

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PROTEİN TEMELLİ YENİ BİR HPLC KOLON DOLGU MADDESİNİN
HAZIRLANMASI VE BAZI RASEMİK BİLEŞİKLERİN BU KOLON
ÜZERİNDEN ENANTİYOMERİK REZOLÜSYONU**

Ömer ERDOĞAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DIYARBAKIR
HAZİRAN 2014

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Ömer ERDOĞAN tarafından yapılan “Protein Temelli Yeni Bir HPLC Kolon Dolgu Maddesinin Hazırlanması ve Bazı Rasemik Bileşiklerin Bu Kolon Üzerinden Enantiyomerik Rezolüsyonu” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Halil HOŞGÖREN

Üye : Prof. Dr. Giray TOPAL(Danışman)

Üye : Prof.Dr.Mehmet KARAKAPLAN

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 25/06/2014

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../...../.....

Doç. Dr. Mehmet YILDIRIM

Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, uygun bir çalışma ortamı oluŐturmak için gerekli bilimsel donanımı sağlayan danışman hocam Sayın Prof. Dr. Giray TOPAL'a,

Bütün eğitim hayatım boyunca manevi desteklerini esirgemeyen annem, babam ve kızkardeŐime,

Deneysel çalıŐmalarım ve tez yazım çalıŐmalarım esnasında yardımlarını esirgemeyen Sayın ArŐ. Gör. Salih PAŐA'ya ve Sayın ArŐ. Gör. ReŐit ÇAKMAK'a,

HPLC alıŐmaları esnasında her tÜrlÜ desteklerini esirgemeyen Sayın Yrd. Doç Dr. Murat SÜNKÜR ve Sayın Yrd. Doç Dr. Tarık ARAL'a,

Taramalı elektron mikroskobu(SEM) ile parçacık analizi çalışmaları için Sayın Yrd. Doç Dr. Medeni AYKUT'a,

Çalışma arkadaŐım Sayın EŐref YİĞİTALP'e,

Ayrıca analiz çalışmaları esnasında yardımlarını esirgemeyen bütün DÜBTAM ekibine teŐekkürÜ bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II
ÖZET	V
ABSTRACT	VI
ÇİZELGE LİSTESİ	VII
ŞEKİL LİSTESİ	VIII
KISALTMA VE SİMGELER	XII
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Kiralite.....	2
1.1.1. Kiralite Nedir?.....	2
1.1.2. Enantiyomer.....	2
1.1.3. Optik Çevrilme	3
1.1.4. Mutlak Konfigürasyonun Belirlenmesi.....	5
1.1.5. Diastereomerler.....	9
1.1.6. Mezo Yapısı.....	10
1.2. Kiralitenin Biyolojik Sistemlere Etkileri.....	10
1.3. Stereoizomerlerin Rezolüsyonu.....	12
1.3.1. Klasik Metotlarla Enantiyomerik Rezolüsyon.....	12
1.3.2. Modern Metotlarla Enantiyomerik Rezolüsyon.....	13
1.3.2.1. Kromatografik Metotlar.....	14
- Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi.....	15
-Süper Kritik Akışkan Kromatografisi.....	15
-Kılcal Elektrokromatografisi.....	15
-İnce Tabaka Kromatografisi.....	15
1.4. Kiral Sabit Fazlar.....	16
1.4.1. Polisakkarit Temelli Kiral Sabit Fazlar.....	16
1.4.2. Siklodekstrin Temelli Kiral Sabit Fazlar.....	17

1.4.3.	Makrosiklik Antibiyotik Temelli Kiral Sabit Fazlar.....	18
1.4.4.	Pirkle Tip Kiral Sabit Fazlar.....	18
1.4.5.	Protein Temelli Kiral Sabit Fazlar.....	19
1.4.5.1.	Bovine Serum Albumin(BSA).....	20
1.4.5.2.	Human Serum Albumin(HSA).....	20
1.4.5.3.	α_1 - Asit Glikoprotein.....	21
1.4.5.4.	Ovomucoid.....	21
1.4.5.5.	Avidin.....	21
1.4.5.6.	Ovotransferrin.....	21
1.4.5.7.	Kimotripsin.....	21
1.4.5.8.	Sellobiyohidrolaz-I.....	21
1.4.6.	Kiral Crown Eter Temelli Kiral Sabit Fazlar.....	22
1.5.	Kiral Tanıma Mekanizması.....	22
1.6.	Kromatografik Parametreler.....	23
1.7.	Mandelik Asit.....	24
2.	ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	25
3.	MATERYAL VE METOT.....	29
3.1.	Kullanılan Kimyasallar.....	29
3.2.	Kullanılan Cihazlar.....	30
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI.....	31
4.1.	Kiral Sabit Fazların Hazırlanması.....	31
4.1.1.	Pirkle Tip Kiral Sabit Fazın Hazırlanması.....	31
4.1.2.	Bovin Serum Albumin (BSA) Temelli Kiral Sabit Fazın Hazırlanması.....	32
4.2.	Hazırlanan CSP'lerin HPLC Kolona Doldurulması.....	33
4.3.	Enantiyomerik Rezolüsyon Çalışmaları.....	33
5.	TARTIŞMA VE SONUÇ.....	35
5.1.	Sentezlenen CSP'lerin Elementel Analiz Sonuçları	35
5.1.1.	Protein Temelli CSP'nin Elementel Analiz Sonuçları.....	35

5.1.2.	Pirkle-Tip CSP'nin Elementel Analiz Sonuçları.....	35
5.2.	Sentezlenen CSP'lerin Taramalı Elektron Mikroskop(SEM) Görüntüleri.....	36
5.2.1.	Pirkle Tip CSP'nin Sentezlenen CSP'lerin Taramalı Elektron Mikroskop(SEM) Görüntüleri.....	36
5.2.2.	Protein Temelli CSP'nin Sentezlenen CSP'lerin Taramalı Elektron Mikroskop(SEM) Görüntüleri.....	37
5.3.	Rasemik Bileşikler İçin Enantiyomerik Rezolüsyon Çalışmalarının Sonuçları	38
5.3.1.	Yürütücü Faz Olarak 100mM pH=6 Fosfat Tamponunda Rezolüsyon Çalışmaları.....	38
5.3.2.	Yürütücü Faz Olarak 100mM pH=7 Fosfat Tamponunda Rezolüsyon Çalışmaları.....	42
5.3.3.	Yürütücü Faz Olarak 100mM pH=8 Fosfat Tamponunda Rezolüsyon Çalışmaları.....	48
6.	KAYNAKLAR	60
	ÖZGEÇMİŞ.....	67

ÖZET

PROTEİN TEMELLİ YENİ BİR HPLC KOLON DOLGU MADDESİNİN HAZIRLANMASI VE BAZI RASEMİK BİLEŞİKLERİN BU KOLON ÜZERİNDEN ENANTİYOMERİK REZOLÜSYONU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Ömer ERDOĞAN

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2014

Bu çalışmada protein temelli(CSP-I) ve Pirkle-tip(CSP-II) iki kiral sabit faz sentezlendi. Bu CSP'lerin yapısı elementel analiz ile aydınlatılarak parçacık boyutu SEM ile ölçüldü. Hazırlanan bu CSP'ler 150x4,6 mm ebatlarındaki HPLC kolona dolduruldu. CSP-I üzerinden rasemik formdaki mandelik asit, metil mandelat, epinefrin, propranolol, ibuprofen, naproxen, treonin, α -feniletilamin ve 3-hidroksibütirik asit gibi bazı bileşiklerin rezolüsyonu 100mM pH=6, pH=7, pH=8 fosfat tamponunda 1mL/dk, 1.5mL/dk, 2mL/dk, 2.5mL/dk ve 3mL/dk akış hızlarında çalışıldı. Bu akış hızlarında enantiyomerik olarak ayrılan her bir rasemik bileşik için rezolüsyon sabiti(R_s), ayrılma faktörü(α) gibi kromatografik parametreler hesaplandı. Bu CSP'lerden CSP-I ile enantiyomerik rezolüsyon çalışmalarında daha başarılı sonuçlar elde edildi. CSP-II verileri yeterli kromatografik parametrelere uygun sonuçlarla örtüşmediğinden, CSP-II ile ayırma işlemlerinden vazgeçildi.

Anahtar Kelimeler: Bovine Serum Albumin, Enantiyomerik Rezolüsyon, HPLC, Kiral Sabit Fazlar

ABSTRACT

THE PREPARATION OF A NEW PROTEIN COLUMN PACKING MATERIAL AND ENANTIOMERIC RESOLUTION OF SOME RASEMIC COMPOUNDS THROUGH THIS COLUMN

MSc THESIS

Ömer ERDOĞAN

DEPARTMENT OF CHEMISTRY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
UNIVERSITY OF DICLE

2014

In this study, protein based(CSP-I) and Pirkle type chiral stationary phases(CSP-II) were synthesized. The structure of this CSPs were enlightened with elemental analysis. The particle size of CSPs were measured by scanning electron microscope(SEM). The prepared CSPs were packed into 150X4.6mm HPLC column. The enantiomeric resolution of some rasemic compounds such as mandelic acid, methyl mandelate, epinephrine, propranolol, α -phenylethylamine and 3-hydroxybutyric acid was employed in 1mL/rpm, 1,5mL/rpm, 2mL/rpm, 2,5mL/rpm, 3mL/rpm flow rate in various pHs such pH=6, pH=7, pH=8 100mM phosphate buffer. Chromatographic parameters such as resolution factor(R_s) and selectivity(α) for each rasemic compounds were calculated above conditions in these flow rates and pHs. More successful results were obtained with CSP-I in enantiomeric resolution studies.

Key Words: Bovine Serum Albumin, Chiral Stationary Phases, HPLC, Enantiomeric Resolution

ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
Çizelge 4.1.	Enantiyomerik olarak ayrılmaya çalışılan rasemik bileşiklerin yapı formülleri	34
Çizelge 5.1.	100mM pH=6 fosfat tamponunda enantiyomerik olarak ayrılan rasemik bileşiklere ait alıkonma süreleri	41
Çizelge 5.2.	100mM pH=6 fosfat tamponunda enantiyomerik olarak ayrılan rasemik bileşiklere ait kromatografik parametreler	41
Çizelge 5.3.	100mM pH=7 fosfat tamponunda enantiyomerik olarak ayrılan rasemik bileşiklere ait alıkonma süreleri	47
Çizelge 5.4.	100mM pH=7 fosfat tamponunda enantiyomerik olarak ayrılan rasemik bileşiklere ait kromatografik parametreler	47
Çizelge 5.5.	100mM pH=8 fosfat tamponunda enantiyomerik olarak ayrılan rasemik bileşiklere ait alıkonma süreleri	54
Çizelge 5.6.	100mM pH=8 fosfat tamponunda enantiyomerik olarak ayrılan rasemik bileşiklere ait kromatografik parametreler	55
Çizelge 5.7.	Enantiyomerik rezolüsyonu sağlanan rasemik bileşiklerin yapı formülleri	57
Çizelge 5.8.	Hazırlamış olduğumuz CSP’de rasemik bileşiklerin en kısa alıkonma süreleri	59

ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1.	Genel bir aminoasidin kiral özelliği	2
Şekil 1.2.	Laktik Asitin Enantiyomerleri	3
Şekil 1.3.	Düzlem polarize ışığın çevrilme yönleri	3
Şekil 1.4.	D-Gliseraldehitin a.) Fischer İzdüşüm Formülü b.) Üçboyutlu Gösterimi	6
Şekil 1.5.	Fischer'e göre D-Glukoz (a), D-Mannoz (b) ve D-Galaktoz (c)	7
Şekil 1.6.	Cahn-İngold-Prelog sistemi	8
Şekil 1.7.	D-(-)-Fenilglisin	8
Şekil 1.8.	Efedrin molekülünün Fischer izdüşüm formülleri	9
Şekil 1.9.	Tartarik asitin stereoizomerleri	10
Şekil 1.10.	Üç noktadan etkileşim modelinin şekilsel gösterimi	11
Şekil 1.11.	Sodyum Amonyum Tartarat kristallerinin d- ve l- formu	13
Şekil 1.12.	Polisakkarit temelli Chiralcel OD-H ^a CSP'nin kimyasal formülü	16
Şekil 1.13.	α -, β -, ve γ - siklodekstrinlerin yapısı	17
Şekil 1.14.	Siklodekstrinlerin kavitesiyle etkileşen enantiyomerin şekilsel gösterimi	17
Şekil 1.15.	Vancomycin molekülünün kimyasal yapısı	18
Şekil 1.16.	Pirkle ve arkadaşları tarafından hazırlanan ilk Pirkle type CSP'nin yapısı	19
Şekil 1.17.	Herhangi bir proteinin kıvrımlı yapısının oluşturmuş olduğu oluklar	19
Şekil 1.18.	BSA'nın üç boyutlu yapısı	20
Şekil 1.19.	CROWNPAK® CR(+) ticari ismiyle satılan Kiral Crown eter temelli CSP'nin yapısı	22
Şekil 1.20.	Analit ile CSP arasındaki etkileşimin anahtar-kilit modeliyle şekilsel gösterimi	23
Şekil 1.21.	Cyclandelate ve Homatropine'nin yapısı	24
Şekil 2.1.	Stewart ve arkadaşlarının kendi sentezledikleri BSA temelli CSP üzerinden enantiyomerik olarak ayırdıkları triptofanın yapısı	25
Şekil 2.2.	Hermansson tarafından hazırlanan α -1-asit glikoprotein temelli CSP ile enantiyomerik olarak ayrılan β -blokerlerin yapıları	25

Şekil 2.3.	Haginaka ve arkadaşlarının kendi sentezledikleri Avidin temelli CSP üzerinden enantiyomerik olarak ayırdıkları 2-arilpropiyonik asit türevlerinin yapıları	26
Şekil 2.4.	Aboul-Enein ve arkadaşlarının Ovomuroid temelli CSP üzerinden enantiyomerik olarak ayırdıkları tiroksin hormonunun yapısı ve enantiyomerik ayırmayı gösteren HPLC kromatogramı	26
Şekil 2.5.	Harada ve arkadaşları tarafından diol arakolu üzerinden sentezlenen BSA temelli CSP'nin sentez basamakları	27
Şekil 2.6.	Zhang tarafından triazin arakolu üzerinden sentezlenen BSA temelli CSP'nin sentez basamakları	27
Şekil 2.7.	Zhou Lili ve grubunun α_1 - Asit Glikoprotein ve ovomuroid ile hazırladıkları CSP'ler üzerinden enantiyomerik olarak ayırmaya çalıştıkları farmasötik bazı bileşiklerin yapıları	28
Şekil 2.8.	Qin Wei ve arkadaşlarının kloropropilsilika üzerinden Crown eter bağlayarak hazırladıkları CSP'nin sentez basamakları	28
Şekil 4.1.	Pirkle-Tip Kiral Sabit Fazın Yapısı	31
Şekil 4.2.	Bovin Serum Albumin (BSA) Temelli Kiral Sabit Fazın Yapısı	32
Şekil 4.3.	Kolon doldurma ve enantiyomerik rezolüsyon aşamalarında kullanılan HPLC cihazı	33
Şekil 5.1.	Etilendiamin bağlı silika'nın(aşama-I) elementel analiz sonuçları	35
Şekil 5.2.	Protein Temelli CSP'nin(aşama-III) elementel analiz sonuçları	35
Şekil 5.3.	Pirkle-Tip CSP'nin EDAX- elementel analiz sonuçları	35
Şekil 5.4.	Pirkle-Tip CSP'nin taramalı elektron mikroskobu(SEM) ile parçacık boyutu görüntüleri	36
Şekil 5.5.	Protein temelli CSP'nin taramalı elektron mikroskobu(SEM) ile parçacık boyutu görüntüleri	37
Şekil 5.6.	Yürütücü faz olarak pH=6 fosfat tamponu ve 1 ml/dk akış hızında rasemik metilmandelata ait HPLC kromatogramı	38
Şekil 5.7.	Yürütücü faz olarak pH=6 fosfat tamponu ve 1,5 ml/dk akış hızında rasemik metilmandelata ait HPLC kromatogramı	38
Şekil 5.8.	Yürütücü faz olarak pH=6 fosfat tamponu ve 2 ml/dk akış hızında rasemik metilmandelata ait HPLC kromatogramı	39

Şekil 5.9.	Yürütücü faz olarak pH=6 fosfat tamponu ve 2,5 ml/dk akış hızında rasemik metilmandelata ait HPLC kromatogramı	39
Şekil 5.10.	Yürütücü faz olarak pH=6 fosfat tamponu ve 3 ml/dk akış hızında rasemik metilmandelata ait HPLC kromatogramı	40
Şekil 5.11.	Yürütücü faz olarak pH=7 fosfat tamponu ve 1 ml/dk akış hızında rasemik mandelik asite ait HPLC kromatogramı	42
Şekil 5.12.	Yürütücü faz olarak pH=7 fosfat tamponu ve 1,5 ml/dk akış hızında rasemik mandelik asite ait HPLC kromatogramı	42
Şekil 5.13.	Yürütücü faz olarak pH=7 fosfat tamponu ve 2 ml/dk akış hızında rasemik mandelik asite ait HPLC kromatogramı	43
Şekil 5.14.	Yürütücü faz olarak pH=7 fosfat tamponu ve 2,5 ml/dk akış hızında rasemik mandelik asite ait HPLC kromatogramı	43
Şekil 5.15.	Yürütücü faz olarak pH=7 fosfat tamponu ve 3 ml/dk akış hızında rasemik mandelik asite ait HPLC kromatogramı	44
Şekil 5.16.	Yürütücü faz olarak pH=7 fosfat tamponu ve 1 ml/dk akış hızında metil mandelat'a ait HPLC kromatogramı	44
Şekil 5.17.	Yürütücü faz olarak pH=7 fosfat tamponu ve 1,5 ml/dk akış hızında metil mandelat'a ait HPLC kromatogramı	45
Şekil 5.18.	Yürütücü faz olarak pH=7 fosfat tamponu ve 2 ml/dk akış hızında metil mandelat'a ait HPLC kromatogramı	45
Şekil 5.19.	Yürütücü faz olarak pH=7 fosfat tamponu ve 2,5 ml/dk akış hızında metil mandelat'a ait HPLC kromatogramı	46
Şekil 5.20.	Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 2 ml/dk akış hızında rac-mandelik asit'e ait HPLC kromatogramı	48
Şekil 5.21.	Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 2,5 ml/dk akış hızında rac-mandelik asit'e ait HPLC kromatogramı	48
Şekil 5.22.	Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 3 ml/dk akış hızında rac-mandelik asit'e ait HPLC kromatogramı	49
Şekil 5.23.	Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 1 ml/dk akış hızında metil mandelat'a ait HPLC kromatogramı	49
Şekil 5.24.	Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 1,5 ml/dk akış hızında metil mandelat'a ait HPLC kromatogramı	50

Şekil 5.25.	Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 2 ml/dk akış hızında metil mandelat'a ait HPLC kromatogramı	50
Şekil 5.26.	Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 2,5 ml/dk akış hızında metil mandelat'a ait HPLC kromatogramı	51
Şekil 5.27.	Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 3 ml/dk akış hızında metil mandelat'a ait HPLC kromatogramı	51
Şekil 5.28.	Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 3 ml/dk akış hızında α -feniletilamin'e ait HPLC kromatogramı	52
Şekil 5.29.	Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 4 ml/dk akış hızında α -feniletilamin'e ait HPLC kromatogramı	52
Şekil 5.30.	Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 5 ml/dk akış hızında α -feniletilamin'e ait HPLC kromatogramı	53
Şekil 5.31.	BSA proteini ile güçlü ve zayıf π - π etkileşimleri oluşturan mandelik asitin enantiyomerlerin şekilsel gösterimi	58

KISALTMA VE SİMGELER

HPLC	: High Performance Liquid Chromatography (Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi)
DSC	: Differential Scanning Calorimeter (Diferansiyel Taramalı Kalorimetre)
NMR	: Nuclear Magnetic Resonance (Nükleer Manyetik Rezonans)
FT-IR	: Fourier Transform Infrared Spectroscopy ()
CE	: Cappillary Electrophoresis (Kapiler Elektroforez)
CEC	: Cappillary Electro Chromatography (Kapiler Elektro Kromatografi)
CZE	: Cappillary Zone Electrophoresis (Kapiler Bölge Elektroforez)
CIF	: Cappillary İzotacophoresis (Kapiler izotakoforez)
CGE	: Cappillary Gel Electrophoresis (Kapiler Jel Elektroforez)
CIEF	: Cappillary İzoelectric Focusing (Kapiler İzoelektrik Odaklama)
ACE	: Affinity Cappillary Electrophoresis (Afinite Kapiler Elektroforez)
CDR	: Chiral Derivatization Reactive (Kiral Türevlendirme Reaktifi)
CSP	: Chiral Stationary Phase (Kiral Sabit Faz)
CMPA	: Chiral Mobile Phase Additive (Kiral Hareketli Faz Katkısı)
GC	: Gas Chromatography (Gaz Kromatografisi)
SFC	: Supercritical Fluid Chromatography (Süperkritik Akışkan Kromatografisi)
TLC	: Thin Layer Chromatography (İnce Tabaka Kromatografisi)
BSA	: Bovine Serum Albumine (Sığır Serum Albumini)
HSA	: Human Serum Albumine (İnsan Serum Albumini)
RSA	: Rat Serum Albumine (Sıçan Serum Albumini)
GPSA	: Guinea Pig Serum Albumine (Domuz Serum Albumini)
CPSG	: Chloropropylsilica gel (Kloropropilsilika jel)
TGA	: Termal Gravimetrik Analiz

E.N.	: Erime Noktası
°C	: Santigrat Derece
λ	: Dalga boyu
g	: Gram
R _s	: Rezolüsyon sabiti
α	: Ayrılma Faktörü

1. GİRİŞ

1883 yılında Lord Kelvin, yunanca el anlamındaki “*cheir*” kelimesinden kiralite kelimesini türetmiştir. Temel parçacıklardan insanlara kadar geniş yelpazedeki nesnelere birçoğunda kiralite gözlemlenmiştir (Hegstrom ve ark. 1990). Bu gözlem sayesinde bilim insanları, evrenin oluşumunda kiralitenin önemli bir role ve gizeme sahip olduğunu öne sürmüşlerdir. Evrenimizde kiralitenin varlığı ile ilgili şu örnekleri verebiliriz. Eski mısır uygarlıklarındaki mezar odalarının duvarlarında kiraliteyi tasvir eden bazı resimler çizilmiştir. Ayrıca Carnegie Galaksi Atlasında yer alan 1168 galaksiden 540'ının, durgunluk hızlarının yönü ile karşılaştırıldığında kiral olduğu bulunmuştur (Kondepudi ve ark. 2001). Birçok asimetrik yapının bulunduğu bitki ve hayvanlarda, kiralitenin etkisi belirgindir. Bitki ve hayvanlardaki sarmal yapılar onları asimetrik yapar. Kısaca, kiralite evrenimizin neredeyse her yerinde vardır.

Kiral bileşiklerin iki önemli özelliği, onları akiral bileşiklerden ayırt eder. Birincisi düzlem polarize ışığa karşı davranışları, ikincisi ise diğer kiral bileşiklerle etkileşimleridir. Bu iki özellikten faydalanarak değişik kromatografik (HPLC, Liquid Kromatografisi ve Clay Kolon Kromatografisi) yöntemler ile kiral bileşiklerin enantiyomerlerine ayrılması literatürde bilinmektedir (Bencini ve ark. 1984; Nimura ve Kinoshito. 1986; Yamagishi ve ark. 1996; Natalini ve ark. 2004; Bojarski ve ark. 2005). Ayrıca Kapiler Elektforez yöntemiyle de söz konusu ayırma işlemleri yapılmaktadır (Kodama ve ark. 2003).

Enantiyomerik saflığı yüksek mandelik asit gibi α -hidroksiasitler, bir β - blokeri olan propranolol ve kalp atışını hızlandıran, kas ve karaciğerdeki glikojeni glukoza çeviren epinefrin metabolizmadaki bu biyolojik önemlerinden dolayı ilaç sanayinde oldukça yaygın kullanım alanı bulurlar (Whitesell ve ark. 1983). Bu nedenle kiral bileşiklerin hazırlanması ve analizi oldukça önemlidir. Kromatografik metotlarla enantiyomerik ayırma ne kadar yüksek enantiyomerik saflıkta yapılabilirse; uygulamada insan sağlığına etkili bir tedavi gerçekleştirmek o denli başarılı olur. Çevre kimyası, ilaç sanayi ve klinik analizlerde her zaman yüksek enantiyomerik saflık istenir. Bu saflık olmazsa her açıdan istenmeyen durumlar yaşanabilir. Hatta sonu ölümle neticelenen durumlar oluşabilir (Sheldon 1993).

Rasemik bileşiklerin ayrılması için günümüzde değişik teknikler kullanılmaktadır. Bunlardan en çok uygulama alanı bulunan HPLC ve kapiler elektforezdir. HPLC' de proteinler silika jel üzerine farklı ara kollar yardımıyla bağlanarak bir CSP hazırlanır. Hazırlanan bu CSP çeşitli ebatlardaki HPLC kolona doldurularak, bu kolon üzerinden rasemik

1.GİRİŞ

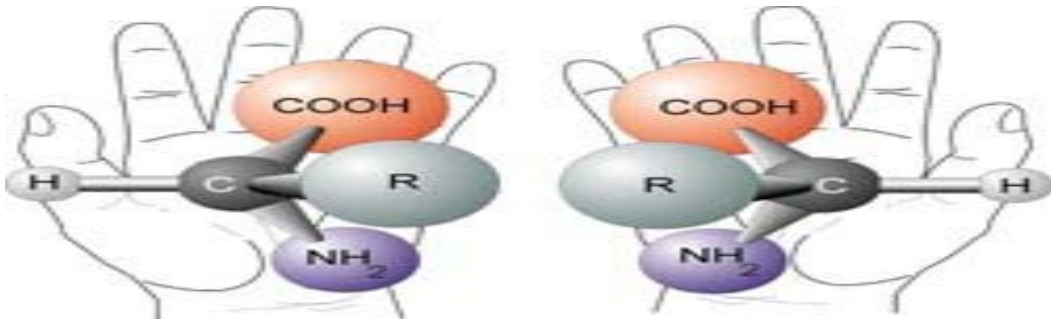
bileşiklerin enantiyomerik rezolüsyonu gerçekleştirilir. Bu kolonlar ticari yolla temin edilebildiği gibi araştırmacılar tarafından analitik amaçlı veya preparatif amaçlı da hazırlanabilirler. Kolonda enantiyomerik ayrılmanın mekanizması; yük transferi, hidrojen bağı, dipol, π - π etkileşimleri gibi non-bonding etkileşimlerle ve sterik etki gibi birçok kombine faktörlerle açıklanmaktadır (Kubota ve ark. 2004).

1.1. Kiralite

1.1.1. Kiralite nedir?

Kiralite geometrik bir özelliktir. Bir objenin ayna görüntüsü kendisi ile üst üste çakışmıyor ise kiral, ayna görüntüsü kendisi ile çakışıyor ise kiral değildir. Kiral objelere yaygın bir örnek olarak sağ ve sol eli verebiliriz. İki boyutlu harfler ise kiral değildir.

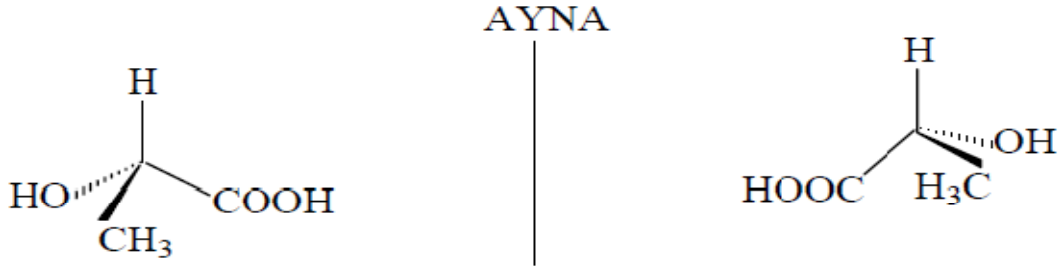
Moleküllerin uzaydaki düzenlenmelerinde molekülün ayna görüntüsü üst üste çakışmıyor ise molekül kiraldır. Kiralite molekülün bir özelliğidir. Aslında kiral olan asimetric merkez taşıyan moleküldür.



Şekil 1.1: Genel bir aminoasidin kiral özelliği

1.1.2. Enantiyomer

Genel anlamda kiral molekül, dört farklı grup ya da atomun karbon atomuna sigma bağlarıyla bağlanmasıyla oluşur. Karbon atomu molekülün asimetric merkezidir. Bu tip moleküller farklı uzaysal yapılarda bir çift stereoizomere sahiptirler ve bunların ayna görüntüleri üst üste çakışmaz. Şekil 1.2.'de kiral bir molekül olan laktik asit, ayna görüntüsü ile üst üste çakışmayan bir enantiyomer çiftine sahiptir.

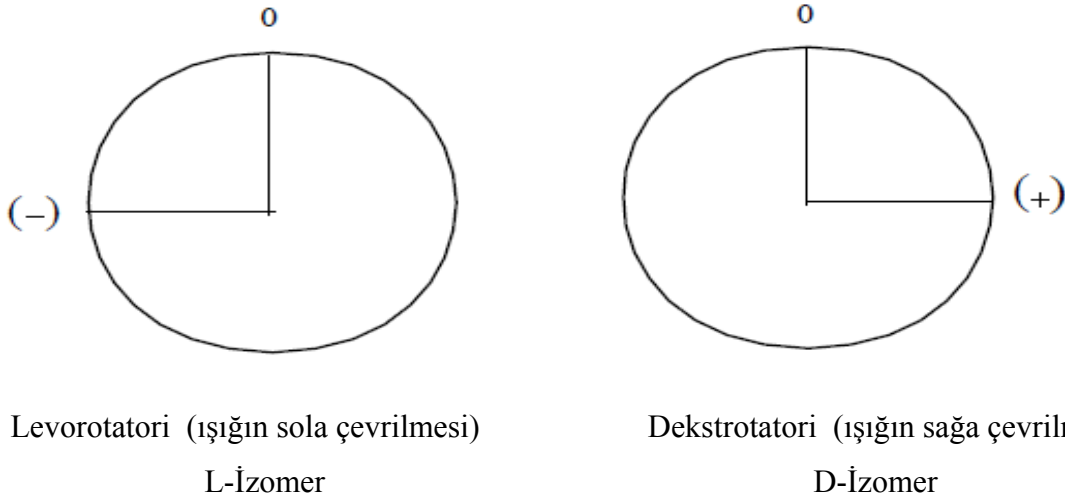


Şekil 1.2: Laktik Asitin Enantiyomerleri

1.1.3. Optik Çevrilme

Enantiyomerlerin fiziksel özelliklerindeki spesifik farklılık, ilk olarak 1815 yılında Biot tarafından bulunan, düzlem polarize ışığın çevrilmesidir. Bu nedenle enantiyomerlere optik izomerler de denir. Normal ışık değişik dalga boylarında ve dalgaların bütün yönler doğru saçılmasıyla oluşur. Dalga hareketi ışığın doğrultusuna diktir. Düzlem polarize ışık ise; tek bir düzlem dışındaki dalga titreşimlerinden arındırılmış ışıktır.

Simetrik moleküllerde; molekül ışıkla karşılaştığında ışık kesin bir dönüş yapar ancak, molekülün diğer konfigürasyonu bu dönüşü (ters yönde olduğunda) dengeler.



Şekil 1.3: Düzlem polarize ışığın çevrilme yönleri

Sonuçta ışığın dönüşü sıfırlanır (Şekil 1.3.). Tek bir enantiyomer için ise; çözeltide ayna konfigürasyonu olmadığından ışığın net dönüşü sıfırlanmaz. Bu nedenle rasemik (1:1) karışımlarda da düzlem polarize ışığın dönüşü sıfırlanır. Optikçe aktif maddelerin spesifik

1.GİRİŞ

olan dönüş açıları, polarimetre ile ölçülebilir. Polarize ışığın yayılma düzlemini sağa çeviren enantiyomere dekstrorotatori (Latince:dexter"sağ") ya da sağa çeviren denir. Bunun ayna görüntüsü polarize ışığın yayılma düzlemini sola çevirir ve levorotatori (Latince:Laevus"sol") ya da sola çeviren adını alır. Sembol olarak dekstrorotatori için (d) ya da (+), levorotatori (l) ya da (-) olarak gösterilir. Ancak d ve l gösterimleri karışıklıklara neden olduğundan bu gösterim terk edilmiştir. Enantiyomerlerin polarize ışığı çevirme derecesine özgül çevirme açısı $[\alpha]$ denir. Çevirme açısı:

- Kullanılan ışığın dalga boyuna
- Polarimetre tüpünün uzunluğuna
- Sıcaklığa
- Çözücüye
- Konsantrasyona bağlıdır. Kullanılan ışığın dalga boyu genellikle 589 nm'dir (sodyum D-çizgisi). Bileşiğin 20 °C' deki özgül çevirme açısı 1.1 denkleminde faydalanılarak hesaplanır.

$$[\alpha]_D^{20} = \frac{\alpha}{l.c} \quad (1.1)$$

$[\alpha]_D^{20}$: 20 °C 'deki Sodyum'un D çizgisinin özgül çevirme açısı

α : 20 °C 'de gözlenen çevirme açısı

l= dm olarak tüpün uzunluğu

C= gr/100ml olarak örneğin derişimi

Ayrıca bir moleküldeki optikçe saflık 1.2 denkleminde göre hesaplanır.

$$\% \text{ optikçe saflık} = \frac{[\alpha]}{[\alpha]_D^{20}} \quad (1.2)$$

$[\alpha]$: Gözlenen çevirme açısı

$[\alpha]_D^{20}$: Özgül çevirme açısı

Her zaman olmamakla birlikte bu denklem % e.e. 1.3 denkleminde yerine de kullanılmaktadır.

$$\% \text{ enantiyomer fazlalığı} = \frac{[E_1 - E_2]}{[E_1 + E_2]} \quad (1.3)$$

E_1 ve E_2 iki enantiyomerin mol miktarlarıdır.

% Enantiyoselektivite 1.4 denklemine göre hesaplanır.

$$\% \text{ enantiyoselektivite}(\% \text{ es}) = \frac{E_1}{E_1 + E_2} \times 100 \quad (1.4)$$

E_1 : Fazla olan enantiyomerin mol miktarı

Örneğin, 2-bütanol enantiyomerlerinin bir karışımının $+6,76^\circ$ 'lik özgül çevirme gösterdiğini varsayalım. Bu durumda (S)-(+)-2-bütanolün enantiyomerik fazlalığının %50 olduğunu söyleyebiliriz.

$$\% \text{ enantiyoselektivite}(\% \text{ es}) = \frac{+6,76^\circ}{+13,52^\circ} \times 100$$

Bu karışımın enantiyomerik fazlalığının %50 olduğunu söylediğimizde, bu fazla olarak bulunan (+) enantiyomerin, bu karışımın %50'sini oluşturduğu, diğer %50'sinin de rasemik şekilde olduğu anlamına gelir. %50'sinin rasemik olmasından dolayı, bunlar birbirinin optik çevirmesini yok eder ve yalnızca (+) enantiyomerlerden oluşan karışımın %50'lik kısmı gözlenen optik çevirmeye katkıda bulunur. Bu yüzden, gözlenen çevirme, karışımın yalnızca (+) enantiyomerden oluşması durumunda beklenen dönmenin %50 'si, yani yarısıdır.

Yukarıda bahsedilen karışımın stereoizomerlerinin gerçek oranı nedir? Toplam karışımın %50'sini, iki enantiyomerin eşit miktarda bulunduğu rasemik şekil oluşturuyor. Bu nedenle, bu %50 'nin yarısı (% 25)(-) enantiyomer ve diğer yarısı (% 25)(+) enantiyomerdir. Karışımın diğer %50'side enantiyomerik fazlalığa neden olan (+) enantiyomerdir. Sonuç olarak karışım %75 (+) enantiyomer ve % 25 (-) enantiyomer içerir.

1.1.4. Mutlak Konfigürasyonun belirlenmesi

Optik çevirme açısı; enantiyomerlerin d – (+) ve l- (-) formunun tek farklılığını gösterir. Fakat bu bize, asimetric merkez atomuna bağlanan grup ve ya atomların uzaydaki yönelimi hakkında bir fikir vermez. Çünkü konfigürasyonla çevirme açısı arasında bir ilişki yoktur. Bir enantiyomer, tek bağın etrafındaki grupların dönmesi ile değişik konformasyonlarda olabilir, ancak konfigürasyondaki bir değişme için asimetric karbondaki

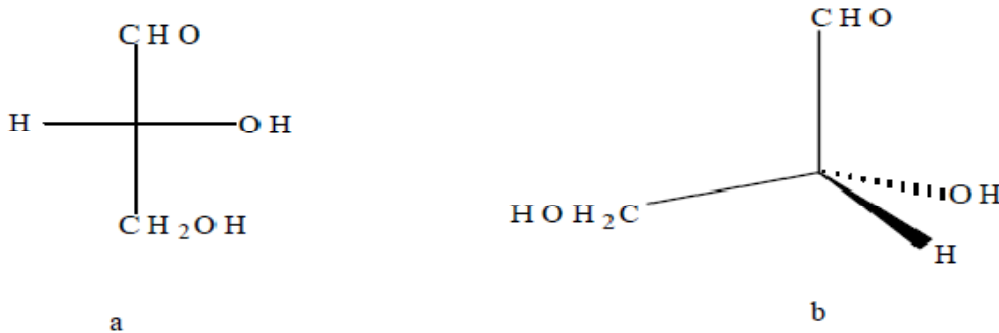
1.GİRİŞ

bağların kırılması gerekir. Yani, bir enantiyomerin konfigürasyonu değişmez.

Laktik asidin iki enantiyomerini ele alarak bunu incelersek; Laktik asidin bir formu düzlem polarize ışığı sağa çevirirken, diğer formu düzlem polarize ışığı sola çevirmekte ve sırasıyla (+) – (-) – olarak etiketlenmektedir. Laktik asidin bu iki konfigürasyonunu Şekil 1.2.'de gösterilmiştir. Sorun şu; hangi yapı, (+) – Laktik asidi; hangi yapı, (-)- Laktik asidi belirler. Diğer bir deyişle konfigürasyonlar nasıl ayrılır. Van't Hoff'dan sonra neredeyse yüzyıla yakın bir süre, enantiyomerlerin mutlak konfigürasyonlarının kesin olarak nasıl belirleneceği tanımlanamadan kaldı. Bu durum 1951'de Bijvoet tarafından, enantiyomerlerin mutlak konfigürasyonlarının X-ışınları spektroskopisi (X-Ray) ile belirlenebileceğinin bildirilmesi ile değişti.

Mutlak konfigürasyonun X-Ray ile belirlenebileceğinin bilinmesinden çok önce, kiral moleküllerin asimetric merkezinin konfigürasyonunun belirlenebilmesi için, tümü ile keyfi olarak, (+)-Gliseraldehitin standart olarak seçilmesi, yerleşik bir kural halini almıştı. Konfigürasyonun belirlenebilmesi için ilk olarak Emil Fischer tarafından önerilen Fischer izdüşüm formülü temel alınmıştı. Fischer bunu ilk olarak glukoz molekülünün d-enantiyomerinin stereokimyasal düzenlemesi için kullanmıştı.

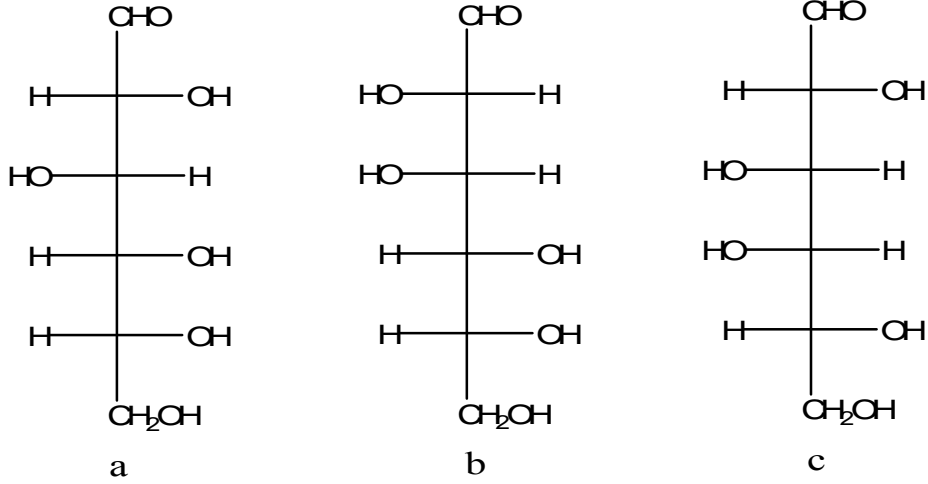
Fischer izdüşümünde, moleküldeki bütün bağlar yatay ve dikey çizgilerle gösterilir. Yatay çizgilerin gözleyene doğru, dikey çizgilerin gözleyenden uzakta olduğu varsayılır. Uzun karbon zinciri dikey olarak gösterilir ve yüksek değerli karbon en üste yazılır. Fischer, konfigürasyonu ayırmada tümüyle keyfi olarak, asimetric merkeze bağlı OH grubunu sağa yönlenen (+)- gliseraldehiti, D-(+)- gliseraldehit olarak isimlendirdi.



Şekil 1.4: D-Gliseraldehitin a.) Fischer İzdüşüm Formülü b.) Üçboyutlu Gösterimi

Fischer izdüşüm formülüne alternatif olarak moleküllerin üç boyutlu gösterimi geliştirildi. Bu gösterimde koyu bağlar gözleyene doğru, kırık bağlarda gözleyenden uzak şekilde betimlenir.

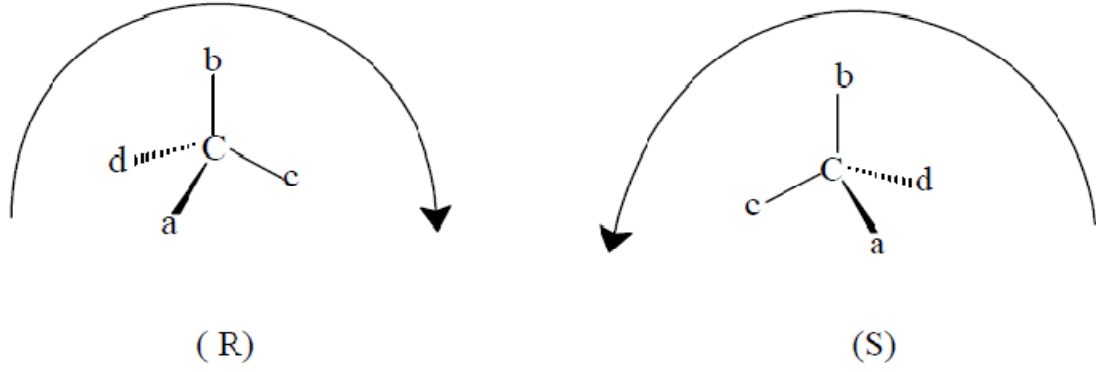
Bütün kiral moleküllerin konfigürasyonları, D-(+)-Gliseraldehit ve L-(-)- Gliseraldehit referans alınarak, D ve L olarak belirlenir. Fischer izdüşüm formülüne göre 5. Karbon atomuna bağlı –OH sağda ise D-, solda ise L- olarak belirlenir. D-Glukoz (a), D-Mannoz (b) ve D-Galaktoz (c) gösterilmiştir. (Şekil 1.5a,b,c).



Şekil 1.5: Fischer'e göre D-Glukoz (a), D-Mannoz (b) ve D-Galaktoz (c)

X-Ray analizi ile mutlak konfigürasyonun belirlenebileceğinin ortaya konulmasından önce, Fischer'in ortaya koyduğu D ve L sistemi bağıl konfigürasyon hakkında bilgi veremekteydi. Ayrıca D ve L sistemi bazı karışıklara yol açmaktaydı. Bu nedenle mutlak konfigürasyonun belirlenmesi için yeni bir sisteme gerek duyuldu.

Bu sistem (R)–(S) ya da “Chan-Ingold-Prelog” sistemidir. Burada (R) Latince Rectus (sağ), (S) Latince sinistre (Sol) sözcüklerinin baş harfleridir. (R)-(S) sistemi, konfigürasyonun kesin düzenlenişi hakkında bilgi vermektedir. (R)-(S) sistemi, asimetric merkeze bağlı grupların önceliğine göre belirlenir (Şekil 1.6.). Örnekte bağlı gruplar, azalan önceliğe göre, a>b>c>d şeklinde sıralanmıştır. Bağlanan grupların önceliği, cis-trans izomerliğini belirlemede kullanılan E-Z sistemindeki gibi bulunur.



Şekil 1.6: Cahn-İngold-Prelog sistemi

Atom numarası en büyük olan atom en öncelikli gruptur.

Örneğin ; Cl > S > F > O > N > C > H

Eğer bağlı iki atom aynı ise, bağlı olan grupta farklılaşma oluncaya kadar diğer atomlara bakılır.

Örneğin: CH₂Cl > CH₂OH > CH₂CH₃ > CH₃....vb.

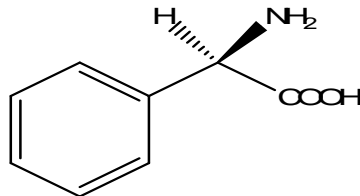
Çift bağlar, iki tane tek bağ gibi düşünülür.

Örneğin: CH₂ = CH₂ > CH₂CH₃

Buna göre; -COOH > -CO->COH > -CH₂OH > -CN > -C₆H₅ > -CH= CR₂ dir.

Şekil 1.6.'ya göre konfigürasyon belirlemek gerekirse, en düşük öncelikli grup (d) gözleyenden uzak bir şekilde çizilir ve diğer gruplara bakılır. Eğer öncelikli gruplar olan a > b > c saat yönünde ilerliyorsa konfigürasyon (R) olarak, saat yönünün tersine ilerliyorsa konfigürasyon (S) olarak adlandırılır.

Tüm bu söylenenleri optikçe aktif bir bileşik olan Fenilglisin'i örnek olarak alıp özetlersek

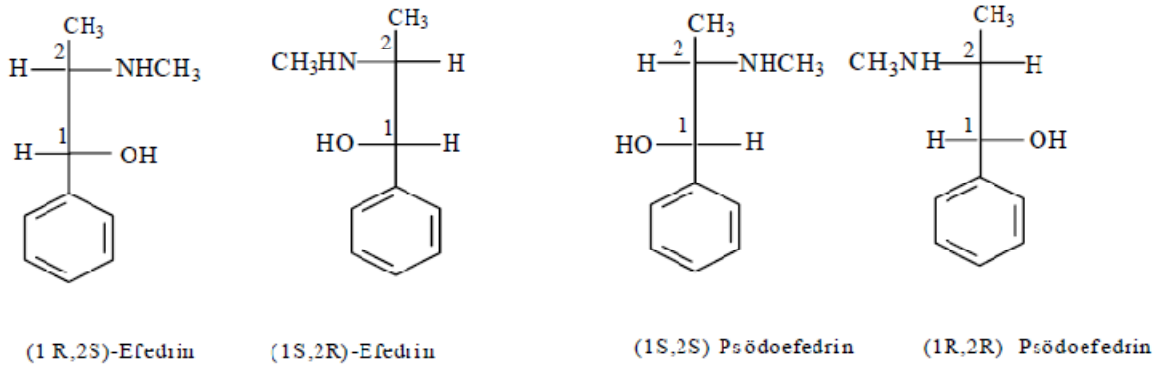


Şekil 1.7: D-(-)-Fenilglisin

Şekil 1.7’ de gösterilen yapı fenilglisin ticari kullanımı olan levorotatori yani (-) ya da (L) izomeridir. Fischer izdüşüm formülüne göre D- konfigürasyonundandır. Bu da D- ve L- ayırmalarında karışıklıklara yol açar. Bu karışıklıklardan kurtulmak için (R)-(S) sistemini kullandığımızda ise, molekül R-konfigürasyonundadır. Fischer izdüşüm formülü karışıklıklara yol açmasına rağmen aminoasit kimyasında yerleşik bir kural halini aldığından, aminoasitler hala D, L sistemine göre adlandırılırlar.

1.1.5. Diastereomerler

Bir molekül birden fazla asimetric karbona sahipse, stereoizomerlerinin sayısı 2^n den fazla olur. Asimetric karbon sayısına n dersek stereoizomer sayısı 2^n olur. Eğer $n=2$ ise, maksimum stereoizomer sayısı 4 olur. Bir çift oluşturan enantiyomerler, diğer stereoizomerlerle ayna görüntüsü vermiyorsa bunlar enantiyomer değildirler. Enantiyomer olmayan bu stereoizomerler “ diastereomer ” olarak adlandırılırlar. Bu tanım yalnızca kiral moleküller için değil; aynı zamanda akiral molekül olan “ cis-trans” geometrik izomerlerini de kapsar. Diastereomerlerin kimyasal özellikleri ve erime noktası, çözünürlük, yoğunluk gibi fiziksel özellikleri farklıdır. Şekil 1.8.’de iki asimetric merkezi olan efedrin molekülünü ele alırsak:

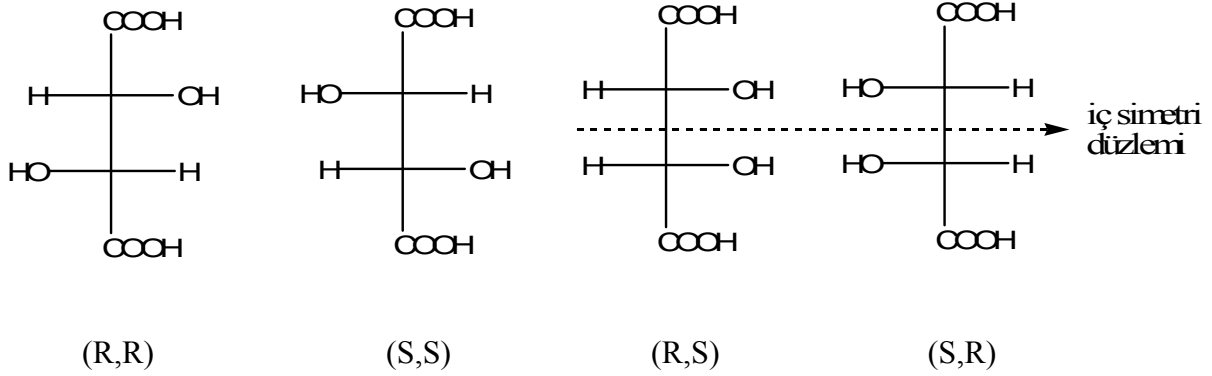


Şekil 1.8: Efedrin molekülünün Fischer izdüşüm formülleri

(1R,2S)-efedrin ile (1S,2R)-efedrin ve (1S,2S)-psödoefedrin ile (1R,2R)-psödoefedrin molekülleri birbirilerinin enantiyomerleridir. Oysa (1R,2S)-efedrin ile (1S,2S)-psödoefedrin stereoizomerleri, ayna görüntüsü ilişkisi olmadığından, birbirilerinin enantiyomerleri değildir. Enantiyomer olmayan bu stereoizomerler diastereomerdirler.

1.1.6. Mezo yapısı

Şekil 1.9' da iki asimetric karbon atomu bulunan tartarik asidin 2ⁿ formülüne göre 4 tane stereoizomeri olması gerekirken; 3 tane stereoizomeri vardır.



Şekil 1.9: Tartarik asitin stereoizomerleri

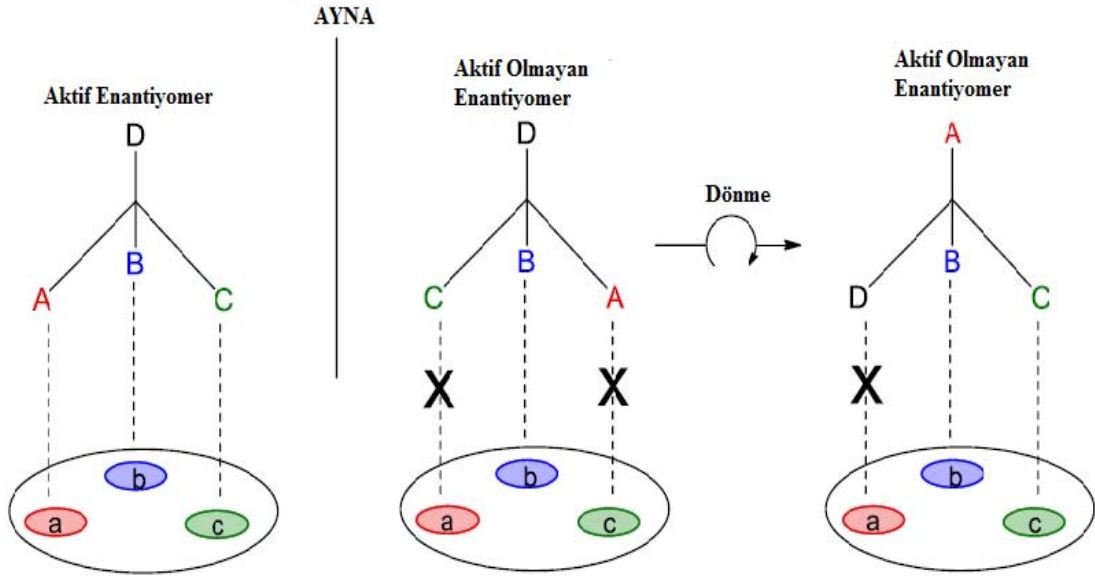
İki izomer (R,R) ve (S,S) enantiyomerdir. (R,S) ve (S,R) yapısına bakarsak, bu moleküller bir iç simetri düzlemine sahiptirler. Birbirinin ayna görüntüsü olan bu moleküllerden birini kağıt düzleminde 180° çevirirsek diğer yapıyı elde ederiz. Dolayısıyla bunlar ayrı bileşikler değil, aynı bileşiklerdir. Molekül iki asimetric karbon atomuna sahip olduğu halde, molekülün üst yarısı, alt yarısının ayna görüntüsü olduğundan; iki yarı birbirinin çevirme açısını yok etmektedir. Asimetric merkezleri olmasına rağmen ayna görüntüleri çakışan stereoizomere mezo şekli denir. Tartarik asidin (R,S) ve (S,R) formları, aynı molekül olup Mezo-tartarik asittir (Tümerdem. 2004).

1.2. Kiralitenin Biyolojik Sistemlere Etkileri

Kiral olmayan bir çevrede, rasemik karışımın enantiyomerleri aynı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahiptir. Fakat kiral kanunların işlediği biyolojik sistemlerde rasemik karışımın enantiyomerleri farklı özellikler sergilemektedirler. Bu enantiyomerlerin farklı çevirme açısına sahip olmaları ve diğer fiziksel özelliklerinin ise aynı olması (erime noktası, kaynama noktası, yoğunluk, kırılma indisi v.b.) bu bileşiklerin birbirleriyle veya diğer bileşiklerin enantiyomerleriyle olan etkileşimlerini etkiler. Bu özellik kiral bileşiklere vücutta veya metabolizmada farklı bir işlevsel özellik kazandırır. İlacın her bir enantiyomerinin etki mekanizması farklı olduğu için vücuttaki fonksiyonu da farklı olur. Genel analjezik olarak kullanılan romatoid türevi ilaçlar, naproxen, ibuprofen gibi ilaçların yalnızca tek bir enantiyomeri etkindir. Bazen (S) izomerin iyileştirici yönde rol oynadığı bir ilacın (R) izomeri

kullanılırsa; biyolojik sistemde onarılması güç hasarlar meydana getirir. Örneğin tüberküloz tedavisinde kullanılan kiral ilaçlardan (S,S)-ethambutolun sentezi sırasında reaktant olarak (S)-2-aminobütanol kullanılmaktadır. Fakat (R)-2-aminobütanol kullanıldığında ele geçen diğer stereoizomer körlüğe sebep olmaktadır (Sheldon 1993).

Enantiyomerlerin böyle farklı davranışlar sergilemesinin nedeni; enantiyomerlerin üç boyutlu yapıda biyolojik sistemlerle farklı etkileşmesidir. Bu olay 1930'lu yılların başlarında Easson ve Stedmann tarafından “Üç Noktadan Etkileşim Modeli” ile açıklanmış ve farmakolojik aktivitede, stereokimyasal farklılıkların anlaşılmasına bir temel oluşturmuştur. Yazarlar, enzim ya da reseptör yüzeyindeki biyolojik olarak aktif bölgeye enantiyomerlerin farklı biyoaffinite gösterdiklerini ifade etmişlerdir. Biyoaffinitedeki bu farklılığın nedeni ise enzim ya da reseptörün eşdeğer olmayan üç noktası ile enantiyomerlerin eşdeğer olmayan üç noktasının farklı şekillerde etkileşmesidir (Easson ve ark. 1933). Enzimin üç noktası ile aynı anda etkileşen enantiyomer “eutomer” ya da “aktif enantiyomer” olarak; enzimin üç noktası ile birebir etkileşmeyen enantiyomer ise “distomer” ya da “aktif olmayan enantiyomer” olarak isimlendirilmiştir.



Şekil 1.10: Üç noktadan etkileşim modelinin şekilsel gösterimi

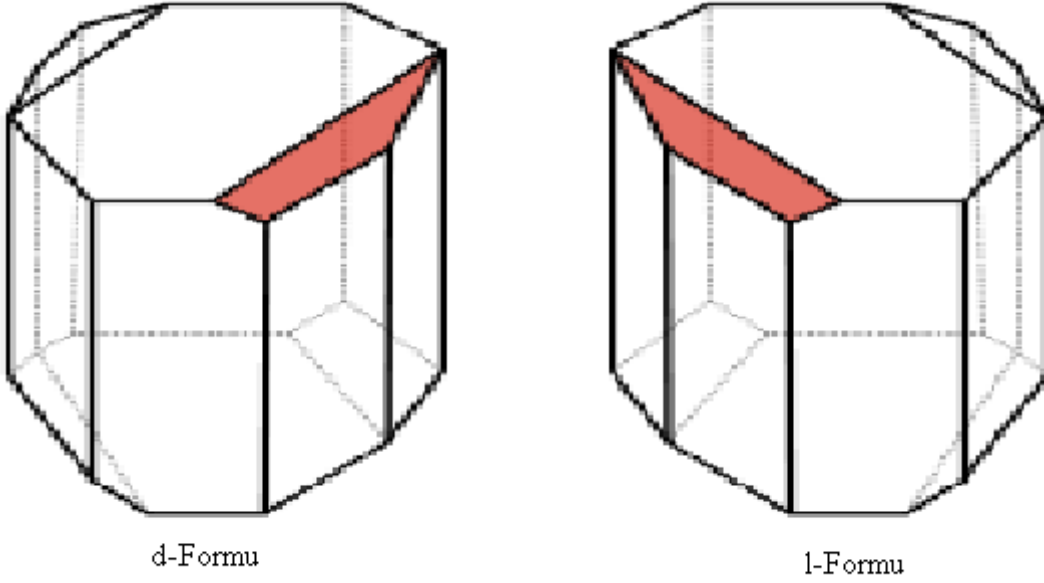
1.3. Stereoizomerlerin Rezolüsyonu

Rasemik bir bileşimin enantiyomerlerine ayrılması işlemi “rezolüsyon” olarak isimlendirilir. Enantiyomerlerin rezolüsyonu için çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Farklı teknikler iki sınıfta kategorize edilmektedir. Bunlardan ilki klasik metotlar olup enzimatik ayırma ve seçici kristallendirmeyi ihtiva etmektedir. İkinci sınıf ise modern yöntemler olarak isimlendirilen ve spektroskopik, elektroforetik ve kromatografik metotları içeren modern teknolojilerdir.

1.3.1. Klasik Metotlarla Enantiyomerik Rezolüsyon

Enzimatik metotta, rezolüsyon biyokimyasal yollardan bir enantiyomerik formun parçalanmasıyla oluşmaktadır. Maya, mantar ve bakteri gibi mikroorganizmalar bir rasemik karışım çözeltisine bırakıldığında; bu mikroorganizmalar enantiyomerlerden biriyle uyum sağlayarak, diğer enantiyomerin çevresinden uzaklaşırlar. Örneğin “*Penicillium glaucum*” mantarı amonyum tartaratın rasemik çözeltisine ilave edilirse; D- formunun yıkımından dolayı çözelti de bir süre sonra L- formu kalır (Pasteur L 1848).

Kristallendirmenin prensibi; optikçe saf bileşimin rasemik yapıdaki enantiyomerlerle diastereomerik tuzlar vermesidir. Diastereomerik tuzlar fiziksel özellikleri farklı olduğu için basitçe ayrılabilir. Bu yöntemde, optikçe aktif ayırma reaktifi, optikçe yüksek saflıkta olmalıdır. İstenilen enantiyomer diastereomerik tuzlardan ayrıldıktan sonra, ayırma reaktifi tekrar elde edilmeli ve yeniden kullanım için hazır hale getirilmelidir. Sodyum amonyum tartarak ve quartz gibi enantiyomerlerinin görünümü birbirinden farklı olan bazı rasemik bileşiklerin kristallerinin ayrılmasında mekanik metotlardan da yararlanılabilir (cımbız, iğne v.b.).



Şekil 1.11: Sodyum Amonyum Tartarat kristallerinin d- ve l- formu

Enzimatik ayırma ve seçici kristallendirmeyi içinde barındıran klasik metotlar laboratuvar uygulamalarında başarılı sonuçlar vermezler ve kullanım alanları oldukça sınırlıdır.

1.3.2. Modern Metotlarla Enantiyomerik Rezolüsyon

Günümüzde kromatografik, elektroforetik, spektroskopik, biyosensör ve membran metotları yaygın olarak kullanılmaktadır. Spektroskopik metotlarda araştırmacılar optik çevirme ölçüm cihazları, NMR spektroskopisi ve IR spektroskopisini kullanmaktadırlar. Diferansiyel taramalı kalorimetre(DSC) rasemik karışımların enantiyomerlerini (+) ya da (-) olarak ayırt edebilir. NMR spektroskopisinde, kiral solvatlayıcı reaktifleri kiral karbon atomlarının kimyasal kaymasını değiştirmek için kullanılabilir. Ancak, DSC ve spektroskopik metotlar, örnekteki kiral ve akiral kirliliklerden gelen girişimlere karşı hassastır. Bu nedenle DSC ve spektroskopik metotlar, preparatif ölçeklerde başarılı sonuçlar vermezler. 2001 yılında preparatif ölçeklerde enantiyomerleri ayırmak için kiral membranlar kullanılmıştır; fakat bu teknik yeterince geliştirilememiştir (Maier ve ark. 2001).

Kiral ayırmanın elektroforetik metotları içinde, kapiler bölge elektroforez(CZE), kapiler izotakofrez(CIF), kapiler jel elektroforez(CGE), kapiler izoelektrik odaklama(CIEF), affinite kapiler elektroforez(ACE) ve mikroçipler gibi kapiler elektroforezin çeşitli formları yer almaktadır. Ancak CZE diğer elektroforetik metotlara göre daha fazla kullanılmaktadır (Stefan ve ark. 2001). Modern kiral sabit fazların gelişimi elektroforetik metotların uygulamalarını sınırlandırmıştır. Ayrıca elektroforetik teknikler, kiral ayırma biliminin acil

ihtiyacına yanıt veremediğinden dolayı preparatif ölçeklerde kullanılmamaktadır. Preparatif amaçlar için bazı kromatografik metotlar kullanılmaktadır.

1.3.2.1. Kromatografik Metotlar

Kromatografik metotlarda direk ve indirek olmak üzere iki metot kullanılmaktadır. Rasemik karışımın enantiyomerlerine indirek kromatografik ayrılması, rasemik bileşiğin bir kiral türevlendirme reaktifi (CDR) ile diastereoizomerik tuz komplekslerinin oluşturulması ile sağlanmaktadır. Farklı fiziksel ve kimyasal özelliklere sahip bu diastereomerler akiral kromatografik metotlarla birbirinden ayrılabilirler.

Direk kromatografik uygulamalar kiral hareketli faz katkısı (CMPA) ve kiral sabit faz (CSP) olarak isimlendirilen kiral selektörlerin kullanımını içermektedir. CMPA' da kiral selektör yürütücü faz içerisinde çözülür ve sabit faz akiraldir. CMPA ile analit enantiyomerlerinin etkileşmesi geçici diastereomerik kompleksleri oluşturur. Bu kompleksler akiral sabit faz ve yürütücü faz arasında farklı oluşum sabitleriyle enantiyomerik ayırma ile sonuçlanırlar. Ancak hareketli fazın hazırlanması için gerekli olan kiral selektör miktarının fazla olması, maliyeti yüksek oranlara taşımaktadır. Preparatif amaçlar için CMPA lar yerine CSP' ler tercih edilmektedir.

Kromatografik metotlar yürütücü faz olarak gaz ya da sıvı kullanımına göre, Gaz Kromatografisi ve Sıvı Kromatografisi olarak sınıflandırılırlar. Gaz kromatografisinde buharlaştırılmış numunenin bileşenleri, hareketli faz ile bir kolona tutturulmuş bir sıvı veya bir katı faz arasında dağılması sonucu ayrılır. Gaz kromatografi tekniğinde, numune buharlaştırılır ve kromatografi kolonunun girişine enjekte edilir. İnert bir gaz olan yürütücü gazın akışıyla elüsyon gerçekleştirilir. Kiral bileşiklerin birçoğu uçucu olmadığından dolayı gaz kromatografisiyle enantiyomerik rezolüsyon çalışmaları oldukça sınırlıdır. Birçok rasematın enantiyomerik rezolüsyonu için en etkili yöntem Sıvı Kromatografisidir. Sıvı kromatografisinin temel avantajı biyolojik ve çevresel örneklerde enantiyomerleri belirleme yeteneğidir. Sıvı kromatografisi uygulamalarında kullanılan çeşitli teknolojiler geliştirilmiştir. Bunlardan en önemlileri yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC), süperkritik akışkan kromatografisi (SFC), kılcal elektrokromatografi (CEC) ve ince tabaka kromatografisi (TLC) dir.

Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Bu kromatografi türünde hareketli faz sıvı ve durgun faz ise çok küçük katı taneciklerden oluşur. Uygun akış hızları elde edebilmek için, sıvıya birkaç yüz psi'lik veya daha yüksek bir basınç uygulanması gerekir. HPLC'nin diğer sıvı kromatografisi tekniklerine göre birçok üstün tarafı vardır. Yüksek hız, hassaslık ve tekrar kullanılabilirlik gibi özellikler neredeyse bütün laboratuvarlarda HPLC'nin kullanımını gerekli kılar. Ayrıca bu metodun herhangi bir sınırlaması olmadığından dolayı hem analitik hem de preparatif ölçeklerde başarılı sonuçlar verir. Kiral rezolüsyon çalışmalarının yaklaşık olarak %90'ı HPLC ile gerçekleştirilmektedir. Neredeyse kiral selektörlerin tümü HPLC kolonlar için uygundur ve kiral rezolüsyonda çok geniş bir uygulama alanına sahiptir (Allenmark 1991).

Süper Kritik Akışkan Kromatografisi (SFC)

Hareketli fazın süperkritik akışkan olduğu bu kromatografi türü gaz ve sıvı kromatografisinin üstün yanlarını bir araya getirmiş, bunların karışımı olan bir tekniktir. Süperkritik akışkan, bir maddenin kritik sıcaklığının üzerine çıktığı zaman elde edilen fiziksel halidir. Kritik akışkanların fiziksel özellikleri gazlar ve sıvılar arasındadır. Süperkritik akışkanlar, gazlar gibi sıkıştırılabilir ve sıvılar gibi belli bir viskoziteye ve yoğunluğa sahiptirler. Kromatografide yaygın olarak kullanılan süperkritik akışkanlar; karbondioksit, diazotmonooksit ve triflorometandır (Schoenmakers 1988). SFC ile ilk kiral rezolüsyon çalışması 1985 yılında Mourier ve arkadaşları tarafından yapılmıştır.

Kılcal Elektrokromatografi (CEC)

Bu kromatografi türü HPLC ve kılcal elektroforez yöntemlerinin bir melezi olup iki yöntemin de en iyi yönleri birleştirilmiştir (Cronin J.R. ve Pizarello S. 1997). CEC'de paketlenmiş kapiler kolonlar kullanılır ve bu kolonların iki ucu arasında elektroozmotik akış sağlanarak hareketli faz taşınır. Rasemik bileşiklerin kiral rezolüsyonu için birçok uygulamada CEC kullanılmıştır. Yüksek hız, hassaslık, dedeksiyon limitinin düşüklüğü ve yeniden kullanılabilirlik, CEC'yi kiral rezolüsyon için ideal bir yöntem yapar. Ancak bu teknik yeterince geliştirilemediğinden dolayı sıkça tercih edilen bir yöntem değildir.

İnce Tabaka Kromatografisi (TLC)

İnce tabaka ayırmaları, genellikle ince bir şekilde öğütülmüş taneciklerin bir cam yüzeye ince bir tabaka halinde kaplanmasıyla elde edilen durgun fazda gerçekleştirilir. TLC ile kiral ayırmalar son 25 yıldır literatürde yer almaktadır. Bu kromatografi türünde, kiral

1.GİRİŞ

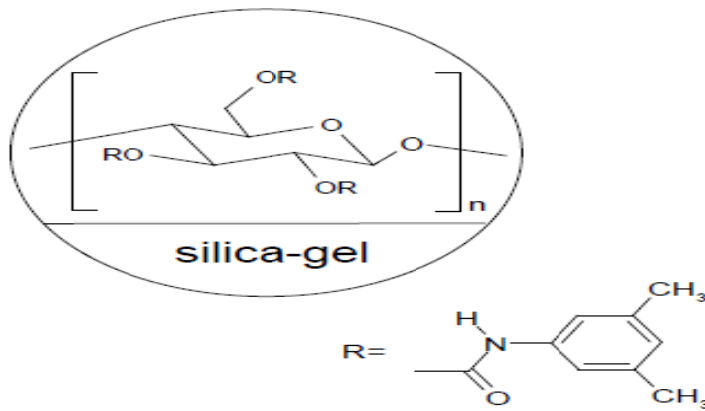
ayırılmalar için en yaygın kullanılan durgun faz selülozun, fenil karbamat türevleridir. Düşük fiyat, basitlik ve kullanım kolaylığı TLC'nin temel avantajlarıdır. Rezolüsyon çalışmalarında bu yöntemin dezavantajı ise, dedeksiyon limitinin yüksekliği ve kiral ince tabaka materyalinden gelen kirliliklerin yaptığı girişimlerdir.

1.4. Kiral Sabit Fazlar (CSPs)

CSP'ler akiral katı bir destek maddesi üzerine kiral bir molekülün kimyasal bağlarla bağlanması sonucu elde edilirler ve enantiyomerik rezolüsyonda çok önemli bir yere sahiptirler. Analitik, biyokimya, ilaç ve çevre endüstrisinde kromatografi ile enantiyomerlerin kiral rezolüsyon çalışmaları genellikle CSP'ler üzerinden yürütülmektedir. CSP'ler genellikle HPLC'de kullanılan çelik kolonlara doldurulmaktadır. Fakat kapiler elektroforez ve ince tabaka kromatografisi için bazı kiral kılcallar ve ince tabakalarda da kullanıldıkları bilinmektedir. Kiral kolonlar ve kapiler dolgu maddeleri; polisakkaritler, siklodekstrinler, antibiyotikler, proteinler, Pirkle tip ligand değiştiriciler ve crown eterler gibi çeşitli kiral selektörler ile paketlenmektedir.

1.4.1. Polisakkarit Temelli Kiral Sabit Fazlar

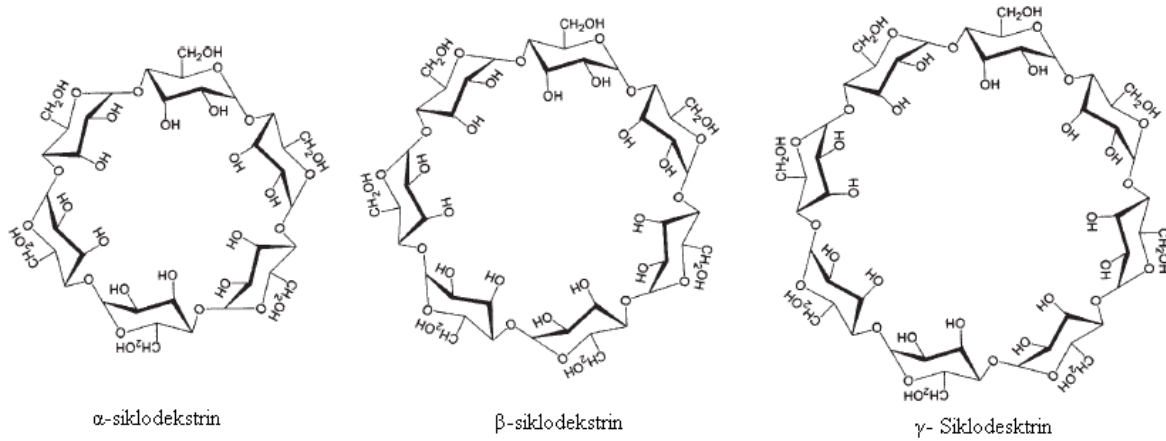
Selüloz, amiloz ve kitin gibi polisakkaritler, yeryüzünde bol miktarda bulunan optikçe aktif polimerlerdir. Bu polisakkaritlerin asit klorürler ve izosiyanatlarla reaksiyonu sonucu oluşan ester ya da karbamatları kiral tanıma özelliğine sahiptir. Polisakkarit temelli CSP'ler, birçok kiral bileşiğin enantiyomerik rezolüsyonunda yaygın olarak kullanılmaktadır. Aşağıdaki şekilde alkaloidler, tropinler, aminler ve β -blokerlerin enantiyomerik rezolüsyonunda kullanılan, kimyasal adı selüloz tris 3,5-Dimetilfenilkarbamat ve ticari adı Chiralcel OD-H^a olan CSP'nin yapısı verilmiştir.



Şekil 1.12: Polisakkarit temelli Chiralcel OD-H^a CSP'nin kimyasal formülü

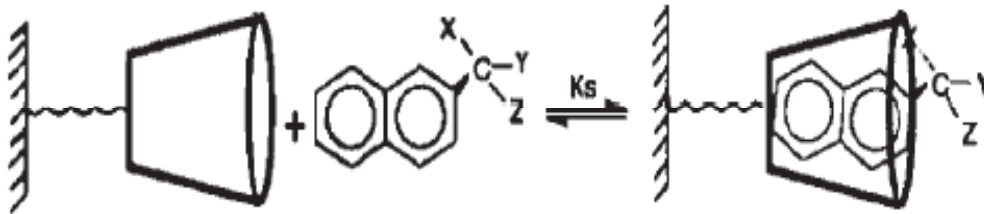
1.4.2. Siklodekstrin Temelli Kiral Sabit Fazlar

Siklodekstrinler D-(+)-glukopiranoz ünitelerinin α -(1,4) bağlarıyla bağlanması sonucu oluşan toroidal şekilli moleküllerdir. Siklodekstrinler “*Bacillus macerans*” bakterileri tarafından nişastanın sindirilmesiyle ya da siklodekstrin glikozilaz enzimi tarafından doğal olarak üretilirler. α -, β -, ve γ - siklodekstrinler doğada bol miktarda bulunmaktadır ve sırasıyla altı, yedi ve sekiz glukopiranoz birimlerinin bir araya gelmesiyle oluşmaktadır. Aşağıdaki şekilde α -, β -, ve γ - siklodekstrinlerin yapıları verilmiştir.



Şekil 1.13: α -, β -, ve γ - siklodekstrinlerin yapısı

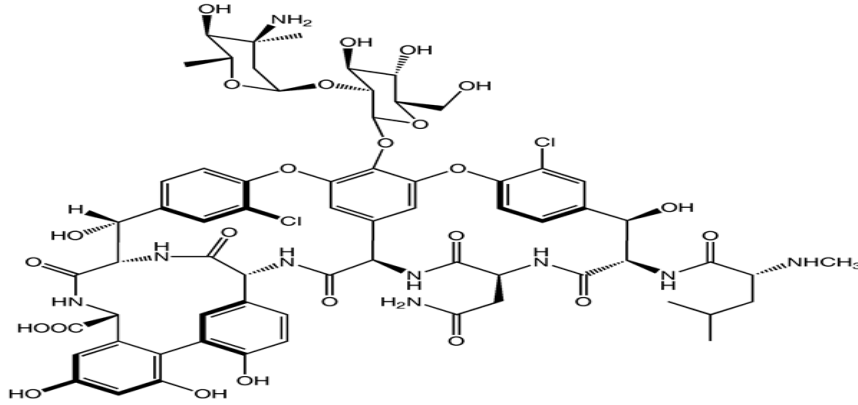
Kiral ayırmalar için siklodekstrinler ilk olarak 1959 yılında kullanılmıştır. Bu tür CSP’ler silikanın izosiyanat, etilendiamin ve epoksit türevlerine siklodekstrinlerin -OH grubunun bağlanması sonucu hazırlanmaktadır. Siklodekstrin temelli CSP’ler de enantiyomerlerden biri π - π etkileşimleri, hidrojen bağı, dipol-dipol etkileşimleri ve sterik etkiler sonucu siklodekstrinlerin kiral kavitesiyle etkileşirken; diğer enantiyomer, tam olarak etkileşmez ve enantiyomerik rezolüsyon gerçekleşmiş olur (Armstrong ve ark. 1991).



Şekil 1.14: Siklodekstrinin kavitesiyle etkileşen enantiyomerin şekilsel gösterimi (D’Acquarica 2000).

1.4.3. Makrosiklik Antibiyotik Temelli Kiral Sabit Fazlar

Armstrong ve çalışma arkadaşları tarafından 1994 yılında literatüre kazandırılan bu kiral selektör türü, birçok rasemik bileşiğin enantiyomerik rezolüsyonunda kullanılabilirliği ve hızlı gelişimi sayesinde dikkatleri üzerine çekmiştir. Birçok biyolojik, kimyasal ve farmakolojik bileşik sınıfı için antibiyotik temelli CSP'ler kullanılarak yüksek enantiyomerik saflık elde etmek mümkündür. Bu tür CSP'ler de Vancomycin, ristocetin, teicoplanin v.b makrosiklik antibiyotikler kullanılmaktadır. İlk kullanılan antibiyotik 18 kiral merkez içeren vancomycin'dir. Vancomycin antibiyotiği, bakterinin hücre duvarındaki D-alanil-D-alanin grubuna bağlanarak bakterinin gelişimini durdurur. Bu bilgidен hareketle vancomycin ile hazırlanan CSP'de aminoasitlerin enantiyomerik rezolüsyonu denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir (Berthod ve ark 2000).



Şekil 1.15: Vancomycin molekülünün kimyasal yapısı

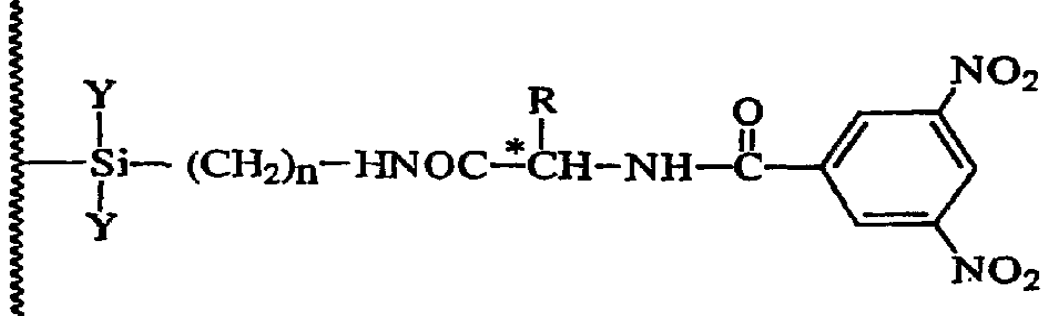
1.4.4. Pirkle Tip Kiral Sabit Fazlar

Genellikle kiral sabit fazların tümü polimerik yapıda olan polisakkaritler ve proteinler, siklik yapıda olan siklodekstrinler ve crown eterler, kiral oyuk içeren antibiyotik temelli kiral sabit fazlar ve uygun ligand değiştiriler ile koordine edilmiş metal iyonlarını içeren ligand değişim fazları gibi bazı spesifik yapılara sahiptir. Bununla birlikte 1976'da Mikes ve arkadaşları silikajele küçük bir kiral molekül tutturarak yeni bir CSP türüne zemin oluşturdular. Pirkle ve çalışma arkadaşları bu tip kiral sabit fazları geliştirerek, bu kolon dolgu materyallerinin Pirkle tip kiral sabit fazlar adı altında literatüre girmesini sağladılar.

Bu tip CSP'ler de, ya π -elektron alıcı grup ya π -elektron verici grup ya da her iki grubu birden içeren kiral bir molekül, iyonik veya kovalent bağlarla silika jele bağlanır. Bu yüzden Pirkle tip CSP'ler üç grupta sınıflandırılır (π -asidik, π -bazik, π -asidik-bazik). Kiral

moleküllerdeki fenil grupları π -elektron verici eğilime sahiptir. Ancak elektronegatif atom ya da gruplar içeren fenil gruplarında π -elektron noksanlığı vardır ve bu gruplar yapıya π -elektron çekici bir özellik kazandırır.

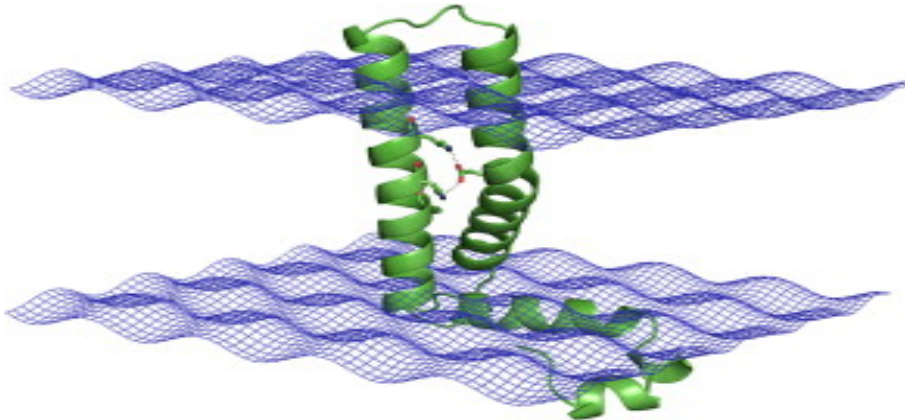
Pirkle tarafından hazırlanan ilk CSP π -asidik grup olan 3,5-Dinitrofenil glisinini içermektedir.



Şekil 1.16: Pirkle ve arkadaşları tarafından hazırlanan ilk Pirkle type CSP' nin yapısı

1.4.5. Protein Temelli Kiral Sabit Fazlar

Proteinler, glisin hariç aminoasitlerden oluşan doğal polimerlerdir. Protein polimerler farklı moleküler arası bağlardan dolayı kıvrımlar içerir. Bu bağlar, protein molekülündeki kıvrımların oluklar oluşturmasını sağlar. Üç boyutlu kıvrımlı yapı proteine doğada enantioseçicilik kazandırır. Proteinlerle küçük moleküller arasında enantioseçici etkileşim en çok biyolojik sistemlerde gözlemlenir (Lowe ve Dean 1974).



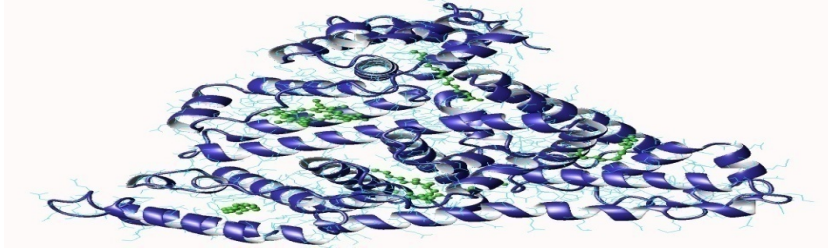
Şekil 1.17: Herhangi bir proteinin kıvrımlı yapısının oluşturmuş olduğu oluklar

1.GİRİŞ

Proteinler enantiyoseçici özelliklerinden dolayı, kromatografi de CSP olarak kullanıma elverişli biyopolimerlerdir. Silika jel üzerine immobilize edilen proteinler HPLC’de birçok rasemik bileşiğin enantiyomerik rezolüsyonunda, başarılı sonuçlar vermiştir. Sıvı kromatografisinde kiral selektör olarak genelde bovine serum albumin(BSA), human serum albumin(HSA), rat serum albumin(RSA) ve guinea pig serum albumin(GPSA) proteinleri kullanılmaktadır. Bu proteinler içerisinde kiral ayırma kapasitesi en yüksek olan BSA ve HSA’dır. Bu proteinlerin yanı sıra glikoprotein temelli α -asitglikoprotein, ovomucoid, avidin, tripsin ve enzim temelli kimotripsin, riboflavin, lizozim, pepsin, amiloglikosidaz proteinleri de kiral ayırmada kullanılmaktadır.

1.4.5.1. Bovine Serum Albumin(BSA)

Bovine serum albumin sığırlardan elde edilen bir proteindir. Toplamda 607 tane aminoasit içeren, 66210 molekül kütlesine sahip bu, protein globuler yapıdadır. İzoelektrik noktası 4.7 olan bu protein asit özelliği gösterir ve suda çok iyi çözünür. Moleküler boyutu $141 \times 42 \text{ \AA}$ ’dır. BSA hidrofobik gruplar içeren birçok organik bileşik ile bağ yapabilme kapasitesine sahiptir. BSA, hidrofobik özellik gösteren inorganik anyonlarla da bağ yapabilmektedir. Yağ asitleri ile çok zayıf bağlar oluşturduğundan dolayı BSA kaprilik asit içerisinde stabilize edilmektedir.



Şekil 1.18: BSA'nın üçboyutlu yapısı

1.4.5.2. Human Serum Albumin(HSA)

HSA insan kan plazmasında en bol miktarda bulunan proteindir. Karaciğerde üretilen HSA bovine serum albumin ile benzer özellikler göstermekte olup HSA'dan sonra sıvı kromatografisinde kiral selektör olarak en çok kullanılan proteinlerden biridir. Bu protein tek bir polipeptid zinciri üzerinde 580 aminoasit içerir ve molekül kütlesi 69000'dir. Bu proteinin izoelektrik noktası 4.8 olup asidik özellik sergilemektedir.

1.4.5.3. α_1 - Asit Glikoprotein

Orosomuroid olarak da bilinen bu protein insan kan plazmasında bulunmaktadır. 141 aminoasit içeren α_1 -asit glikoprotein 41000 molekül kütlesine sahiptir. 2.7 izoelektrik noktasına sahip olan bu protein asidik özellik sergilemektedir. Bu protein 40 sialik asit kalıntısı içermektedir. Sialik asit kalıntıları nötral pH'lar da amonyum tipi bileşiklerle enantiyoseçici proseslere uygun bağ yaparlar.

1.4.5.4. Ovomuroid

Ovomuroid tavuk yumurtasının beyaz kısmından elde edilen bir glikoproteindir. 186 aminoasit içeren bu protein 55000 molekül kütlesine sahiptir. Toplam ağırlığının 0.5-1% arasında sialik asit kalıntıları içerir. İzoelektrik noktası 4.5 olan ovomuroid asidik yapıdadır. Asit ve aminlerle bağ yapabilme kapasitesine sahiptir.

1.4.5.5. Avidin

Tavuk yumurtasının beyaz kısmından elde edilen diğer bir proteinde avidindir. 9.5-10 arasında izoelektrik noktasına sahip olan bu protein bazik özellik sergilemektedir. Avidin, her birinin molekül kütlesi 16400 olan dört özdeş alt birimden oluşmaktadır. 17 tane asparagin aminoasidini içeren ve dört alt zincirden biri olan glikozidik zincir 1 mol biotin ile bağ yapabilmektedir. Nötral pH'lar da üzerindeki net pozitif yükten dolayı avidin anyonik örnekler için iyi bir enantiyoselektivite göstermektedir.

1.4.5.6. Ovotransferrin

Ovotransferrin tavuk yumurtasının beyaz kısmından elde edilen ve sıvı kromatografisinde kiral selektör olarak kullanılan bir proteindir. Bu protein daha çok demir, bakır, mangan, çinko v.b metal iyonlarıyla bağ yapar. İzoelektrik noktası 6.1-6.6 arasında olan bu protein 70000-78000 arasında bir molekül kütlesine sahiptir.

1.4.5.7. Kimotripsin

α - ve β - olmak üzere iki formdan oluşan bu protein pankreatik dokulardan elde edilmektedir. Kimotripsin'in α - formu kromatografide kiral selektör olarak kullanılmaktadır. Molekül kütlesi 25000 ve izoelektrik noktası 8.1-8.6 arasındadır.

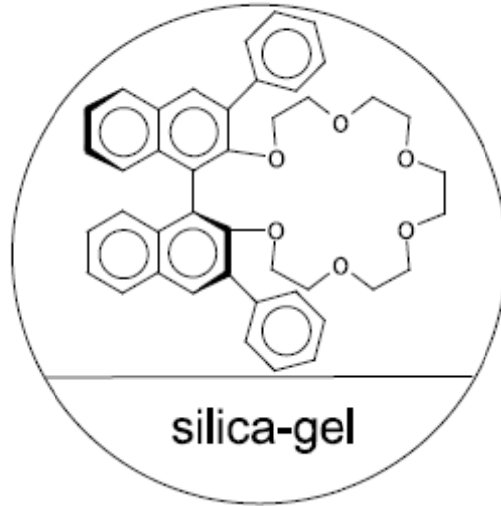
1.4.5.8. Sellobiyohidrolaz-I

Sellobiyohidrolaz-I, hayvanlardan elde edilen ve sıvı kromatografisinde selektör olarak en çok kullanılan glikoproteindir. 3.6 izoelektrik noktası sahip olan bu protein yine asit

sınıfında yer almaktadır. Molekül kütlesi 60000' dir.

1.4.6. Kiral Crown Eter Temelli Kiral Sabit Fazlar

Crown eterler yapılarında oksijen atomu ihtiva eden sentetik makrosiklik polieterlerdir. Oksijen atomu yerine azot ve kükürt atomu ihtiva eden Crown eterler de mevcuttur. Bu eterler sırasıyla aza Crown eterler ve tiyo Crown eterler olarak isimlendirilmektedir. Crown eterlere enantiyoseçici özellik kazandırmak için bu bileşiklere kiral bir grup bağlamak gerekir. Bu amaç için kullanılan en önemli kiral gruplar; binaftil, bifenantril, tartarik asit türevleri, aromatik bisiklo türevleri, tetrahidroindenoin v.b. dir.



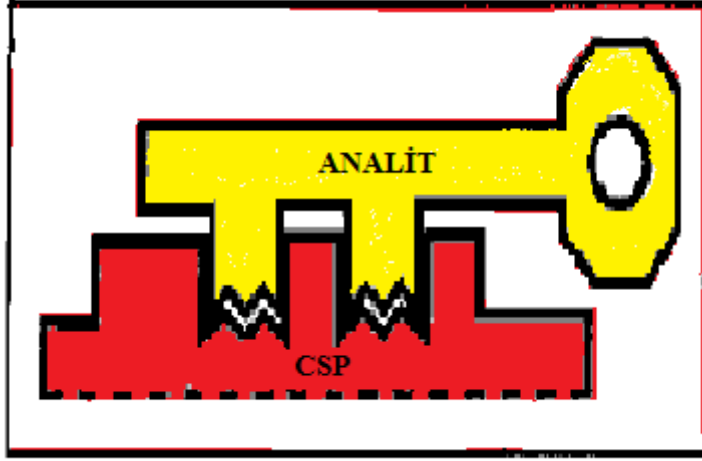
Şekil 1.19: CROWNPAK® CR(+) ticari ismiyle satılan Kiral Crown eter temelli CSP'nin yapısı

1.5. Kiral Tanıma Mekanizması

Ligand değiştiriciler hariç, bütün kiral selektörlerde kiral tanıma mekanizması oldukça benzerdir. Bütün kiral selektörler enantiyomerler için kiral bir yüzey içerirler. Enantiyomerler bu kiral yüzeylere farklı bağ enerjisi ile bağlanarak geçici kompleksler oluştururlar. Enantiyomerlerin farklı stereokonfügrasyonları, kiral selektör yüzeyine farklı bağ enerjileriyle tutunmanın temel nedenidir. Geçici kompleksler bir seri etkileşim ile dengededir. Bu etkileşimler; hidrojen bağı, π - π etkileşimleri, dipol-indüklenmiş dipol etkileşimi, iyonik etkileşimler ve sterik etkileşimlerdir. Ayrıca van der Waals ve yük değişim etkileşimleri gibi zayıf kuvvetler de kiral tanıma mekanizmasında temel rol oynar. Ligand değişim selektörlerinde kiral tanıma mekanizması diğer selektörlerden farklıdır. Bu selektörlerde

bulunan metal iyonlarıyla enantiyomerler yer değiştirerek kiral ayırma sağlanır.

Kiral selektör yüzeyinde kiral tanıma mekanizması anahtar-kilit modeline göredir. Enantiyomerlerden biri kiral selektör yüzeyine uygun bir şekilde tutunurken; diğer enantiyomer tam olarak tutunmaz ve böylece enantiyomerik rezolüsyon gerçekleşmiş olur.



Şekil 1.20: Analit ile CSP arasındaki etkileşimin anahtar-kilit modeliyle şekilsel gösterimi

1.6. Kromatografik Parametreler

HPLC spektrumlarında aranan en önemli özellik “iki pik arasında minimum zamanda optimum rezolüsyon” elde etmektir. İki pik arasında hesaplanan rezolüsyon değeri 1,5’e eşit ve büyük ise numunedeki bileşenler iyi bir baseline ayırımı vermiş demektir. Rezolüsyon değeri(R_s) aşağıdaki denklemle hesaplanmaktadır.

$$R_s = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B}$$

$(t_R)_A$ = Kromatogramda ilk gelen pike ait alıkonma süresi

$(t_R)_B$ = Kromatogramda ikinci gelen pike ait alıkonma süresi

W_A = Kromatogramda ilk gelen pike ait genişlik

W_B = Kromatogramda ikici gelen pike ait genişlik

HPLC spektrumlarında hesaplanan bir diğer parametre ayrılma faktörü(α)’dür. Ayrılma faktörü(α) numunedeki bileşenlerin baseline olarak ayrılıp ayrılmadığını ifade eden bir

1.GİRİŞ

parametredir. Yüksek α değeri iki pik arasında iyi bir ayırım olduğunun göstergesidir. Ayrılma faktörü(α) aşağıdaki denklem ile hesaplanmaktadır.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0}$$

t_0 = Kromatogramda CSP tarafından tutulmayan bileşene ait alıkonma süresi

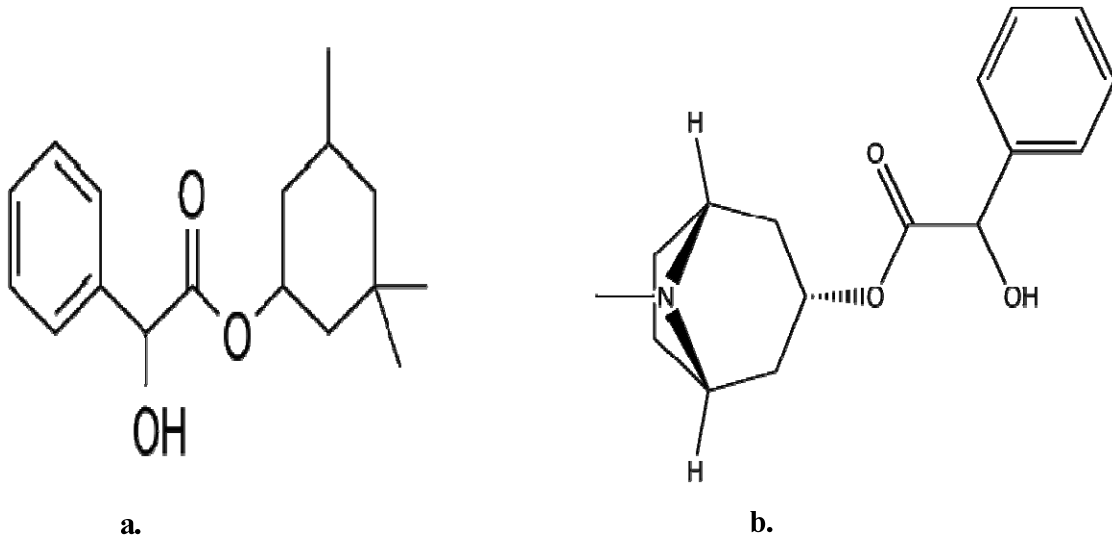
t_{R1} = Kromatogramda ilk gelen pike ait alıkonma süresi

t_{R2} = Kromatogramda ikinci gelen pike ait alıkonma süresi

1.6. Mandelik Asit

Mandelik asit bir aromatik α -hidroksi asittir. Beyaz kristal yapıda olan mandelik asit su ve polar organik çözücülerde çözünebilmektedir. Mandelik asit çeşitli ilaçlarda öncül olarak kullanılmakta olup acı bademden ekstrakte edilmektedir. İsmi almanca badem anlamına gelen “mandel” den almaktadır.

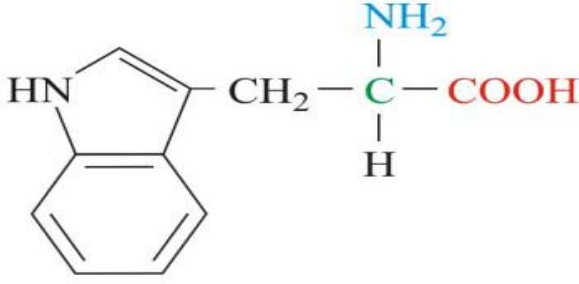
Mandelik asit tıpta antibakteriyel olarak uygulama alanı bulmaktadır. D-Mandelik asit idrar yolu enfeksiyonları, cilt hastalıkları, gül hastalığı tedavisinde ayrıca yetişkinlerde akne sorunlarını gidermede, L-Mandelik asit ise hayvan hastalıkları tedavisinde farmakolojik olarak kullanılmaktadır. Damar sertliğini gidermede kullanılan Cyclandelate ve otonom sinirlerden impuls geçişini durduran homatropine, mandelik asitin esterleri olan ilaçlardır.



Şekil 1.21: Cyclandelate (a) ve Homatropine'nin (b) yapısı

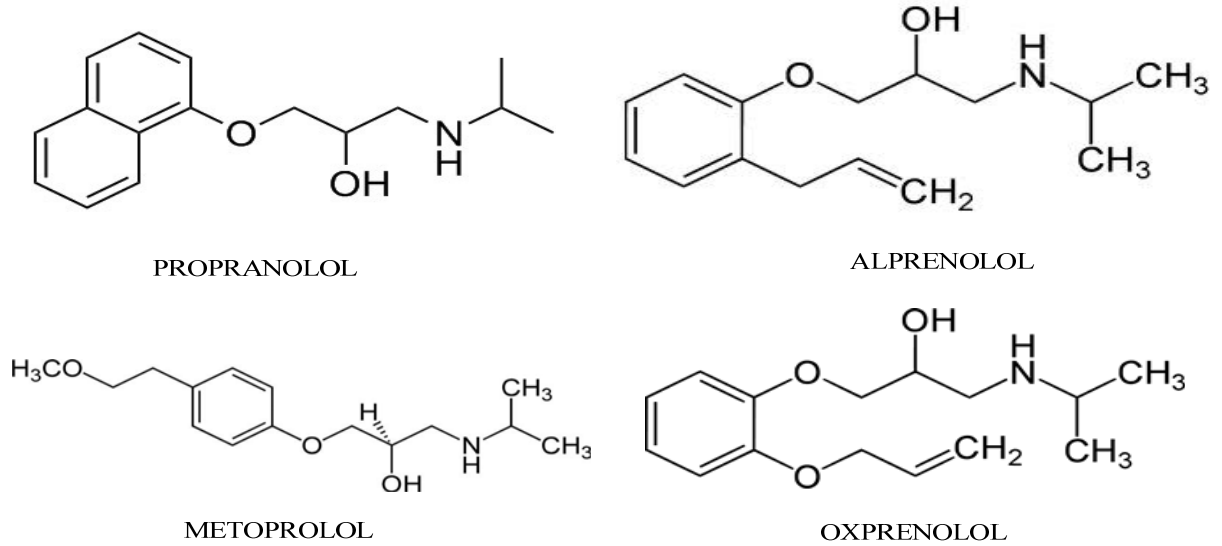
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Stewart ve arkadaşları protein temelli ilk CSP'yi 1973 yılında tasarladılar. Bovine serum albumini, etilendiamin-süksinik asit arakolu yardımıyla safaroz'a kenetleyerek hazırladıkları CSP üzerinden rasemik triptofan'ı enantiyomerlerine ayırmayı başardılar (Stewart ve ark. 1973).



Şekil 2.1. Stewart ve arkadaşlarının kendi sentezledikleri BSA temelli CSP üzerinden enantiyomerik olarak ayırdıkları triptofanın yapısı

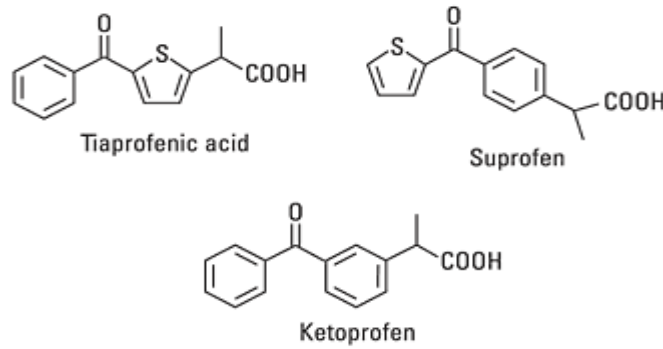
Hermansson α -1-asit glikoprotein ile hazırladığı CSP üzerinden propranolol, alprenolol, metoprolol, oxprenolol, pindolol gibi aminoalkol türevi olan β -blokerleri (Şekil 2.2), aminleri ve mandelik asitin metil ve etil esterlerini enantiyomerlerine ayırdı (Hermansson. 1985).



Şekil 2.2. Hermansson tarafından hazırlanan α -1-asit glikoprotein temelli CSP ile enantiyomerik olarak ayrılan β -blokerlerin yapıları

2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Haginaka ve arkadaşları avidin proteinini N,N' -disüksinimidil karbonat, N,N' -disüksinimidil suberat ve 1,1'-karbonildiimidazol arakolları üzerinden 180 A° ve 300 A° parçacık boyutlarına sahip silika üzerine immobilize ederek yeni CSP'ler hazırladılar ve hazırladıkları bu CSP'ler üzerinden 2-arilpropiyonik asit türevlerini enantiyomerik olarak ayırdılar. 180 A° parçacık boyutuna sahip CSP'lerin 300 A° parçacık boyutuna sahip CSP'lerden daha iyi kiral ayırma kapasitesine sahip olduğunu belirttiler (Haginaka ve ark. 1993).



Şekil 2.3. Haginaka ve arkadaşlarının kendi sentezledikleri Avidin temelli CSP üzerinden enantiyomerik olarak ayırdıkları 2-arilpropiyonik asit türevlerinin yapıları

Aboul-Enein ve arkadaşları ovomucoid protein temelli kiral kolon ile farklı çözücü sistemlerini deneyerek rasemik tiroksini enantiyomerlerine ayırmayı başarmışlardır. Maksimum verimi $20\text{ mM KH}_2\text{PO}_4/\text{CH}_3\text{CN}/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}(100:15:5)$ çözücü sistemi $1,2\text{ mL/dk}$ akış hızı'nda sağlamışlardır (Aboul-Enein ve ark. 1995).

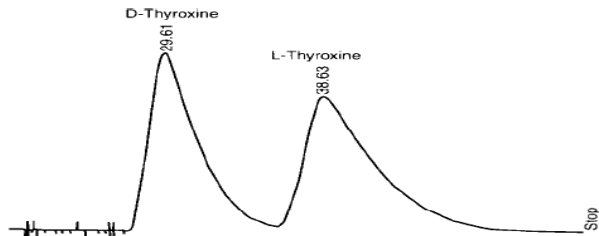
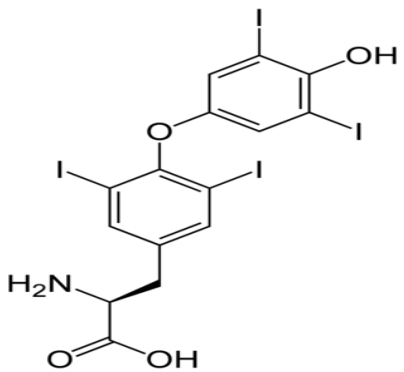
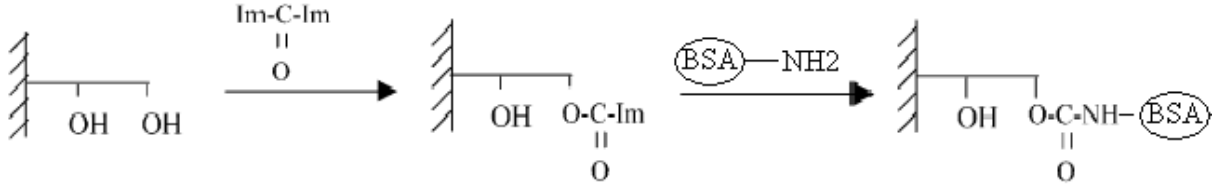


Fig. 2. Chromatogram of D,L-thyroxine authentic sample, 20 nmol. Column: ovomucoid (150 mm \times 4.6 mm I.D., particle size 5 μm); mobile phase, 20 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{CH}_3\text{CN}/\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}(100:15:5)$; flow rate, 1.2 ml/min; chart speed, 0.5 cm/min; $T = 23^\circ\text{C}$; UV 220 nm detection; 0.01 aufs.

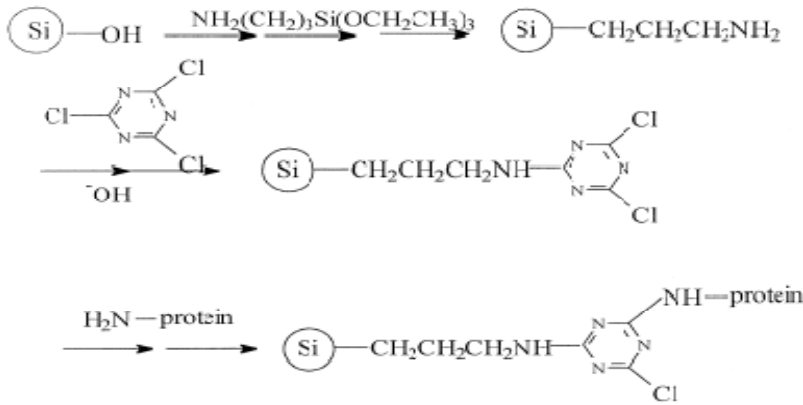
Şekil 2.4. Aboul-Enein ve arkadaşlarının Ovomucoid temelli CSP üzerinden enantiyomerik olarak ayırdıkları tiroksin hormonunun yapısı ve enantiyomerik ayırmayı gösteren HPLC kromatogramı

Harada ve arkadaşları bovine serum albumini üç farklı yoldan silika üzerine kovalent bağla bağlayarak hazırladıkları CSP'yi 150X4 mm ebatlarındaki çelik kolona doldurdular. Hazırladıkları bu CSP'ler üzerinden N-süstitüe aminoasitleri enantiyomerik olarak ayırdılar (Harada ve ark. 1996).



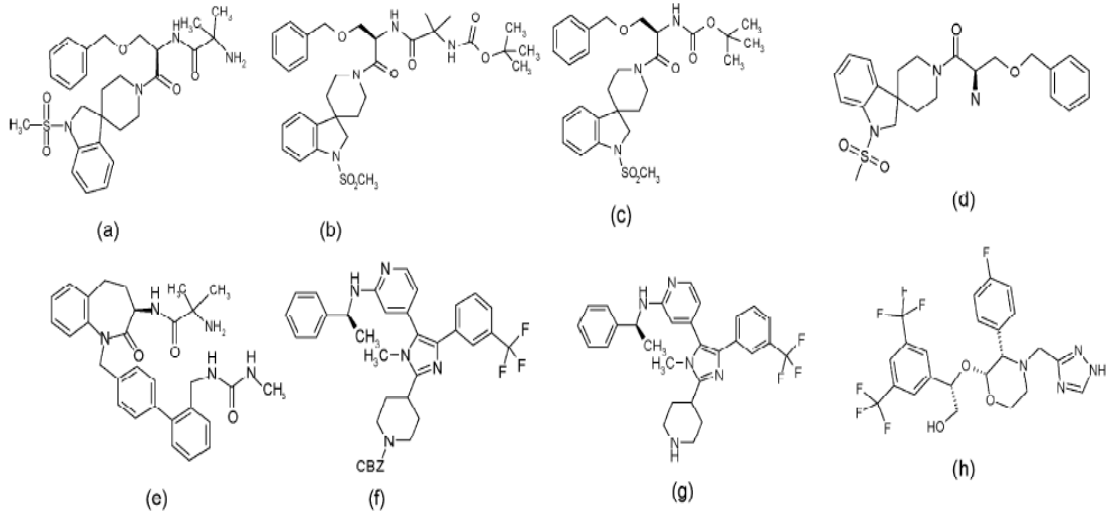
Şekil 2.5. Harada ve arkadaşları tarafından diol arakolu üzerinden sentezlenen BSA temelli CSP'nin sentez basamakları

Zhang ve arkadaşları, 2,4,6-trikloro-1,3,5-triazin üzerinden protein temelli yeni bir kiral sabit faz tasarladılar. Bovine serum albumin kullanarak hazırladıkları CSP'yi 150X4,6 mm ebatlarındaki HPLC kolona doldurarak, hem rac-triptofanı enantiyomerik olarak hem de 13 farklı kiral bileşiği moleküler olarak ayırmayı başardılar (Zhang ve ark. 2000).



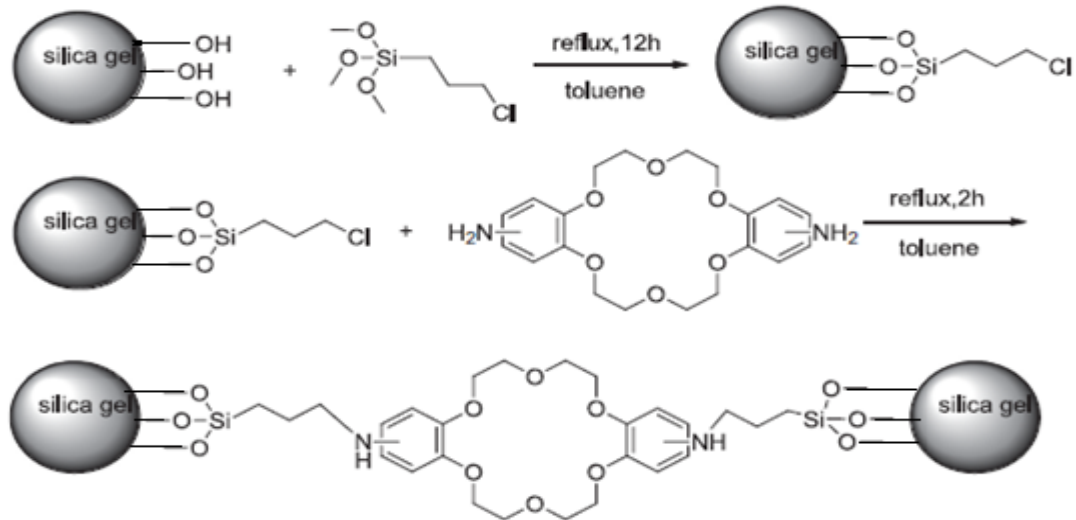
Şekil 2.6. Zhang tarafından triazin arakolu üzerinden sentezlenen BSA temelli CSP'nin sentez basamakları

Zhou Lili ve arkadaşları α_1 - Asit Glikoprotein ve ovomucoid proteinleriyle iki farklı CSP hazırlayarak 27 farklı farmasötik bileşiği enantiyomerik olarak ayırmaya çalıştılar. Kiral ayırmayı sağlayabilmek için; yürütücü faz, pH, sıcaklık gibi parametreleri değiştirerek optimum şartları belirlediler. Yaptıkları bu çalışma sonucunda ovomucoid temelli CSP'nin, α_1 - Asit Glikoprotein temelli CSP'den daha etkin rezolüsyon kapasitesine sahip olduğunu belirlediler (Zhou Lili ve ark. 2008).



Şekil 2.7. Zhou Lili ve grubunun α_1 - Asit Glikoprotein ve ovomucoid ile hazırladıkları CSP'ler üzerinden enantiyomerik olarak ayırmaya çalıştıkları farmasötik ilişkili bazı bileşiklerin yapıları

Qin Wei ve arkadaşları Dibenzo-18-Crown-6-eter'i kloropropil fonksiyonlu silikaya kenetleyerek yeni bir CSP hazırladılar. Bu CSP'nin yapısını FT-IR, TGA ve elementel analiz ile aydınlatıldılar (Qin Wei ve ark. 2013).



Şekil 2.8. Qin Wei ve arkadaşlarının kloropropilsilika üzerinden Crown eter bağlayarak hazırladıkları CSP'nin sentez basamakları

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kullanılan Kimyasallar

DL-Mandelik asit(Aldrich), DL-Metilmandelat(Sigma-Aldrich), rac-epinefrin(Sigma-Aldrich), DL-Treonin(Sigma-Aldrich), rac-propranololhidroklorür(Sigma-Aldrich), rac-3-hidroksibütirikasit(Sigma-Aldrich), rac- α -feniletilamin(Sigma-Aldrich), hidroklorik asit(Sigma-Aldrich), sülfürik asit(Sigma-Aldrich), sodyum hidroksit(Merck), asetik asit(Sigma-Aldrich), sodyumhidrojenfosfat(Merck), sodyumdihidrojenfosfat(Merck), sodyum bikarbonat(Merck), sodyum sülfat(Fluka), 3-kloropropilsilika jel(Aldrich), (S)-(α)-Etilbenzilamin(Fluka), sodyum nitrit(Merck), glutaraldehit(Sigma-Aldrich), etilendiamin(Fluka), bovin serum albumin(Merck), Benzen(Aldrich), Etanol(Sigma-Aldrich), Diklorometan(Sigma-Aldrich), Toluen(Sigma-Aldrich), Kloroform(Sigma-Aldrich),

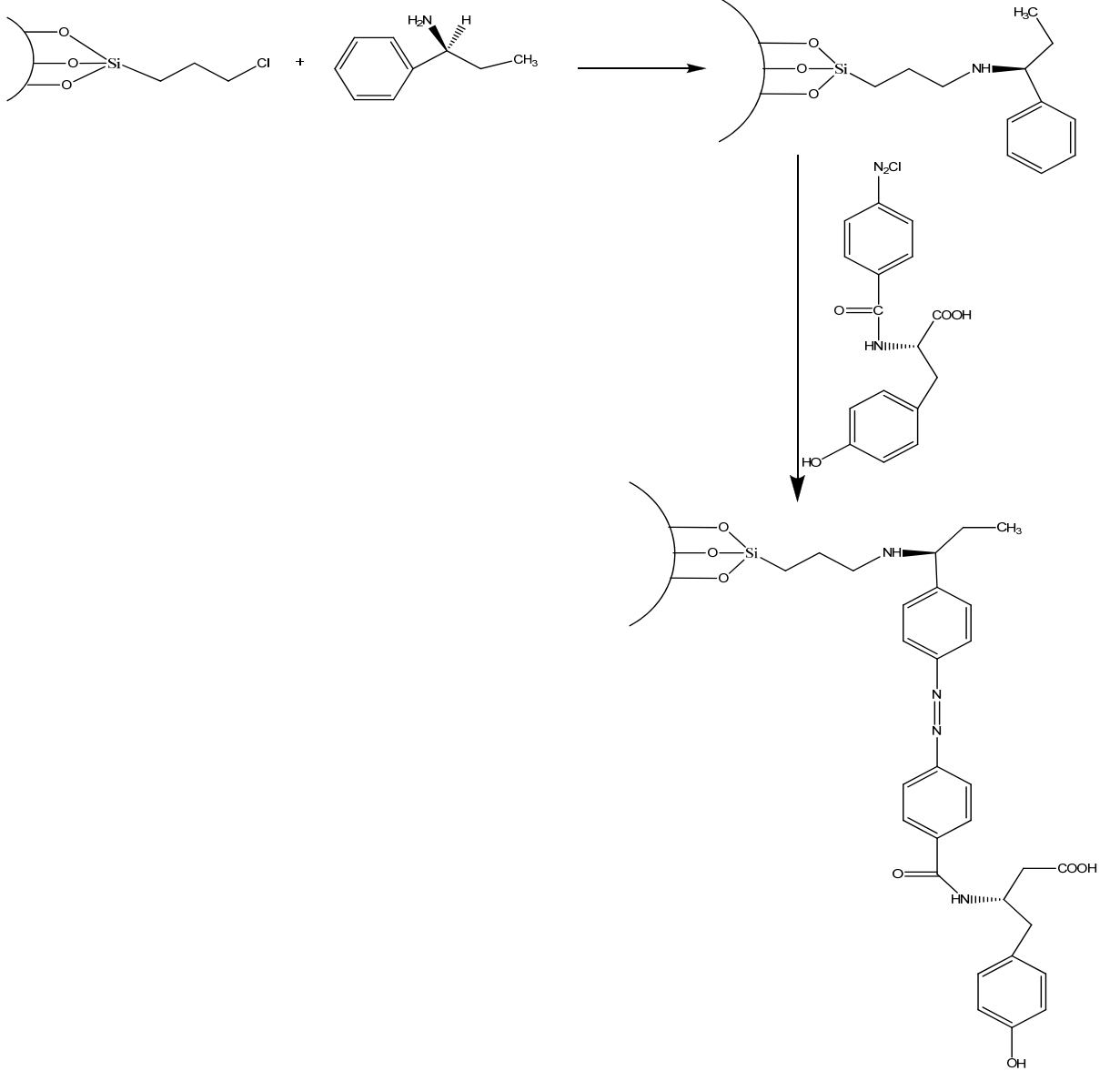
3.2. Kullanılan Cihazlar

1. FT-IR (Perkin Elmer Precisely Spectrum One), Dicle Üniversitesi Eğitim Fak. Kimya Bölümü
2. UV-Vis (Shimadzu UV-1700 Spectrophotometer), Dicle Üniversitesi Eğitim Fak. Kimya Eğitimi Bölümü
3. ¹H-NMR Spektrometresi (Bruker AV-400) Dicle Üniversitesi Fen Fak. Kimya Bölümü.
4. Elementel analiz (Costech instruments), Dicle Üniversitesi Merkez Laboratuvarı
5. Erime noktası tayin cihazı (Barnstead Electrothermal 9100), Dicle Üniversitesi Eğitim Fak. Kimya Eğitimi Bölümü.
6. Etüv (Protherm), Dicle Üniversitesi Eğitim Fak. Kimya Eğitimi Bölümü
7. pH Metre (Hanna Instrument HI 221 Calibration Check Microprocessor), Dicle Üniversitesi Eğitim Fak. Kimya Eğitimi Bölümü
8. Ultra Deiyonize Saf Su Cihazı (Sartorius Arium Comfort), Dicle Üniversitesi Eğitim Fak. Kimya Eğitimi Bölümü
9. HPLC Cihazı (Agilent Technologies 1260 Infinity Series), Dicle Üniversitesi Eğitim Fak. Kimya Eğitimi Bölümü
10. Evaporatör(Heidolph Laborato 4001 Efficient), Dicle Üniversitesi Eğitim Fak. Kimya Eğitimi Bölümü
11. Polarimetre(ATAGO-AP300), Dicle Üniversitesi Eğitim Fak. Kimya Eğitimi Bölümü
12. Magnetik Karıştırıcı(IKA C-Mag HS-7), Dicle Üniversitesi Eğitim Fak. Kimya Eğitimi Bölümü
13. Su Banyosu(Memmert), Dicle Üniversitesi Eğitim Fak. Kimya Eğitimi Bölümü
14. Sirkülatör(PolyScience), Dicle Üniversitesi Eğitim Fak. Kimya Eğitimi Bölümü
15. Taramalı Elektron Mikroskobu-SEM(QUANTA 250 FEG), Dicle Üniversitesi Merkez Laboratuvarı

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Kiral Sabit Fazlar'ın Hazırlanması

4.1.1. Pirkle Tip Kiral Sabit Fazın Hazırlanması



Şekil 4.1. Pirkle-Tip Kiral Sabit Fazın Sentez Aşamaları ve Yapısı(CSP-II)

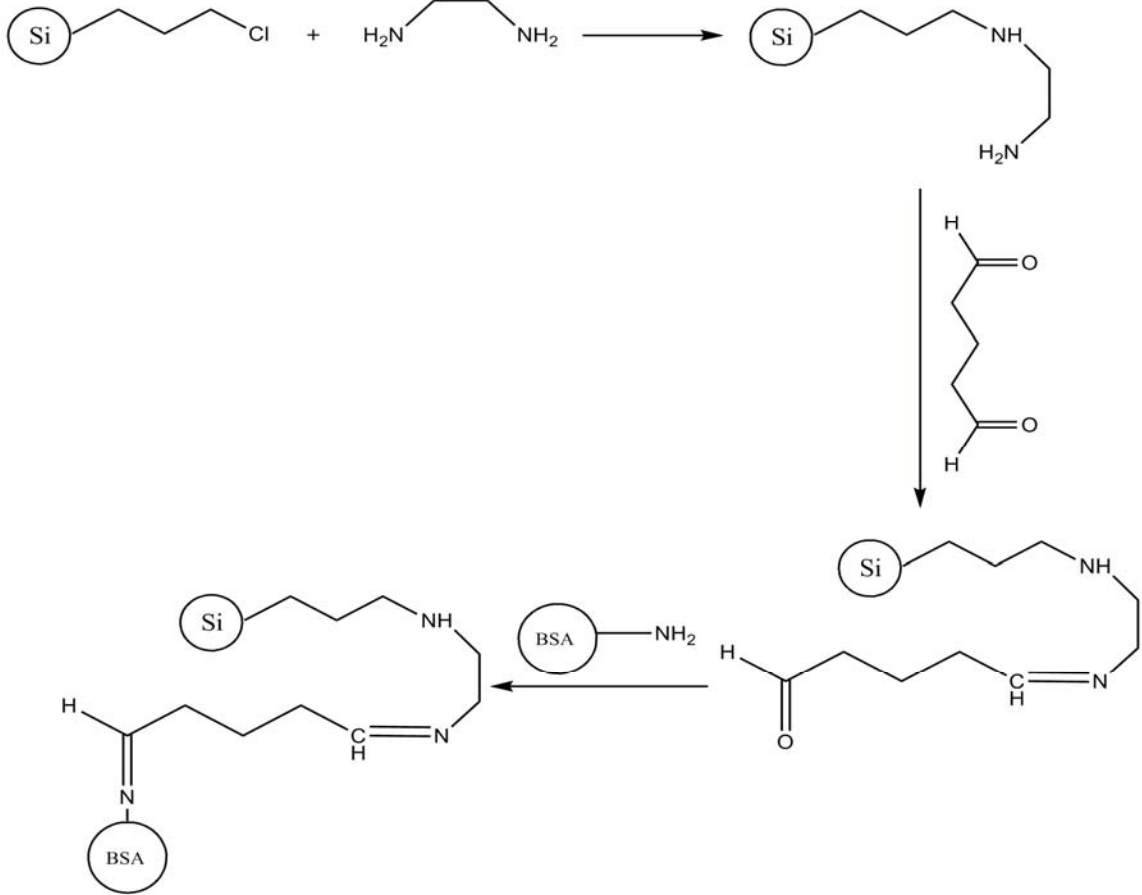
İlk aşamada; 4 gr 3-Kloropropilsilika jel (CPSG)'nin 60 mL toluen içindeki süspansiyonu hazırlandı. Sonra bu karışıma 3,2 mL (S)-(α)-Etilbenzilamin ilave edildi. Karışım 4 gün boyunca karıştırılarak reflux edildi. Toluene uçuruldu. (Verim: 5,25g)

İkinci aşamada (S)-(α)-Etilbenzilamin bağlı silika jele, N-p-aminobenzoil-L-tirozin diazolanarak kenetlendirildi. Bu işlem için 100 mL' lik bir beherde 0,5 g N-p-aminobenzoil-L-tirozin 1M 30 mL HCl' de çözüldü. 0 °C' deki su-buz banyosundaki bu çözeltinin üzerine

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

yine 0 °C’ deki su-buz banyosunda soğutulmuş 1 g NaNO₂ (5 mL suda çözülmüş) yavaş yavaş ilave edildi. Daha sonra bu karışım, 25 mL 0 °C suda süspansiyon haline getirilen 5,25g S)-(α)-Etilbenzilamin bağlanmış silikajele magnetik karıştırıcı üzerinde ilave edildi. Karışım 1 saat karıştırıldıktan sonra süzüldü. Elde edilen katı, 1 gün boyunca soxhlet ekstraksiyonunda kloroform ile ekstrakte edilerek, reaksiyona girmemiş aromatik amin ortamdan uzaklaştırıldı. Hazırlanan bu CSP ile çizelge 4.1’ de verilen rasemik bileşiklerin enantiyomerik rezolüsyonu sağlanamadığından, elde edilen kromatogramlar teze eklenmemiştir.

4.1.2 Bovin Serum Albumin (BSA) Temelli Kiral Sabit Fazın Hazırlanması



Şekil 4.2. Bovin Serum Albumin (BSA) Temelli Kiral Sabit Fazın Hazırlanışına Ait Tepkime Basamakları(CSP-I)

Bu CSP'nin hazırlanması 3 aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada, 8 g CPSG alınarak 100 mL toluende süspansiyon haline getirildi. Bu karışıma 12g (13,35 mL) etilen diamin ilave edilerek karışım 4 gün boyunca reflux edildi. Çözücü ve etilen diaminin fazlası evapore edildikten sonra elde edilen katı %5'lik NaOH çözeltisi ile yıkandı. Verim: 9,8 g. Elementel analiz: %C 9,91 %N 6,67 %H 2,44

İkinci aşamada etilendiamin bağlanan silika jel glutaraldehit ile etkileştirildi. Bu işlem için, glutaraldehit'in 0,1 M fosfat tamponundaki % 5'lik çözeltisinden 60 mL alınarak 9 g etilendiamin bağlanan silika jel ile 1 saat boyunca 25 °C’ de vakum altında karıştırıldı. Karışım vakum altında süzüldü. Elde edilen katı 0 °C’ deki su ile birkaç kez yıkandı.

Üçüncü aşamada, glutaraldehit bağlanan silika jelde bulunan serbest aldehit grupları ile bovin serum albumin proteinindeki aminoasitlerin serbest amino grupları arasında Schiff bazı reaksiyonu gerçekleştirildi. Bu işlem için, 0,8 g bovin serum albuminin 85mL 100mM Ph=7 fosfat tamponundaki çözeltisi ile 9 g glutaraldehit bağlanmış silika jel 1 gün boyunca 5 °C’ de karıştırıldı. Karışım vakum altında süzüldü. Elde edilen katı sırasıyla 1M NaCl ve ardından soğuk su ile yıkanarak CSP kolona doldurmaya elverişli hale getirildi.

4.2. Hazırlanan CSP'nin HPLC Kolona Doldurulması

Bovine serum albuminin, etilen diamin ve glutaraldehit ara kolu üzerinden silika jel üzerine bağlanmasıyla hazırlanan CSP 10 mL 100mM pH=7 fosfat tamponunda süspansiyon haline getirildi. Mikropipet ile bu süspansiyon 150X4.6 cm ebatlarındaki HPLC kolona dolduruldu. CSP ile paketlenen kolon, yürütücü faz olarak 2 saat boyunca 0.8 mL/dk akış hızında 100mM pH=7’lik fosfat tamponu ile şartlandırıldı.



Şekil 4.3. Kolon doldurma ve enantiyomerik rezolüsyon aşamalarında kullanılan HPLC cihazı

4.3. Enantiyomerik Rezolüsyon Çalışmaları

Çizelge 4.1’de verilen rasemik bileşiklerin heksan-etanol(1:1) karışımında 2mg/mL çözeltileri hazırlanarak viallere dolduruldu. Enantiyomerik rezolüsyon çalışmalarında HPLC şartları:

Enjeksiyon hacmi: 10µL

Kolon sıcaklığı: 25 °C

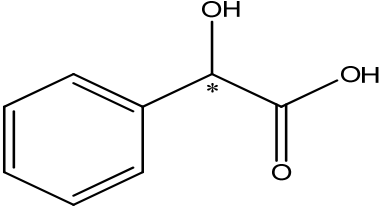
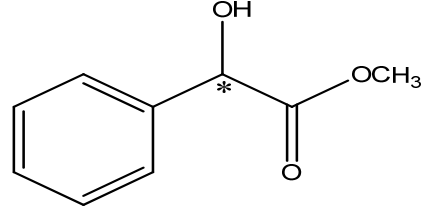
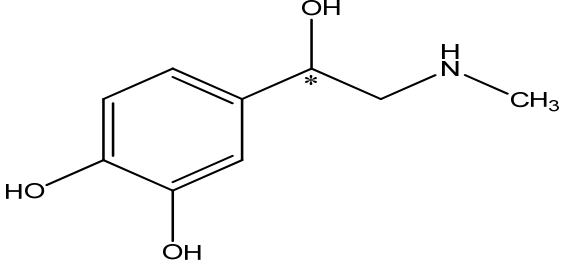
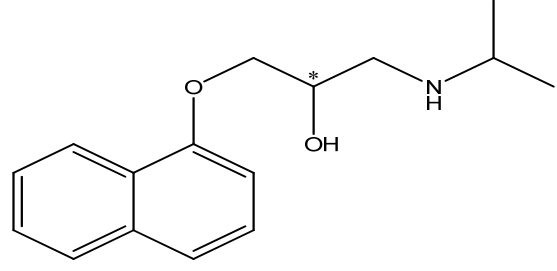
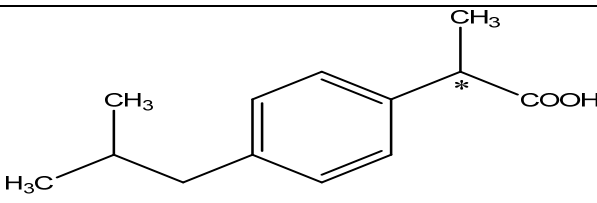
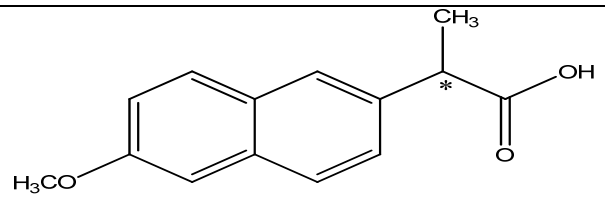
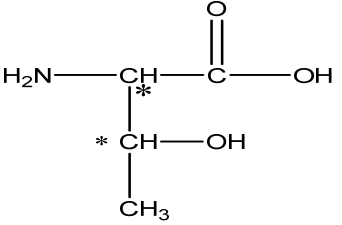
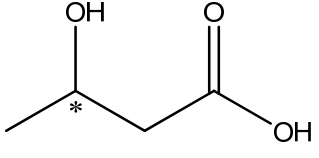
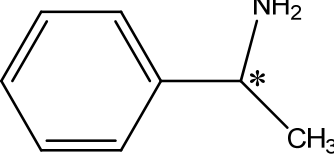
Yürütücü faz: 100mM pH=6, pH=7 ve pH=8 fosfat tamponu

Akış Hızı: 1 mL/dk, 1,5 mL/dk, 2 mL/dk, 2,5 mL/dk, 3 mL/dk, 4 mL/dk, 5 mL/dk.

Dedektör ve tarama yapılan dalga boyu: UV-DAD dedektör-270nm

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.1. Enantiyomerik olarak ayrılmaya çalışılan rasemik bileşiklerin yapı formülleri

 <p>Mandelik asit</p>	 <p>Metilmandelat</p>
 <p>Epinefrin</p>	 <p>Propranolol</p>
 <p>İbuprofen</p>	 <p>Naproxen</p>
 <p>Treonin</p>	 <p>3-Hidroksibütirikasit</p>
 <p>α-feniletilamin</p>	

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

5.1. Sentezlenen CSP'lerin Elementel Analiz Sonuçları

5.1.1. Protein Temelli CSP'nin Elementel Analiz Sonuçları

	Reten. Time [min]	Response	Weight [mg]	Weight [%]	Peak Type	Element Name	Carbon Response Ratio
1	0,873	231,110	0,078	6,67	Ordnr	Nitrogen	0,212
3	1,593	1091,095	0,116	9,91	Ordnr	Carbon	1,000
4	5,110	664,729	0,029	2,44	Ordnr	Hydrogen	0,609
C4	11,877					Sulphur	
	Total		1,173	19,01			

Şekil 5.1. Etilendiamin bağlı silika'nın(aşama-I) elementel analiz sonuçları

	Reten. Time [min]	Response	Weight [mg]	Weight [%]	Peak Type	Element Name	Carbon Response Ratio
1	0,917	509,476	0,166	1,94	Ordnr	Nitrogen	0,057
2	1,490	8896,599	1,236	14,43	Ordnr	Carbon	1,000
3	6,957	4166,304	0,215	2,51	Ordnr	Hydrogen	0,468
C4	12,200					Sulphur	
	Total		8,561	18,88			

Şekil 5.2. Protein Temelli CSP'nin(aşama-III) elementel analiz sonuçları

Aşama-I ve aşama-III'ün elementel analiz sonuçlarını kıyaslayarak, silika üzerine protein bağlandığını kanıtlayabiliriz. Etilendiamin bağlı silikaya, II. aşamada glutaraldehit ve III. aşamada protein bağlanmasıyla %C oranında artış ve %N oranında bir düşüş beklenir. Elementel analiz sonuçlarına bakıldığında; I.Aşamada %C 9,91 iken III.aşamada %C 14,43'e çıkmış ve yine I.aşamada %N 6,67 iken III.aşamada %N 1,94'e düşmüştür. Bu sonuçlar silika üzerine protein bağlandığını desteklemektedir.

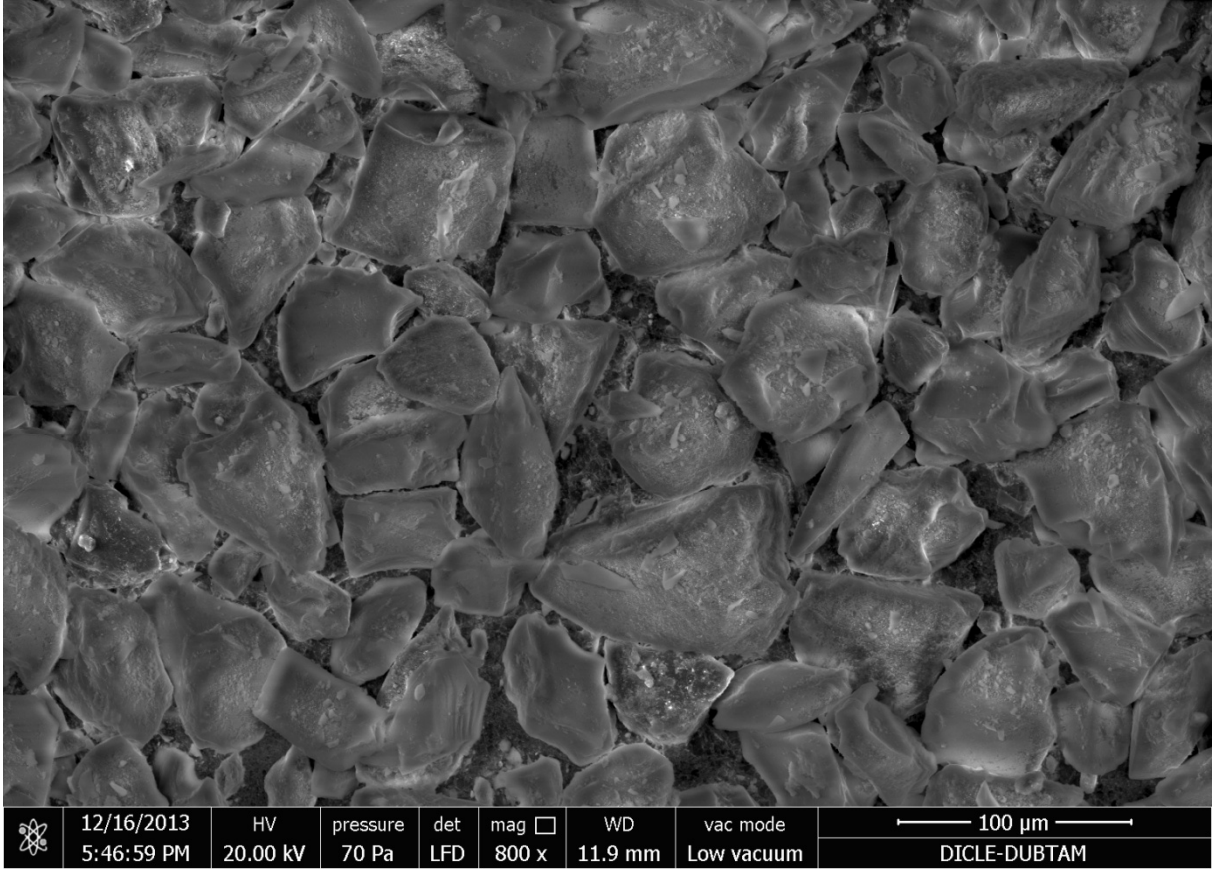
5.1.2. Pirkle-Tip CSP'nin Elementel Analiz Sonuçları

Element	Weight %	Atomic %	Net Int.	Net Int. Error
C K	34.66	45.45	216.4	0.01
N K	3.23	3.63	11.9	0.03
O K	37.86	37.27	520.4	0
AlK	2.2	1.28	191.3	0.01
SiK	22.05	12.36	2106	0

Şekil 5.3. Pirkle-Tip CSP'nin EDAX-elementel analiz sonuçları

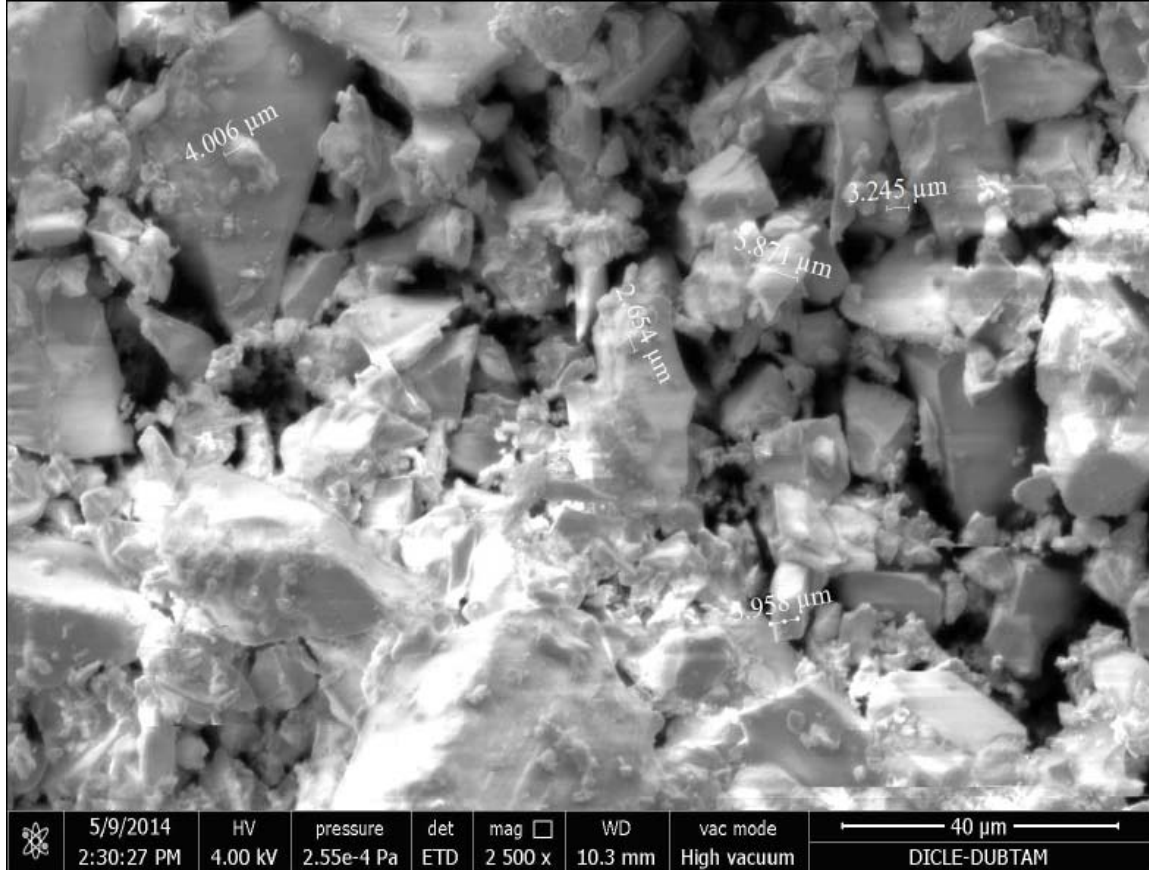
5.2. Sentezlenen CSP'lerin Taramalı Elektron Mikroskop(SEM) Görüntüleri

5.2.1. Pirkle-Tip CSP'nin Taramalı Elektron Mikroskop(SEM) Görüntüleri



Şekil 5.4. Pirkle-Tip CSP'nin taramalı elektron mikroskobu(SEM) ile parçacık boyutu görüntüleri

5.2.2. Protein Temelli CSP'nin Taramalı Elektron Mikroskop(SEM) Görüntüleri

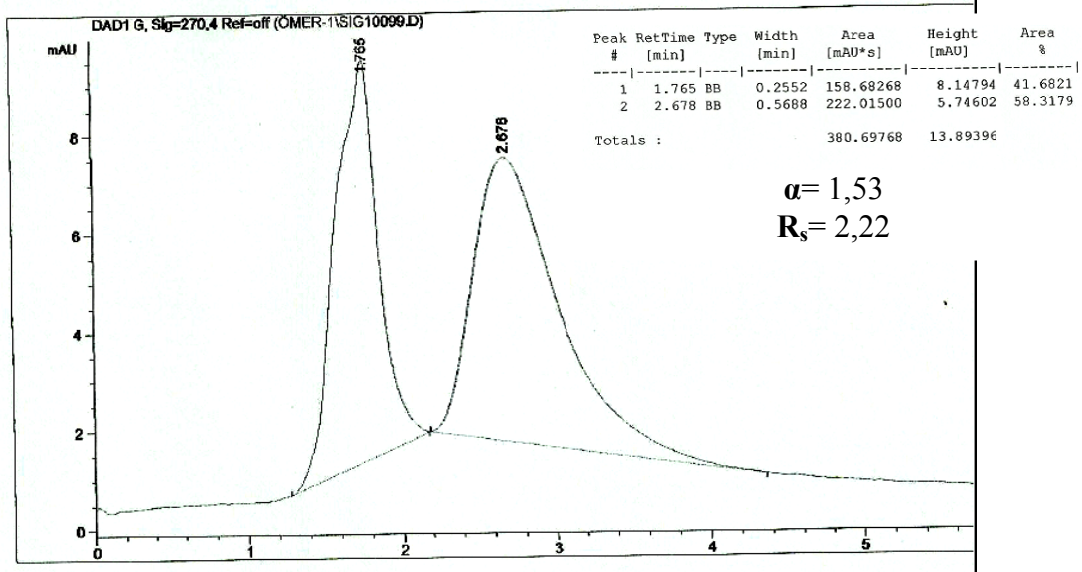


Şekil 5.5. Protein Temelli CSP'nin taramalı elektron mikroskopu(SEM) ile parçacık boyutu görüntüleri

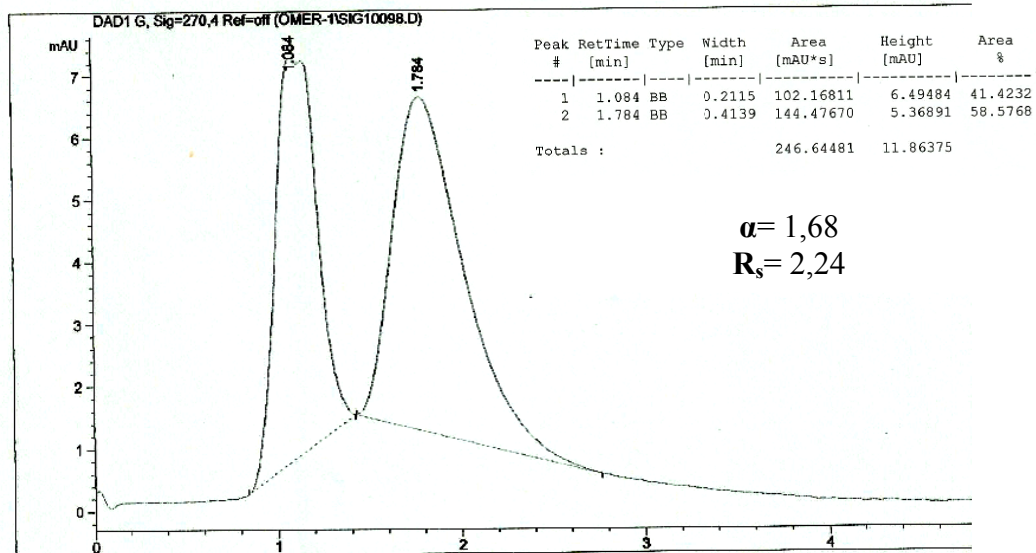
Kiral sabit fazların HPLC kolona paketlenbilmeleri için parçacık boyutunun 5µm olması gerekmektedir (Aboul-Enein ve ark. 2003). Sem görüntüsüne bakıldığında sentezlenen CSP'nin parçacık boyutu HPLC kolona doldurmaya elverişlidir.

5.3. Rasemik Bileşikler İçin Enantiyomerik Rezolüsyon Çalışmalarının Sonuçları

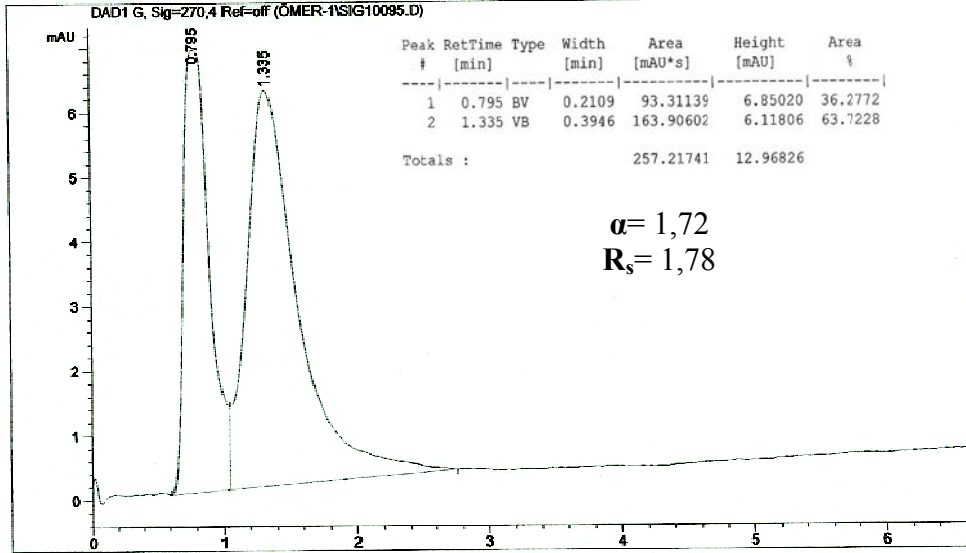
5.3.1. Yürütücü Faz Olarak 100mM pH=6 Fosfat Tamponunda Rezolüsyon Çalışmaları



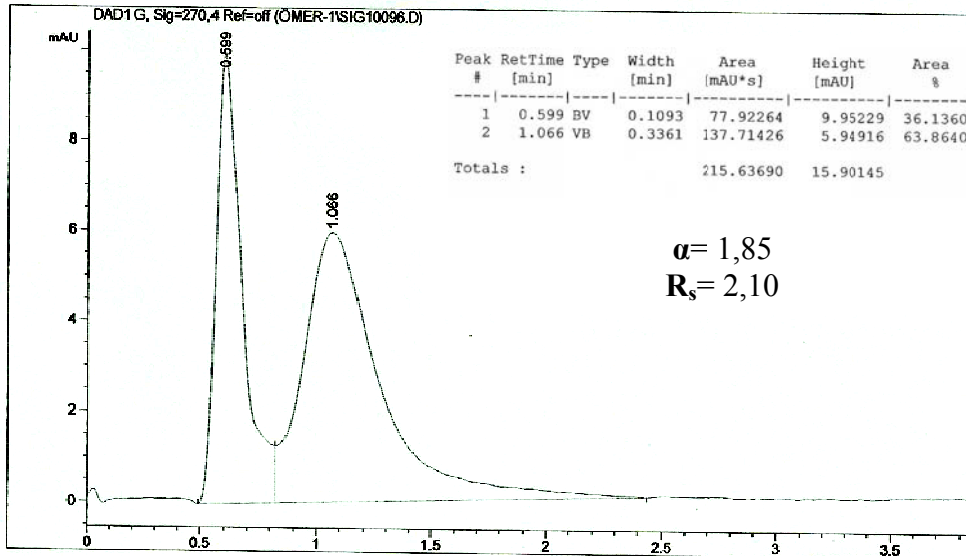
Şekil 5.6. Yürütücü faz olarak pH=6 fosfat tamponu ve 1 ml/dk akış hızında rasemik metilmandelata ait HPLC kromatogramı



Şekil 5.7. Yürütücü faz olarak pH=6 fosfat tamponu ve 1,5 ml/dk akış hızında rasemik metilmandelata ait HPLC kromatogramı

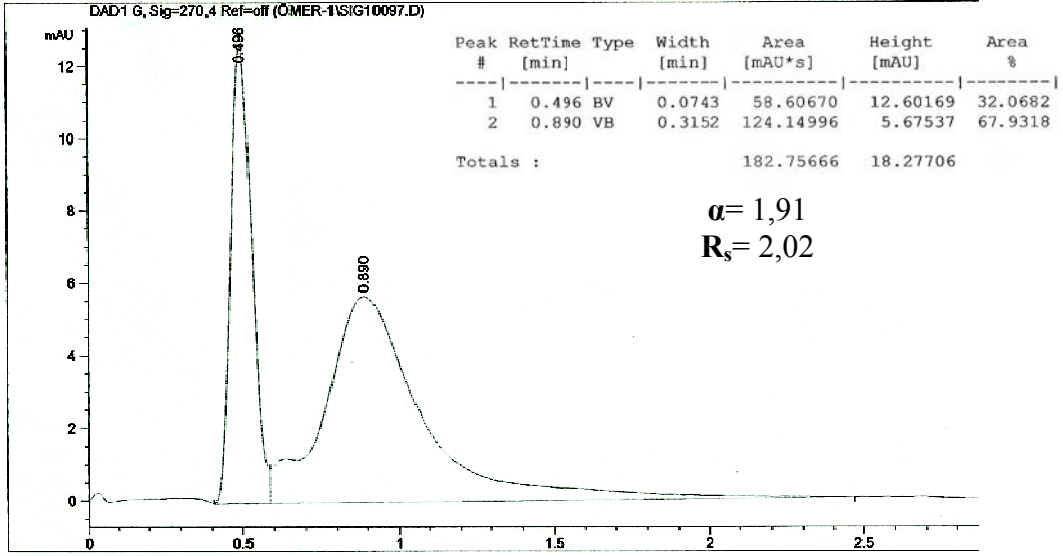


Şekil 5.8. Yürütücü faz olarak pH=6 fosfat tamponu ve 2 ml/dk akış hızında rasemik metilmandelata ait HPLC kromatogramı



Şekil 5.9. Yürütücü faz olarak pH=6 fosfat tamponu ve 2,5 ml/dk akış hızında rasemik metilmandelata ait HPLC kromatogramı

5.TARTIŞMA VE SONUÇ



Şekil 5.10. Yürütücü faz olarak pH=6 fosfat tamponu ve 3 ml/dk akış hızında rasemik metilmandelata ait HPLC kromatogramı

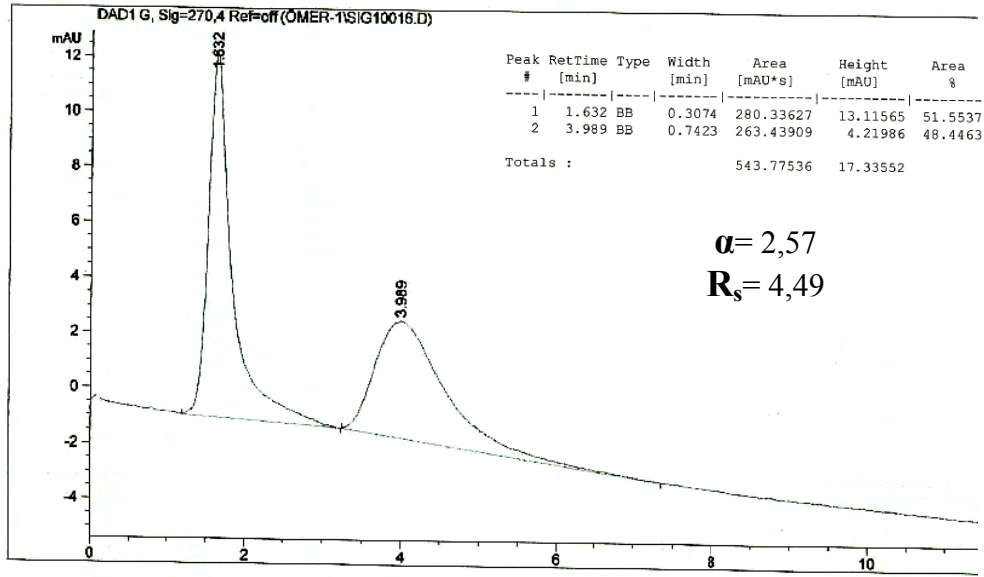
Çizelge 5.1. 100mM pH=6 fosfat tamponunda enantiyomerik olarak ayrılan rasemik bileşiklere ait alıkonma süreleri

				AKIŞ HIZI				
				1 mL/dk	1,5 mL/dk	2 mL/dk	2,5 mL/dk	3 mL/dk
Rasemik Bileşik	rac- metil mandelat	Alıkonma Süreleri (dakika)	t ₀	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
			t ₁	1,765	1,084	0,795	0,599	0,496
			t ₂	2,678	1,784	1,335	1,066	0,890

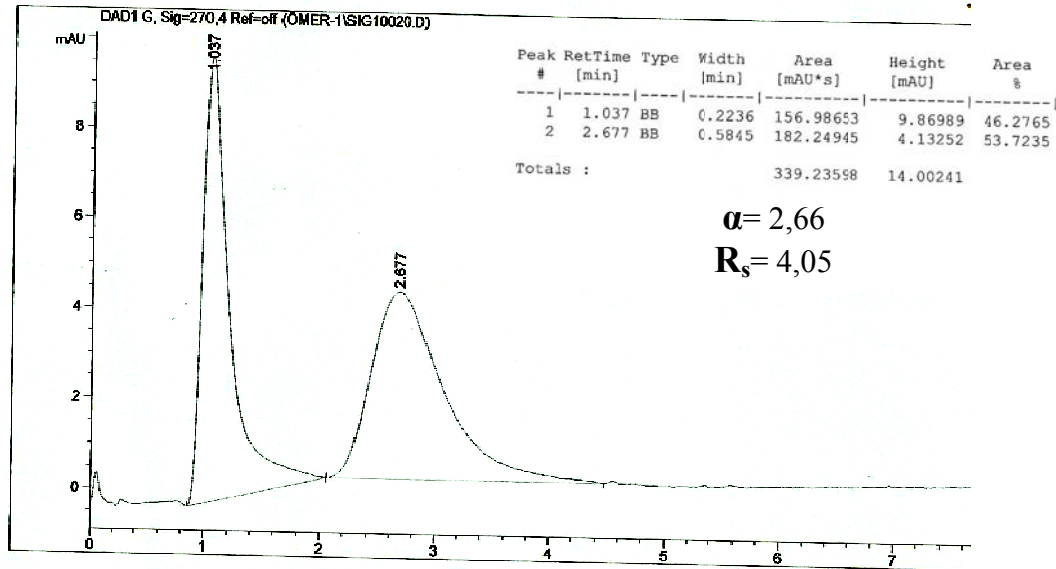
Çizelge 5.2. 100mM pH=6 fosfat tamponunda enantiyomerik olarak ayrılan rasemik bileşiklere ait kromatografik parametreler

				AKIŞ HIZI				
				1 mL/dk	1,5mL/dk	2 mL/dk	2,5mL/dk	3 mL/dk
Rasemik Bileşik	rac- metil mandelat	Kromatografik Parametreler	R _s	2,22	2,24	1,78	2,10	2,02
			α	1,53	1,68	1,72	1,85	1,91

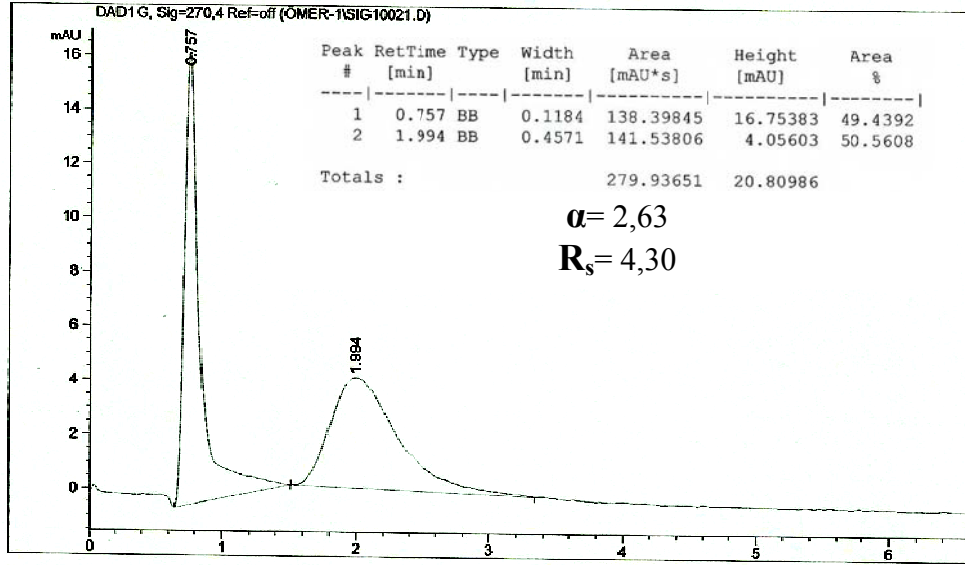
5.3.2. Yürütücü Faz Olarak 100mM pH=7 Fosfat Tamponunda Rezolüsyon Çalışmaları



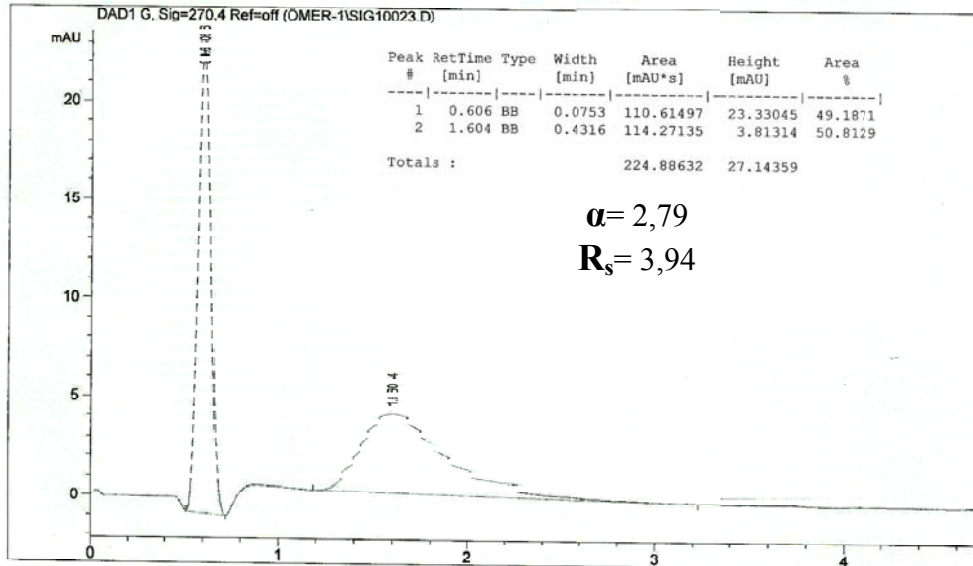
Şekil 5.11. Yürütücü faz olarak pH=7 fosfat tamponu ve 1 ml/dk akış hızında rasemik mandelik asite ait HPLC kromatogramı



Şekil 5.12. Yürütücü faz olarak pH=7 fosfat tamponu ve 1,5 ml/dk akış hızında rasemik mandelik asite ait HPLC kromatogramı

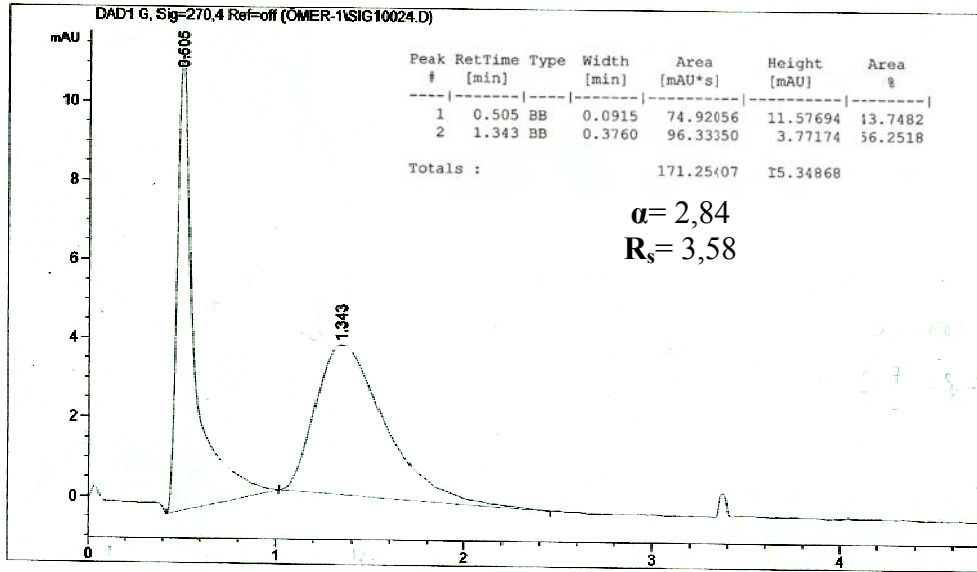


Şekil 5.13. Yürütücü faz olarak pH=7 fosfat tamponu ve 2 ml/dk akış hızında Rasemik mandelik asite ait HPLC kromatogramı

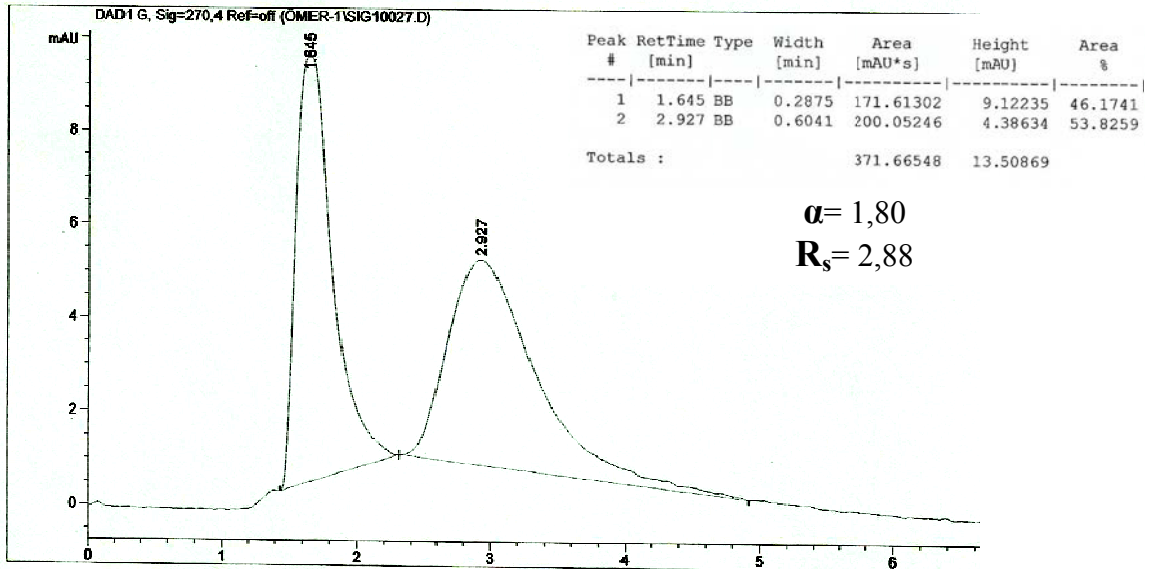


Şekil 5.14. Yürütücü faz olarak pH=7 fosfat tamponu ve 2,5 ml/dk akış hızında Rasemik mandelik asite ait HPLC kromatogramı

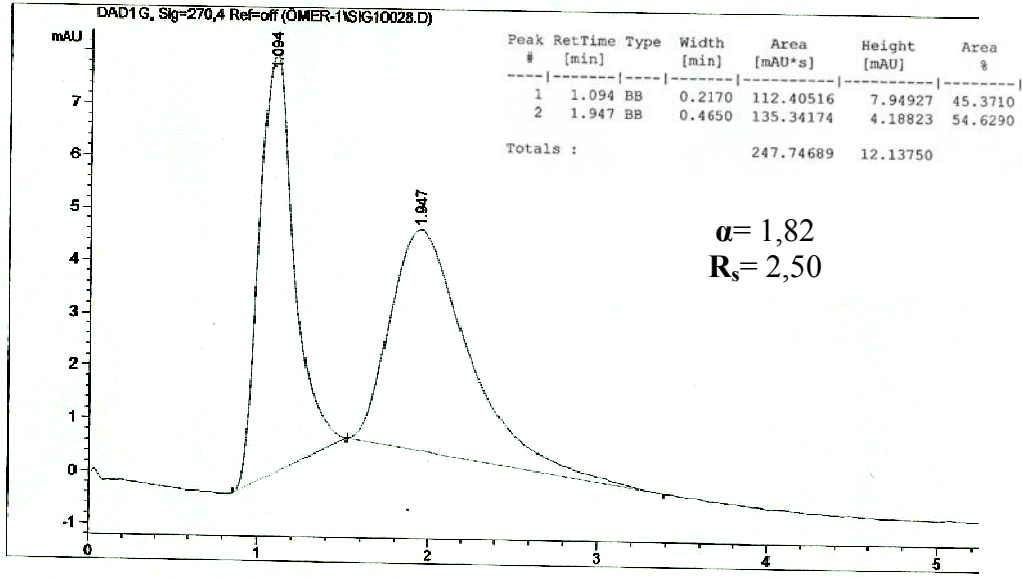
5.TARTIŞMA VE SONUÇ



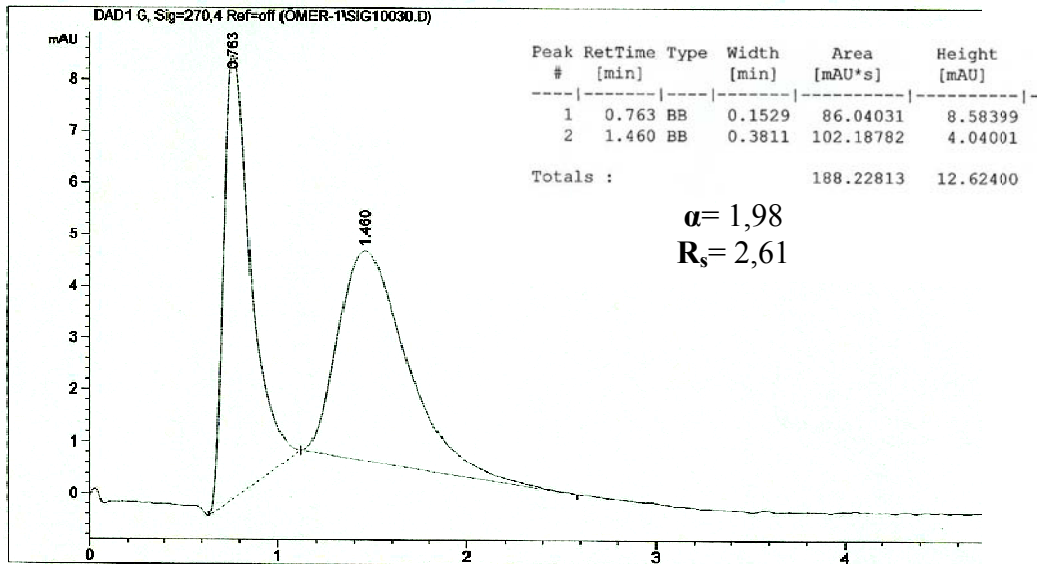
Şekil 5.15. Yürütücü faz olarak pH=7 fosfat tamponu ve 3 ml/dk akış hızında Rasemik mandelik asite ait HPLC kromatogramı



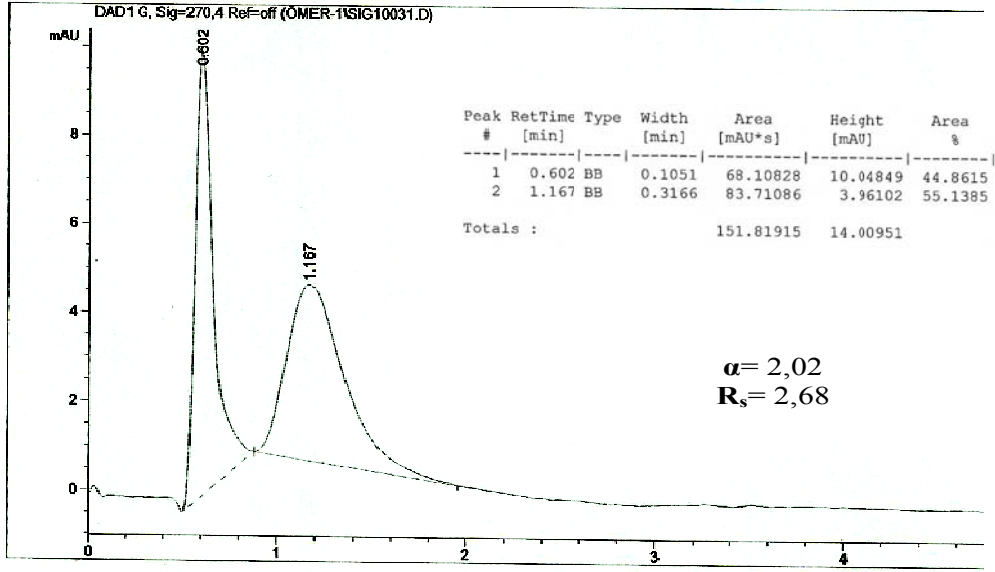
Şekil 5.16. Yürütücü faz olarak pH=7 fosfat tamponu ve 1 ml/dk akış hızında metil mandelat'a ait HPLC kromatogramı



Şekil 5.17. Yürütücü faz olarak pH=7 fosfat tamponu ve 1,5 ml/dk akış hızında metil mandelat'a ait HPLC kromatogramı



Şekil 5.18. Yürütücü faz olarak pH=7 fosfat tamponu ve 2 ml/dk akış hızında metil mandelat'a ait HPLC kromatogramı



Şekil 5.19. Yürütücü faz olarak pH=7 fosfat tamponu ve 2,5 ml/dk akış hızında metil mandelat'a ait HPLC kromatogramı

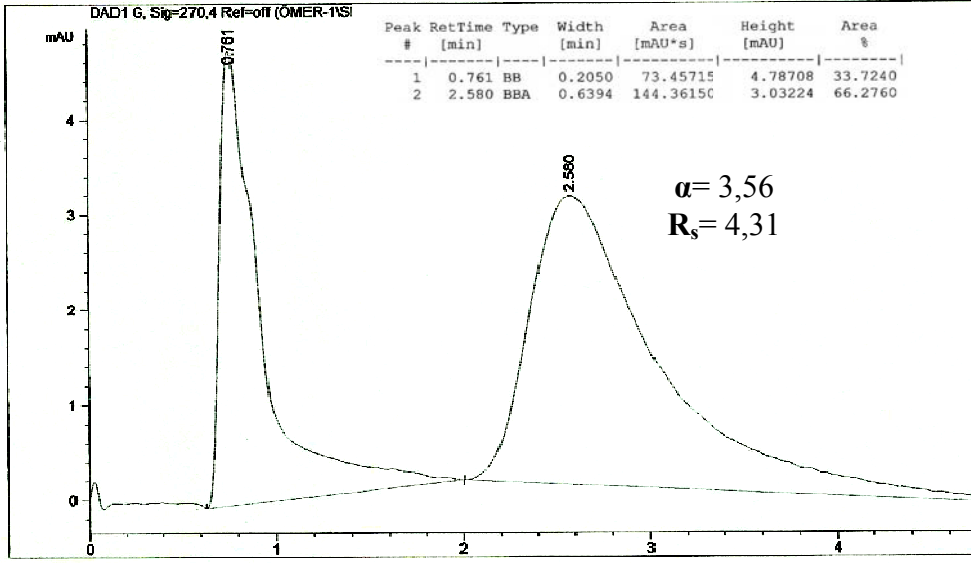
Çizelge 5.3. 100mM pH=7 fosfat tamponunda enantiyomerik olarak ayrılan rasemik bileşiklere ait alıkonma süreleri

			AKIŞ HIZI					
			1 mL/dk	1,5 mL/dk	2 mL/dk	2,5 mL/dk	3 mL/dk	
Rasemik Bileşik	rac-mandelik asit	Alıkonma Süreleri (dakika)	t ₀	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
			t ₁	1,632	1,037	0,757	0,606	0,505
			t ₂	3,989	2,677	1,994	1,604	1,343
	rac- metil mandelat	Alıkonma Süreleri (dakika)	t ₀	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05
			t ₁	1,645	1,094	0,763	0,602	1,495
			t ₂	2,927	1,947	1,460	1,167	0,979

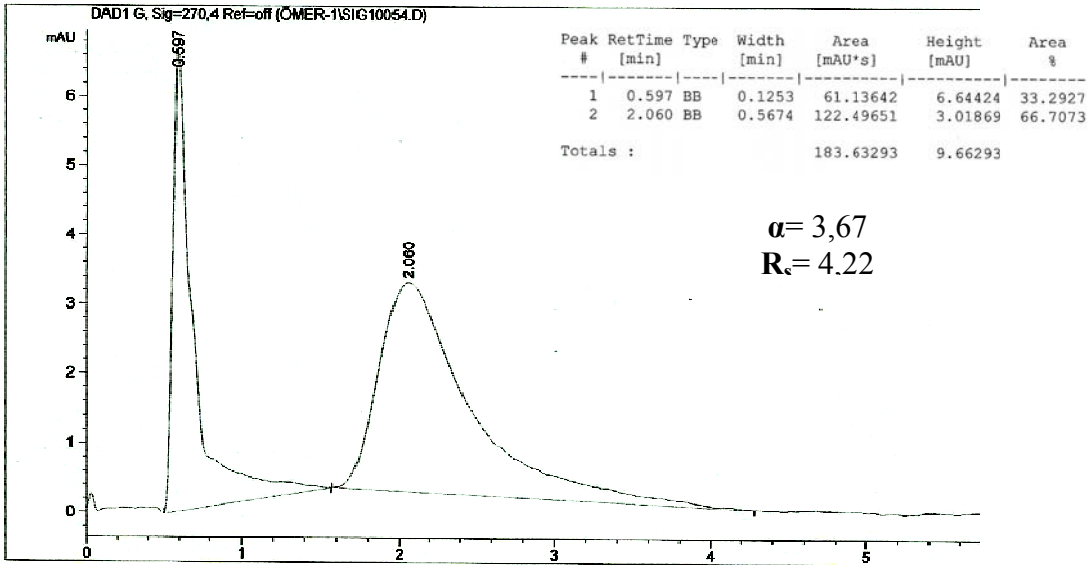
Çizelge 5.4. 100mM pH=7 fosfat tamponunda enantiyomerik olarak ayrılan rasemik bileşiklere ait kromatografik parametreler

			AKIŞ HIZI					
			1 mL/dk	1,5mL/dk	2 mL/dk	2,5mL/dk	3 mL/dk	
Rasemik Bileşik	rac-mandelik asit	Kromatografik Parametreler	R_s	4,49	4,05	4,30	3,94	3,58
			α	2,57	2,66	2,63	2,79	2,84
	rac- metil mandelat	Kromatografik Parametreler	R_s	2,88	2,50	2,61	2,68	-
			α	1,80	1,82	1,98	2,02	-

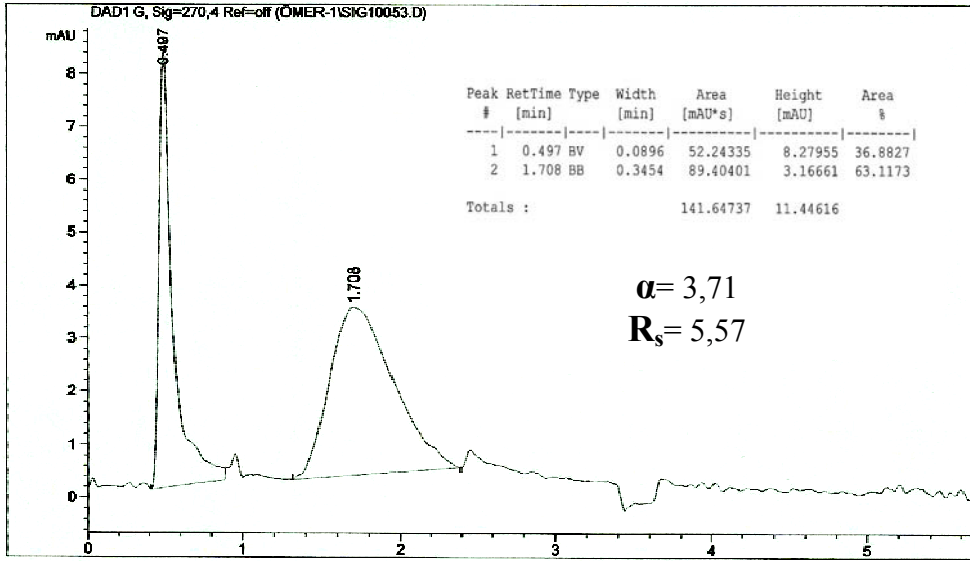
5.3.3. Yürütücü Faz Olarak 100mM pH=8 Fosfat Tamponunda Rezolüsyon Çalışmaları



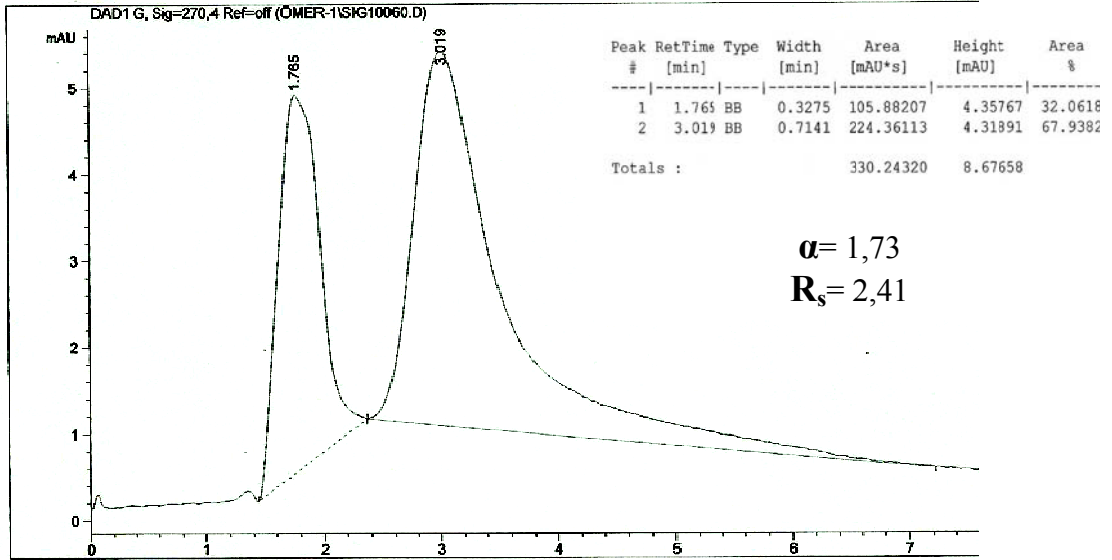
Şekil 5.20. Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 2 ml/dk akış hızında rac-mandelik asit'e ait HPLC kromatogramı



Şekil 5.21. Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 2,5 ml/dk akış hızında rac-mandelik asit'e ait HPLC kromatogramı

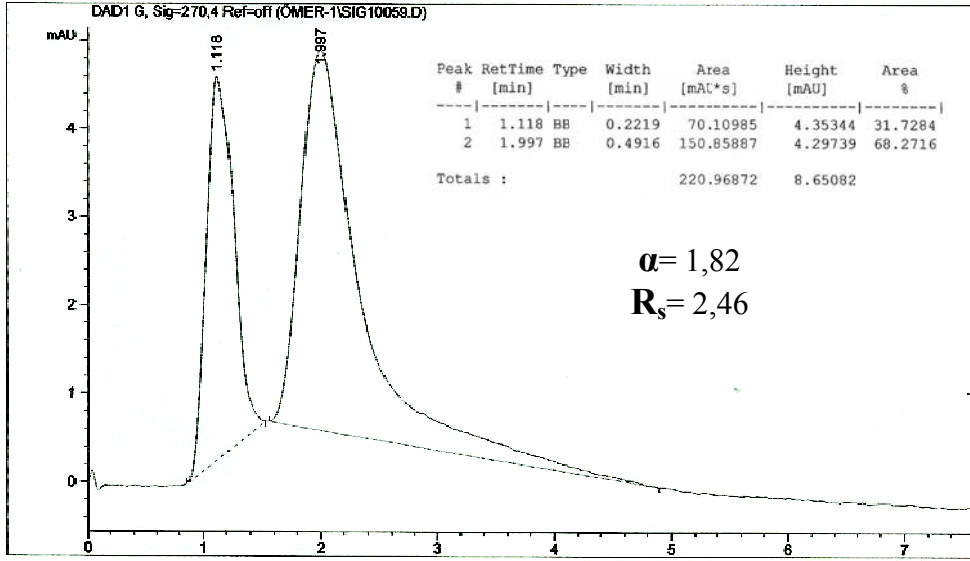


Şekil 5.22. Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 3 ml/dk akış hızında rac-mandelik asit'e ait HPLC kromatogramı

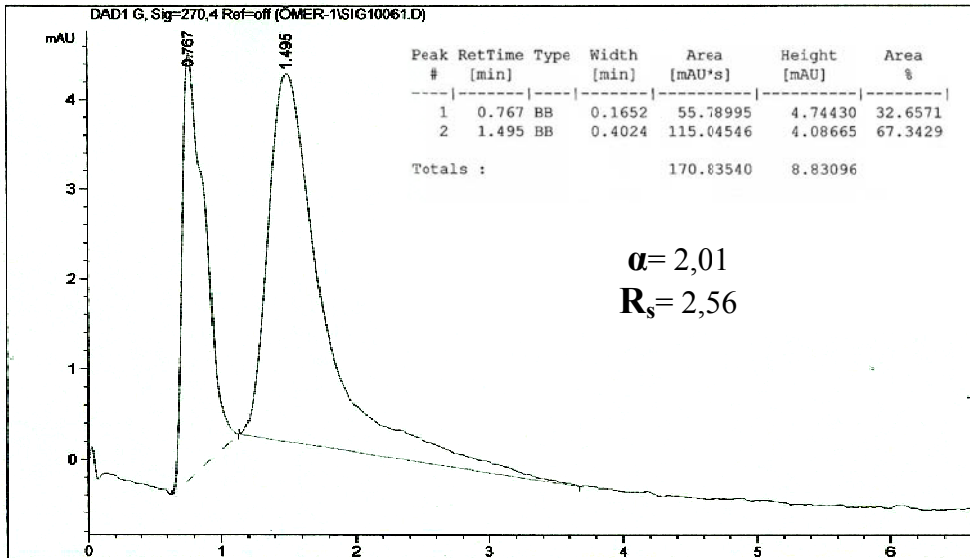


Şekil 5.23. Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 1 ml/dk akış hızında metil mandelat'a ait HPLC kromatogramı

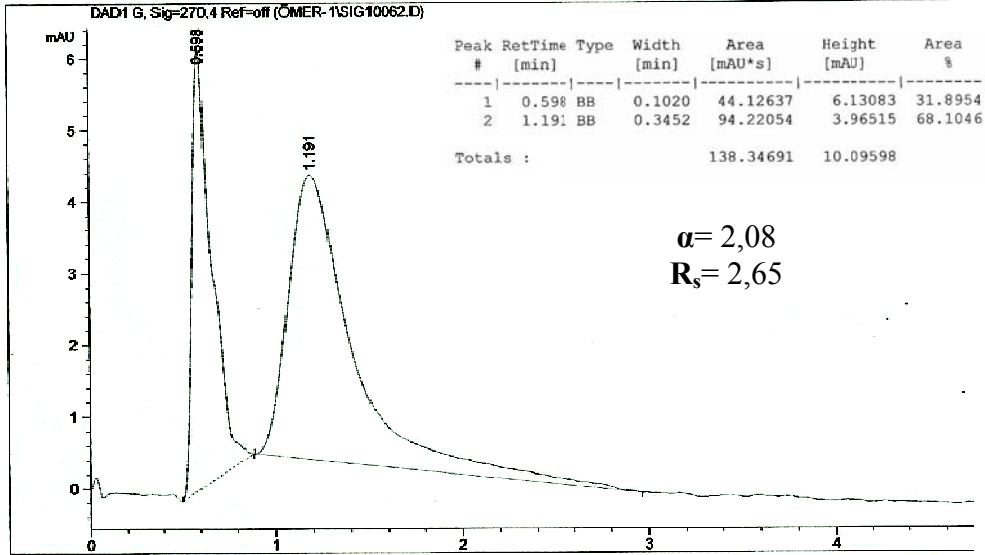
5. TARTIŞMA VE SONUÇ



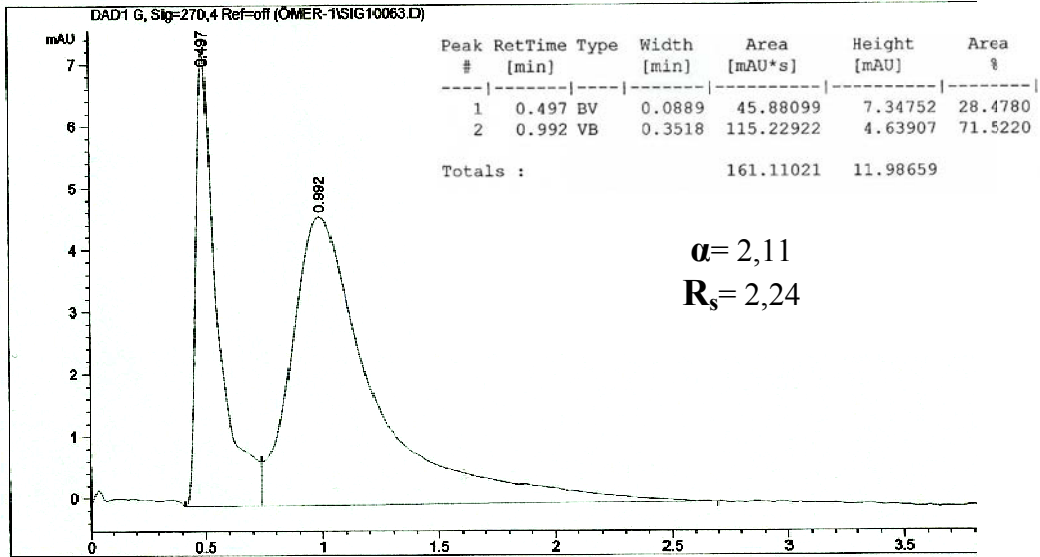
Şekil 5.24. Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 1,5 ml/dk akış hızında metil mandelat'a ait HPLC kromatogramı



Şekil 5.25. Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 2 ml/dk akış hızında metil mandelat'a ait HPLC kromatogramı

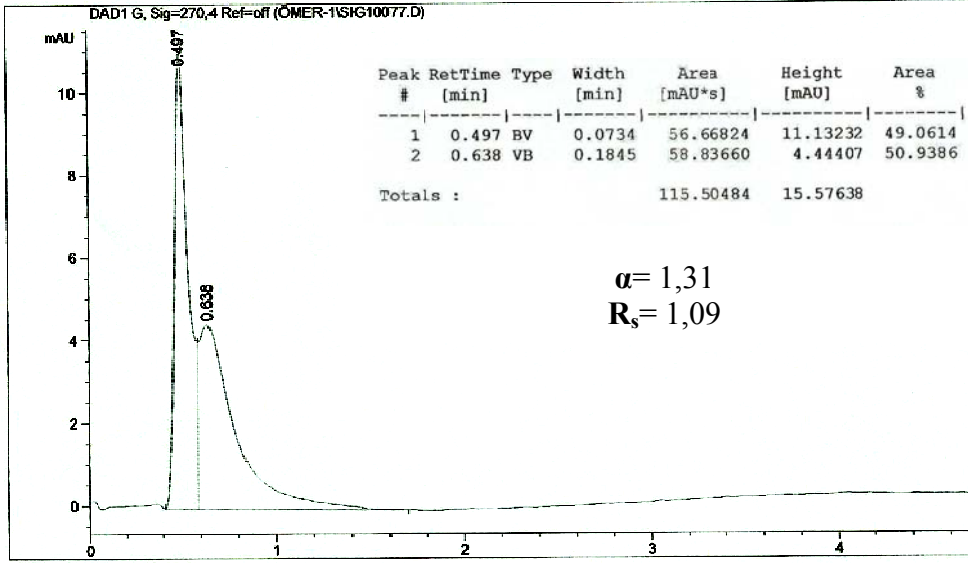


Şekil 5.26. Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 2,5 ml/dk akış hızında metil mandelat'a ait HPLC kromatogramı

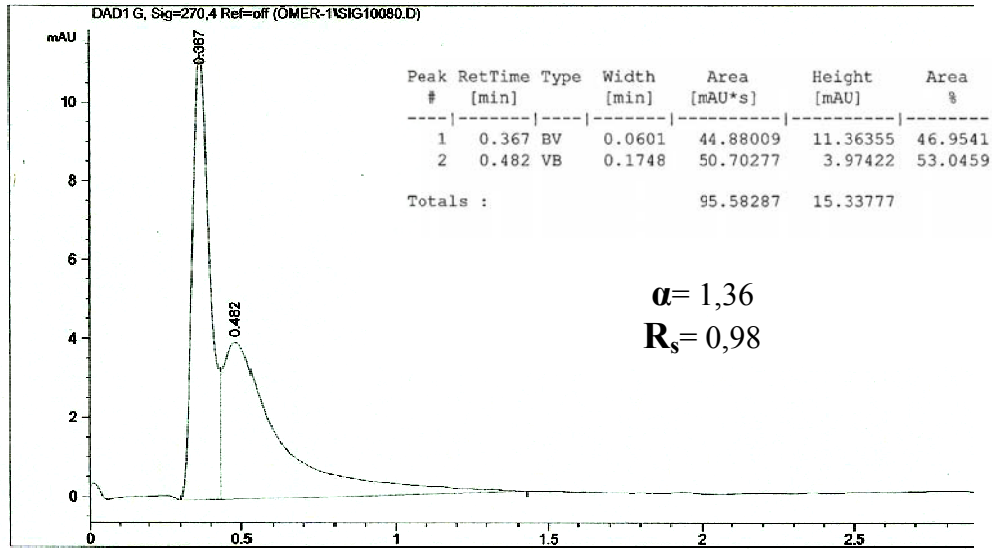


Şekil 5.27. Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 3ml/dk akış hızında metil mandelat'a ait HPLC kromatogramı

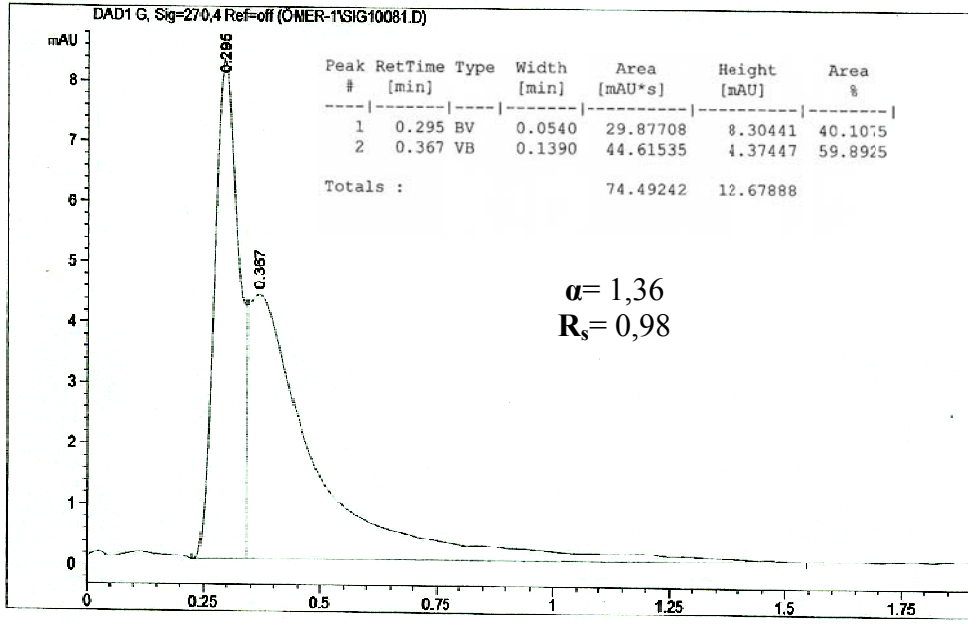
5. TARTIŞMA VE SONUÇ



Şekil 5.28. Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 3 ml/dk akış hızında α -feniletilamin'e ait HPLC kromatogramı



Şekil 5.29. Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 4 ml/dk akış hızında α -feniletilamin'e ait HPLC kromatogramı



Şekil 5.30. Yürütücü faz olarak pH=8 fosfat tamponu ve 5 ml/dk akış hızında α -feniletilamin'e ait HPLC kromatogramı

Çizelge 5.5. 100 mM pH=8 fosfat tamponunda enantiyomerik olarak ayrılan rasemik bileşiklere ait alıkonma süreleri

			AKIŞ HIZI							
			1mL/dk	1,5mL/dk	2mL/dk	2,5mL/dk	3mL/dk	4mL/dk	5ml/dk	
Rasemik Bileşik	rac- mandelik asit	Alıkonma Süreleri (dakika)	t ₀	-	-	0,05	0,05	0,05	-	-
			t ₁	-	-	0,761	0,597	0,497	-	-
			t ₂	-	-	2,580	2,060	1,708	-	-
	rac- metil mandelat	Alıkonma Süreleri (dakika)	t ₀	0,05	0,05	0,05	0,05	0,05		
			t ₁	1,765	1,118	0,767	0,598	0,497		
			t ₂	3,019	1,997	1,495	1,191	0,992		
	rac- α- feniletil amin	Alıkonma Süreleri (dakika)	t ₀					0,05	0,05	0,05
			t ₁					0,497	0,367	0,295
			t ₂					0,638	0,482	0,367

Çizelge 5.6. 100 mM pH=8 fosfat tamponunda enantiyomerik olarak ayrılan rasemik bileşiklere ait kromatografik parametreler

				AKIŞ HIZI							
				1mL/dk	1,5mL/dk	2mL/dk	2,5mL/dk	3mL/dk	4mL/dk	5mL/dk	
Rasemik Bileşik	rac- mandelik asit	Kromatografik Parametreler	R_s	-	-	4,31	4,22	5,57	-	-	
			α	-	-	3,56	3,67	3,71	-	-	
	rac- metil mandelat	Kromatografik Parametreler	R_s	2,41	2,46	2,56	2,65	2,24			
			α	1,73	1,82	2,01	2,08	2,11			
	rac- α- feniletil amin	Kromatografik Parametreler	R_s					1,09	0,98	0,75	
			α					1,31	1,36	1,30	

Bu çalışmada; izoelektrik noktası 4,7 olan asidik yapıdaki bovine serum albumin, etilendiamin ve glutaraldehit arakolu üzerinden 3-kloropropil silikajele bağlanarak protein temelli bir kiral sabit faz hazırlandı. Hazırlanan bu CSP 150X4,6 mm ebatlarındaki HPLC kolona bulamaç metoduyla doldurularak 9 farklı rasemik bileşiğin enantiyomerik rezolüsyonu sağlanmaya çalışıldı. Her bir rasemik bileşiğin etanol-heksan(1:1) karışımında 2mg/mL çözeltisi hazırlandı. Bu şekilde çözeltisi hazırlanan her bir rasemik bileşik 10µL hacimde cihaza enjekte edilerek sonuçlar UV-DAD dedektörde $\lambda=270$ nm'de okundu. Protein temelli kiral sabit fazlarda en iyi ayırma sağlayan sodyum fosfat tamponu(Zhou L. ve ark. 2008) yürütücü faz olarak kullanıldı. Farklı pH'lar (pH=6, pH=7, pH=8) ve farklı akış hızları (1, 1.5, 2, 2.5, 3, 4, 5mL/dk) denenerek enantiyomerik rezolüsyonu sağlanan rasemik bileşikler için kromatografik parametreler (R_s ve α) hesaplandı.

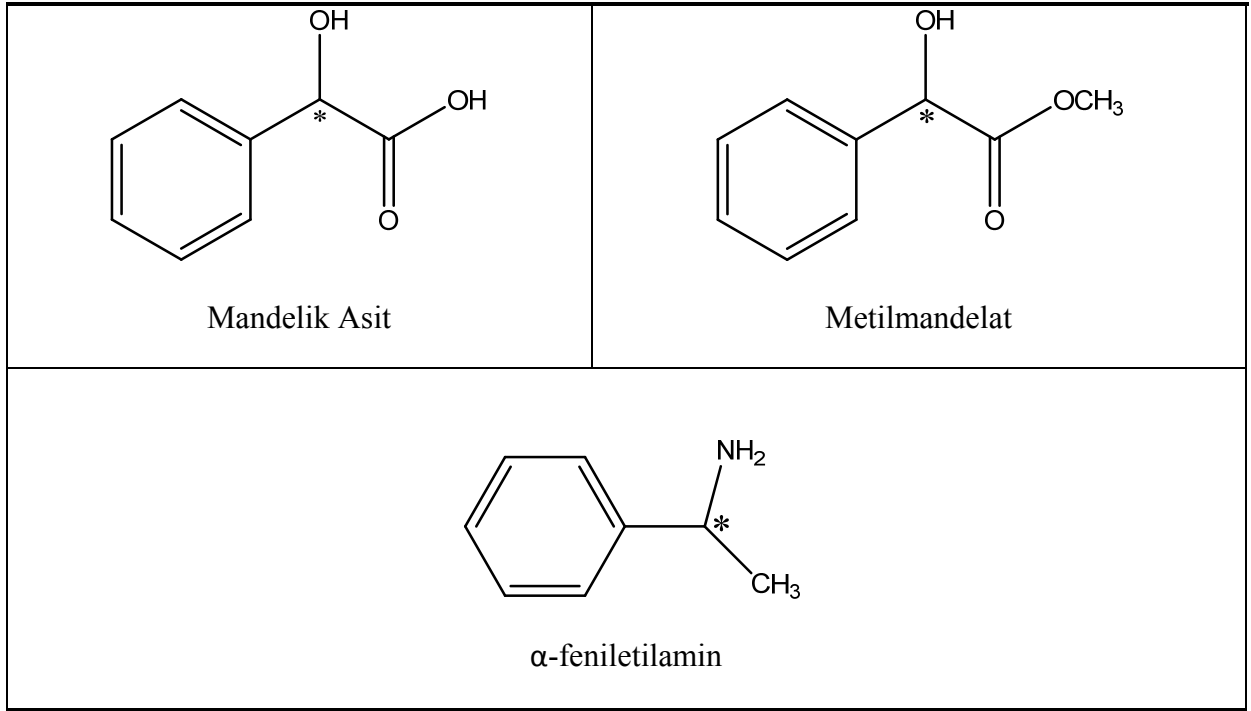
pH=6'da metilmandelat'ın enantiyomerik rezolüsyonu sağlandı. Bu pH'da metil mandelat için 1, 1.5, 2.5 ve 3mL/dk akış hızlarında en ideal ayırım sağlandı.

pH=7'de mandelik asit ve metil mandelat'ın enantiyomerik rezolüsyonu sağlandı. Bu pH'da mandelik asit ve metil mandelat için bütün akış hızlarında(1, 1.5, 2, 2.5, 3mL/dk), en ideal ayırım sağlandı.

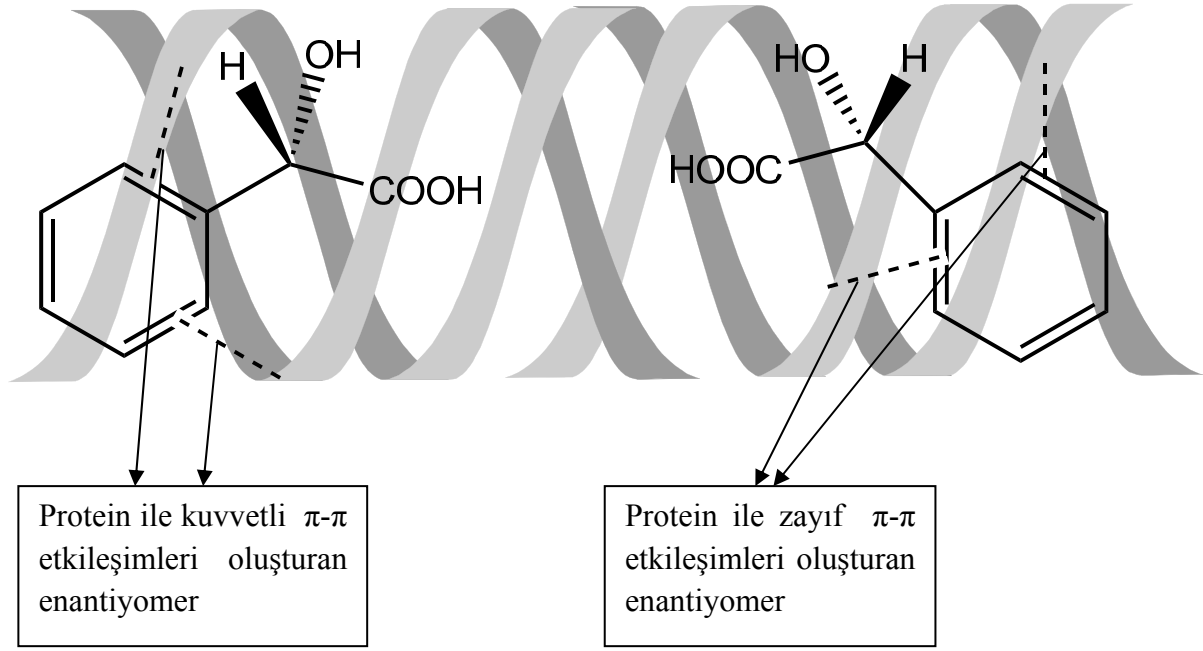
pH=8'de mandelik asit, metil mandelat ve α -feniletılamin'in enantiyomerik rezolüsyonu sağlandı. Bu pH'da metil mandelat için bütün akış hızlarında(1, 1.5, 2, 2.5, 3mL/dk), mandelik asit için 3 mL/dakika akış hızında ($\alpha= 3,71$ ve $R_s= 5,57$) ve α -feniletılamin için 3mL/dk akış hızında ($\alpha= 1,31$ ve $R_s= 1,09$) en ideal ayırım sağlandı.

Yeni arakol üzerinden sentezlediğimiz BSA temelli CSP'nin pH=8'de daha fazla sayıda rasemik bileşiği enantiyomerlerine ayırabildiği elde edilen kromatogramlara bakılarak tespit edildi. Asidik ve bazik bileşiklere nazaran metil mandelat gibi nötral bileşiklerin enantiyomerik rezolüsyonununun pH değişikliklerinden etkilenmediği ve bazik yapıdaki α -feniletılamin'in bazik pH'da(pH=8), asidik yapıdaki mandelik asidin nötral(pH=7) ve bazik(pH=8) pH'larda enantiyomerlerine ayrıldığı gözlemlendi.

Çizelge 5.7. Enantiyomerik Rezolüsyonu sağlanan rasemik bileşiklerin yapı formülleri



Enantiyomerik rezolüsyonu sağlanan rasemik bileşiklerin yapı formüllerine bakıldığında (Çizelge 5.7.), bu bileşiklerin fenil ve naftil gibi aromatik grupları ihtiva ettiği görülmektedir. Bu bilgiden hareketle sentezlediğimiz CSP ile analitler arasında kirale ayırmayı sağlayan en önemli kuvvetin π - π etkileşimleri olduğunu düşünmekteyiz. Yine CSP'miz özellikle fenil ya da naftil gruplarına komşu karbondaki hidroksil veya amino grubu ihtiva eden rasemik bileşiklere karşı enantiyoseçici davranmaktadır.



Şekil 5.31. BSA proteini ile güçlü ve zayıf π - π etkileşimleri oluşturan mandelik asitin enantiyomerlerin şekilsel gösterimi

Literatürde yer alan protein temelli CSP'lerin enantiyomerik olarak ayırmış olduğu kiral bileşiklerin kromatogramlarına bakıldığında; en kısa sürede rezolüsyon fenoprofen için 4. ve 7. dakikalar arasında yine triazin arakolu üzerinden sentezlenmiş BSA temelli CSP ile sağlanmıştır (H. Zou ve ark. 2000). Hazırlanmış olduğumuz CSP'de en kısa alıkonma süreleri (çizelge 5.8.) mandelik asit için 0,497. ve 1,708. dakikalar arasında (pH=8, 3mL/dk akış hızında), metil mandelat için 0,496. ve 0,890. dakikalar arasında (pH=8, 3mL/dk akış hızında), ve α -feniletilamin için 0,295. ve 0,367. dakikalar arasında (pH=8, 3mL/dk akış hızında) elde edilmiştir. Hazırladığımız CSP'nin diğer protein temelli CSP'lerden üstün tarafı, özellikle fenil ve naftil halkasına komşu karbondaki hidroksil grubu içeren rasemik bileşiklerin enantiyomerik rezolüsyonunu kısa sürede gerçekleştirmesidir.

Çizelge 5.8. Hazırlanmış olduğumuz CSP’de rasemik bileşiklerin en kısa alıkonma süreleri

RASEMİK BİLEŞİKLER					Çalışılan pH	Akış Hızı
	mandelik asit	Minimum Alıkonma Süreleri	t ₁	0,497	pH=8	3mL/dk
			t ₂	1,708		
	metil mandelat	Minimum Alıkonma Süreleri	t ₁	0,496	pH=8	3mL/dk
			t ₂	0,890		
α-feniletilamin	Minimum Alıkonma Süreleri	t ₁	0,295	pH=8	3mL/dk	
		t ₂	0,367			

Sonuç olarak tarafımızdan hazırlanan CSP hem ayırma gücü açısından hemde alıkonma zamanı yönünden literatürdeki analoglarıyla uyum içindedir hatta onlardan üstün yanları da vardır. Ayrıca hem kolay temin edilebilen ve hemde ticari yolla ucuz olarak satın alınabilen ekonomik üstünlüğe haizdir. Bu özellik hem CSP’nin temelini oluşturan BSA hem de CPSG için geçerlidir.

Bundan başka yürütücü faz olarak fosfat tamponu kullanılması sulu fazın, yine bol bulunabilen, ekonomik ve çevre dostu özelliklerini ön plana taşımakta ve diğer mobil fazlara üstünlük sağlamaktadır. Organik solvent israfı önlenmiş olmakta ve bu durum hazırlanan CSP ve kullanılan yürütücü fazı tercih edilebilir kılmaktadır.

Kolon sıcaklığı, parçacık boyutu gibi parametreler değiştirilerek iyi bir baseline ayırımı vermeyen ve tek bir pik veren rasemik bileşiklerin de enantiyomerik rezolüsyonu sağlanabilir. Ayrıca tasarlanmış olduğumuz etilendiamin ve glutaraldehit arakolu üzerinden asidik protein olan BSA’nın yanı sıra avidin ve kimotripsin gibi enantiyomerik ayırma gücü olan bazik proteinler silika üzerine bağlanarak yine geniş yelpazedeki rasemik bileşiklerin enantiyomerik rezolüsyon çalışmaları yapılabilir. Bu konudaki çalışmalarımız sürmektedir.

6. KAYNAKLAR

- Abou-Basha, L. I., & Aboul-Enein, H. Y. (1995). Enantiomeric separation and optical purity determination of thyroxine enantiomers in bulk and pharmaceutical formulations. *Pharmaceutica Acta Helvetiae*, 70, 237-240.
- Aboul-Enein, H. Y., & Ali, I. (2003). *Chiral separations by liquid chromatography and related technologies* (Vol. 90): CRC Press.
- Adam, F., Osman, H., & Hello, K. M. (2009). The immobilization of 3-(chloropropyl) triethoxysilane onto silica by a simple one-pot synthesis. *Journal of colloid and interface science*, 331, 143-147.
- Allenmark S., *Chromatographic Enantioseparation: Methods and Applications*, 2nd Ed., Ellis Horwood, New York (1991).
- Altria, K. D. (1996). *Capillary electrophoresis guidebook: principles, operation, and applications* (Vol. 52): Springer.
- Armstrong, D. W., Chang, C. D., & Haing Lee, S. (1991). (R)- and (S)-Naphthylethylcarbamate-substituted β -cyclo-dextrin bonded stationary phases for the reversed-phase liquid chromatographic separation of enantiomers. *Journal of Chromatography A*, 539, 83-90.
- Bencini, A., Benelli, C., & Gatteschi, D. (1984). The angular overlap model for the description of the paramagnetic properties of transition metal complexes. *Coordination chemistry reviews*, 60, 131-169.
- Berthod, A., Chen, X., Kullman, J. P., Armstrong, D. W., Gasparrini, F., D'Acquaric, I., Villani, C., & Carotti, A. (2000). Role of the carbohydrate moieties in chiral recognition on teicoplanin-based LC stationary phases. *Analytical chemistry*, 72, 1767-1780.
- Bijvoet, J., Peerdeman, A., & Van Bommel, A. (1951). Determination of the absolute configuration of optically active compounds by means of X-rays. *Nature*, 168, 271-272.
- Billman, J. H., & Diesing, A. C. (1957). Reduction of Schiff bases with sodium borohydride. *The Journal of Organic Chemistry*, 22, 1068-1070.
- Bojarski, J., Aboul-Enein, H. Y., & Ghanem, A. (2005). What's new in chromatographic enantioseparations. *Current Analytical Chemistry*, 1, 59-77.
- Brooker, S., Iremonger, S. S., & Plieger, P. G. (2003). A new bis (phenol-armed) pyridazine-containing Schiff base ligand: synthesis, complexation and reduction to the amine ligand analogue. *Polyhedron*, 22, 665-671.
- Cabrera, K. (2004). Applications of silica-based monolithic HPLC columns. *Journal of separation science*, 27, 843-852.

- Çakmak, R. (2008). *PirkLe -tip kiral kolon kromatografisi yöntemiyle biyolojik öneme sahip kiral aminlerden (±)-β-metilfeniletilamin'in rezolüsyonu*. Yüksek Lisans Tezi, Harran Üniversitesi.
- Caude, M., Tambuté, A., & Siret, L. (1991). Chiral stationary phases derived from tyrosine. *Journal of Chromatography A*, 550, 357-382.
- Cavazzini, A., Pasti, L., Massi, A., Marchetti, N., & Dondi, F. (2011). Recent applications in chiral high performance liquid chromatography: A review. *Analytica Chimica Acta*, 706, 205-222.
- Chankvetadze, B., Chankvetadze, L., Sidamonidze, S., Kasashima, E., Yashima, E., & Okamoto, Y. (1997). 3-Fluoro-, 3-chloro- and 3-bromo-5-methylphenylcarbamates of cellulose and amylose as chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic enantioseparation. *Journal of Chromatography A*, 787, 67-77.
- Chen, Z., Fuyumuro, T., Watabe, K., & Hobo, T. (2004). Influence of spacers and organic modifiers on chromatographic behaviors on chiral diamide stationary phase with N-(3, 5-dimethylbenzoyl)-D-phenylglycine. *Analytica chimica acta*, 518, 181-189.
- Choi, H. J., Ha, H. J., Han, S. C., & Hyun, M. H. (2008). Liquid chromatographic resolution of β-amino acids on CSPs based on optically active (3,3'-diphenyl-1,1'-binaphthyl)-20-crown-6. *Analytica Chimica Acta*, 619, 122-128.
- Cronin, J. R., & Pizzarello, S. (1997). Enantiomeric excesses in meteoritic amino acids. *Science*, 275, 951-955.
- Çakmak, R., Durdagi, S., Ekinci, D., Şentürk, M., & Topal, G. (2011). Design, synthesis and biological evaluation of novel nitroaromatic compounds as potent glutathione reductase inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 21, 5398-5402.
- D'Acquarica, I., Gasparrini, F., Misiti, D., Zappia, G., Cimarelli, C., Palmieri, G., Carotti, A., Cellamare, S., & Villani, C. (2000). Application of a new chiral stationary phase containing the glycopeptide antibiotic A-40,926 in the direct chromatographic resolution of β-amino acids. *Tetrahedron: Asymmetry*, 11, 2375-2385.
- Easson, L. H., & Stedman, E. (1933). Studies on the relationship between chemical constitution and physiological action: Molecular dissymmetry and physiological activity. *Biochemical Journal*, 27, 1257.
- Eriksson, B.-M., & Wallin, A. (1995). Evaluation of the liquid-chromatographic resolution of indenoindolic racemic compounds on three protein-based chiral stationary phases. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 13, 551-561.
- Fu, Y., Huang, T., Chen, B., Shen, J., Duan, X., Zhang, J., & Li, W. (2013). Enantioselective resolution of chiral drugs using BSA functionalized magnetic nanoparticles. *Separation and Purification Technology*, 107, 11-18.

- Guillaume, Y.-C., Ismaili, L., Truong, T.-T., Nicod, L., Millet, J., & Thomassin, M. (2002). Chiral discrimination of phenoxypropionic acid herbicide enantiomers on teicoplanin phase: methanol dependence and eluent pH consideration. *Talanta*, *58*, 951-959.
- Haginaka, J. (2008). Recent progresses in protein-based chiral stationary phases for enantioseparations in liquid chromatography. *Journal of Chromatography B*, *875*, 12-19.
- Haginaka, J. (2012). 8.9 Chromatographic Separations and Analysis: Protein and Glycoprotein Stationary Phases. In E. M. Carreira & H. Yamamoto (Eds.), *Comprehensive Chirality* (pp. 153-176). Amsterdam: Elsevier.
- Haginaka, J. (2014). Chiral Separations: Protein Stationary Phases. In *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering*: Elsevier.
- Haginaka, J., Murashima, T., Fujima, H., & Wada, H. (1993). Direct injection assay of drug enantiomers in serum on ovomucoid-bonded silica materials by liquid chromatography. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, *620*, 199-204.
- Harada, K., Yuan, Q., Nakayama, M., & Sugii, A. (1996). Effects of organic modifiers on the chiral recognition by different types of silica-immobilized bovine serum albumin. *Journal of Chromatography A*, *740*, 207-213.
- Hegstrom, R. A., & Kondepudi, D. K. (1990). The handedness of the universe. *Scientific American*, *262*, 108-115.
- Hermansson, J. (1985). Resolution of racemic aminoalcohols (β -blockers), amines and acids as enantiomeric derivatives using a chiral α -acid glycoprotein column. *Journal of Chromatography A*, *325*, 379-384.
- Hosangadi, B. D., & Dave, R. H. (1996). An efficient general method for esterification of aromatic carboxylic acids. *Tetrahedron letters*, *37*, 6375-6378.
- Hotta, Y., Taniguchi, M., Inukai, K., & Yamagishi, A. (1996). Formation of thin films of clay-organic complexes with an application as an electrode modifier. *Langmuir*, *12*, 5195-5201.
- Hyun, M. H. (2003). Characterization of liquid chromatographic chiral separation on chiral crown ether stationary phases. *Journal of separation science*, *26*, 242-250.
- Hyun, M. H. (2012). 8.13 Chromatographic Separations and Analysis: Chiral Crown Ether-Based Chiral Stationary Phases. In E. M. Carreira & H. Yamamoto (Eds.), *Comprehensive Chirality* (pp. 263-285). Amsterdam: Elsevier.
- Hyun, M. H., Cho, Y. J., Ryoo, J.-J., Jyung, K. K., & Heo, G. S. (1995). Preparation and application of an (S)-naproxen chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A*, *696*, 173-183.

- Hyun, M. H., Tan, G., & Xue, J. Y. (2005). Unusual resolution of N-(3,5-dinitrobenzoyl)- α -amino acids on a chiral stationary phase based on (+)-(18-crown-6)-2,3,11,12-tetracarboxylic acid. *Journal of Chromatography A*, 1097, 188-191.
- Ito, R., Yamamoto, A., Kodama, S., Kato, K., Yoshimura, Y., Matsunaga, A., & Nakazawa, H. (2003). A study on the change of enantiomeric purity of catechins in green tea infusion. *Food chemistry*, 83, 563-568.
- Kacprzak, K. M., Maier, N. M., & Lindner, W. (2006). Highly efficient immobilization of Cinchona alkaloid derivatives to silica gel via click chemistry. *Tetrahedron letters*, 47, 8721-8726.
- Kiasat, A. R., Zayadi, M., Mohammad-Taheri, F., & Fallah-Mehrjardi, M. (2011). Simple, Practical and Eco-friendly Reduction of Nitroarenes with Zinc in the Presence of Polyethylene Glycol Immobilized on Silica Gel as a New Solid-liquid Phase Transfer Catalyst in Water. *Iran. J. Chem. Chem. Eng. Research Note Vol*, 30.
- Kiyohara, S., Nakamura, M., Saito, K., Sugita, K., & Sugo, T. (1999). Binding of dl-tryptophan to BSA adsorbed in multilayers by polymer chains grafted onto a porous hollow-fiber membrane in a permeation mode. *Journal of Membrane Science*, 152, 143-149.
- Kodama, S., Yamamoto, A., Matsunaga, A., & Hayakawa, K. (2003). Direct chiral resolution of tartaric acid by ion-pair capillary electrophoresis using an aqueous background electrolyte with (1R,2R)-(-)-1,2-diaminocyclohexane as a chiral counterion. *Electrophoresis*, 24, 2711-2715.
- Kondepudi, D. K., & Asakura, K. (2001). Chiral autocatalysis, spontaneous symmetry breaking, and stochastic behavior. *Accounts of chemical research*, 34, 946-954.
- Kubota, T., Yamamoto, C., & Okamoto, Y. (2004). Reversed-phase liquid chromatographic enantioseparation by cycloalkylcarboxylates of cellulose and amylose. *Chirality*, 16, 309-313.
- Le Bel, J. A. (1874). Sur les relations qui existent entre les formules atomiques des corps organiques et le pouvoir rotatoire de leurs dissolutions. *Bull. Soc. Chim. Fr*, 22, 337-347.
- Lienne, M., Caude, M., Rosset, R., & Tambute, A. (1988). Optimization of the direct chiral separation of potential cytotoxic α -methylene- γ -butyrolactones and α -methylene- γ -butyrolactams by liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 448, 55-72.
- Lowe, C. R., & Dean, P. D. (1974). *Affinity chromatography*: Wiley New York.
- Lubsen, N., Aarts, H., & Schoenmakers, J. (1988). The evolution of lenticular proteins: the β - and γ -crystallin super gene family. *Progress in biophysics and molecular biology*, 51, 47-76.

- Maier, S. A., Brongersma, M. L., Kik, P. G., Meltzer, S., Requicha, A. A., & Atwater, H. A. (2001). Plasmonics—a route to nanoscale optical devices. *Advanced Materials*, *13*, 1501-1505.
- Majors, R. E. (2006). Developments in HPLC column packing design. *LC GC Magazine-North America-Solutions for Separation Scientists*, *29*, 8-15.
- McKennon, M. J., Meyers, A., Drauz, K., & Schwarm, M. (1993). A convenient reduction of amino acids and their derivatives. *The Journal of Organic Chemistry*, *58*, 3568-3571.
- Mikes F, Boshart G, Gil-Av E, J Chromatogr 122: 205 (1976).
- Mitchell, C. R., & Armstrong, D. W. (2004). Cyclodextrin-based chiral stationary phases for liquid chromatography. In *Chiral Separations* (pp. 61-112): Springer.
- Mourier, P. A., Eliot, E., Caude, M. H., Rosset, R. H., & Tambute, A. G. (1985). Supercritical and subcritical fluid chromatography on a chiral stationary phase for the resolution of phosphine oxide enantiomers. *Analytical chemistry*, *57*, 2819-2823.
- Narayanan, S. R. (1992). Immobilized proteins as chromatographic supports for chiral resolution. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, *10*, 251-262.
- Natalini, B., Marinozzi, M., Bade, K., Sardella, R., Thomsen, C., & Pellicciari, R. (2004). Preparative resolution of 1-aminoindan-1, 5-dicarboxylic acid (AIDA) by chiral ligand-exchange chromatography. *Chirality*, *16*, 314-317.
- Nimura, N., & Kinoshita, T. (1986). o-Phthalaldehyde—N-acetyl-L-cysteine as a chiral derivatization reagent for liquid chromatographic optical resolution of amino acid enantiomers and its application to conventional amino acid analysis. *Journal of Chromatography A*, *352*, 169-177.
- Ou, J., Lin, H., Tang, S., Zhang, Z., Dong, J., & Zou, H. (2012). Hybrid monolithic columns coated with cellulose tris (3, 5-dimethylphenyl-carbamate) for enantioseparations in capillary electrochromatography and capillary liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, *1269*, 372-378.
- Pasteur L, C R Acad Sci 26: 535 (1848).
- Pérez-Quintanilla, D., Morante-Zarcelero, S., & Sierra, I. (2014). Preparation and characterization of mesoporous silicas modified with chiral selectors as stationary phase for high-performance liquid chromatography. *Journal of colloid and interface science*, *414*, 14-23.
- Pirkle, W. H., & Murray, P. G. (1996). Observations relevant to the differential intercalation of enantiomers between the strands of brush-type chiral stationary phases. *Journal of Chromatography A*, *719*, 299-305.
- Pirkle, W. H., Pochapsky, T. C., Mahler, G. S., & Field, R. E. (1985). Chromatographic separation of the enantiomers of 2-carboalkoxyindolines and N-aryl- α -amino esters on

- chiral stationary phases derived from N-(3,5-dinitrobenzoyl)- α -amino acids. *Journal of Chromatography A*, 348, 89-96.
- Qin, W., Xu, S., Xu, G., Xie, Q., Wang, C., & Xu, Z. (2013). Preparation of silica gel bound crown ether and its extraction performance towards zirconium and hafnium. *Chemical Engineering Journal*, 225, 528-534.
- Schoenmakers, P. J., Uunk, L. G., & De Bokx, P. K. (1988). Effect of sample size of retention in packed column super-critical fluid chromatography: A method for characterizing stationary phase homogeneity. *Journal of Chromatography A*, 459, 201-213.
- Sheldon, R. A. (1993). *Chirotechnology: industrial synthesis of optically active compounds*: CRC press.
- Shinbo, T., Yamaguchi, T., Nishimura, K., & Sugiura, M. (1987). Chromatographic separation of racemic amino acids by use of chiral crown ether-coated reversed-phase packings. *Journal of Chromatography A*, 405, 145-153.
- Stefan, R.I. (2001). *Electrochemical sensors in bioanalysis*: CRC Press.
- Steffeck, R. J., Zelechonok, Y., & Gahm, K. H. (2002). Enantioselective separation of racemic secondary amines on a chiral crown ether-based liquid chromatography stationary phase. *Journal of Chromatography A*, 947, 301-305.
- Stewart, K. K., & Doherty, R. F. (1973). Resolution of DL-tryptophan by affinity chromatography on bovine-serum albumin-agarose columns. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 70, 2850-2852.
- Tümerdem, R. (2004). *Yeni Kiral Schiff Bazlarının Sentezi Ve Bunların Karbonil Bileşiklerinin Asimetrik İndirgenmesinde Kullanılması*. Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi.
- Tümerdem, R., Topal, G., & Turgut, Y. (2005). Asymmetric reduction of acetophenone using lithium aluminium hydride modified with some novel amino alcohol Schiff bases. *Tetrahedron: Asymmetry*, 16, 865-868.
- Van Gysegem, E., Van Hemelryck, S., Daszykowski, M., Questier, F., Massart, D., & Vander Heyden, Y. (2003). Determining orthogonal chromatographic systems prior to the development of methods to characterise impurities in drug substances. *Journal of Chromatography A*, 988, 77-93.
- Vibholm Petersen, P., Ekelund, J., Olsen, L., & Vinding Ovesen, S. (1997). Chiral separations of β -blocking drug substances using the Pirkle-type α -Burke 1 chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A*, 757, 65-71.
- Wainer, I. W., & Chu, Y.Q. (1988). Use of mobile phase modifiers to alter retention and stereoselectivity on a bovine serum albumin high-performance liquid chromatographic chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A*, 455, 316-322.

- Wang, P., Zhang, E., Niu, J.-F., Ren, Q.H., Zhao, P., & Liu, H.-M. (2012). An excellent new resolving agent for the diastereomeric resolution of rac-mandelic acid. *Tetrahedron: Asymmetry*, *23*, 1046-1051.
- Whitesell, J. K., & Reynolds, D. (1983). Resolution of chiral alcohols with mandelic acid. *The Journal of Organic Chemistry*, *48*, 3548-3551.
- Wolf, C., & Pirkle, W. H. (1998). Synthesis and evaluation of a copolymeric chiral stationary phase. *Journal of Chromatography A*, *799*, 177-184.
- Yamagishi, A., Taniguchi, M., Imamura, Y., & Sato, H. (1996). Clay column chromatography for optical resolution: selectivities of Lambda-[Ru (phen) 3] 2+ and Lambda-[Ru (bpy) 3] 2+ laponite columns towards 1, 1'-binaphthol. *Applied clay science*, *11*, 1-10.
- Yilmaz, H., Topal, G., Cakmak, R., & Hosgoren, H. (2010). Resolution of (\pm)- β -methylphenylethylamine by a novel chiral stationary phase for Pirkle-type column chromatography. *Chirality*, *22*, 252-257.
- Younes, E. A., Hussein, Q., May, M. A., & Fronczek, F. R. (2011). Synthesis of 2-Amino-1, 4-benzodiazepin-5-ones from 2-nitrobenzoic acid and α -aminonitriles. *ARKIVOC*, *2*, 322-330.
- Zhang, Q., Zou, H., Wang, H., & Ni, J. (2000). Synthesis of a silica-bonded bovine serum albumin s-triazine chiral stationary phase for high-performance liquid chromatographic resolution of enantiomers. *Journal of Chromatography A*, *866*, 173-181.
- Zhou, L., Mao, B., & Ge, Z. (2008). Comparative study of immobilized α 1 acid glycoprotein and ovomucoid protein stationary phases for the enantiomeric separation of pharmaceutical compounds. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, *46*, 898-906.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : ÖMER ERDOĞAN

Doğum Yeri : GAZİANTEP

Doğum Tarihi: 31.03.1989

Medeni Hali : BEKAR

Yabancı Dili : İNGİLİZCE

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl) :

Lise : ORHAN SEVİNÇ LİSESİ/2003-2006

Lisans : DİCLE ÜNİVERSİTESİ/2007-2012

Yüksek Lisans : DİCLE ÜNİVERSİTESİ/2012-2014

Çalıştığı Projeler : 113 Z 773 Nolu TÜBİTAK PROJESİ