

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

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**PİRKLE –TİP KİRAL KOLON KROMOTOGRAFİSİ YÖNTEMİYLE  
BİYOLOJİK ÖNEME SAHİP KİRAL AMİNLERDEN  
(±)-β-METİLFENİLETİLAMİN'İN REZOLÜSYONU**

**Reşit ÇAKMAK**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**ŞANLIURFA  
2008**

Doç. Dr. Eşref TAŞ danışmanlığında, Reşit ÇAKMAK' ın hazırladığı “Pirkle –Tip Kiral Kolon Kromatografisi Yöntemiyle Biyolojik Öneme Sahip Kiral Aminlerden ( $\pm$ ) –  $\beta$  - Metilfeniletamin' in Rezolüsyonu” konulu bu çalışma 23 / 07 / 2008 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Harran üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman: Doç. Dr. Eşref TAŞ

Üye : Prof. Dr. Giray TOPAL

Üye : Doç. Dr. Mustafa DEĞİRMENCİ

Bu Tezin Kimya Anabilim Dalında Yapıldığını ve Enstitümüz Kurallarına Göre Düzenlendiğini Onaylarım.

Prof. Dr. İbrahim BOLAT  
**Enstitü Müdürü**

**Bu Çalışma HÜBAK (Proje No: 851) ve TÜBİTAK ( 106 T 724) tarafından desteklenmiştir.**

**Not:** Bu tezde kullanılan özgün ve başka kaynaktan yapılan bildirişlerin, çizelge, şekil ve fotoğrafların kaynak gösterilmeden kullanımı, 5846 sayılı Fikir ve Sanat Eserleri kanunundaki hükümlere tabidir.

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ÖZ.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
SİMGELER DİZİNİ.....	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	v
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	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.....	9
1.1.6. Mezo yapısı.....	10
1.2. Kiralite ve Rezolüsyon.....	11
1.3. HPLC ve Kiral kolonlar.....	13
1.3.1. HPLC.....	13
1.3.2. Kiral kolonlar.....	14
1.3.2.1. Kiral Ligand değişim kolonu.....	14
1.3.2.2. Affinite kolon.....	15
1.3.2.3. Sarmal Polimer kolon.....	15
1.3.2.4. Kavite kolon.....	16
1.3.2.5. Pirkle tip kolon.....	18
1.4. Biyolojik Önemi Olan Bazı Aminler.....	19
1.4.1. 2-Feniletaminler.....	20
1.4.2. Vitaminler ve Antihistaminler.....	21
1.4.3. Teskin ediciler.....	22
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	24
3. MATERYAL ve YÖNTEM.....	25
3.1. Materyal.....	25
3.1.1. Kullanılan araç ve gereçler.....	25
3.1.2. Kullanılan kimyasallar.....	25
3.1.3. Kullanılan cihazlar.....	26
3.2. Yöntem.....	26
3.2.1. N- <i>p</i> -nitrobenzoil-(S)-glutamik asit sentezi.....	26
3.2.2. N- <i>p</i> -aminobenzoil-(S)-glutamik asit sentezi.....	27
3.2.3. (S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil) propanoik asit metil esterinin sentezi.....	27
3.2.4. N-[(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil)propanoil] -(S)-Aspartik asit sentezi.....	28
3.2.5. N $\alpha$ -Boc-N $\epsilon$ -2-kloro benziloksikarbonil-L-lizin- <i>p</i> -nitrofenil ester sentezi.....	28
3.2.6. L-lizinin <i>p</i> -nitrofenil esterinin sentezi.....	29
3.3. Kiral Kolon Hazırlanması ve Enantiyomerik Verimin Belirlenmesi.....	30
3.3.1. Kiral kolon hazırlanması.....	30
3.3.2. Rasemik karışımın kolona tatbik edilmesi.....	31
3.3.3. HPLC ile Enantiyomerik verimin belirlenmesi.....	32
4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA.....	34
4.1. Sentezlenen Bileşiklerin Yapılarının Spektroskopik Yöntemlerle Aydınlatılması.....	34
4.1.1. <sup>1</sup> H NMR spektrumları.....	34
4.1.2. <sup>13</sup> C NMR spektrumları.....	36
4.1.3. Kütle ve IR spektrumları.....	38
5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER.....	40
5.1. Sonuçlar.....	40
5.2. Öneriler.....	42

KAYNAKLAR.....	43
ÖZGEÇMİŞ.....	45
EKLER.....	46
ÖZET.....	79
SUMMARY.....	80

## ÖZ

Yüksek Lisans Tezi

### **PİRKLE –TİP KİRAL KOLON KROMOTOGRAFİSİ YÖNTEMİYLE BİYOLOJİK ÖNEME SAHİP KİRAL AMİNLERDEN (±)-β-METİLFENİLETİLAMİN'İN REZOLÜSYONU**

**Reşit ÇAKMAK**

**Harran Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı**

**Danışman: Doç. Dr. Eşref TAŞ  
Yıl: 2008, Sayfa : 80**

Bu çalışmada Pirkle–tip kiral sabit faz oluşturarak kolon kromatografisi yöntemi ile biyolojik öneme sahip kiral amin enantiyomerlerinin rezolüsyonu sağlandı. Bu amaçla dolgu maddesi olarak sepharose-4B kullanıldı. Uzatma kolu olarak dolgu maddesine L-tirozin takıldı ve bu uzatma koluna doğal amino asitlerden L-glutamik asidin aromatik amin türevi diazolama yoluyla ligand olarak bağlandı. Sonra ayrılması istenilen biyolojik öneme sahip kiral aminin (β-metilfeniletilamin) rasemik karışımı kolona tatbik edildi ve hareketli faz olarak değişik pH'larda (pH: 6, 7 ve 8) tampon çözeltiler kullanılarak rezolüsyon sağlandı. Elüatın akış hızı peristaltik pompa ile ayarlandı. Kolondan alınan elüat organik (diethyl eter) faza alındıktan sonra HPLC ile aminin enantiyomerik fazlalığı (e.e) belirlendi.

**ANAHTAR KELİMELER:** Kolon Kromatografisi, Kiral Aminlerin Rezolüsyonu, Pirkle-tip sabit fazlar

## **ABSTRACT**

**MSc Thesis**

### **PREPARATIVE RESOLUTION OF CHIRAL( $\pm$ )- $\beta$ -METHYLPHENYLETHYLAMINE HAVE BIOLOGICAL ACTIVITY a BY PIRKLE –TYPE CHIRAL COLUM CHROMATOGRAPHY**

**Reşit ÇAKMAK**

**Harran University  
Graduate School of Natural and Applied Sciences  
Department of Chemistry**

**Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Eşref TAŞ  
Year: 2008, Page:80**

In this study, a new Pirkle-type chiral column stationary phase for resolution of chiral amin enantiomers having biological activity was prepared by using sepharose 4B as a matrix, L-tyrosine as a spacer-arm and aromatic amin derivatives of some natural amino acid (L-glutamic acid) as a ligand. Rasemic mixture of  $\beta$ -methylphenylethylamine was loaded to the column. The binding capacities of the column stationary phase was determined at different pH's (pH: 6, 7 and 8) using buffer solutions as mobil phase. The flow rate of eluat was adjusted with peristaltic pump. Then eluat was extracted with diethyl ether and enantiomeric excess (e.e.) was determined by HPLC method.

**KEY WORDS:** Column Chromatography, Resolution of Chiral Amines, Pirkle-type phases

## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans öğrenimim boyunca benden yardımlarını esirgemeyen danışmanım Sayın Doç. Dr. Eşref TAŞ'a ve Harran Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya bölümü öğretim üyelerine sonsuz teşekkürler ederim.

Lisans ve yüksek lisans öğrenimim boyunca yakın ilgisi ve desteğinden dolayı Sayın Prof. Dr. Giray TOPAL'a (Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi öğretim üyesi) ve Sayın Doç. Dr. Hayrullah YILMAZ'a (Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi öğretim üyesi) teşekkürü bir borç bilirim.

Tezin yazım aşamasında bilgisinden yararlandığım Fen Bilgisi Öğretmeni ve Fen Bilgisi Eğitimi yüksek lisans öğrencisi Mürşet ÇAKMAK'a (Milli Eğitim Bakanlığı) ve tez çalışmam sırasında yardımlarından dolayı yüksek lisans öğrencileri Murat KALOĞLU ve İsmail ÖZENTÜRK'e teşekkür ederim.

106T724 (TBAG-HD/224) no'lu proje ile çalışmamı destekleyen TÜBİTAK'a ve 851 no'lu proje ile çalışmamı destekleyen HÜBAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tüm eğitim hayatım boyunca bana sürekli destek olan ve yanımda olan başta sevgili anneme, babama, abim Şefik ÇAKMAK'a ve tatlı yeğenim Mir Muhammed Mustafa ÇAKMAK olmak üzere tüm aileme ve yakın arkadaşlarıma özel sevgilerimi sunarım.

## SİMGELER DİZİNİ

DMSO : Dimetilsülfoksit  
GC : Gaz Kromatografisi  
CLC : Gaz Likit Kromatografisi  
IR : Infrared Spektroskopisi  
CMPA : Kiral Mobil Faz Maddesi  
CSP : Kiral Sabit Faz  
NMR : Nükleer Manyetik Rezonans  
UV-Vis : Ultraviyole-Görünür Alan Spektroskopisi  
HPLC : Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi



## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
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.....	7
Şekil 1.4. Fischer'e göre D-Eritroz ve D-Treoz .....	7
Şekil 1.5. Cahn-İngold-Prelog sistemi.....	8
Şekil 1.6. D-(-)- Fenilglisin.....	9
Şekil 1.7. Efedrin molekülünün Fischer İzdüşüm formülleri.....	10
Şekil 1.8. Tartarik asidin stereoizomerleri.....	10
Şekil 1.9. Kinetik Rezolüsyon üzerinden Asimetrik sentez.....	13
Şekil 1.10. Kiral ligand değişim kromatografisi.....	15
Şekil 1.11. CSPs olarak kullanılan Selüloz türevleri.....	16
Şekil 1.12. Siklodekstrinlerin yapıları.....	17
Şekil 1.13. Pirkle-tip kiral sabit faz.....	18
Şekil 1.14. Biyolojik önemi olan bazı aminler.....	20
Şekil 1.15. Vitaminler ve Antihistaminler.....	22
Şekil 1.16. Asetilkolin Esteraz Enzimi.....	23
Şekil 3.1. N- <i>p</i> -nitrobenzoil – (S)- glutamik asit sentezi .....	27
Şekil 3.2. N- <i>p</i> -aminobenzoil – (S)- glutamik asit sentezi .....	27
Şekil 3.3. (S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil) propanoik asit metil esteri sentezi.....	28
Şekil 3.4. N-[(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil) propanoil]-(S)-Aspartik asit sentezi .....	28
Şekil 3.5. N $\alpha$ -Boc-N $\epsilon$ -2-kloro benziloksikarbonil-L-lizin-p-nitrofenil ester sentezi.....	29
Şekil 3.6. L-lizinin p-nitrofenil esterinin sentezi .....	29
Şekil 3.7. Kiral kolonunun hazırlanışı .....	31

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa No</b>
Çizelge 4.1. Sentezlenen bileşiklerin <sup>1</sup> H NMR(δppm) kimyasal kayma değerleri .....	36
Çizelge 4.2. Sentezlenen bileşiklerin <sup>13</sup> C NMR(δppm) kimyasal kayma değerleri.....	37
Çizelge 4.3. Sentezlenen bileşiklerin <i>IR</i> kimyasal kayma değerleri.....	38
Çizelge 4.4. Sentezlenen bileşiklerin karakteristik özellikleri : M.A. (molekül ağırlıkları), E.n. (erime noktaları), (%) reaksiyon verimi, renk, çevirme açıları.....	39

## 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 (Bencini ve ark., 1984; Nimura ve Kinoshito, 1996; Yamagishi ve ark., 1996; Natalini ve ark., 2004; Bojaski ve ark., 2005). Ayrıca Kapiler Elektroforez yöntemiyle de söz konusu ayırma işlemleri yapılmaktadır (Kodama ve ark., 2003).

Enantiyomerik saflığı yüksek aminler biyolojik öneme sahip iseler ilaç sanayinde oldukça yaygın kullanım alanı bulurlar (Solomons ve Fryhle, 2000). 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 (Sheldon, 1992).

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 (Sheldon, 1992). 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 (Kubota ve ark., 2004).

## 1.1. Kiralite

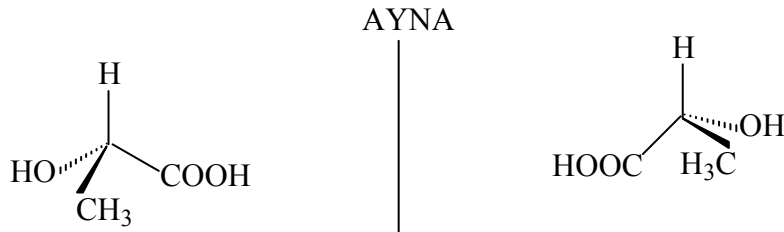
### 1.1.1. Kiralite nedir?

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 stereoizomere 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.

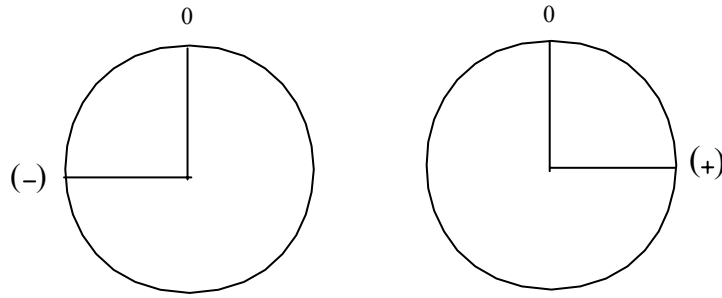


Şekil 1.1. Laktik asidin Enantiyomerleri

### 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)

L-İzomer

Dekstrotatori (ışığın sağa çevrilmesi)

D-İzomer

Şekil 1.2. Düzlem polarize ışığın çevrilme yönleri

Sonuçta ışığın dönüşü sıfırlanır (Şekil 1.2.). Tek bir enantiyomer için ise; çözeltide 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

$\alpha$  = 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

$[\alpha]_D^{20}$  = 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.

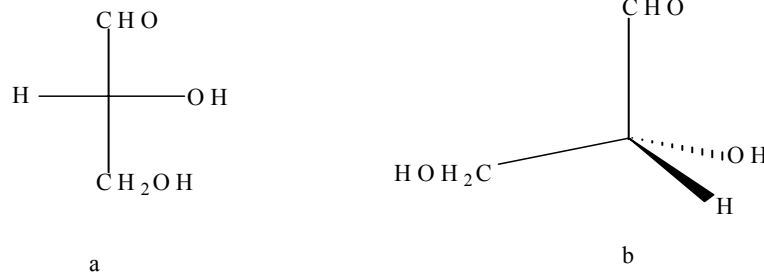
Laktik asidin iki enantiyomerini ele alarak bunu incelersek; Laktik asidin bir formu düzlem polarize ışığı sağa çevirirken, diğer formu düzlem polarize ışığı sola çevirmekte ve sırasıyla (+) – (-) – olarak etiketlenmektedir. Laktik asidin bu iki konfigürasyonunu Şekil 1.1.'de gösterilmiştir. Sorun şu;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



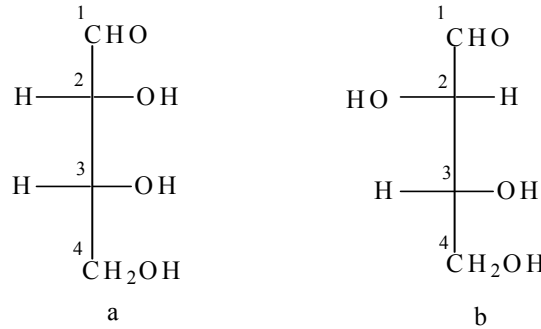
Fischer izdüşümünde, moleküldeki bütün bağlar yatay ve dikey çizgilerle gösterilir. Yatay çizgilerin gözleyene doğru, dikey çizgilerin gözleyenden uzakta olduğu varsayılır. Uzun karbon zinciri dikey olarak gösterilir ve yüksek değerli karbon en üste yazılır. Fischer, konfigürasyonu ayırmada tümüyle keyfi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

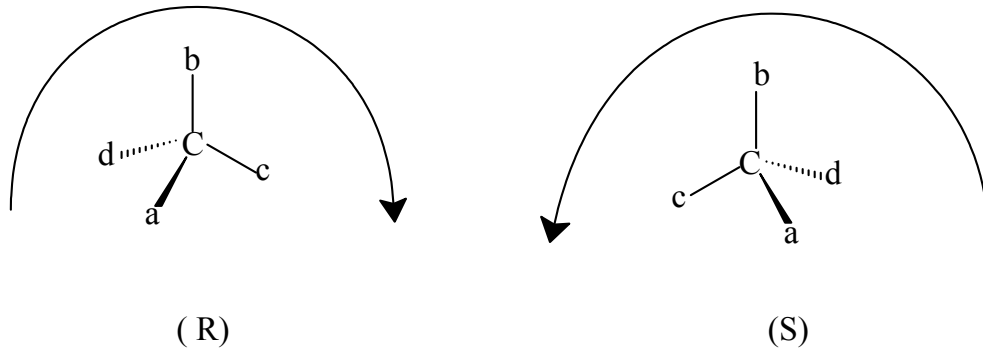
Bütün kiral moleküllerin, D-(+)-Gliseraldehit ve L-(-)- Gliseraldehit referans alınarak, konfigürasyonları D ve L olarak belirlenir. Fischer izdüşüm formülüne göre en yüksek numaralı asimetrik merkeze göre belirlenir. D-Eritroz (a) ve D-Treoz (b) gösterilmiştir (Şekil 1.4a,b).



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 vermektedir. 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 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 1.5.). 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-Ingold-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:  $CH_2Cl > CH_2OH > CH_2CH_3 > CH_3 \dots vb.$

Çift bağlar, iki tane tek bağ gibi düşünülür.

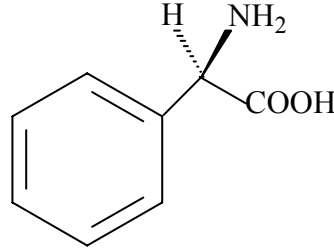
Örneğin:  $CH_2 = CH_2, CH_2CH_3$

Buna göre;  $-COOH > -CO- > COH > -CH_2OH > -CN > -C_6H_5 > -CH=CR_2$  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.) :



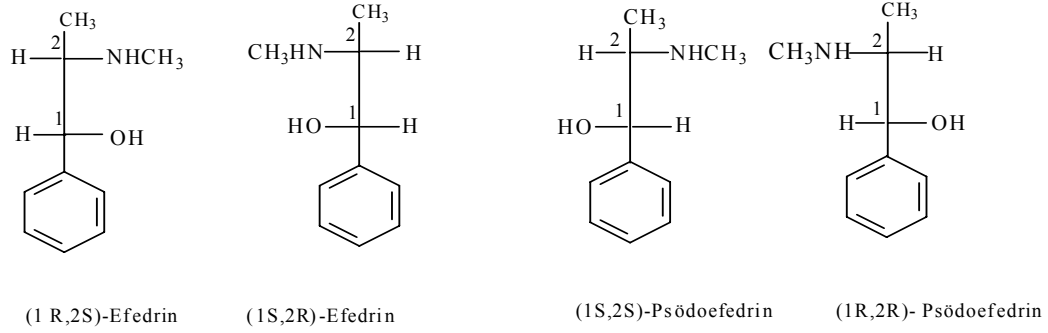
Şekil 1.6 . D-(-)- Fenilglisin

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, stereoisomerlerinin sayısı  $2^n$  den fazla olur. Asimetric karbon sayısına n dersek stereoisomer sayısı  $2^n$  olur. Eğer  $n=2$  ise, maksimum stereoisomer sayısı 4 olur. Bir çift oluşturan enantiyomerler, diğer stereoisomerlerle ayna görüntüsü vermiyorsa bunlar enantiyomer değildir. Enantiyomer olmayan bu stereoisomerler “ diastereomer ” olarak adlandırılırlar. Bu tanım yalnızca kirial 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 asimetric merkezi olan efedrin molekülünü ele alırsak:

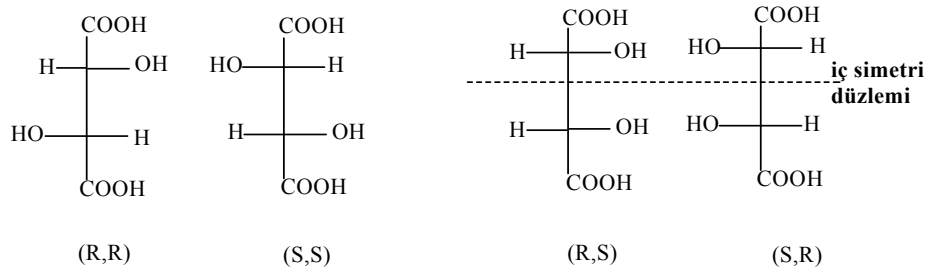


Şekil 1.7. Efedrin molekülünün Fischer izdüşüm formülleri

(1R,2S)-efedrin ile (1S,2R)- efedrin ve (1S,2S)-psödoefedrin ile (1R,2R)-psödoefedrin molekülleri 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 1.8.’de iki asimetric karbon atomu bulunan tartarik asidin 2<sup>n</sup> 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  $180^\circ$  çevirsek 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 (Tümerdem, 2004).

## 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 (Sheldon, 1992). Ayrıca 45 yıl önce yaşanmış Talidomid olayı bunun en güzel örneğidir (Solomons ve Fryhle, 2000).

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  $\alpha$ -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.

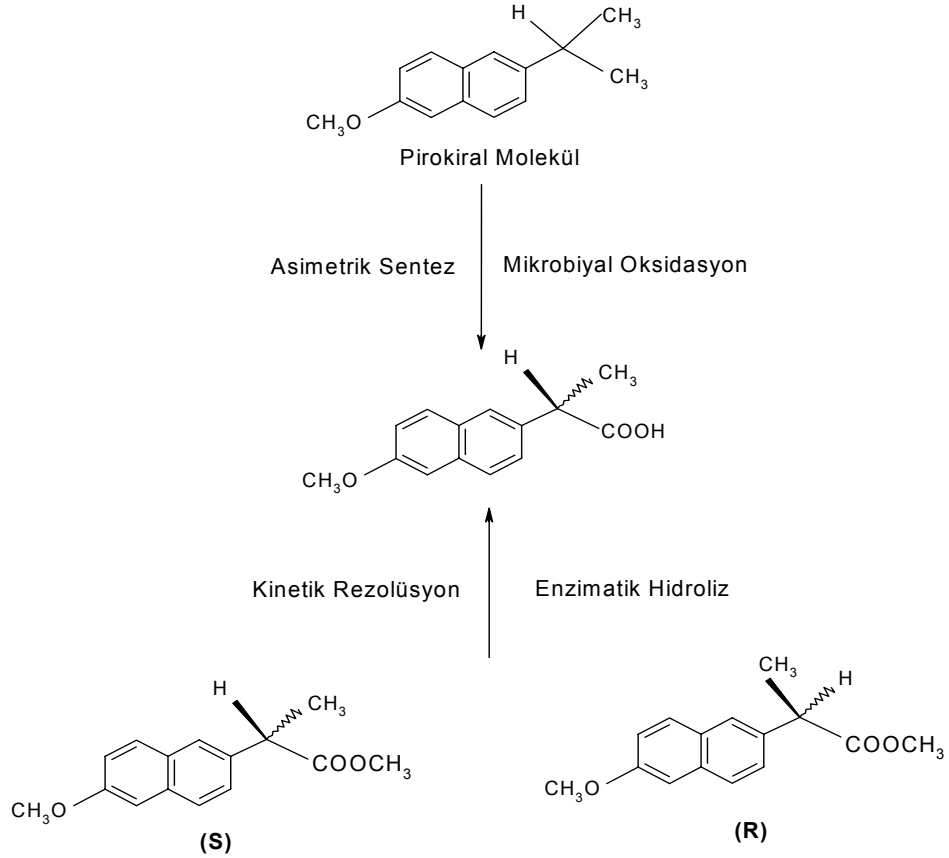
Bir diğer kaynak asimetric sentezdir. Emil Fischer özel bir şeker serisi üzerindeki çalışmalarıyla 5 karbonlu arabinozdan çıkıp 6 karbonlu şekerlerin eldesinde iki diastereomerik ürün mümkünken yalnız bir tanesinin baskın ürün olduğunu gözlemlemiştir (Solomons ve Fryhle, 2000).

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 asidin 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 (Solomons ve Fryhle, 2000).

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 diastereomerler

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:

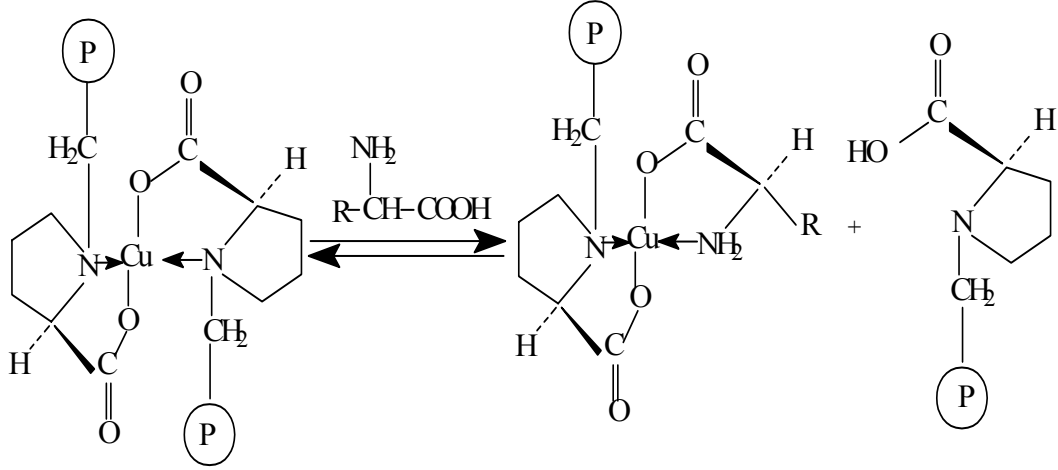
1. Kiral -ligand değişim kolonu
2. Afinite kolonu
3. Sarmal kolon
4. Kavite kolon
5. Pirkle-tip kolon

### 1.3.2. Kiral kolonlar

#### 1.3.2.1. Kiral Ligand değişim kolonu

Davankov ve arkadaşları Kiral ligand değişim kromatografisinde 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 kiral 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.





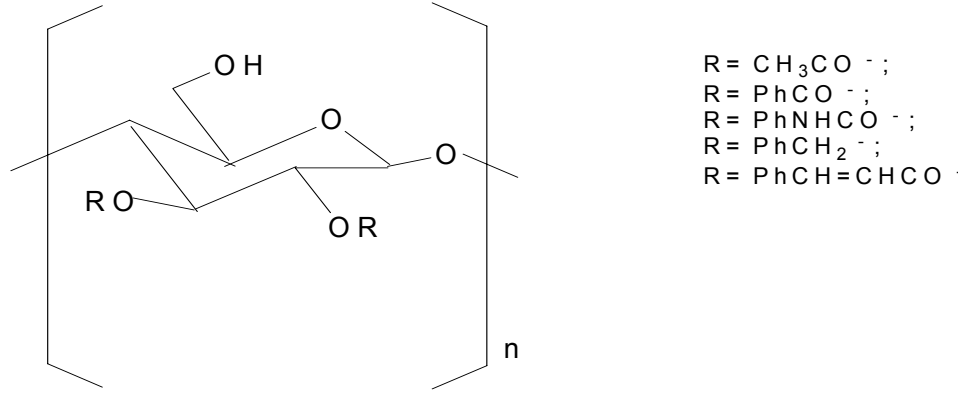
Şekil 1.10. Kiral ligand değişim kromatografisi

### 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  $\alpha$ - asit Glukoprotein (AGB) temel esaslı sabit faz geliştirildi. Bunların ikisi de kirale ilaçların ayrılması için gayet uygundur ve sık sık yüksek ayırma faktörleri gösterir. Bir protein için beklenebilecek ayırma; pH, iyonik güç ve sıcaklık gibi bir çok parametreye bağlıdır. Bu yüzden, optimum şartları her bir bileşik için ayrı ayrı belirlemek zorunludur.

### 1.3.2.3. Sarmal Polimer kolon

Sarmal yapılı 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.

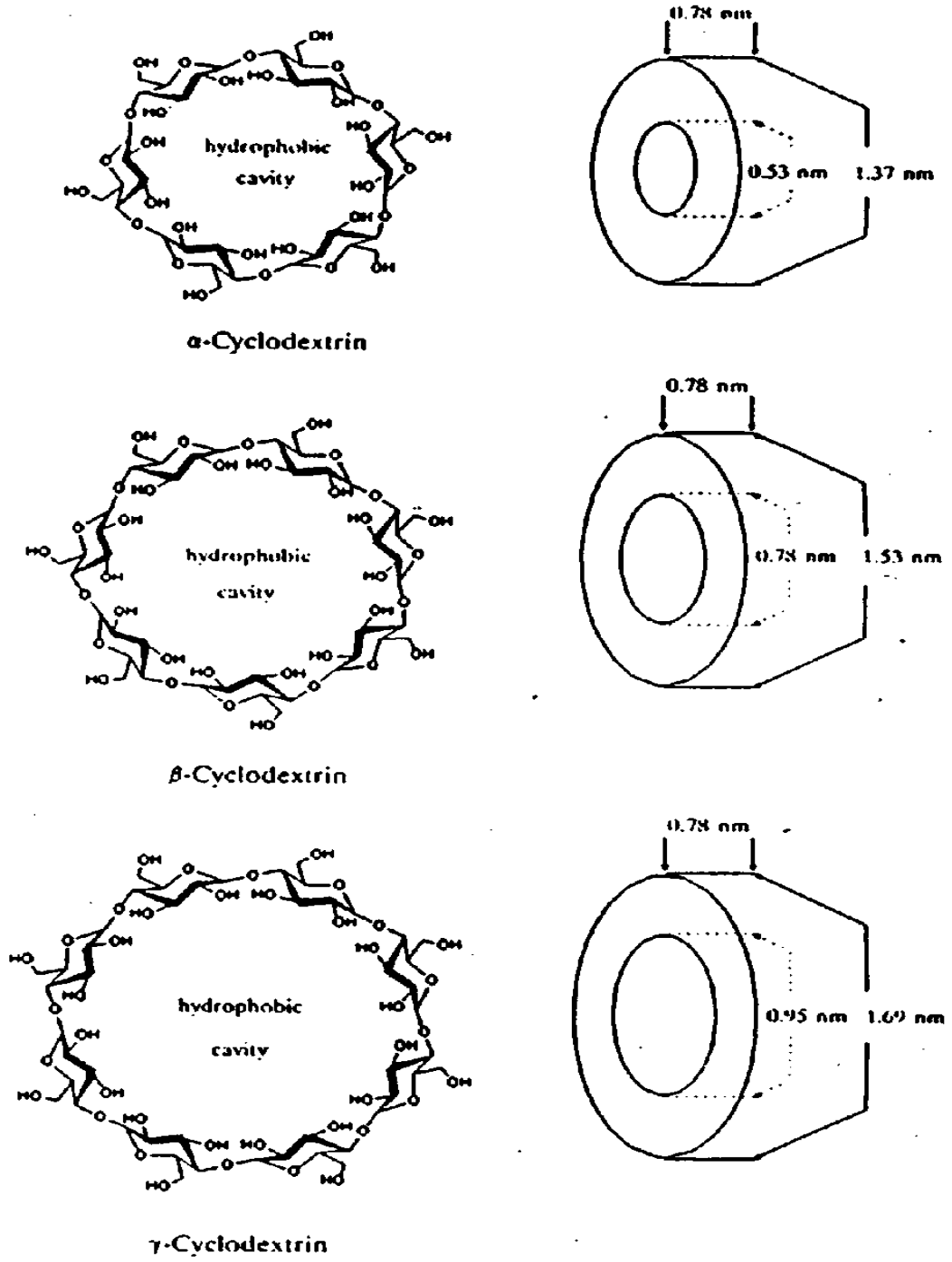


Şekil 1.11. CSPs olarak kullanılan Selüloz türevleri

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 ayrımları 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.).



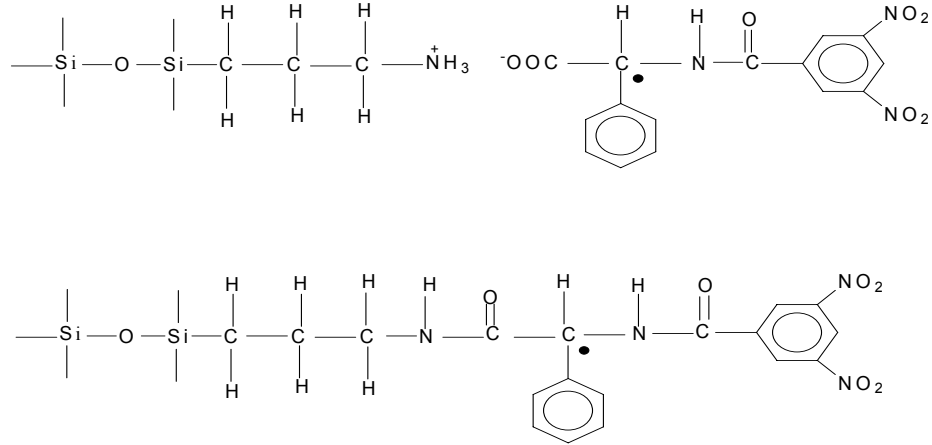
Şekil 1.12. Siklodekstrinlerin yapıları

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 (Pirkle ve Finn, 1983). 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 (Arslan ve ark., 1996). 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:

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

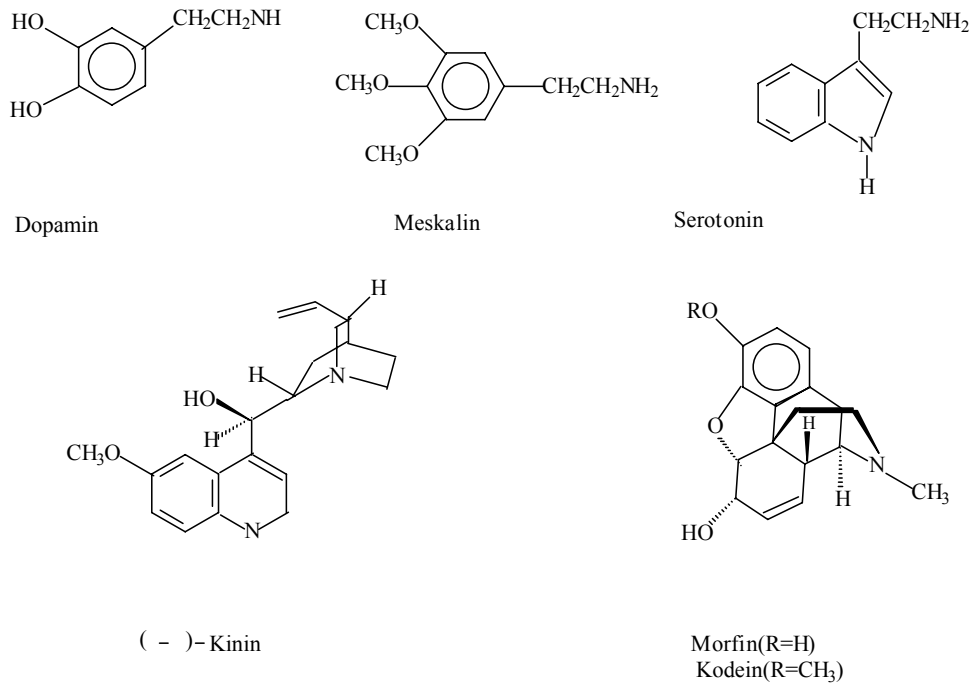
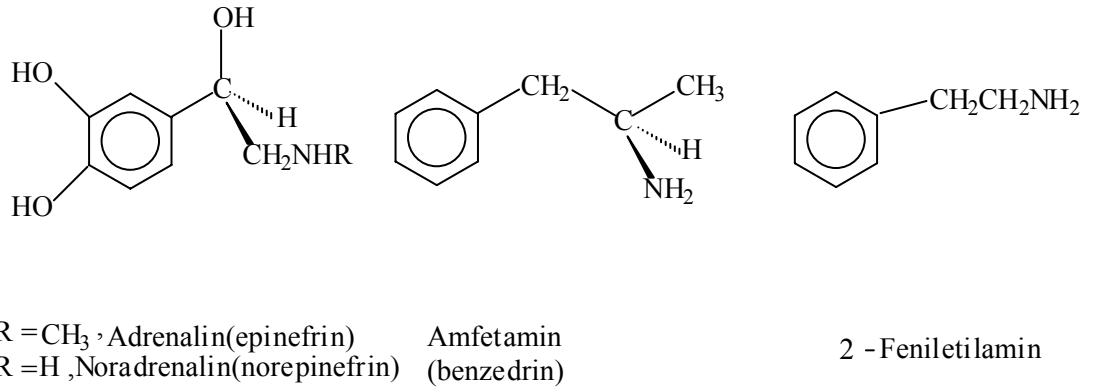
Örneğin R ve S karışımından oluşan bir numunenin R ve S oranı (R/S : 95/5) ise, % e.e. = 90 bulunur.

Bir diğer analiz metodu HPLC yöntemidir. Uygun sabit fazdan numune elue edilirken enantiyomerlerden birinin sabit fazda daha fazla alıkonması 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 ( $\delta_{\text{ppm}}$ ) değerine sahipken, ortama kaydırma reaktifi ilave edildikten sonra aynı protonlara ait iki farklı kimyasal kayma değeri ortaya çıkmaktadır.

#### 1.4. Biyolojik Önemi Olan Bazı Aminler

Tıbbi ve biyolojik önemi olan bileşiklerin çoğu amindir. Aşağıda Şekil 1.14.'de tıbbi ve biyolojik önemi olan böyle aminlere bazı örnekler verilmiştir.



Şekil 1.14. Biyolojik önemi olan bazı aminler

### 1.4.1. 2-Feniletilaminler

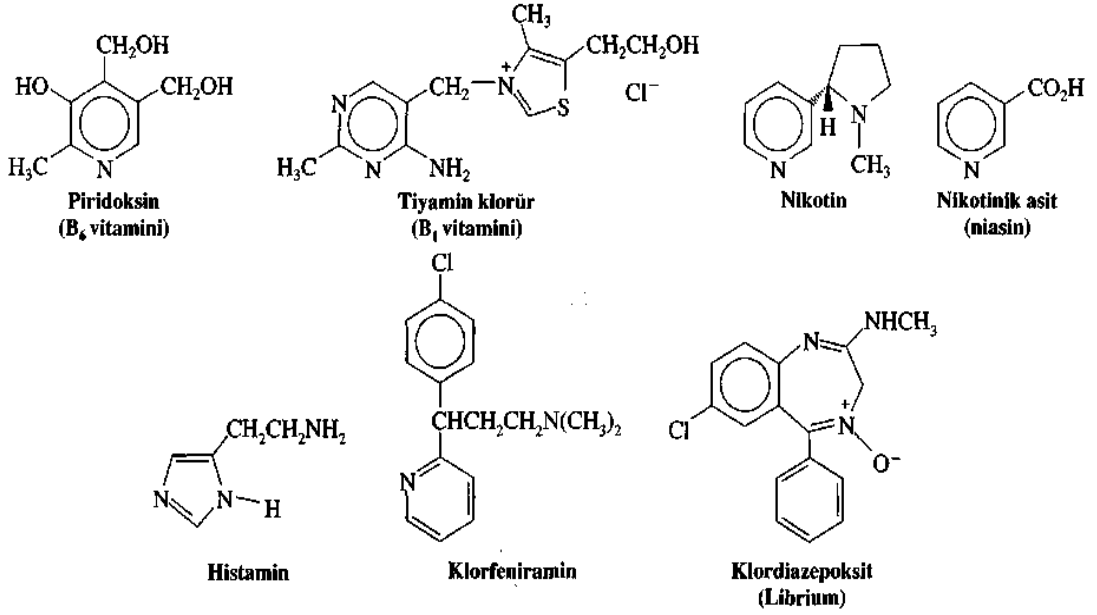
Pek çok feniletilamin bileşiğinin güçlü fizyolojik ve psikolojik etkileri vardır. Adrenalin ve Noradrenalin adrenal salgı bezinden salgılanan iki hormondur. Bir hayvan tehlike hissettiğinde kana verilen adrenalin kan basıncını ve kalp atış hızını artırır, akciğerin hava geçiş yollarını genişletir. Bütün bu etkiler hayvanı savaşmaya ya da kaçmaya hazırlar. Noradrenalin de kan basıncını artırır ve dürtülerin bir sinir ucundan diğerine geçmesinde görev üstlenir. Dopamin ve Serotonin

beyindeki önemli sinir ileticileridir. Beyinde dopamin düzeyindeki anormallikler Parkinson hastalığı dahil, pek çok psikolojik hastalığa neden olur. Dopamin hareketlerin, motivasyonun, duyguların kontrolünde ve düzenlenmesinde başlıca rol oynar. Serotonin ilginç bir bileşiktir. Mental olaylarda oldukça önemli bir rolü olduğu , zihinsel aktiviteleri artırdığı sanılmaktadır. Şizefroni gibi zihinsel bozuklukların serotonin metabolizması ile ilgili olduğu düşünülmektedir.

Amfetaminin (güçlü bir uyarıcı) ve Meskalin (bir halusinojen ) yapıları Serotonin, Adrenalin ve Noradrenalinin yapılarına benzer. Hepsi de 2-feniletılamin türevidir (verilen yapısına bakınız). (Serotoninde azot atomu beş üyeli bir halkada benzen halkasına bağlıdır). Bu bileşiklerin yapı benzerlikleri, fizyolojik ve psikolojik etkilerini de belirlemelidir. Çünkü 2-feniletılamin türevlerinin pek çoğu benzer özellikler gösterir. Örneğin N-metilamfetamin ve LSD (Liserjik Asitin Dietilamiti) bunlardan yalnızca ikisidir. İki güçlü analjezik olan Morfin ve Kodein de yapılarında birer 2-feniletılamin sistemi taşırlar (Morfin ve Kodein alkaloit tipi bileşiklere birer örnektir).

#### 1.4.2. Vitaminlar ve Antihistaminler

Aminlerin bir çoğu vitamindir. Bunlardan bazıları Nikotirik asit ve Nikotinamid, Piridoksin( B<sub>6</sub> Vitamini) ve Tiamin klorürdür. Nikotin tütünde bulunan zehirli bir alkaloittir ve sigara alışkanlığını yapan bileşiktir. Başka bir zehirli amin olan Histamin vücudun bütün dokularında proteinelere bağlanmış olarak bulunur. Histaminin serbest kalması allerjik tepkimelere ve soğuk algınlığına neden olur. Klorfeniramin bir ‘‘antihistamindir’’ ve soğuk algınlığının tedavisinde ilaç bileşeni olarak kullanılır (Şekil 1.15.).



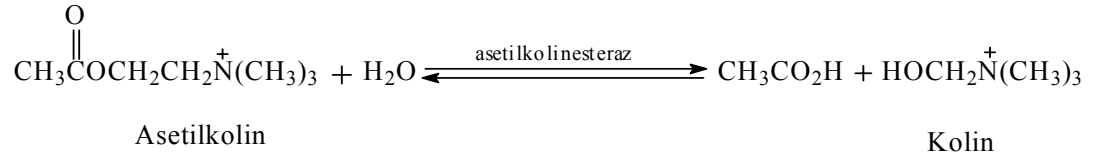
Şekil 1.15. Vitaminlar ve Antihistaminler

### 1.4.3. Teskin ediciler

Klordiazepoksit yedili bir halka içeren ilginç bir bileşiktir ve en çok kullanılan yatıştırıcılardan biridir. (Klordiazepoksik N-oksit halinde pozitif bir azot atomu da taşır.)

**Sinir ileticileri:** Sinir hücreleri diğer sinir hücreleri ile sinaps denen bağlantı yerlerine veya yarıklara sahiptirler. Sinir dürtüleri bu bağlantı yerlerinde (sinapslarda) sinir ileticileri denen kimyasal bileşikler tarafından taşınırlar. Asetilkolin cholinergic synapses denen yerde önemli bir sinir ileticisidir. Bu bileşik bir kuaterner amonyum grubu taşır. Küçük molekülü ve iyonik yapıda olduğunda, suda çok çözünür ve kolay difüzenir. Bu özellikleri onun sinir ileticisi olmasına yardımcıdır. Asetilkolin molekülleri, sinapslardan önceki bölgedeki zar tarafından, yaklaşık 104 molekülü paketler halinde nöronlara verilirler. Bu molekül paketi, iki sinir arasında, bir sinir hücresinden diğerine difüzenir (Şekil 1.16.).





Şekil 1.16. Asetilkolin Esteraz Enzimi

Elektriksel iletimi tetikleyen sinir dürtülerini sinapslar üzerinden taşıyan asetilkolin molekülleri, arkadan gelen dürtünün ulaşmasına fırsat tanımak amacıyla birkaç milisaniye içinde (koline) hidroliz olmalıdır. Bu hidroliz asetilkolin esteraz denen çok etkin bir enzim tarafından katalizlenir.

Kasların sinaps sonrası zarları üzerinde bulunan asetilkolin alıcıları bazı ölümcül sinir zehirleyicilerin hedefi durumundadır (Solomons ve Fryhle, 2000)

## 2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

Tıpatıp aynı olmamakla beraber kromatografik ayırmalara literatürde rastlanmaktadır.

Yamagishi ve arkadaşları Clay kolon kromatografisi yoluyla dolgu maddesi olarak trifenil rutenyum  $\Lambda$ -[Ru(phen)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> ve  $\Lambda$ -[Ru(bpy)<sub>3</sub>]<sup>2+</sup> laponit kolon kullanarak 1,1'-binaftol enantiomerlerini ayırmayı sağlamışlardır (Yamagishi ve ark., 1996).

Nimura ve arkadaşları sıvı kromatografisi yoluyla kiral reaktif olarak o-ftalaldehit-N-asetil-L-sistein kullanarak amino asit enantiomerlerinin rezolüsyonunu sağlayarak yaygın protein amino asitlerinin enantiomerlerinin analizinde preparatif açıdan uygulanabilir bir seviyeye ulaşmışlardır (Nimura ve ark., 1996).

Natalini ve arkadaşları kiral selektör olarak N,N-dimetil-(S)-fenilalaninin kullanarak 1-aminoindan-1,5-dikarboksilik asitin rezolüsyonunu yarı-preparatif açıdan başarıyla gerçekleştirmişlerdir (Natalini ve ark., 1996).

Kubota ve arkadaşları selüloz ve amiloza ligant olarak siklokarboksilik asitler bağlayarak oluşturdukları ester türevleriyle bazı optikçe aktif tröger bazlarının enantiomerlerine ayrılmasını sağlamışlardır (Kubota ve ark., 2004).

Natalini ve arkadaşları ligand değişim kromatografisi yoluyla literatürde ilk kez kiral selektör olarak o-benzil-(S)-serin kullanarak değişik pH'larda doğal ve yapay aminoasitlerin rezolüsyonunu yüksek verimle gerçekleştirmişlerdir (Natalini ve ark., 2005).

### 3. MATERYAL ve YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. Kullanılan araç ve gereçler

- Cam malzeme olarak; çeşitli ebatlarda balon, geri soğutucu, damlatma hunisi, ayırma hunisi, huni, erlenmayer, beher, büret, kılcal boru.
- Manyetik ve mekanik karıştırıcı.
- Sıcaklık ölçümleri için termometre.
- Isıtma için; su banyosu ve yağ banyosu.
- Otomatik pipet ve pipet uçları.
- UV spektroskopisi için Quartz Küvet.

##### 3.1.2. Kullanılan kimyasallar

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

- *p*-nitrobenzoil klorür, D-aspartik asit, L-aspartik asit, R(-)-2-amino-1-bütanol, S(+)-2-amino-1-bütanol, L-tirozin, sodyum hidroksit, hidroklorik asit, sülfürik asit, L-glutamik asit, Pd/C, hidrazin hidrat ve (±)-β-metilfeniletilamin kullanıldı.
- Çözücü olarak aseton, etanol, metanol, metilen klorür, kloroform, petrol eteri, dietileter ve diğer organik çözücüler kullanıldı.
- Ayrıca <sup>1</sup>H-NMR ve <sup>13</sup>C-NMR spektrumları için çözücü olarak DMSO -d<sub>6</sub> ve CDCl<sub>3</sub> kullanıldı.
- Kolon dolgu maddesi olarak aktive edilmiş edilmiş Sepharose-4B ve ayrılmanın enantiyomerik veriminin tayininde HPLC yürütücü fazı için HClO<sub>4</sub> kullanıldı.

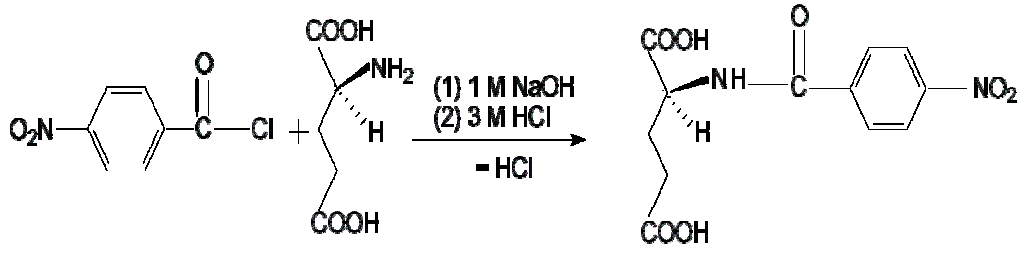
### 3.1.3. Kullanılan cihazlar

- **Peristaltik pompa** (Watson Marlow 323)
- **Magnetik karıştırıcı** (Heidolph 1011)
- **Evaporatör** (Heidolph 4001)
- **pH-metre** (WTW pH 526)
- **UV-spektrofotometresi  $\lambda$ -35** (Perkin Elmer)
- **400 MHz  $^1\text{H}$ -NMR spektrometresi** (Bruker AC model)
- **Infrared spektrofotometresi** (Mattson 1000 FT)
- **Agilent 1100 MSD kütle spektrometresi**
- **HPLC cihazı ve Kiral UV dedektörü** (Bio-Der )
- Rezolüsyonda kolon olarak **1x20 cm (IDXL) Luer-Lock ceketsiz cam kolon** kullanıldı.
- HPLC kolon olarak (+) **Crownpak CD-11** kiral kolon kullanıldı.

## 3.2. Yöntem

### 3.2.1. N-*p*-nitrobenzoil-(S)-glutamik asit sentezi

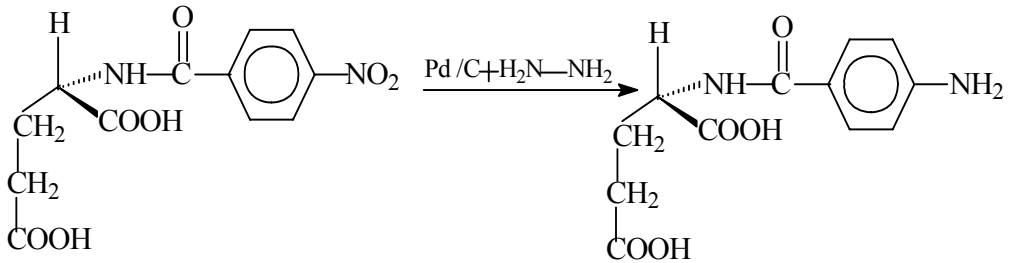
0.73 gr L-glutamik asit 15 ml 1 N NaOH'de çözüldü. Bu çözeltiliye 1.5 gr sodyum asetat ve 0.93 gr *p*-nitrobenzoilchlorür eklendi. Çözeltinin rengi vişne rengini aldı. Çözelti 5 dakika kadar karıştırıldı. Bu işlemten sonra çözünmeyen *p*-nitrobenzoilchlorür süzgeç kâğıdıyla ayrıldı. Çözelti üzerine 3 N HCl çözeltisi damla damla ilave edildi. Asit ilavesiyle beyaz bir çökelek oluştu. Çözeltinin pH'ı kontrol edildi. Renk kırmızıyı gösterinceye kadar asit eklendi. Bu durumda beyaz çökelek dibe çöktü. Çökeleğin iyice olgunlaşması için yeterince beklenildi. Oluşan beyaz çökelek tromptan 3 - 4 kere berrak bir çözelti elde edilene kadar süzülürdü. Katıdan ayrılan süzüntü bir behere alınıp kristallenmeye bırakıldı. 15 dakika içinde beherde beyaz renkli bir çökelek oluşmaya başladı. Oluşan çökelek tromptan süzülüp kurutuldu. Erime noktası: 192 °C; Verim: % 64 ; Renk: beyaz renkli ve lifimsi;  $[\alpha]_D^{30} = -15.7$  ( C= 0.6 , etanol); (Chandra ve Kumar, 2004)



Şekil 3.1. N-p-nitrobenzoil-(S)-glutamik asit sentezi

### 3.2.2. N-p-aminobenzoil-(S)-glutamik asit sentezi

0.8 g N-p-nitrobenzoil-(S)-glutamik asit içinde 60 ml etanol bulunan 250 ml ve iki boyunlu bir balonda çözüldü. Daha sonra 0.05 g palladiyum karbon eklendi. Çözelti su banyosunda geri soğutucu altında 20 dakika kadar ısıtılarak karıştırıldı. 10 ml hidrazinhidrat yavaş yavaş damlatıldı. Damlatmadan sonra sıcaklık 80 °C'de sabit tutularak yaklaşık 2.5 saat geri soğutucu altında kaynatıldı. Karışım süzülüp evapore edildi. Renk: sarı renkli yağimsı sıvı; Verim: % 78;  $[\alpha]_D^{30} = -9.8$  (C= 0.8, etanol).

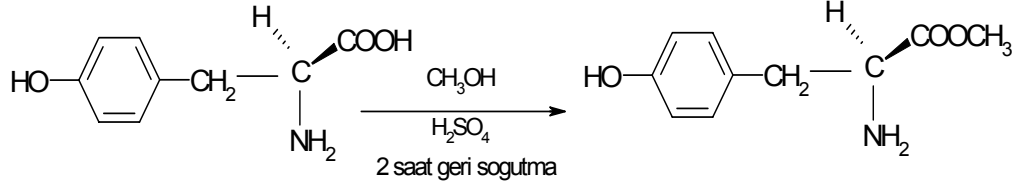


Şekil 3.2. N-p-aminobenzoil-(S)-glutamik asit sentezi

### 3.2.3. (S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil)propanoik asit metil esterinin sentezi

10.0 g 2-amino-3-(4-hidroksifenil) propanoik asit 40 ml mutlak metanolde çözüldü ve karışıma 8 ml derişik sülfürik asit eklendi. Oluşan sarı çözelti 2 saat geri soğutucu altında kaynatıldı. 0 °C'ye kadar soğutuldu ve derişik amonyak çözeltisiyle nötrale edildi. Daha sonra çöken ürün süzülde ve soğuk suyla yıkandı. Sulu

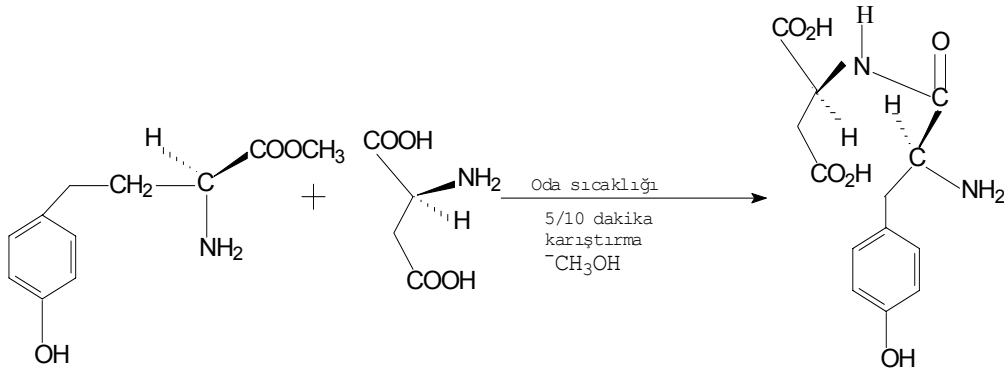
etanolda kristallendirildi. Sentezlenen yapının spektroskopik verileri literatürle uyumludur. Erime noktası: 162 °C; Verim: % 42; (Furniss ve ark., 1989)



Şekil 3.3. (S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil)propanoik asit metil esterinin sentezi

### 3.2.4. N-[(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil)propanoil]-(S)-aspartik asit

Eşdeğer miktarda (S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil) propanoik asit metil esteri (10 mmol) ve aspartik asit (10 mmol) ayrı beherlerde 20 ml etanol içinde oda sıcaklığında çözüldü. Esterin bulunduğu behere aspartik asit çözeltisi 2 dakika içerisinde damla damla ilave edildi. Oluşan beyaz çökelek trompta süzülür ve metanol-su karışımında kristallendirildi. Çözelti süzülüp kristaller kurutuldu. Erime noktası: 128 °C; Renk: beyaz ;  $[\alpha]_D^{30} = +3.0$ ; (C= 0.5,  $1.10^{-3}$  M HClO<sub>4</sub> içinde); (Zilkha ve Liwschitz, 1957).

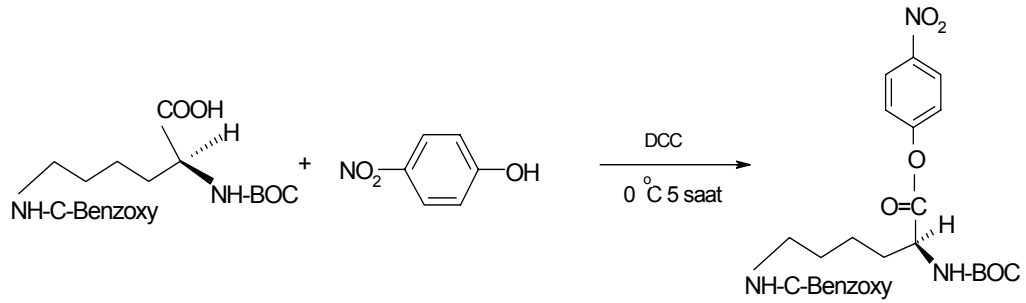


Şekil 3.4. N-[(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil)propanoil]-(S)-Aspartik asit sentezi

### 3.2.5. N $\alpha$ -Boc-N $\epsilon$ -2-kloro benziloksikarbonil-L-lizin-p-nitrofenil ester sentezi

3.15 g N $\alpha$ -Boc-N $\epsilon$ -2-klorobenziloksikarbonil-L-lizin ve 1.35 g p-nitrofenol 40 ml etilasetat içinde çözüldü. Bunun üzerine 0°C'de 1.9 g disikloheksilkarbodiimit (DCC) ilave edildi. 5 saat sonra oluşan disikloheksilüre tromptan süzülür ve

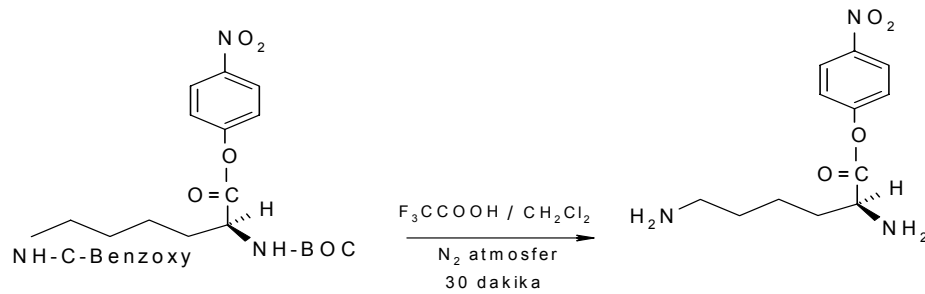
etilasetat evapore edildi. Evaporasyondan sonra kalan madde metilen klorürde çözüldü. 0 °C de 0.5 M potasyum karbonat çözeltisiyle ekstrakte edildi. Organik faz HCl ve suyla yıkanarak sodyum sülfat üzerinden kurutuldu. Çözücü evapore edildi ve geride kalan katı madde etanol-su karışımından kristallendirildi. Esterin karakteristik verileri literatürle uyum içindedir. Erime noktası: 92 °C; Renk: beyaz; Verim: 5.5 g (% 90);  $[\alpha]_D^{30} = -22.7$  (C= 2, etanol); (European Patent, Patent Number: EP0288278).



Şekil 3.5. Nα-Boc-Nε-2-kloro benziloksikarbonil-L-lizin-*p*-nitrofenil ester sentezi

### 3.2.6. L-lizinin *p*-nitrofenil esteri sentezi

1.82 g (3,4 mmol) Nα-Boc-Nε-2-klorobenziloksikarbonil-L-lizin-*p*-nitrofenil esteri oda sıcaklığında 10 ml metilen klorür içerisinde çözüldü. Azot atmosferi altında 10 ml metilen klorürde çözülmüş 5 ml TFA (Trifloro asetik asit) 30 dakika içerisinde yavaş yavaş ilave edildi. Daha sonra balon muhtevası 30 ml metilen klorürle seyreltildi. 0.5 N NaOH ile ekstrakte edildi ve sulu fazın pH'sı 10 civarına getirildi. Organik faz ayrıldı . Susuz Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> üzerinden kurutularak evapore edildi. Madde mutlak etanolde kristallendirildi. Erime noktası: 208-210 °C; Renk: açık sarı; Verim: 0.8 g (%60);  $[\alpha]_D^{30} = -29.0$  (C =0.4, etanol); (Curini ve ark., 2002).



Şekil 3.6. L-lizinin -*p*-nitrofenil esterinin sentezi

### 3.3. Kiral Kolon Hazırlanması ve Enantiyomerik Verimin Belirlenmesi

#### 3.3.1. Kiral kolon hazırlanması

Affinite kromatografisinde sabit faz dolgu maddesi hazırlanırken; aktive edilmiş Sepharose 4B'ye aromatik gruba sahip tirozin yan kol olarak bağlanmakta ve tirozine enzim inhibitörü olarak bilinen bazı diazonyum tuzları kenetlenerek spesifik bir uzatma koluna sahip dolgu maddesi elde edilmektedir (Arslan ve ark., 1996). Bu metottan hareketle Pirkle-tip kolon dolgu maddesi hazırlanırken, affinite kromatografisinin sabit fazını oluşturan dolgu maddesinin ligantları üzerinde değişiklikler yaparak yeni bir sabit faz oluşturulması uygun görüldü ve kiral amino asitlerin aromatik amin türevlerinin hazırlanıp tirozine diazonyum tuzları halinde kenetlenerek enantiyomerik ayırmada ligant olarak kullanması tasarlandı.

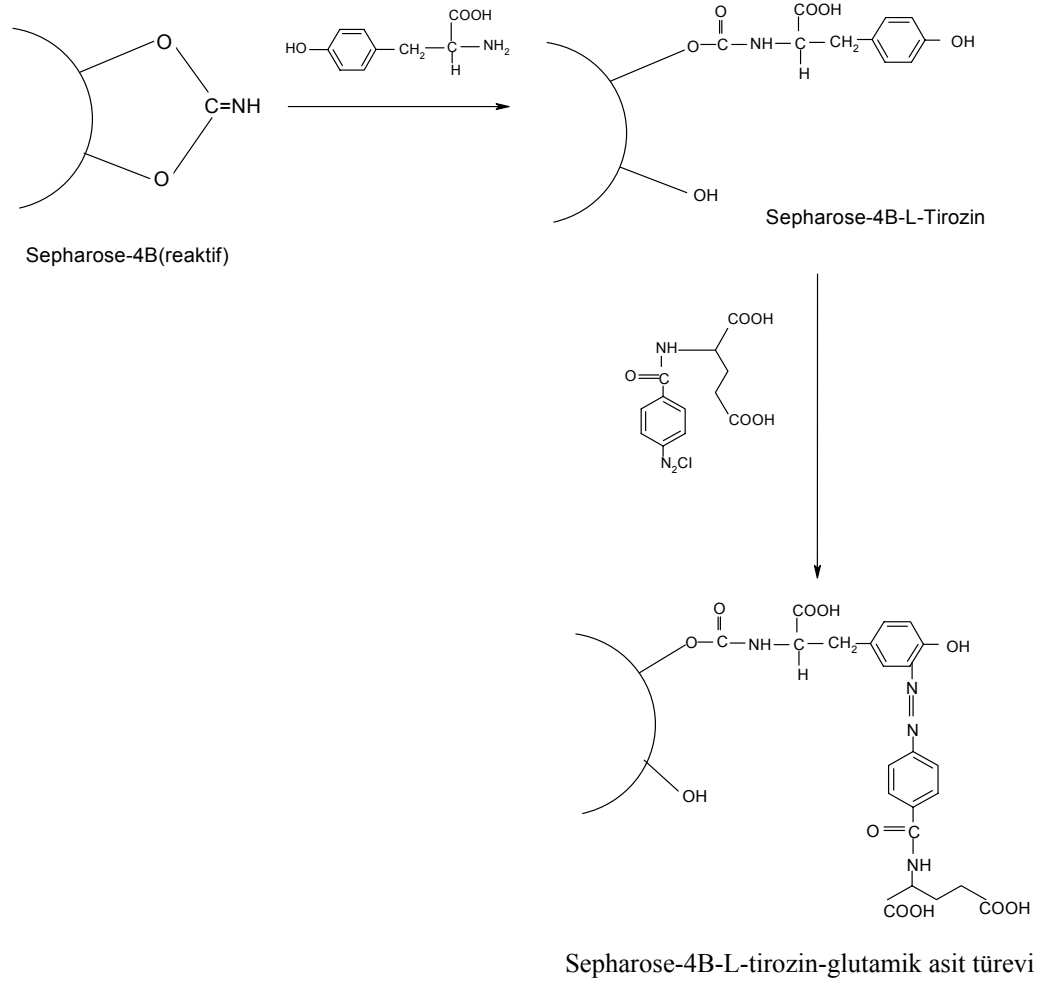
Bu amaçla; 5.0 g aktifleştirilmiş Sepharose-4B kolon dolgu maddesi saf suyla şişirildi. Daha sonra nuçe erleni kullanılarak sırayla saf su ve 0.2 M pH 10 bikarbonat tamponu ile birkaç kez yıkandı. Dolgu maddesi bir behere alındı ve bir magnetik karıştırıcı üzerinde 20 ml suda çözülmüş 80 mg L-tirozin 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*-aminobenzoil-(S)-glutamik asit, 1 M 10 ml HCl'de soğutulularak çözüldü. Bu karışıma 5 ml suda çözülmüş 100 mg NaNO<sub>2</sub> 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 3.8 de gösterilmiştir:



Şekil 3.7. Kiral kolonunun hazırlanışı

### 3.3.2. Rasemik karışımın kolona tatbik edilmesi

Rasemik 100 µL β-metilfeniletülinin bileşiği 10 ml fosfat tamponunda (0.2 M ve pH 6) çözüldü ve kolona tatbik edildi. Yürütücü faz (0.2 M pH 6 fosfat tamponu) ile rasemik karışımın elüe edilmesi sağlandı. Elüatın akış hızı peristaltik pompa ile ayarlandı (Devir sayısı: 5 rpm). Kolondan alınan elüatlar her tüp 3 ml olacak şekilde toplam on tüpe alındı. Tüplere alınan elüatların absorbansları UV-spektrofotometresi ile  $\lambda = 256$  nm'de okundu ve herbir pH değeri için ayrı ayrı olmak üzere 3. 4. 5. ve 6. tüplerde bileşiğin geldiği belirlendi. Bu tüplerdeki karışımın pH'sı yaklaşık 14

civarına getirildi ve sonra eter ile ekstraksiyon yapılarak nötral aminin eter fazına alınması sağlandı. Eter evapore edildi ve üzerine 2 ml HClO<sub>4</sub> (pH 1.5) ilave edildi. Bu şekilde numune HPLC ile enantiyomerik fazlalık (e.e.) derecesinin belirlenmesi için hazır hale geldi.

### 3.3.3. HPLC ile Enantiyomerik verimin belirlenmesi

Yukarıda (3.3.2.'de) anlatıldığı gibi elde edilen numune 10 kat seyreltilerek HPLC cihazının numune haznesine enjekte edildi. Yürütücü faz olarak HClO<sub>4</sub> (pH 1.5) çözeltisi kullanıldı (Akış hızı 1.0 ml/dk ve Kolon basıncı 100 bar). Bu çalışmada UV-dedektörü ve Crownpak CD-11 kiral kolon kullanıldı. Aşağıda belirtilen ve ekler bölümünde de kromatogramları verilen şekillerde de görüldüğü gibi önce (S)-enantiyomer sonra (R)-enantiyomer kolondan ayrıldı.

**100 µL β-metilfeniletilamin ile yapılan rezolüsyon çalışmalarına ait kromatogram sonuçları:**

- **pH 5 tamponu** : beşinci tüp için Ek Şekil 5.1., altıncı tüp için Ek Şekil 5.2.
- **pH 6 tamponu** : dördüncü tüp için Ek Şekil 5.3., beşinci tüp için Ek Şekil 5.4. ve altıncı tüp için Ek Şekil 5.5.
- **pH 7 tamponu**: üçüncü tüp için Ek Şekil 5.6., dördüncü tüp için Ek Şekil 5.7., beşinci tüp için Ek Şekil 5.8.
- **pH 8 tamponu**: üçüncü tüp için Ek Şekil 5.9., dördüncü tüp için Ek Şekil 5.10., beşinci tüp için Ek Şekil 5.11., altıncı tüp için Ek Şekil 5.12.' de verilmiştir.

Daha sonra optimum akış hızı 1.0 ml/dk ve optimum pH 6 olarak belirlendi ve ayrılmanın en iyi olduğu bu pH'da hazırlanan kolona daha az numune yüklenerek (50 µL) rezolüsyon çalışmaları tekrarlandı. UV de aynı dalga boyunda okunarak 6. 7. 8. ve 9. tüplerde madde olduğu belirlendi ve bu tüplerdeki numuneler kiral UV dedektörde aynı kiral kolon kullanılarak ve aynı dalga boyunda okunarak rezolüsyon verimi hesaplandı.

**50 µL β-metilfeniletülamın ile yapılan rezolüsyon çalışmalarına ait kromatogram sonuçları:**

- **pH 6 tamponu:** beşinci tüp için Ek Şekil 5.13., altıncı tüp için Ek Şekil 5.14., yedinci tüp için Ek Şekil 5.15., sekizinci tüp için Ek Şekil 5.16., dokuzuncu tüp için Ek Şekil 5.17.'de verilmiştir.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI ve TARTIŞMA

### 4.1. Sentezlenen Bileşiklerin Yapılarının Spektroskopik Yöntemlerle Aydınlatılması

Sentezlenen bileşiklerin yapısı incelendiğinde bileşiklerin tümünün spektroskopik verilerinin önerilen yapılarla uyum içinde olduğu bulundu. Sci Finder Scholar programıyla yapılan taramada yalnızca N-*p*-aminobenzoil-(S)-glutamik asidin yeni olduğu diğerlerinin ise daha önce sentezlendiği anlaşıldı. N-*p*-aminobenzoil-(S)-glutamik asidin diazolanmasıyla tirozine kenetlenmesi sonucu hazırlanan kiral kolon dolgu maddesi de yenidir. Daha sonra rezolüsyon çalışmalarında kullanılması düşünülen N-[(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil)propanoil]-(S)-aspartik asit ve L-lizinin p-nitrofenil esterinin Sepharose-4B'ye bağlanmasıyla oluşacak kiral kolon dolgu maddeleri de yeni olacaktır. Ayrıca N $\alpha$ -Boc-N $\epsilon$ -2-klorobenziloksikarbonil-L-lizin-p-nitrofenil esteri Pd/C katalizörlüğünde hidrojenasyonla p-aminofenil esterine dönüştürülmüş ve diazolanarak aktive edilmiş Sepharose -4B'ye bağlanmıştır. Bu yeni hazırlanan kolonla da ( $\pm$ )-Glutamik asidin rezolüsyon çalışmaları sürdürülmektedir. N-[(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil)propanoil]-(S)-aspartik asidin de hem uzatma kolu hem de ligant olarak aktive edilmiş Sepharose -4B'ye direk bağlanması düşünülmektedir.

#### 4.1.1. <sup>1</sup>H NMR spektrumları

N-*p*-nitrobenzoil-(S)-glutamik asidin <sup>1</sup>H NMR spektrumu incelendiğinde aromatik bölgede 2 farklı protondan dolayı 8.12 ve 8.33 ppm'de iki farklı dubletin gözlenmesi ve 9.02 ppm'de bir proton değerinde amit N-H'ına ait bir sinyal gözlenmesi p-nitrobenzoil grubunun glutamik asitle amin oluşturduğunun göstergesidir (Ek Şekil 1.1.). N-*p*-aminobenzoil-(S)-glutamik asidin N-*p*-nitrobenzoil-(S)-glutamik asitten farkı nitro grubunun aromatik amine dönüştürülmesidir. Bu tepkimenin de başarılı bir şekilde yürüdüğü ve N-*p*-

aminobenzoil-(S)-glutamik asidin sentezlendiği hem e.n. ölçümünden hem de  $^1\text{H}$  NMR'da benzen halkasına ait protonların kimyasal kayma değerlerinin elektron verici amino grubunun yapıya girmesiyle yukarı alana kaymasından anlaşılmaktadır (Ek Şekil 1.2.). (S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil) propanoik asit metil esteri literatürde bilinen bir bileşik olduğundan yapı aydınlatılmasına gidilmedi. N-[(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil)propanoil]-(S)-aspartik asit bileşiği L-tirozinin bir amit türevi olup sentezinin başarılı olduğu  $^1\text{H}$  NMR'da aromatik protonların integrasyon değerlerinin alifatik protonlarınkine oranından anlaşılmaktadır (Ek Şekil 1.3.).  $\text{N}\alpha$ -Boc- $\text{N}\epsilon$ -2-kloro benziloksikarbonil-L-lizin-p-nitrofenil esterinin yapısı incelendiğinde yapının spektroskopik verilerle uyum içinde olduğu ve literatürde benzer yapılar incelendiğinde yakın sonuçlarla karşılaşıldığı görülmektedir (Martin ve ark., 1959).  $^1\text{H}$  NMR spektrumuna bakıldığında Boc-L-lizinin yapısında aromatik protonların olduğu göz önüne alınırsa sentezin gerçekleştiği hem aromatik protonlara ait sinyal sayısının artmasından anlaşılmaktadır. Ayrıca  $^1\text{H}$  NMR da integrasyon değerlerinin aromatik protonlar/alifatik protonlar oranı  $\approx 7.62/19.37$  olarak gözlenirken, yapıdaki protonlar sayıldığında bu değer 7/20 olduğu görülmektedir. Bu durum yine sentezin olumlu yönde gerçekleştiğinin göstergesidir (Ek Şekil 1.4.).  $\text{N}\alpha$ -Boc- $\text{N}\epsilon$ -2-kloro benziloksikarbonil-L-lizin-p-nitrofenil esterinden Boc gruplarının uzaklaştırılmasıyla elde edilen L- Lizinin p-nitrofenil esteri bileşiğinde ise aromatik gruplara ait sinyal sayısının azaldığı  $^1\text{H}$  NMR spektrumundan gözlenmektedir.  $^1\text{H}$  NMR spektrumunda aromatik bölgede 6.68 ppm ve 6.95 ppm'de gözlenen iki farklı dublet yine nitro grubu taşıyan benzen halkasının kaldığının ve 2-klorobenziloksikarbonil grubunun uzaklaştığının göstergesidir ( Ek Şekil 1.5.). Çizelge 4 .1.'de sentezlenen bileşiklerin  $^1\text{H}$  NMR( $\delta$ ppm) kimyasal kayma değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.1. Sentezlenen bileşiklerin <sup>1</sup>H NMR(δppm) kimyasal kayma değerleri

Bileşiğin ismi, kapalı formülü ve ona ait Ekler bölümündeki spektrumun yeri	<sup>1</sup> H NMR(δppm)
N- <i>p</i> -nitrobenzoil-(S)-glutamik asit C <sub>12</sub> H <sub>12</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Ek Şekil 1.1.	1.93-2.16 (m, 2H), 2.36-2.50 (m, 2H), 4.40-4.46(m, 1H),8.12 (d, 2H), 8.33 (d, 2H), 9.02 (d, 1H), 12.35 (b.s, 2H)
N- <i>p</i> -aminobenzoil-(S)-glutamik asit C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Ek Şekil 1.2.	1,85 (d, 2H), 1.95-2.08 (m, 2H), 4.11 (m, 1H),6.55 (d, 2H), 7.55 (d, 2H), 7.87 (d,2H). Karboksilik asit protonları ve amit N-H protonu gözlenemedi.
(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil) propanoik asit metil esteri C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub>	Sentezlenen yapının spektroskopik verileri literatürle uyumludur.
N-[(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil) propanoil]-(S)-aspartik asit C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O.1/2(H <sub>2</sub> O) Ek Şekil 1.3.	2.50 (m, 2H), 2.77 (m, 2H), 3.58 (bs, 1H), 5.65 (bs, 4H), 6.68 (d, 2H), 6.95 (d,2H). Amit NH protonu ve karboksilik asit protonları gözlenemedi.
Nα-Boc-Nε-2-kloro benziloksikarbonil-L-lizin- <i>p</i> -nitrofenil esteri C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> Cl Ek Şekil 1.4.	1.37-1.45 (m, 15H), 3.03 (bs, 2H), 4.04-4.16 (m, 1H), 5.09 (s, 2H),7.36-7.57 (m, 8H), 8.31 (d, 1H). Diamite ait NH protonlarından biri gözlenmedi
L-lizin- <i>p</i> -nitrofenil esteri C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> Ek Şekil 1.5.	1,21-1,62 (m, 8H), 2.95-3.02 (bs, 2H), 4,22-4,38 (m, 1H), 5.07(s, 2H), 6.91(d, 2H), 7.35(d,2H)

#### 4.1.2. <sup>13</sup>C NMR spektrumları

N-*p*-nitrobenzoil-(S)-glutamik asidin <sup>13</sup>C NMR spektrumunda hem amit karbonilinin karbon atomuna ait 165.5 ppm'de bir sinyal hem de karboksil karbonlarına ait 173.5 ppm ve 174.2 ppm'de iki farklı sinyalin gözlenmesi önerilen yapıyı doğrulamaktadır (Ek Şekil 2.1.). N-*p*-aminobenzoil-(S)-glutamik asidin <sup>13</sup>C NMR spektrumu yapıyla uyum içindedir (Ek Şekil 2.2.). (S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil) propanoik asit metil esteri literatürde bilinen bir bileşik olduğundan yapı aydınlatılmasına gidilmemiştir. N-[(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil) propanoil]-(S)-aspartik asit bileşiği <sup>13</sup>C NMR spektrumunda hem 160 ppm civarında çıkan amit karboniline ait bir pik hem de 172.6 ve 174.7 ppm'deki karboksil karbonlarına ait 2

ayrı pik, yapının önerilen şekilde olduğunu doğrulamaktadır.  $^{13}\text{C}$  NMR da hem alifatik hem de aromatik karbonlara ait pikler bulunması ve bileşiğin karbon sayısına karşılık gelmesi de benzen halkasının aspartik asite amit grubu üzerinden bağlandığının göstergesidir (Ek Şekil 2.3.).  $\text{N}\alpha$ -Boc- $\text{N}\epsilon$ -2-klorobenziloksikar- bonil-L-lizin-*p*-nitrofenil esterinin  $^{13}\text{C}$  NMR spektrumundaki 171.5 ppm'de ester karboniline ait bir sinyal gözlenmiştir (Ek Şekil 2.4.). L-lizinin *p*-nitro fenil bileşiğinin  $^{13}\text{C}$  NMR da aromatik protonlara ait dört pik gözlenmesi (  $\text{N}\alpha$ -Boc- $\text{N}\epsilon$ -2-klorobenziloksikarbonil-L-lizin-*p*-nitrofenil bileşiğinde dokuz pik gözlenirken) yapıda sadece nitro grubu taşıyan ve ester grubu üzerinden bağlanan aromatik halkanın kaldığını diğer benzen halkasının ve Boc- grubunun uzaklaştığını göstermektedir (Ek Şekil 2.5.). Çizelge 4.2.'de sentezlenen bileşiklerin  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\delta$ ppm) kimyasal kayma değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.2. Sentezlenen bileşiklerin  $^{13}\text{C}$  NMR( $\delta$ ppm) kimyasal kayma değerleri

Bileşiğin ismi, kapalı formülü ve ona ait Ekler bölümündeki spektrumun yeri	$^{13}\text{C}$ - NMR( $\delta$ ppm)
N- <i>p</i> -nitrobenzoil-(S)-glutamik asit $\text{C}_{12}\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_7$ Ek Şekil 2.1.	26.2, 30.8, 52.6, 123.9, 129.4, 139.9, 149.6, 165.5, 173.4, 174.2
N- <i>p</i> -aminobenzoil-(S)-glutamik asit $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5$ Ek Şekil 2.2.	29.4, 34.3, 55.1, 113.2, 121.8, 128.9, 151.9, 166.2, 177.0, 179.2
(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil) propanoik asit metil ester $\text{C}_{10}\text{H}_{13}\text{NO}_3$	Sentezlenen yapının spektroskopik verileri literatürle uyumludur.
N-[(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil) propanoil]-(S)-aspartik asit $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_6 \cdot 1/2(\text{H}_2\text{O})$ Ek Şekil 2.3.	37.2, 50.1, 51.9, 55.8, 115.5, 127.4, 130.6, 156.6, 160.0, 172.5, 174.6
$\text{N}\alpha$ -Boc- $\text{N}\epsilon$ -2-klorobenziloksi karbonil-L-lizin- <i>p</i> -nitrofenil ester $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_3\text{O}_8\text{Cl}$ Ek Şekil 2.4.	24.6, 28.5, 29.3, 32.2, 54.4, 55.3, 63.0, 79.0, 116.2, 123.3, 125.8, 127.7, 129.6, 130.0, 130.1, 132.7, 135.0, 145.5, 155.8, 156.2, 171.5.
L-lizin- <i>p</i> -nitrofenil ester $\text{C}_{12}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_4$ Ek Şekil 2.5.	24.8, 25.5, 29.7, 33.8, 49.4, 115.7, 126.1, 163.5

### 4.1.3. Kütle ve IR spektrumları

N-[(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil)propanoil]-(S)-aspartik asit bileşiğinin kütle spektrumunda moleküler iyon piklerinin önerilen yapının  $M_A$  değerine karşılık geldiği görülmektedir (Ek Şekil 4.1.).

Bileşiğin IR spektrumuna bakıldığında  $3240\text{ cm}^{-1}$  ve  $3350\text{ cm}^{-1}$ 'de sırasıyla amit hidrojenine ait orta şiddette tekli pik ve primer amin hidrojenlerine ait N-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanan ve yine orta şiddette ikili pikler ve karboksilli asit ve amit karbonillerine ait sırasıyla  $1742$  ve  $1693\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenen C=O gerilme titreşimlerine ait pikler sentezi düşünülen yapıyı doğrulamaktadır. Ayrıca hem alifatik hem de aromatik C-H gerilme titreşimlerine ait pikler sırasıyla  $2940$  ve  $3111\text{ cm}^{-1}$ 'de gözlenmişlerdir. Karboksil gruplarının tipik belirgin özelliğini ortaya koyan ve O-H gerilme titreşimlerinden kaynaklanan  $3600 - 2860\text{ cm}^{-1}$  arasındaki oldukça yayvan pik de bileşiğin beklenen yapıya uygunluğunun göstergesidir (Ek Şekil 3.1.). N $\alpha$ -Boc-N $\epsilon$ -2-kloro benziloksikarbonil-L-lizin-p-nitrofenil esterinden Boc gruplarının uzaklaştırılmasıyla elde edilen L-lizinin p-nitro fenil esterinin IR spektrumunda  $3355\text{ cm}^{-1}$ 'deki N-H gerilme titreşimlerine ait ikili pik primer amin gruplarından kaynaklanmakta olup Boc- gruplarının uzaklaştığının göstergesidir (Ek Şekil 3.2.). Çizelge 4.3.'de sentezlenen bileşiklerin IR kimyasal kayma değerleri verilmiştir.

Çizelge 4.3. Sentezlenen bileşiklerin IR kimyasal kayma değerleri

Bileşiğin ismi, kapalı formülü ve ona ait Ekler bölümündeki spektrumun yeri	IR ( $\nu_{\text{cm}^{-1}}$ )
N-[(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil)propanoil]-(S)-aspartik asit $C_{13}H_{16}N_2O_6 \cdot 1/2(H_2O)$ Ek Şekil 3.1.	3355, 3240, 3111, 2933, 1744, 1693, 1650, 1573, 1415, 1346, 1316, 1226, 1102, 822, 721,635
L-lizinin p-nitro fenil esterini $C_{12}H_{17}N_3O_4$ Ek Şekil 3.2.	3300–3350, 2980, 2860, 1720, 1650, 1570, 1500–1450, 1250, 1180, 1050



Çizelge 4. 4.'de sentezlenen bileşiklerin molekül ağırlıkları, erime noktaları, reaksiyon verimleri, sahip oldukları renkler ve çevirme açıları verilmiştir.

Çizelge 4. 4. Sentezlenen bileşiklerin M.A. (Molekül ağırlıkları), E.N. (Erime noktaları), (%) reaksiyon verimi, renk ve çevirme açısı verilmiştir

Bileşiğin ismi ve Çevirme açısı: $[\alpha]_D^{30}$	M.A. g/mol	E.n. (°C)	Verim (%)	Renk
N- <i>p</i> -nitrobenzoil-(S)-glutamik asit $[\alpha]_D^{30} = -15.7$ (C= 0.6, etanol)	296	192	64	açık sarı renkli kristal
N- <i>p</i> -aninbenzoil-(S)-glutamik asit $[\alpha]_D^{30} = -9.8$ (C= 0.8, etanol)	266	-	78	yağimsı sarı renkli akışkan sıvı
(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil) Propanoik asit metil esteri	195	162	42	-
N-[(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil) propanoil]-(S)-aspartik asit $[\alpha]_D^{30} = +3.0$ (C= 0.5 $1.10^{-3}$ M, HClO <sub>4</sub> )	305	128	-	Beyaz kristal
N $\alpha$ -Boc-N $\epsilon$ -2-kloro benziloksikarbonil-L-lizin- <i>p</i> -nitrofenil esteri $[\alpha]_D^{30} = -22.7$ (C= 2, etanol)	535	92	90	kirli beyaz kristal
L-lizin- <i>p</i> -nitrofenil esteri $[\alpha]_D^{30} = -29.0$ (C=0.4, etanol)	267	208-210	60	Açık sarı renkli Kristal

## 5. SONUÇLAR ve ÖNERİLER

### 5.1. Sonuçlar

- Bu çalışmada sentezlenen bileşiklerden N-*p*-aminobenzoil-(S)-glutamik asit diazolanarak aktive edilmiş Sepharose-4B kolon dolgu maddesine takılı L-tirozin grubunun aromatik halkasına *o*-konumunda kenetlendi.
- Kenetlenmenin başarıyla gerçekleştiği kolon renginin diazonyum tuzlarının tipik rengi olan açık sarıya dönüşmesinden anlaşıldı.
- Daha sonra biyolojik öneme sahip kiral aminlerden ( $\pm$ )- $\beta$ -metilfeniletilamin alınıp bu aminin rezolüsyon çalışmaları yapıldı.
- Değişik pH'larda tampon çözeltiler kullanılarak başlangıçtaki rasemik kiral aminin enantiyomerleri kolondan sırasıyla alındı ve numuneler önce polarimetrede okundu. Fakat çok düşük derişimlerde çalışıldığından polarimetredeki okumaların sağlıklı olmadığı görüldü. Bu yüzden daha farklı bir yöntem takip edilerek nümuneler önce UV'de  $\lambda = 256 \text{ nm}$ 'de okunarak kiral aminin hangi tüplerden geldiği tespit edildi.
- Daha sonra da HPLC'de kiral UV dedektörle Crownpak-CD-11 kiral kolon kullanılarak  $\lambda = 200 \text{ nm}$ 'de okundu ve analiz edildi. Bu işlemler sırasında yürütücü sıvı faz olarak da  $\text{HClO}_4$  (pH = 1.5) çözeltisi kullanıldı.
- Bölüm 3.3.2.'de anlatıldığı gibi rasemik amin, hazırlanan kolona farklı miktarlarda (100 ve 50  $\mu\text{L}$ ) olmak üzere iki kez yüklendi.
- İlk numunenin (100  $\mu\text{L}$   $\beta$ -metilfeniletilamin) analizinden elde edilen sonuçlar değerlendirildiğinde kolon kapasitesinin çok üzerinde çalışıldığı anlaşıldı ve daha az miktarda rasemik karışım numunesi kolona yüklenerek (50  $\mu\text{L}$ ) rezolüsyon çalışmaları tekrar edildi.
- Bu ilk rezolüsyon işlemi sırasında elde edilen sonuçlardan en uygun pH'da aynı işlemler bu kez 50  $\mu\text{L}$  için tekrarlandı. Alınan eluatlar önce UV spektrofotometresinde aynı dalga boyunda okunarak hangi tüplerde kiral

amine rastlandığı tespit edildi. Daha sonra da bu tüpler uygun işlemlerden geçirildikten sonra kiral dedektöre verilerek rezolüsyon verimi bulundu.

- Bu işlemler sırasında kiral Crownpak kolon kullanıldı.
- Rezolüsyonun veriminin hesaplanması için aşağıdaki formülden faydalanılarak rezolüsyon verimi bulundu.

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

- Bu formüle göre % e.e. yani rezolüsyon verimleri hesaplandığında, 100 µL β-metilfeniletilamin'in kullanıldığı ilk rezolüsyon çalışmasında en yüksek verime pH = 6'da altıncı tüpte ulaşıldı (Ek Şekil 5.5.).
- Kiral kolondan hangi enantiyomerin önce geldiğini anlamak için ise kiral kolona standart rasemik β-metilfeniletilamin numunesi enjekte edildi. Önce (S) enantiyomer sinyalinin gözlemlendiği tespit edildi. Bu işlem için (S) izomer (R) izomere oranla biraz daha fazla alınarak pik integrasyonları karşılaştırılıp hangisinin önce geldiği belirlendi.
- Kiral dedektördeki okumalarda (S) enantiyomerin oranı (R) enantiyomere göre daha fazla çıktı ve kolondan önce (S) enantiyomerin geldiği (41. dakika ve % alan değeri = 64.97) daha sonrada (R) enantiyomerin geldiği (49. dakika ve % alan değeri = 31.64) tespit edildi (Ek Şekil 5.5.).
- Bu da (R) enantiyomerin kolonda daha fazla alıkonulduğunun göstergesidir.
- Bu sonuçlar kolanla başarılı bir rezolüsyon çalışması yapıldığını göstermektedir.
- Piklerin alan değerleri formülde yerlerine konursa,

$$\% \text{ e.e.} = \frac{(64.97-31.64)}{(64.97+31.64)} \times 100 = 34.49 \approx \% 35 \text{ değeri elde edilir. (S > R)}$$

- Daha sonra bu rezolüsyon verimini yükseltilmesi için optimum şartlar ayarlanarak ikinci kez yapılan rezolüsyon deneylerinde 50 µL

$\beta$ -metilfeniletilamin kullanılarak en yüksek rezolüsyon verimine yine pH 6'da sekizinci tüpte ulaşıldı.

- (S) enantiyomerin kolondan çıkma süresi 26. dakika ve pikin % alan değeri 55.83 olarak kaydedildi. (R) enantiyomer için ise bu değerler 33. dakika ve % alan değeri 20.08 olarak gözlemlendi (Ek Şekil 5.16.). Bu değerler de yukarıdaki formülde yerine konulursa,

$$\% \text{ e.e.} = \frac{(55.83-20.08)}{(55.83+20.08)} \times 100 = 47.14 \approx \%47 \text{ değeri elde edilir. (S > R)}$$

- Enantiyomerik fazlalık %50'ye yakın bir değerdir.
- Diğer sentezlenen bileşiklerle ilgili olarak rezolüsyon çalışmaları sürdürülmektedir.

## 5.2. Öneriler

- Bu çalışmada oldukça güzel bir ayırma verimi elde edildi. Fakat rezolüsyon şartlarını değiştirerek (kolon dolgu maddesinin miktarını artırmak yani kolon boyunu uzatmak veya kolona daha az nümune yüklemek veya kolonda sentezlediğimiz kenetleme reaktiflerinden yeni birini kullanmak gibi) daha yüksek verimle rezolüsyon çalışmaları yapılabilir.
- Ayrıca 50  $\mu\text{L}$  için örneğin pH 6'da 8. tüpteki (Ek Şekil 5.16.) numuneyi (ayrılmanın en yüksek olduğu) 2. kez kolona tatbik ederek iki basamaklı rezolüsyonla % 90 e.e. değerine ulaşılması da mümkündür.
- Bundan başka sentezlenen ligantlarla değişik aldehit ya da ketonların etkileştirilmesiyle yeni orijinal Schiff bazları ve bunların metal kompleksleri hazırlanarak bu komplekslerin asimetric sentez tepkimelerinde (Nitro aldol tepkimeleri, Diels-Alder tepkimeleri gibi) kullanımları başlı başına ayrı bir araştırma konusu olarak çalışılabilir.

## KAYNAKLAR

- ARSLAN, O., NALBANTOĞLU, B., DEMİR, N., ÖZDEMİR, H., and KÜFREVİOĞLU, İ., 1996. A New Method for The Purification of Carbonic Anhydrase Isoenzymes by Affinity Chromatography. *Turkish Journal of Medical Sciences*, 26:163-166.
- BENCINI, A., BENELLI, C., and GATTESCHIO, I., 1984. The Angular Overlap Model for The Description of The Paramagnetic Properties of Transition Metal Complexes. *Coordination Chemistry Reviews*, 60:131-169.
- BOJASKI, J., ABOUL-ENEIN, H. Y., and GHANEM, A., 2005. What's New in Chromatography Enantioseparations. *Current Analytical Chemistry*, 1: 59-77.
- CHANDRA, S., and KUMAR, R., 2004. Synthesis and Spectral Studies on Mononuclear Complexes of Chromium(III) and Manganese(II) with 12-Membered Tetradentate N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub>S<sub>2</sub> and N<sub>4</sub> Donor Macrocyclic Ligands. *Transition Metallic Chemistry*, 29:269-275.
- CURINI, M., EPIFANO, F., MALTESE, F., and MARCOTULLIO, M. C., 2002. Novel Chiral Schiff Base Ligands from Amino Acid Amides and Salicylaldehyde. *Tetrahedron Letters*, 43:3821-3823
- EUROPIAN PATENT. Patent Number: EP-0288278
- FURNISS, B. S., HANNAFURT, A. J., SMITH, P. W. G., and TATCHELL, A. R. 1989. *Vogels Textbook of Practical Organic Chemistry*. London, fifth Edition,.
- GÜRKAN, P., and SARI, N., 1999. Yttrium(III), Cerium(III) and Lanthanum(III) Complexes of Salicylideneamino Acids, Synthesis, Characterization and Potentiometric Studies. *Synt. React. Inorg. Met. Org. Chem.*, 29:753-765.
- KODAMA, S., YAMAMATO, A., MATSUNAGA, A., and HAYAKAWA, K., 2003. Direct Chiral Resolution of Tartaric Acid by Ion, or Cappillary Electrophoresis Using an Aqueous Background Alestroyte with (1R, 2R)-(-)-1, 2- Diaminocyclohexane as a Chiral Counterion. *Electrophoresis*, 24:2711-2715.
- KUBOTA, T., YAMAMATO, C., and OKAMOTA, Y., 2004. Resersed-Phase Liquid Chromatography Enantioseparation by Cycloalkylcarboxylates of Cellulose and Amylose. *Chirality*, 16:309-313.
- MARTIN, C. J., GOLUBOW, J., and AXELROD, A. E., 1959. The Hydrolysis of Carbobenzoxy-L-Tyrosine p-Nitrophenylester by Various Enzymes. *Journal of Biological Chemistry*, 234 (7):1718-1725.
- MATSUI, Y., TSUHITANI, Y., and YAMAHA, Y., 1973. Acid Chloride of Amino Acids. *Chemical Abstracts*, 78, 136660h.
- NATALINI, B., SADELLA, R., and PELLICCIARI, R., 2005. o-Benzyl-(S)-Serine, a New Chiral for Ligand-Exchange Chromatography of Amino Acid. *Current Analytical Chemistry*, 1:85-92.
- NATALINI, B., NARINOZZI, M., BADE, K., SARDELLA, R., THOMSEN, C., and PELLICCIARI, R., 2004. Preparative Resolution of 1-Aminoindan-

- 1,5-Dicarboxylic Acid by Chiral Ligand-Exchange Chromatography. *Chirality*, 16:314-317.
- NIMURA, N., and KINOSHITO, T., 1996. o-Phtalaldehyde–N-Acetyl-L- Cysteine as a Chiral Derivatization Reagent for Liquid Chromatographic Optical Resolution to Conventional Amino Acid Analysis. *Journal Chromatography A.*, 352:169-177.
- PIRKLE, W. H., and FINN, J., 1983. *Asymmetric Synthesis*. Vol. 1, Academic Press. pp. 87-124, New York, USA
- SAUNDERS, B. C., 1934. The Identification of Amino Acids by Means of 3,5-Dinitrobenzoylchloride. *Biochemical Journal*, 28:580-586.
- SHELDON, R. A., 1992. *Industrial Synthesis of Optically Active Compounds, Chirotecnology*. Marcel Dekker, Inc., pp. 53-61 and pp. 27-33, New York, USA.
- SOLOMONS, G., and FRYHLE, C. B. 2000. *Organic Chemistry*. John Willey & Sons. Inc. Seventh Edition.
- TÜMERDEM, R., 2004. Yeni Kiral Schiff Bazlarının Sentezi ve Bunların Karbonil Bileşiklerinin Asimetrik İndirgenmesinde Kullanılması. Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, Diyarbakır, 90 s.
- YAMAGISHI, A., TANIGUCHI, M., IMAMURA, Y., and SATO, H., 1996. Clay Column Chromatography of Optical Resolution: Selectivities of  $\Lambda$ –[ Ru(phen)<sub>3</sub> ]<sup>2+</sup> and  $\Lambda$ –[ Ru(pby)<sub>3</sub> ]<sup>2+</sup> Laponite Columns Towards 1,1'-Binaphthol. *Applied Clay Science*, 11 (1):1-10.
- ZILKHA, A., and LIWSCHITZ, Y., 1957. Preparation of Aspartyl Amides and Peptides Via N-Benzyl-L-Aspartic Anhydride Hydrochloride. *Journal of The Chemical Society*, 43:497-499.

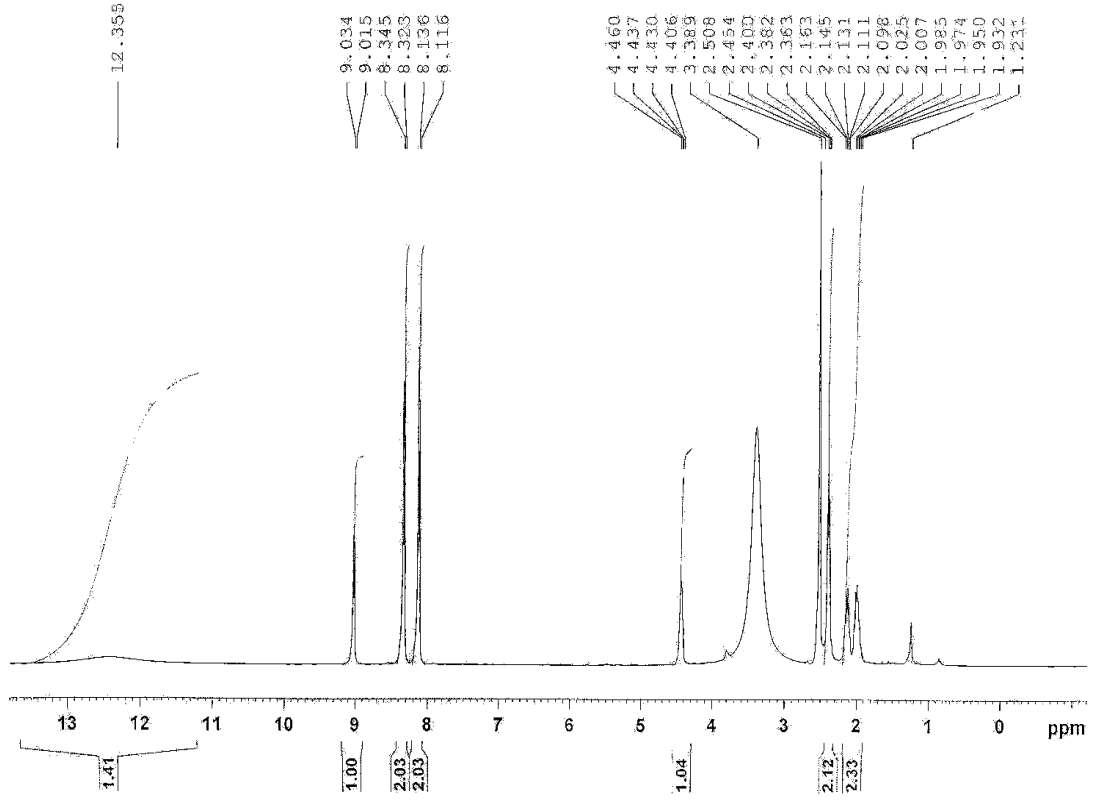
## ÖZGEÇMİŞ

Reşit ÇAKMAK 1979 yılında Diyarbakır'ın Çınar İlçesinde doğdu. İlk öğrenimini Çınar ilçesi Yuvacık İlköğretim okulunda, orta öğrenimini 1999 yılında Diyarbakır Birlik Lisesinde tamamladı. Aynı yıl Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü'nü kazandı. 2001 yılında Dicle Üniversitesi Ziya Gökalp Eğitim Fakültesi Kimya Öğretmenliği bölümüne dikey geçiş yaptı. 2005 yılında Kimya Öğretmeni ünvanıyla mezun oldu. 2006 yılında Harran Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalında yüksek lisans eğitimine başladı.

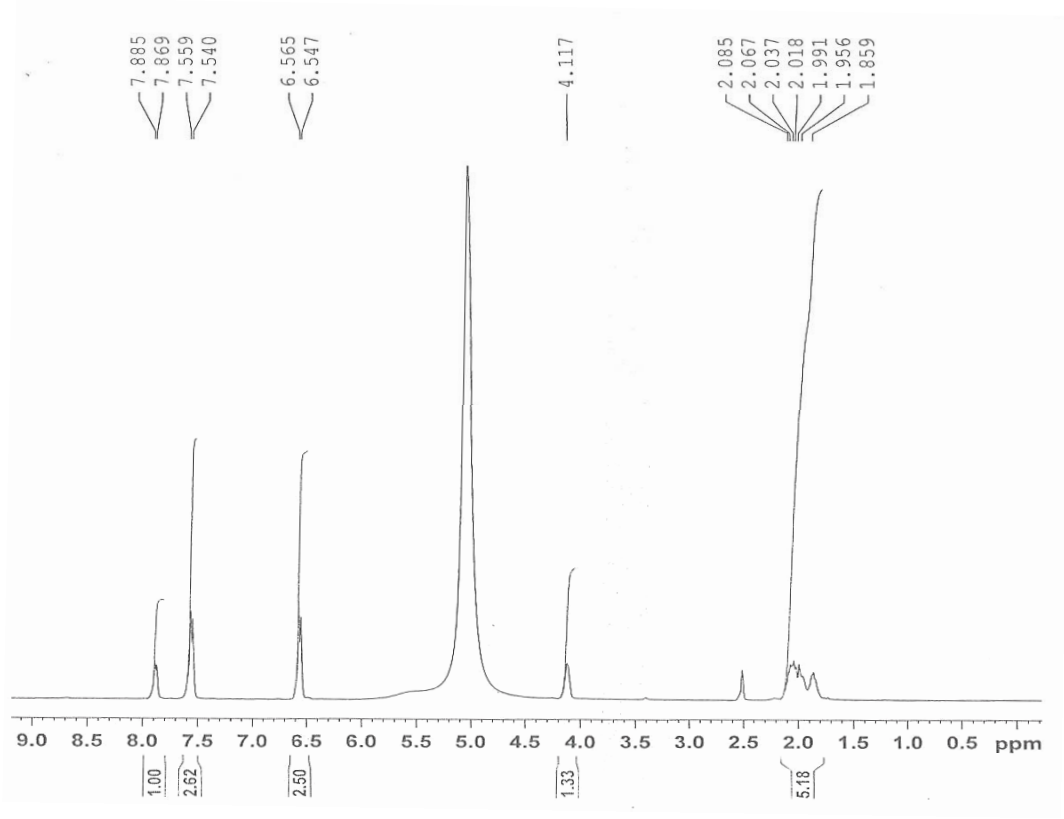
# EKLER



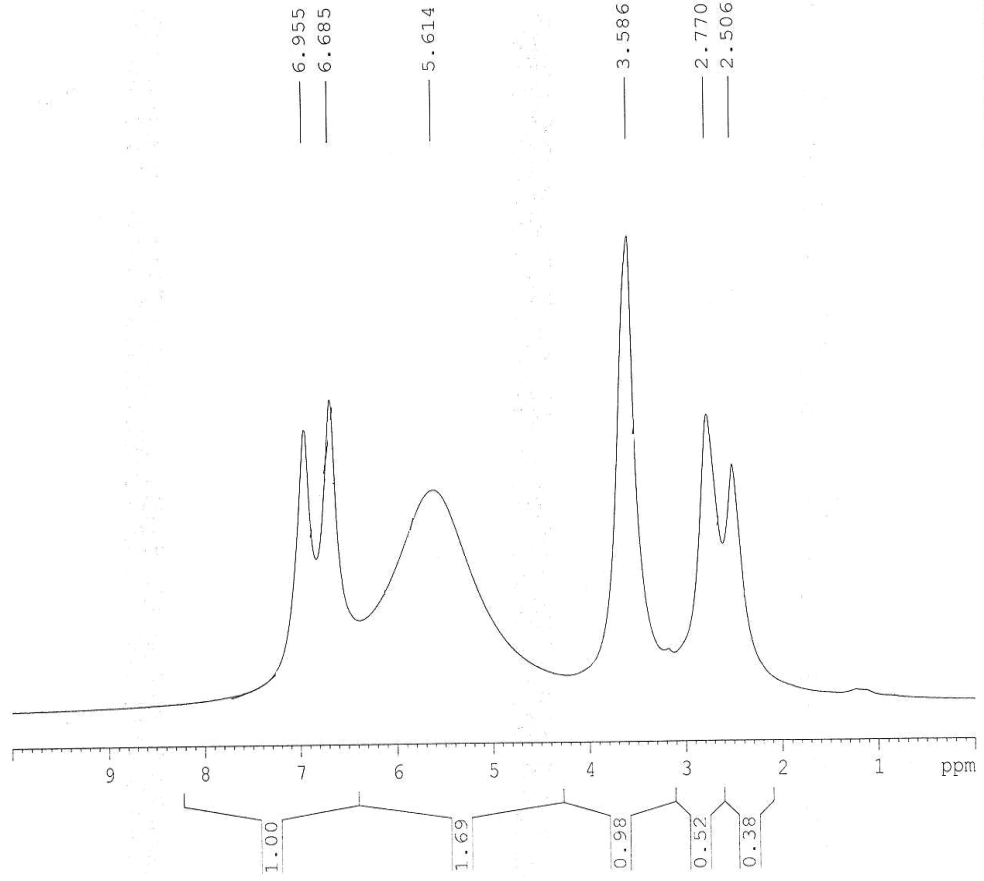
## EK 1. Sentezlenen Bileşiklerin <sup>1</sup>H NMR Spektrumları



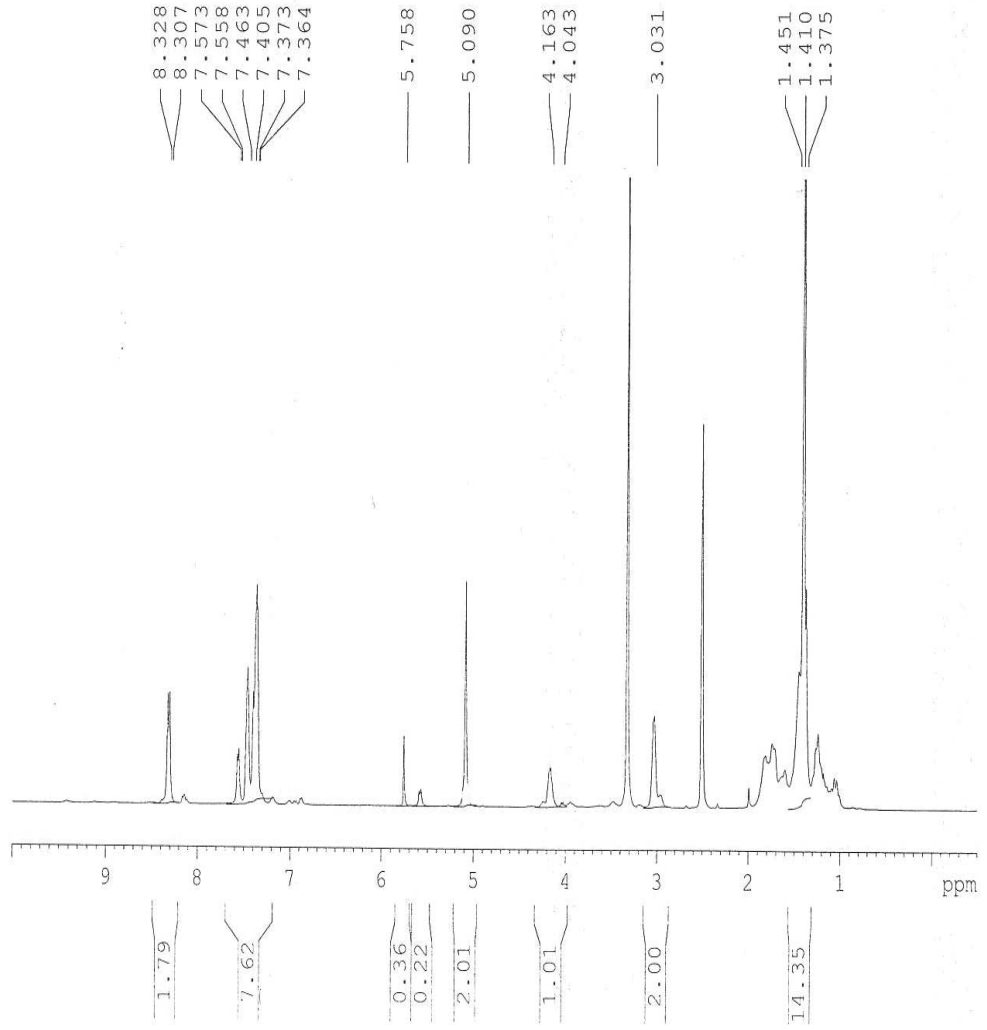
Ek Şekil 1.1. N-*p*-nitrobenzoil-(S)-glutamik asidin DMSO içinde alınan <sup>1</sup>H-NMR spektrumu



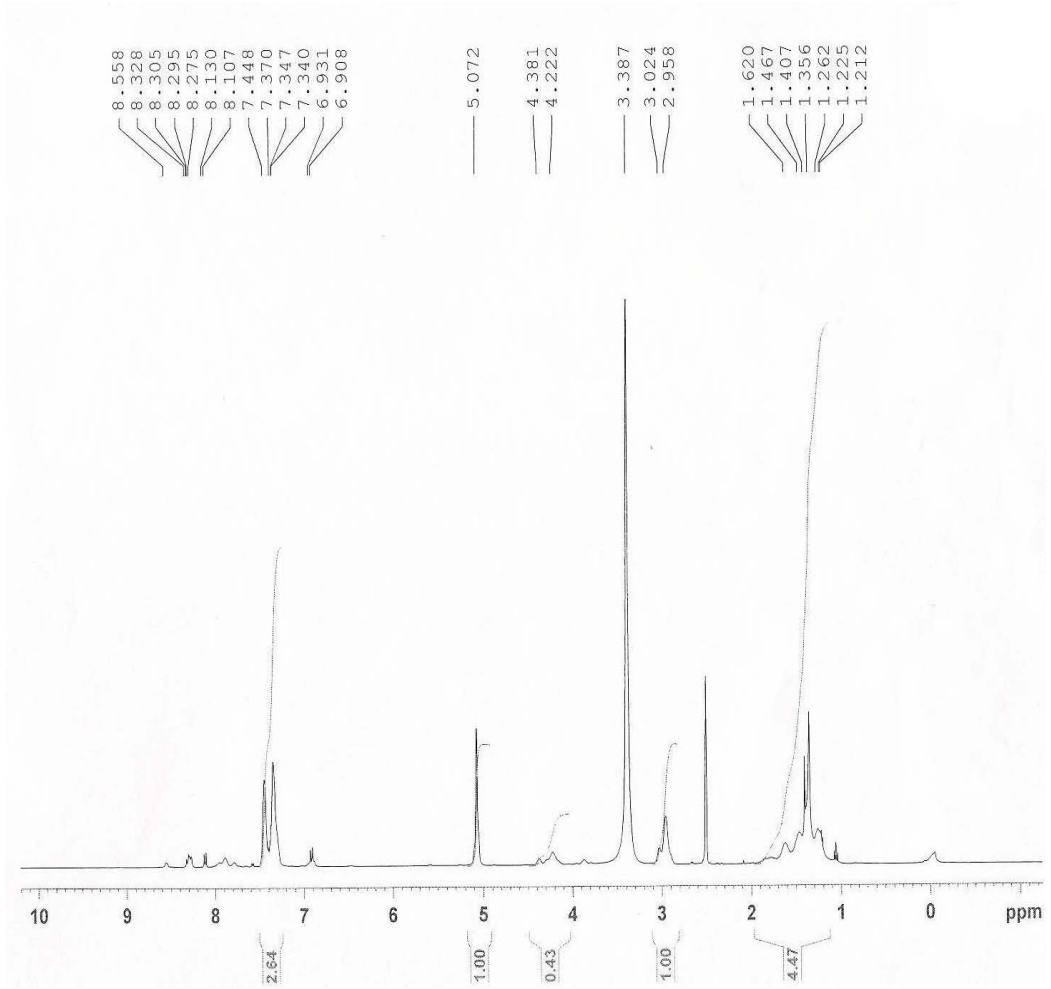
Ek Şekil 1.2. N-*p*-aminobenzoil-(S)-Glutamik asidin DMSO içinde alınan <sup>1</sup>H-NMR spektrumu



Ek Şekil 1.3. N-[(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil)propanoil]-(S)-Aspartik asidin DMSO içinde alınan <sup>1</sup>H-NMR spektrumu

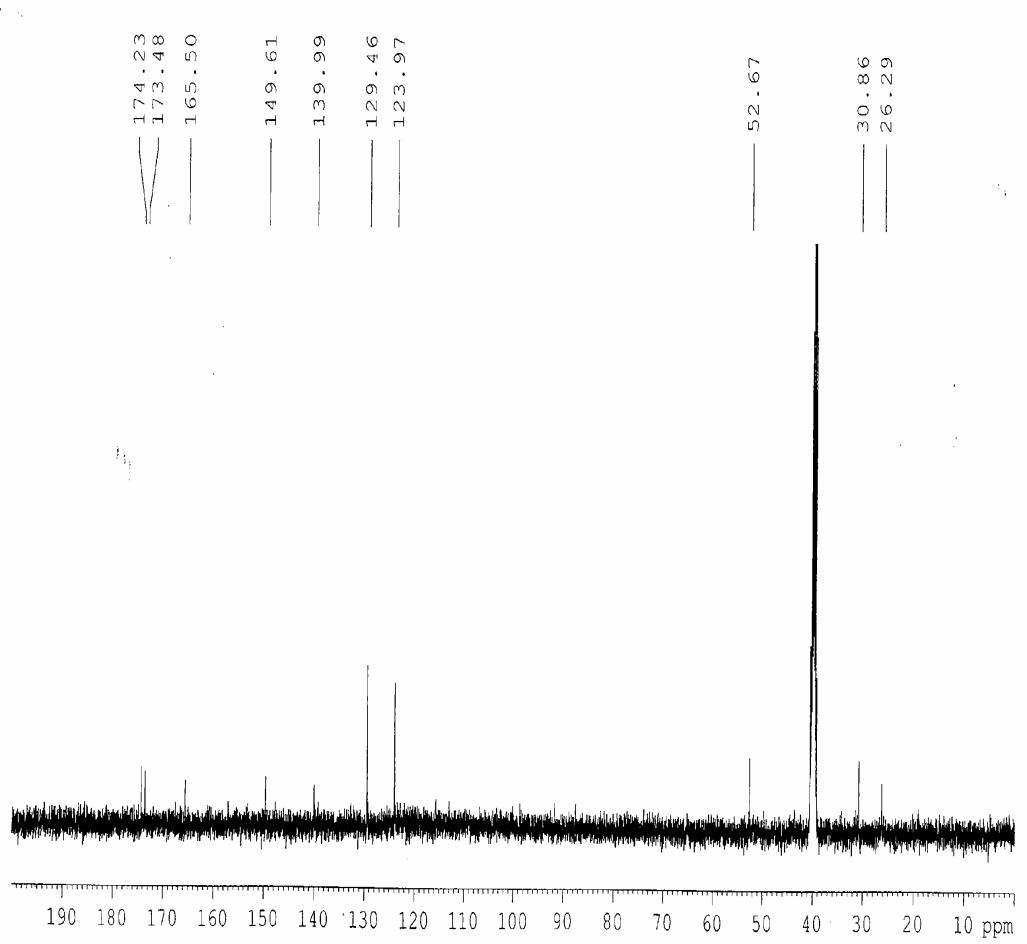


Ek Şekil 1.4. N $\alpha$ -Boc-N $\epsilon$ -2-kloro benziloksikarbonil-L-lizin-p-nitrofenil esterinin DMSO içinde alınan <sup>1</sup>H-NMR spektrumu

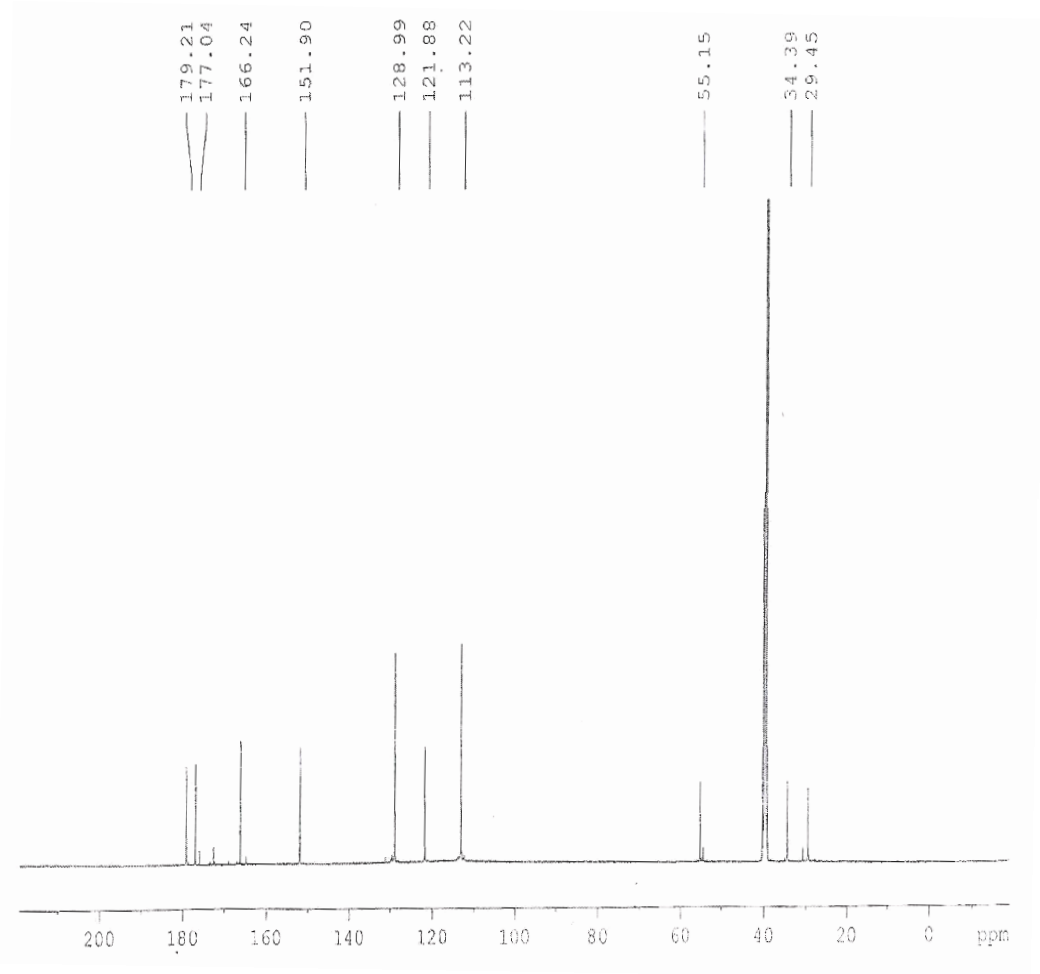


Ek Şekil 1.5. L-lizin-p-nitrofenil esterinin DMSO içinde alınan  $^1\text{H-NMR}$  spektrum

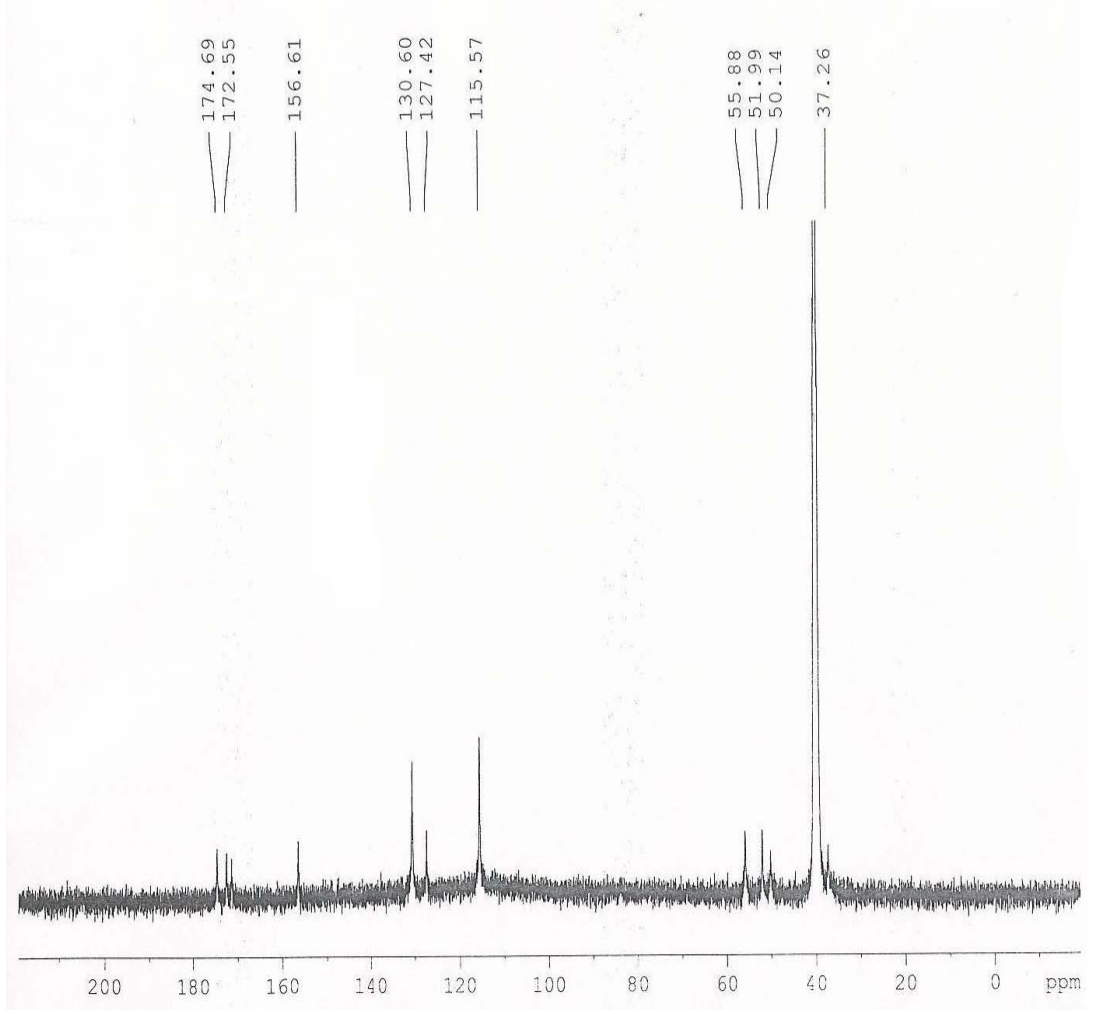
## EK 2. Sentezlenen Bileşiklerin $^{13}\text{C}$ NMR Spektrumları



Ek şekil 2.1. N-*p*-nitrobenzoil-(S)-Glutamik asidin DMSO içinde alınan  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu

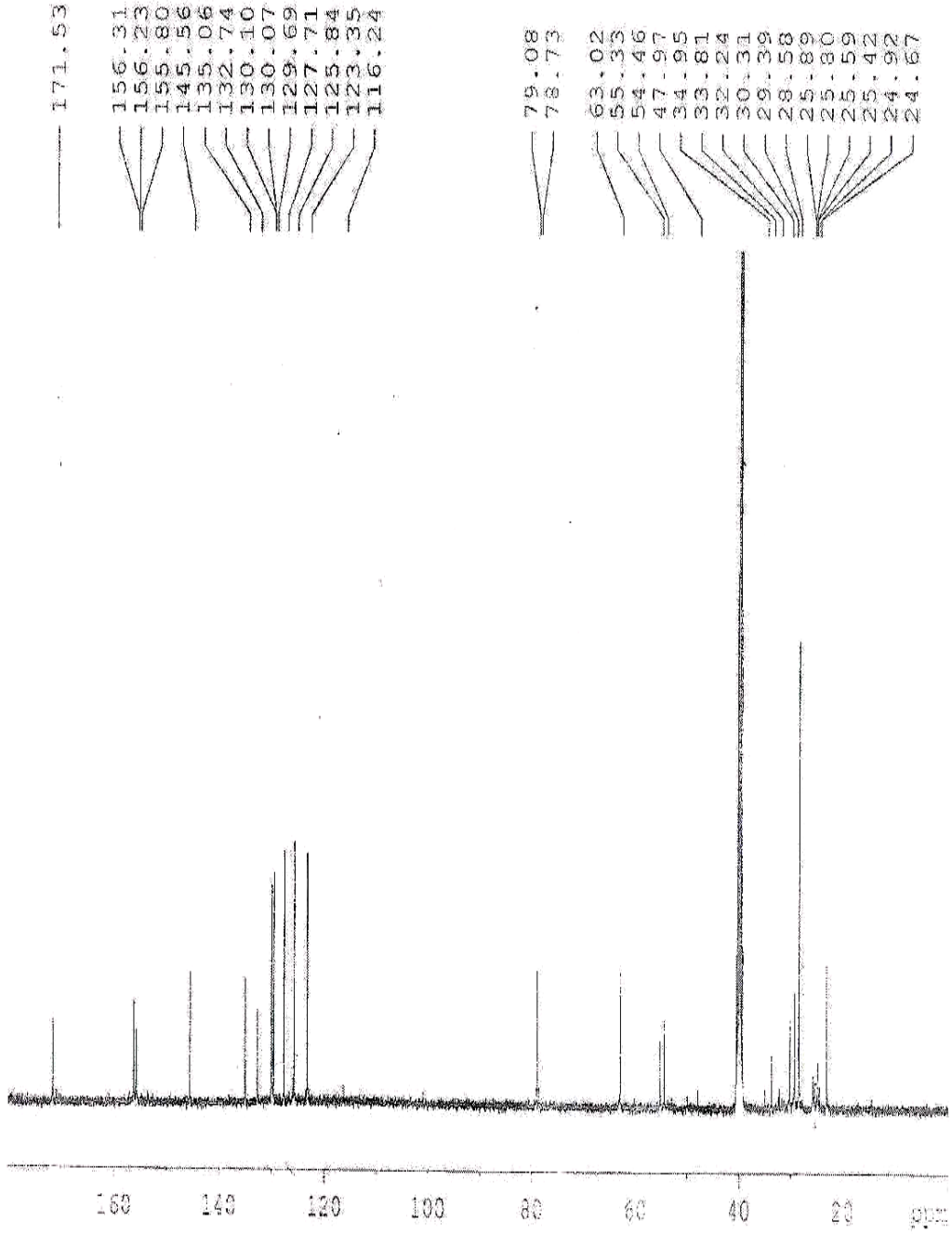


Ek şekil 2.2. N-*p*-aminobenzoil-(S)-Glutamik asidin DMSO içinde alınan  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu

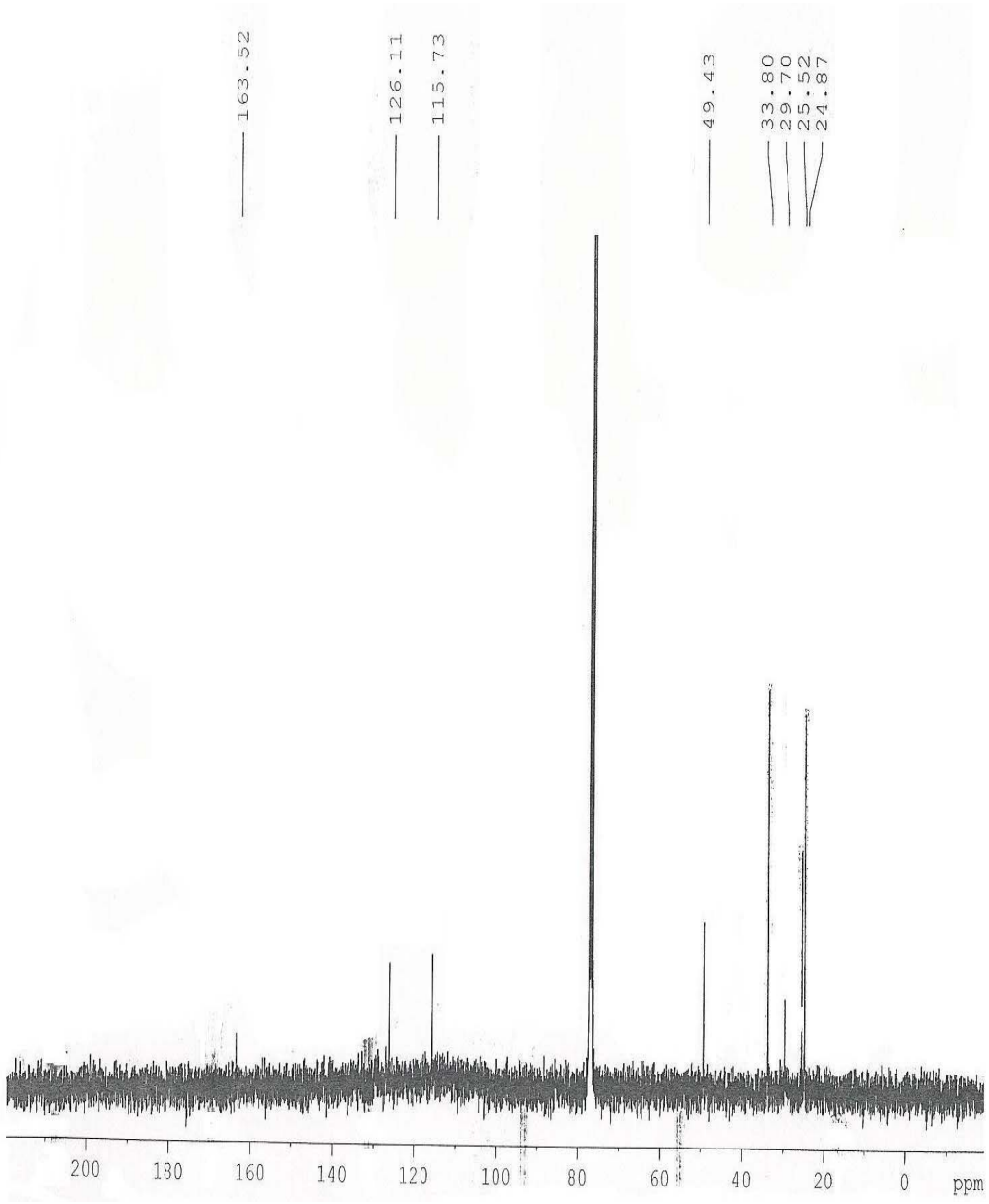


Ek Şekil 2.3. N-[(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil)propanoil]-(S)-Aspartik asidin DMSO içinde alınan  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu



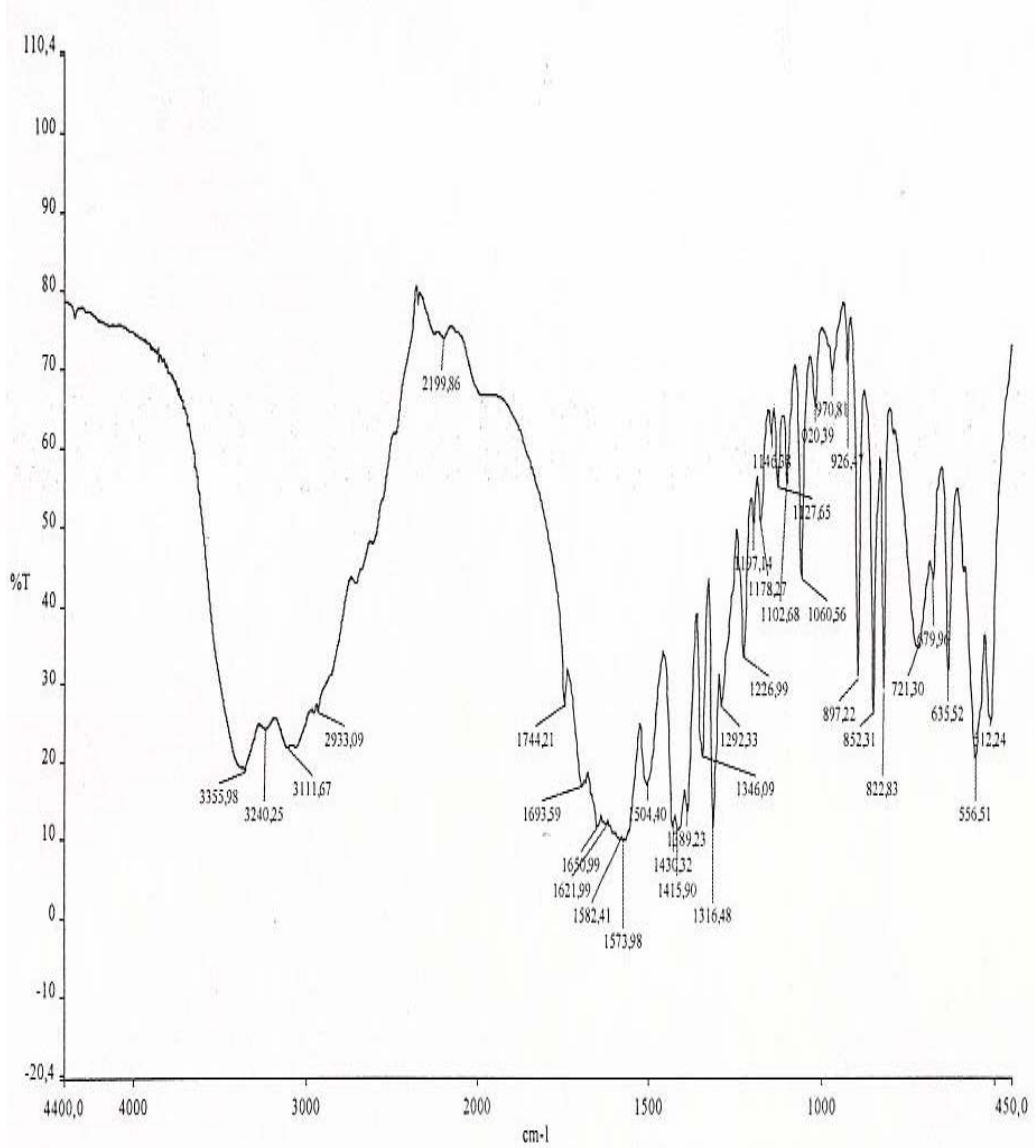


Ek Şekil 2.4 N $\alpha$ -Boc-N $\epsilon$ -2-kloro benziloksikarbonil-L-lizin-p-nitrofenil esterinin DMSO içinde  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu

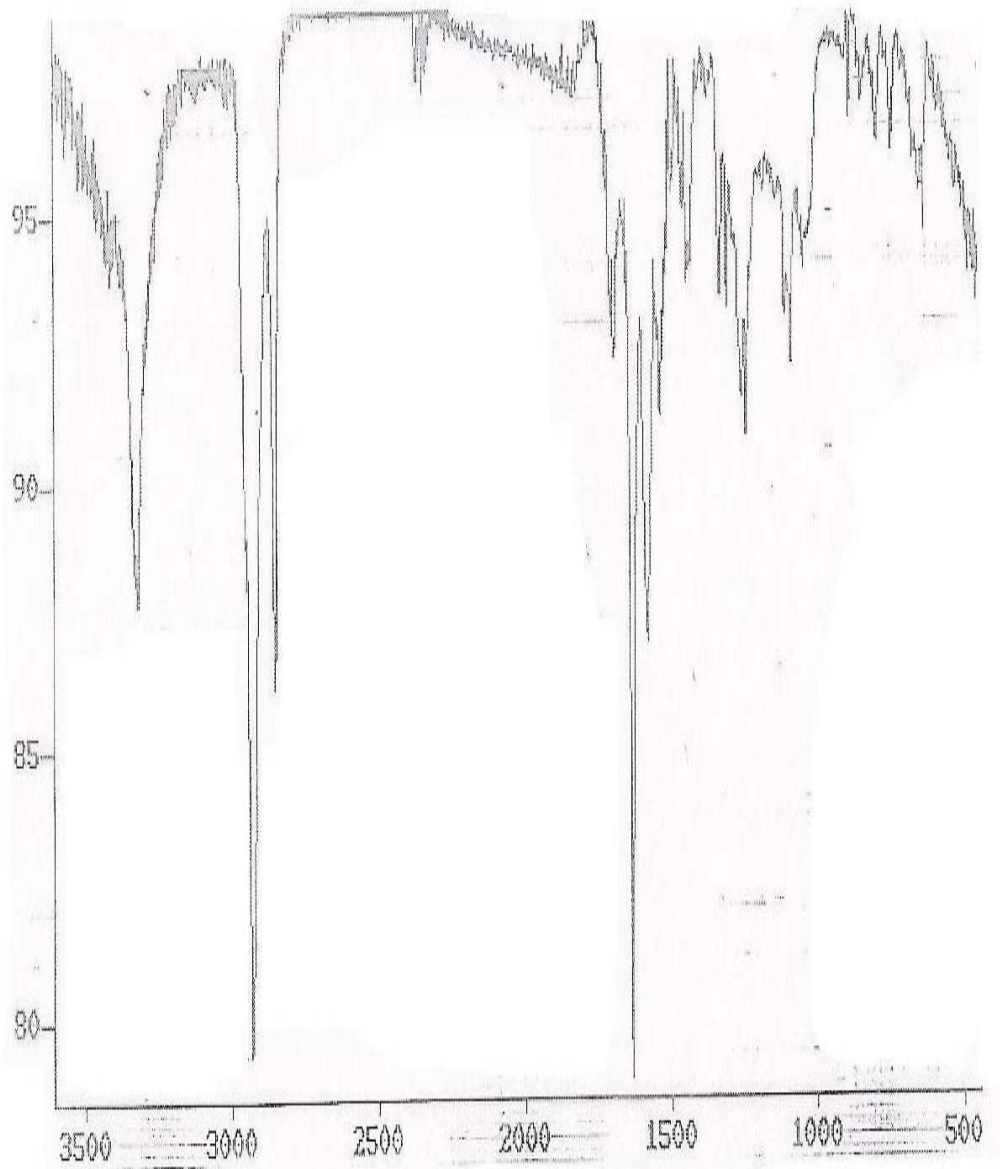


Ek Şekil 2.5. L-lizin-p-nitrofenil esterinin DMSO içinde alınan  $^{13}\text{C}$ -NMR spektrumu

### EK 3. Sentezlenen Bileşiklerin *IR* Spektrumları

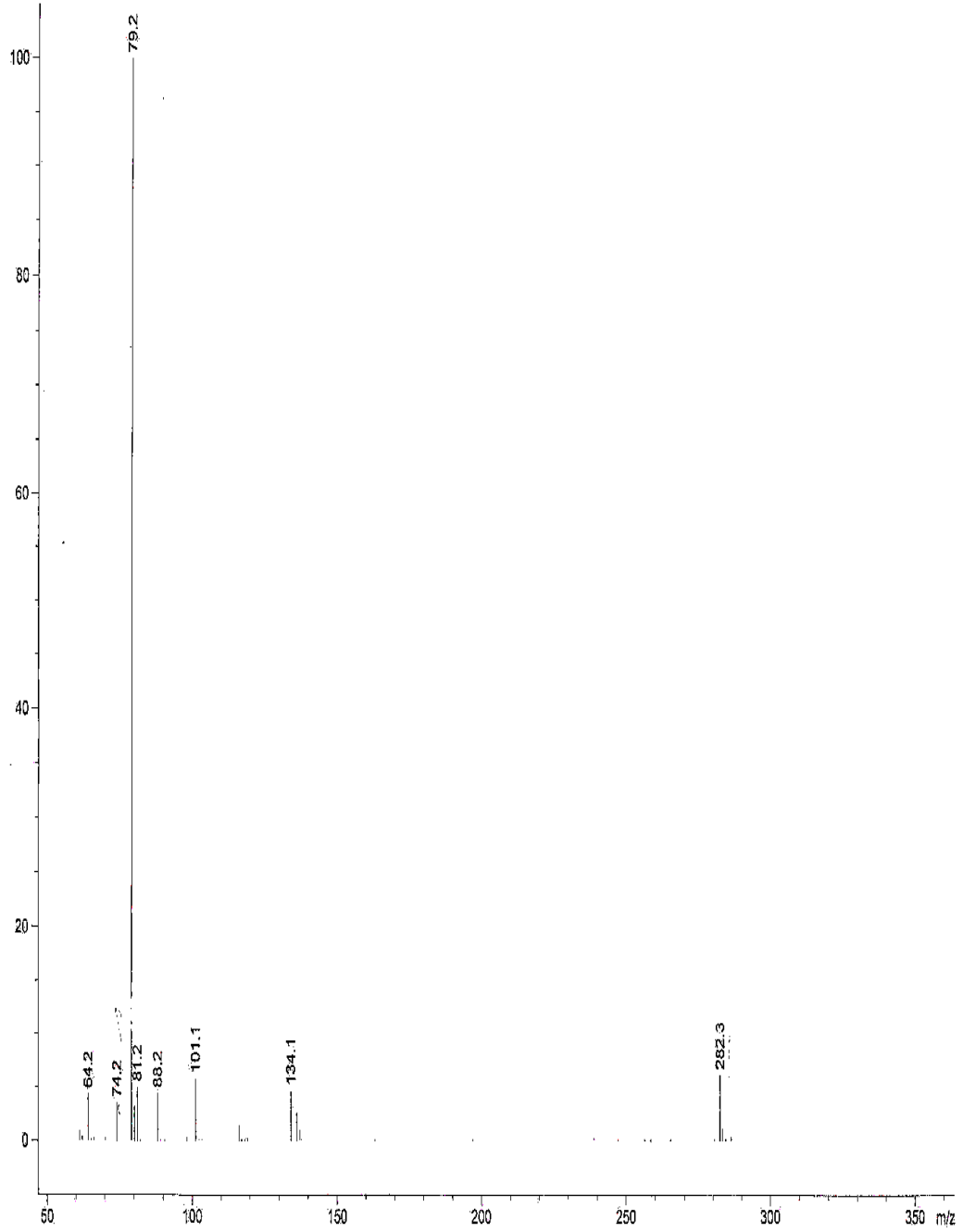


Ek Şekil 3.1. N-[(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil)propanoil]-[(S)-Aspartik asidin KBr pelet tekniği ile alınan *IR* spektrumu



Ek Şekil 3.2. L-lizin-p-nitrofenil esterinin KBr pelet tekniği ile alınan *IR* spektrumu

#### EK 4. Sentezlenen Bileşiklerin LC/MS Kütle Spektrumları



Ek Şekil 4.1. N-[(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil)propanoik asit]-L-Aspartik asidin Agilent 1100 MSD Kütle spektrometresinde alınan LC/MS kütle spektrumu

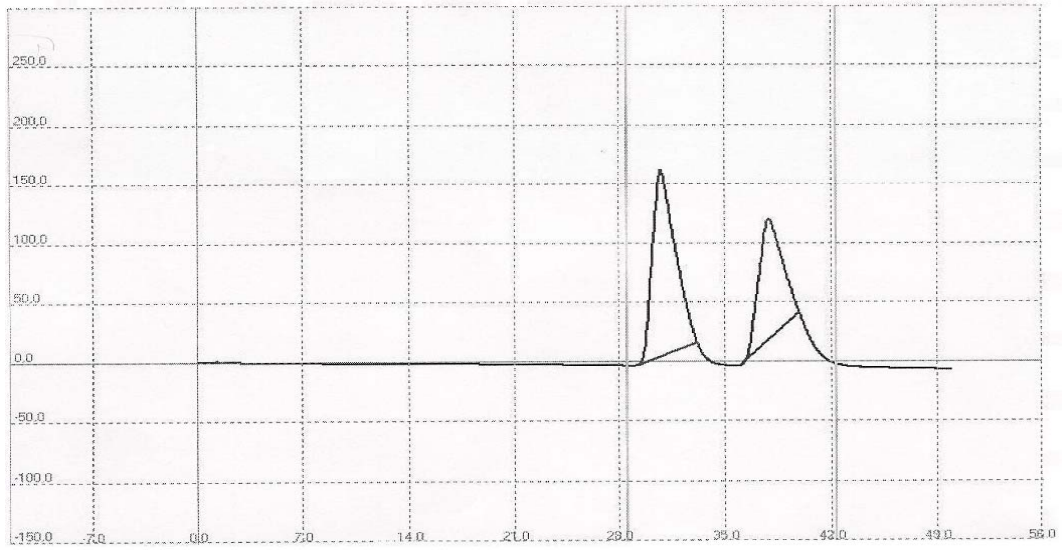
m/z	Abundance	m/z	Abundance	m/z	Abundance	m/z	Abundance	m/z	Abundance
61.25	0.9	108.20	0.0	149.00	0.1	198.20	0.0	231.85	0.1
62.15	0.4	109.30	0.0	149.25	0.1	198.85	0.0	232.20	0.0
62.80	0.1	110.20	0.0	150.20	0.0	199.30	0.0	232.80	0.0
63.20	0.1	110.60	0.0	151.00	0.0	199.75	0.4	233.20	0.0
64.20	4.4	111.10	0.1	151.20	0.1	200.00	0.0	233.90	0.0
65.10	0.1	112.10	0.0	152.05	0.0	200.25	0.0	234.75	0.0
66.15	0.3	112.90	0.0	154.95	0.0	200.60	0.0	234.95	0.0
69.40	0.0	113.40	0.0	155.60	0.0	201.00	0.0	235.30	0.1
70.15	0.3	113.70	0.0	155.90	0.1	206.10	0.1	235.80	0.1
71.10	0.0	114.15	0.1	157.00	0.1	206.65	0.0	236.15	0.0
73.00	0.0	114.40	0.0	157.30	0.1	207.20	0.0	237.60	0.1
74.20	3.5	115.30	0.0	157.85	0.0	207.55	0.1	238.20	0.0
74.90	0.1	116.15	1.5	159.05	0.0	208.20	0.0	238.80	0.3
75.20	0.1	117.00	0.2	159.90	0.0	208.80	0.1	239.45	0.0
77.90	0.0	118.10	0.2	160.10	0.0	209.60	0.0	239.80	0.1
79.20	100.0	119.10	0.3	161.80	0.0	210.00	0.0	240.65	0.1
80.20	3.3	120.30	0.0	162.70	0.0	210.40	0.0	241.05	0.0
81.15	5.0	120.75	0.0	163.05	0.2	211.40	0.1	241.20	0.2
82.25	0.1	121.40	0.0	164.40	0.0	211.90	0.0	242.25	0.1
83.10	0.0	121.80	0.0	164.80	0.0	212.60	0.1	243.10	0.0
84.10	0.0	122.70	0.0	165.20	0.1	213.10	0.0	245.00	0.1
84.40	0.0	123.30	0.0	165.80	0.0	213.50	0.0	246.70	0.1
86.40	0.0	123.90	0.0	166.80	0.0	213.70	0.0	247.15	0.1
88.20	4.4	124.25	0.0	167.20	0.0	214.10	0.0	248.20	0.0
89.05	0.1	125.80	0.0	168.60	0.0	214.20	0.0	249.60	0.0
89.30	0.0	127.10	0.0	169.20	0.0	214.70	0.1	249.90	0.1
89.70	0.0	128.00	0.0	170.00	0.0	215.20	0.0	250.15	0.0
90.45	0.2	128.40	0.0	170.60	0.0	215.50	0.0	251.60	0.1
91.15	0.0	129.00	0.0	173.20	0.0	216.00	0.0	252.10	0.0
91.90	0.0	129.60	0.1	176.10	0.0	217.15	0.1	253.40	0.0
92.40	0.0	132.70	0.0	176.90	0.0	218.20	0.1	254.30	0.1
92.95	0.0	134.10	4.6	177.10	0.0	219.25	0.0	255.20	0.0
93.30	0.0	134.85	0.1	177.95	0.0	220.10	0.0	255.90	0.0
94.30	0.0	135.05	0.1	178.90	0.0	220.80	0.0	256.25	0.2
97.20	0.0	136.10	2.6	179.15	1.8	221.20	0.0	256.45	0.1
97.75	0.1	137.15	1.1	180.10	0.2	222.30	0.0	257.00	0.0
98.10	0.4	137.75	0.2	181.90	0.0	222.85	0.1	257.25	0.1
99.30	0.0	138.30	0.1	182.20	0.1	223.95	0.0	257.75	0.0
101.10	5.8	138.70	0.0	184.20	0.0	224.30	0.0	258.00	0.1
101.80	0.0	139.40	0.0	186.30	0.0	224.70	0.0	258.25	0.2
102.15	0.2	141.95	0.0	186.80	0.0	225.25	0.0	258.40	0.1
102.95	0.1	142.20	0.0	187.20	0.0	225.95	0.0	259.00	0.0
103.25	0.2	142.70	0.0	188.70	0.0	228.20	0.0	259.30	0.0
105.00	0.0	143.05	0.0	190.90	0.0	229.20	0.0	260.15	0.0
105.40	0.0	145.20	0.1	192.90	0.0	229.90	0.0	261.30	0.0
105.85	0.1	146.10	0.0	195.25	0.0	230.15	0.1	263.00	0.1
106.25	0.1	147.00	0.1	196.20	1.6	230.65	0.1	263.25	0.1
107.20	0.1	147.25	0.0	197.10	0.2	231.05	0.1	265.20	0.2

Ek Şekil 4.1. N-[(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil)propanoil]-(S)-Aspartik asidin Agilent 1100 MSD Kütle spektrometresinde alınan LC/MS kütle spektrumuna ait sayısal veriler

## EK 5. HPLC Crownpak CD-11 Kiral Kolonu ve UV Dedektör ile Belirnen

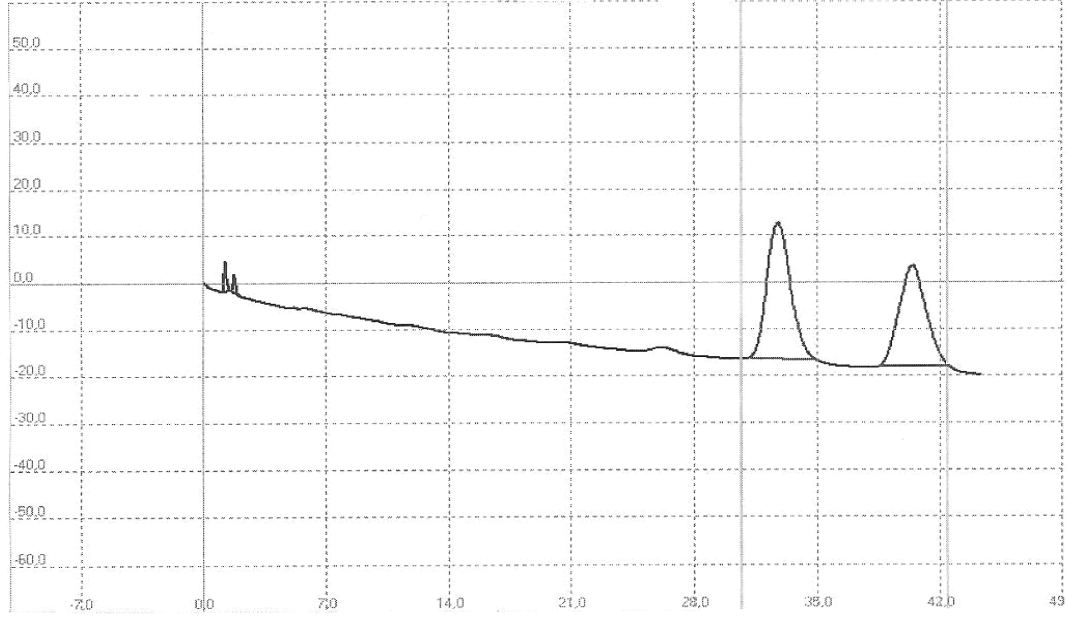
### % e.e. Değerleri

Aşağıdaki kromatogramlara ait sayısal veriler bazı kromatogramlarda o kromatogramın altında verilmiş; bazılarında ise kromatogramın verildiği sayfadan sonra gelen sayfada ona ait sayısal veriler verilmiştir.



Ek Şekil 5.1. 100 µL β-metilfeniletıl amin için pH 5 tamponu, 5. tüpe ait kromatogram (%e.e=21.05)

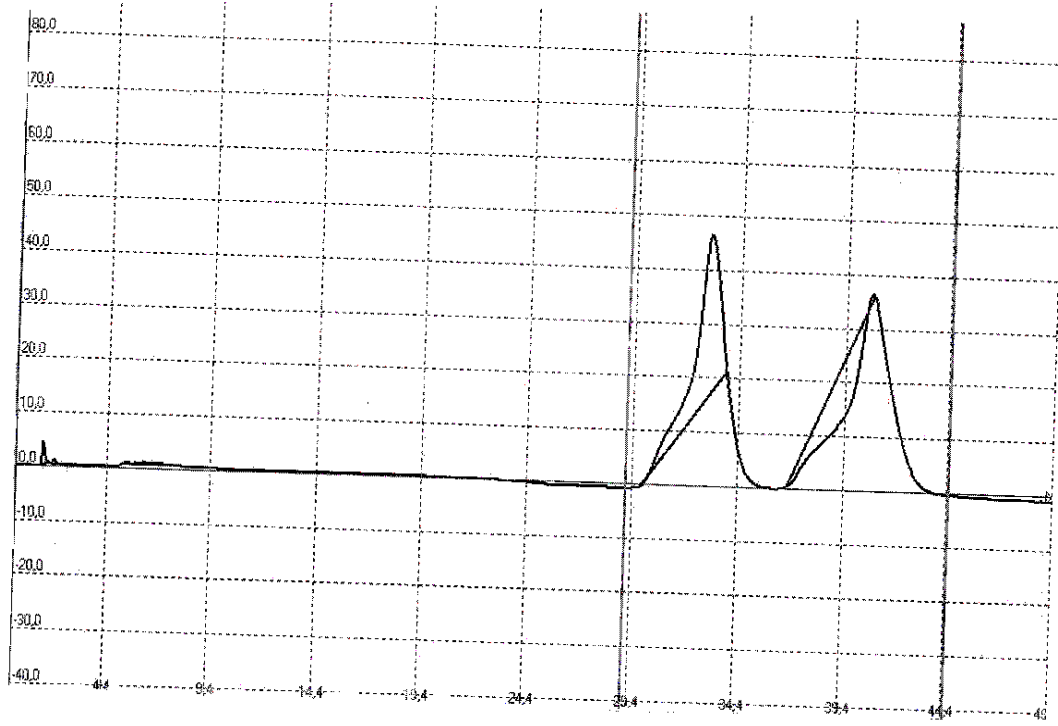
No	Name	Type	Start(min)	End(min)	Retention	Height(mV)	Area (mVs)	% Area	Col.	Area (mVs)	Plate #	Conc(ppm)
1	PP 1 (+)		1,18 min	1,75 min	1,30 min	1,184	16,308 mVs	0,06		0,000 mVs	221078,895	0,0000
2	PP 2 (+)		1,75 min	1,95 min	1,79 min	0,663	4,718 mVs	0,02		0,000 mVs	732542,706	0,0000
3	PP 3 (+)		29,19 min	33,18 min	30,79 min	158,046	16474,625 mVs	60,48		0,000 mVs	1919,630	0,0000
4	PP 4 (+)		35,93 min	39,91 min	37,92 min	101,411	10743,562 mVs	39,44		0,000 mVs	1906,253	0,0000



Ek Şekil 5.2. 100 µL β-metilfeniletil amin için, pH 5 tamponu, 6. tüpe ait kromatogram (%e.e=7.40)

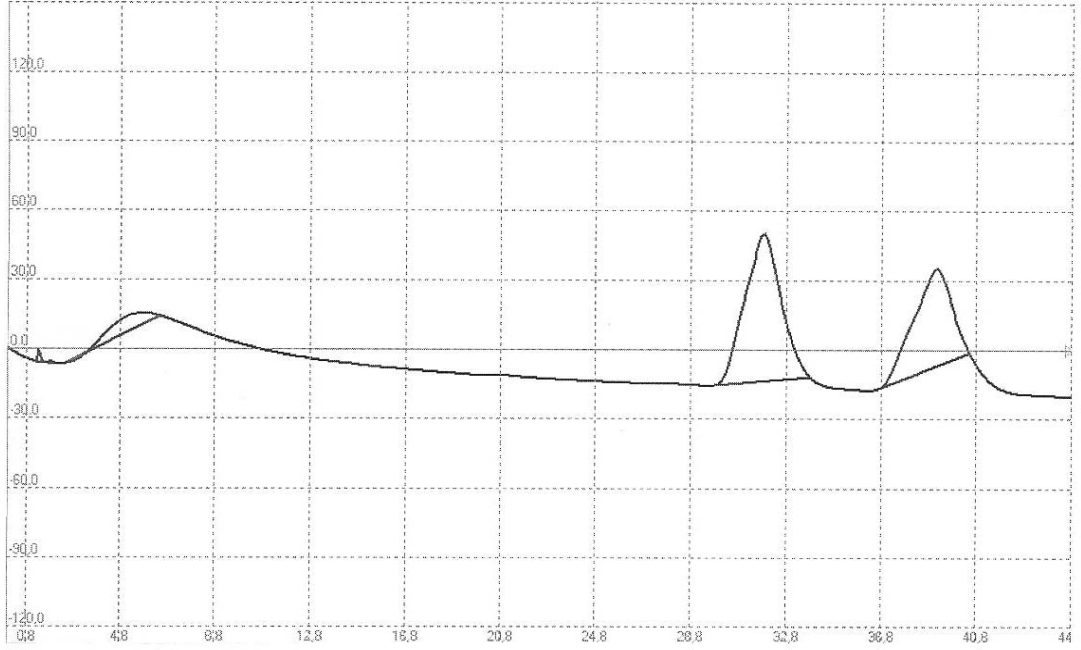
No	Name	Type	Start(min)	End(min)	Retention	Height(mV)	Area(mVs)	% Area	Col.	Area(mVs)	Plate #	Conc(ppm)
1	PP 1 (+)		1,19 min	1,53 min	1,30 min	6,467	58,167 mVs	1,15		0,000 mVs	579517,466	0,0000
2	PP 2 (+)		1,68 min	2,10 min	1,82 min	3,818	34,710 mVs	0,68		0,000 mVs	0,000	0,0000
3	PP 3 (+)		31,25 min	34,90 min	32,83 min	28,950	2677,606 mVs	52,72		0,000 mVs	0,000	0,0000
4	PP 4 (+)		38,56 min	42,54 min	40,44 min	21,588	2308,017 mVs	45,45		0,000 mVs	0,000	0,0000





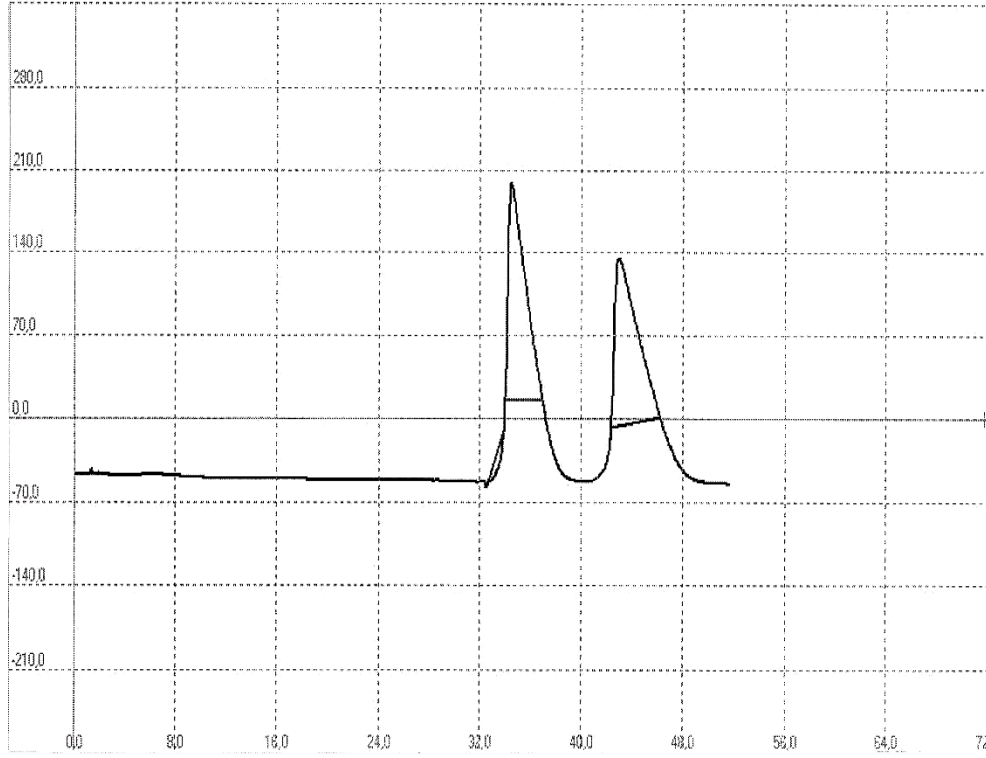
Ek Şekil 5.3. 100 µL β-metilfeniletıl amin için pH 6 tamponu, 4. tüpe ait kromatogram (%e.e=24.04)

No	Name	Type	Start(min)	End(min)	Retention	Height(mV)	Area(mVs)	% Area Col.	Area(mVs)	Plate #	Conc(ppm)
1	PP 1 (+)		1,20 min	1,52 min	1,31 min	4,255	34,625 mVs	0,98	0,000 mVs	304063,895	0,0000
2	PP 2 (+)		1,71 min	2,07 min	1,83 min	0,771	7,781 mVs	0,22	0,000 mVs	174317,772	0,0000
3	PP 3 (+)		5,09 min	7,64 min	6,26 min	0,488	43,250 mVs	1,22	0,000 mVs	3182,279	0,0000
4	PP 4 (+)		29,82 min	33,80 min	32,97 min	30,038	2139,646 mVs	60,52	0,000 mVs	5661,935	0,0000
5	PP 5 (+)		36,72 min	40,70 min	40,62 min	11,231	-1310,218 mVs	37,06	0,000 mVs	83003,325	0,0000



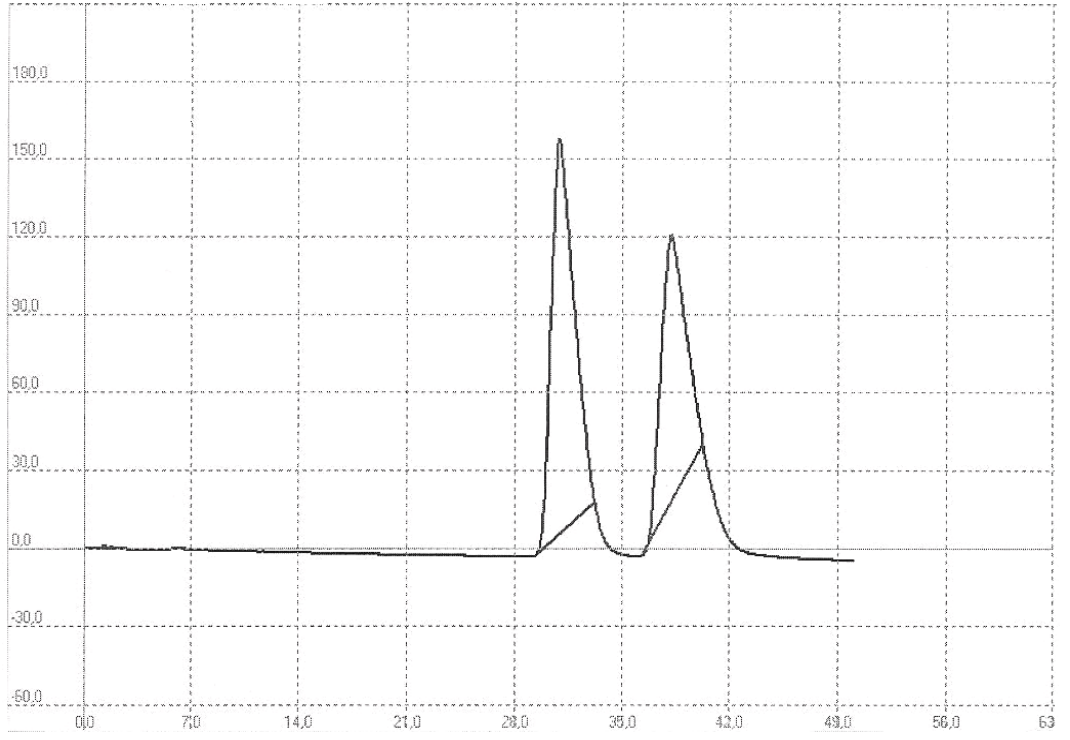
Ek Şekil 5.4. 100 µL β-metilfeniletıl amin için pH 6 tamponu, 5. tüpe ait kromatogram (%e.e=18.42)

No	Name	Type	Start(min)	End(min)	Retention	Height (mV)	Area (mVs)	% Area	Col. Area (mVs)	Plate #	Conc (ppm)
1	PP 1 (+)		1,19 min	1,61 min	1,30 min	5,390	46,555 mVs	0,38	0,000 mVs	0,000	0,0000
2	PP 2 (+)		1,70 min	1,99 min	1,81 min	1,208	9,138 mVs	0,08	0,000 mVs	0,000	0,0000
3	PP 3 (+)		2,47 min	6,45 min	5,76 min	6,936	740,833 mVs	6,08	0,000 mVs	2086,074	0,0000
4	PP 4 (+)		29,80 min	33,79 min	31,84 min	63,522	6741,670 mVs	55,34	0,000 mVs	4677,484	0,0000
5	PP 5 (+)		36,54 min	40,53 min	39,11 min	41,642	4643,174 mVs	38,12	0,000 mVs	3258,317	0,0000



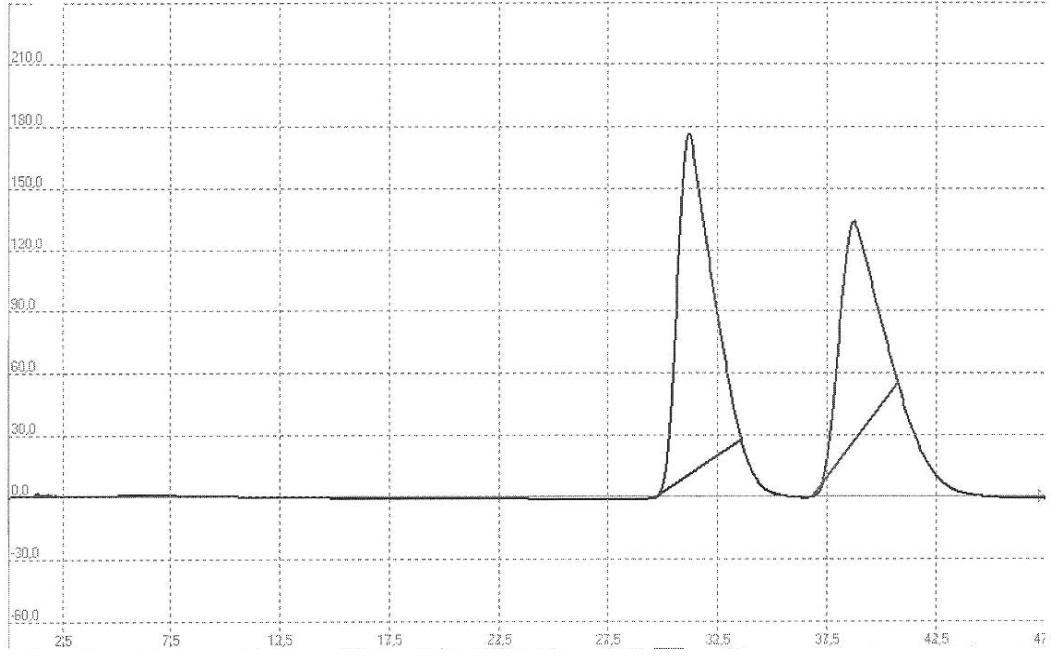
Ek Şekil 5.5. 100 µL β-metilfeniletıl amin için pH 6 tamponu, 6. tüpe ait kromatogram (%e.e=34.49)

No	Name	Type	Start(min)	End(min)	Retention	Height(mV)	Area(mVs)	% Area	Col.	Area(mVs)	Plate #	Conc(ppm)
1	PP 1	(+)	5,40 min	5,61 min	5,43 min	1,472	0,907 mVs	0,00		0,000 mVs	0,000	0,0000
2	PP 2	(+)	5,61 min	5,82 min	5,63 min	1,396	-1,983 mVs	0,01		0,000 mVs	0,000	0,0000
3	PP 3	(+)	5,82 min	6,02 min	6,02 min	1,636	-4,247 mVs	0,02		0,000 mVs	234878,111	0,0000
4	PP 4	(+)	6,02 min	6,23 min	6,02 min	1,849	-7,918 mVs	0,04		0,000 mVs	0,000	0,0000
5	PP 5	(+)	6,23 min	6,49 min	6,41 min	2,181	-16,805 mVs	0,07		0,000 mVs	0,000	0,0000
6	PP 6	(+)	6,49 min	6,69 min	6,51 min	2,350	-13,625 mVs	0,06		0,000 mVs	0,000	0,0000
7	PP 7	(+)	6,69 min	6,90 min	6,90 min	2,613	-15,991 mVs	0,07		0,000 mVs	284716,611	0,0000
8	PP 8	(+)	6,90 min	7,45 min	7,17 min	3,716	99,291 mVs	0,44		0,000 mVs	0,000	0,0000
9	PP 9	(+)	7,45 min	9,79 min	7,46 min	3,287	224,272 mVs	1,00		0,000 mVs	0,000	0,0000
10	PP 10	(+)	10,03 min	10,55 min	10,15 min	3,893	34,792 mVs	0,15		0,000 mVs	0,000	0,0000
11	PP 11	(+)	10,58 min	10,91 min	10,64 min	0,751	7,364 mVs	0,03		0,000 mVs	0,000	0,0000
12	PP 12	(+)	14,08 min	16,22 min	14,30 min	1,020	67,066 mVs	0,30		0,000 mVs	0,000	0,0000
13	PP 13	(+)	37,21 min	38,14 min	37,33 min	0,257	7,380 mVs	0,03		0,000 mVs	0,000	0,0000
14	PP 14	(+)	40,67 min	41,39 min	41,28 min	18,405	-262,676 mVs	1,17		0,000 mVs	0,000	0,0000
15	PP 15	(+)	41,39 min	45,37 min	43,33 min	198,211	14626,500 mVs	64,97		0,000 mVs	1665,706	0,0000
16	PP 16	(+)	49,55 min	51,62 min	51,62 min	99,728	-7122,147 mVs	31,64		0,000 mVs	0,000	0,0000



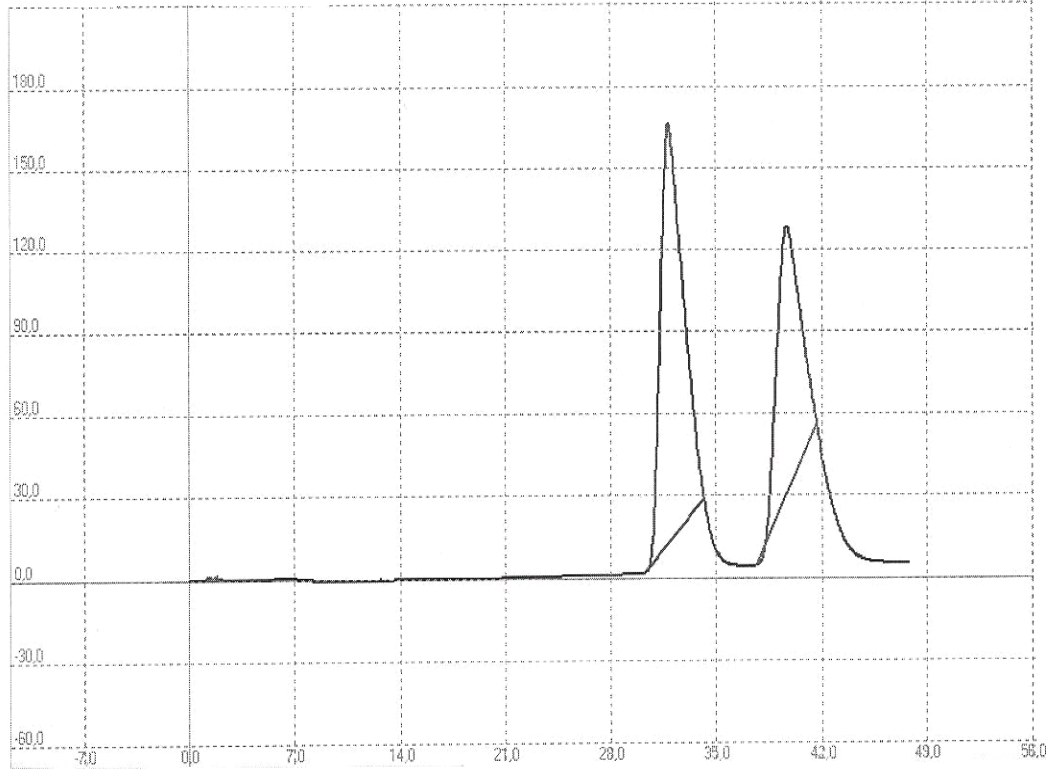
Ek Şekil 5.6. 100 µL β-metilfeniletıl amin için pH 7 tamponu, 3. tüpe ait kromatogram (%e.e=16.89)

No	Name	Type	Start(min)	End(min)	Retention	Height(mV)	Area(mVs)	% Area	Col.	Area(mVs)	Plate #	Conc(ppm)
1	PP 1 (+)		1,18 min	1,62 min	1,30 min	1,329	13,599 mVs	0,05		0,000 mVs	96989,169	0,0000
2	PP 2 (+)		1,71 min	1,95 min	1,78 min	0,623	4,365 mVs	0,02		0,000 mVs	123299,456	0,0000
3	PP 3 (+)		5,03 min	5,28 min	5,14 min	0,185	1,388 mVs	0,01		0,000 mVs	0,000	0,0000
4	PP 4 (+)		29,28 min	33,26 min	30,90 min	152,642	15664,515 mVs	58,40		0,000 mVs	986,264	0,0000
5	PP 5 (+)		36,30 min	40,29 min	38,21 min	102,720	11137,238 mVs	41,52		0,000 mVs	721,763	0,0000



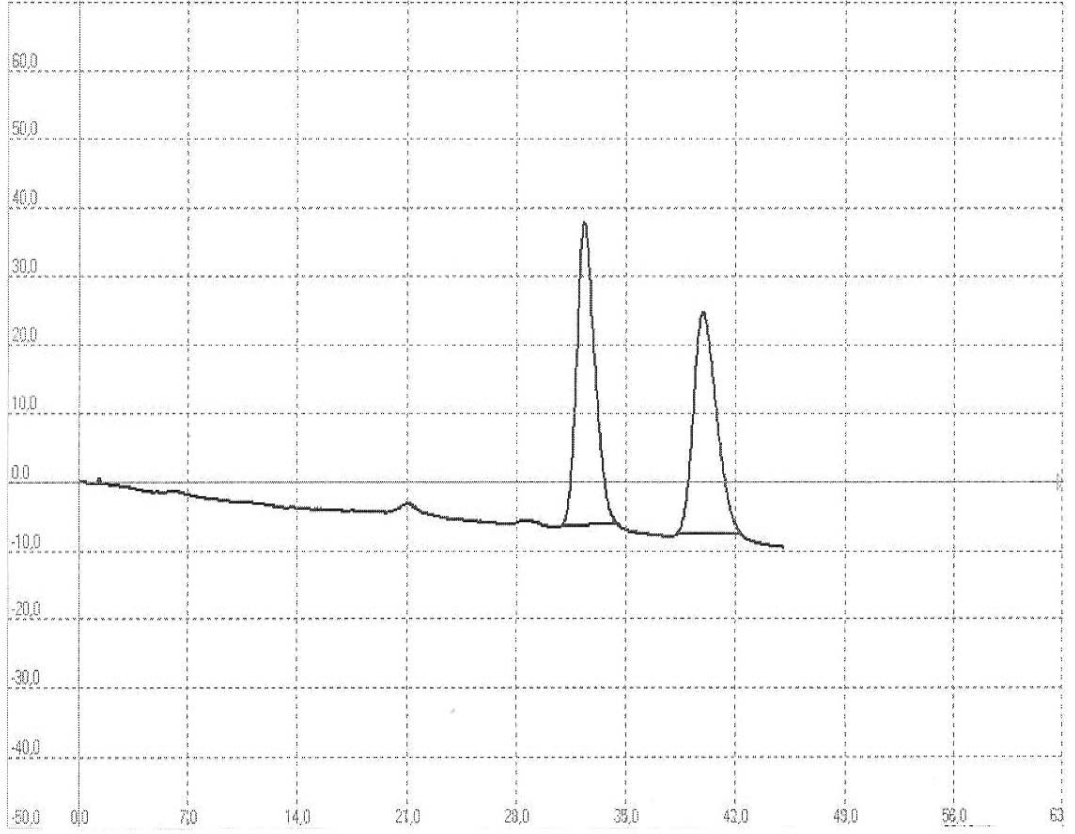
Ek Şekil 5.7. 100 µL β-metilfeniletıl amin için pH 7 tamponu, 4. tüpe ait kromatogram (%e.e=20.74)

No	Name	Type	Start(min)	End(min)	Retention	Height(mV)	Area(mVs)	% Area	Col.	Area(mVs)	Plate #	Conc(ppm)
1	PP 1	(+)	1,20 min	1,73 min	1,30 min	1,565	23,826 mVs	0,08		0,000 mVs	74289,406	0,0000
2	PP 2	(+)	1,73 min	2,25 min	1,80 min	1,158	12,642 mVs	0,04		0,000 mVs	170337,605	0,0000
3	PP 3	(+)	29,61 min	33,59 min	31,20 min	166,140	17295,640 mVs	60,30		0,000 mVs	968,341	0,0000
4	PP 4	(+)	36,77 min	40,75 min	38,71 min	107,430	11351,627 mVs	39,58		0,000 mVs	765,097	0,0000



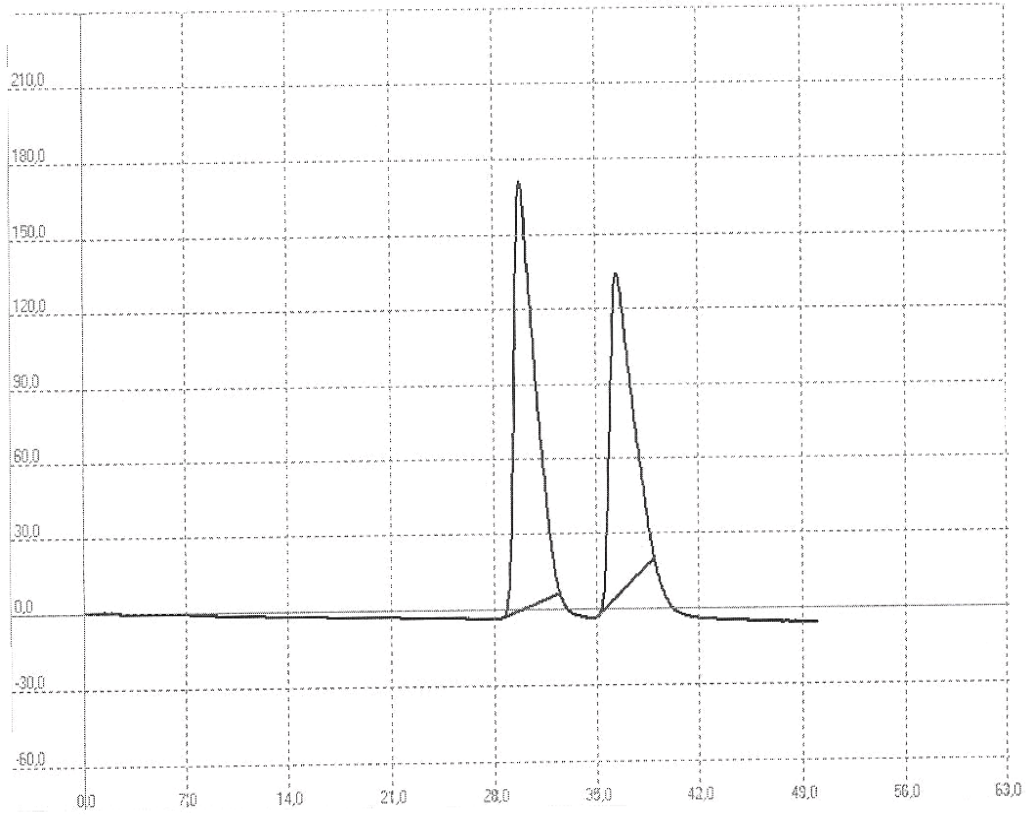
Ek Şekil 5.8. 100 µL β-metilfeniletil amin için pH 7 tamponu, 5. tüpe ait kromatogram (%e.e=20.90)

No	Name	Type	Start (min)	End (min)	Retention	Height (mV)	Area (mVs)	% Area	Col.	Area (mVs)	Plate #	Conc (ppm)
1	PP 1 (+)		1,21 min	1,55 min	1,29 min	1,327	15,103 mVs	0,06		0,000 mVs	82244,062	0,0000
2	PP 2 (+)		1,55 min	1,75 min	1,75 min	0,613	4,561 mVs	0,02		0,000 mVs	0,000	0,0000
3	PP 3 (+)		1,75 min	2,01 min	1,82 min	1,513	12,223 mVs	0,05		0,000 mVs	144459,879	0,0000
4	PP 4 (+)		5,03 min	5,33 min	5,14 min	0,167	1,169 mVs	0,00		0,000 mVs	93764477,840	0,0000
5	PP 5 (+)		12,74 min	12,98 min	12,76 min	4,313	4,871 mVs	0,02		0,000 mVs	28083657,465	0,0000
6	PP 6 (+)		30,23 min	34,21 min	31,88 min	153,258	15772,698 mVs	60,37		0,000 mVs	788,480	0,0000
7	PP 7 (+)		37,68 min	41,66 min	39,68 min	98,573	10317,530 mVs	39,49		0,000 mVs	846,161	0,0000



Ek Şekil 5.9. 100 µL β-metilfeniletıl amin için pH 8 tamponu, 3. tüpe ait kromatogram (%e.e=4.48)

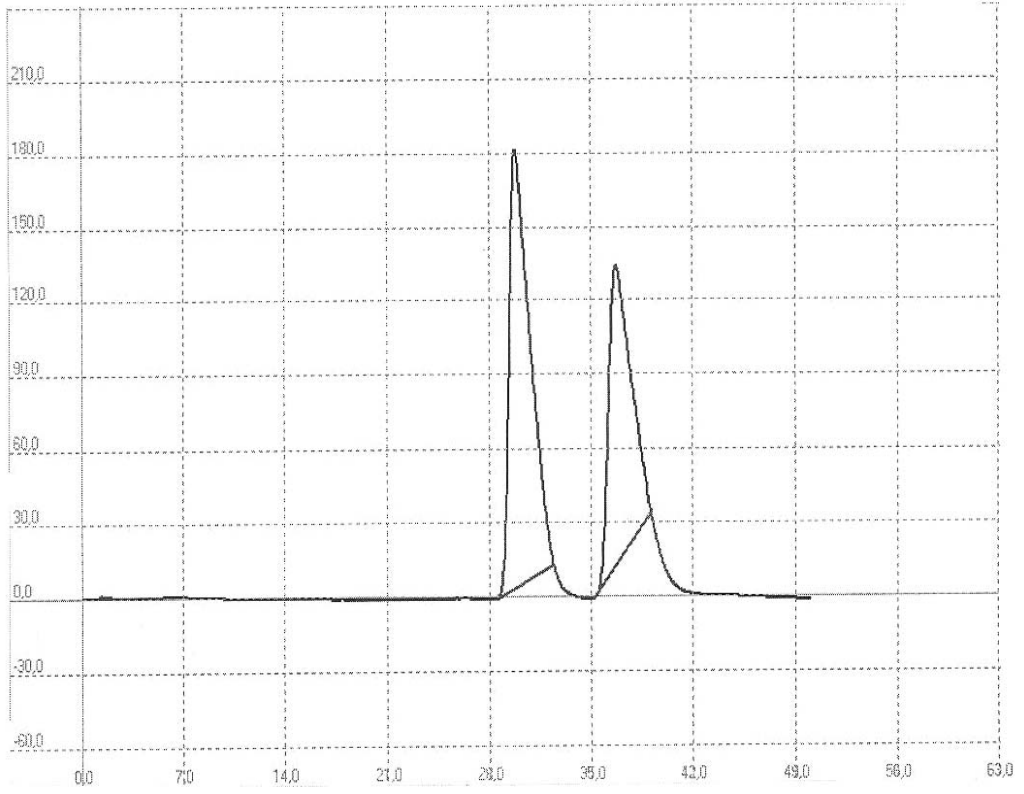
No	Name	Type	Start(min)	End(min)	Retention	Height(mV)	Area(mVs)	% Area	Col. Area(mVs)	Plate #	Conc(ppm)
1	PP 1 (+)		1,20 min	1,48 min	1,30 min	0,993	8,284 mVs	0,12	0,000 mVs	528052,142	0,0000
2	PP 2 (+)		30,94 min	34,40 min	32,38 min	44,239	3567,710 mVs	52,18	0,000 mVs	2483,597	0,0000
3	PP 3 (+)		38,28 min	42,27 min	39,94 min	32,248	3261,589 mVs	47,70	0,000 mVs	2457,121	0,0000



Ek Şekil 5.10. 100 µL β-metilfeniletıl amin için pH 8 tamponu, 4. tüpe ait kromatogram (%e.e=11.00)

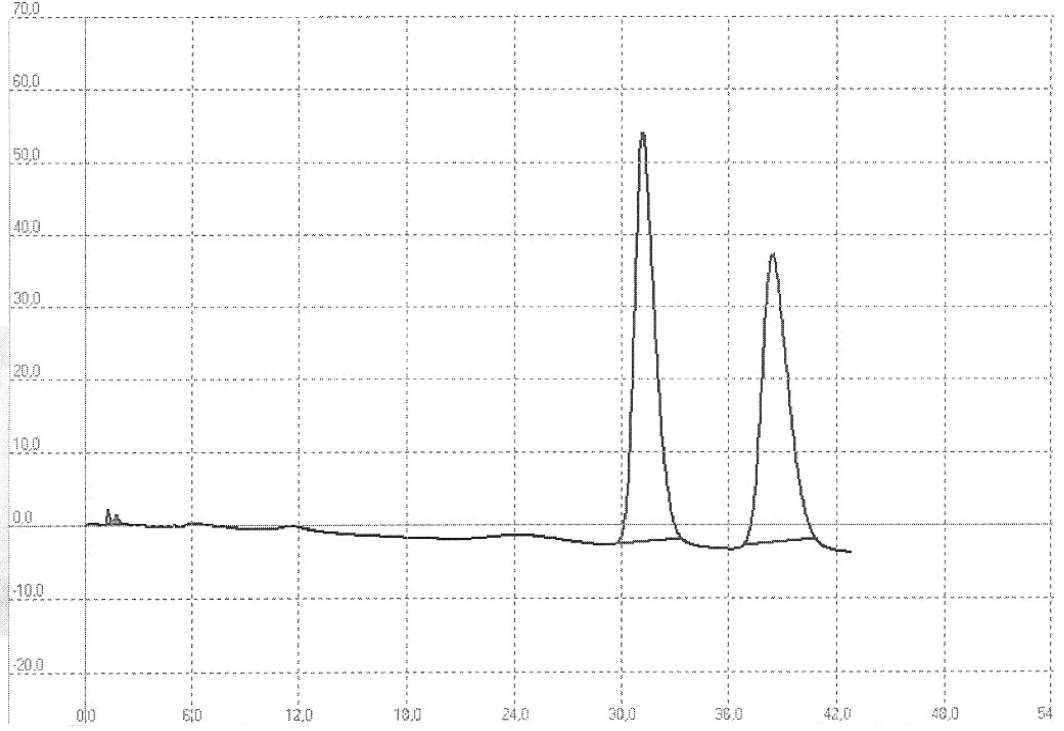
No	Name	Type	Start(min)	End(min)	Retention	Height(mV)	Area(mVs)	% Area	Col.	Area(mVs)	Plate #	Conc(ppm)
1	PP 1	(+)	0,10 min	0,28 min	0,12 min	0,089	0,126 mVs	0,00		0,000 mVs	2909285,449	0,0000
2	PP 2	(+)	1,20 min	1,53 min	1,28 min	0,887	9,394 mVs	0,03		0,000 mVs	102645,197	0,0000
3	PP 3	(+)	1,53 min	1,74 min	1,74 min	0,571	3,290 mVs	0,01		0,000 mVs	0,000	0,0000
4	PP 4	(+)	1,74 min	1,93 min	1,76 min	0,808	5,072 mVs	0,02		0,000 mVs	169493,933	0,0000
5	PP 5	(+)	28,50 min	32,48 min	29,80 min	171,597	16888,829 mVs	55,47		0,000 mVs	1002,622	0,0000
6	PP 6	(+)	34,95 min	38,93 min	36,42 min	128,749	13540,685 mVs	44,47		0,000 mVs	892,678	0,0000





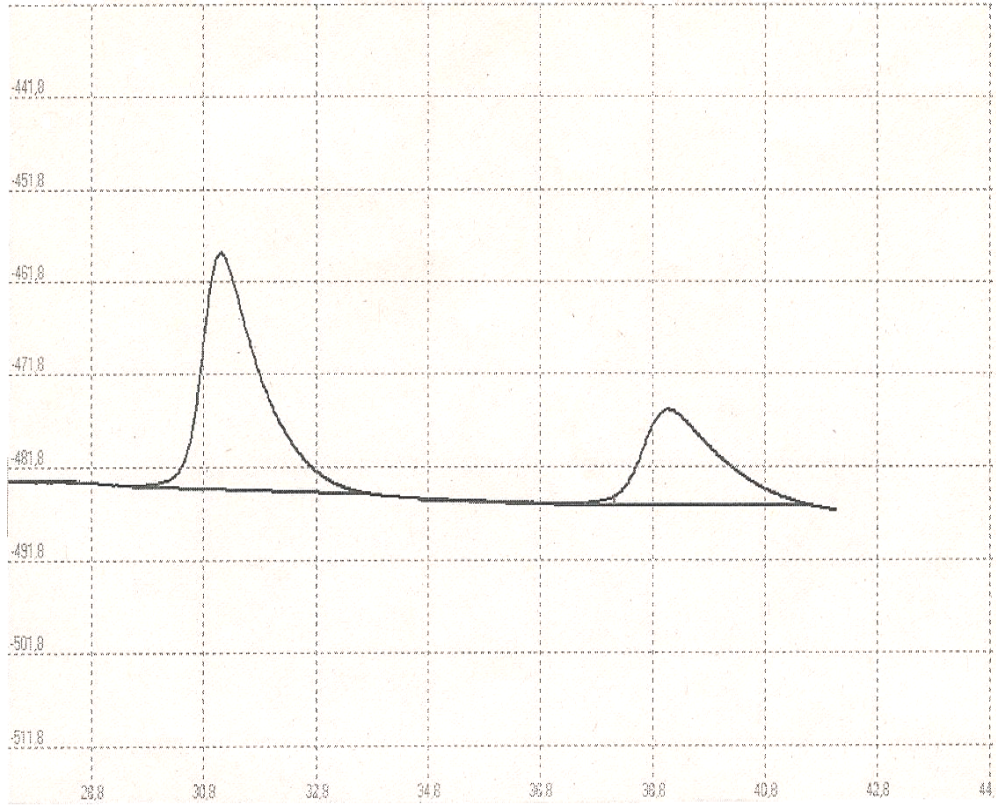
Ek Şekil 5.11. 100 µLβ-metilfeniletıl amin için pH 8 tamponu, 5. tüpeaitkromatogram (%e.e=16.32)

No	Name	Type	Start(min)	End(min)	Retention	Height(mV)	Area(mVs)	% Area	Col. Area(mVs)	Plate #	Conc(ppm)
1	PP 1	(+)	1,19 min	1,70 min	1,29 min	1,068	14,102 mVs	0,05	0,000 mVs	96947,287	0,0000
2	PP 2	(+)	1,70 min	1,94 min	1,76 min	0,664	5,385 mVs	0,02	0,000 mVs	185160,581	0,0000
3	PP 3	(+)	28,50 min	32,49 min	29,81 min	178,296	17765,514 mVs	58,13	0,000 mVs	957,224	0,0000
4	PP 4	(+)	35,18 min	39,16 min	36,78 min	121,435	12777,632 mVs	41,81	0,000 mVs	891,362	0,0000

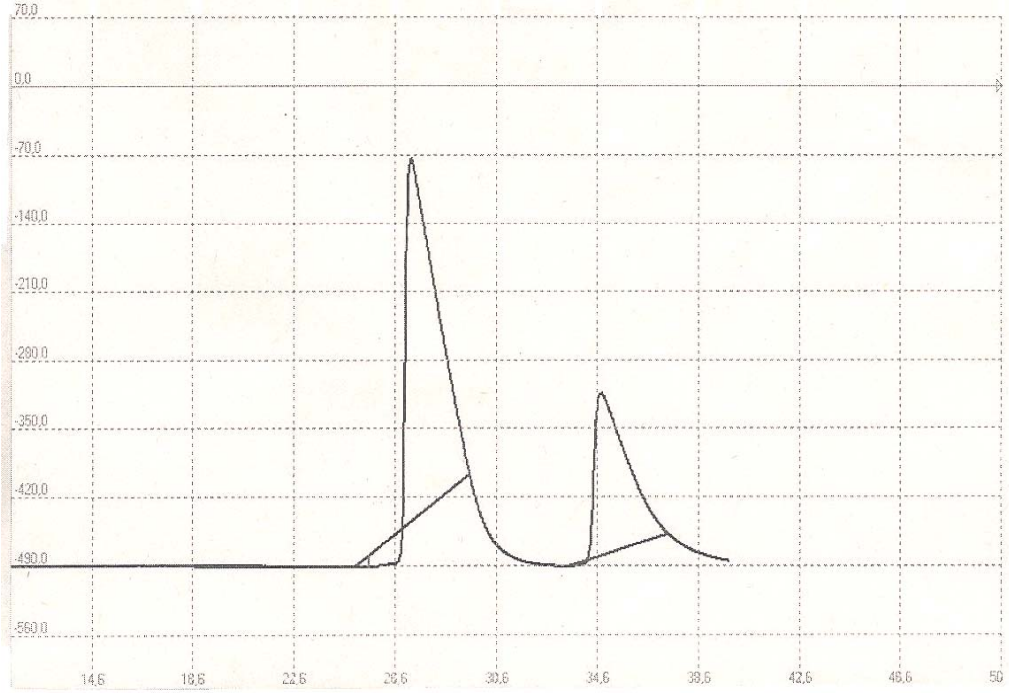


Ek Şekil 5.12. 100 µL β-metilfeniletıl amin için pH 8 tamponu, 6. tüpe ait kromatogram (%e.e=5.87)

No	Name	Type	Start(min)	End(min)	Retention	Height(mV)	Area(mVs)	% Area	Col.	Area(mVs)	Plate #	Conc(ppm)
1	PP 1 (+)		1,18 min	1,51 min	1,29 min	2,064	19,895 mVs	0,24		0,000 mVs	131899,035	0,0000
2	PP 2 (+)		1,51 min	1,72 min	1,72 min	0,873	6,616 mVs	0,08		0,000 mVs	0,000	0,0000
3	PP 3 (+)		1,72 min	1,99 min	1,76 min	1,179	9,469 mVs	0,11		0,000 mVs	248371,996	0,0000
4	PP 4 (+)		29,80 min	33,36 min	31,22 min	56,325	4456,350 mVs	52,71		0,000 mVs	2113,318	0,0000
5	PP 5 (+)		36,83 min	40,81 min	38,47 min	39,767	3961,759 mVs	46,86		0,000 mVs	1156,295	0,0000

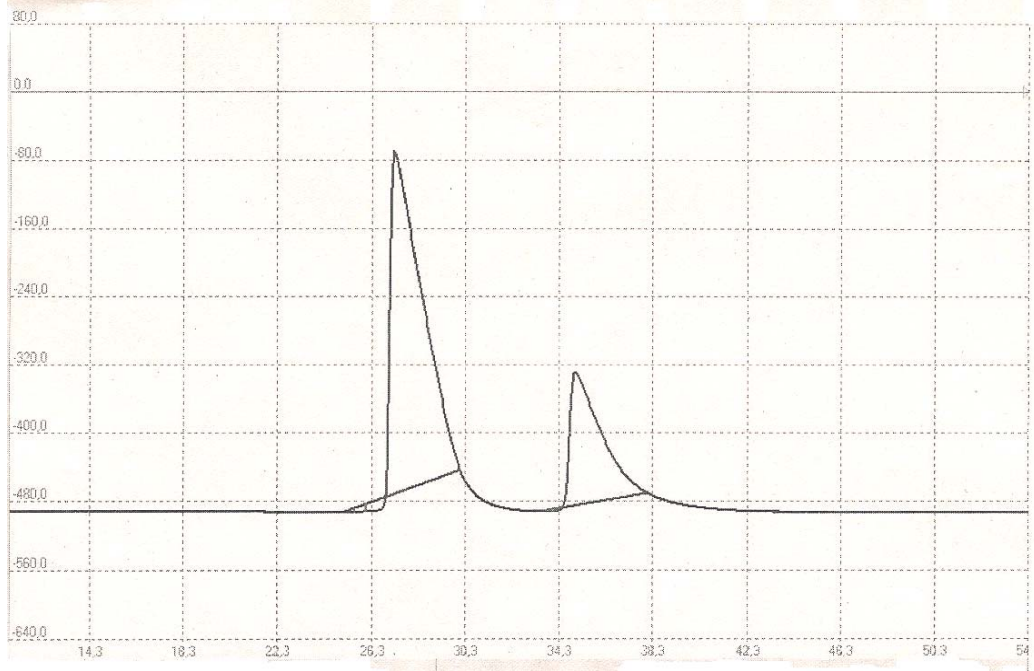


Ek Şekil 5.13. 50 µL β-metilfeniletil amin için pH 6 tamponu, 5. tüpe ait kromatogram (%e.e=30)



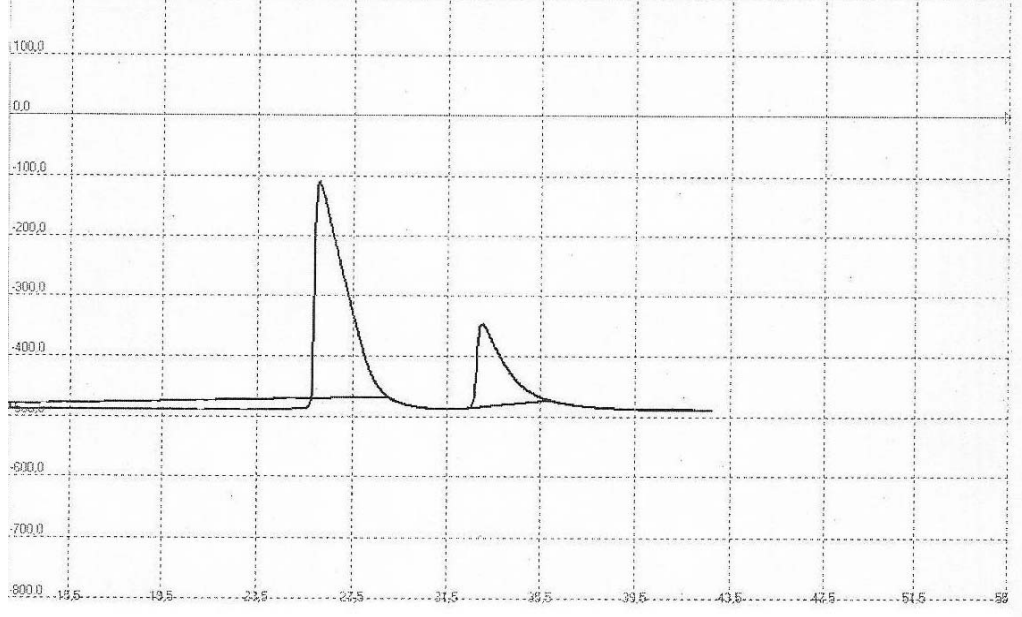
Ek Şekil 5.14. 50 µL β-metilfeniletıl amin için pH 6 tamponu, 6. tüpe ait kromatogram (%e.e=33.66)

No	Name	Type	Start(min)	End(min)	Retention	Height(mV)	Area(mVs)	% Area Col.	Area(mVs)	Plate #	Conc(ppm)
1	PP 1	(+)	0,13 min	0,71 min	0,15 min	0,035	0,371 mVs	0,00	0,000 mVs	0,000	0,0000
2	PP 2	(+)	0,88 min	1,55 min	1,26 min	0,640	5,823 mVs	0,01	0,000 mVs	0,000	0,0000
3	PP 3	(+)	1,64 min	2,21 min	1,72 min	0,050	0,235 mVs	0,00	0,000 mVs	0,000	0,0000
4	PP 4	(+)	2,21 min	2,76 min	2,23 min	0,037	0,102 mVs	0,00	0,000 mVs	0,000	0,0000
5	PP 5	(+)	2,76 min	3,28 min	2,77 min	0,038	0,382 mVs	0,00	0,000 mVs	0,000	0,0000
6	PP 6	(+)	3,43 min	4,08 min	3,47 min	0,061	-0,538 mVs	0,00	0,000 mVs	0,000	0,0000
7	PP 7	(+)	4,16 min	4,65 min	4,18 min	0,034	0,182 mVs	0,00	0,000 mVs	0,000	0,0000
8	PP 8	(+)	4,81 min	5,30 min	4,94 min	0,167	1,844 mVs	0,00	0,000 mVs	0,000	0,0000
9	PP 9	(+)	5,35 min	5,92 min	5,38 min	0,066	1,117 mVs	0,00	0,000 mVs	0,000	0,0000
10	PP 10	(+)	5,92 min	6,48 min	5,92 min	0,047	0,541 mVs	0,00	0,000 mVs	0,000	0,0000
39	PP 39	(+)	24,46 min	24,95 min	24,51 min	0,051	0,053 mVs	0,00	0,000 mVs	0,000	0,0000
40	PP 40	(+)	25,00 min	25,57 min	25,57 min	11,651	-200,000 mVs	0,46	0,000 mVs	1234223,360	0,0000
41	PP 41	(+)	25,57 min	29,56 min	27,22 min	370,569	29004,494 mVs	66,49	0,000 mVs	0,000	0,0000
42	PP 42	(+)	33,41 min	37,40 min	34,78 min	165,376	14396,134 mVs	33,00	0,000 mVs	0,000	0,0000



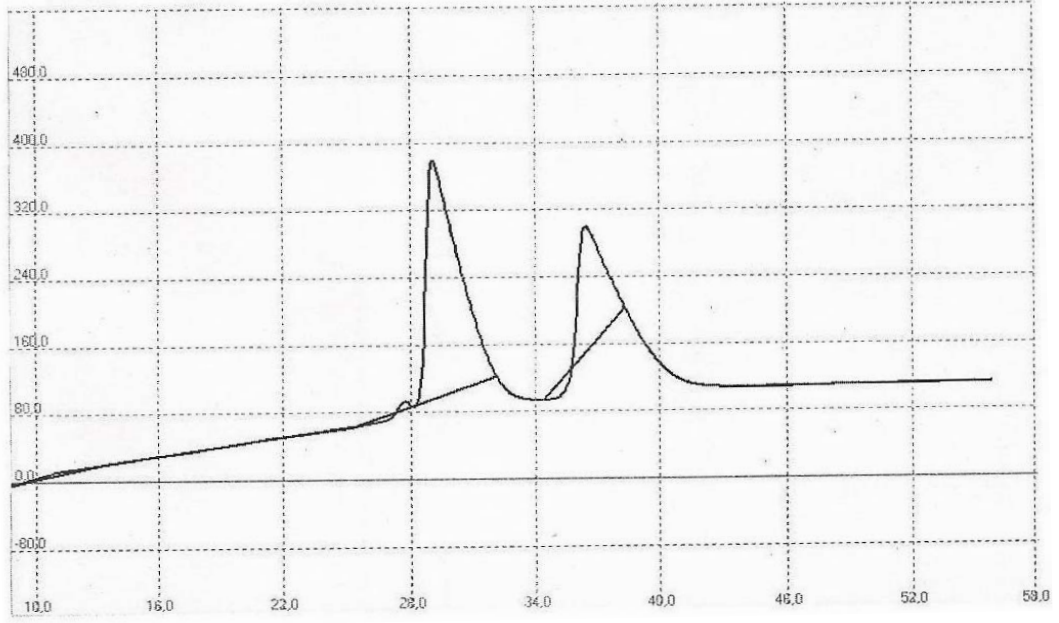
Ek Şekil 5.15. 50 µL β-metilfeniletıl amin için pH 6 tamponu, 7. tüpe ait kromatogram(%e.e=44.27)

No	Name	Type	Start(min)	End(min)	Retention	Height(mV)	Area(mVs)	% Area	Col. Area(mVs)	Plate #	Conc(ppm)
1	PP 1	(+)	0,05 min	0,54 min	0,06 min	0,037	0,357 mVs	0,00	0,000 mVs	0,000	0,0000
2	PP 2	(+)	0,81 min	1,48 min	1,26 min	0,480	4,882 mVs	0,01	0,000 mVs	0,000	0,0000
3	PP 3	(+)	1,48 min	2,03 min	1,50 min	0,126	2,467 mVs	0,00	0,000 mVs	0,000	0,0000
4	PP 4	(+)	2,03 min	2,51 min	2,04 min	0,061	0,803 mVs	0,00	0,000 mVs	0,000	0,0000
5	PP 5	(+)	2,55 min	3,11 min	2,58 min	0,044	0,025 mVs	0,00	0,000 mVs	0,000	0,0000
6	PP 6	(+)	3,11 min	3,60 min	3,16 min	0,040	-0,107 mVs	0,00	0,000 mVs	0,000	0,0000
7	PP 7	(+)	3,75 min	4,32 min	3,78 min	0,050	0,203 mVs	0,00	0,000 mVs	0,000	0,0000
8	PP 8	(+)	4,32 min	4,83 min	4,36 min	0,030	0,027 mVs	0,00	0,000 mVs	0,000	0,0000
41	PP 41	(+)	25,05 min	25,59 min	25,08 min	5,349	-88,432 mVs	0,17	0,000 mVs	0,000	0,0000
42	PP 42	(+)	25,59 min	26,10 min	26,10 min	9,880	-234,818 mVs	0,45	0,000 mVs	14676,400	0,0000
43	PP 43	(+)	26,10 min	30,08 min	27,27 min	402,065	36953,423 mVs	71,53	0,000 mVs	0,000	0,0000
44	PP 44	(+)	33,55 min	34,05 min	34,05 min	2,112	-35,264 mVs	0,07	0,000 mVs	15407,707	0,0000
45	PP 45	(+)	34,05 min	38,04 min	35,02 min	156,908	14272,836 mVs	27,63	0,000 mVs	0,000	0,0000
46	PP 46	(+)	43,37 min	43,88 min	43,39 min	0,049	-0,447 mVs	0,00	0,000 mVs	0,000	0,0000



Ek Şekil 5.16. 50 µL β-metilfeniletıl amin için pH 6 tamponu, 8. tüpe ait kromatogram (%e.e=47.09)

No	Name	Type	Start(min)	End(min)	Retention	Height(mV)	Area(mVs)	% Area	Col. Area(mVs)	Plate #	Conc(ppm)
1	PP 1	(+)	0,13 min	0,81 min	0,75 min	0,472	-8,935 mVs	0,02	0,000 mVs	0,000	0,0000
2	PP 2	(+)	0,81 min	1,58 min	1,25 min	0,974	-29,250 mVs	0,05	0,000 mVs	0,000	0,0000
3	PP 3	(+)	1,58 min	2,13 min	1,59 min	1,361	-38,125 mVs	0,07	0,000 mVs	0,000	0,0000
4	PP 4	(+)	2,13 min	2,90 min	2,90 min	1,890	-74,935 mVs	0,14	0,000 mVs	0,000	0,0000
5	PP 5	(+)	2,90 min	3,43 min	2,90 min	2,291	-67,105 mVs	0,12	0,000 mVs	0,000	0,0000
6	PP 6	(+)	3,43 min	4,08 min	3,66 min	2,739	-96,131 mVs	0,18	0,000 mVs	0,000	0,0000
7	PP 7	(+)	4,08 min	4,63 min	4,19 min	3,127	-96,187 mVs	0,18	0,000 mVs	0,000	0,0000
8	PP 8	(+)	4,63 min	5,18 min	4,90 min	3,487	-107,795 mVs	0,20	0,000 mVs	0,000	0,0000
9	PP 9	(+)	5,18 min	5,73 min	5,61 min	3,881	-121,568 mVs	0,23	0,000 mVs	0,000	0,0000
10	PP 10	(+)	5,73 min	6,27 min	6,05 min	4,278	-133,203 mVs	0,25	0,000 mVs	0,000	0,0000
11	PP 11	(+)	6,27 min	6,81 min	6,30 min	4,664	-143,669 mVs	0,27	0,000 mVs	0,000	0,0000
41	PP 41	(+)	23,95 min	24,50 min	24,50 min	17,145	-559,397 mVs	1,04	0,000 mVs	23631,098	0,0000
42	PP 42	(+)	24,50 min	25,00 min	25,00 min	17,244	-518,896 mVs	0,96	0,000 mVs	0,000	0,0000
43	PP 43	(+)	25,00 min	28,99 min	26,06 min	359,573	30031,933 mVs	55,83	0,000 mVs	0,000	0,0000
44	PP 44	(+)	31,90 min	35,88 min	33,00 min	136,677	10800,749 mVs	20,08	0,000 mVs	0,000	0,0000
45	PP 45	(+)	39,65 min	40,21 min	39,66 min	0,177	-2,666 mVs	0,00	0,000 mVs	0,000	0,0000
46	PP 46	(+)	40,21 min	40,75 min	40,21 min	0,231	-5,762 mVs	0,01	0,000 mVs	3169451,399	0,0000



Ek Şekil 5.17. 50 µL β-metilfeniletil amin için pH 6 tamponu, 9. tüpe ait kromatogram (%e.e=45.45)

No	Name	Type	Start (min)	End (min)	Retention	Height (mV)	Area (mVs)	% Area	Col.	Area (mVs)
1	PP 1	(+)	1,13 min	2,02 min	1,27 min	8,772	109,221 mVs	0,26		0,000 mVs
2	PP 2	(+)	2,10 min	2,60 min	2,60 min	1,091	-15,611 mVs	0,04		0,000 mVs
3	PP 3	(+)	2,60 min	5,10 min	4,85 min	6,156	92,844 mVs	0,22		0,000 mVs
4	PP 4	(+)	5,10 min	9,08 min	9,08 min	4,775	342,395 mVs	0,80		0,000 mVs
5	PP 5	(+)	9,19 min	13,18 min	13,18 min	3,469	399,436 mVs	0,93		0,000 mVs
6	PP 6	(+)	13,21 min	17,20 min	17,20 min	0,152	6,732 mVs	0,02		0,000 mVs
7	PP 7	(+)	17,20 min	21,19 min	21,19 min	0,552	-81,232 mVs	0,19		0,000 mVs
8	PP 8	(+)	21,27 min	25,25 min	25,25 min	0,344	-34,599 mVs	0,08		0,000 mVs
9	PP 9	(+)	25,28 min	28,15 min	27,73 min	9,318	-208,389 mVs	0,49		0,000 mVs
10	PP 10	(+)	28,15 min	32,14 min	29,08 min	284,052	30117,139 mVs	70,50		0,000 mVs
11	PP 11	(+)	34,35 min	38,34 min	36,45 min	148,866	11294,693 mVs	26,44		0,000 mVs
12	PP 12	(+)	44,28 min	48,27 min	48,27 min	0,080	-8,231 mVs	0,02		0,000 mVs
13	PP 13	(+)	48,31 min	48,82 min	48,80 min	0,023	0,324 mVs	0,00		0,000 mVs



## ÖZET

Bu çalışmada *N-p*-nitrobenzoil-(S)-glutamik asit, *N-p*-aminobenzoil-(S)-glutamik asit, (S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil) propanoik asit metil esteri, N-[(S)-2-amino-3-(4-hidroksifenil) propanoil]-(S)-aspartik asit, N $\alpha$ -Boc-N $\epsilon$ -2-klorobenziloksikarbonil-L-lizin-p-nitrofenil esteri ve L-lizinin-p-nitrofenil esteri sentezlendi. Sci Finder Scholar programıyla yapılan taramada *N-p*-aminobenzoil-(S)-glutamik asidin iyi verimle yeni sentezlen bir ligand olduğu anlaşıldı. Bileşiklerin yapıları IR, <sup>1</sup>H NMR ve <sup>13</sup>C NMR sonuçlarıyla ile karakterize edildi. Pirkle-tip kiral sabit faz oluşturarak kolon kromatografisi yöntemi ile biyolojik öneme sahip kiral amin enantiyomerlerinin rezolüsyonu sağlandı. Bu amaçla dolgu maddesi olarak sepharose-4B kullanıldı. Uzatma kolu olarak dolgu maddesine L-tirozin takıldı ve bu uzatma koluna doğal amino asitlerden L-glutamik asidin aromatik amin türevi diazolama yoluyla ligand olarak bağlandı. Sonra ayırılmak istenilen biyolojik öneme sahip kiral aminin ( $\beta$ -metilfeniletilamin) rasemik karışımı kolona tatbik edildi ve hareketli faz olarak değişik pH'larda (pH: 6, 7 ve 8) tampon çözeltiler kullanılarak rezolüsyon sağlandı. Elüatın akış hızı peristaltik pompa ile ayarlandı. Kolondan alınan elüat organik (diethyl eter) faza alındıktan sonra HPLC ile aminin enantiyomerik fazlalığı (e.e) belirlendi.  $\beta$ -metilfeniletilaminin rasemik karışımı farklı miktarlarda(100 ve 50  $\mu$ l) iki kez kolona yüklendi. Enantiyomerik fazlalık(e.e) pH 6, 7 ve 8 için hesaplanarak maksimum rezolüsyonun pH 6'da olduğu bulundu. Diğerlerine göre maksimum enantiyomerik saflık 50  $\mu$ l'de olduğu belirlendi ve  $\beta$ -metilfeniletilamin için optimum Ph'in 6 olduğu anlaşıldı

## SUMMARY

In this study, N-*p*-nitrobenzoyl-(S)-glutamic acid, N-*p*-aminobenzoyl-(S)-glutamic acid, (S)-2-amino-3-(4-hydroxyphenyl)-propanoic acid methyl ester, N-[(S)-2-amino-3-(4-hydroxyphenyl)propanoyl]-(S)-aspartic acid, N $\alpha$ -Boc-N $\epsilon$ -2-chlorine benzyloxycarbonyl-L-lysine-*p*-nitrophenyl ester and *p*-nitro phenyl ester of L-lysine were synthesised. The synthesized compounds were screened with Sci Finder program and N-*p*-aminobenzoyl-L-glutamic acid, which is a new chiral ligand, has been synthesized in good yield. The structures of compounds were characterized with IR, <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR results. A new Pirkle-type chiral column stationary phase for resolution of chiral amin enantiomers having biological activity was prepared by using sepharose 4B as a matrix, L-tyrosine as a spacer-arm and aromatic amin derivatives of some natural amino acid (L-glutamic acid) as a ligand. Racemic mixture of  $\beta$ -methylphenylethylamine was loaded to the column. The binding capacities of the column stationary phase was determined at different pH's (pH: 6, 7 and 8) using buffer solutions as mobile phase. The flow rate of eluate was adjusted with peristaltic pump. Then eluate was extracted with diethyl ether and enantiomeric excess (e.e.) was determined by HPLC method.  $\beta$ -methylphenylethylamine was loaded to column two times at different amounts (100 and 50  $\mu$ l). The enantiomeric excess was calculated for pH 6, 7 and 8, and the maximum resolution was recorded at pH 6. Maximum enantiomeric purity was determined at 50  $\mu$ l the sample with respect to the others and the optimum pH is 6 for  $\beta$ -methylphenylethylamine.