

**T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**PİRKLE TİP KİRAL KOLON KROMATOĞRAFİSİ
YÖNTEMİYLE 3-HİDROKSİ BUTİRİK ASİDİN
RASEMİK KARIŞIMININ REZOLÜSYONU**

Mehmet KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Hayrullah YILMAZ

**DİYARBAKIR
MAYIS 2010**

T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PİRKLE TİP KİRAL KOLON KROMATOĞRAFİSİ
YÖNTEMİYLE 3-HİDROKSİ BUTİRİK ASİDİN
RASEMİK KARIŞIMININ REZOLÜSYONU**

Mehmet KAYA

YÜKSEK LİSANS TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN: Prof. Dr. Hayrullah YILMAZ

DİYARBAKIR

T.C
DICLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Mehmet KAYA tarafından yapılan bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında YÜKSEK LİSANS tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyesinin

Ünvanı Adı Soyadı

Başkan :Prof. Dr. Hayrullah YILMAZ

Üye :Doç. Dr. Kemal AKKILIÇ

Üye : Yrd. Doç. Dr. Fazıl KARADENİZ

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

28/ 05/ 2010

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans öğrenimim boyunca benden yardımlarını esirgemeyen tez danışmanım Kimya Eğitimi Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. Hayrullah YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek Lisans Tezimin hazırlanması boyunca yakın ilgisi ve desteğinden dolayı sayın hocalarım Batman Üniversitesi Teknik Eğitim Fakültesi Dekanı Prof. Dr. Giray TOPAL ve Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Müdür'ü Prof. Dr. Hamdi TEMEL'e teşekkürü bir borç bilirim.

Tezin deneysel kısmında ve yazım aşamasında yardımlarından dolayı Dicle Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Bölümü Doktora öğrencisi Reşit ÇAKMAK'a, Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Kimya Eğitimi Bölümü Arş. Gör. Salih Paşa'ya ve tez çalışmam sırasında yardımlarından dolayı Kimya Eğitimi üçüncü sınıf öğrencisi Ömer ERDOĞAN'a teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
TEŞEKKÜR.....	i
AMAÇ.....	iv
ÖZET.....	v
SUMMARY.....	vi
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.....	6
1.1.5. Diastereomerler.....	10
1.1.6. Mezo Yapısı.....	11
1.2. Kiralite ve Rezolüsyon.....	12
1.3. HPLC ve Kiral Kolonlar.....	15
1.3.1. HPLC.....	15
1.3.2. Kiral Kolonlar.....	16
1.3.2.1. Kiral Ligand değişim kolonu.....	16
1.3.2.2. Affinite kolon.....	17
1.3.2.3. Sarmal Polimer kolon.....	17
1.3.2.4. Kavite kolon.....	18
1.3.2.5. Pirkle tip kolon.....	20
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	23

3. MATERYAL ve METOD	25
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	25
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	25
3.3. Metod.....	26
4. DENEYSEL KISIM VE BULGULAR	27
4.1. N- <i>p</i> -nitrobenzil-(<i>R</i>)-2-amino-1-butanol sentezi.....	27
4.2. N- <i>p</i> -aminobenzil-(<i>R</i>)-2-amino-1-butanol sentezi.....	27
4.3. Kiral Kolonun Hazırlanması ve Enantiyomerik Verimin Belirlenmesi.....	28
4.3.1. Kiral Kolon Hazırlanması.....	28
4.3.2. Rasemik Karışımın Kolona Tatbik Edilmesi	29
4.3.3. Polarimetre ile Kiral (<i>R</i>) ve (<i>S</i>)-3-hidroksibütirik Asidin Çevirme Açısının Belirlenmesi.....	32
4.3.4. Enantiyometrik Fazlalığın Belirlenmesi.....	32
5. SONUÇ VE TARTIŞMA	33
5.1. N- <i>p</i> -Nitrobenzil-(<i>R</i>)-2-amino-1-butanol İçin Spektroskopik Sonuçlar	33
5.2. N- <i>p</i> -Aminobenzil-(<i>R</i>)-2-amino-1-butanol İçin Spektroskopik Sonuçlar	36
5.3. Enantiyomerik verim.....	39
6. KAYNAKLAR	40
7. TABLO LİSTESİ	43
8. ŞEKİL LİSTESİ	44
9. ÖZGEÇMİŞ	45

AMAÇ

Enantiyomerik saflığı yüksek organik asitler tıbbi ve biyolojik öneme sahiplerse ilaç sanayinde oldukça yaygın kullanım alanı bulurlar. Bu sebeple kiral bileşiklerin hazırlanması ve analizi oldukça önemlidir. Kromatografi yoluyla enantiyomerik ayırma ne kadar yüksek enantiyomerik saflıkta yapılabilirse insan sağlığına uygulamada etkili bir tedavi gerçekleştirmek o denli başarılı olur. Çünkü çevre kimyasında, ilaç sanayinde, klinik analizlerde hep yüksek enantiyomerik saflık istenir. Bu yüzden enantiyomerik saflık olmazsa her açıdan istenmeyen durumlar yaşanabilir. Hatta sonu ölümlle neticelenen durumlar meydana gelebilir. Buda enantiyomerik saflığın ne kadar önemli olduğunu göstermektedir.

Bu çalışmanın amacı Pirkle tip yeni bir kiral sabit faz (CSP) hazırlayarak biyolojik ve tıbbi açıdan önemi olan 3-hidroksibutirik asidin rasemik karışımını kolon kromatografisi yöntemiyle enantiyomerlerine ayırmaktır.

ÖZET

Bu çalışmada, Pirkle tip kiral sabit bir faz (CSP) hazırlandı ve rasemik 3-hidroksibütirik asidin rezolüsyon çalışmaları yapıldı. Yeni kiral sabit faz (CSP) hazırlanırken dolgu maddesi olarak Sepharose-4B kullanıldı, uzatma kolu olarak dolgu maddesine L-Tirozin takıldı, bu uzatma koluna ligand olarak N-*p*-aminobenzil-(*R*)-2-amino-1-butanol diazolanarak kenetlendi. Daha sonra 3-hidroksibütirik asidin rasemik karışımı kolona tatbik edildi. Hareketli faz olarak değişik pH'larda (pH: 6, 7 ve 8) tampon çözeltiler kullanılarak rezolüsyon sağlandı. Elüatın akış hızı peristaltik pompa ile ayarlandı. Toplam 12 tüp elüat alındı. Tüplerin absorbans değerleri 330 nm de spektrofotometreyle belirlendi. 6. 7. ve 8. tüplerde madde (3-hidroksibütiri asit) tespit edildi. pH 7 ve pH 8'de çalışmalar tekrarlandı. Ancak bir sonuç elde edilemedi. pH 6'da 6. 7. ve 8. tüplerin çevirme açıları belirlendikten sonra enantiyomerik fazlalık 11,4 olduğu belirlendi.

Anahtar Kelimeler: Rezolüsyon, Pirkle tip kolon, kiral organik asitler, amino alkoller

SUMMARY

In this study, Pirkle type chiral stationary phases (Csp) was prepared and resolution studies of racemic 3-hydroxybutyric acid were made. When a new chiral stationary phase (CSP) is prepared, Sepharose-4B was used as a matrix. L-Tyrosine as an spacer-arm was attached to the matrix, N-*p*-aminobenzyl-(*R*)-2-amino-1-butanol was connected as ligand to this spacer-arm via diazo. Then racemic mixture of 3-hydroxybutyric acid was loaded to the column. By using buffer solutions as moving phase at different pH's (pH = 6,7,8), the resolution was supplied. The flow rate of eluat was adjusted with peristaltic pump. The total 12 tubes eluat were took. Absorbance values of the tubes were read at 330 nm with spectrophotometer. In the 6th,7th and 8th tubes the material (3-hydroxybutyric acid) was determined. The studies were repeated at pH 7 and pH 8. But, A result wasn't achieve. After rotation angle of 6th, 7th and 8th tubes were determined at pH 6, the enantiomeric excess was found as 11.4

Key words : Resolution, Pirkle type column, Chiral organic acids, amino alcohols

1. GİRİŞ

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 [1-5]. Ayrıca Kapiler Elektroforez yöntemiyle de söz konusu ayırma işlemleri yapılmaktadır [6].

Enantiyomerik saflığı yüksek aminler biyolojik öneme sahip iseler ilaç sanayinde oldukça yaygın kullanım alanı bulurlar [7]. Bu sebeble kiral bileşiklerin hazırlanması ve analizi oldukça önemlidir. Kromatografi yoluyla enantiyomerik ayırma ne kadar yüksek enantiyomerik saflıkta yapılabilirse insan sağlığına uygulamada etkili bir tedavi gerçekleştirmek o denli başarılı olur. Çevre kimyası, ilaç sanayi, klinik analizlerde hep yüksek enantiyomerik saflık istenir. Bu saflık olmazsa her açıdan istenmeyen durumlar yaşanabilir. Hatta sonu ölümle neticelenen durumlar oluşabilir [8].

Rasemik amin karışımlarının ayrılması için günümüzde değişik teknikler kullanılmaktadır. Bunlardan bir tanesi de kromatografik ayırmalardır. Bunlar Pirkle-tip kolon kromatografisi genelde amino asit türevlerinin silikajele bağlanarak oluşturduğu bir seri değişik sabit fazın dolgu maddesi olarak kullanılmasıyla geliştirilmiş bir tekniktir [8]. Bu teknikte N-(3,5-dinitrobenzoil) fenilglisin silikajele kovalent bağla bağlanarak sabit faz oluşturulur. Bu kolonlar ticari yolla temin edilebildiği gibi araştırmacılar tarafından da preparatif amaçlı veya analitik amaçlı hazırlanabilirler. Kolonda enantiyomerik ayrılmanın mekanizması; yük transferi

yoluyla etkileşim, Hidrojen bağı oluşturularak etkileşim, dipol oluşturularak etkileşim ve sterik yönden etkileşim gibi birçok kombine faktörlerle açıklanmaktadır [9].

1.1. Kiralite

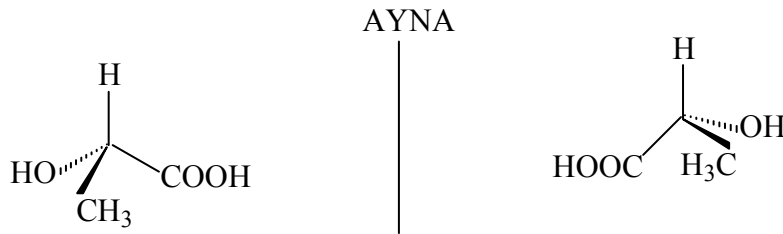
1.1.1. Kiralite nedir?

Kiralite geometrik bir özelliktir. Bir objenin ayna görüntüsü üst üste çakışmıyor ise kiral, ayna görüntüsü 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. Eğer molekül birden fazla asimetric merkez taşıyor ise multi kiraldır. Buna rağmen molekül kiral olabilir ya da olmayabilir.

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 stereoisomere sahiptirler ve bunların ayna görüntüleri üst üste çakışmaz. Şekil 1.1.'de kiral bir molekül olan laktik asit ayna görüntüsü ile üst üste çakışmayan bir enantiyomer çiftine sahiptir.

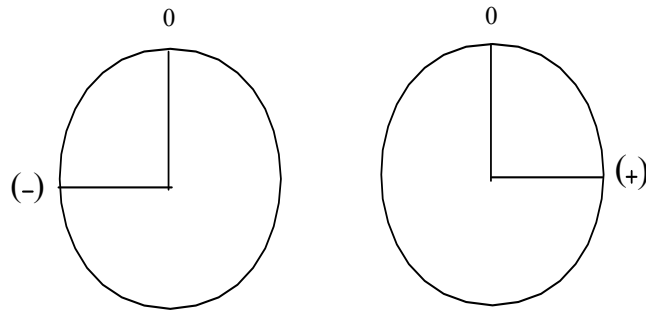


Şekil 1.1. Laktik asidin Enantiyomerleri

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 yönlere doğru salınmasıyla 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 ayna görüntüsü bu dönüşü (ters yönde olduğunda) dengeler.



Levorotatori (ışığın sola çevrilmesi)

Dekstrotatori (ışığın sağa çevrilmesi)

L-İzomer

D-İzomer

Şekil 1.2. Düzlem polarize ışığın çevrilme yönleri

Sonuçta ışığın dönüşü sıfırlanır (Şekil 1.2.). Tek bir enantiyomer için ise; çözeltilerde ayna görüntüsü olmadığından ışığın net dönüşü sıfırlanmaz. Bu nedenle rasemik (1:1) karışımlarda da düzlem polarize ışığın dönüşü sıfırlanır. Optikçe aktif maddelerin spesifik 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 gösterimler terk edilmektedir.

Enantiyomerlerin çevirme miktarına 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 çizgisi).

Bileşiğin 20 °C' deki özgül çevirme açısı 1.1 formülünden faydalanılarak hesaplanır.

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

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

α = 20 °C' de gözlenen çevirme açısı

l = dm olarak tüpün uzunluğu

c = gr/ml olarak örneğin derişimi

Ayrıca bir moleküldeki optikçe saflık 1.2 formülüne göre hesaplanır.

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

$[\alpha]$ = gözlenen çevirme açısı

$[\alpha]^{20}_D$ = özgül çevirme açısı

D

Her zaman olmamakla birlikte bu formül % e.e. 1.3 formülü yerine de kullanılmaktadır.

$$\% \text{ Enantiyomer fazlalığı (ee)} = \frac{[E_1 - E_2]}{[E_1 + E_2]} \times 100 \quad (1.3)$$

E_1 ve E_2 iki enantiyomerin mol miktarlarıdır.

% Enantiyosellektivite 1.4 formülüne göre hesaplanır.

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

E_1 = Fazla olan enantiyomerin mol miktarı

Örneğin, 2-bütanol enantiyomerlerinin bir karışımının $+6,76^0$ 'lik özgül çevirme gösterdiğini varsayalım. Bu durumda (S)-(+)-2-bütanolün enantiyomerik fazlalığının %50 olduğunu söyleyebiliriz.

$$\% \text{ Enantiyomerik fazlalık} = \frac{+6,76^0}{+13,52^0} \times 100$$

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 gerçek stereoizomerlik bileşimi 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 çevrilme; enantiyomerlerin d – (+) ve l- (-) formundaki farklılığı belirlemektedir. Fakat bu bize, asimetric merkez atomuna bağlanan grup ve ya atomların uzaydaki dağılımı hakkında bir fikir verir. Bir enantiyomer, tek bağın etrafındaki grupların dönmesi ile değişik konformasyonlarda olabilir, ancak konfigürasyondaki bu değişme için asimetric karbondaki bağların kırılması gerekir. Yani, bir enantiyomerin konfigürasyonu sabittir.

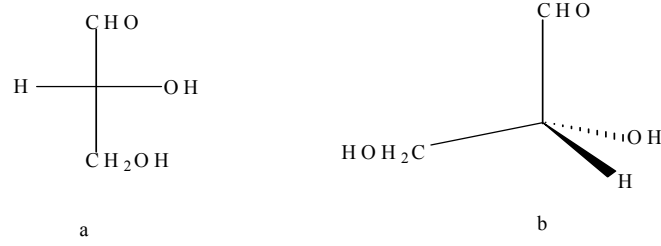
Laktik asidin iki enantiyomerini ele alarak bunu incelersek; Laktik asidin bir formu düzlem polarize ışığı sağa çevirirken, diğer formu düzlem polarize ışığı sola çevirmekte ve sırasıyla (+) – (-) – olarak etiketlenmektedir. Laktik asidin bu iki konfigürasyonunu Şekil 1.1.'de gösterilmiştir. Sorun şu; 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 moleküllerinin 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.

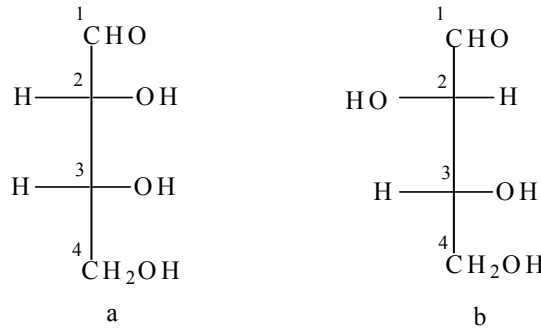
Fischer izdüşümünde, moleküldeki bütün bağlar yatay ve düşey çizgilerle gösterilir. Yatay çizgilerin gözleyene doğru, dikey çizgilerin gözleyenden uzakta olduğu varsayılır. Uzun karbon zinciri dikey olarak gösterilir ve yüksek değerli karbon en üste yazılır. Fischer, konfigürasyonu ayırmada tümüyle keyfi olarak, asimetric merkeze bağlı OH grubunu sağa yönlenen (+)- gliseraldehiti, D-(+)- gliseraldehit olarak isimlendirdi. (+) –glukozu da (+)-gliseraldehit gibi gösterdiğinde, geriye sadece glukozun beşinci karbonundaki asimetric merkez kaldı (Şekil 1.3a,b).



Şekil 1.3. D-Gliseraldehitin a) Fischer izdüşüm formülü b) üç boyutlu 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, D-(+)-Gliseraldehit ve L-(-)- Gliseraldehit referans alınarak, konfigürasyonları D ve L olarak belirlenir. Fischer izdüşüm formülüne göre en yüksek numaralı asimetrik merkeze göre belirlenir. D-Eritroz (a) ve D-Treoz (b) gösterilmiştir (Şekil 1.4a,b).

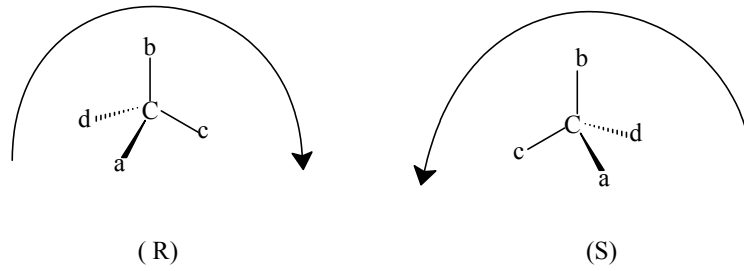


Şekil 1.4. Fischer'e göre D-Eritroz (a) ve D-Treoz (b)

X-Ray analizi ile mutlak konfigürasyonun belirlenebileceğinin ortaya konulmasından önce, Fischer'in ortaya koyduğu D ve L sistemi bağıl konfigürasyon hakkında bilgi vermekteydi. 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 “Cahn-Ingold-Prelog” sistemidir. Burada (R) Latince Rektus (sağ), (S) Latince sinistre (Sol) sözcüklerinin baş harfleridir. (R)-(S) sistemi, konfigürasyonun kesin düzenlenişi hakkında bilgi vermektedir. (R)-(S) sistemi, asimetrik merkeze bağlı grupların önceliğine göre belirlenir (Şekil 1.5.). 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 1.5. Cahn-İngold-Prelog sistemi

Atom numarası en büyük olan atom en öncelikli gruptur.

Örneğin ; $\text{Cl} > \text{S} > \text{F} > \text{O} > \text{N} > \text{C} > \text{H}$

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

Örneğin: $\text{CH}_2\text{Cl} > \text{CH}_2\text{OH} > \text{CH}_2\text{CH}_3 > \text{CH}_3 \dots \text{vb.}$

Çift bağlar, iki tane tek bağ gibi düşünülür.

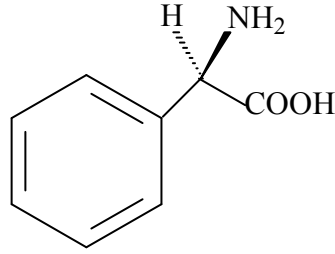
Örneğin: $\text{CH}_2 = \text{CH}_2, \text{CH}_2\text{CH}_3$

Buna göre; $-\text{COOH} > -\text{CO}- > \text{COH} > -\text{CH}_2\text{OH} > -\text{CN} > -\text{C}_6\text{H}_5 > -\text{CH} = \text{CR}_2$ dir.

Şekil 1.5.'e göre konfigürasyon belirlemek gerekirse, en düşük öncelikli grup (d) gözleyenden uzak bir şekilde çizilir ve diğer gruplara bakılır.

Eğer öncelikli gruplar olan $a \longrightarrow b \longrightarrow c$ saat yönünde doğru 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 1.6.) :



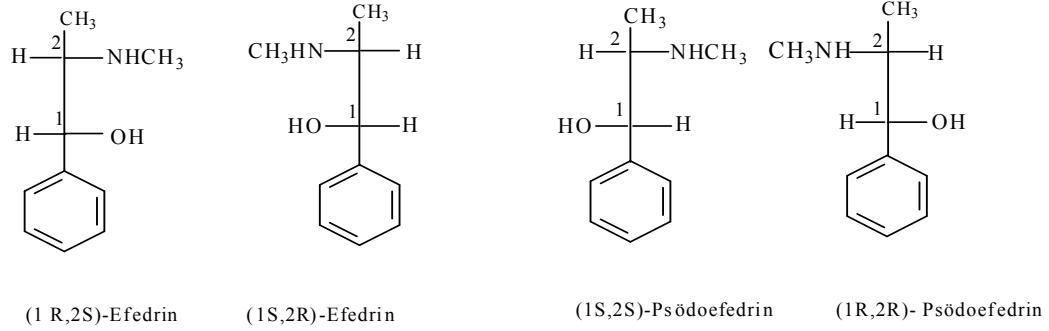
Şekil 1.6 . D-(-)- Fenilglisin

Bu fenilglisin'in ticari kullanımı olan levorotatori yani (-) ya da (l) izomeridir. Fischer izdüşüm formülüne göre D- konfigürasyonundandır ki 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 değildir. Enantiyomer olmayan bu stereoizomerler “ diastereomer ”

olarak adlandırılırlar. Bu tanım yalnızca kiral moleküller 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 1.7.’de iki asimetrik merkezi olan efedrin molekülünü ele alırsak:

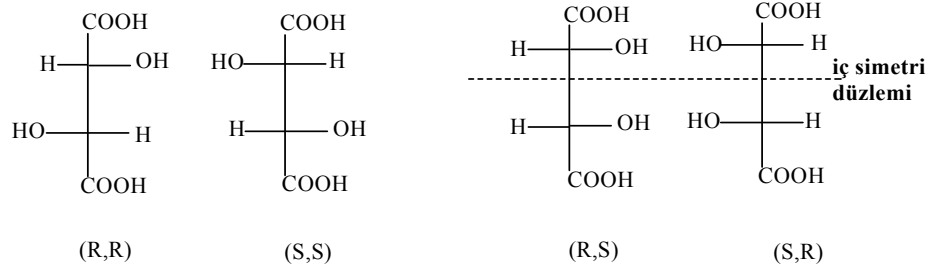


Şekil 1.7. Efedrin molekülünün Fischer izdüşüm formülleri

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

1.1.6. Mezo yapısı

Şekil 1.8.’de iki asimetrik karbon atomu bulunan tartarik asidin 2ⁿ formülüne göre 4 tane stereoizomeri olması gerekirken 3 tane stereoizomeri vardır.



Şekil 1.8. Tartarik asidin 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. Buna tartarik asidin (R,S) ve (S,R) formları, aynı molekül olup Mezo-tartarik asittir [10].

1.2. Kiralite ve Rezolüsyon

Kiral bileşikler etkileşirken enantiyomerlerinden biri özellikle canlı organizmadaki enzimatik reaksiyonlarda seçici davranır. Özellikle kiral ilaçların (R) veya (S) enantiyomerleri vücutta ayrı etkilere sahiptir. Bazen (S) izomerin iyileştirici yönde rol oynadığı bir ilacın (R) izomeri kullanılırsa onarılması güç hasar meydana getirir. Sakatlık veya körlük yapar, öldürücü olabilir. 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 [8]. Ayrıca 45 yıl önce yaşanmış Talidomid olayı bunun en güzel örneğidir [7].

Proteinler oluşurken D ve L-amino asitler karışımı halinde değil, yalnız L-amino asitlerden oluşur. D ve L-amino asitleri bir arada bulunduran protein zincirleri düzenli bir α -sarmal yapı oluşturamaz. Enzimin yapısında D-amino asitler yer alırsa uygun geometrik bir yapı oluşmaz ve enzim etkin katalitik özellik göstermez. Enzimler sarmal yapıyı oluştururken seçici davranırlar.

Bir diğer kaynak asimetric sentezdir. Emil Fischer özel bir şeker serisi üzerindeki çalışmalarıyla 5 karbonlu arabinozdan çıkıp 6 karbonlu şekerlerin eldesinde iki diastereomerik ürün mümkünken yalnız bir tanesinin baskın ürün olduğunu gözlemlemiştir [7].

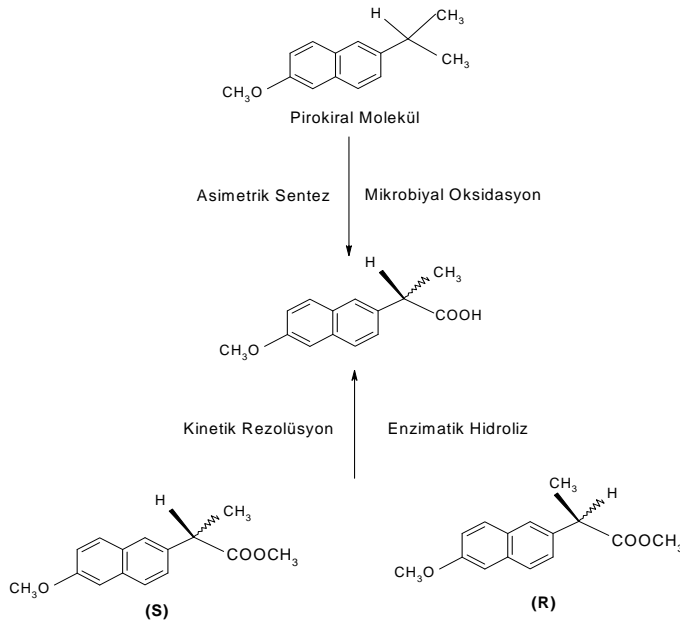
Zayıf elektrolitik etkileşimler, kiral simetrisinin kırılması ve asimetric otokataliz biyomoleküller kiralitenin diğer kaynaklarıdır. Yani kiral bir etki yapılmadıkça akiral bir bileşikten kiral bir bileşiğe geçiş mümkün olmamaktadır.

Eskiden beri kimyacıların çalışma alanlarından birisini de optik izomerlerin ayrılması oluşturmuştur. Rasemik karışımın ayrılması ilk defa 1848'de L. Pasteur tarafından tartarik asidin optik izomerlerinin ayrı ayrı elde edilebildiği bir deneyle gösterilmiştir. Pasteur, tartarik asidin sodyum amonyum tuzlarının farklı yapılarda kristallendiklerini gözlemleyerek bu iki tip kristal yapıyı bir cımbız ve büyüteç kullanarak mekanik yolla ayırabildi. Çünkü bu yöntem, enantiyomerlerin ayrılmasında genel uygulanabilirliğe sahip bir yöntem değildir. Günümüzde en iyi bilinen ve en çok uygulanan yöntem rasemik yapıyı diğer kiral bir bileşiğin tek bir enantiyomeriyle tepkimeye sokmaktır. Bu işlem bir rasemik yapıyı diastereomerler karışımına çevirir. Örneğin rasemik tartarik asit karışımıyla, kiral bir aminin

enantiyomerlerinden biri reaksiyona sokulursa tartarik asitin amin tuzlarının diastereomerlerinin bir karışımı elde edilir. Diastereomerlerin fiziksel özelliklerinin farklılığından faydalanarak bu karışımı ayrılabilir ve sonra tekrar asitle muamele ederek her bir tartarik asit enantiyomeri ayrı ayrı elde edilir [7].

Prokiral bir molekülden mikrobiyal oksidasyonla enantiyomerlerden biri aşırı miktarda elde edilebilir. Çünkü kullanılan bakteri yapısı tek bir enantiyomerden oluştuğu için, ürün de tek bir enantiyomerin fazlaca elde edildiği izomer olacaktır. Bir diğer tabirle enantiyomerik aşırılık (e.e.) adını verdiğimiz bu olay tek bir enantiyomerin yüksek verimle elde edilmesidir.

Aynı şekilde kinetik rezolüsyon yoluyla (R) ve (S) esterlerin enantiyomerik karışımı enzimatik hidrolize uğratarak karboksilik asidin enantiyomerlerden birini bu tip bir yöntemle aşırı oranda elde etmek mümkündür (Şekil 1.9.).



Şekil 1.9. Kinetik rezolüsyon üzerinden asimetrik sentez

Rasemik karışımı ayırmada başvurulan diğer yöntemlerden bir tanesi de kiral sabit bir faz oluşturarak kiral bir kolon hazırlayıp rasemik karışımı bu kolondan hareketli bir fazla elue etmektir. Bu işlem için kullanılan sabit fazları içeren kolonlar (Kiral ligand-değişim kolonu, Kiral afinite kolon, Helikal polimer kolon, Kavite kolon, Pirkle-tip kolon) aşağıda ayrıntılı bir şekilde açıklanmıştır.

1.3. HPLC ve Kiral Kolonlar

1.3.1. HPLC

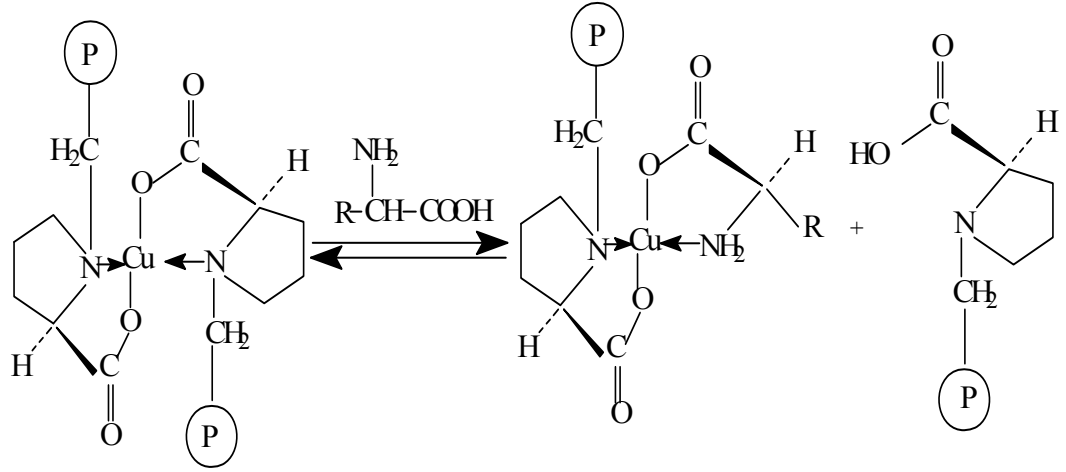
Enantiyomerler aynı adsorpsiyon özelliklerine sahip olduklarından düzenli akiral adsorbentler üzerinden doğrudan kromatografik ayırmayla ayrılamazlar. Ayırma, yalnızca farklı adsorpsiyon özelliklerine sahip olan diasteromerler oluşturularak iki yoldan başarılabilir. Bunlardan biri akiral kolonlar üzerinden ayrılabilen diasteromerik moleküller veren kiral bir reaktif ile aynı türevin prekolonunu gerektirir. Diğeri, yani ikinci yol ise kiral mobil fazın katkı maddesi(CMPA) veya kiral durgun fazın (CSP) oluşumunda bir kiral selektör ile enantiyomerlerin etkileşimi aracılığıyla kısa süreli (geçici) diasteromerler oluşturmaya yöneliktir. Ticari açıdan mevcut olanların çoğu kiral durgun faz olarak tanımlanan geniş bir çeşitlilikle ortaya konuldu ve daha ileri tekniklerle geliştirildi. Kiral durgun fazın farklı tipleri aşağıdaki gibi sınıflandırıldı:

1. Kiral -ligand değişim kolonu
2. Afinite kolonu
3. Sarmal kolon
4. Kavite kolon
5. Pirkle-tip kolon

1.3.2. Kiral kolonlar

1.3.2.1. Kiral Ligand değişim kolonu

Davankov ve arkadaşları Kiral ligand değişim kromotografisinde optik olarak aktif ligandı, amino aside kovalent yolla bağladılar. Klorometillenmiş polistiren esas alındı. Daha sonra Gübitz ve meslektaşları 3-Glisildipropil halkasıyla silikaya bağlanan L-prolini yani silika bağlantılı kirale sabit fazı geliştirdiler. Cu(II) iyonlarıyla adsorbent yüklendikten sonra Rasemat kromatografik ayrılmaya uğratıldı. Her bir amino asit molekülü bir karışım kompleksi oluşturmak için polimere bağlı prolin ligandlarından birinin yerine geçti (Şekil 1.10.). Kısa süreli oluşan diastereomerik kompleksler sırasıyla 8 kcal/mol'den büyük serbest enerji farklılığı gösterebilen (R) ve (S) amino asit enantiyomerleriyle oluşturuldu.



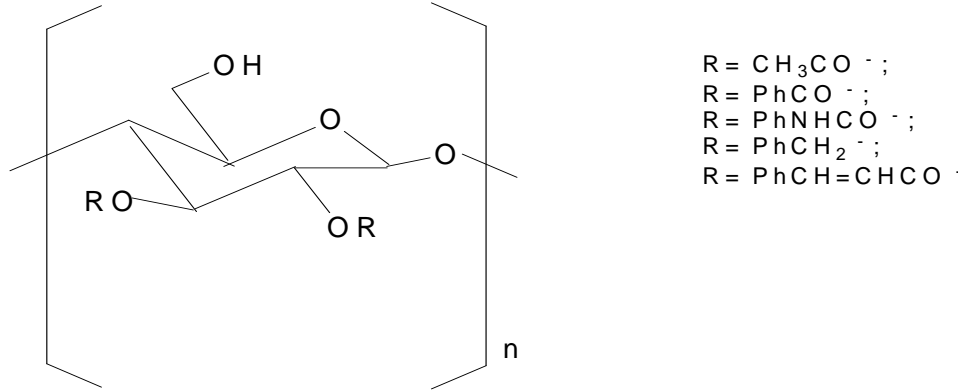
Şekil 1.10. Kiral ligand değişim kromatografisi

1.3.2.2. Afinite kolon

Birkaç serum proteini, farmakolojik açıdan aktif bileşiklerin geniş bir çeşitliliğiyle enantioselektif etkileşimler geçirir. Bu amaçla Bovine serum albümin (BSA) veya HPLC için kullanılan özel bir silikaya bağlı bir α - asit Glukoprotein (AGB) temel esaslı sabit faz geliştirildi. Bunların ikisi de kiral ilaçların ayrılması için gayet uygundur ve sık sık yüksek ayırma faktörleri gösterir. Bir protein için beklenebilecek ayırma; pH, iyonik güç ve sıcaklık gibi birçok parametreye bağlıdır. Bu yüzden, optimum şartları her bir bileşik için ayrı ayrı belirlemek zorunludur.

1.3.2.3. Sarmal Polimer kolon

Sarmal yapıli polimerler sterik etkilerin kaynağı üzerinden enantiyomerleri ayırabilir. Sarmal polimer fazla birkaç selüloz türevi ve poli(trifenilmetil)metakrilat gibi sentetik polimerler içerir. Örneğin farklı selüloz türevleri (Şekil 1.11.) ticari bakımdan mevcut olan ve geniş bir şekilde kullanılan makrogözenekli silika üzerinden adsorplandı.

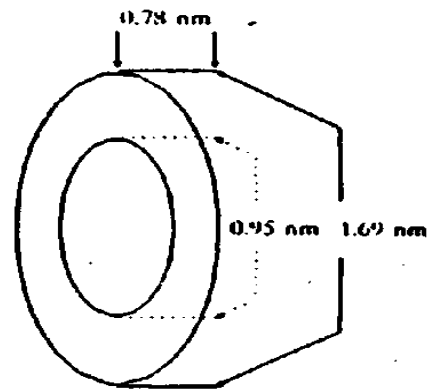
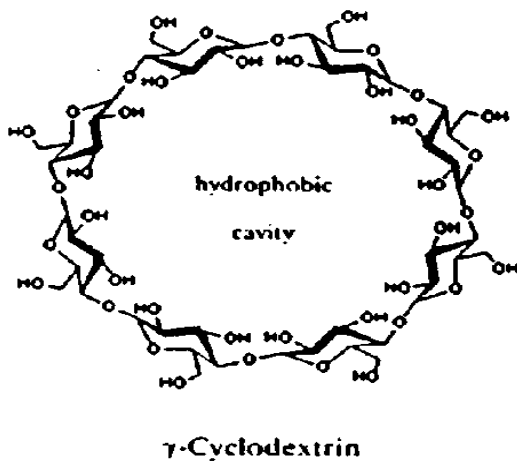
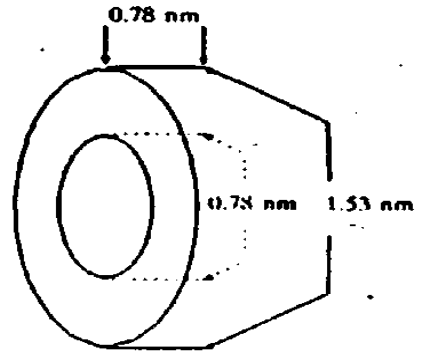
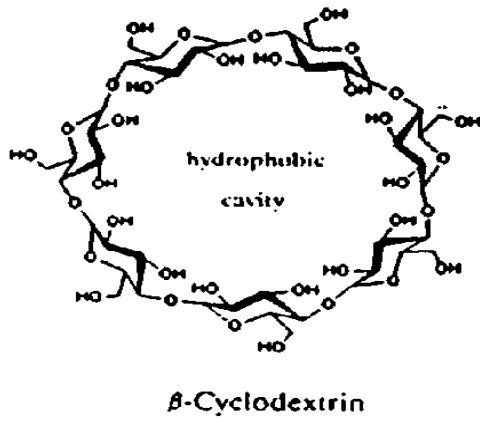
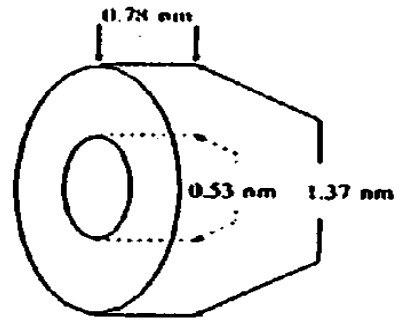
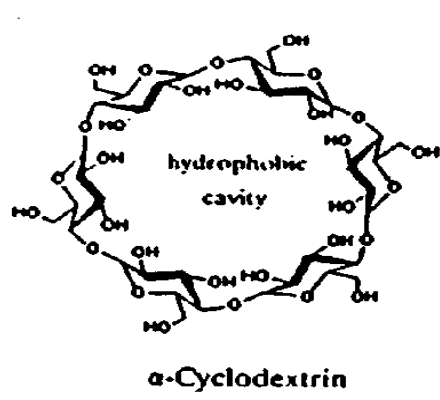


Şekil 1.11. CSPs olarak kullanılan Selüloz türevleri

Poli(trifenilmetil)metakrilat'ın polimerizasyonu spartein-bütillityum gibi kiral iyonik olmayan başlatıcı'nın yanında sarmal yapısı sayesinde kiral olan bir isotaktik polimer verir. Büyük trifenilmetil grupların bir sarmal konformasyon oluşturarak büyüyen polimer zincirini yönlendirdiği tahmin edilmektedir. Rasemat'ların geniş bir oranda iyi ayırımları makrogözenekli silika üzerinde adsorplanan bu polimerleri kullanarak elde edildi.

1.3.2.4. Kavite kolon

Siklodekstrinler 1,4-konumu aracılığıyla bağlanmış alfa -D-Glukoz'dan oluşmuş halkalı oligosakkaridlerdir. En yaygın olanları iç boşlukları hidrofobik bir halka biçiminde olan ve sırasıyla 6,7 ve 8 glukoz birimleri içeren alfa – beta ve gama Siklodekstrinlerdir (Şekil.1.12.).

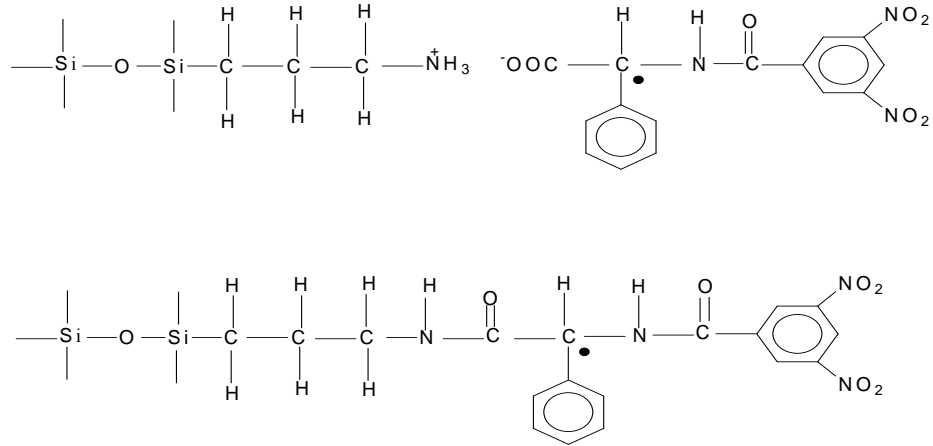


Şekil 1.12. Siklodekstrinlerin yapıları

Çeşitli bileşikler kompleks verirken bu kaviteye uygun büyüklükte iseler etkileşim gerçekleşebilir. Yoksa kompleks oluşmaz. Beta ve alfa formlar geniş uygulanabilirliği bulunan kiral sabit fazlar oluşturmak için silikaya başarılı bir şekilde bağlandı. Onlar diğer bir çok kiral sabit fazlar'dan ve mevcut olan hazır satın alınan standart kolonlardan daha ucuzdur.

1.3.2.5. Pirkle tip kolon

Pirkle ve arkadaşları amino asit türevlerinden ibaret bir seri CSP (Kiral sabit fazlar) kolon geliştirdiler [11]. Bu, silikaya tutturulmuş hem iyonik hem de kovalent etkileşmeyle doğal N-(3,5-dinitrobenzoil)fenilglisin türevlerinden oluşan sabit bir fazdır. Bu anlamda birçok kolon analitik amaçlı veya sentetik amaçlı olarak geliştirilerek piyasaya sürüldü ve geniş uygulama sahası buldu[12]. Ayrılmanın mekanizması; yük-transfer etkileşimi, hidrojen bağı oluşumu, dipol-iyon etkileşimleri veya sterik nedenlerden kaynaklanan etkileşimler olabilir (Şekil 1.13.).



Şekil 1.13. Pirkle-tip kiral sabit faz

Bu düşünceden hareketle sabit faz olarak Sepharose-4B maddesine tutturulmuş bir L-tirozin ünitesine, uzatma kolu olarak asidik veya bazik amino asitlerin aromatik amino türevlerini diazolama yoluyla bağlandı. Bu kolondan hareketli faz olarak değişik pH'larda tampon çözeltiler kullanılarak biyolojik öneme sahip bazı aminler enantiyomerlerine ayrılmaya çalışıldı. HPLC yöntemiyle de kiral UV dedektör kullanarak enantiyomerik saflık verimleri tayin edildi. Enantiyomerik saflık tayinleri birkaç yolla yapılır. Bunlardan en çok kullanılanlardan biri optik çevirme açısını ölçerek saflık derecesini tayin etmektir. Bu işler için çevirme açısından faydalanır ve polarimetre yardımıyla optikçe saflık şu formüle göre hesaplanır;

$$\% \text{ Optikçe Saflık} = \frac{[\alpha]}{[\alpha]_o} \times 100$$

$[\alpha]$: Enantiyomerik karışımın optik çevirme açısı; $[\alpha]_o$: Saf enantiyomerin çevirme açısı

Buradan enantiyomerik fazlalık bulunur:

$$\% \text{ e.e.} = \frac{(\text{R})-(\text{S})}{(\text{R})+(\text{S})} \times 100 \quad (\text{R} > \text{S} \text{ için})$$

Örneğin R ve S karışımından oluşan bir numunenin R ve S oranı (R/S : 95/5) ise, % e.e. = 90 bulunur.

Bir diğer analiz metodu HPLC yöntemidir. Uygun sabit fazdan numune elue edilirken enantiyomerlerden birinin sabit fazda daha fazla alikonması prensibine dayanır. Bir diğer metot, bozunmaya uğramadan kolaylıkla buhar fazına geçebilen bileşikler için gaz kromatografisi (GC) veya gaz-likit kromatografisi (GLC) yöntemleridir.

Bir başka tayin metodu ise, NMR teknikleridir. Bu yöntem; kiral lantanit kaydırma reaktifleri kullanılarak enantiyomerlerden birinin diğerine göre farklı etkileşiminden dolayı NMR’da farklı bölgede sinyal vermesi prensibine dayanır. Kiral kaydırma reaktif kullanımında iki enantiyomerin protonlarına ait pikler aynı kimyasal kayma (δ_{ppm}) değerine sahipken, ortama kaydırma reaktifi ilave edildikten sonra aynı protonlara ait iki farklı kimyasal kayma değerini ortaya çıkmaktadır

2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Yapacağımız çalışma ile tıpatıp aynı olmamakla beraber son zamanlarda bu alanda benzer çalışmalar yapılmaktadır ve kromatografik ayırmalara literatürde sıklıkla rastlanmaktadır. Rasemik karışımın ayrılması günümüzde değişik teknikler kullanılarak yapılmaktadır. Bunlardan bir tanesi de kromatografik ayırmalardır. Bunlardan Pirkle-tip kolon kromatografisi genelde amino asit türevlerinin silikajele bağlanarak oluşturduğu bir seri değişik sabit fazın dolgu maddesi olarak kullanılmasıyla geliştirilmiş bir tekniktir[13]. Bu teknikte N-(3,5-dinitrobenzoil)-fenilglisin silikajele kovalent bağla bağlanarak sabit faz oluşturulur. Bu kolonlar ticari yolla temin edilebildiği gibi araştırmacılar tarafından da preparatif amaçlı veya analitik amaçlı hazırlanabilirler. Kolonda enantiyomerik ayrılmanın mekanizması; yük transferi yoluyla etkileşim, hidrojen bağı oluşturularak etkileşim, dipol oluşturularak etkileşim ve sterik yönden etkileşim gibi birçok kombine faktörlerle açıklanmaktadır [14]. Pirkle ve arkadaşları (*S*)-leusin ve (*R*)-fenilglisinin N-(3,5-dinitrobenzoil) ile olan reaksiyonundan elde ettikleri türevlerden yola çıkarak Pirkle-tip kiral sabit fazlar hazırladılar ve hazırladıkları kiral sabit fazlar ile N-aril- α -amino esterleri ve 2-karboalkoksiindolin'lerin enantiyomerlerinin rezolüsyonunda kullandılar[15]. Hyun ve arkadaşları naproxen'in amit türevlerinin rezolüsyon çalışmalarında Pirkle-tip π -asidik kiral sabit fazlar kullandılar[16]. Kato ve arkadaşları 4-floro-7-nitro-2,1,3-benzoksadiazol (NBD-F) 'den elde ettikleri türevlerden amino asit enantiyomerlerinin rezolüsyonu için uzun alkil zincirleri içeren yeni Pirkle-tip kiral sabit fazlar hazırladılar [17]. Hyun ve arkadaşları (*S*)-leusin'den çıkarak sentezledikleri türevlerle yeni Pirkle-tip kiral sabit fazlar hazırlayarak 2-hidroksikarboksilik asidin rezolüsyon çalışmalarını gerçekleştirdiler

[18]. Kraml ve arkadaşları ticari olarak bulunan rasematların karbobenziloksi türevlerinin bir serisini hazırladılar. Bu hazırladıkları bu seri bileşiklerle çeşitli mobil fazlar, polisakkaritler ve Pirkle-tip kiral sabit fazlar kullanarak enantioselektif kromatografi yöntemiyle analizler yaptılar. Bu analizler sonucunda karbobenziloksi'den elde edilmiş bileşiklerin HPLC ve SFC şartları altında iyi bir kiral rezolüsyon gösterdiklerini buldular [19]. Yılmaz ve arkadaşları dolgu maddesi olarak Sepharose-4B kullanarak yeni geliştirdikleri Pirkle-tip bir sabit faz üzerinden biyolojik öneme sahip β -metilfeniletilaminin rezolüsyonunu gerçekleştirdiler [20]. Pirkle ve arkadaşları naproxen ve diğer steroidal olmayan anti inflamatuvar ilaçların enantiyomerlerinin ayrılmasında son zamanlarda geliştirmiş oldukları kiral selektorleri, mutlak konfigürasyonun belirlenmesi için kullandılar [21]. Kühn ve Wiesner konjuge bir dien sistemi içeren monohidroksipolienoik yağ asitlerinin enantiyomerlerini Pirkle-tip bir sabit faz olan (*R*)-(-)-N-(3,5-dinitrobenzoil)- α -fenilglisin (DNBPG) üzerinden ayırmayı başardılar [22].

3. MATERYAL VE METOD

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada; Sigma-Fluka ve Merck firmalarınca ticari olarak satılan:

- *p*-nitrobenzilbromür, 3-hidroksibutirik asit, R(-)-2-amino-1-bütanol, L-tirozin, sodyum hidroksit, hidroklorik asit, sülfürik asit, Pd/C, hidrazin hidrat kullanıldı.
- Çözücü olarak aseton, etanol, metanol, metilen klorür, kloroform, petrol eteri, dietileter ve diğer organik çözücüler kullanıldı.
- Ayrıca ¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları için çözücü olarak DMSO -d₆ ve CDCl₃ kullanıldı.
- Kolon dolgu maddesi olarak aktive edilmiş Sepharose-4B kullanıldı.

3.2. Kullanılan Cihazlar

- Polarimetre (Perkin Elmer)
- Peristaltik pompa (Watson Marlow 323)
- Magnetik karıştırıcı (Heidolph 1011)
- Evaporatör (Heidolph 4001)
- pH-metre (WTW pH 526)
- UV-spektrofotometresi λ-35 (Perkin Elmer)
- 400 MHz ¹H-NMR spektrometresi (Bruker AC model)
- Manyetik ve mekanik karıştırıcı.
- Sıcaklık ölçümleri için termometre.
- Isıtma için; su banyosu ve yağ banyosu.
- Otomatik pipet ve pipet uçları.

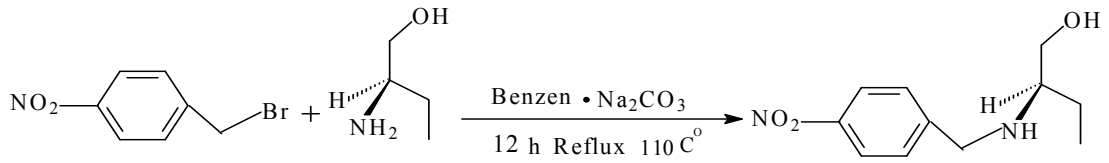
3.3. Metod

Pirkle tip kiral kolonun hazırlanması ve hazırlanması için gerekli olan N-*p*-aminobenzil-(*R*)-2-amino-1-butanol'un sentezi deneysel kısımda verilmiştir.

4. DENEYSEL KISIM VE BULGULAR

4.1. N-*p*-nitrobenzil-(*R*)-2-amino-1-butanol sentezi

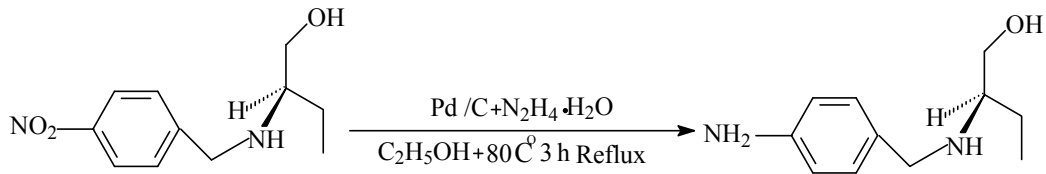
4.46 g (*R*)-2-amino-1-butanol ve 2.7 g 4-nitrobenzilbromür 100 mL benzende çözüldü. Azot atmosferi altında çözeltiliye 1.3 g Na₂CO₃ ilave edilip yağ banyosunda 110⁰C'de 12 saat reflux edildi. Daha sonra çözelti süzülüp çözücü uçuruldu. Geriye kalan ham ürün benzen ve diklormetan karışımında kristallendirildi [23]. E.N.:113⁰C, Verim:%70, Renk: Beyaz



Şekil 4.1. N-*p*-nitrobenzil-(*R*)-2-amino-1-butanol

4.2. N-*p*-aminobenzil-(*R*)-2-amino-1-butanol sentezi

1,2 g N-*p*-nitrobenzil-(*R*)-2-amino-1-butanol alınıp 100 ml etanolde çözüldü. Çözeltiliye 0.15 g Pd/C eklenip su banyosunda 30 dakika reflux edildi. Daha sonra damlatma hunisi ile 25 ml hidrazinhidrat yavaş yavaş damlatıldı. 3 saat reflux edildikten sonra çözelti süzülüp evapore edild. Benzende kristallendirildi [24].E.N.: 253⁰C, Verim: % 80, Renk: Sarı



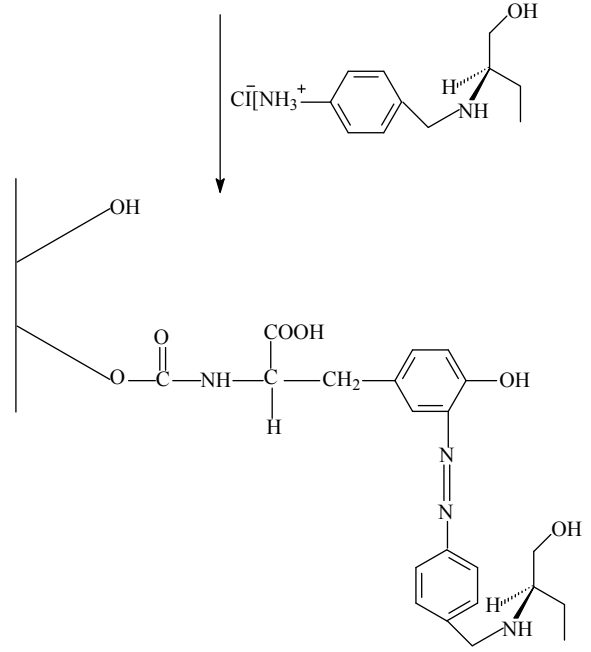
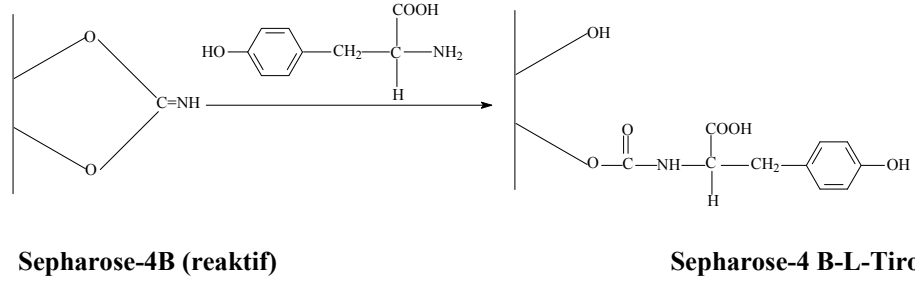
Şekil 4.2. N-*p*-aminobenzil-(*R*)-2-amino-1-butanol

4.3. Kiral Kolonun Hazırlanması ve Enantiyomerik Verimin Belirlenmesi

4.3.1. Kiral kolon hazırlanması

Kiral kolon hazırlanırken öncelikle; 5.0 g aktifleştirilmiş Sepharose-4B kolon dolgu maddesi saf suyla şişirildi. Daha sonra nuçe erleni kullanılarak sırayla saf su ve 0.2 M pH 10 bikarbonat tamponu ile birkaç kez yıkandı. Dolgu maddesi bir behere alındı ve bir magnetik karıştırıcı üzerinde 20 ml suda çözülmüş 80 mg L-tirozin çözeltisi yavaş yavaş ilave edildi. 2 saat buzdolabında (4 °C) magnetik karıştırıcı üzerinde karıştırıldı. Daha sonra 16 saat karıştırılmadan buzdolabında bekletildi. Buzdolabından alınan dolgu maddesi nuçe erleni ile 0.2 M pH 8.8 bikarbonat tamponu ile birkaç kez yıkandı ve 40 ml tampon içinde bir behere alındı.

50 mg N-*p*-aminobenzil-(*R*)-2-amino-1-butanol, 1 M 10 ml HCl'de soğutulularak çözüldü. Bu karışıma 5 ml suda çözülmüş 100 mg NaNO₂ çözeltisi 0 °C 'ta yavaş yavaş ilave edildi. Daha sonra bu karışım yukarıda anlatılan dolgu maddesine (40 ml tampon içindeki) magnetik karıştırıcı üzerinde ilave edildi. pH 9.5'a getirildi (1 N NaOH ilave ederek). 3 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Nuçe erleninde suyla yıkandı ve 50 ml 0.2 M fosfat tamponuna alındı (pH 6). Kolona 15-20 ml fosfat tamponu koyuldu ve pipetle yukarıda hazırlanan dolgu maddesi çözeltisi yavaş yavaş ilave edildi. Daha sonra peristaltik pompaya bağlanarak 50-60 ml fosfat tamponu (0.2 M pH 6) kolondan geçirilerek kolon dengeye getirildi. Bu şekilde kolon hazırlanmış oldu. Kolonun hazırlanışı Şekil 4.3'de gösterilmiştir [12,20,25,26,27,28]:

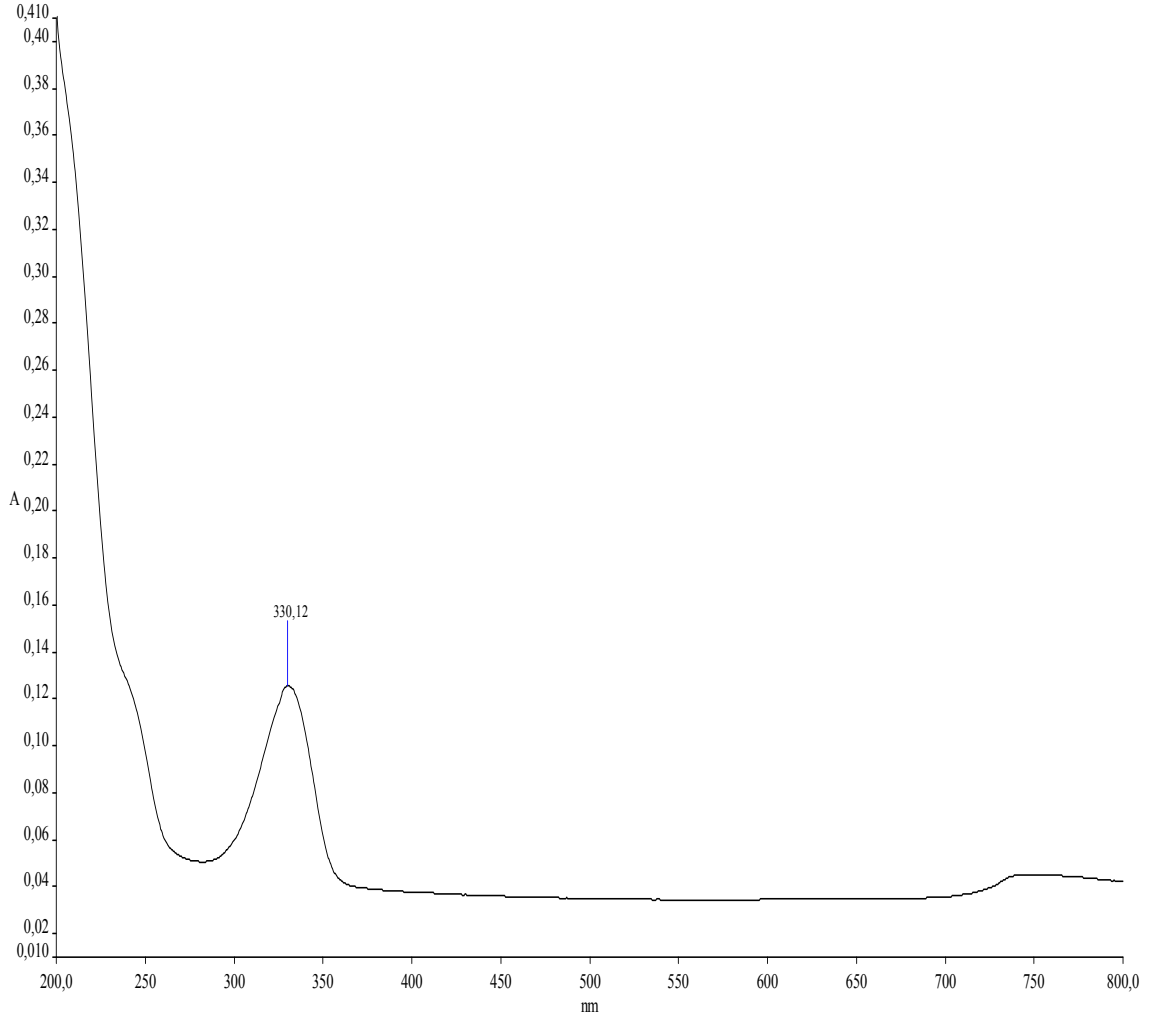


Şekil 4.3. N-*p*-aminobenzil-(*R*)-2-amino-1-butanol kullanılarak kiral sabit fazın hazırlanması

4.3.2. Rasemik karışımın kolona tatbik edilmesi

Öncelikle 3-Hidroksibütirik asit'in max absorbans değeri belirlendi. Bunun için 0,1 g 3-hidroksibütirik asit, 100 mL saf suda çözerek karışım hazırlandı. Spektrofotometre ile 800-200 nm arasında tarama yapılarak maddenin max absorbans gösterdiği dalga boyu belirlendi. Şekil 4.4. de görüldüğü gibi 3-

hidroksibütirik asit için max absorbans değeri 330 nm'de bulundu. Bundan sonra yapılan çalışmalarda 3-hidroksibütirik asidin absorbans değerleri 330 nm de okundu.



Şekil 4.4. 3-Hidroksibütirik asidin 800-200 nm arasında spektrofotometreyle yapılan absorbans taraması

3-hidroksibütirik asidin rasemik karışımı (0,1 g/5 mL tampon) kolona tatbik edildi ve pH 6 fosfat tamponu(0,2 M) ile yürütüldü. Akış hızı 5 rpm/dk olarak peristaltik pompa ile ayarlandı. Her bir tüp 3 mL olacak şekilde toplam 12 tüp elüat alındı.

Bütün tüplerdeki karışımların absorbans değerleri 330 nm de spektrofotometreyle belirlendi. Tablo 4.1 de görüldüğü gibi 6. 7. ve 8. tüplerde maddenin bulunduğu (3-hidroksibütiri asit) tespit edildi.

Aynı şekilde pH 7 ve pH 8 posfat tamponları kullanılarak yapıldı. Ancak bir sonuç elde edilemedi.

Tablo 4.1 pH 6 fosfat tamponu kullanarak kolondan alınan elüatların (3-hidroksibütirik asit) absorbans değerleri

Tüp No	Absorbans ($A_{330 \text{ nm}}$)
1	0
2	0
3	0
4	0
5	0
6	0,35
7	0,97
8	0,45
9	0
10	0
11	0
12	0

4.3.3. Polarimetre ile Kiral (R) ve (S)-3-hidroksibütirik asidin Çevirme Açısının Belirlenmesi

Saf (R) ve (S)-3-hidroksibütirik asitlerden 0,1'er g alındı ve ayrı ayrı 5'er mL posfat tamponunda çözüldü. Polarimetre ile çevirme açıları belirlendi.

(S)-3-hidroksibütirik asit için $\alpha = +22^\circ$

(R)-3-hidroksibütirik asiti için $\alpha = -22^\circ$

Kolondan alınan elüat(6. 7. ve 8. tüp) karışımlarının çevirme açıları ise;

6.tüp $\alpha = +2,5^\circ$

7.tüp $\alpha = +1,5^\circ$

8.tüp $\alpha = -0,3^\circ$

4.3.4. Enantiyometrik Fazlalığın Belirlenmesi

Gözlenen Özgül Çevirme Açısı

% Enantiyometrik Fazlalık = _____ x 100

Saf enantiyomerin Özgül Çevirme Açısı

Buna göre;

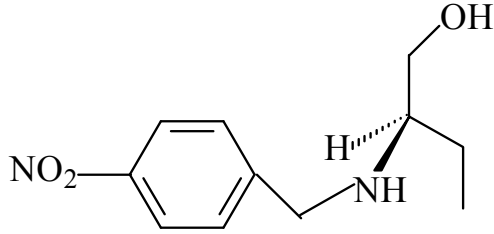
+ 2,5°

% Enantiyometrik Fazlalık = _____ x 100 = 11,4 olarak belirlendi.

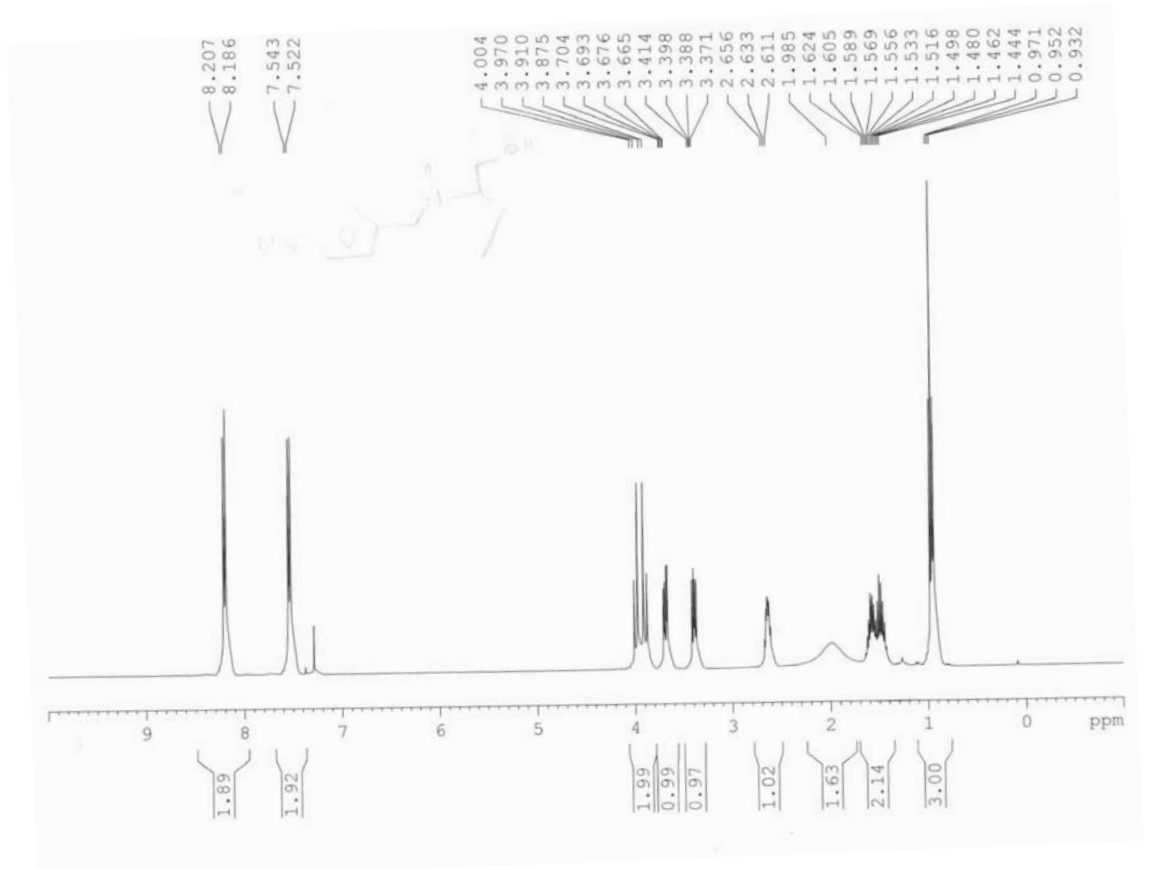
+ 22°

5.SONUÇ VE TARTIŞMA

5.1. N-*P*-Nitrobenzil-(*R*)-2-Amino-1-Butanol İçin Spektroskopik Sonuçlar

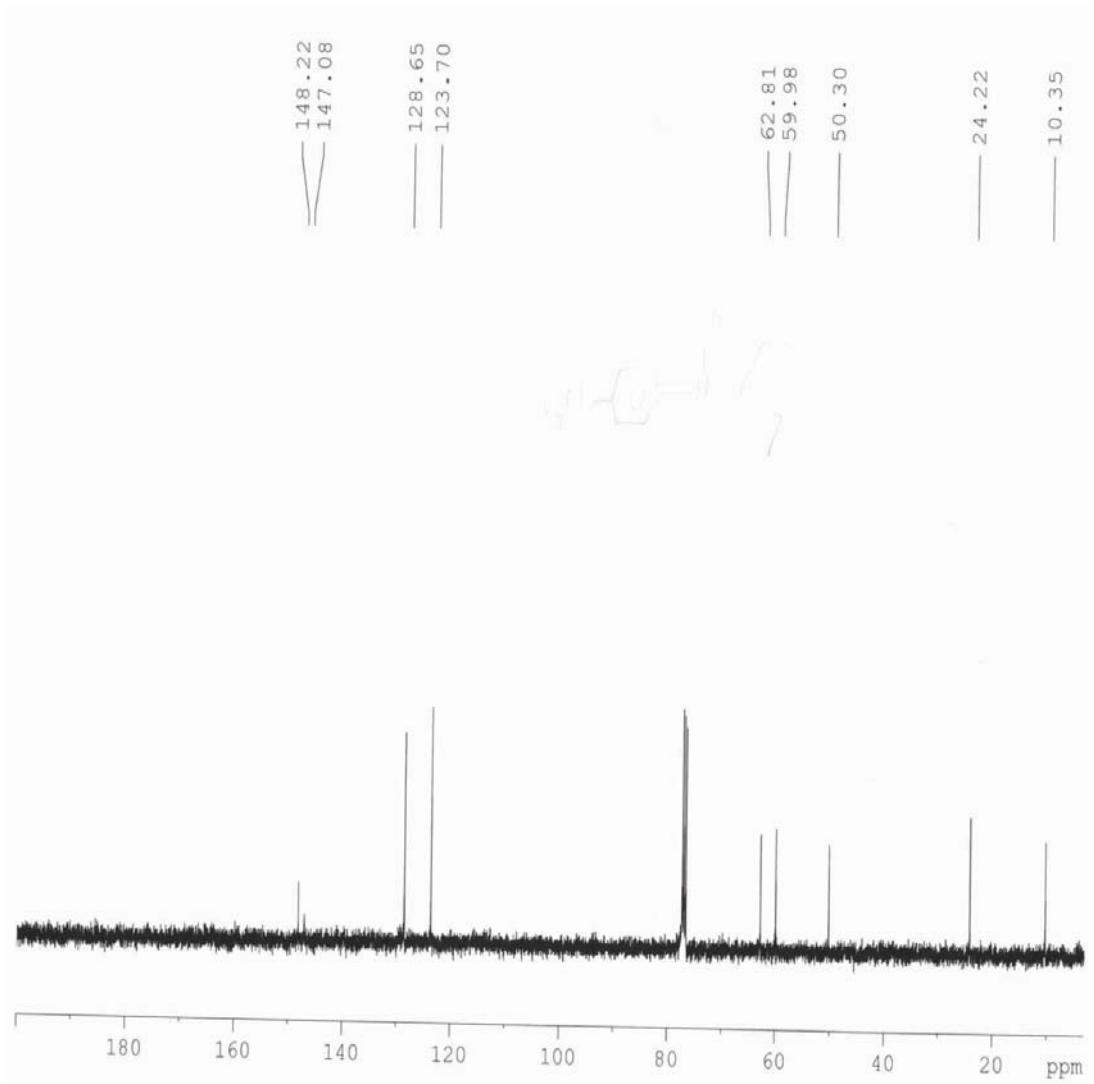


¹H NMR Spektrum Sonuçları:



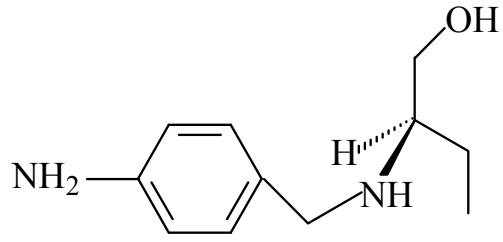
Şekil 5.1. N-*p*-nitrobenzil-(*R*)-2-amino-1-bütanol'un ^1H NMR Spektrumu

¹³C NMR Spektrum Sonuçları:

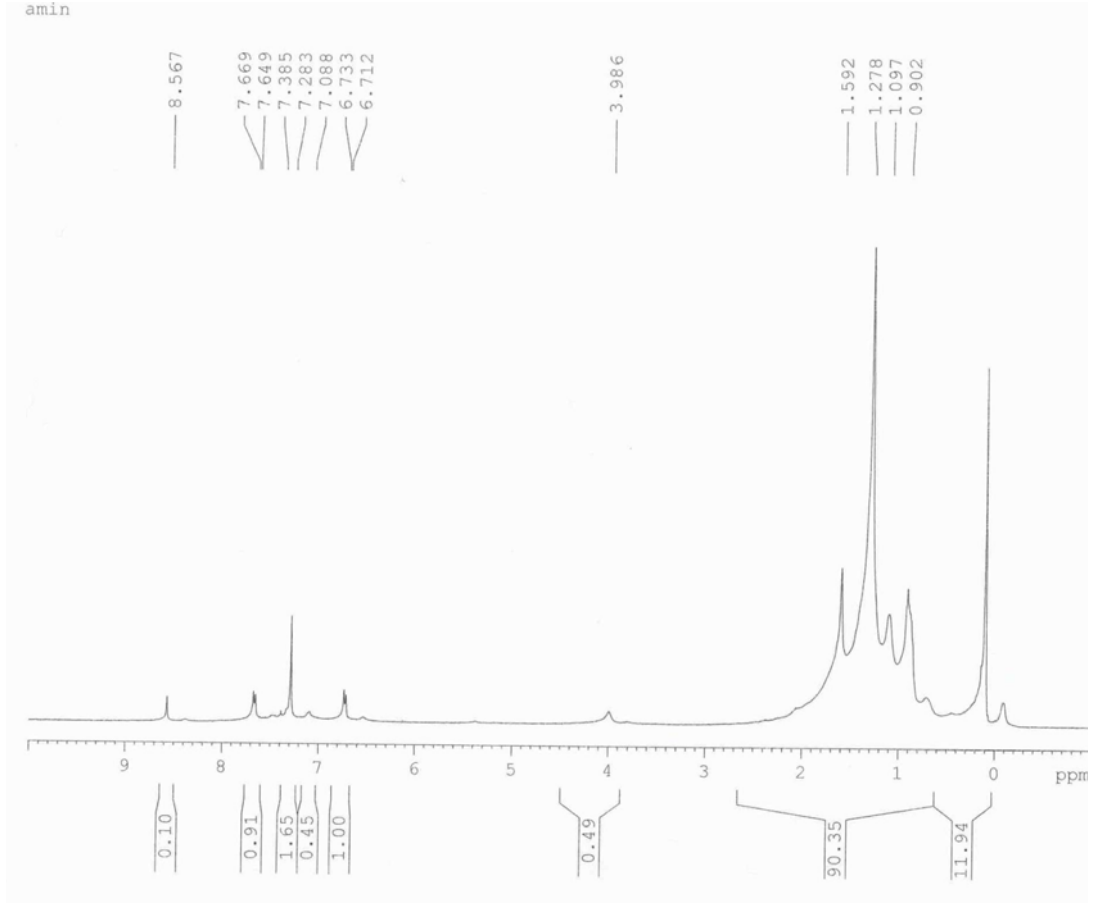


Şekil 5.2. N-*p*-nitrobenzil-(*R*)-2-amino-1-bütanol'un ¹³C NMR Spektrumu

5.2. N-*P*-Aminobenzil-(*R*)-2-Amino-1-Butanol İçin Spektroskopik Sonuçlar

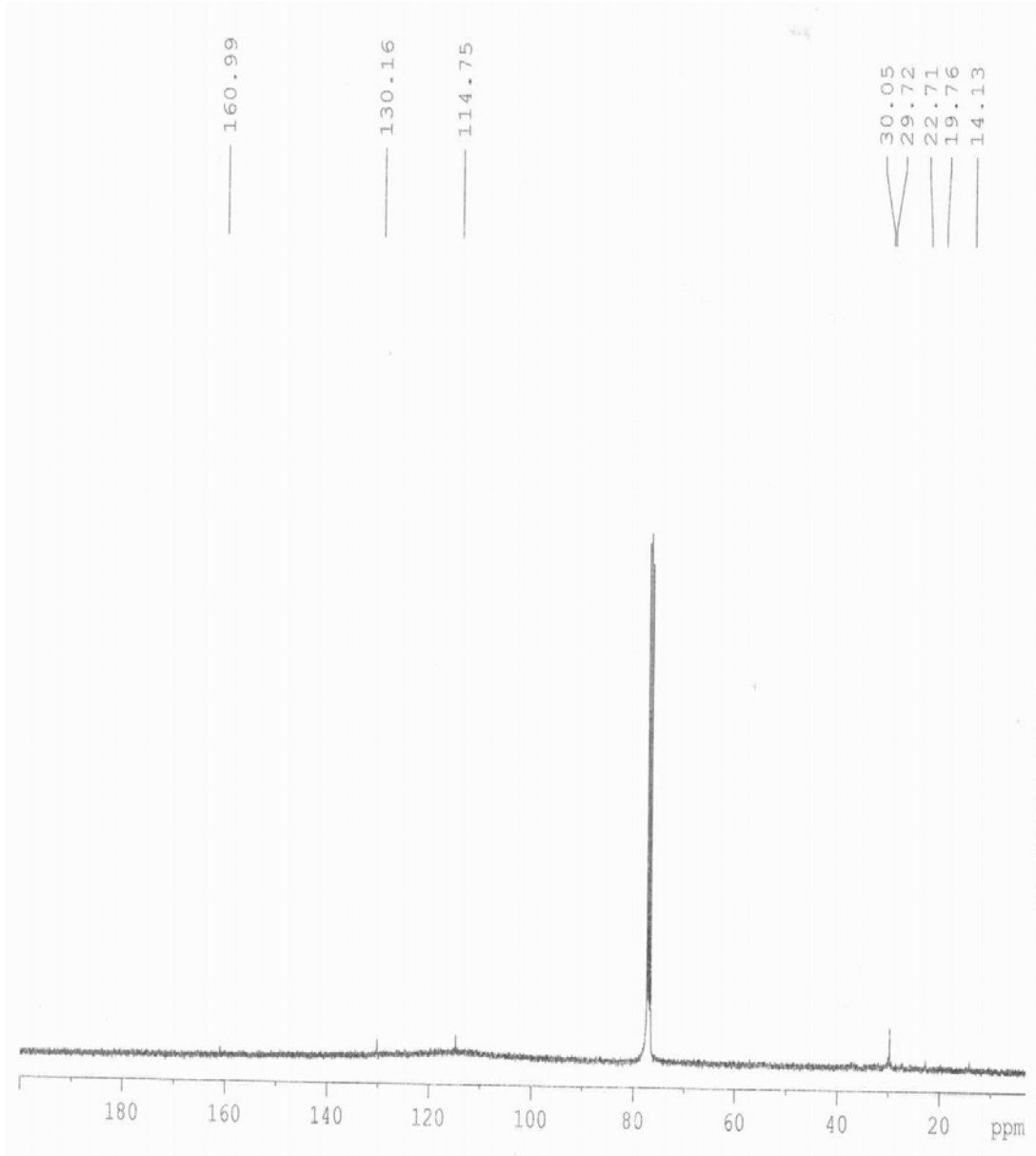


¹H NMR Spektrum Sonuçları:



Şekil 5.3. N-*p*-aminobenzil-(*R*)-2-amino-1-bütanol'un ^1H NMR Spektrumu

¹³C NMR Spektrum Sonuçları:



Şekil 5.4. N-*p*-aminobenzil-(*R*)-2-amino-1-bütanol'un ¹³C NMR Spektrumu

5.3.Enantiyomerik Verim

Bu çalışmada kiral 3-hidroksibütirik asit rasemik karışımı Pirkle tip kolon kromatografisi yöntemiyle enantiyomerlerine ayırmaya çalışılmıştır. Bu amaçla kolon dolgu maddesine yapısında amino grubu bulunan bir kiral organik madde ligant olarak takılmıştır. Ligand olarak takılan organik bileşik pH 6,7 ve 8’ de proton alarak katyon halindedir. Aynı pH’larda enantiyomerlerine ayırmak istenilen kiral 3-hidroksibütirik asit proton vererek anyon halindedir. Dolayısıyla kolona tatbik edilen anyonik bileşik kolon dolgu maddesinin katyonik ligantı tarafından tutulur. Fakat kolon tarafından tutulan kiral bileşiğin bir enantiyomeri diğer enantiyomere göre farklı oranda olması beklenir.

Çalışmamızda 0.2 M pH=6 fosfat tamponu ile yapılan ayırma işleminde (S)-3-hidroksibütirik asidin (R)-3-hidroksibütirik aside oranla daha fazla kolon tarafından tutulduğu gözlenmiştir. Kolondan alınan elüatın 6. ve 7. tüplerinde (S)-enantiyomerin olduğu, 8. tüpte ise (R) – enantiyomerin olduğu polarimetre ile yapılan ölçümlerde bulunmuştur. Enantiyomerik fazlalık 11.4 olarak bulunmuştur. Bu oran fazla yüksek olmamasına rağmen , hazırladığımız kolonun rasemik karışımın enantiyomerlerine ayırma kapasitesine sahip olduğu gözlenmiştir.

Aynı çalışmanın pH 7 ve 8’de sonuç vermemesi ilginç bulunmuştur. Çünkü bu pH’larda ligant katyonik, 3-hidroksibütirik asit anyonik karakterdedir. Fakat pH=6 tamponunda elde edilen değere benzer veya yakın bir sonuç elde edilememiştir.

6. KAYNAKLAR

1. BENCINI, A., BENELLI, C., and GATTESCHD, I., 1984. Coordination Chemistry Reviews, 60,131-169.
2. NIMURA, N., and KINOSHITO, T., 1996. Journal Chromatography A, 352,169-177.
3. YAMAGISHI, A., TANIGUCHI, M., IMAMURA ,Y., and SATO, H., 1996. Applied Clay Science, 11,1,1-10.
4. NATALINI, B., NARINOZZI, M., BADE, K., SARDELLA, R., THOMSEN, C., and PELLICCIARI, R.,2004. Chirality, 16,314-317.
5. BOJASKI, J., ABOUL-ENEIN, H. Y., and GHANEM. A., 2005. Current Analytical Chemistry,1, 59-77.
6. KODAMA, S., YAMAMMATO, A., MATSUNAGA, A., and HAYAKAWA, K., 2003. Electrophoresis, 24,2711-2715.
7. SOLOMONS, G., and FRYHLE, C. B. 2000. Organic Chemistry. John Willey & Sons. Inc. Seventh Edition.
8. SHELDON, R. A., 1992. Chirotecnology. Marcel Dekker, Inc, 53-61 and 27-33, New York, USA
9. KUBOTA, T., YAMAMMATO, C., and OKAMOTA, Y., 2004. Chirality, 16,309-313.
10. TÜMERDEM, R., 2004 . Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Diyarbakır, 90 s.
11. PIRKLE, W. H., and FINN, J., 1983. Asymmetric Synthesis 1,87-124, New York, USA

12. ARSLAN, O., NALBANTOĞLU, B., DEMİR, N., ÖZDEMİR, H., and KÜFREVIÖĞLU, İ., 1996. Turkish Journal of Medical Sciences, 26,163-166.
13. SHELDON, R. A.,1992. Chirotechnology, ed: Marcel Dekker Inc, New York, 190-191.
14. KUBOTA, C., YAMAMATO, C., OKAMOTA, Y., 2004. Chirality, 16,309-313
15. PIRKLE, W.H., POCHAPSKY, T.C., MAHLER, G.S.,1985. FIELD, R.H., Journal of Chromatography A, 348, 89–96.
16. HYUN, M. H., CHO, Y.J., MİN, C.S., RYOO, J.J.,1995. Bulletin of the Korean Chemical Society, 16, 764–768.
17. KATO, M., FUKUSHİMA, T., SANTA, T., NAKASHİMA, K., NİSHİOKA, R., IMAİ, K.,1998. Analyst, 123, 2877–2882
18. HYUN, M. H., KANG, M.H., HAN, S.C., 2000. Journal of Chromatography A, 868, 31–39
19. KRAML, C.M., ZHOU, D., BYRNE, N., MCCONNELL, O., 2005. Journal of Chromatogr A, 1100,1, 108–115.
20. YILMAZ, H., TOPAL, G., ÇAKMAK, R., HOŞGÖREN, H., 2010. Chirality,22, 2, 252-257.
21. PIRKLE, W. H., WELCH, C. J., WILSON, S.,1994.Chirality, 6, 8, 615-622
22. KÜHN, H., WIESNER, R.,1990. Journal of Chromatography A, 520, 391-401.

23. TOGRUL, M., AKSIN, M., HOSGOREN, H.,2005.Tetrahedron: Asymmetry,
16,16, 2771-77
24. TEMEL, H., ILHAN, S.,2007. Russian Journal of Chemistry, 33,12, 918-
921.
25. O, OZENSOY., ARSLAN, O., SINAN, S.O., 2004. Biochemistry,
(Moscow), 69,2, 216-219.
26. MENG, Q-Q., WANG, J-X., MA, G-H., SU, Z-GUO.,2009 Process
Biochemistry, 44,5, 562-571.
27. WILCHEK, M., MIRON, T.,2003. Journal of Biochemical methods, 55,1,67-
70.
28. ZHANG, Y., SINGH, V.K., YANG, V.C.,1998. J Biomed Mater Res.,42,2,
182-187.

7. TABLO LİSTESİ

1. Tablo 4.1 pH 6 fosfat tamponu kullanarak kolondan alınan elüatların (3-hidroksibütirik asit) absorbands değerleri

8. ŞEKİL LİSTESİ

1. Şekil 1.1. Laktik asidin Enantiyomerleri
2. Şekil 1.2. Düzlem polarize ışığın çevrilme yönleri
3. Şekil 1.3. D-Gliseraldehitin a) Fischer izdüşüm formülü b) üç boyutlu gösterim
4. Şekil 1.4. Fischer'e göre D-Eritroz ve D-Treoz
5. Şekil 1.5. Cahn-İngold-Prelog sistemi
6. Şekil 1.6. D-(-)- Fenilglisin
7. Şekil 1.7. Efedrin molekülünün Fischer İzdüşüm formülleri
8. Şekil 1.8. Tartarik asidin stereoizomerleri
9. Şekil 1.9. Kinetik Rezolüsyon üzerinden Asimetrik sentez
10. Şekil 1.10. Kiral ligand değişim kromatografisi
11. Şekil 1.11. CSPs olarak kullanılan Selüloz türevleri
12. Şekil 1.12. Siklodekstrinlerin yapıları
13. Şekil 1.13. Pirkle-tip kiral sabit faz
14. Şekil 4.1. N-*p*-nitrobenzil-(*R*)-2-amino-1-bütanol sentezi
15. Şekil 4.2. N-*p*-aminobenzil-(*R*)-2-amino-1-bütanol sentezi
16. Şekil 4.3. N-*p*-aminobenzil-(*R*)-2-amino-1-bütanol kullanılarak kiral sabit fazın hazırlanması
17. Şekil 4.4. 3-Hidroksibütirik asidin 800-200 nm arasında spektrofotometreyle yapılan absorbanstaraması
18. Şekil 5.1. N-*p*-nitrobenzil-(*R*)-2-amino-1-bütanol'un ¹H NMR Spektrumu
19. Şekil 5.2. N-*p*-nitrobenzil-(*R*)-2-amino-1-bütanol'un ¹³C NMR Spektrumu
20. Şekil 5.3. N-*p*-aminobenzil-(*R*)-2-amino-1-bütanol'un ¹H NMR Spektrumu
21. Şekil 5.4. N-*p*-aminobenzil-(*R*)-2-amino-1-bütanol'un ¹³C NMR Spektrumu

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Mehmet KAYA

Doğum Yeri : Adıyaman

Doğum Tarihi : 1971

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Adıyaman Lisesi, 1989

Lisans : Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi, 1993

Yüksek Lisans :-

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Özel Eğitim Kurumları: 1993-2010

Yayımları (SCI ve diğer):