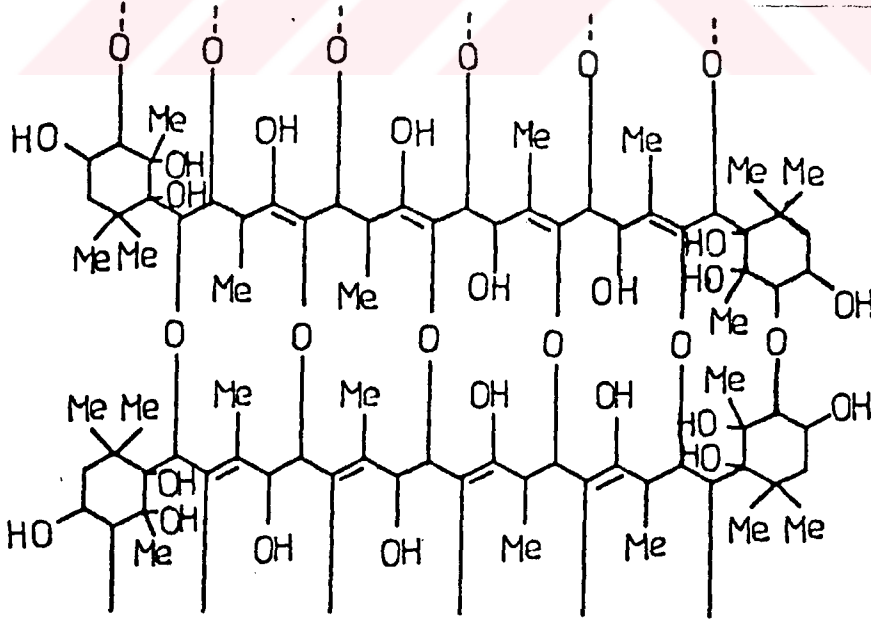
Sporopollenin tabii olarak bitki duvarlarında bulunmaktadır. Spor duvarları hücrenin iç kısımlarını çevreleyen iç içe geçmiş iki ana duvardan oluşmuştur. Hücrenin iç duvarları intine denilen sellülozdan oluşan proteopolisakkaritlerden meydana gelmiştir. Daha dıştaki duvarlar ise exine adı verilen sporopollenini oluşturan maddelerdir[11].

Sporopolleninin belli bir özelliği spor büyüklüğünün tanecikten taneciğe değişmemesidir. *Lycopodium Clavatum* sporları 20 mikronluk bir çapa sahip olup düzgün bir yapıdadır[12].

Exine üzerinde John (1814) ve Bracoonot (1829) yıllarında çalışmalarda bulunmuşlar ve hücre duvarı bileşenlerinin kimyasal reaktiflere karşı dirençleri konularını incelemişlerdir[13]. 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 madde

olduğunu ve spor duvarlarını teşkil eden exosporium içerisinde olduğunu ileri sürmüştür[13].

Sporopollenin *Lycopodium Clavatum*'dan elde edilen karbon, hidrojen ve oksijen ihtiva eden  $C_{90}H_{144}O_{27}$  şeklinde bir stokiyometriye sahip kimyasal maddedir. Yapılan deneyler sporopolleninin karotenoidlerin oksitleyici polimerleşmesinden elde edildiğini göstermiştir. Şekil 1'de sporopolleninin karotenoidlerden türetilmiş kimyasal yapısı gösterilmiştir[14].



Şekil 1. Sporopolleninin karotenoidlerden türetilmiş yapısı

### III.1. Sporopolleninin Elde Edilmesi

Lycopodium Clavatum (250 g), 750 ml asetonla birlikte 4 saat kadar kaynatılmaya bırakılır. Yağı çıkarılan sporlar filtrasyonla biriktirilir. Yağı çok az miktarda çıkarılan Lycopodium Clavatum %6'lık, 500 ml sulu potasyum hidroksitle yıkanır. Sporlar sıcak su ve (2x750 ml) lik sıcak etanolle yıkanır. Sporlar filtrasyonla toplanır, havada kurutulur ve %85'lik fosforik asitle sürekli karıştırılarak 7 gün süreyle geri döndürücü ile kaynatılır. Elde edilen süspansiyon su ile seyreltilir. Selülozdan oluşan sporlar filtre edilerek toplanır. Bu işlemden sonra (5 x 750 ml) su ile ve son olarak 750 ml eter ile yıkanır. Elde edilen ürün %55'lik diklor metan içerisinde bulunan trifluoroasetik asit ile 24 saat çalkalanarak sırasıyla diklormetan, etanol, su, etanol, diklormetan ile yıkanır. Ürün içerisinde kalan amin gruplarını gidermek için sporopollenin ninhidrin çözeltisi ile %80 sulu fenol çözeltisi ve etanol piridin çözeltisi içine alınan potasyum siyanit ile birlikte 16 saatten daha fazla karıştırılarak ısıtılır. Elde edilen sporopollenin fenol, etanol, asetik asit, etanol ve diklorometan ile sırasıyla yıkanır. Yıkama işlemine pH 7' ye kadar ve filtreden çıkan kısım renksiz oluncaya kadar devam edilir. Daha sonra bir buhar banyosunda fosforik asit ile muamele edilir. Elde edilen son ürün sarımsı kahverengi toz halinde spor exine (dış kabuklar) olan sporopollenindir[4].

### III.2. Sporopolleninin Ligand Değiştirici Olarak Uygunluğu

ideal bir değiştiricinin bazı önemli özellikleri şunlardır:

1. Düzenli bir yapıda olmaları,
2. Kontrollü ve etkin ligand değiştirici kapasiteye sahip olmaları,
3. Hızlı değiştirme,
4. Kimyasal kararlılık,
5. Fiziksel kararlılık,
6. Isısal kararlılık,
7. Tanecik büyüklüğünün uygun olması.

Sporopolleninin bazı önemli avantajları şunlardır:

1. Elde edilebilirliği; Sporopollenin tabii olarak bitkilerde mevcut olduğundan kolayca elde edilebilir. Bitkilerdeki intine organik çözücülerle, alkali ve kuvvetli asitlerle reaksiyona sokularak sporopollenin elde edilebilir. Bu reaksiyondan sonra elde edilen sporopollenin orijinal sporunun yapısı aynı kalır.

2. Ligand değiştirme kapasitesi; Sporopolleninin ligand değiştirme kapasitesi çeşitli organik maddeler ekleyerek arttırılabilir.

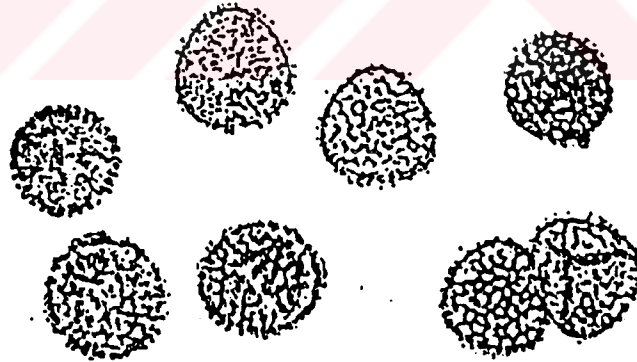
3. Kimyasal kararlılığı; Sporopollenin büyük bir kimyasal kararlılığa sahip olup, çeşitli çözücülerle reaksiyona sokulduğu halde bir çözünme görülmemiştir. Bu madde hidroklorik asit, sülfirik asit ve ortofosforik asit ile tepkimeye sokulmasına rağmen yapısında hiçbir değişiklik olmamıştır[15].

4. Fiziksel ve Isı yönünden kararlılığı; Sporopollenin fiziksel ve ısı yönünden kararlılığa sahip olan büyük moleköl ağırlıklı çapraz bağlarla bağlı tabii bir polimerdir. Brooks ve Shaw [16] gaz kromatografisinde

prolizini ve infrared spektroskopisinde elementel analizini yaparak dayanıklılığını ölçmüştür.

5. Tanecik büyüklüğü; Sporopollenin 20 mikron çapında sabit çok ince tanecikli homojen bir yapıya sahiptir. Bu sabit tanecik büyüklüğü sporopolleninin önemi arttırır. Sporopolleninin diğer bir özelliği çözücülerle muamele edildiği zaman şişmemesidir.

Sporopolleninin sabit bir tanecik büyüklüğüne sahip olması çok istenilen bir durumdur. Çünkü akış hızının dolayısıyla net ayırma tanecik büyüklüğünün sabit olmasına bağlıdır[4].



Şekil 2. Sporopolleninin Tanecik Fotoğrafı



#### IV. MATERİYAL ve METOD

##### IV.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

1. Ligand değiştirici olarak Lycopodium Clavatum sporları
2. Aminoasitler
3. Asetonitril
4. Amonyak  
(Kullanılan kimyasal maddeler Merck ürünüdür).

##### IV.2. Kullanılan Aletler

1. 160-A Shimadzu Model UV-Visible Spektrofotometre (UV-Monitör olarak)
2. P1 Pharmacia Fine Model Peristaltik Pompa
3. Kromatografi Kolonları

##### IV.3. Sporopolleninin Ligand Değiştirici Olarak Hazırlanması

Lycopodium Clavatum bitki sporlarından hazırlanan 54 g'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. Bu şekilde 1,2-diaminoetan sporopollenine bağlanmış olur. Reaksiyon;

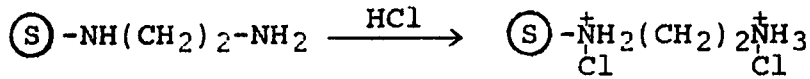


Diaminoetil-sporopollenin  
şeklindedir.

Daha sonra süspansiyon soğutulmaya bırakılır. Soğutma işlemi yapıldıktan sonra vakum filtresiyle süspansiyon süzülür ve toluenle yıkanır. Böylece diaminoetil-sporopolleninin elde edilir.

Depolanması gereken diaminoetil-sporopollenine hidroklorik asit ilave edilmesi gerekir. Aksi halde diaminoetil-sporopollenin hava atmosferinde bulunan CO<sub>2</sub>

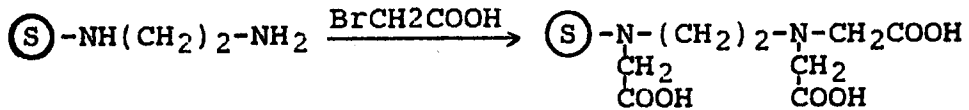
ile reaksiyona girerek bünyesindeki aminleri karbonatlarına çevirir. Sporopolleninin HCl ile reaksiyonu için 2 M'lık HCl kullanılır ve daha sonra su ile yıkanır. Son olarak etanol ve eter ile yıkandıktan sonra kurumaya bırakılır. Diaminoetil-sporopolleninin klorik asit ile reaksiyonu,



şeklindedir.

Klorik asit formundaki diaminosporopollenin kullanılmak istendiği zaman alkollü sodyum hidroksit ile muamele edilir, su, etanol ve diklorometan ile sırasıyla yıkanır.

Bir reaksiyon kabına 48 g diaminoetil-sporopollenin alınır. 32 ml 2M NaOH ve 32 ml 1 M NaHCO<sub>3</sub> ile nötürleştirilen bromoasetik asit reaksiyon kabına eklenir. Oda sıcaklığında bu süspansiyon bir gece boyunca karıştırılır. Daha sonra sırayla su, sulu asetik asit çözeltisi ve tekrar su ile yıkanır ve kurutulur. Reaksiyon,

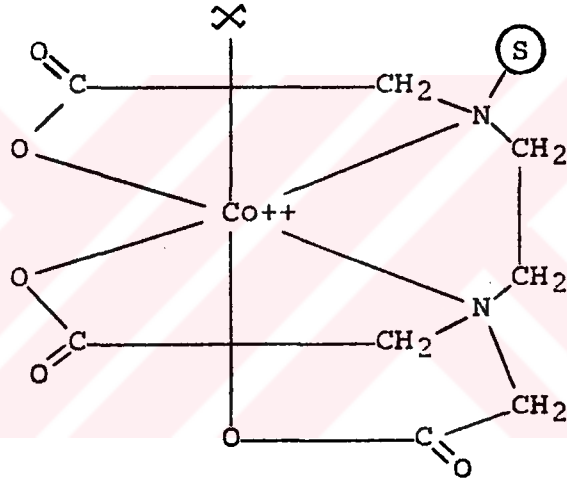
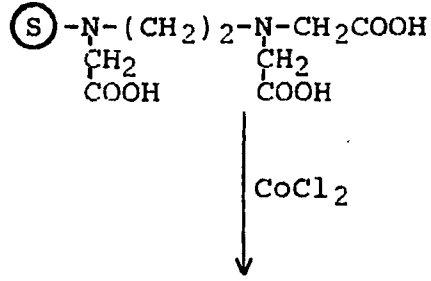


Karboksimetil diaminoetil sporopollenin

şeklindedir.

1 M CoCl<sub>2</sub> çözeltisi bir beher içerisine hazırlanır. Bu çözelti bromoasetik asitli-diaminoetil sporopollenine (karboksimetil diaminoetilsporopollenin) eklenir. Süspansiyon pH'sı 3,5 yapılır. Bir karıştırma kabına alınan

bu çözelti bir gece boyunca manyetik karıştırıcı ile karıştırılır. Elde edilen süspansiyon süzülerek saf su ile yıkanır. Reaksiyon aşağıdaki şekilde olur [5].



$\text{Co}^{++}$  yüklü karboksimetil diaminoetilsporopollenin

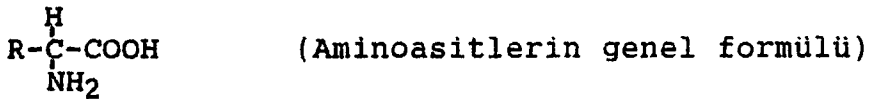
## V. LİGAND DEĞİŞTİRME KROMATOĞRAFİSİ İLE AYRILAN MADDELER ve AYIRMA İŞLEMLERİ

### V.1. Kolonda Ayrılan Maddeler

#### Aminoasitler:

Aminoasitler proteinlerin temel yapısal ünitesidir. Aminoasitlerin polipeptit yapısında belirli bir düzen içerisinde bulunması, proteinlerin üç boyutlu yapısını belirlemektedir. Yirmi aminoasitin protein yapısında çok değişik kombinasyonlarda ve dizilerde bulunması proteinlere çok değişik özellikler ve aktiviteler kazandırmaktadır.

Protein yapısında bulunan yirmi aminoasitin hepsi ortak bir yapıya sahiptir. Bütün aminoasitler aynı karbona bağlı bir karboksil (-COOH), bir de amino (-NH<sub>2</sub>) grubuna sahiptirler. Onlar yalnız R grubu veya yan zincir adı verilen kısımları sayesinde değişik yapılara, farklı elektrik yüküne ve suda değişik oranlarda çözünürlüğe sahiptirler. Protein yapısında yer alan bu yirmi aminoasite standart, temel yahut normal aminoasitler adı verilmektedir.



Aminoasitler karışımı pH 5,5'a ayarlanıp yine aynı pH'da kağıt elektroforezine tabii tutulacak olursa, üç ana gruba ayrıldığı gözlenir.

Tablo 1. Aminoasitlerin izoelektrik Noktaları ve Çözünürlükleri

Aminoasit	Üç Harfli Kisaltma	pI	Çözünürlük (g/100 ml H <sub>2</sub> O)
Alanin	Ala	6,02	17,00
Arjinin	Arg	10,76	15,00
Asparajin	Asn	5,41	2,40
Aspartik asit	Asp	2,77	0,40
Sistein	Cys	5,07	çok
Glutamin	Gln	5,65	3,60
Glutamik asit	Glu	3,22	0,70
Glisin	Gly	5,97	25,00
Histidin	His	7,59	0,40
İzolösin	Ile	6,02	4,00
Lösin	Leu	5,98	2,00
Lisin	Lys	9,74	çok
Methionin	Met	5,74	3,00
Fenilalanin	Phe	5,48	3,00
Prolin	Pro	6,30	162,00
Serin	Ser	5,68	5,00
Threonin	Thr	5,60	çok
Triptofan	Trp	5,89	1,00
Tirozin	Tyr	5,66	0,04
Valin	Val	5,02	9,00

Birinci grupta, pH 5,5'da net elektrik yükleri sıfır olan aminoasitler bulunmaktadır. Bu grupta bulunan aminoasitler genellikle monoamino ve monokarboksilik aminoasitler olup pH 5,5'da hareket etmezler. Bu aminoasitlere nötr aminoasitler de denir.

İkinci grup aminoasitler katoda yani (-) yüklü elektrodada doğru hareket etmektedirler. Bu grup aminoasitlerde birden fazla azot ihtiva eden grup bulunmakta ve net elektrik yükleri de pozitifdir. Bu grup amino asitlere bazik amino asitler adı verilmektedir.

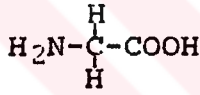
Üçüncü grup aminoasitler anoda yani (+) yüklü elektrodada doğru hareket etmektedirler. Bu grup aminoasitler

ise birden fazla karboksil grubu ihtiva eden aminoasitlerdir ve asidik aminoasitler olarak adlandırılmaktadır.

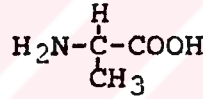
#### Nötral Aminoasitler

Nötral aminoasitler monoamino ve monokarboksilli aminoasitlerdir. Bunlar yan zincirlerin yapı ve özelliğine bakılarak tekrar alt sınıflamaya tabi tutulmaktadır.

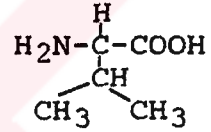
Düz zincirli aminoasitler: Yan zinciri düz olan aminoasitler bu gruba girmektedir. Bunlar glisin, alanin, valin, lösin, prolin ve izolösin dir.



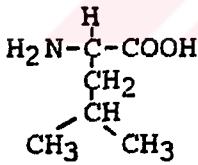
Glisin



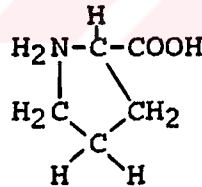
Alanin



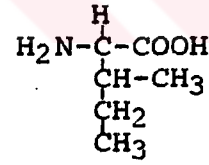
Valin



Lösin

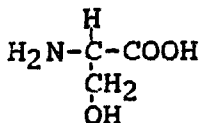


Prolin

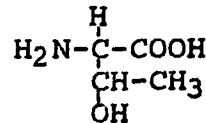


izolösin

Hidroksilli aminoasitler: Yan zincirlerinde hidroksil grubu ihtiva eden amino asitlere hidroksilli aminoasitler adı verilmektedir. Serin ve threonin hidroksilli aminoasitlerdendir.

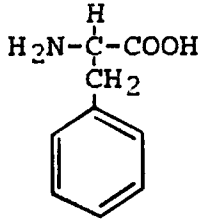


Serin

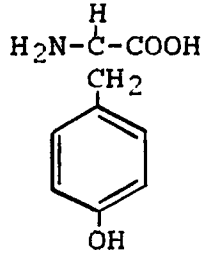


Threonin

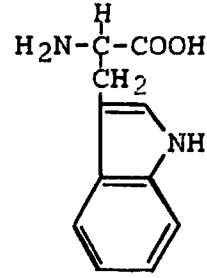
Aromatik aminoasitler: Bu grup aminoasitler alanin aminoasitinin metil grubuna fenil, hidroksifenil ve indol halkasının bağlanmasıyla oluşmuşlardır. Bu grup aminoasitlere fenilalanin, tirozin ve triptofan girmektedir.



Fenilalanin

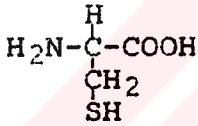


Tirozin

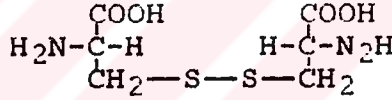


Triptofan

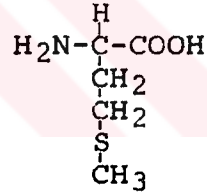
Sülfür grubu ihtiva eden aminoasitler: Monoamino monokarboksilli aminoasitlerden sistein ve methionin sülfür grubu ihtiva eden iki amino asittir.



Sistein



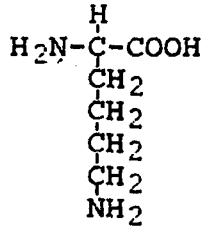
Sistin



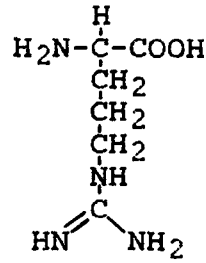
Methionin

#### Bazik aminoasitler

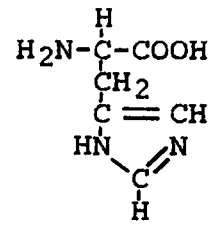
Bazı aminoasitlerin yan zinciri pH 7,0'de net pozitif yüke sahiptir. Bu amino asitlerin hepsi de altı karbonludur. Bunlardan lizin, alifatik zincirinde epsilon ( $\epsilon$ -NH<sub>2</sub>) grubu ile pozitif yüke sahiptir. Arjinin, guanidinium grubu, histidin ise imidazolium grubu ile pozitif yüke sahip olan aminoasitlerdir. pH 7,0'de ancak %10 pozitif yüklü olan histidin pH 6,0'da %50'si pozitif yüklü hale gelmektedir.



Lisin



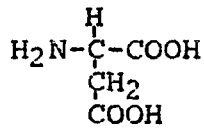
Arjinin



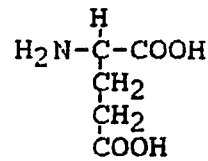
Histidin

### Asidik Aminoasitler

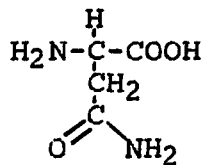
iki karboksil grubuna sahip olan aminoasitlerden birincisi aspartik asit ikincisi ise glutamik asittir. Her iki aminoasit de pH 6 ve 7'de tamamen iyonize olmakta ve asidik özellik göstermektedir. Bu iki aminoasitin amidleri olan asparajin ve glutamine de protein yapısında bol miktarda rastlanmaktadır[17].



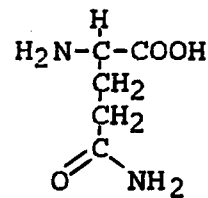
Aspartik Asit



Glutamik Asit



Asparajin



Glutamin



## V.2. Kolon Dolgu Maddesi ve Hareketli Fazlar

### Kolon Dolgu Maddesi Olarak Kullanılan Reçine:

Reçine ismi:	Karboksimetil diaminoetil sporopollenin
Reçine Tabiatı:	Lycopodium Clavatum Polimer
Fonksiyonlu Grup:	$\begin{array}{c} \text{-N-(CH}_2\text{)}_2\text{-N-CH-COOH} \\ \text{H}_2\text{C} \qquad \qquad \qquad \text{CH} \\ \text{COOH} \qquad \qquad \qquad \text{COOH} \end{array}$
Donor Atom:	-COOH

Hareketli Faz	Amonyak Konsantrasyonu
(30:70)Asetonitril-Su	1,00 M
(30:70)Asetonitril-Su	0,14 M

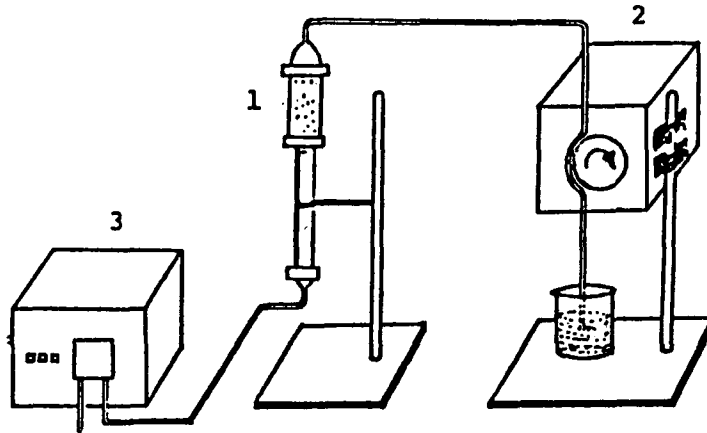
## V.3. Ligand Değişirici Kolonu Yükleme

Ligand değiştirici olarak kullanılan sporopollenin damıtılmış su ile süspansiyon haline gelinceye kadar bir karıştırıcı içerisinde karıştırılır. Ana kolona sporopollenini sıkı bir şekilde doldurabilmek için daha geniş bir çapa sahip yardımcı bir kolon ana kolona eklenir. Ana kolonun çıkış bağlantısına bir filtre kağıdı ve bu kağıdın üzerine cam ipeği elyafı yerleştirilir. Böylece süspansiyon halindeki karışımın kolondan dışarı çıkması nlenmiş olur. Daha sonra yardımcı kolona bu süspansiyon halindeki karışım dökülür. Yardımcı kolonun kapağı sıkıca kapatıldıktan sonra kolona damıtılmış su bir peristaltik pompa yardımıyla verilir. Süspansiyon halindeki sporopolleninin kolona iyice yerleşmesi için kolondan saf su sürekli geçirilir. Kolona, çıkan çözeltinin rengi berrak

oluncaya kadar yaklaşık 6-7 saat kadar saf su geçirme işlemine devam edilir. Sporopollenin kolona sıkıca yerleştirildikten sonra peristaltik pompa durdurulur ve yardımcı kolon devreden çıkarılır[4].

#### V.4. Sistemin Çalıştırılması ve Numune Verilmesi

İlk olarak ligand değiştirici kolondan taşıyıcı ve sökücü olarak kullanılan çözelti bir kaç saat geçirilerek kolonun kararlı hale gelmesi sağlanır. UV dedektör uygun dalga boyuna getirilir. UV dedektör ile sıfır ayarlaması yapılır. Daha sonra kolona, kolon hacminin % 1-2'sini geçmiyecek şekilde bir injektör içerisine hareketli faz içerisinde hazırlanmış numunelerden alınan değişik hacim ve konsantrasyondaki örnekler kolona injekte edilerek taşıyıcı çözelti kolona pompalanır. Kolona numune verirken dikkat edilecek husus, kolona verilen numunenin düzgün bir şekilde injekte edilmesi ve kolon yüzeyine eşit bir dağılımın sağlanmasıdır. Kolondan çıkan çözeltinin absorban pikleri UV dedektör ile tesbit edilir.



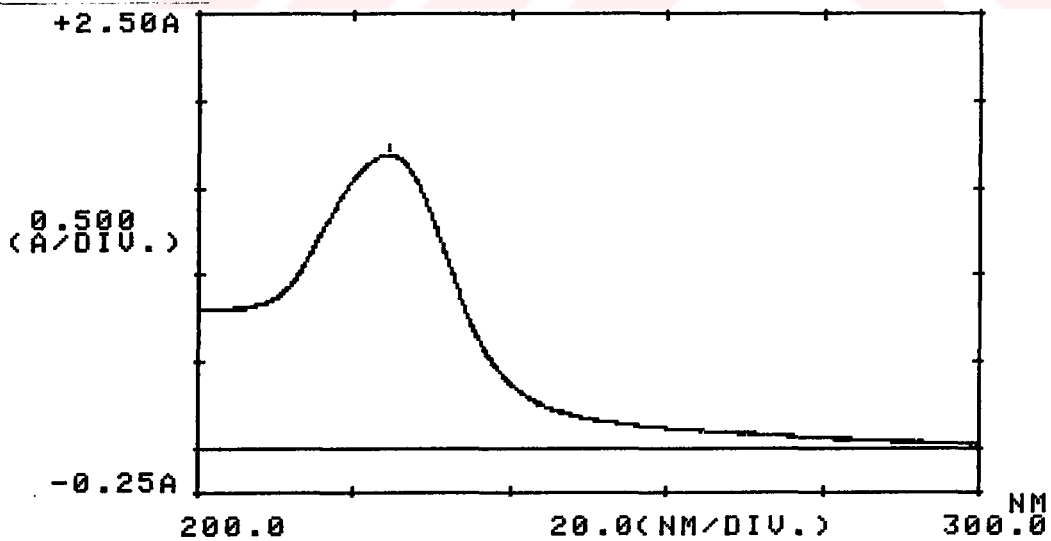
Şekil 3. Ayırma Sistemi: 1. kolon, 2. Pompa, 3. UV dedektör.

### V.5. Aminoasitlerin Co(II) Yüklü Karboksilli Diaminosporopollenin ile Ayrılması

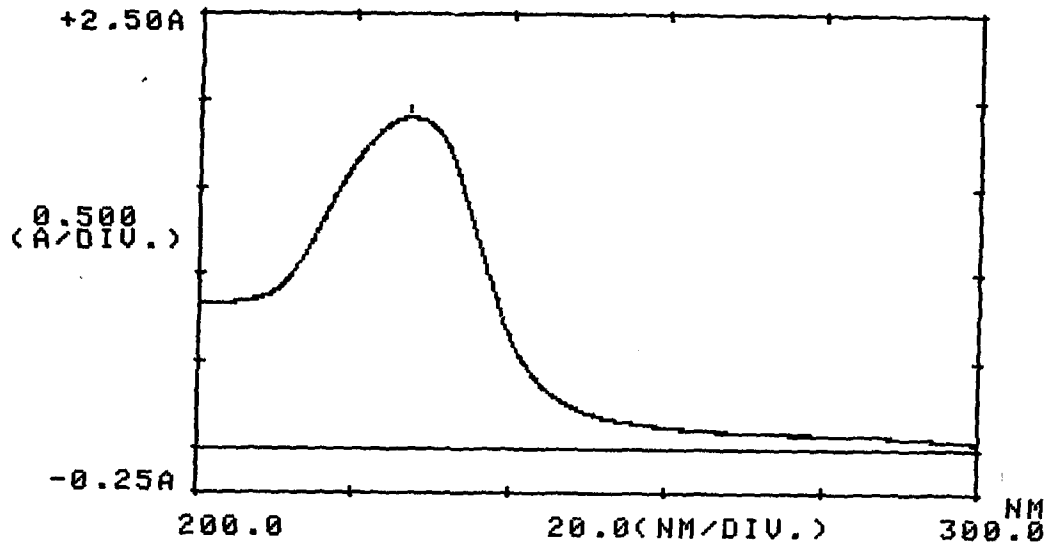
M. Caude ve A. Foucault, ligand değiştirme kromatografisi tekniği kullanarak aminoasitlerin ayrılması üzerine çalışmışlardır. Bu çalışmalarında çeşitli uzunlukta kolonlar kullanarak, kolon uzunluğunun ve hareketli faz pH'ının ayırma üzerindeki etkilerini göstermişlerdir. Kolondan çıkan aminoasitlerin tesbit edilmesinde UV spektrofotometre kullanmışlardır[18].

Bu çalışmada iki değişik uzunlukta kolon kullanılarak bazı aminoasitlerin ayrılmasına çalışılmıştır. Amonyak konsantrasyonu farklı olan iki değişik hareketli faz ile aminoasitlerin ayrılmasına çalışıldı ve bu hareketli fazların ayrılma üzerindeki etkileri incelendi.

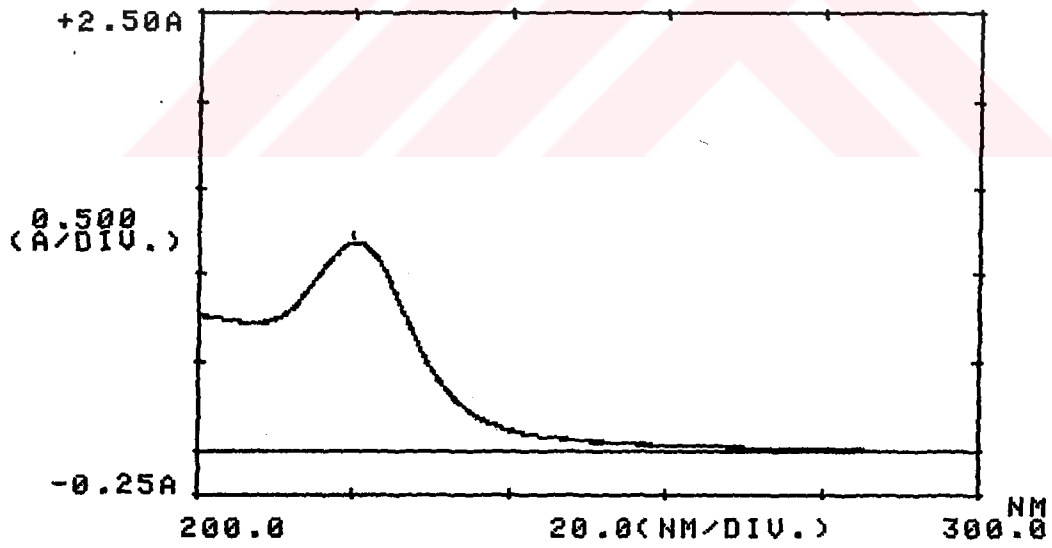
#### Kolonda Ayrılan Aminoasitlerin Spektrumları



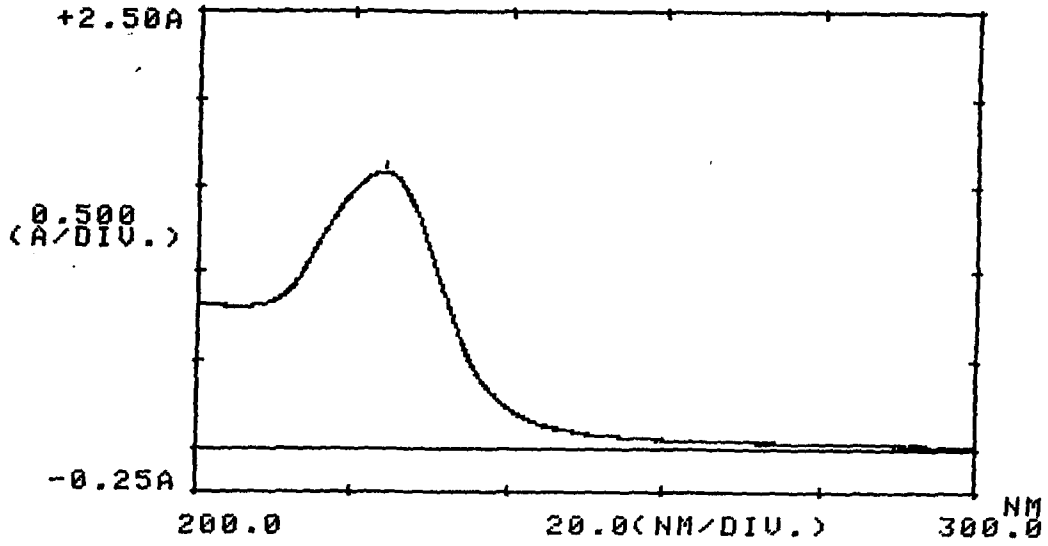
Şekil 4. 1 M  $\text{NH}_3$  'lı (30:70) asetonitril-su içinde 0,1 M aspartik asit,  $\lambda_{\text{max}} = 224,4 \text{ nm}$



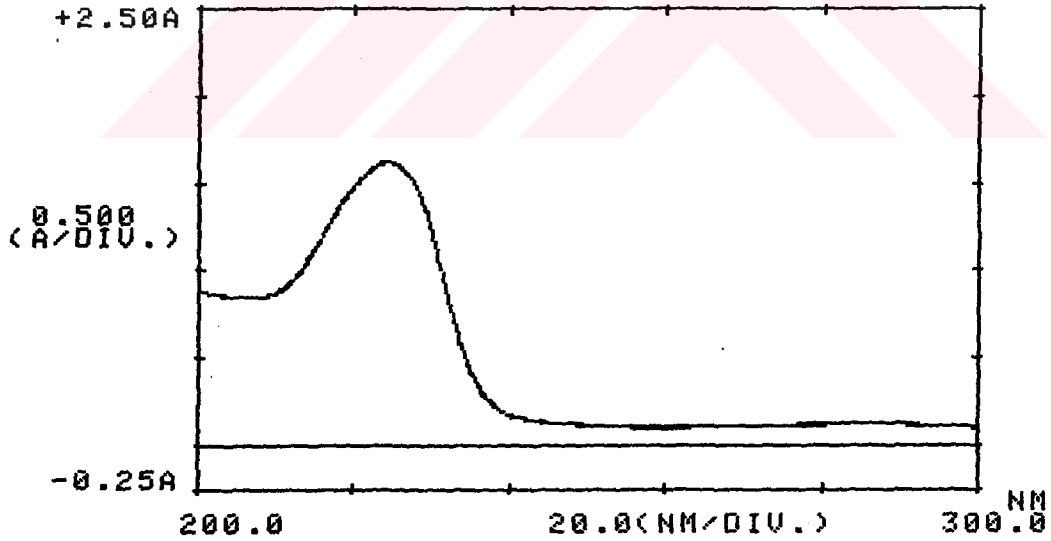
Şekil 5. 1 M NH<sub>3</sub> 'lı (30:70) asetonitril-su içinde 0,2 M arjinin,  $\lambda_{\max} = 226,9$  nm



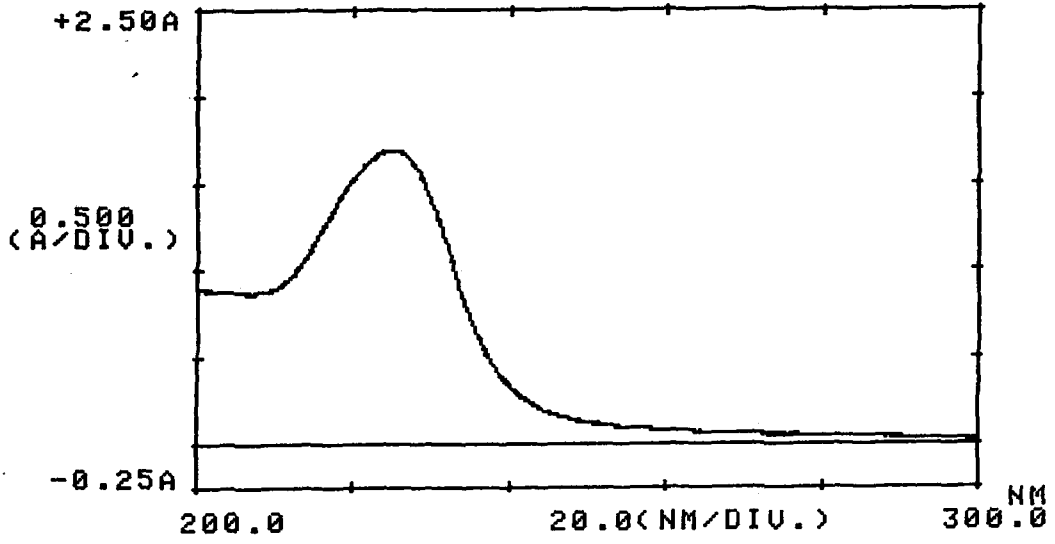
Şekil 6. 1 M NH<sub>3</sub> 'lı (30:70) asetonitril-su içinde 0,02 M aspartik asit,  $\lambda_{\max} = 220,0$  nm



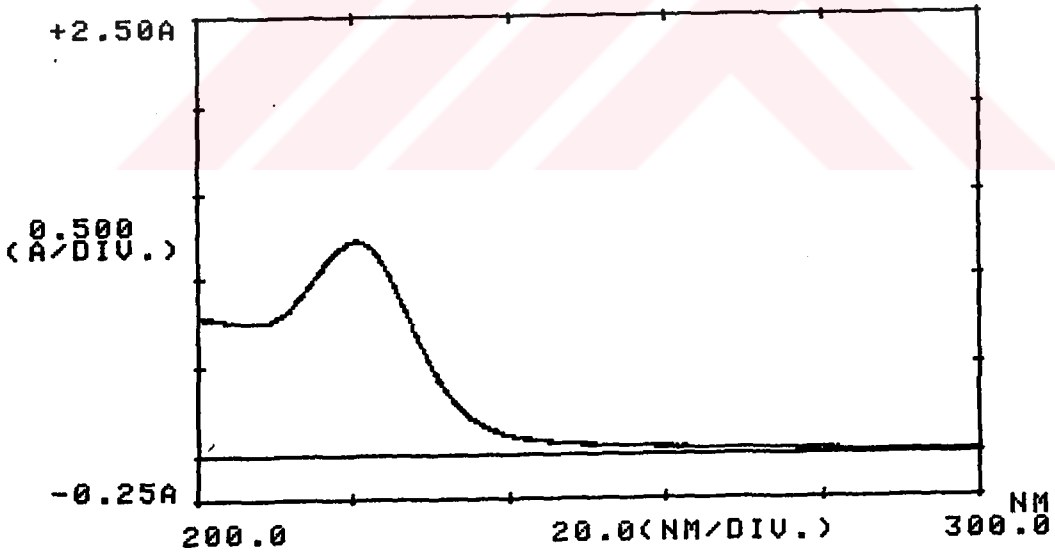
Şekil 7. 1 M  $\text{NH}_3$  'lı (30:70) asetonitril-su içinde  
0,02 M arjinin,  $\lambda_{\text{max}} = 224,0 \text{ nm}$



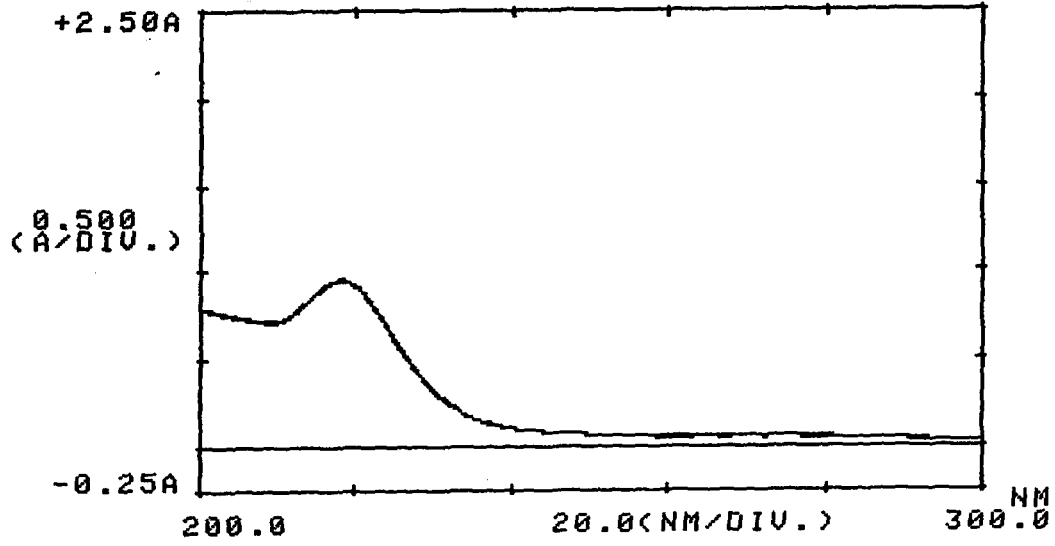
Şekil 8. 1 M  $\text{NH}_3$  'lı (30:70) asetonitril-su içinde  
0,001 M histidin,  $\lambda_{\text{max}} = 224,3 \text{ nm}$



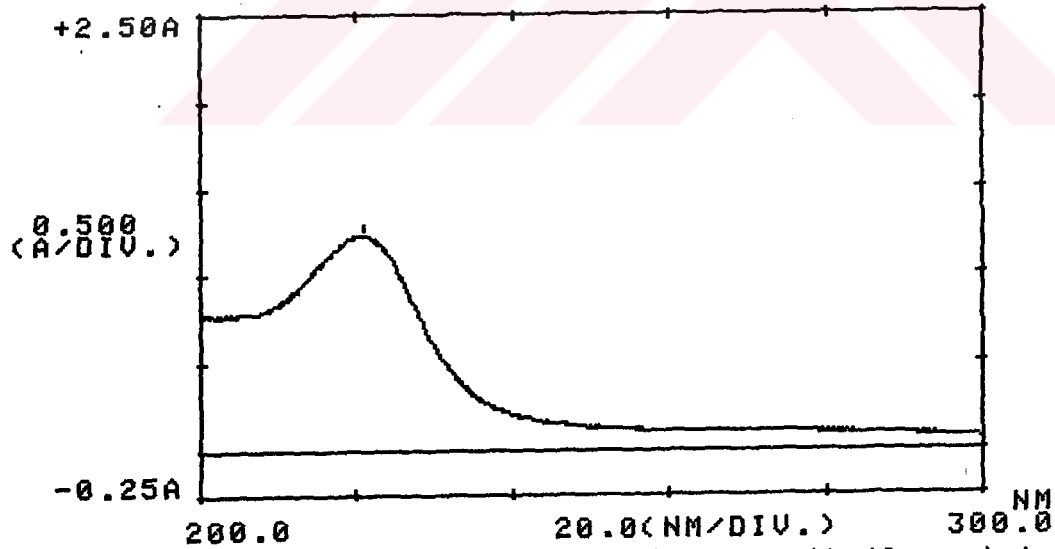
Şekil 9. 1 M  $\text{NH}_3$  'lı (30:70) asetonitril-su içinde  
0,06 M arjinin,  $\lambda_{\text{max}} = 225,0 \text{ nm}$



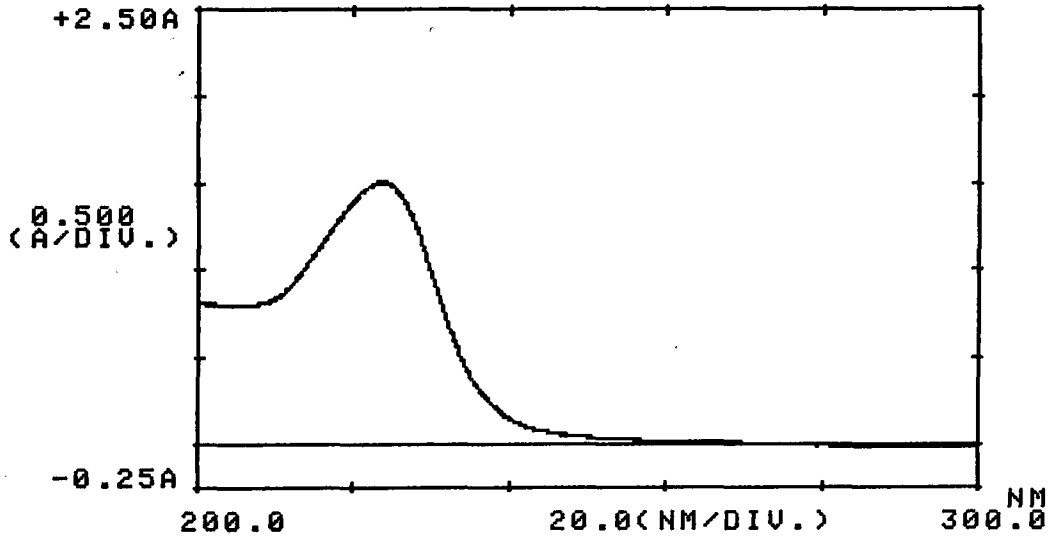
Şekil 10. 1 M  $\text{NH}_3$  'lı (30:70) asetonitril-su içinde  
0,1 M glisin,  $\lambda_{\text{max}} = 220,2 \text{ nm}$



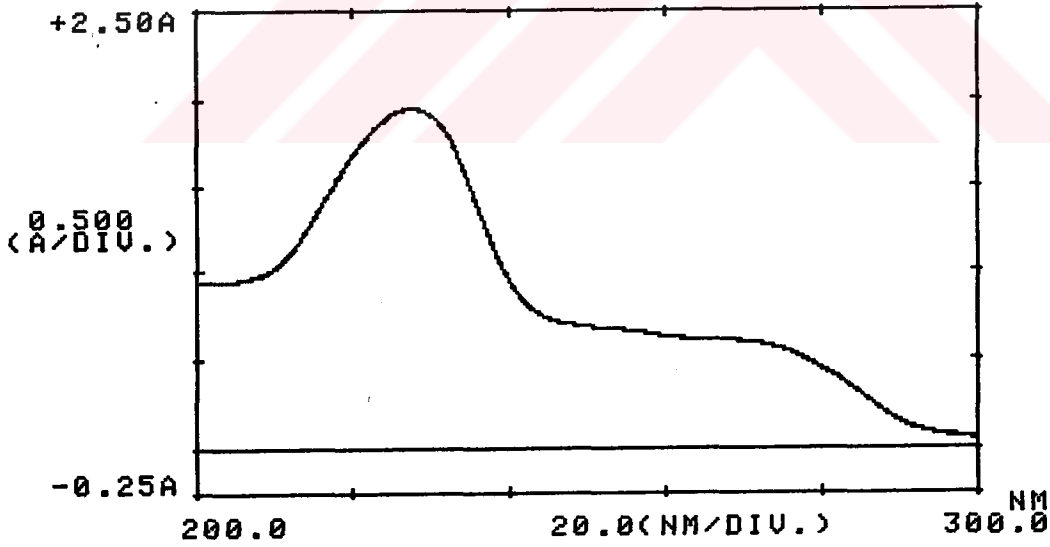
Şekil 11. 1 M  $\text{NH}_3$  'lı (30:70) asetonitril-su içinde  
0,02 M glisin,  $\lambda_{\text{max}} = 217,7 \text{ nm}$



Şekil 12. 1 M  $\text{NH}_3$  'lı (30:70) asetonitril-su içinde  
0,04 M arjinin,  $\lambda_{\text{max}} = 220,8 \text{ nm}$

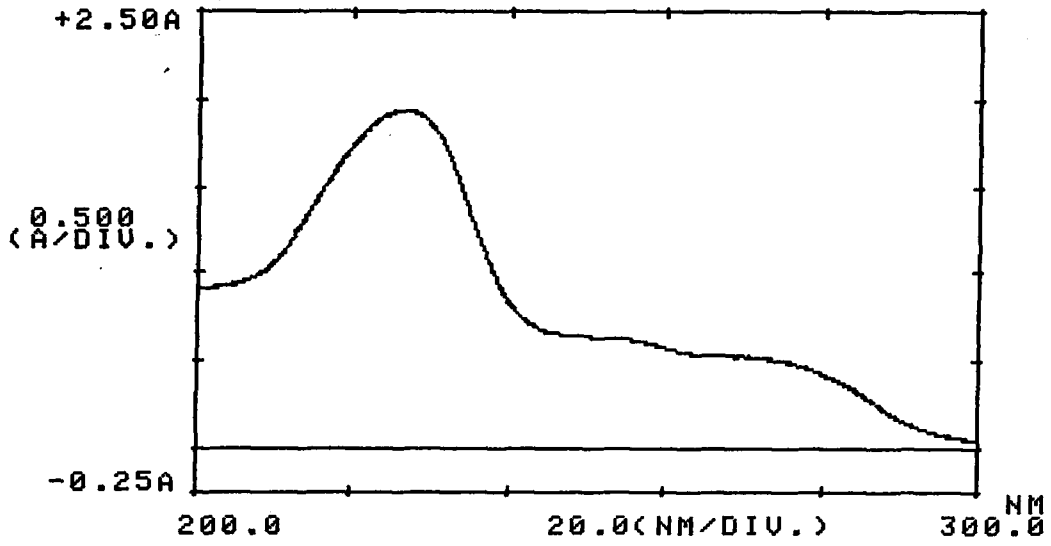


Şekil 13. 1 M  $\text{NH}_3$  'lı (30:70) asetonitril-su içinde  
0,1 M lizin,  $\lambda_{\text{max}} = 223,5 \text{ nm}$

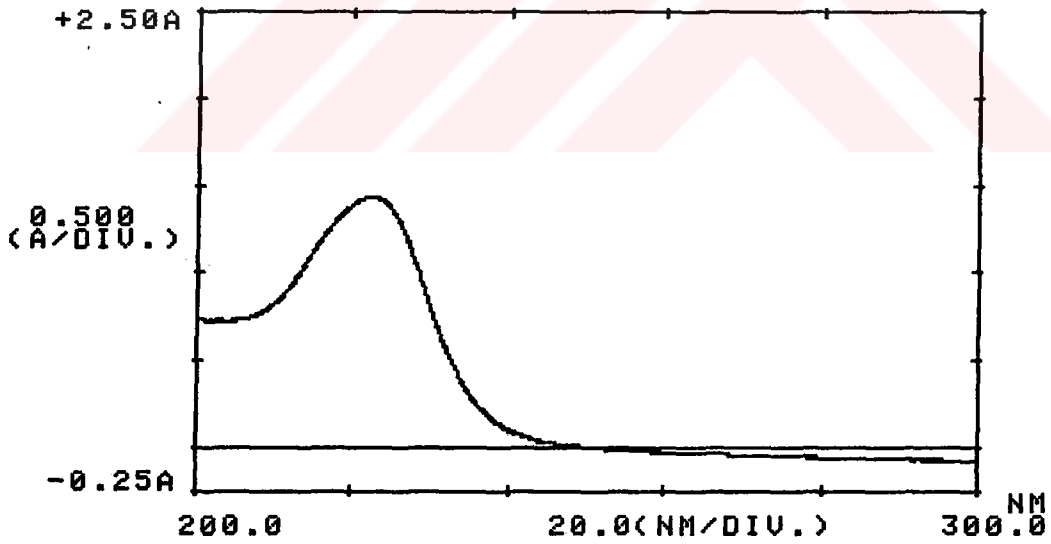


Şekil 14. 1 M  $\text{NH}_3$  'lı (30:70) asetonitril-su içinde  
0,1 M glutamin,  $\lambda_{\text{max}} = 227,4 \text{ nm}$

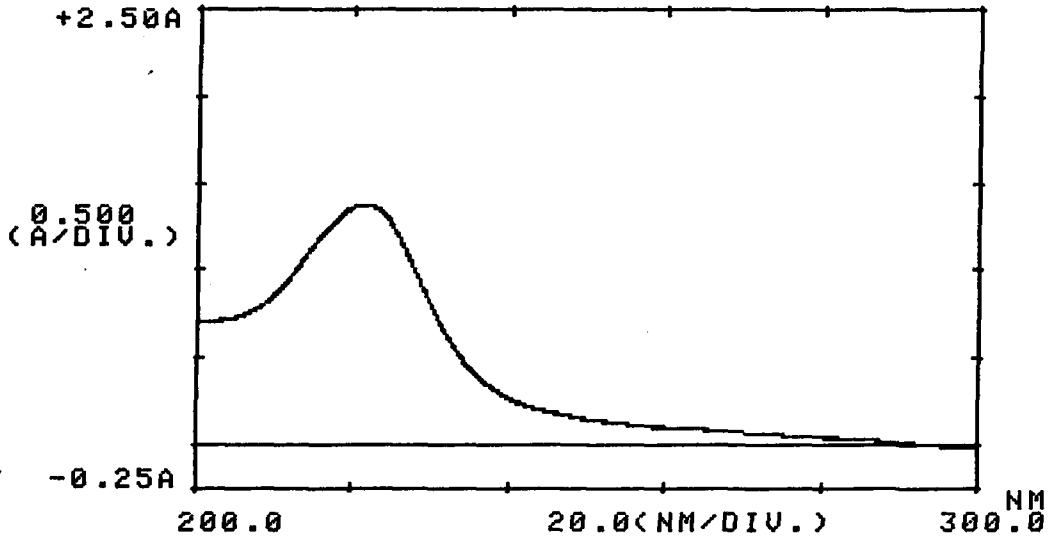




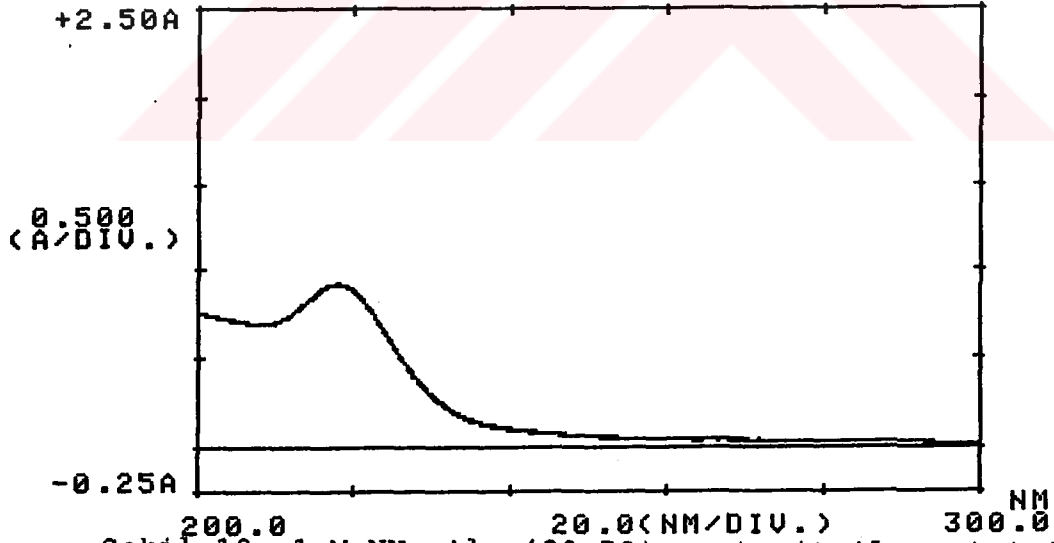
Şekil 15. 0,14 M  $\text{NH}_3$  'lı (30:70) asetonitril-su içinde 0,1 M glutamin,  $\lambda_{\text{max}} = 226,4$  nm



Şekil 16. 0,14 M  $\text{NH}_3$  'lı (30:70) asetonitril-su içinde, 0,1 M lizin,  $\lambda_{\text{max}} = 222,5$  nm



Şekil 17. 0,14 M  $\text{NH}_3$  'lı (30:70) asetonitril-su içinde 0,1 M Asp. asit,  $\lambda_{\text{max}} = 221,7 \text{ nm}$



Şekil 18. 1 M  $\text{NH}_3$  'lı (30:70) asetonitril-su içinde 0,01 M lizin,  $\lambda_{\text{max}} = 217,8 \text{ nm}$

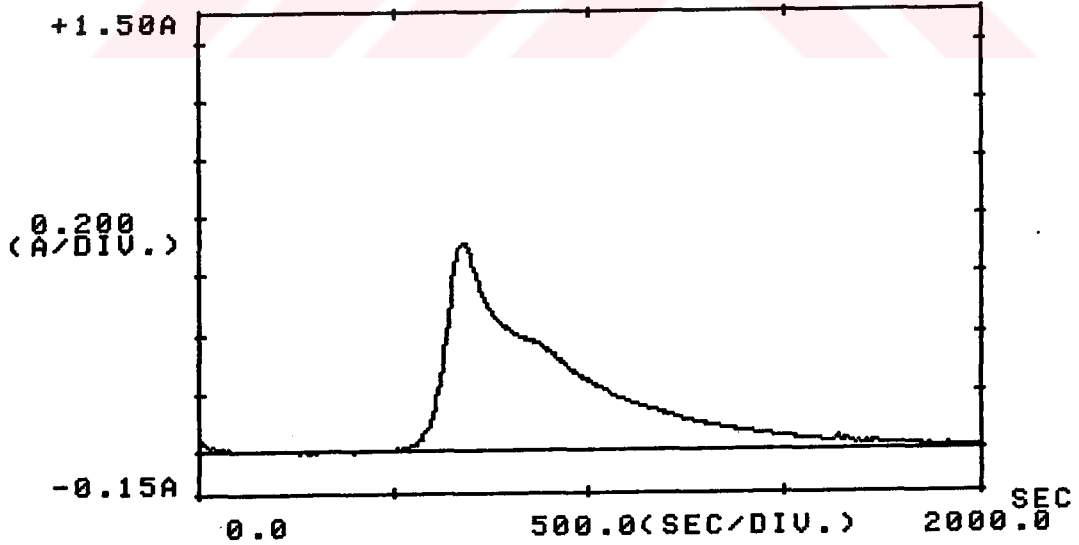
## DENEY I

Kolon Uzunluğu: 30 cm  
 Kolon Çapı : 0,4 cm  
 Akış Hızı : 0,31 ml/dk  
 Hareketli Faz : 1 M NH<sub>3</sub> 'lı (30:70) asetonitril-su

TABLO 2.

## Amino Asitlerin Elüsyon Hacimleri

Aminoasit	Kons.(M)	Hacim(ml)	Pik [t(sn)]	V(ml)]
Asp. asit	0,1	0,05	679	3,5
Arjinin	0,2	0,05	873	4,5



Şekil 19. Aspartik asid ve arjininin ayrılması.

1. Asp. asit (224 nm)
2. Arjinin

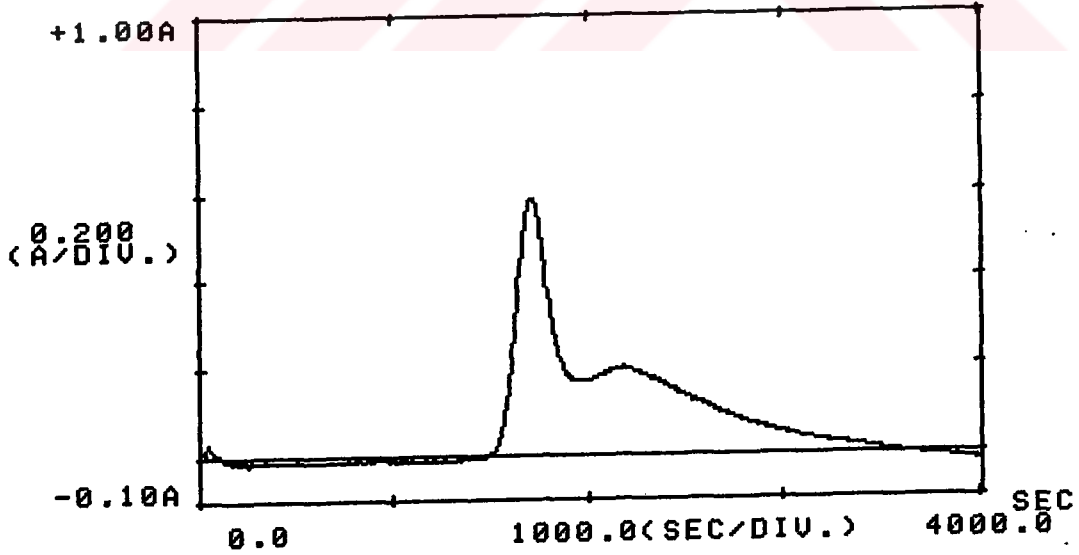
## DENEY II

Kolon Uzunluğu: 50 cm  
 Kolon Çapı : 0,4 cm  
 Akış Hızı : 0,22 ml/dk  
 Hareketli Faz : 1 M NH<sub>3</sub> 'lı (30:70) asetonitril-su

TABLO 3.

## Amino Asitlerin Elüsyon Hacimleri

Aminoasit	Kons.(M)	Hacim(ml)	Pik [t(sn)]	V(ml)]
Asp. asit	0,1	0,1	1715	6,4
Arjinin	0,2	0,1	2180	8,1



Şekil 20. Aspartik asid ve arjininin ayrılması.

1. Asp. asit (226 nm)
2. Arjinin

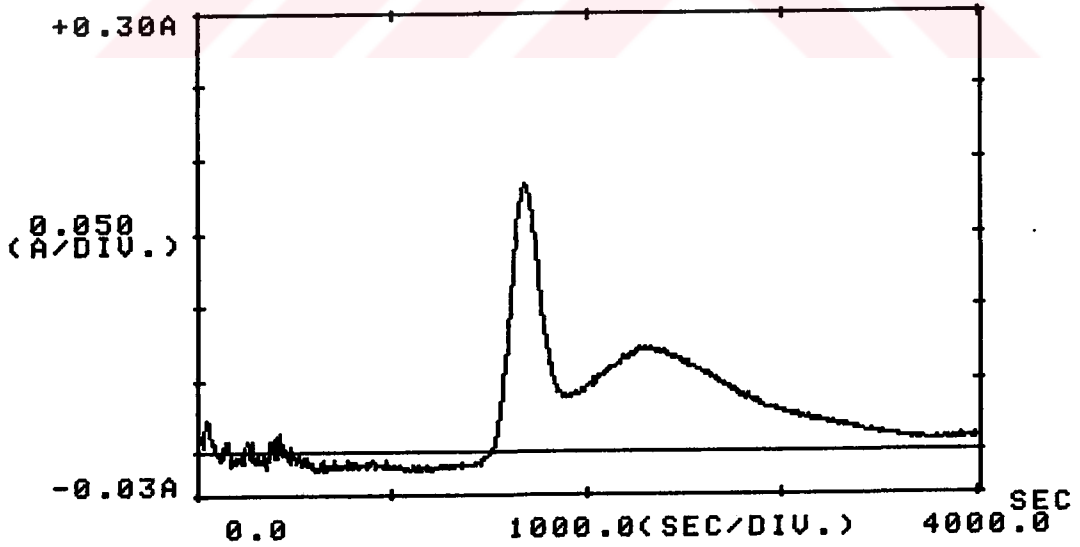
## DENEY III

Kolon Uzunluğu: 50 cm  
 Kolon apı : 0,4 cm  
 Akış Hızı : 0,23 ml/dk  
 Hareketli Faz : 1 M NH<sub>3</sub> 'lı (30:70) asetonitril-su

TABLO 4.

## Amino Asitlerin Elüsyon Hacimleri

Aminoasit	Kons.(M)	Hacim(ml)	Pik [t(sn)	V(ml)]
Asp. Asit	0,02	0,1	1685	6,6
Arjinin	0,02	0,1	2290	9,0



şekil 21. Aspartik asid ve arjininin ayrılması.

1. Aspartik asit (224 nm)
2. Arjinin

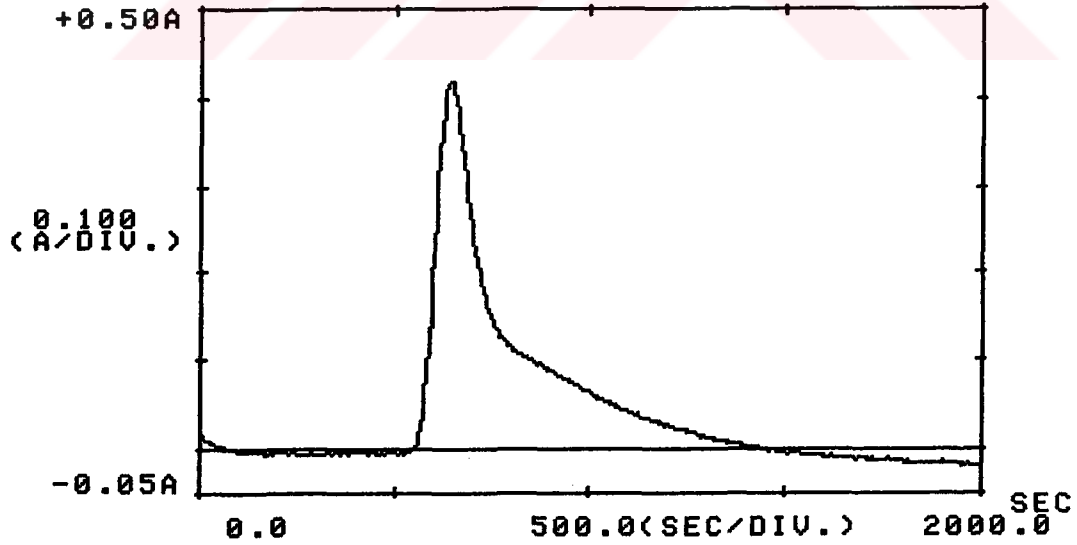
## DENEY IV

Kolon Uzunluğu: 30 cm  
 Kolon apı : 0,4 cm  
 Akış Hızı : 0,31 ml/dk  
 Hareketli Faz : 1 M NH<sub>3</sub> 'lı (30:70) asetonitril-su

TABLO 5.

## Amino Asitlerin Elüsyon Hacimleri

Aminoasit	Kons.(M)	Hacim(ml)	Pik [t(sn)	V(ml)]
Histidin	0,001	0,025		
Arjinin	0,06	0,075		



şekil 22. Histidin ve arjininin ayrılması.

1. Histidin + arjinin (224 nm)
2. -

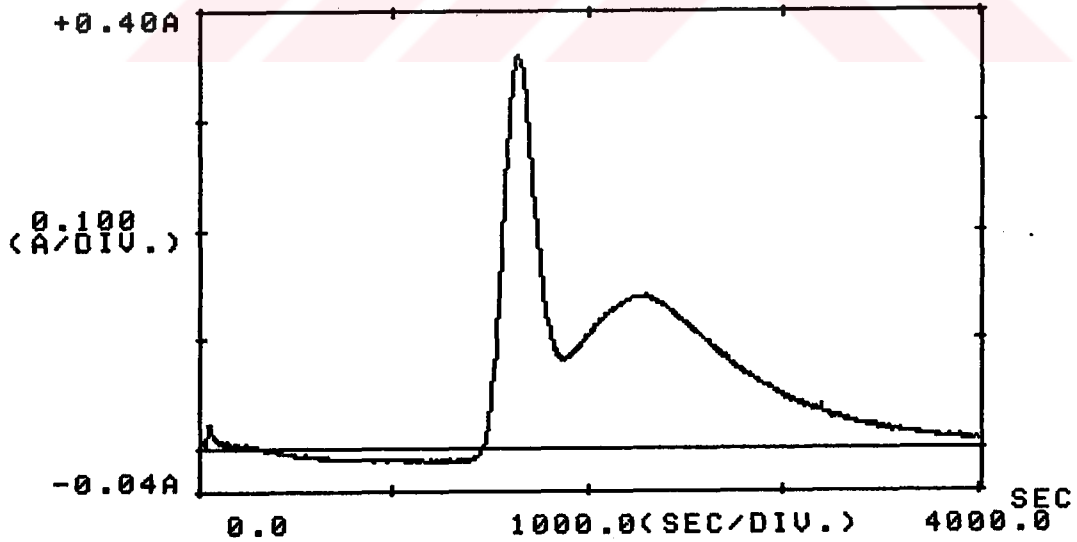
## DENEY V

Kolon Uzunluğu: 50 cm  
 Kolon Çapı : 0,4 cm  
 Akış Hızı : 0,22 ml/dk  
 Hareketli Faz : 1 M NH<sub>3</sub> 'lı (30:70) asetonitril-su

TABLO 6.

## Amino Asitlerin Elüsyon Hacimleri

Aminoasit	Kons.(M)	Hacim(ml)	Pik [t(sn)	V(ml)]
Histidin	0,001	0,1	1635	6,2
Arjinin	0,06	0,1	2295	8,7



Şekil 23. Histidin ve arjininin ayrılması.

1. Histidin (225 nm)
2. Arjinin

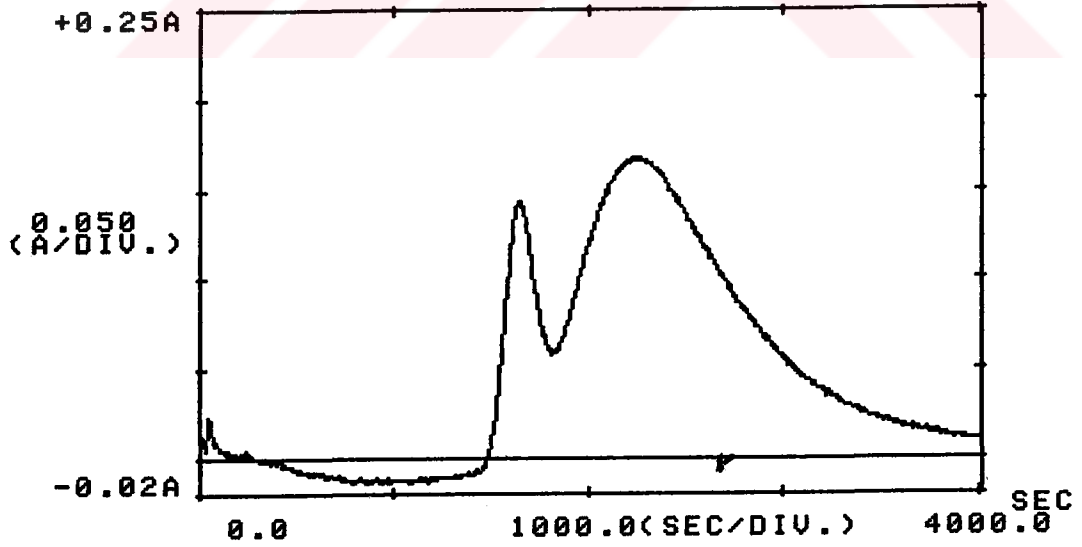
## DENEY VI

Kolon Uzunluğu: 50 cm  
 Kolon Çapı : 0,4 cm  
 Akış Hızı : 0,22 ml/dk  
 Hareketli Faz : 1 M NH<sub>3</sub> (30:70) asetonitril-su

TABLO 7.

Amino Asitlerin Elüsyon Hacimleri

Aminoasit	Kons. (M)	Hacim(ml)	Pik [t(sn)	V(ml)]
Histidin	0,001	0,05	1650	6,1
Arjinin	0,06	0,15	2250	8,4



Şekil-24. Histidin ve arjininin ayrılması

1.Histidin (225 nm)  
 2.Arjinin



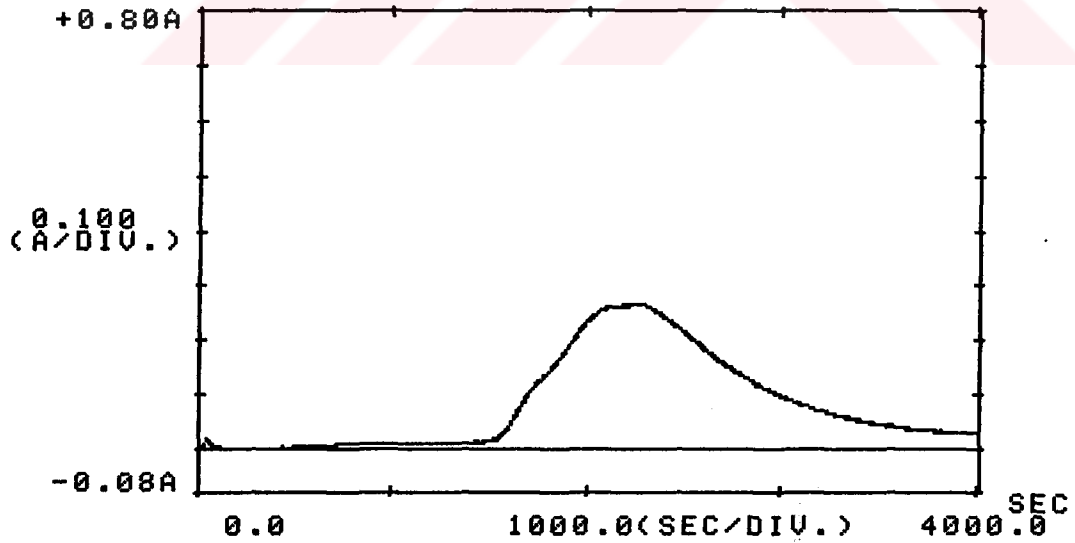
## DENEY VII

Kolon Uzunluğu: 50 cm  
 Kolon Çapı : 0,4 cm  
 Akış Hızı : 0,23 ml/ dk  
 Hareketli Faz : 1 M NH<sub>3</sub> (30:70) asetonitril-su

TABLO 8.

## Amino Asitlerin Elüsyon Hacimleri

Aminoasit	Kons.(M)	Hacim(ml)	Pik [t(sn)	V(ml)]
Glisin	0,1	0,1		
Arjinin	0,2	0,1		



Şekil 25. Glisin ve arjininin ayrılması.

1. Glisin + arjinin (226 nm)
2. -

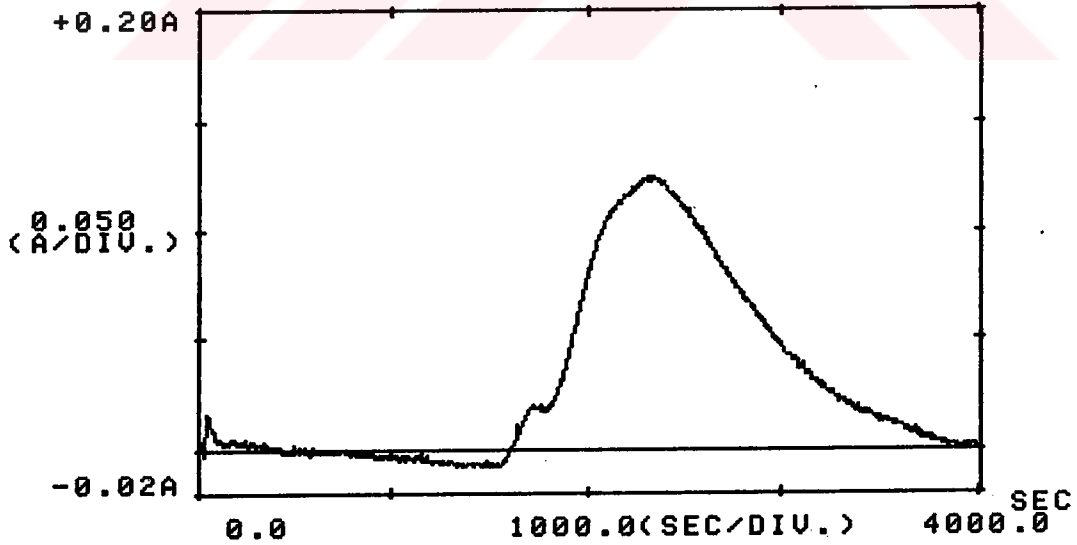
## DENEY VIII

Kolon Uzunluğu: 50 cm  
 Kolon Çapı : 0,4 cm  
 Akış Hızı : 0,22 ml/dk  
 Hareketli Faz : 1 M NH<sub>3</sub> 'lı (30:70) asetonitril-su

TABLO 9.

## Amino Asitlerin Elüsyon Hacimleri

Aminoasit	Kons.(M)	Hacim(ml)	Pik [t(sn)	V(ml)]
Glisin	0,02	0,05	1728	6,4
Arjinin	0,06	0,15	2345	8,7



Şekil 26. Glisin ve arjininin ayrılması.

1. Glisin (225 nm)
2. Arjinin

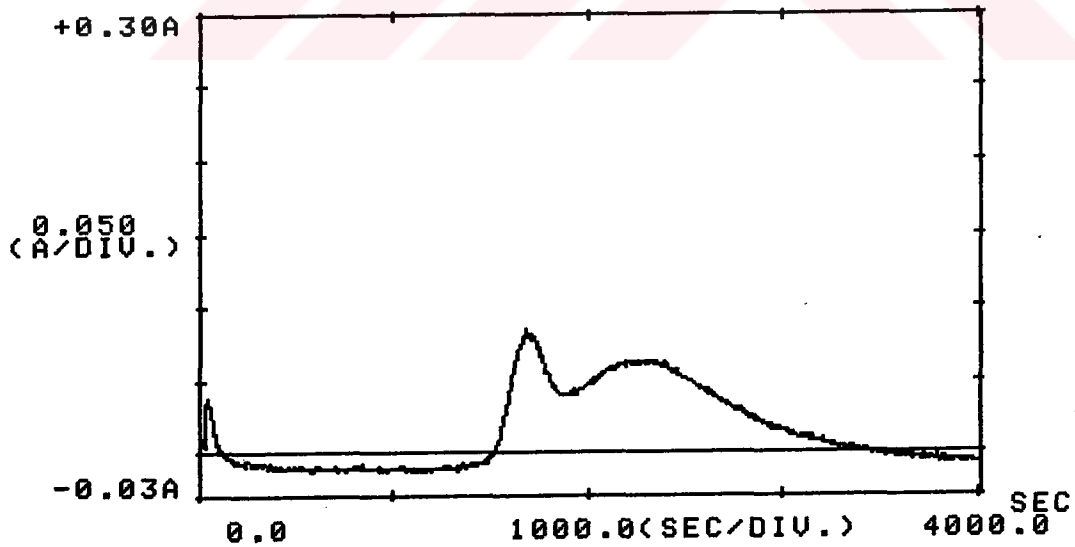
## DENEY IX

Kolon Uzunluğu: 50 cm  
 Kolon Çapı : 0,4 cm  
 Akış Hızı : 0,23 ml/dk  
 Hareketli Faz : 1 M NH<sub>3</sub> 'lı (30:70) asetonitril-su

TABLO 10.

## Amino Asitlerin Elüsyon Hacimleri

Aminoasit	Kons.(M)	Hacim(ml)	Pik [t(sn)	V(ml)]
Glisin	0,02	0,1	1680	6,6
Arjinin	0,04	0,1	2235	8,8



Şekil 27. Glisin ve arjininin ayrılması.

1. Glisin (220 nm)
2. arjinin

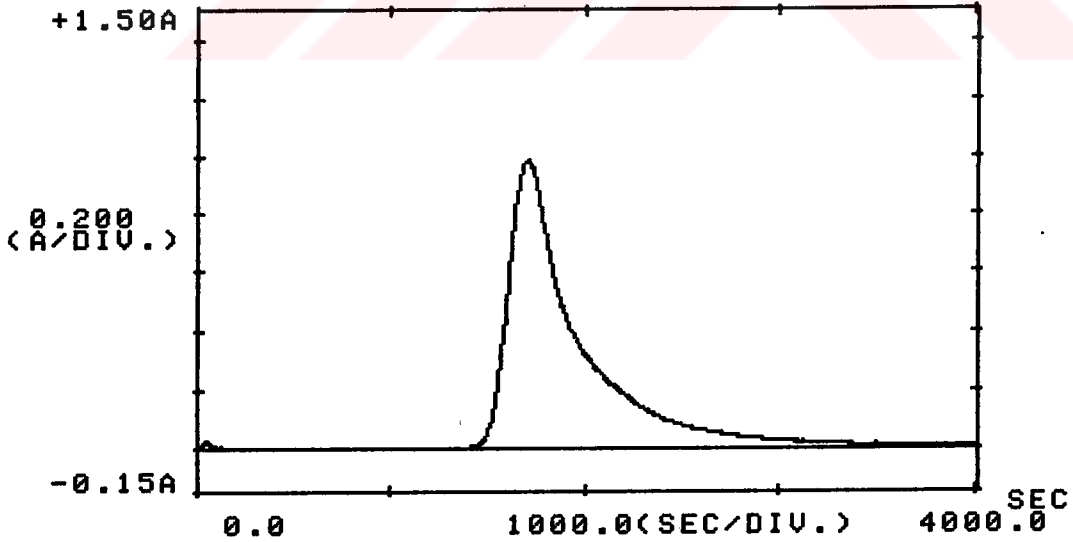
## DENEY X

Kolon Uzunluğu: 50 cm  
 Kolon Çapı : 0,4  
 Akış Hızı : 0,23  
 Hareketli Faz : 1 M NH<sub>3</sub> 'lı (30:70) asetonitril-su

TABLO 11.

## Amino Asitlerin Elüsyon Hacimleri

Aminoasit	Kons.(M)	Hacim(ml)	Pik [t(sn)	V(ml)]
Glutamin	0,1	0,1		
Lisin	0,1	0,1		



Şekil 28. Glutamin ve lisinin ayrılması.

1. Glutamin + lisin (223 nm)
2. -

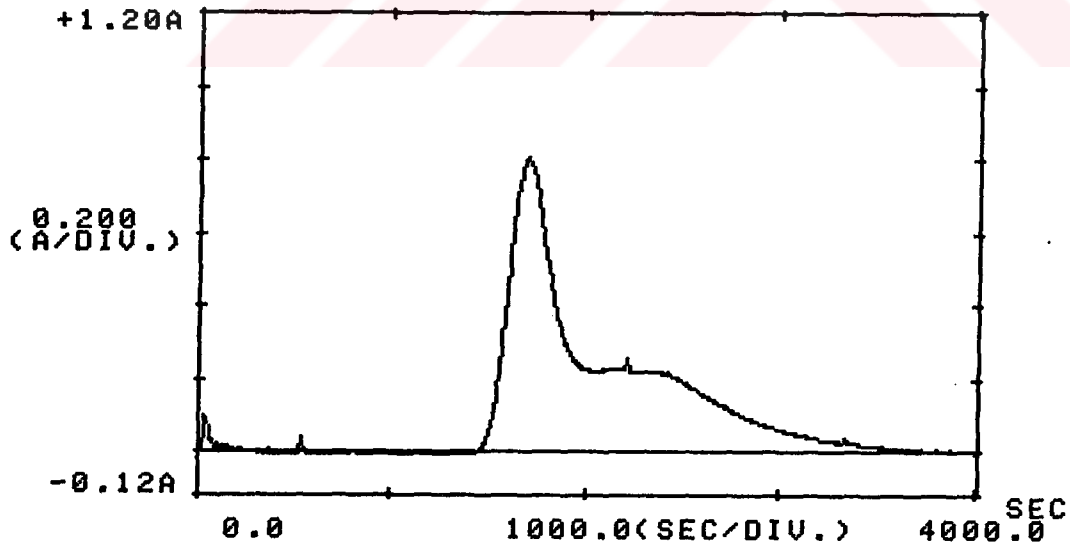
## DENEY XI

Kolon Uzunluğu: 50 cm  
 Kolon Çapı : 0,4 cm  
 Akış Hızı : 0,24 ml/dk  
 Hareketli Faz : 0,14 M NH<sub>3</sub> 'lı (30:70) Ast.nitril-su

TABLO 12.

## Amino Asitlerin Elüsyon Hacimleri

Aminoasit	Kons.(M)	Hacim(ml)	Pik [t(sn)	V(ml)]
Glutamin	0,1	0,1	1695	6,7
Lisin	0,1	0,1		



Şekil 29. Glutamin ve lisinin ayrılması.

1. Glutamin (222 nm)
2. Lisin

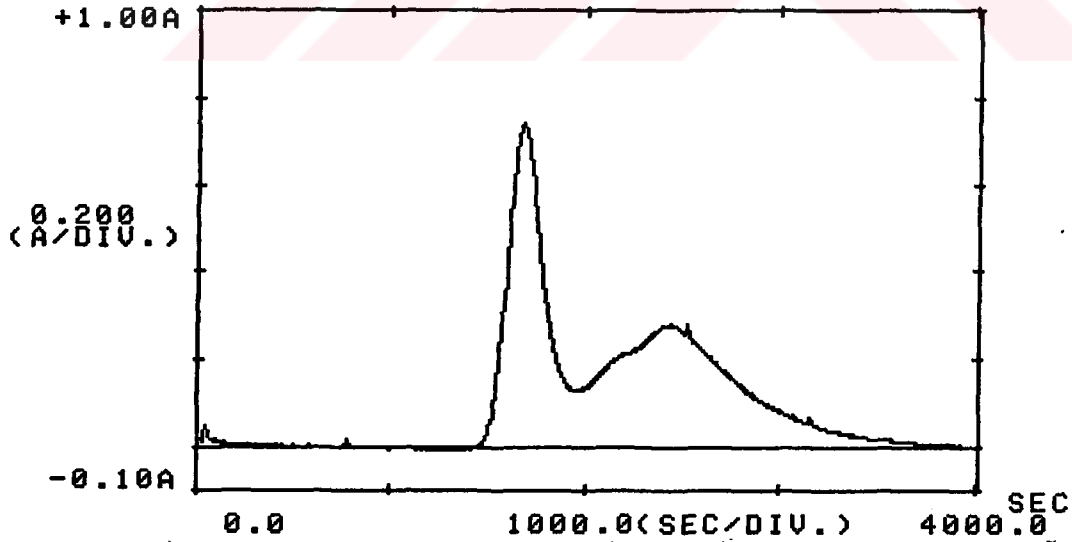
## DENEY XII

Kolon Uzunluğu: 50 cm  
 Kolon Çapı : 0,4 cm  
 Akış Hızı : 0,23 ml/dk  
 Hareketli Faz : 0,14 M NH<sub>3</sub> 'lı (30:70) Ast.nitril-su

TABLO 13.

## Amino Asitlerin Elüsyon Hacimleri

Aminoasit	Kons.(M)	Hacim(ml)	Pik [t(sn)]	V(ml)]
Aspartik asit	0,1	0,1	1675	6,6
Lisin	0,1	0,1	2430	9,5



Şekil 30. Aspartik asid ve lisinin ayrılması.

1. Aspartik asit (222 nm)
2. Lisin

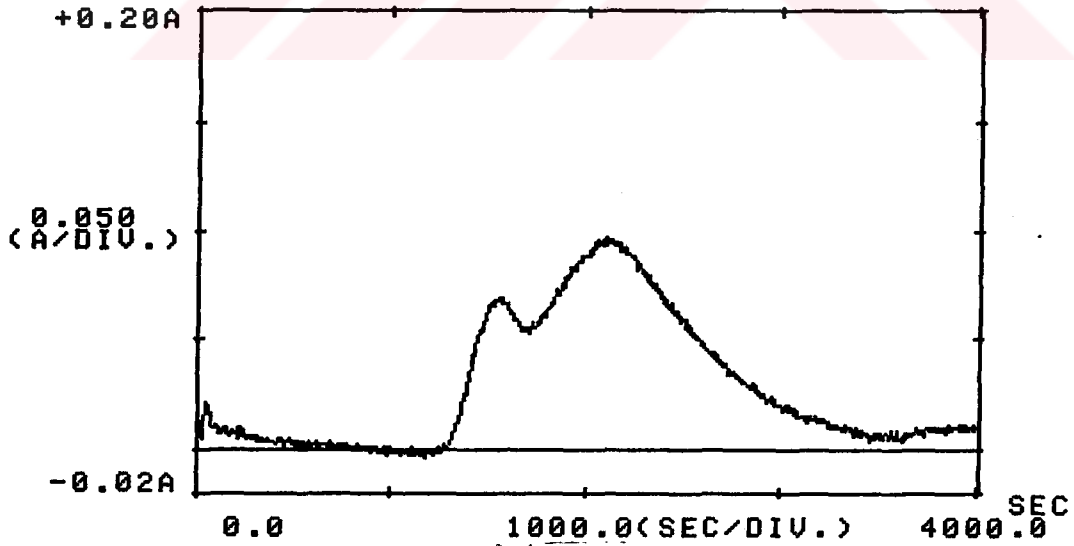
## DENEY XIII

Kolón Uzunluğu: 50 cm  
 Kolon Çapı : 0,4 cm  
 Akış Hızı : 0,25 ml/dk  
 Hareketli Faz : 1 M NH<sub>3</sub> 'lı (30:70) asetonitril-su

TABLO 14.

## Amino Asitlerin Elüsyon Hacimleri

Aminoasit	Kons.(M)	Hacim(ml)	Pik [t(sn)	V(ml)]
Lisin	0,01	0,05	1553	6,7
Arjinin	0,04	0,15	2097	9,0



Şekil 31. Lisin ve arjininin ayrılması.

1. Lisin (221 nm)
2. Arjinin

## VI. DENEY SONUÇLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

Tabii bir polimer olan sporopollenin, aminoasitlerin ayrılmasında ligand değiştirici olarak başarı ile kullanılmıştır.

Sporopollenin ile yapılan deneylerde, sporopolleninin çözücülerle şişmediği ve yüklenen metalin çözücü ile sızmadığı görülmüştür.

Sporopollenin ile hazırlanan kolonlarda sabit akış hızı sağlanmış olup, kuvvetli asit ve bazlara karşı kararlı olduğu görülmüştür.

Ligand değiştirici sporopollenin ile yapılan bir deneyden sonra kolonun rejenerasyonuna gerek kalmadan yeni deneyler yapılabilmektedir.

Aminoasitlerin, ligand değiştirici sporopollenin ile ayrılmasında hareketli faz pH'ı yanında kolon uzunluğunun da etkili olduğu deneyler sonucunda görülmüştür.

### VI.1. Ayrılacak Madde Konsantrasyonunun Ayrılma Üzerine Etkisi

Ayrılacak madde konsantrasyonu, ayrılma üzerinde iki şekilde etkili olmuştur.

1. Ayrılacak maddelerin konsantrasyonu yüksek tutulursa, maddelerin ayrılma oranları azalır. Aminoasitler birbirlerine çok benzeyen yapılar olduklarından kolondan çıkış zamanları birbirlerine çok yakındır. Şayet aminoasitler fazla miktarda ya da konsantrasyonda kolona injekte edilirse, bunların ayrılma yüzdeleri azalmaktadır. Seyreltik numunelerle yapılan deneylerde daha iyi sonuçlar alınmıştır.(DENEY 3, 6, 8, 9)



2. Konsantrasyonun yüksek olması çoğu zaman piklerin birbirlerini örtmesine ve ayrılmanın gözlenememesine neden olmuştur. Aminoasitler çok değişik dalga boylarında maksimum absorpsiyon göstermektedir. Ayrıca aminoasitlerin absorpsiyon şiddetleri de birbirlerine göre çok değişmektedir. Şayet kolondan ilk olarak çıkacak aminoasitin absorpsiyonu çok şiddetli ise ikinci pikin görülmesi çok zordur. Bu durumda kolondan ilk çıkacak aminoasitin konsantrasyonu azaltılmalı ya da çok az miktarlarla çalışılmalıdır. DENEY 5 ve DENEY 6 karşılaştırılacak olursa DENEY 6'da daha iyi bir ayrılma görülmektedir. DENEY 6'da ayrılmanın daha iyi olmasının nedeni, kolona injekte edilen madde miktarının daha az olmasıdır.

#### VI.2. Kolon Uzunluğunun Ayrılma Üzerine Etkisi

Ayrılma işlemlerinde iki değişik uzunlukta kolon kullanılmıştır. Yapılan deneylerde kolon uzunluğunun ayrılmada etkili olduğu görülmüştür.

DENEY 1'de görüldüğü gibi 30 cm' lik kolon ile aspartik asit ve arjinin aminoasitleri çok az ayrılırken DENEY 2 'de aynı aminoasitler 50 cm'lik kolon ile daha iyi ayrılmışlardır.

#### VI.3. pH'ın Ayrılma Üzerine Etkisi

DENEY 10'da lizin ve glutamin aminoasitleri 1 M amonyaklı yürütücü ile ayrılamazken, aynı aminoasitler 0,14 M amonyaklı yürütücü ile ayrılmışlardır. (DENEY 11)

Arjinin gibi güçlü ligand özelliği gösteren amino-  
asitler yüksek pH'da yürütücü kullanmak suretiyle kolon-  
dan sökülebilmıştır.



## VII. SONUÇ

Sporopollenin Co(II) yüklü karboksilli diaminosporopollenin halinde ligand değiştirici olarak hazırlanmıştır.

Ligand değiştirici olarak hazırlanan sporopollenin ile bazı aminoasitlerin ayrılması başarılmıştır.

Sporopolleninin tabii olarak bulunması, kolay elde edilebilmesi ve kimyasal maddelere karşı kararlı olmasından dolayı iyi bir ligand değiştirici olarak kromatografide kullanılabilir.

Kolon dolgu maddelerinde istenilen en büyük özellikler; kolon dolgu maddelerinin sabit tanecik büyüklüğünde olması ve çözücülerde şişmemesidir. Sporopollenin ile yapılan deneylerde sabit akış hızı sağlanmış ve şişme olayı görülmemiştir.

Metal ile yüklü sporopolleninde çözücü ile birlikte metal sızıntısı görülmemiştir.

Co(II) yüklü karboksilli diaminosporopollenin halinde hazırlanan sporopollenin, aminoasitlerin ayrılmasında ligand değiştirici olarak kullanılabilir.

## VIII. KAYNAKLAR

1. Helfferich F., Nature, 189,1001 (1961).
2. Helfferich F., Ion-Exchange, Mc. Graw Hill, 222, New York (1962).
3. Walton H.F. and Stokes R. H., Metal Amine Complexes in Ion-Exchange , J.Am.Chem.Soc., 76,3327 (1954).
4. Pehlivan E., Yeni Bir İyon Değişirici Olan Sporopolleninin Kromatografide Anyon, Katyon ve Ligand Değişirici Olarak Kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, S.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya (1987).
5. Pehlivan E., Lycopodium Clavatum'dan Elde Edilen Ligand Değişirici Reçinelerin Hazırlanması ve Sıvı Kolon Kromatografisinde Kullanılarak Nükleosid, Nükleik Asit Bazları, Aminlerin Ayrılması ve Kinetiğinin İncelenmesi, Doktora Tezi, S. Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya (1991).
6. Porath J., Carsen J., Olsson I. and Belfrage G., Nature , 258, 598 (1975).
7. Hudjun M. J., Coordination Chemistry of Selective Ion-Exchange Resins, UK (1976).
8. Boef D. and Hulanicki A., Pure Appl. Chem., 55, 54 (1983)
9. Davankov V. A., Rogazhin S. V., Semechkin A. V., Baranov V. A. and Sannkova G.S., J. Chromatogr., 93,363 (1974).
10. Brooks J. and Shaw G., Nature, 220,678, London (1972).
11. Brooks J. and Shaw G., Trans. Bose. Res. Inst., 40(2), London (1977).
12. Shaw G. and Yeadon A., Grann Polynologien, 5(2), London, (1964).
13. Brooks J., Sporopollenin, Academic Press, 305, London and New York (1971).
14. Shaw G., In Sporopollenin, Academic Press, 350, London and New York (1972).
15. Adamson R. and Gregson S., Cr. Int. J. Peptide Protein Res., 22,560 (1983).

16. Brooks J. and Shaw G., Chem. Geol., 10, 69-87, London (1972).
17. Gözükara E. M., Biyokimya, Repromat Ltd. Şti., Ankara (1990).
18. Caude M. and Foucault A., Analytical Chemistry, 51(3), 459(1979).



## IX. ÖZGEÇMİŞ

1963 yılında Konya'da doğan Ahmet AYAR, ilkokul, Ortaokul ve Liseyi Konya'da bitirmiştir. 1989 yılında S.Ü. Fen - Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümünden mezun olmuştur.

1990 yılında S. Ü. Fen - Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümüne araştırma görevlisi olarak atanmıştır.

**T. C.  
Yükseköğretim Kurulu  
Dokümantasyon Merkezi**