



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI KARBOKSİLİK ASİT GRUBU İÇEREN KALİKSARENLERİN/SİKLODEKSTRİNLERİN SENTEZİ VE BAZI PROFEN TÜRÜ RASEMİK İLAÇLARIN LİPAZ KATALİZLİ ENANTİYOSEÇİCİ TEPKİMELERDE KULLANILMASI

Osman Yılmaz AKBULUT

YÜKSEK LİSANS

KİMYA Anabilim Dalı

Ekim-2013
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI KARBOKSİLİK ASİT GRUBU İÇEREN KALİKSARENLERİN/SİKLODEKSTRİNLERİN SENTEZİ VE BAZI PROFEN TÜRÜ RASEMİK İLAÇLARIN LİPAZ KATALİZLİ ENANTİYOSEÇİCİ TEPKİMELERDE KULLANILMASI

Osman Yılmaz AKBULUT

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. Mustafa YILMAZ

2013, 133 Sayfa

Jüri
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
Prof. Dr. Mehmet SEZGİN
Doç. Dr. Sabri ALPAYDIN

Bu çalışmada, çıkış bileşikleri olarak *p-ter*-bütilkaliks[4]aren **(1)** ve *p-ter*-bütilkaliks[6]aren **(2)** literatüre göre sentezlenerek alkil brom ester ile reaksiyonu sonucu bu bileşiklerin ester türevleri **(3-6)** sentezlendi. Sentezlenen ester türevleri hidroliz edilerek karboksilli asit **(7-10)** formlarına dönüştürüldü.

Kaliksaren bileşiklerinin yanında kaliksarenler gibi konuk-konak türü kompleks yapabilme özelliğine sahip olan β-siklodekstrin, tosil anhidrit ile etkileştirilerek mono-6-deoksi-6-tosil-β-siklodekstrin **(12)** literatüre göre sentezlendi. Mono-6-deoksi-6-tosil-β-siklodekstrin sonra klor asetikasit ile uygun reaksiyon şartlarında reaksiyona sokularak hekza asit türevi **13** elde edildi. Daha sonra hekza asit türevi **13** uygun fonksiyonel kısmından (tosil) amino silika ile modifiye olmuş manyetik nanopartiküllere immobilize edildi.

Sentezlenen bütün bileşiklerin yapıları spektroskopik teknikler (FTIR, ^{1}H NMR ve ^{13}C- NMR) ile aydınlatıldı.

Sentezlenen kaliksaren türevleri (**7-10)** ile manyetik nanopartiküle immobile olmuş β-siklodekstrin rasemik Naproksen metil esterinin lipaz katalizli enantiyoseçimli tepkimelerinde kullanıldılar.

Anahtar Kelimeler: Kaliksaren, siklodekstrin, sol-gel, enantiyoseçimlilik, Naproksen

ABSTRACT

MS THESIS

SYNTHESIS OF VARIOUS CARBOXYLIC ACID GROUPS CONTAINING CALIXARENES/CYCLODEXTRINES AND UTILIZATION OF THEM IN THE ENANTIOSELECTIVE STUDIES BY LIPASE CATALYST FOR SOME RASEMIC PROFEN DRUGS.

Osman Yılmaz AKBULUT

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCEOF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN CHEMISTRY

Advisor: Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

2013, 133 Pages

Jury
Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
Prof. Dr. Mehmet SEZGİN
Doç. Dr. Sabri ALPAYDIN

In this studies, *p-tert*-butylcalix[4]arene **(1)** and *p-tert*-butylcalix[6]arene **(2)** were synthesized as starting materials according to the literature, and were treated with alkyl bromoester to afford their ester derivatives **(3-6)**. Hydrolization of the ester derivatives gave the carboxylic acid derivatives **(7-10)**.

Besides of calixarene, β-siklodekstrin which comprimes host-guest type complexes just as calixarenes, was treated with tosylanhydride to obtain mono-6-deoxy-6-tosyl-β-siklodekstrin **(12)** according to literature. Then, the reaction mono-6-deoxy-6-tosyl-β-siklodekstrin and chloroacetic acid was constructed hexa acid derivative **13**. The hexa acid **13** was grafted onto amino-silica modified mangetic nanoparticles with a suitable pathway of the hexa acid (tosyl).

All prepared compounds were characterized by ^{1}H-NMR, ^{13}C-NMR, FTIR tecniques.

Synthesized calixarene derivatives **(7-10)** and β-siklodekstrin-grafted magnetic nanoparticles were used in the enantioselective hydrolysis reaction of rasemic Naproxen methyl ester by means of lipase catalysis.

Keywords: Calixarene, cyclodextrin, sol-gel, enantioselectivity, Naproxen

ÖNSÖZ

Bu çalışma, Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Prof. Dr. Mustafa YILMAZ yönetiminde yapılarak Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü'ne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

Bu çalışma, Tübitak 111T027 nolu araştırma projesinin bir kısmı olarak ve Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri koordinatörlüğü tarafından BAP 13201029 nolu yüksek lisans tez projesi olarak desteklenmiştir.

İlk olarak bu çalışmanın seçiminde, hazırlanmasında ve araştırılmasında her türlü bilgi ve öneriyle bana yön veren, danışman hocam Sayın Prof. Dr. Mustafa YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışmanın gerçekleşmesinde beni maddi olarak destekleyen Tübitak ve Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmalarım boyunca bana laboratuvar imkanı sağlayan Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. H. İsmet UÇAN'a ve Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde görev yapan çok değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarımda bana her konuda yardımcı olan ve tezimin hazırlanmasında emeği geçen başta Enise AKÖZ olmak üzere Serkan SAYIN, Arş. Gör. Dr.Elif ÖZYILMAZ, Arş. Gör. Dr. Ezgi AKCEYLAN, Arş. Gör. Dr. Özlem ŞAHİN, Arş. Gör. Dr. Arzu UYANIK, Uzman Dr. Serkan ERDEMİR ve Uzman Dr. Mustafa TOPKAFA'ya ve diğer yüksek lisans öğrencileri Selçuk KAPLAN, Hasan YILDIZ ve Mehmet AKTAŞ'a teşekkür ederim.

Ayrıca tez çalışmam boyunca bana büyük sabır ve ilgi gösteren, maddi, manevi yardımlarını ve desteklerini benden esirgemeyen çok değerli aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Osman Yılmaz AKBULUT
KONYA-2013

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Kaliksarenler 1
1.1.1. Kaliksaren Tarihçesi 1
1.1.2. Kaliksarenlerin Adlandırılması 3
1.1.3. *p-ter*-Bütilkaliks[n]arenlerin Sentezi 3
1.1.4. *p-ter*-Bütilkaliks[n]arenlerin Sentezi Üzerine Kullanılan Bazın Etkisi 4
1.1.5. Kaliksarenlerin Elde Edilişi ve Reaksiyon Mekanizması 5
1.1.6. Kaliksarenlerin Konformasyonları 7
1.1.7. Kaliksarenlerin Fonksiyonlandırılması 8
1.1.8. Kaliksarenlerin Kullanım Alanları 11
1.2. Siklodekstrin 24
1.2.1. Siklodekstrinlerin Tarihçesi 24
1.2.2. Siklodekstrinlerin Yapı ve Özellikleri 25
1.2.3. Siklodekstrin Türevleri 29
1.2.4. Siklodekstrinlerin Fonksiyonlandırılması 30
1.3. Enzimler ve Genel Özellikleri 33
1.3.1. Lipazlar 33
1.3.2. *Candida Rugosa* Lipaz (CRL) 35
1.3.3. Enzim İmmobilizasyonu 36
1.3.3. İmmobilizasyon Yöntemleri 37

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI **46**

3. MATERYAL VE YÖNTEM **53**

3.1.Enstrümantal Teknikler 53
3.2.Kimyasal Sentezler ve Karakterizasyon 53
3.2.1. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28-tetrahidroksikaliks[4]aren 53
3.2.2. 5,11,17,23,29,35-Hekza-*ter*-bütil-37,38,39,40,41,42-hekzahidroksi kaliks[6]aren 54
3.2.3. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren 55
3.2.4. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-dietoksikarbonilbütoksi-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren 56
3.2.5. p-ter-Bütil kaliks(4)aren ile p-ter-bütil kaliks(6)arenlerin ester türevlerinin sentezi 57

- 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28-tetrametoksikarbonilmetoksi kaliks[4]aren....57
- 5,11,17,23,29,35-hekza-*ter*-bütil-37,38,39,40,41,42-hekzametoksikarbonil metoksikaliks[6]aren....58
3.2.6. Kaliks(n)arenlerin ester türevlerin hidrolizi 58
- 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-dihidroksikarbonilmetoksi-26,28-di hidroksikaliks[4]aren 58
- 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dihidroksikarbonilbütoksi-26,28-di hidroksikaliks[4]aren 59
- 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28-tetrahidroksikarbonilmetoksi-kaliks[4]aren....60
- 5,11,17,23,29,35-Hekza-*ter*-bütil-37,38,39,40,41,42-hekzahidroksikarbonil metoksikaliks[6]aren....60
3.2.8. *p*-Toluensulfonik anhidritin hazırlanması 61
3.2.9. Mono-6-deoksi-6-(*p*-toluensulfonil)-β-siklodekstrin 61
3.2.10. Heksa-etanoik asit-mono-(*p*-toluensulfonil)-β-siklodekstrin (CD-$(COOH)_6$) 62
3.2.11. Karboksimetil-β-siklodekstrin (CD-$(COOH)_7$) 63
3.2.12. Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülünün sentezi 63
3.2.13. Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülünün APTES ile modifiye edilmesi 64
3.2.14. CD-$(COOH)_6$-MN sentezi 65
3.2.15. CD-$(COOH)_7$-MN sentezi 65
3.2.16. Sol-gel metoduna göre Lipaz İmmobilizasyonu....66
- Protein miktarı 67
- Aktivite Tayini 68
3.2.17. HPLC çalışmaları....68
- (*S*)-Naproksen'in Rasemleştirilmesi 68
- (*R*/*S*)-Naproksen Metil Ester Sentezi 69

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 71

4.1. Sol-Jel Tekniğine göre Lipaz İmmobilizasyonu....87
Optimum pH....89
Optimum sıcaklık 92
4.2. İmmobilize Lipazların Enantiyoseçimli Tepkimelerde Kullanılması....94
Kaliksaren miktarının (R,S)- Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizine etkisi....100
Tekrar kullanılabilirlik....102

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 106

KAYNAKLAR 107

EKLER 118

ÖZGEÇMİŞ....133

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

APTES	3-Aminopropiltrietoksisilan
CPS	Kloropropilsilikajel
CD	Siklodekstrin
Ts	Tosil klorür
Ts_2O	Tosil anhidrit
TsCD	Mono-6-deoksi-6-tosil-β-siklodekstrin
CD-$(COOH)_6$	Heksa-etanoik asit-mono-(p-toluensulfonil)-β-siklodekstrin
CD-$(COOH)_7$	Karboksimetil-β-siklodekstrin
MN	Manyetik nanopartikül
CRL	*Candida Rugosa* Lipaz
TMOS	Tetrametoksisilan
MTMOS	Metiltrimetoksisilan
TEOS	Tetraetoksisilan
OTES	Oktiltrietoksisilan
p-NPP	*p*-nitrofenil palmitatın
p-NP	*p*-nitrofenol
BSA	Bovin serum albumin
Enc	Enkapsüle

1. GİRİŞ

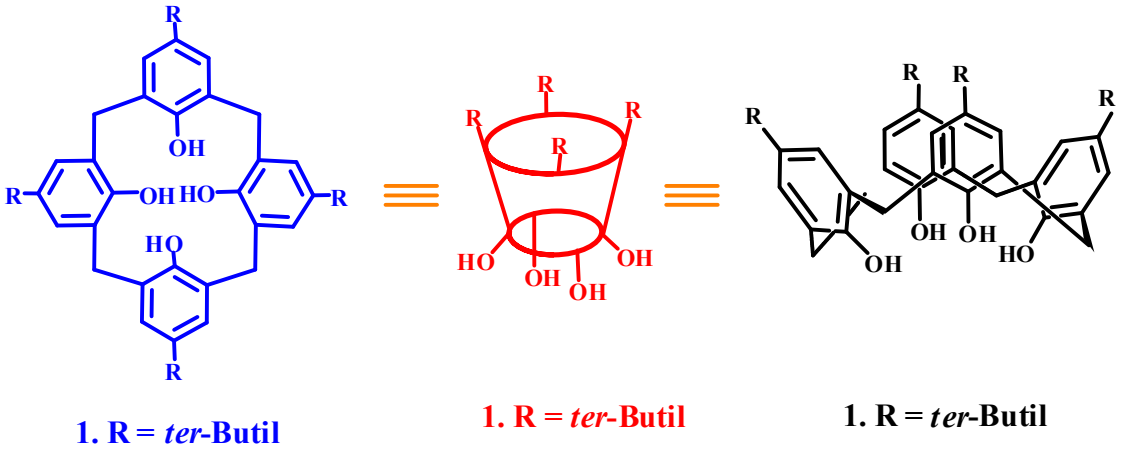
Günümüzde en önemli sorunlardan biri haline gelen insan sağlığı birçok araştırmacıyı harekete geçirmiştir. Gelişen teknolojiyle birlikte çok önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. İnsan ve çevre üzerinde birçok zararı olduğu bilinen toksik maddelerin uzaklaştırılmasında ve son zamanlarda özellikle farmokolojide birçok ilacın etken maddesi olan kiral bileşiklerin enantiomerlerinin ayrılmasında farklı metotlar geliştirilmiştir. Supramoleküler kimyada bu problemlerin giderilmesine yönelik uygun fonksiyonel gruplar bulunduran makromoleküller sentezlenmiştir. Örneğin; taç eterler (Pedersen, 1967; 1988 [a,b]; İzatt, 1992), kriptantlar (Lehn, 1995; 1988 [a,b]), siklofanlar (Vögtle, 1993) ve doğal siklodekstrinler (Bender, 1978; Szejtle, 1998) v.s. gibi makrosiklik moleküller sentezlenebilir. Bu çalışmada, siklodekstrinler ve taç eterlerden sonra supramoleküler kimyada üçüncü kuşak bileşikleri olarak bilinen limitsiz fonksiyonlandırabilme özelliğine sahip, nötral, anyon ve katyonlarla konuk-konak türü kompleks yapabilen, tek basamakta sentezlenebilen ***kaliksarenler*** sentezlenerek rasemik profen türevlerinin enantiyomerlerine ayrılmasında kullanıldılar.

1.1. Kaliksarenler

1.1.1. Kaliksaren Tarihçesi

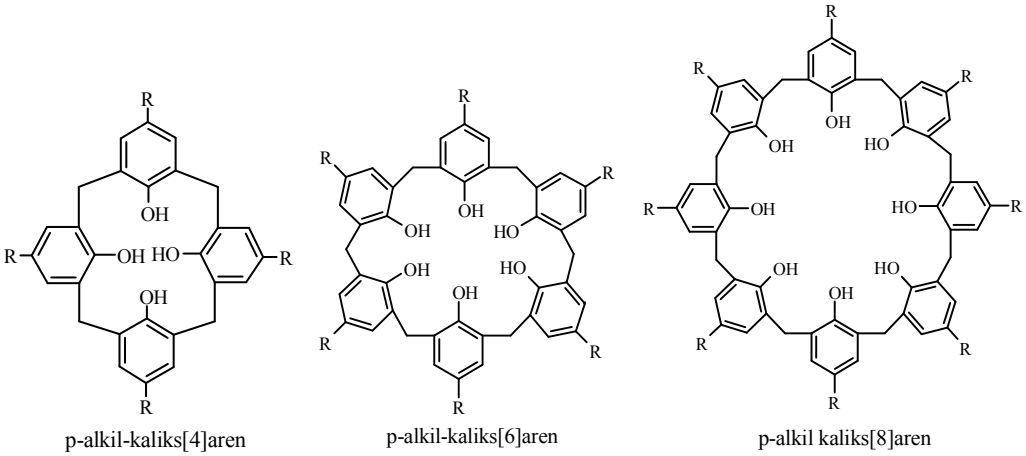
Supramoleküler kimyada taç eterler ve siklodekstrinler, birinci ve ikinci kuşak supramolekülleri oluştururken, benzer özellik göstermesi sebebiyle kaliksarenler de, üçüncü kuşak supramoleküller olarak tanımlanmaktadırlar. Kaliksarenler, fenol ve formaldehitin bazik ortamdaki kondenzasyon reaksiyonu sonucu oluşan halkalı esnek yapıdaki makrosiklik reseptörlerdir. İlk olarak 1872 yılında Adolph von Baeyer sulu formaldehit ve fenolü ısıtarak oldukça sert reçinemsi ve kristallenmeyen bir ürün elde etmiştir. Ancak o zamanlarda yapısını tam olarak aydınlatamamıştır. Leo Hendrick Baekeland 20.yüzyılda fenol-formaldehit reaksiyonundan elastiki katı bir reçinenin hazırlanması için sentetik bir metod geliştirerek patentini almıştır (Baekeland, 1908). Kaliksarenlerin ilk oluşumu 1941 yılında Avusturyalı kimyacı Alois Zinke ve Erich Zeigler tarafından ortaya çıkarılmıştır. Zinke ve Ziegler isimli bilim adamları ‘‘*Bakalit oluşum prosesi’’* üzerindeki çalışmalarını yoğunlaştırarak *p-ter*-bütilfenol ve sulu formaldehiti bazik ortamda etkileştirmiş ve erime noktası 340^{o}C’nin üzerinde,

çözünürlüğü az olan, yüksek molekül ağırlıklı halkalı tetramerik yapıda bir madde elde ettiklerini ileri sürmüşlerdir (Zinke ve Ziegler, 1944) (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Kaliks[4]arenlerin farklı gösterimleri

Gutsche ve arkadaşları, Zinke ve Ziegler'in elde ettikleri ürünün gerçekte bir tetramer olmayıp; tetramer, hekzamer, oktamer ve bir miktar da lineer oligomer karışımı olduğunu ispatladılar. Daha sonra Gutsche ve arkadaşları *p-ter*-bütilfenol ile formaldehitin kondenzasyonu sonucu oluşan halkalı tetramer, hekzamer ve oktameri, reaksiyon şartlarını optimize ederek ayrı ayrı saf olarak ve yüksek verimde elde etmeyi başarmıştır (Gutsche, 1990) (Şekil 1.2). Gutsche ve arkadaşları halkalı pentamer ve heptamer yapılarını da saf olarak fakat düşük verimle elde etmişlerdir (Stewart ve Gutsche, 1993).

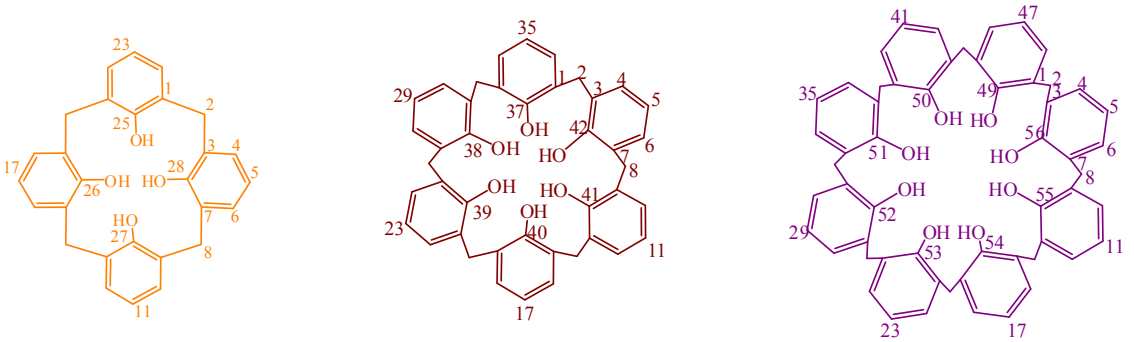


Şekil 1.2. Kaliks[n]arenlerin yapısı

1.1.2. Kaliksarenlerin Adlandırılması

Kaliksarenler halkalı yapıda, fenolik halkaların metilen gruplarıyla birbirine bağlanması sonucu oluşan taç şeklindeki oligomerlerdir. Bu bileşikler ilk defa Gutsche tarafından pratik bir yolla isimlendirilmiştir. Bu isimlendirme tarzı IUPAC tarafından da kabul edilmiştir. Kaliks[n]aren terimindeki, "kaliks(chalice)" yunanca taç, aren de organik kimyada aromatik halkayı ifade ettiğinden Gutsche bunları "kaliks[n]aren" olarak isimlendirmiştir. Bileşikteki "n'' ise fenolik birimlerin sayısını yani makrosiklik bileşiğin büyüklüğünü gösterir (Akceylan, 2004).

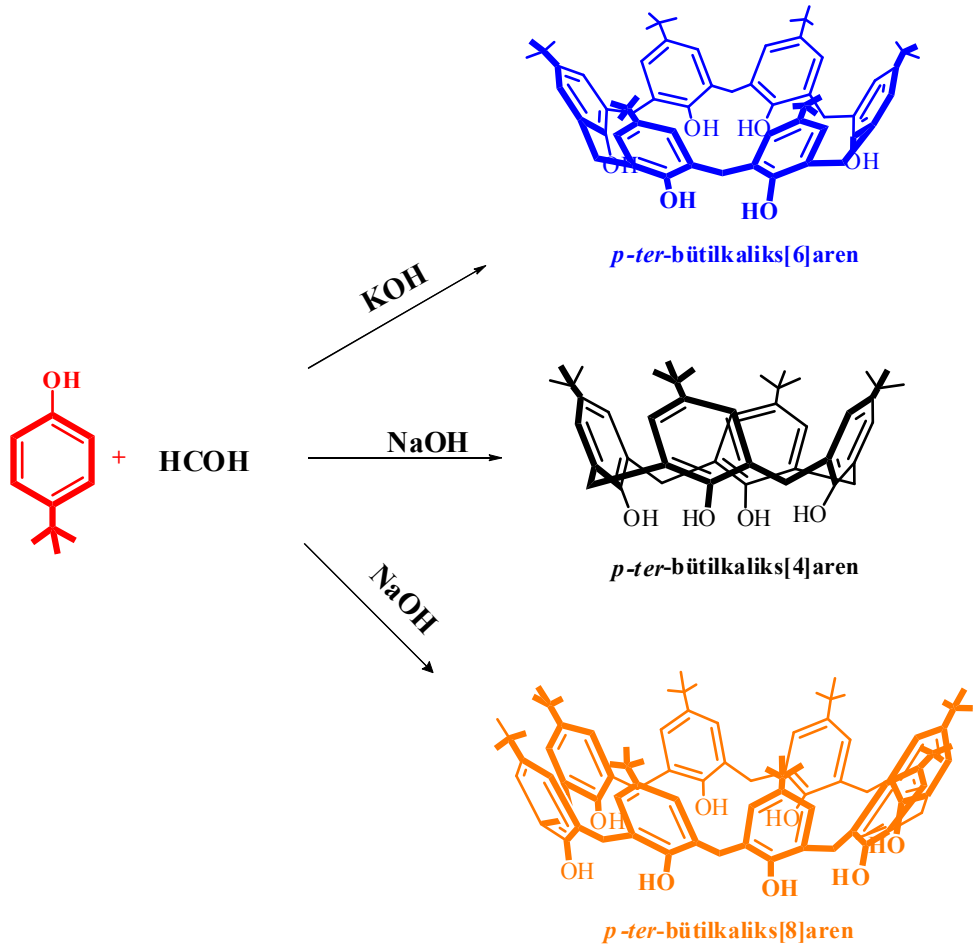
Kaliks[n]arenler 4,5,6,7,8,…gibi farklı sayıda fenolik birimlerden ve sübstitue gruplardan meydana gelebilirler. Farklı sübstitue fenoller için kaliksarenler isimlendirilirken fenolün sübstitue kısmı kaliksarenlerin önüne yazılır. Bununla ilgili olarak, literatürlerde *p*-alkil fenolden oluşan dört üyeli halkalı tetramer yapıdaki kaliksaren, daha sistematik olarak 5,11,17,23-tetra-alkil-25,26,27,28-tetrahidroksi kaliks[4]aren şeklinde, daha kısa ise *p*-alkil kaliks[n]arenler şeklinde isimlendirilir (Gutsche, 1989; Aksoy, 2011) (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Kaliks[4]aren, kaliks[6]aren ve kaliks[8]arenlerin yapıları ve numaralandırılması

1.1.3. *p-ter*-Bütilkaliks[n]arenlerin Sentezi

Kaliks[n]arenler molekül olarak konuk-konak (host-guest) kimyasında önemli bir yer teşkil ederler. Gutsche'nin dört (Gutsche ve Iqbal, 1990), altı (Gutsche, 1990) ve sekiz (Munch ve Gutsche, 1990) tekrarlanan birimlere sahip *p-ter*-bütil kaliksarenler için tek basamaklı sentez metotlarının olması, literatürde yeni kaliksaren türevlerinin çoğalmasını sağlamıştır (Aksoy, 2011) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. *p-ter*-Bütilkaliks[4]aren, *p-ter*-bütilkaliks[6]aren ve *p-ter*-bütilkaliks[8]arenlerin yapıları

1.1.4. *p-ter*-Bütilkaliks[n]arenlerin Sentezi Üzerine Kullanılan Bazın Etkisi

Kaliksarenlerin sentezi yıllardır incelenmiş ve sıcaklığın, çözücünün, kullanılan bazın ve farklı miktarlarının kaliksarenlerin sentezi üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

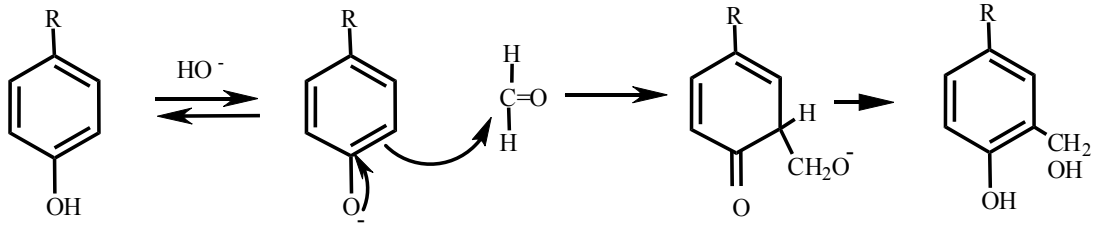
p-ter-Bütilkaliks[4]aren'in sentezinde baz miktarı oldukça önemlidir. Kullanılan bazın optimum miktarlarda olması gerekir. Bazın konsantrasyonu ürün verimini ve sentezlenecek oligomerin cinsini etkilemektedir. Halkalı oktamer ve tetramerin eldesinde katalitik miktarda baz kullanılırken halkalı hekzamer eldesinde ise stokiyometrik oranda baz kullanılmalıdır (Gutsche, 1981, 1984; Dhawan, 1987).

Tetramer, hekzamer ve oktamerin sentezinde kullanılan bazın miktarı kadar türü de önemlidir. Bu yüzden tetramer, hekzamer ve oktamerin sentezi için farklı alkali metal hidroksitleri kullanılmıştır. Halkalı hekzamer sentezinde RbOHveya CsOH

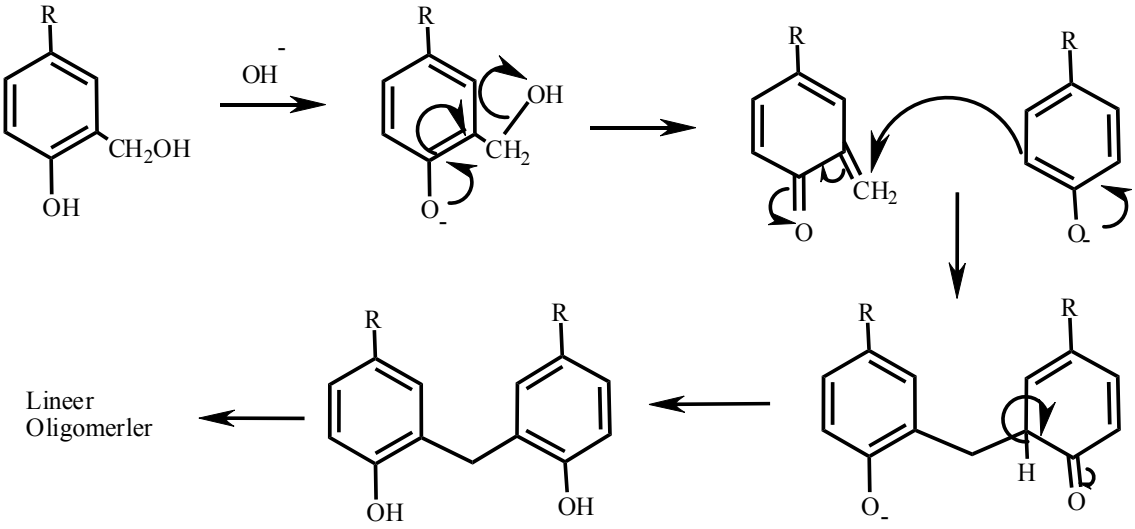
kullanıldığında çok yüksek verim elde edilirken halkalı tetramer ve oktamer sentezinde ise LiOH veya NaOH kullanıldığında yüksek verim elde edilmiştir. Kullanılan bazın seçiminde alkali metal katyonlarının iyon çapları göz önüne alınmıştır (Aksoy, 2011).

1.1.5. Kaliksarenlerin Elde Edilişi ve Reaksiyon Mekanizması

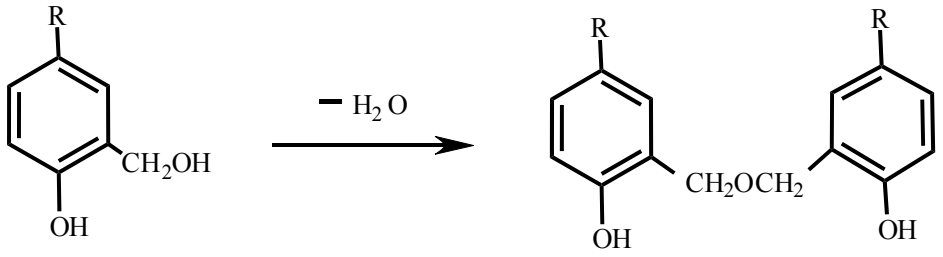
Fenol-formaldehit'in bazkatalizli reaksiyonunda ilk basamak bir karbon nükleofili olarak rol oynayan fenoksit iyonunu oluşturmaktır. Bu nükleofil formaldehitin karbonil karbonu ile kolaylıkla reaksiyona girer.



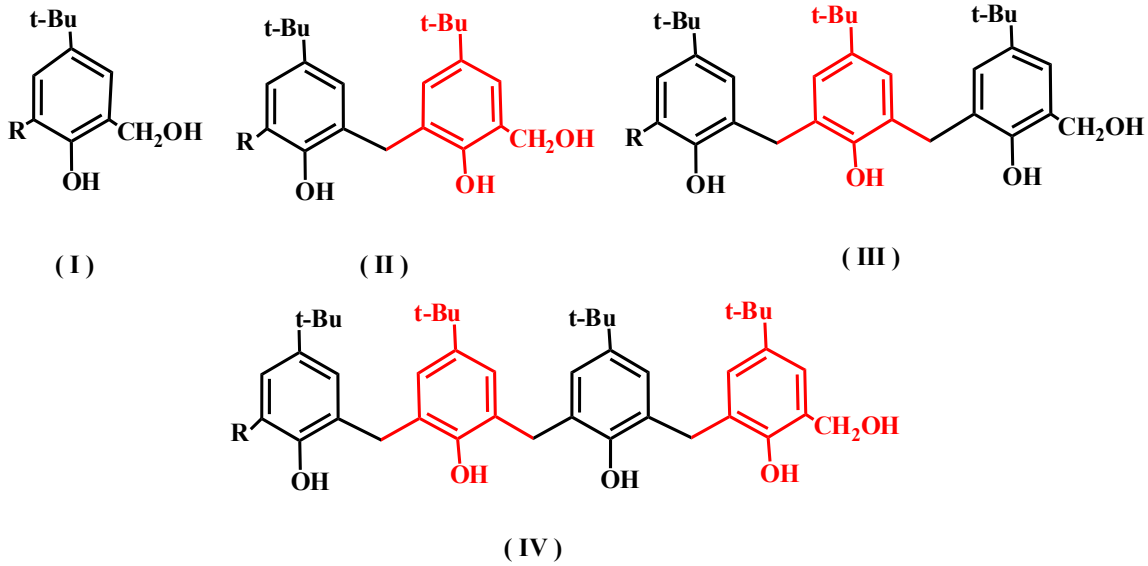
Uygun koşullar altında reaksiyon bu basamakta durdurulur ya da hidroksimetil fenoller izole edilip karakterize edilebilir (Gutsche 1989). Biraz daha iyi şartlarda ise reaksiyon, muhtemelen Michael prosesindeki gibi fenolat iyonları ile o-kinonmetit ara ürünlerinin reaksiyona girmesi sonucu diarilmetil bileşiklerinin oluşması şeklinde ilerler;



Bütün oligomerlerin oluşumunda o-kinonmetitlerin ara ürün olarak ortaya çıkacağı uzun zaman öncesinde vurgulanmıştı (Gutsche, 1989). Hidroksimetil fenollerin diğer bir reaksiyonu da diarilmetanların yerine, dibenzil eterlerin dehidratasyonla oluşum reaksiyonudur.



Bundan dolayı meydana gelen kaliksarenler karışımı oligomerizasyonun farklı aşamalarında oluşan difenil metan türü ve dibenzil eter türü bileşikleri içermektedir. Aşağıda gösterilen I-IV bileşiklerin (R=H ve CH_2OH) hepsi, bir dizi özel şartlar altında tamamen benzer ürün karışımlarını verir (Dhawan, 1987) (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Ön ürünün (precursor) bileşimleri

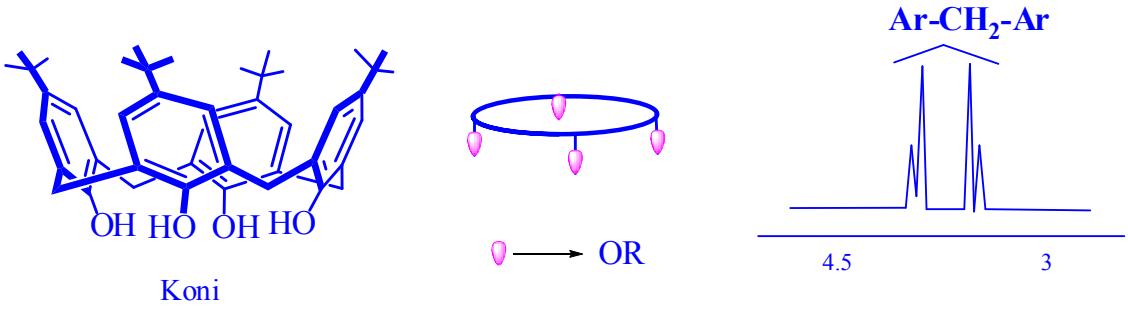
1.1.6. Kaliksarenlerin Konformasyonları

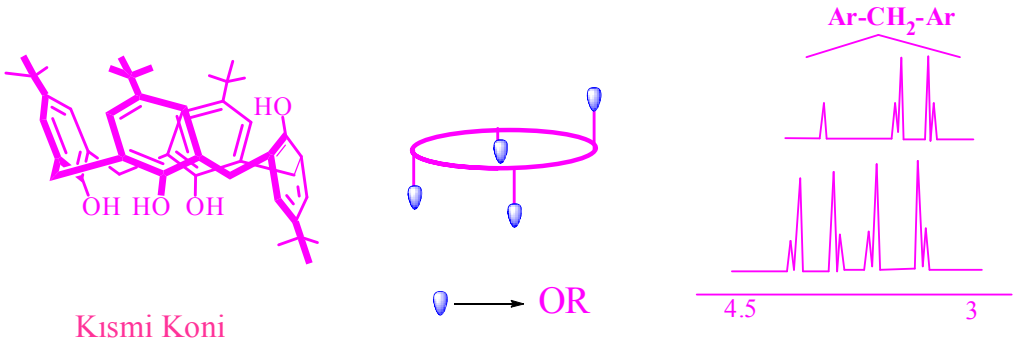
Sübstitüe olmamış kaliksarenlerde çözücü, kullanılan baz ve ortamın sıcaklığına bağlı olarak konformasyon değişikliği meydana gelmektedir. Bu konformasyon değişikliğinde fenolik birimler iki farklı şekilde dönme hareketi yaparlar. Bu hareketlerden birisi fenolik birimlerin oksijenli kısmının, diğeri ise *p*-substitüentli kısmının halkaya doğru yönlenmeleridir.

Kaliks[4]arenler, yapısında bulunan aril halkalarının "yukarı" ve "aşağı" doğru yönlenmeleri sonucu dört farklı konformasyonlarda bulunurlar. Bunlar "koni", "kısmi koni" , "1-2 karşılıklı" ve "1-3 karşılıklı" olarak isimlendirilirler. Bir kaliks[4]arenin hangi konformasyonda olduğu bu bileşiğin köprü Ar-CH_2–Ar protonlarının ^{1}H NMR spektrumlarından tespit edilebilir (Çizelge 1.1).

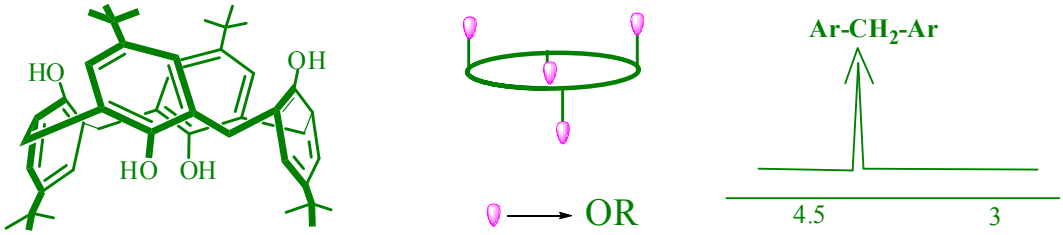
Çizelge 1.1. Kaliks[4]aren' in Ar-CH_2-Ar protanlarının ^{1}H NMR spektrumları

Konformasyon	Ar-CH_2-Ar protonları
Koni	Bir çift dublet
Kısmi Koni	İki çift dublet (1:1) veya bir çift dublet ve bir singlet (1:1)
1,2-Karşılıklı	Bir singlet ve iki dublet (1:1)
1,3-Karşılıklı	Bir singlet

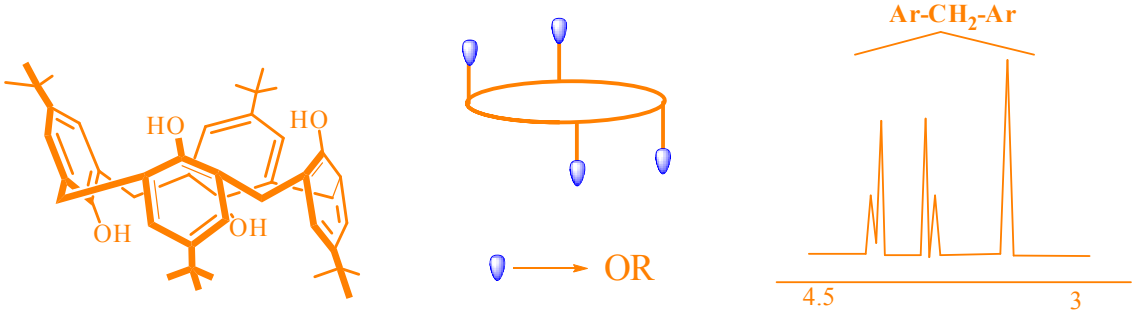




Kısmi Koni



1,3 Karşılıklı



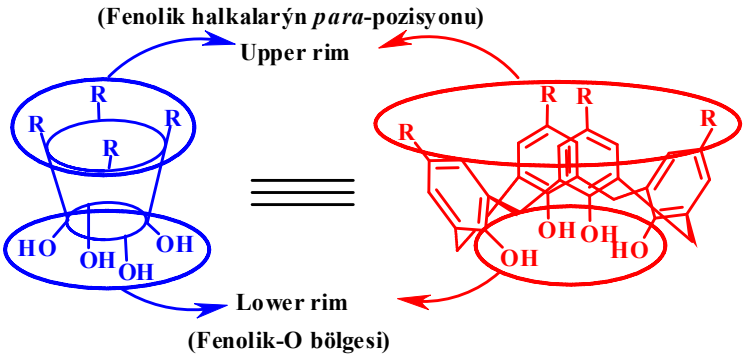
1,2 Karşılıklı

1.1.7. Kaliksarenlerin Fonksiyonlandırılması

Kaliksarenleri, bu kadar önemli hale getiren diğer bir etken de halkalı yapıdaki taç eterlere ve siklodektrinlere göre sentezlerde kolaylıkla modifikasyona uğratılabilmesidir.

Kaliksarenlerin birçok organik çözücüdeki çözünürlüğü azdır. Bu yüzden istenilen amaca yönelik kaliksarenler elde etmek için, kaliksarenler fenil halkasının para konumundan (upper rim) veya fenolik oksijen (lower rim) üzerinden

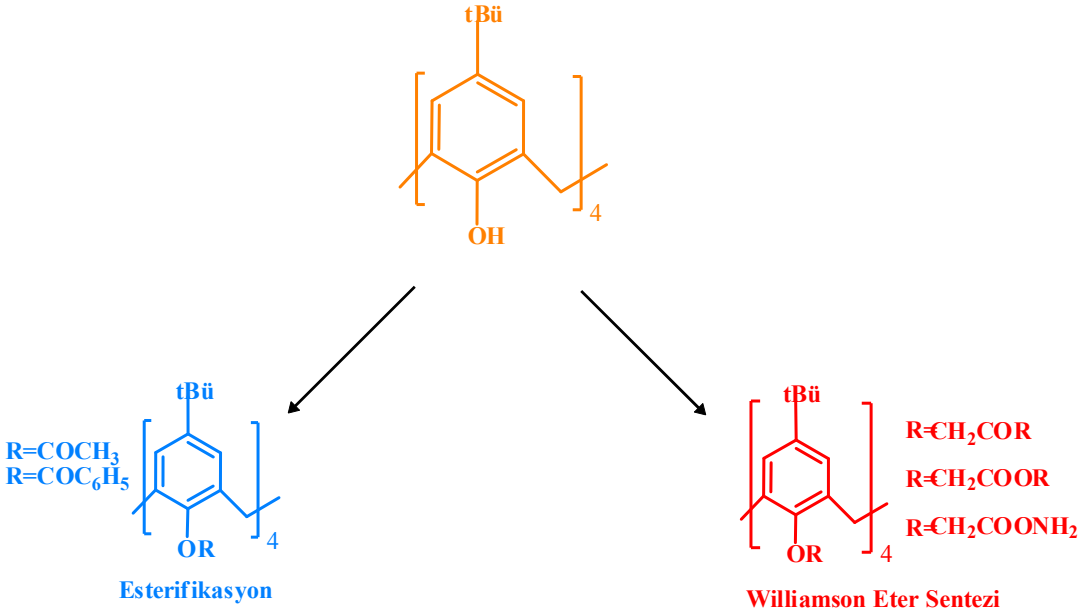
fonksiyonlandırılırlar (Şekil 1.6). Böylece hem çözünürlükleri hem de uygulama alanları artar.



Şekil 1.6. Kaliks[4]arenin *p*-konumunun ve fenolik O- bölgesinin şematik gösterimi

1.1.7.1. Kaliksarenlerin fenolik-OH üzerinden fonksiyonlandırılması

Kaliksarenlerin fenolik OH gruplarının (lower rim) fonksiyonlandırılması ester, keton, eter, fosfin, imin, oksim gruplarının bağlanması ile yapılmaktadır (Yilmaz, 1999; Ting, 1990; Cameron, 1995). Oluşan bileşiklerin daima çıkış maddelerine göre, düşük erime noktalı ve daha fazla çözünür olması bunların üzerinde çok çalışılmasına sebep olmuştur. Ayrıca hareketli bir konformasyonları olan kaliksarenler bu grupların bağlanması ile kolaylıkla rijit (hareketsiz) yapılar oluşturulabilir (Şekil 1.7).



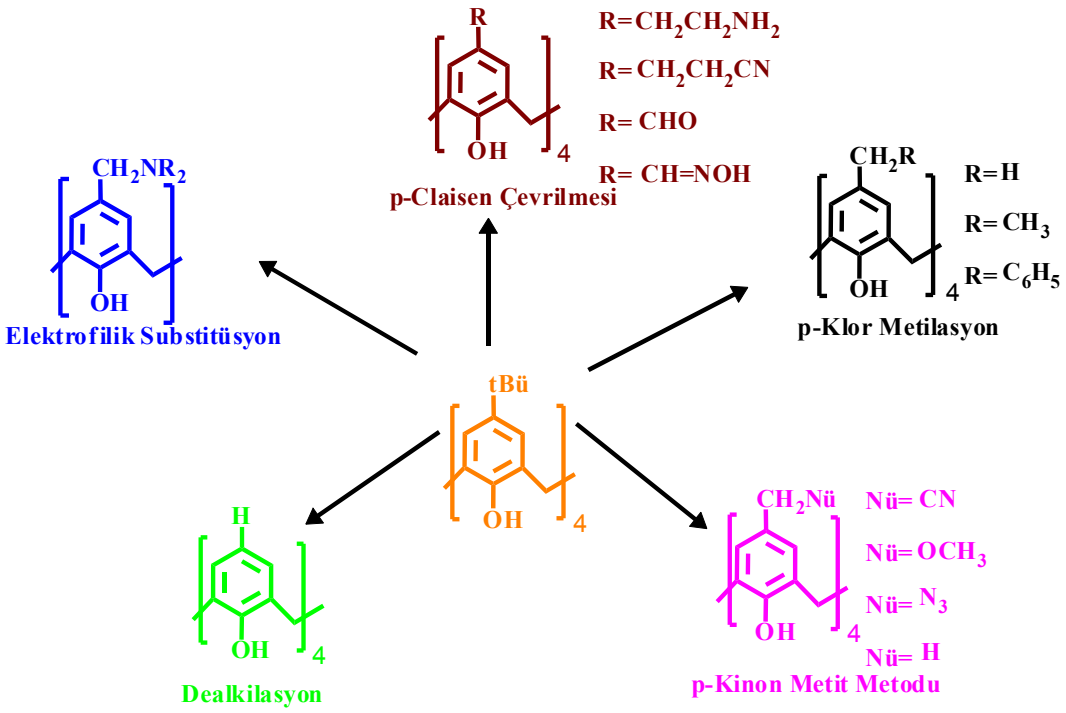
Şekil 1.7. Kaliksarenlerin fenolik –OH den fonksiyonlandırılması

1.1.7.2.Kaliksarenlerin *para*-pozisyonlarından fonksiyonlandırılması

Kaliksarene bağlı *ter*-bütil gruplarının toluen/$AlCl_3$ ortamında kolayca giderilmesi (dealkilasyonu), kaliksarenlerin fenolik grupların *p*-pozisyonuna birçok fonksiyonel grubun bağlanmasına da olanak sağlar. Kaliksarenlerin *p*-pozisyonu üzerinden modifiye çalışmalarının çoğu bromlama, iyotlama, nitrolama, sülfolama, klor sülfolama, klormetilleme, açilleme, diazolama ve formülasyon gibi elektrofilik "*kinon-metit*" tipi yer değiştirme reaksiyonlarıdır (Erdemir, 2006).

Kaliks[4]arenin alil eterlerinin *p*-Claisen çevrilmesi metodu ise, fenolik grupların *p*-pozisyonuna fonksiyonel grupların transferinin gerçekleştiği bir başka metottur (Gutsche 1985).

Kaliksarenin belirli pozisyonları için kontrollü yer değiştirme yapmak mümkündür. Nitrolama, formilasyon, iyotlama ve aminometilleme gibi kısmi yer değiştirme reaksiyonları gerçekleştirilmiştir. Ayrıca *o*-alkilli, *o*-açilli kaliksarenlerin *ter*-bütil grupları seçimli olarak giderilmiş ve daha sonrada para pozisyonlarından seçimli olarak modifiye edilebilmiştir (See, 1991; Kanamathareddy, 1995; Sharma, 1996). Ayrıca fenolik grupların *p*-pozisyonunda (upper rim) iki veya daha fazla fonksiyonel grup bulunduran kaliksarenlerin sentezi için birtakım metotlar geliştirilmiştir (Gutsche, 1989; Böhmer, 1995; Erdemir, 2006) (Şekil 1.8).



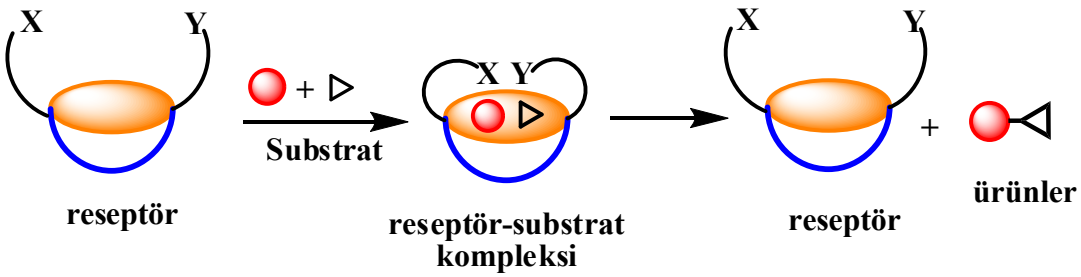
Şekil 1.8. Kaliksarenlerin para-pozisyonlarından fonksiyonlandırılması

1.1.8. Kaliksarenlerin Kullanım Alanları

- ✓ Enzim-mimik olarak kaliksarenler
- ✓ Molekül ve iyon taşıyıcı kaliksarenler
- ✓ Kromotografik uygulamalarda kaliksarenler
- ✓ Membran ve sensör teknikleri
- ✓ Katalizör çalışmalarında kaliksarenler

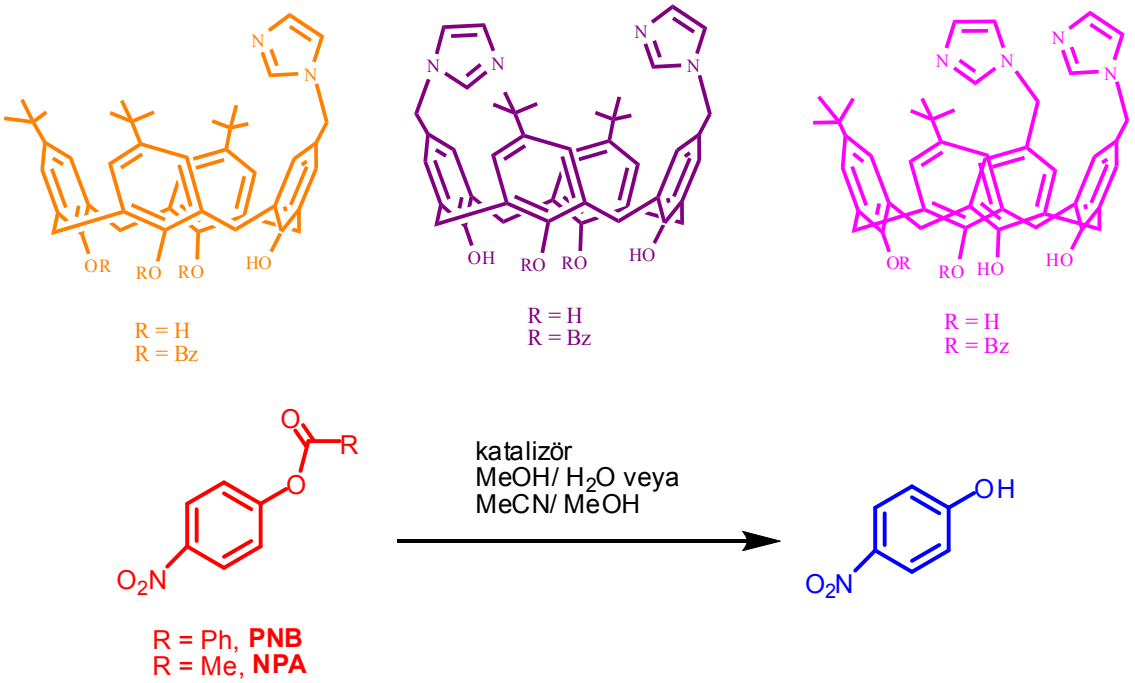
a. Enzim-mimik olarak kaliksarenler

Enzim mimik yapısının temel amacı, enzimin aktif bölgesini kaliksaren bazlı sentetik bir model yapmaktır. Bu durumda enzim, diğer fonksiyonel gruplarla beraber bağlanan substratlar için bir boşluk içerecektir. Böylece substratlarda etkileşim, katalitik olarak substratların ürünlere dönüşmesini sağlayacaktır (Breslow, 1995) (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Fonksiyonlaştırılmış kaliksarenler üzerinde enzim modellerinin şematik gösterimi

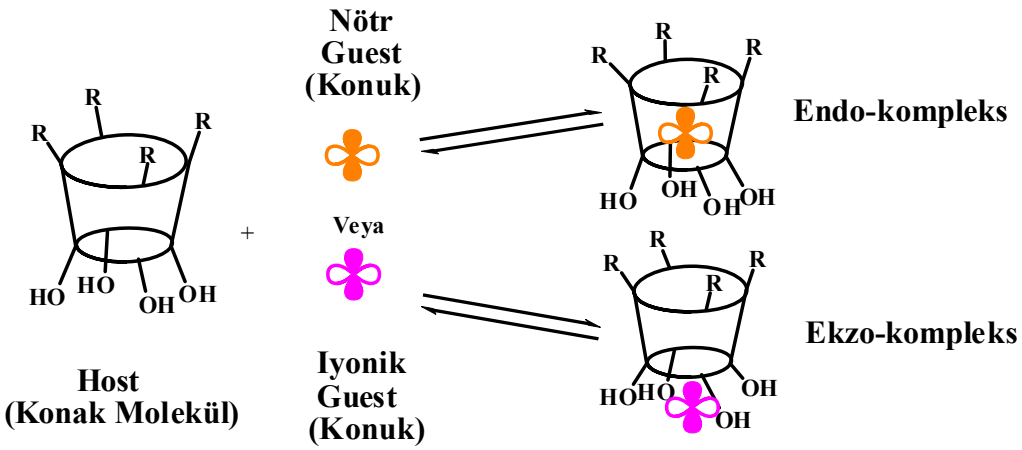
Dospil ve Schatz (2001), *p*-konumundaki farklı pozisyonlarda imidazol grupları taşıyan kaliks[4]arenler sentezlemişlerdir. Bunların tampon çözeltilerde *p*-nitrofenil esterlerden *p*-nitrofenolü açığa çıkaran enzim gibi davrandıkları görülmüştür (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. *p*-Konumunda farklı şekillerde imidazol grubu taşıyan kaliks[4]arenler

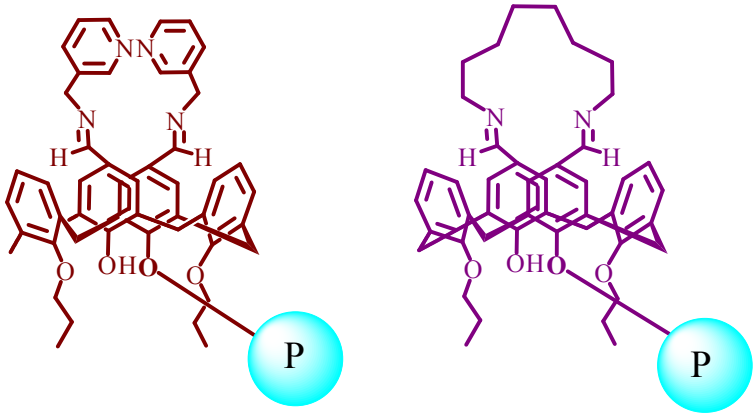
b. Molekül / İyon Taşıyıcı Kaliksarenler

Kaliksarenler yapısında bulunan halka boşluğundan dolayı farklı yapıdaki birçok molekül veya iyonlarda kompleks yapma özelliğine sahiptir. Bu yüzden kaliksarenler molekül ve iyon taşıyıcı olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bu bileşiklerin kompleksleri endo- ve ekzo- kompleks şeklindedir (Şekil 1.11).



Şekil 1.11. Fonksiyonlaştırılmış kaliksarenler üzerinde enzim modellerinin şematik gösterimi

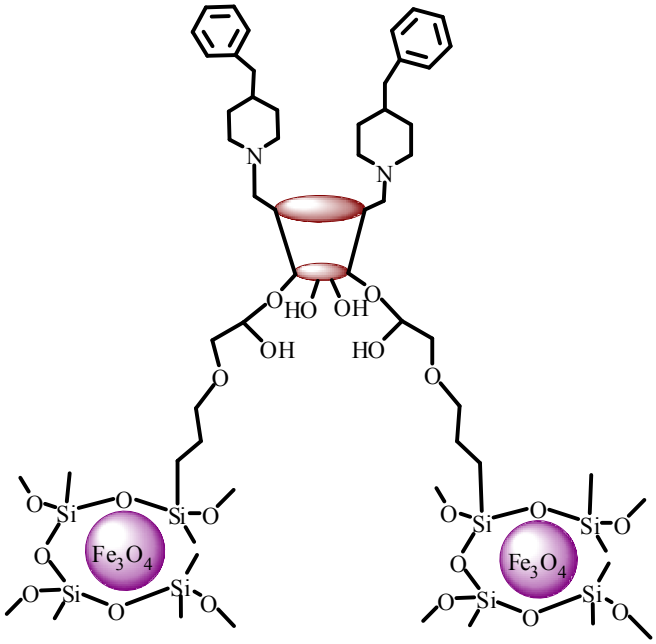
Karaküçük ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada farklı yapıda kaliks[4]aren Schiff-bazı türevlerini sentezlemişlerdir. Daha sonra bu bileşikleri Merrifield reçinesine bağlayarak polimer destekli kaliks[4]aren türevlerine dönüştürmüşler ve bazı geçiş metal iyonları ve dikromat anyonu ekstraksiyon çalışmalarında kullanmışlardır (Şekil 1.12).



P = Merrifield Reçinesi

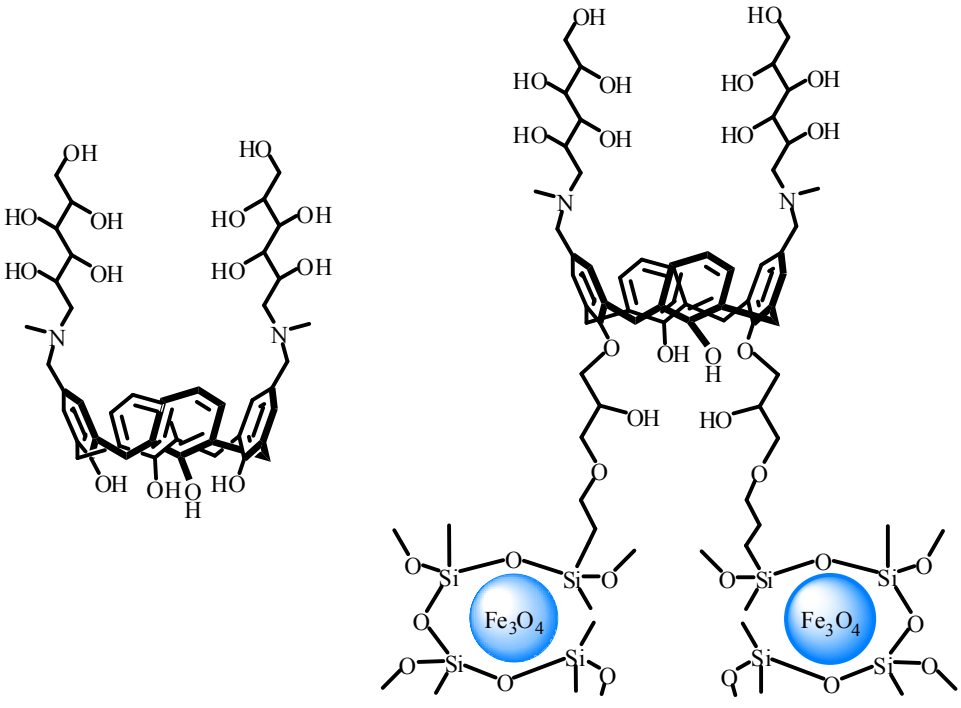
Şekil 1.12. Polimer destekli kaliks[4]aren Schiff-baz türevleri

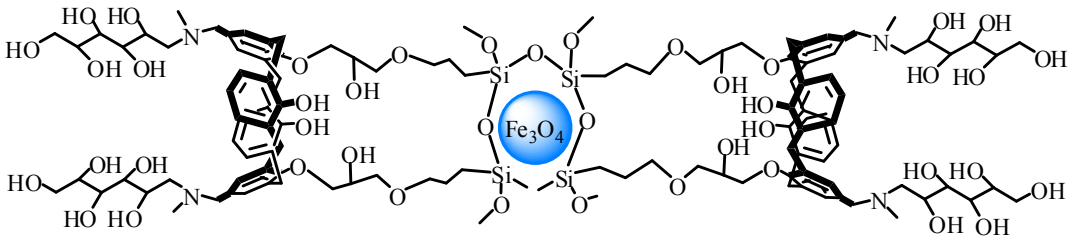
Sayin ve ark. (2010), kaliks[4]aren ve 4-benzil piperdini mannich reaksiyonuyla etkileştirmişler ve elde ettikleri kaliks[4]aren türevini Fe_3O_4 manyetik nanoparçacıklarına immobilize etmişlerdir. Oluşan kaliks[4]aren türevli bu manyetik nanoparçacıkları arsenat ve dikromat anyonlarının sulu çözeltilerden uzaklaştırılmasında kullanmışlardır (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. Mannich tepkimesiyle oluşturulan kaliks[4]arenin manyetik parçacığa immobilizasyonu

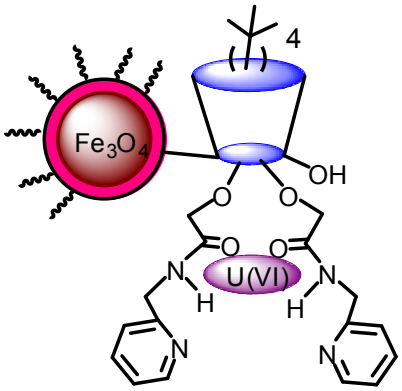
Sayin ve ark. (2010), kaliks[4]arenin N-metil glukamin türevini sentezlemiş ve daha sonra bu bileşiği APTMS ile modifiye edilmiş olan Fe_3O_4 manyetik nanoparçacıklarına immobilize etmişlerdir. Katı-sıvı ekstraksiyon deneyleri sonucunda, arsenat ve dikromat iyonlarının sulu çözeltilerden uzaklaştırılmasında kaliks[4]aren bazlı manyetik nanoparçacıkları kullanmışlardır (Şekil 1.14).





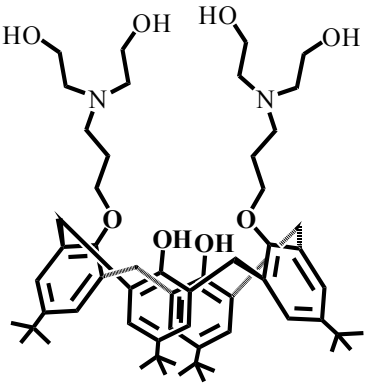
Şekil 1.14. Manyetik özellik gösteren kaliks[4]aren nanoparçacıkları

Sayin ve Yilmaz (2011), yaptıkları çalışmada *p-ter*-bütilkaliks[4]arenin diamit türevlerini sentezledikten sonra Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerine immobilize etmişlerdir. Daha sonra bu materyalin ve *p-ter*-bütilkaliks[4]arenin diamit türevlerinin, sıvı-sıvı ekstraksiyon ve katı-sıvı ekstraksiyon ile uranil katyonlarını sulu çözeltilerden uzaklaştırmasını incelemişlerdir. Uranil iyonlarını uzaklaştırmada manyetik nanopartiküllerin kaliks[4]aren türevlerinden daha iyi olduğunu gözlemlemişlerdir (Şekil 1.15).



Şekil 1.15. Uranil (VI) ekstraksiyonunda kullanılan manyetik nanopartiküle bağlı kaliks[4]aren bileşiği

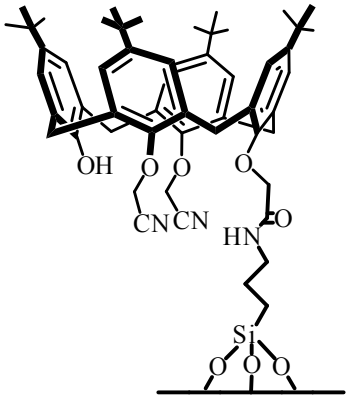
Afzal ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada kaliks[4]arenin amin türevini sentezlenmişlerdir. Bu amin gruplu kaliksarenler kanserojen azo boyaların sulu çözeltilerden uzaklaştırmasında kullanılmıştır (Şekil 1.16).



Şekil 1.16. Azo boyaların uzaklaştırmasında kullanılan amin türevli kaliks[4]aren

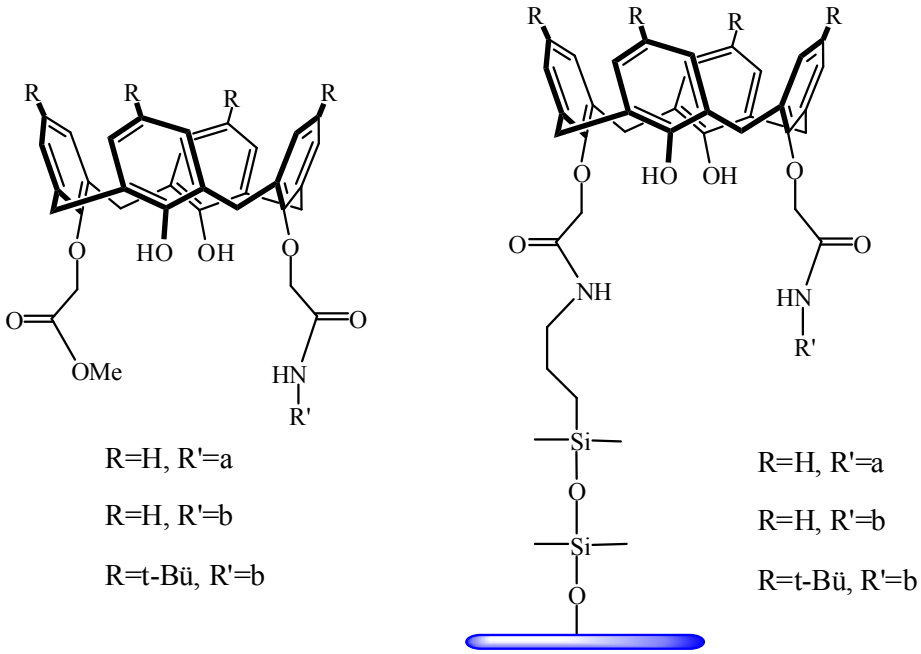
c. Sabit faz olarak kaliksarenlerin kromotografide kullanılması

Tabakci ve Yilmaz (2008), bu çalışmada aminopropil silika jel immobilize edilmiş kaliks[4]aren polimerleri sentezlemişdir. Cu^{+2}, nin sulu çözeltilerden uzaklaştırılmasını, sıcaklık ve pH parametrelerini incelemişler ve maksimum Cu^{+2} giderilmesinin pH 6 ve 25^{o}C'de gerçekleştiğini belirtmişlerdir (Şekil 1.17).



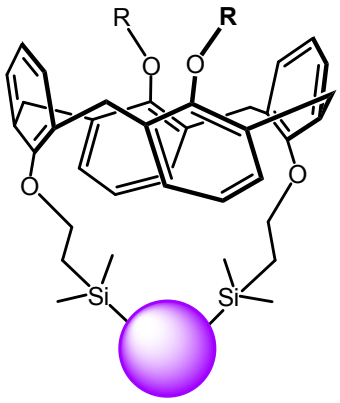
Şekil 1.17. Cu^{+2} için kullanılan kaliks[4]aren bazlı sabit faz

Bozkurt ve ark. (2008), kaliks[4]arenlerin mono amit türevlerini 3-aminopropil trietoksisilanla (APTES) etkileştirmiş, daha sonra silika jelle aktifleştirmişler ve üç yeni kaliks[4]aren polimeri hazırlamışlardır. Katı-sıvı ekstraksiyon metoduyla dikromat ($HCr_2O_7^-$ / $Cr_2O_7^{-2}$) anyonlarının sulu çözeltilerden giderilmesinde kullanmışlardır. Yapılan çalışmada, kaliks[4]aren bazlı polimerlerin dikromat anyonlarını taşımada kaliks[4]aren monomerlerinden daha iyi olduğunu belirtmişlerdir (Şekil 1.18).

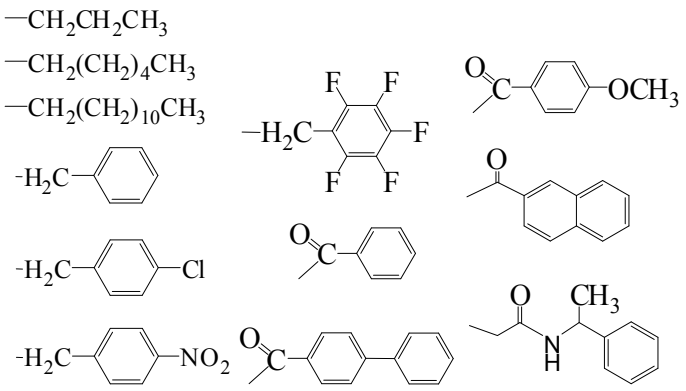


Şekil 1.18. Dikromat anyonlarının ekstraksiyonu için kullanılan kaliks[4]aren bazlı sabit faz

Sliwka-Kaszynska ve ark. (2010), 1,3-alternatif konformasyonunda on iki farklı kaliks[4]aren bileşiği sentezleyerek bunları sabit faz olarak kullanmak üzere silikaya bağlamışlardır. Kaliksaren bazlı sabit fazların temel kromotografik özelliklerini değerlendirmek için ticari olarak mevcut sabit fazları değerlendirmede kullanılan yaygın test tekniklerini uygulamışlardır. Caltrex ve LiChrosorb C-18 kolonları ile yeni kaliksaren fazlarını karşılaştırmışlardır (Şekil 1.19).

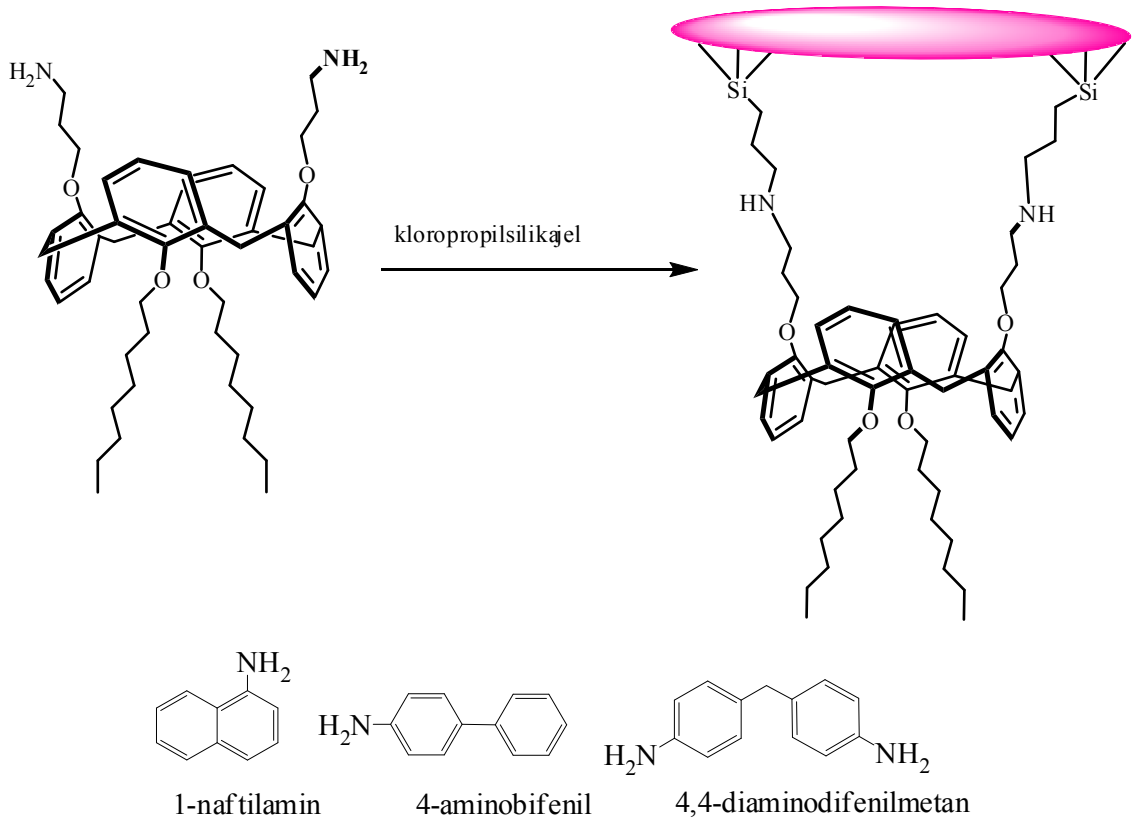


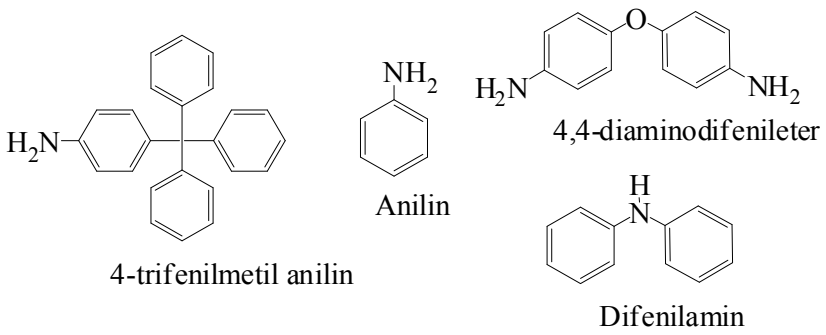
R sübstitüentleri



Şekil 1.19. Sabit faz olarak kullanılan silika bağlı kaliks[4]aren türevleri

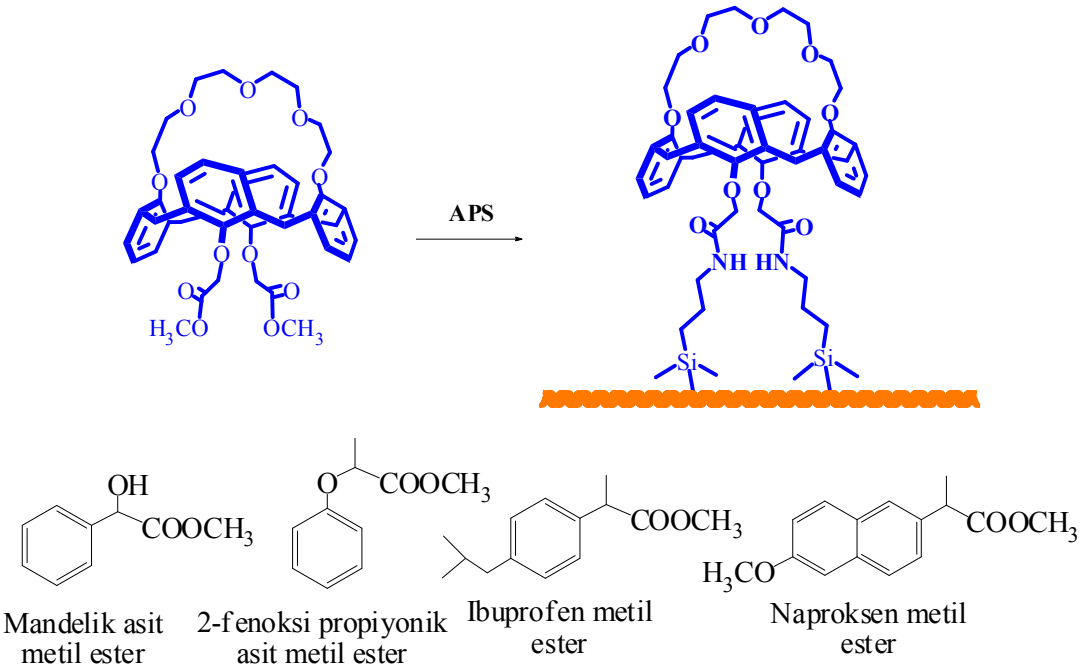
Erdemir ve Yilmaz (2010), sentezlediği 1,3-konformasyonuna sahip kaliks[4]aren türevini kloropropilsilikajele (CPS) immobilize ederek kolon dolgu maddesi olarak kullanmışlardır. HPLC de bu kolanla bazı aromatik hidrokarbonlar, fenolik bileşikler, aromatik aminler ve bazı ilaç karışımlarını ayırmada kullanmışlardır (Şekil 1.20).





Şekil 1.20. Aminleri ayırmada kloropropilsilikajele immobilize edilmiş kaliks[4]aren türevinin kolon dolgu maddesi olarak kullanılması

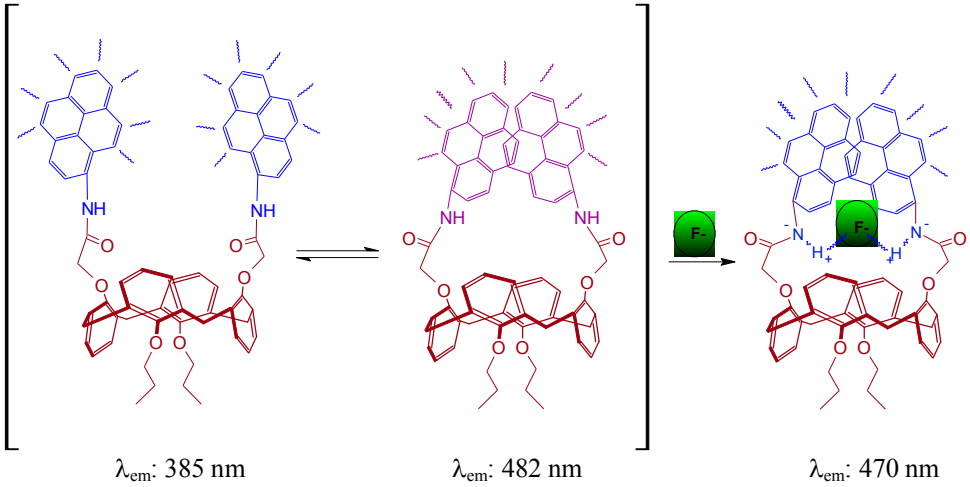
Erdemir ve Yilmaz (2011), kaliks[4]crown-5 makrosiklik bileşiği bağlı silika sabit fazını hazırlamışlardır. Daha sonra aromatik aminler, fenoller ve ilaçların ayrımı için kromotografik bir yöntem geliştirmede kullanmışlardır. Bunun sonucunda bazı aromatik aminler, fenoller ve ilaçların hazırlanan kaliksaren bazlı sabit faz ile başarılı bir şekilde ayrıldığını tespit etmişlerdir (Şekil 1.21).



Şekil 1.21. İlaçları ayırmadakullanılan kaliks[4]crown-5 bileşiği bağlanmış silika sabit fazı

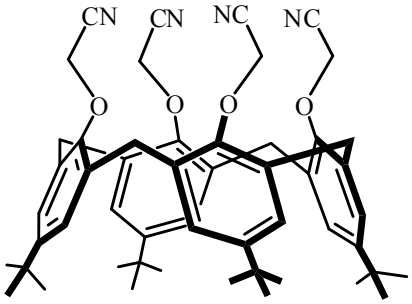
d. Kaliksarenlerin sensör (iyon seçici elektrot, ISE) ve membran tekniklerinde kullanılması

Kim ve ark. (2005), 1,3-konformasyonunda florojenik piren halkası taşıyan kalik[4]aren bazlı floresans kemosensör sentezlemişlerdir. Sentezlenen piren grubu taşıyan kaliks[4]arenin 346 nm'de güçlü bir absorpsiyon verdiğini gözlemişlerdir. Bu bileşiğin anyonlar ile etkileştirildiğinde sadece F^- iyonunun kırmızıya kaymaya neden olduğunu gözlemlemişlerdir (Şekil 1.22).



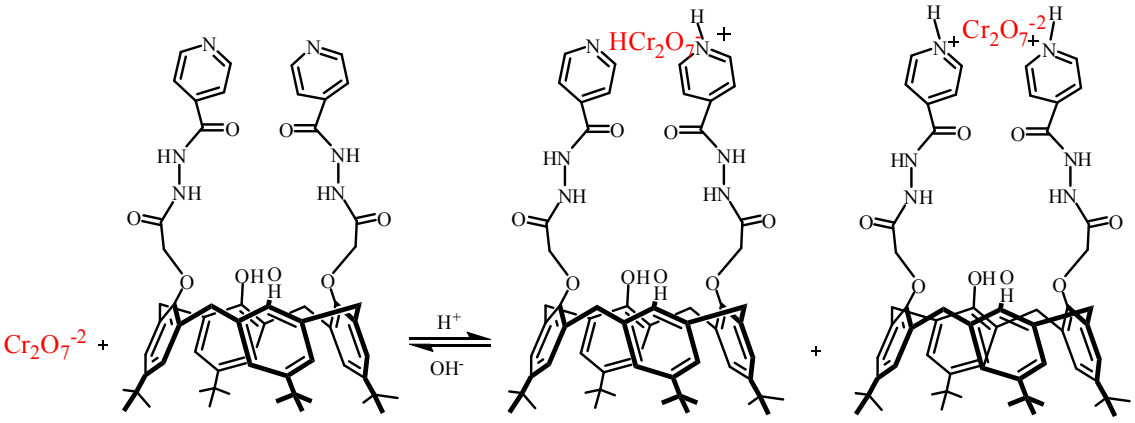
Şekil 1.22. F^- anyonu için floresans kemosensör kaliks[4]aren bileşiği

Erden ve ark. (2006), *p-ter*-bütil-tetrasiyanometoksi kaliks[4]aren ile hidrojen iyonuna seçimli elektrot hazırlamışlar ve bunu asidik ortamda tiyosiyanata karşı hassasiyet göstermesi sebebiyle tiyosiyanat ile yürütülen titrasyonlarda indikatör elektrot olarak kullanmışlardır (Şekil 1.23).



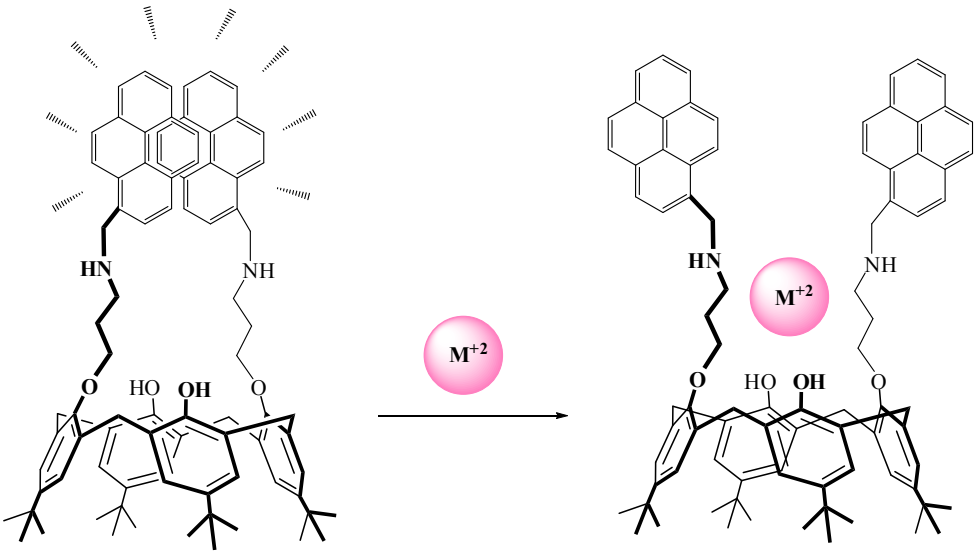
Şekil 1.23. Tiyosiyanat iyonu için iyonofor özellikteki kaliks[4]aren bileşiği

Ertürün ve ark. (2007), iyon seçici elektrot olarak kaliks[4]aren bazlı PVC membran elektrot hazırlamışlardır. Kalilk[4]aren türevi bileşiğin dikromat anyonuna karşı seçimli bir elektrot hazırlamada çok uygun bir iç dolgu maddesi olduğunu tespit etmişlerdir. Bu dikromat-ISE'i, $K_2Cr_2O_7$ ile potansiyometrik titrasyonlarında indikatör elektrot olarak başarılı bir şekilde kullanmışlardır (Şekil 1.24).



Şekil 1.24. Dikromat iyonuna seçimli kaliks[4]aren bileşiği

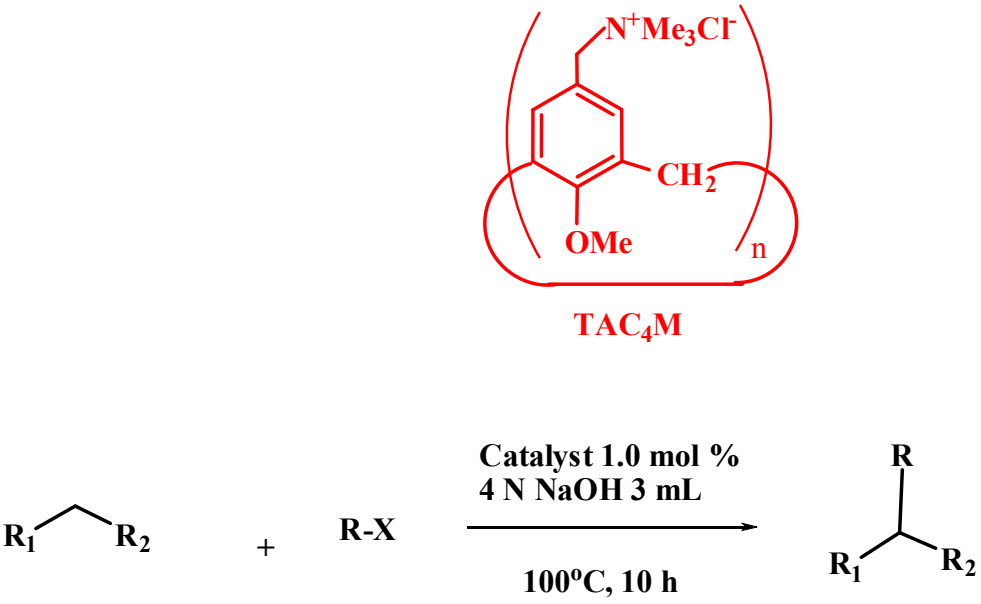
Sahin ve Yilmaz (2011), fenolik-O'nin 1,3 pozisyonunda piren grubu taşıyan florojenik *p-ter*-bütilkaliks[4]aren bileşiğini sentezlemişlerdir. Kaliks[4]arenin piren amin türevlerinin, sırasıyla Pb^{+2} ve Cu^{+2} iyonları için seçimli bir sensör olarak rol oynadığını bulmuşlardır (Şekil 1.25).



Şekil 1.25. Pb^{+2} ve Cu^{+2} iyonu için sensör özellikteki kaliks[4]aren bileşiği

e. Katalizör çalışmalarında kaliksarenlerin kullanılması

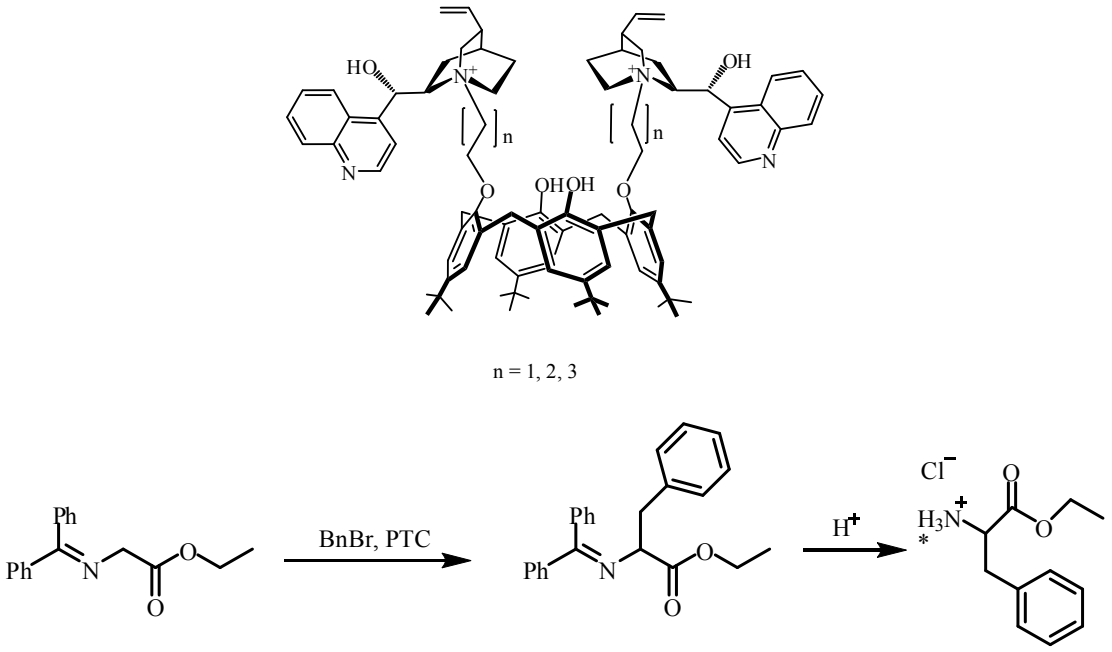
Shimizu ve ark. (2001), fenolik birimlerin *p*-pozisyonunda trimetilamonyummetil grubu taşıyan, suda çözünen kaliks[n]areni ve monomerini sentezlemişler ve bu bileşikleri faz-transfer katalizörü olarak farklı reaksiyonlarda kullanmışlardır. Fenilaseton'u farklı alkil halojenürlerle alkilleme reaksiyonunda katalizör kullanmadan reaksiyonun yavaş gerçekleşdiği gözlemlemişlerdir. Katalizör olarak *β*-siklodekstrin kullanıldığında verimin %14, trimetilamonyummetil grubu taşıyan kaliks[4]aren kullanıldığında ise verimin % 85-95'e kadar çıktığı anlaşılmıştır (Şekil 1.26).



R_1= C_6H_5, CH_3CO, C_6H_5CO, 2-ClC_6H_4, 1-$C_{10}H_7$
R_2= CH_3CO, CN,
R= C_8H_{17}, 4-*t*-but$C_6H_4CH_2$, $Cl(CH_2)_4$, 1-$C_{10}H_7CH_2$
X= Br

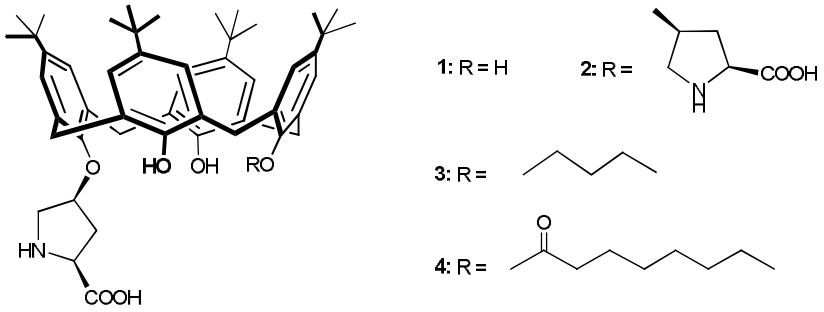
Şekil 1.26. Kaliks[n]aren, monomeri ve katalizör olarak kullanılması

Bozkurt ve ark. (2008), cinchona alkaloitlerden türetilen kaliksaren bazlı kiral faz-transfer katalizörü sentezlemişlerdir. Bu kiral kaliks(4)aren'in katalitik özelliğini, N-(difenilmetilen)glisin etil ester ile benzil bromür arasındaki alkilasyon reaksiyonunu kullanarak değerlendirmişlerdir. Ayrıca reaksiyonun verimine ve enantiyoseçimliliğine etki eden diğer faktörleri de incelemişlerdir (Şekil 1.27).



Şekil 1.27. Kaliksaren bazlı kiral faz-transfer katalizörü

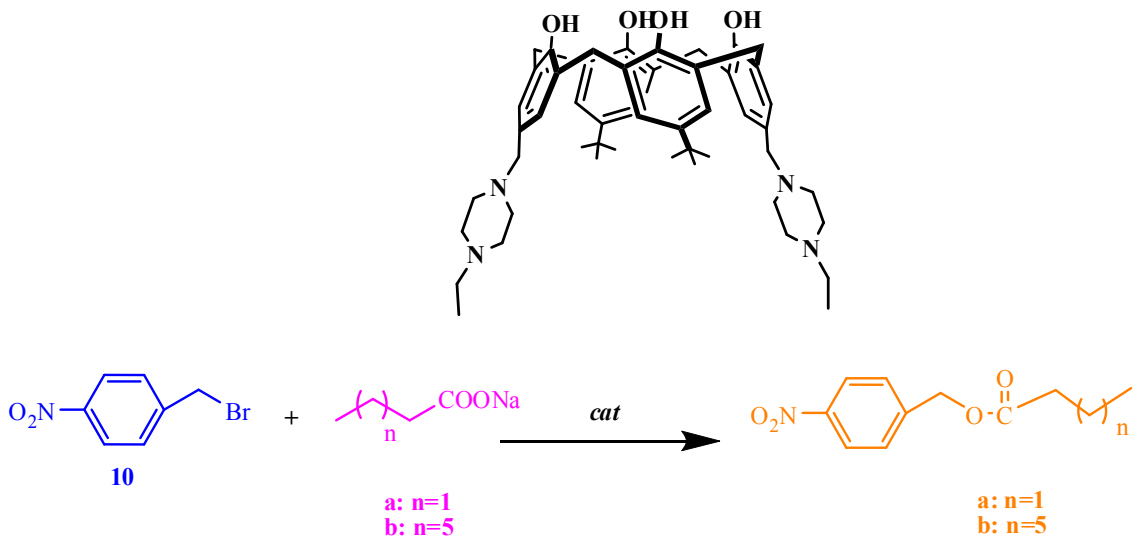
Li ve ark. (2009), sulu ortamdaki aldol reaksiyonlarını katalizlemek için pirolinle türevlendirilmiş kaliks[4]aren bazlı bir seri organokatalizör geliştirmişlerdir. Optimum koşullar altında yaptıkları çalışmada % 99'a kadar yüksek bir verim, % 99'a kadar iyi bir enantiyoseçimlilik, 90:10'a kadar diastereoseçimlilik elde etmişlerdir (Şekil 1.28).



Şekil 1.28. Aldol reaksiyonunda kullanılan pirolin türevi kaliks[4]aren bazlı organokatalizörler ve elde edilen bileşikler

Akceylan ve Yilmaz (2011), yaptıkları çalışmada faz transfer katalizörü olarak kullanmak için kaliks[4]arenin N-etilpiperazin, diallilamin ve 4-benzilpiperidin

türevlerini sentezlemişlerdir. Kaliksar[4]arenin N-etilpiperazin türevinin katalizör olarak kullanıldığı esterleşme reaksiyonunda en iyi verim elde edilmiştir (Şekil 1.29).



Şekil 1.29. Esterleşme reaksiyonunda kaliks(4)arenin katalizör olarak kullanılması

1.2. Siklodekstrin

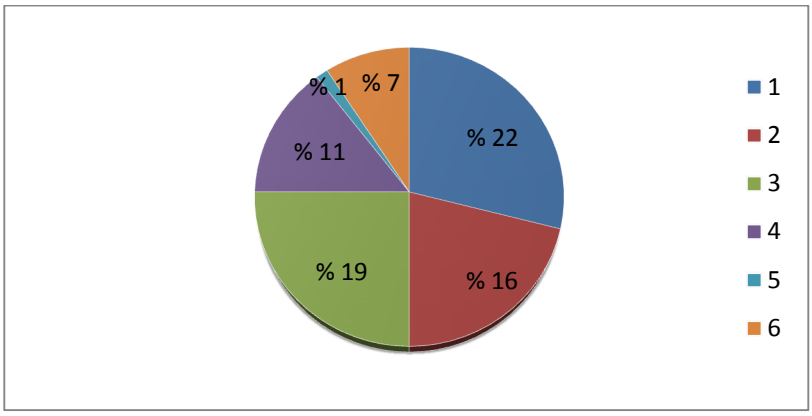
1.2.1. Siklodekstrinlerin Tarihçesi

1891 yılında siklodekstrinler (CD) Villiers tarafından selülozin adıyla araştırılmıştır. 1903 yılında Schardinger, nişasta bulunduran bir gıda maddesinin bozulmasına sebep olan mikroorganizmalar üzerine araştırma yaparken, selüloza benzeyen bu maddeyi izole ederek ”cellulosine” adını vermiştir. 1911 yılında ise Schardinger, Bacillus Macerans adındaki basili izole ederek nişastadan daha çok miktarda kristal şeker ürettiğini açıklamış ve bu madde Schardinger şekerleri olarak isimlendirilmiştir (Szejtli, 1989). Almanya’dan Pringsheim 1911-1935 yılları arasında, bu alanda önemli araştırmalar yapmış ve izole edilen bu şekerlerin çok farklı molekül ile kararlı sulu çözeltiler oluşturabileceğini söylemiştir (Arslan, 2012).

Siklodekstrinin yapısı tam olarak bilinmediğinden 1942 yılında Freudenburg ve Cramer X-ray kristolografisini kullanarak α- ve β-CD’lerin yapısını bulmuş ve γ-siklodekstrini keşfetmişlerdir. French ve Cramer 1950’lerde, çalışma arkadaşlarıyla

birlikte, siklodekstrinleri saf bileşenlerine ayırmışlar ve bileşenlerin kimyasal ve fiziksel özelliklerini aydınlatmışlardır (Arslan, 2012).

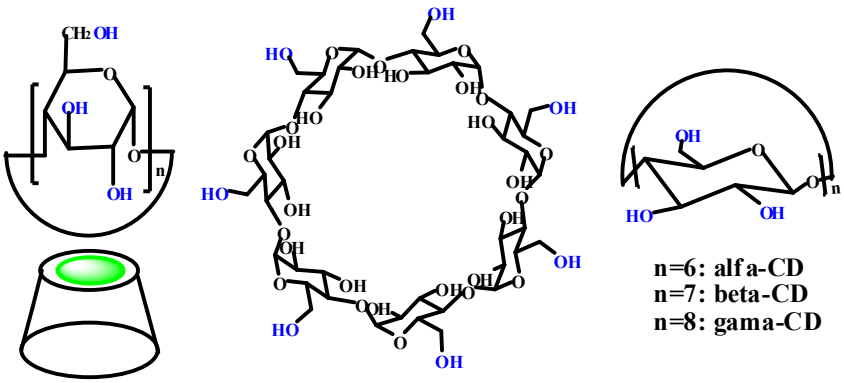
Siklodekstrinler toksik değillerdir, maliyetleri düşük, kompleks oluşturma kapasiteleri yüksek, bazı spesifik uygulamalar için çok uygun bileşiklerdir. Yüksek saflıkta elde edilebilirler, farmakolojik reaksiyonlarda inerttirler. Biyolojik olarak kolay parçalanırlar, kullanılan cihazlarda da kirlilik yaratmazlar (Yılmaz, 2010).



Şekil 1.30. 1. CD komplekslerinin kimyası, 2. CD ve türevlerinin enzimoloji, biyolojik etkileri ve üretimi, 3. Analitik kimya, 4. Kimyasal ve biyokimyasal işlem ve ürünlerde kullanımı, 5. Pestisid, 6. Gıda ve kozmetikte kullanımı, 7. Farmasötik alanda kullanımı

1.2.2. Siklodekstrinlerin Yapı ve Özellikleri

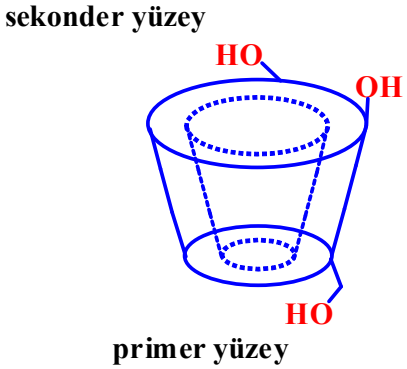
Nişastanın glikoziltransferaz enzimi katalizliğinde (CGT) parçalanıp halkalı molekül oluşturması ile siklodekstrinler ortaya çıkmıştır (Şekil 1.31). Gerçekleşen bu enzimatik reaksiyon sonucu birbirlerine α-1,4 bağları ile bağlanmış halkalı yapılar meydana gelmekte ve molekül içi bir reaksiyon olmasından dolayı reaksiyon gerçekleşirken su açığa çıkmaktadır (Arslan, 2012).



Şekil 1.31. Siklodekstrinin yapısı

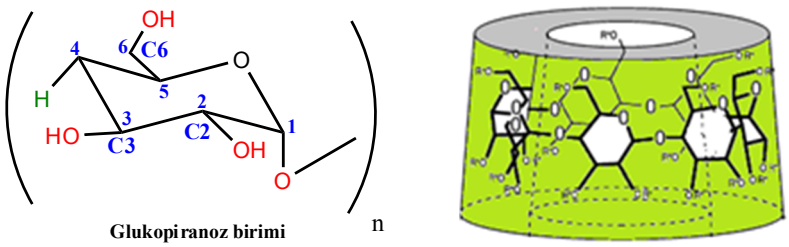
Siklodekstrinler sterik engelden dolayı en az altı glikopiranoz biriminden oluşur. Altı tane glikopiranoz birimi içerenler alfa (α), yedi tane içerenler beta (β), sekiz adet içerenler ise gama (γ) siklodekstrin (CD) olarak isimlendirilmektedir. Teorik olarak sekizden fazla glukopiranoz birimine sahip siklodekstrinler, 10ε- (epsilon), 11ζ- (zeta), 12η- (eta), 13θ- (teta) glikopiranoz birimi içeren CD'ler bulunmaktadır. Fakat düşük kompleks oluşturma ve suda çözünürlüklerinin artması sebebiyle fazla tercih edilmemektedir.

β-CD'nin yapısına göre primer hidroksil grupları koninin dar tarafında (C6 atomlarında), sekonder hidroksil grupları ise halkanın geniş tarafında (C2 ve C3 atomlarında) yer almaktadır (Şekil 1.32).



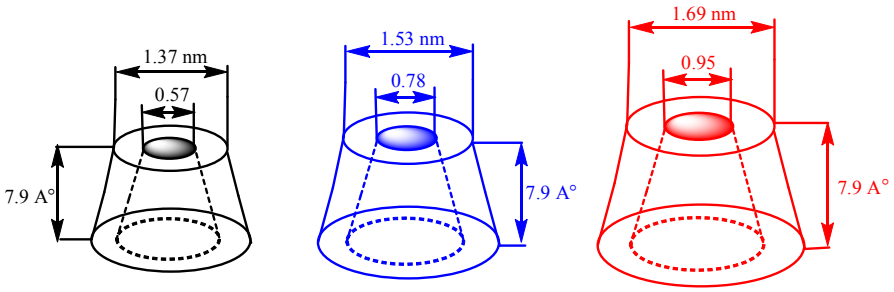
Şekil 1.32. Siklodekstrin molekülünün üç boyutlu yapısı. Sekonder hidroksiller yapının sekonder yüzeyinde 2- ve 3- pozisyonlarında, primer hidroksiller ise primer yüzey üzerinde 6- pozisyonunda yer alırlar

Siklodekstrinlerin molekül şekline bakıldığında içi boş kesik koni yapısında moleküller olduğu görülür. Halkanın içinde bulunan yeri değiştirilemeyen hidrojen atomları ve çoğu glikozidik oksijen atomları tarafından sağlanan elektronca zengin bir ortamın sonucu olarak hidrofobik özellik gösterir. Hidroksil grupları halkanın dış tarafında yer aldığından dolayı dış yüzey hidrofilik özellik göstermektedir. Siklodekstrinler bu özel yapıları sayesinde sıvı veya katı haldeki, siklodekstrin boşluğuna sığabilecek büyüklükteki hidrofobik molekülleri veya amfilik moleküllerin apolar kısımlarını hidrofobik iç boşluklarında hapsederek, bu moleküllerle konuk-konak kompleksi oluşturabilirler. Bu kompleksle konuk moleküllerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özellikleri değişerek, istenmeyen yan etkilerini giderip, yeni önemli özelliklerinin oluşmasına sebep olurlar (Arslan, 2012).



Şekil 1.33. Siklodekstrinin üç boyutlu yapısı

Siklodekstrinlerin konuk-konak türü kompleks oluşturabilmeleri boşluk çaplarıyla ilişkilidir. α-CD küçük çapa (5 Å) sahip olduğundan kompleks oluşturmak için çok uygun değildir. β-CD'in çapı 6 Å, γ-CD'in çapı ise 8 Å olup pek çok molekül ile kompleks oluşturabilme özelliklerine sahiptir (Arslan, 2012) (Şekil 1.34).



Şekil 1.34. α-, β- ve γ- siklodekstrinlerin moleküler boyutları

CD'ler beyaz, tatlı, nem çekmeyen, kokusuz, kristal toz yapısına sahiptir. Siklodekstrin birimlerinden oluşan, nişasta veya sukroz kadar kararlı olup, bozulmadan yıllarca saklanabilme özelliğine sahiptirler (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Bazı CD'lerin fizikokimyasal özellikleri (Arslan, 2012)

Siklodekstrinler	**α-CD**	**β-CD**	**γ-CD**
Glukoz sayısı	6	7	8
Molekül ağırlığı	973	1135	1297
Erime noktası (°C)	275	280	275
Boşluk çapı (A°)	5	6	8
Çap	14.6	15.4	17.5
Yaklaşık boşluk hacmi (A°)	174	262	427

Yükseklik (A°)	7.9	7.9	7.9
Sudaki çözünürlük (mg/10mL)	14.5	1.85	23.2
1 g CD'deki ~boşluk hacmi (mL)	0.10	0.14	0.20
Kristal suyu % ağırlık	10.2	13.2-14.5	8.13-17.7

CD'lerin sabit bir erime noktası olmamasından dolayı 200°C'nin üzerinde bozunmaya başlarlar. Araştırma sonucu termoanalitik özellikler kristal yapısına, ısıtma hızına, moleküldeki su içeriğine ve atmosferik koşullara bağlı olarak değişiklik gösterirler.

CD'lerin konformasyonları kristal halde görülen ile çözelti halindeki ile hemen hemen aynıdır. Bu özellikte primer ve sekonder hidroksil gruplarının kristal halde veya çözünmüş halde iken benzer konformasyonda olduklarını gösterir. Bu durum ise CD'lerin olağan dışı çözünürlüklerini açıklar: β-CD, esnek olmayan, γ-CD ise daha esnek bir yapıya sahiptir. α-CD'deki hidrojen bağı köprüsü tamamlanmamıştır. α-CD ve γ-CD'in çözünürlüğü β-CD'inkinden sırasıyla 7 ve 14 kat daha fazladır. β-CD molekülünde molekül içi oluşan hidrojen bağları CD molekülünü daha kararlı kılmakta ve CD molekülünün sabit bir yapı almasına neden olmaktadır. Ayrıca bu hidrojen bağları CD molekülünün su ile etkileşimini engelleyerek β-CD'in çözünürlüğünün düşük olmasına neden olmaktadır. Genellikle doğal CD'lerin sudaki çözünürlükleri sıcaklık artışıyla artmaktadır (Bekers ve ark., 1991; Taneri, 2004) (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3. CD'lerin değişik sıcaklıklarda sudaki çözünürlüğü (Taneri, 2004)

Sudaki çözünürlük (mg CD/g su)			
T (°C)	α-CD	β-CD	γ-CD
20	90	16.4	185
25	127	18.8	256
30	165	22.8	320
35	204	28.3	390
40	242	34.3	460
45	285	44.0	585
50	347	52.7	-

Çizelge 1.4. CD'lerin değişik organik çözücülerdeki çözünürlükleri (g/100 mL, 25 °C) (Arslan, 2012)

Organik çözücü	α-CD	β-CD	γ-CD
Metanol % 100	çözünmez	çözünmez	> 0.1
Metanol % 50	0.3	0.3	208
Etanol % 100	çözünmez	çözünmez	> 0.1
Etanol % 50	> 0.1	1.3	2.1
Dimetilformamid	54	32	
Dimetilsülfoksit	2	35	
Aseton	çözünmez	çözünmez	> 0.1
Tetrahidrofuran	çözünmez	çözünmez	çözünmez
Kloroform	çözünmez	çözünmez	çözünmez
Gliserin	çözünmez	4.3	
Propilenglikol	1	21	
Etilenglikol	9	21	
Piridin	7	37	

1.2.3. Siklodekstrin Türevleri

Siklodekstrinlerin kompleks oluşum kapasitelerini artırmak, fizikokimyasal özelliklerini değiştirmek, farklı özellikler kazandırmak amacıyla kimyasal olarak yeni bileşikler sentezlenmektedir. Elde edilmiş modifiye siklodekstrinler, doğal siklodekstrinlerden farklı olarak daha iyi özelliklere sahip olabilirler.

Siklodekstrinler, çok fazla sayıda fonksiyonel gruplara sahiptirler. α-CD'de 18, β-CD'de 21 ve γ-CD'de bulunan 24 adet hidroksil grubunun olması siklodekstrinlere çok fazla kimyasal fonksiyonlandırma imkanı sağlamıştır.

Siklodekstrinlerin hidroksil gruplarının dikkate alınmasında başlıca iki neden vardır.

1- Kullanılan reaktiflerin CD'lerle kompleks oluşturma yetenekleri

2- Hidroksil gruplarının nükleofilik gücü

C6 pozisyonundaki –OH grubu daha nükleofilik olduğu için reaktivitesi yüksektir, C3 pozisyonundakinin ise reaktivitesi en düşüktür. C2 pozisyonundaki daha asidik

olmasına rağmen reaktivitesi düşüktür. –OH gruplarının reaktivitelerinin farklı olması sebebiyle, siklodekstrinler seçimli olarak türevlendirilebilme yeteneğine sahiptir.

Siklodekstrinlerin fonksiyonlandırma nedenlerini şu şekilde özetleyebiliriz:

- ✓ Biyolojik membranlardan siklodekstrinlerin geçişini artırmak
- ✓ Suda çözünebilen moleküllerin ilaçlı salınım özelliklerini değiştirerek kontrollü salınımını sağlamak
- ✓ Kompleks oluşum kapasitesinde artış sağlamak
- ✓ Çözünürlüğü az olan moleküllerin sudaki çözünürlüğünü artırmak, çok az çözünen β-siklodekstrinin sudaki çözünürlüğünü artırmak
- ✓ Siklodekstrinlere kendi kendini düzenleme özelliği kazandırarak ilaç taşıyıcı sistemi oluşturmak (Bilensoy ve Hıncal, 2008).

Siklodekstrin bileşiğine bir hidroksil üzerinden bağlı olduğu zaman mono-substütie, birden fazla hidroksil üzerinden bağlı olduğu zaman 2 veya 3 sübstitüentin bağlandığı anlaşılmalıdır.

Siklodekstrinlerin hidroksil gruplarından modifiye edilmesinde bilinen iki yol vardır.

1. Mono modifiyelendirme: Sadece bir hidroksil grubu ile modifiye edilmesi
2. Çoklu modifiyelendirme: Birden fazla hidroksil grupları ile modifiye edilmesi

1.2.4. Siklodekstrinlerin Fonksiyonlandırılması

Mono modifiyelendirme hidroksil gruplarının bir elektrofil ile reaksiyonu sonucu elde edilir. Hidroksil gruplarının farklı pozisyonlarda yer alması ile istenilen yerlerde fonksiyonlandırma yapmamızı sağlar. Farklı pozisyonların, kimyasal ve reaktivite özelliklerinin farklı olması, özel ürünlerin elde edilmesinde kullanılabilir (Bender ve Komiyana, 1978).

En çok kullanılan başlangıç molekülü, mono-6-deoksi-6(-tosil)-β-siklodekstrin (TsCD)'dir. TsCD, β-CD ile *p*-toluensülfonilklorürün reaksiyona girmesi ve ürünün suda kristallendirilmesiyle elde edilir (Mazzaglia ve ark., 2003; Sortino ve ark., 2006). Siklodekstrinlerin türevlendirilmesinde bu sülfonatlı siklodekstrinler ara basamak olarak kullanılır. Bazı nükleofiller siklodekstrindeki tosil gruplarıyla yer değiştirerek, fonksiyonlu siklodekstrinler elde edilmesinde kullanılırlar. Bu nükleofiller iyodür, hidroksilamin, aril azid, tiyoasetat, ya da poli-alkilamin gibi nükleofiller olabilir (Petrak, 2005; Wiley, 1999; Challa ve ark., 2005; Loftsson ve Stefonsson, 1997).

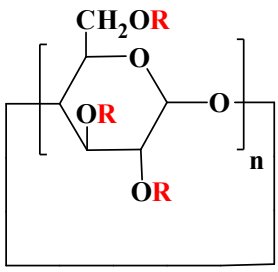
Farmasetik alanda ve ilaç taşıyıcı sistemlerin formülasyonunda sıklıkla kullanılan siklodekstrin türevleri aşağıda verilmiştir (Çizelge 1.5):

Çizelge1.5. Farmasötik açıdan önemli olan β-CD türevleri (Taneri, 2009)

Türev	Sübstitüentin yeri	Sübstitüent
Hidrofilik türevler		
*Metillenmiş β-CD	2,6-; 2,3,6-	OCH_3
*Hidroksialkillenmiş β-CD	Rastgele	OCH_2-CH(OH)-CH_3
* Dallanmış β-CD	6-	-glukozil, -maltozil
Hidrofobik türevler		
*Etillenmiş β-CD	2,6-; 2,3,6-	-O-C_2H_5
*Perasetillenmiş β-CD	2,3,6-	-O-CO(CH_2)nCH_3
İyonize olabilen türevler		
*Karboksialkil β-CD	Rastgele	-O-(CH_2)n-COONa
*Karboksimetil, etil	2,6-; 3-	-O-CH_2COONa; -O-C_2H_5
*Sülfatlar	Rastgele	-O-SO_3Na
*Alkil sülfonatlar	Rastgele	-O-(CH_2)n-SO_3Na

a. Metillenmiş siklodekstrinler:

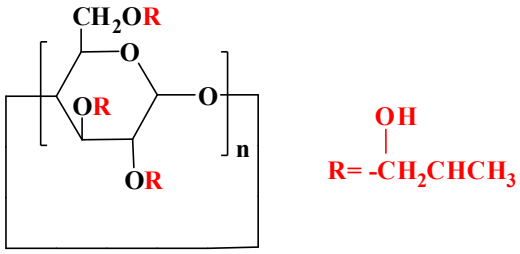
C6 primer hidroksil gruplarından, C2 ve C3 sekonder (dimetil siklodekstrin) veya C2, C3 ve C6 (trimetil siklodekstrin) hidroksil gruplarının metilasyonu ile elde edilir. Metillenmiş siklodekstrinlerin en önemli dezavantajı sıcaklık artışıyla çözünürlüğün azalması ve hemolitik etkisinin bulunmasıdır. β-siklodekstrinin metilasyonunun kısmi olmasına bağlı olarak gözlenen bu dezavantaj, güçlü hemolitik etkiye ve ilacın güçlü bağlanmasına sebep olur (Debouzy, 1997; Yavuz, 2009; Arslan, 2012).



R= -CH_3

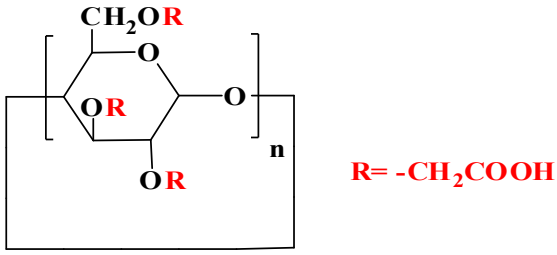
b. Hidroksialkillenmiş Siklodekstrinler:

β-CD'in propilen oksit ile alkali ortamda kondensasyonu sonucu β-CD'in bir veya birkaç hidroksiline 2-hidroksipropil grubunun bağlanmasıyla β-CD'ler hazırlanırlar (Duchene, 1990; Arslan, 2012).



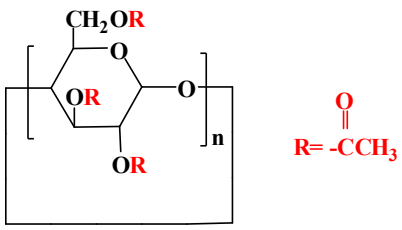
c. Karboksimetiletilenmiş-β-siklodekstrinler

Kompleks oluşturma kapasiteleri ilacın yapısına, partikül büyüklüğüne ve yüküne bağlı olarak değişiklik gösterir. İyonize siklodekstrinlerden olup enterik tipte taşıyıcı sistem hazırlamada kullanılırlar (Uekama ve ark., 1989, Yavuz, 2009; Arslan, 2012).



d. Açillenmiş siklodekstrinlerin:

Sudaki çözünürlüğü substitüsyon derecesine göre değişiklik gösterir. Polaritesi az olan çözücülerde çözünürlüğü artar. Hidrofobik özelliğinden dolayı suda çözünen ilaçların kontrollü salınımını sağlar (Komiyama ve ark., 1984; Yavuz, 2009; Arslan, 2012).



1.3. Enzimler ve Genel Özellikleri

Enzimler, canlı sistemlerinde gerçekleşen protein yapılı biyokimyasal reaksiyonlarda kullanılan biyokatalizörlerdir. Kimyasal katalizörlere göre enerji gereksinimini azaltarak düşük sıcaklık (genellikle 20-40 ^{o}C), sulu çözeltilerde ılımlı koşullar altında ve basınçta (atmosfer basıncı) reaksiyonları katalizleme özelliğine sahiptirler. Genellikle optimum pH aralığı 5-8' dir. Kimyasal katalizörlerde karşılaşılan rasemizasyon, izomerizasyon, bozulma, ve yeniden düzenlenme gibi yan reaksiyonlar gözlenmemektedir. Biyokatalizör tepkimeleri, kimyasal katalizörlere göre 10^{8}-10^{10} kat daha hızlı kataliz özelliği gösterirler. Kimyasal katalizörler genellikle % 0,1–10 derişim aralığında kullanılırken, biyokatalizörler aynı katalitik etkiyi 10^{-3} - 10^{-4} derişiminde gösterirler (Tiryaki, 1993; Kennedy, 1995; Faber, 2000; Bakkal, 2006; Etci, 2011).

Enzimler canlı ortamlarda etkinlik gösterebildikleri gibi, canlı olmayan ortamlardada aktiflik gösterebilirler, bu da enzimlerin canlı olmayan koşullardaki kullanımını sağlamıştır. Böylece enzimlerin birçok proseste kullanımı yaygınlaşmış, endüstriyel anlamda birçok yerde kullanılabilme imkanı sağlanmıştır. Hücre içinde çok önemli etkinlik gösteren enzimler, endüstride birçok alanda farklı amaçlar için kullanılmaktadır (Gezer, 2009; Etci, 2011) (Çizelge 1.6).

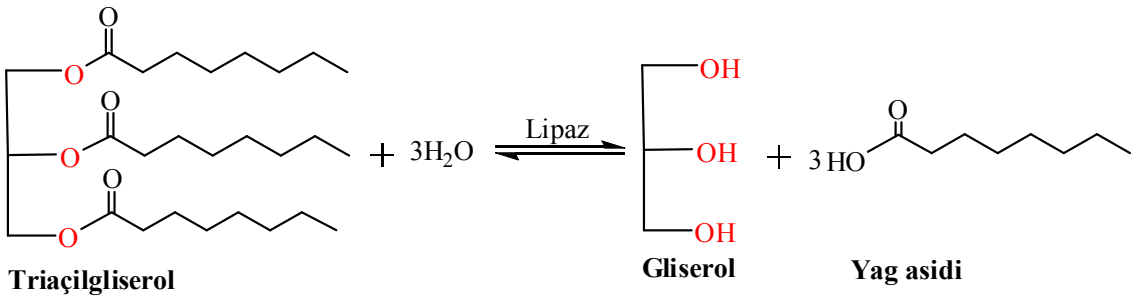
Çizelge 1.6. Enzimlerin Kullanım Alanları (Telefoncu, 1997)

Enzim	Kullanım alanı
Penisilin amidaz, oksidaz	Eczacılıkta
Kolesterol oksidaz	Tıp' ta kolesterol tayininde
Proteazlar, lipaz, amilaz	Deterjan sanayinde
Redüktaz, amilaz, fosfataz, oksidazlar	Analitik amaçlı analizlerde
Laktaz, mikrobiyal proteazlar	Süt ve süt ürünleri endüstrisinde
Katalaz, amilaz	Tekstil sanayinde
Pektinaz, selülaz, limonaz	Meyve suyu sanayinde
Proteaz, lipaz	Deri sanayinde
Amilaz, glukoz izomeraz	Nişasta endüstrisinde
Ksilenaz	Kağıt endüstrisinde
Amilaz, amiloglikozidaz, pentosanaz	Ekmek sanayinde
Papain, katalaz	Et sanayinde
Termolizin	Aspartam üretiminde

1.3.1. Lipazlar

Lipazlar, mono-, di- ve triaçil gliserollerin (hayvan, bitki ve mikrobiyal yağların ana bileşeni) karboksil ester bağlarının bölünmelerini (hidrolizini) katalizleyen

enzimlerdir. Bu reaksiyon sonucu karboksilik asitler ve alkoller oluşur (Bakkal, 2006; Etci, 2011) (Şekil 1.35).



Şekil 1.35. Lipazların genel hidroliz şeması

Lipazlar sadece hidroliz değil aynı zamanda uzun zincirli açil gliserollerin sentezini de katalizlemektedirler. Lipazlar organik kimyada en yaygın kullanılan enzimlerdir. Organik kimyada lipazlar biyokatalizörleri önemli hale getirmiştir (Jaeger ve Reetz, 1998).

Lipazlar, esterleşme, transesterleşme ve hidroliz tepkimelerini düşük sıcaklıkta katalizlemeleri, kofaktör istememeleri, susuz ortamda kararlı ve aktif olmaları, , yüksek katalitik güçleri, ucuz olmaları, yan ürün oluşumunu önlemeleri, yüksek substrat seçimlilikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılmıştır (Sharma ve ark., 2001; İşbakan, 2006) (Çizelge 1.7).

Çizelge 1.7. Lipazların endüstrideki bazı uygulamaları (Etci, 2011)

Endüstri	Tepkime	Ürün/uygulama
Deterjan	Yağların hidrolizi	Fabrikalardan yağ atıklarının uzaklaştırılması
Kimyasallar	Enantiyomseçimlilik, sentez	Kiral yapı taşları
Yağ	Transesterleşme, hidroliz	Kakao yağı, margarin, yağ asitleri, gliserol
Farmasotik	Transesterleşme, Hidroliz	Sindirime yardımcı, özel yağlar
Süt ürünleri	Süt yağının hidrolizi, peynirin olgunlaşması	Süt, peynir ve tereyağında tat geliştirme
İçki	Aroma geliştirme	İçki
Kağıt	Hidroliz	Kaliteli kağıt üretimi
Et ve balık	Tat artırma	Et balık ürünleri
Kozmetik	Sentez	Nemlendirme
Deri	Hidroliz	Deri Ürünleri

Lipaz enzim çeşitleri:

- Phycomyces nitens
- Porcine pancreas
- Humicola lanuginosa
- Aspergillus niger
- Candida cylindracea
- Candida antarctica
- Candida rugosa

Bu lipazlardan yüksek aktivite ve düşük fiyatından dolayı Candida Rugosa tercih edilmiştir.

1.3.2. *Candida Rugosa* Lipaz (CRL)

CRL, Histidin, Serin ve Glutamin (His-Ser- Glu) katalitik üçlüsünden oluşan ve 31 aminoasitten oluşan bir kapağı olan aktif bölgeye sahiptir (Benjamin ve Pandey, 1998; Paiva ve ark..2000; Bakkal, 2006). Bu kapak aktif bölgeyi kısmen kaplar. Kapağın aktif bölgeye bakan yüzeyi hidrofobik özellik, diğer yüzeyi ise hidrofilik özellik göstermektedir (Tejo ve ark., 2004). Kapak açık ve kapalı olmak üzere iki farklı konformasyona sahiptir. Kapak kapalıyken 90° hareket ettiğinde açık form haline gelir. Kapağın görevi enzimin aktif konumuna substrat girişini sağlamasına yardımcı olmaktır (Secundo ve ark., 2003). Açık konumda ise aktif ve enantiyoseçimliliği yüksek, kapalı konumda enzim inaktif ve enantiyoseçimliliği düşük özellik göstermektedir. Enzimler organik çözücülerde genellikle çözünmezler. Bu durumda tepkime su-organik çözücü iki faz ara yüzeyinde gerçekleşmektedir. Enzim aktivitesinin ara yüzeyde artması ara yüzey aktivasyonu olarak bilinmektedir. Diğer birçok lipaz türünde gözlenmeyen ara yüzey aktivasyonu *Candida Rugosa* lipazda gözlenmektedir. CRL enzimi suda çözündüğü zaman kapağı kapalı ve hidrofilik kısmı çözücüye doğru dönüktür. Lipazın su-organik çözücü ara yüzeyine adsorbsiyonundan sonra kapak açılır ve enzimin hidrofobik kısmı ara yüzeyde ortaya çıkar (Mutlu, 2006; Etci, 2011).

Lipazlar arasında, *Candida Rugosa* lipaz yaygın olarak yağ hidrolizinde, esterifikasyonda, transesterleşmede ve enantiyoseçimli biyodönüşümlerde çok önemli özellik göstermektedir (Bezbradica ve ark., 2006; Santos ve Castro, 2006; Ting ve ark., 2006).

1.3.3. Enzim İmmobilizasyonu

Enzimler, hücrelerde sentezlenen, canlı organizmalarda oluşan tüm reaksiyonların ılımlı koşullarda gerçekleşmesini sağlamaktadır. Bu reaksiyonların uyumlu bir biçimde koordinasyonunu sağlayan protein yapıdaki spesifik katalizörlerdir (Telefoncu, 1997). Enzimler suda çözünürler ve endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştirildiğinden katalizör olarak kullanılan serbest enzimin aktivitesini kaybetmeden geri kazanılması mümkün değildir. Serbest enzim, reaksiyon ortamından istenildiği zaman uzaklaştırılamadığından reaksiyonun kontrolü çok güçtür. Tüm bu sorunları olumlu yönde çözebilmek, enzimleri daha çekici hale getirmek için enzim immobilizasyonu üzerine çalışılmıştır (Aksoy, 2003).

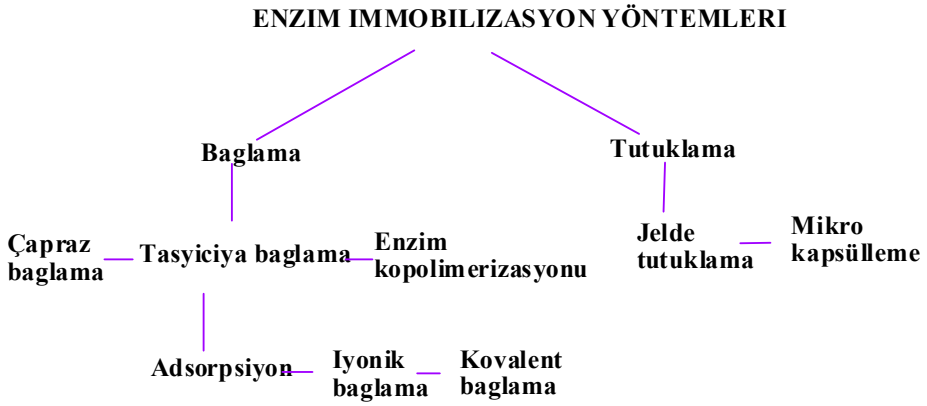
Enzim immobilizasyonu, enzimin tekrar kullanılabilirliğini geliştirmek ve enzimlerin aktivitesinin kararlılığını artırmak için etkili bir yol haline gelmiştir (Chang ve ark.,2008). İmmobilize lipazlar katalizör olarak sürekli reaksiyon sistemlerinde kullanılabilirler ve aynı zamanda lipazın sıcaklık ve pH kararlılığı lipazın taşıyıcı matrikse immobilizasyonuyla artırılabilir hale gelir (Park ve ark., 2002). Böylece, immobilize lipazlar sert/zor istenilen sıcaklık ve pH şartları altında kullanılabilirler. Lipazın immobilizasyonu çözünmez olmasını sağlar ve böylece daha sonra lipazın reaksiyon karışımından kolayca ayrılmasına olanak sağlar (Tischer ve Wedekind, 1999; Kim ve ark., 2000; Oh ve ark., 2007). Bu yüzden enzim teknolojisinde suda çözünmeyen desteklerde enzimin immobilizasyonu aktif araştırma konusu olmasını sağlamıştır. İmmobilize enzimlere fiziksel adsorpsiyon, kovalent bağlama, polimerlere tutuklama ya da enkapsülasyon ve çapraz bağlama gibi farklı stratejiler önerilmiştir (Lei ve ark., 2009).

Farklı yöntemlerle çözünmez forma getirilmiş olan immobilize enzimlerin serbest enzimlere göre bazı üstünlükleri vardır. Bunlar (Telefoncu, 1997);

- Reaksiyon sonunda ortamdan kolayca uzaklaştırılabilirler ve ürünlerin enzimler tarafından kirletilmesi gibi bir problem oluşmaz.
- Serbest enzimlere kıyasla daha kararlı haldedir.
- Sürekli işlemlere uygulanabilirler.
- Enzimin kendi kendini parçalama (autolysis) olasılığı azalmaktadır.
- Çevre koşullarına (pH,sıcaklık v.s.) karşı daha dayanıklıdırlar.
- Mekanistik çalışmalar için uygun özellik gösterir.

- Ürün oluşumunu kontrol altında tutma özelliği sağlar.
- Birbirini izleyen çok adımlı reaksiyonlar için uygun hale gelir.
- Birçok kez ve uzun süre kullanılma özelliğine sahiptir.
- Bazı durumlarda serbest enzimden daha yüksek bir aktivite göstermektedir.

1.3.3. İmmobilizasyon Yöntemleri



Şekil 1.36. İmmobilizasyon yöntemlerinin sınıflandırılması

1.3.3.1.Taşıyıcıya Bağlama Yöntemleri

Taşıyıcıya bağlama yöntemi uygulamalarında enzim için uygun taşıyıcı sistem seçimi oldukça önemlidir. Bu yöntemde bağlanma kimyasal (kovalent veya iyonik) ya da fiziksel (adsorbsiyon) yolla olacağı için enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar, iyonik gruplar ve hidrofobik bölgelerin dikkate alınması gerekir (Telefoncu, 1997) (Çizelge 1.8).

Çizelge1.8. Enzim immobilizasyonunda en yaygın kullanılan taşıyıcılar (Etci, 2011)

Anorganik	Doğal polimerler	Sentetik polimerler
Kil, cam	Selüloz	Polistiren türevleri
Silikajel	Nişasta	Poliakrilamid
Hidroksiapatit	Jelatin	M. anhidrid polimerler
Aktif karbon	Albumin	Siklodekstrin polimerleri
Bentonit	Agar ve agaroz	Vinil ve alil polimerler
Titandioksit	Karragenan	Oxiranlar
Metaller	Dextran	Naylon
Nikeloksit	Kollagen	Metakrilat
Pomza taşı	Kitin kitosan	İ. Değiştirici reçineler

Enzim immobilizasyonunda kullanılacak taşıyıcıda aranan nitelikler;

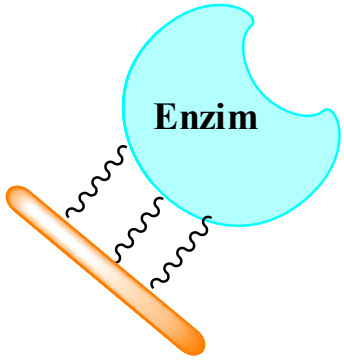
- Ucuz olma
- Rejenere olabilme
- Kimyasal ve termal stabilite
- Kovalent bağlamada kullanılacak taşıyıcıların ılıman koşullarda reaksiyon verebilen fonksiyonel gruplar taşıması
- Suda çözünmeme
- Gözenekli (poröz) yapı
- Hidrofilik karakter
- Mikroorganizmalara karşı dirençli olma
- Mekanik stabilite ve uygun partikül formu
- Zehirsiz olması

Enzim immobilizasyonu belirli koşullarda (oda sıcaklığı, nötr pH vb.) yapılmalıdır. Yüksek sıcaklık, organik çözücüler, kuvvetli asidik veya bazik ortam ve yüksek tuz konsantrasyonu ile muamele, enzimin denatüre olması ve aktivitesinin kaybına neden olur (Telefoncu, 1997). Aktif merkezdeki aminoasitler veya merkezin üç boyutlu yapısı değişirse katalitik aktivite de düşer ve substrat spesifikliği değişir. Bu yüzden yapılacak immobilizasyon işleminde herhangi bir kovalent bağlama söz konusu ise bu bağlamanın enzim aktivitesi için gerekli olan aminoasitler üzerinden gerçekleşmemesine ve bu grupların bağlanma sırasında sterik olarak engel oluşturmamasına dikkat edilmelidir. Kovalent bağlama enzim molekülü üzerindeki fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleştirilir. Enzim immobilizasyonu yaparken, enzim immobilizasyonu esnasında veya sonrasında enzim aktif merkezine zarar vermeyecek bir yöntem seçilmelidir. İşlem sırasında taşıyıcı ile bağlanma söz konusuysa (iyonik veya kovalent bağlanma) bu bağlanmanın aktif merkez için esansiyel aminoasitler üzerinden gerçekleşmeyeceği taşıyıcılar seçilmelidir. İmmobilizasyon yöntemleri tek tek kullanılabildiği gibi, beraber olarak kullanılabilirler (Telefoncu, 1997; Etci, 2011).

a. Kovalent Bağlama:

Genellikle sulu ortamda gerçekleştirilir. Enzimin taşıyıcıya kovalent bağla bağlanmasında dikkat edilecek önemli bir husus, bağlanmanın enzim aktivitesi için zorunlu gruplar üzerinden olmaması ve bağlanma sırasında sterik engeller teşkil

edilmemesidir (Telefoncu, 1997). Kovalent bağlama enzim zincirindeki aminoasitlerin taşıdığı fonksiyonel gruplar üzerinden gerçekleştirilir. Taşıyıcı suda çözünmemeli ancak suda ıslanabilmeli ve ayrıca mekanik kararlılığa sahip olmalıdır. Bu tür taşıyıcıların seçiminde enzim-taşıyıcı bağının aktivite için zorunlu gruplar üzerinden olmaması yanında taşıyıcının enzim tarafından parçalanmaması, mikroorganizma üremesine olanak vermemesi, pH ve çözücülere karşı dayanıklı olması gibi özellikler taşımasına dikkat edilir (Telefoncu, 1997; Goldstein ve Manecke, 1976; Mosback, 1976; Öztürk, 2006) (Şekil 1.37).



Şekil.1.37. Kovalent bağlama (Guisan, 2006)

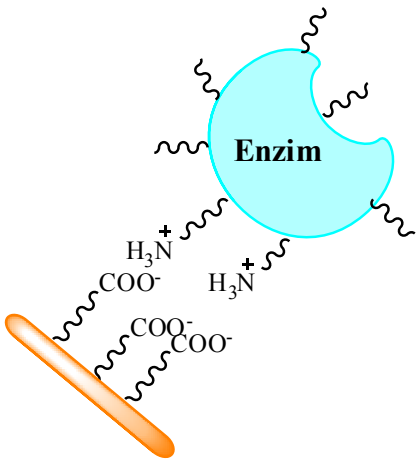
b. Adsorpsiyon:

Bu yöntem, suda çözünmeyen bir adsorbanın enzim çözeltisi ile karıştırılıp belli bir süre etkileştirildikten sonra, enzimin aşırısının ortamdan iyice yıkanarak uzaklaştırılması temeline dayanır. Enzimin taşıyıcıya bağlanmasında etkin olan etkileşimler Van der Waals kuvvetleri, hidrojen bağı ve elektrostatik etkileşimlerdir. Enzim immobilizasyonunda en çok kullanılan adsorbanlar; nişasta, aktif karbon, silikajel, $CaCO_3$, gözenekli cam, diatome toprağı, kül, kollodyum, bentonit, hidroksiapatit, gluten ve kalsiyum fosfattır. Adsorbsiyon yönteminin avantajı; enzim immobilizasyon işleminin basit oluşu, değişik biçim ve yükteki taşıyıcıları seçme olanağı vermesi ve bir yandan immobilizasyon gerçekleştirilirken diğer yandan da enzim saflaştırılmasına olanak sağlamasıdır. İşlem kolay olduğu gibi ılımlı koşullarda gerçekleşmekte ve önemli ölçüde enzim inaktivasyonuna da sebep olmamaktadır (Knežević, 2004; Andrade ve Hlady, 1986; Etci, 2011).

Yöntemin dezavantajları ise; her ne kadar immobilizasyon işlemi kolay olsada optimal koşulların saptanması çok güçtür. Eğer enzim ile taşıyıcı arasında kuvvetli bir bağlanma yoksa bu durumda desorpsiyon sonucu enzim serbest hale geçmekte ve ürünlerin kirlenmesine sebep olmaktadır (Telefoncu, 1997; Aksoy, 2003).

c. İyonik Bağlama:

Bu yöntem, iyon değiştirme yeteneğine sahip suda çözünmeyen taşıyıcılara enzimin iyonik bağlanmasıdır. Bazı durumlarda iyonik bağlamanın yanında fiziksel adsorpsiyon da etkili olmaktadır. İyonik bağlama ılımlı koşullarda gerçekleştiğinden enzimin konformasyonunda ve aktif merkezde değişikliğe sebep olmaz. Ancak enzim ile taşıyıcı arasındaki bağ, kovalent bağ kadar güçlü olmadığından dolayı enzim kaçışı söz konusudur (Telefoncu, 1997; Karaca 2006) (Şekil 1.38).



Şekil.1.38. İyonik bağlama

1.3.3.2.Çapraz Bağlama Yöntemleri

Küçük moleküllü bi- veya multi-fonksiyonel reaktifler enzim molekülleri arasında bağlar yaparak ortamda suda çözünmeyen komplekslerin oluşmasını sağlar. Çapraz bağlanma derecesi ve immobilizasyon, protein ve reaktif konsantrasyonuna, pH'a ve immobilize edilecek enzime çok bağımlıdır (Telefoncu, 1997).

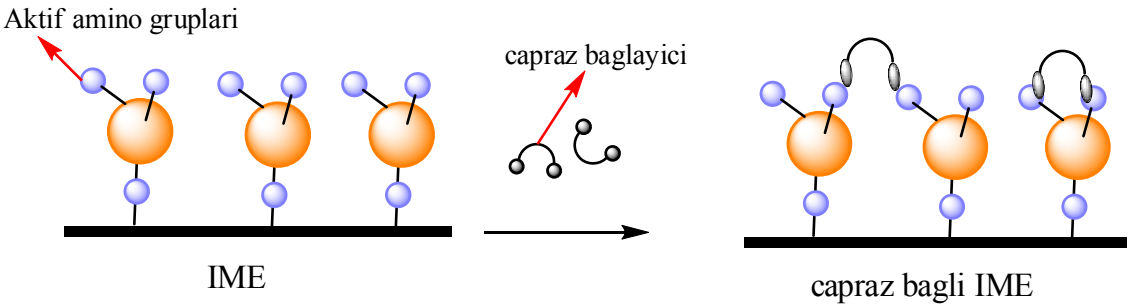
Bu yöntem ile enzim immobilizasyonu dört farklı şekilde gerçekleşmektedir:

a) Enzimin yalnız bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu

b) Enzimin ikinci bir protein varlığında bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu

c) Enzimin suda çözünen bir taşıyıcıda adsorpsiyonundan sonra bifonksiyonel reaktif ile reaksiyonu

d) Enzimin bifonksiyonel reaktif tarafından aktive edilmiş polimer taşıyıcı ile reaksiyonudur. En çok kullanılan çapraz bağlama reaktifleri; glutaraldehid, klorformat, karbonildiimidazol, heterosiklik halojenürler, bisoksiranlar, divinilsulfanlar, p-benzokinonlar, geçiş metal iyonları ve epiklorhidrinlerdir. Çapraz bağlama reaksiyonu ılımlı koşullarda gerçekleşmediğinden bazı durumlarda önemli ölçüde aktivite kaybı söz konusu olmaktadır (Telefoncu, 1997; Öztürk, 2006) (Şekil 1.39).



Şekil.1.39. Çapraz bağlı immobilize enzimler (Cao, 2005)

1.3.3.3.Tutuklama Yöntemleri

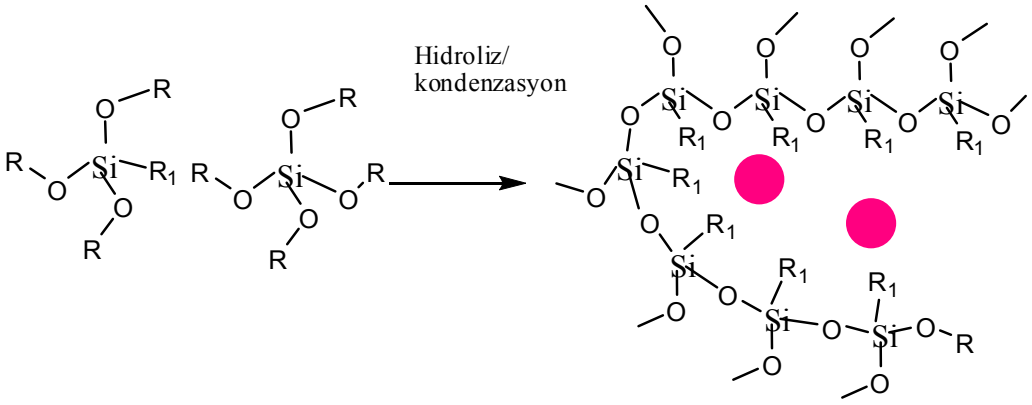
Tutuklama yöntemi, bağlama yöntemlerinde yapılan immobilizasyondan farklı olarak enzim molekülünün fiziksel veya kimyasal yollarla herhangi bir taşıyıcıya bağlanmadan belirli bir ortamda tutulması demektir. Tutuklama işlemleri sırasında enzim moleküllerinin polimer matris içindeki kafeslerde, yarı geçirgen membranlar içinde, mikrokapsülleme ve misellerde tutulması demektir. Bu yöntemi kovalent bağlama ve çapraz bağlama immobilizasyonundan ayıran en önemli özellik, enzim molekülünün kimyasal veya fiziksel olarak herhangi bir taşıyıcıya bağlanmamış olmasıdır (Telefoncu, 1997).

a. Sol-jel tutuklama:

İmmobilize enzimler hazırlamak için sol-jel tutuklama tekniklerinin kullanımı 1990 tarihinden itibaren enzim immobilizasyonunun önemli bir alanı olmuştur (Braun ve ark., 1990). Bu metod 1950' lerin ortalarında ortaya çıkmasına rağmen geçen zamanda protein ve enzimlerin hazırlanmasında birçok çalışma yapılmıştır.

Sol-jel tutuklama metoduna göre immobilize olmuş enzimin kararlılığının enzim konsantrasyonuna, pH'a, iyonik kuvvete ve diğer immobilizasyon şartlarına oldukça bağlı olduğu bulunmuştur. Matrikste tutuklanmış enzimin konsantrasyonunun artırılmasının enzimin termostabilitesinin artmasına neden olduğu gözlenmiştir (Arica ve ark., 1996;Cao, 2005).

Bu prosesde bağlayıcı silan bileşikleri olarak alkil ve alkoksi silan bileşikleri kullanılmaktadır. Sol-jel teknikleri, enzim varlığında alkoksi silanların asit veya baz katalizi ile yapılır (Hench ve West, 1990; Brinker ve Scherer, 1990) (Şekil 1.40).



Şekil.1.40. Sol-jel matriksinde enzim tutuklanması (Gao, 2004)

Sol-jel tutuklama yönteminin enzim immobilizasyonu için kolay ve etkili bir yol olduğu ispatlanmıştır (Brzozowski ve ark., 1991). Destek maddesinin inertliği, termal dayanıklılığı, ılıman şartları metodun ayırıcı karakteristik özellikleri arasındadır (Yılmaz, 2010).

Enzim tutuklamasına dayalı sol jel tutuklama yöntemi ilk kez 1990 yılında Avnir ve ark. tarafından alkali fosfataz enzimine uygulanmıştır (Braun ve ark.,1990). Avnir ve ark. sol-jel kafesinin özelliklerini ve sol-jel prosesinin prensibini açıklamışlardır. Tutuklanmış enzimlerin ve mikro çevre kafeslerin homojen olmasının enzimlerin katalitik aktivitesine katkı sağladığı gözlenmiştir.

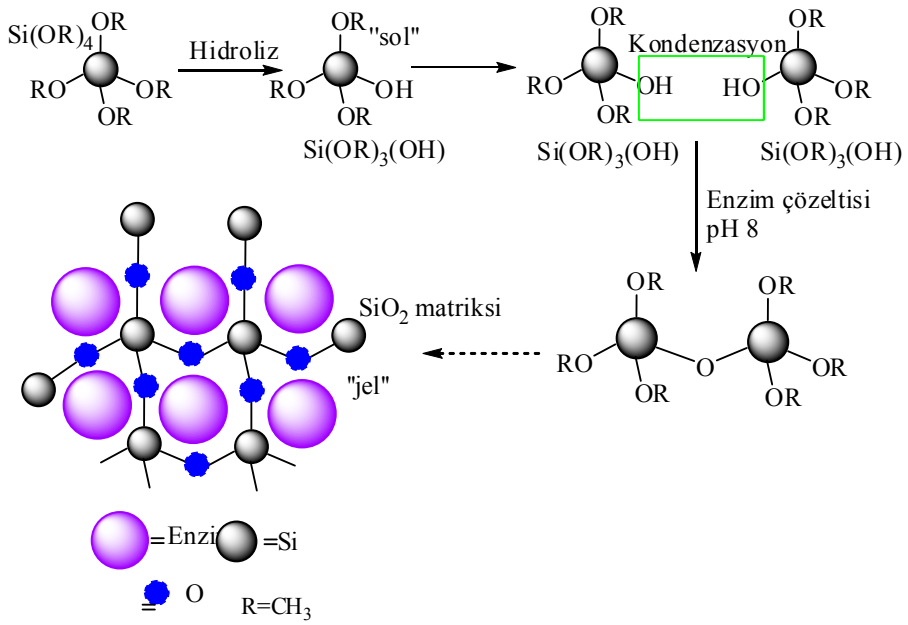
İsopropanol, polivinilalkol, siklodekstrinler veya sürfektanlar gibi katkı maddelerinin lipaz immobilizasyonunda sol-jel tutuklama yönteminin etkisini artırdığı bilinmektedir. Böyle heterojen biyokatalizörlerin uygulamasının amacı; organik çözücülerde ve iyonik sıvılarda esterifikasyon veya transesterifikasyon reaksiyonlarını gerçekleştirmektir (Etci, 2011).

Enzim immobilizasyon medotları arasında tutuklama, biyomoleküllerin serbestliğinden ve hazırlanmasının kolay olmasından dolayı ilgi odağı haline gelmiştir. Yöntemin uygulanması kolay ve tekrarlanabilirliği oldukça yüksektir. Sol-jel tutuklama çalışmalarında, polimer matrikste biyomoleküllerin tutuklanması gerçekleştirilir ve oluşan matriks ile biyomolekül arasında kovalent bağ yoktur. Bu tutuklama metodu dönmeyi ve sarmalın hareketini sınırlandırmaktadır. Aynı zamanda enzim-substrat etkileşimine izin vermektedir (Edmiston ve ark., 1994; Dave ve ark., 1995; Gottfried ve ark., 1999; Hartnett ve ark., 1999).

Sol-jel prosesi oda sıcaklığında ve ilk eklenen organik maddelerin reaksiyonuyla gözenekleri belirlenmiş organosiloksan matriksi ve silika arasındaki metal oksit oluşumuna dayalıdır (Hench ve ark., 1990; Guisan, 2006; Campàs ve Marty, 2006). Oluşan silika matriksi tutuklanan lipazın iç yüzey aktivasyonunu kolaylaştırabilen hidrofobik özellikte olduğu için bu amaçla kullanılmaktadır (Reetz, 2006; Guisan, 2006).

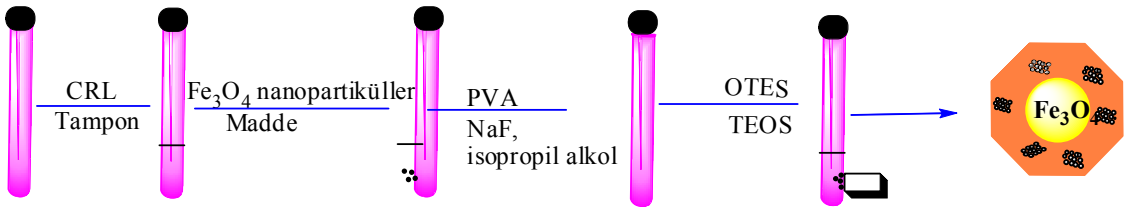
Sol-jel teknikleri tetraalkoksisilan bileşiklerinin [$Si(OR)_4$] asit ya da baz katalizli hidrolizini içermektedir (Hench ve ark., 1990; Brinker ve ark., 1990; Reetz, 2006; Guisan, 2006).

Sol-jel de ilk basamak tetrametoksisilan [TMOS; $Si(OCH_3)_4$] veya metiltrimetoksisilan [MTMOS; $CH_3Si(OCH_3)_3$] eklenerek bir ya da iki metal alkoksitlerin asidik pH da, su ortamında silisyum hidroksit gruplarının (Si-OH) oluşumuyla gerçekleşmektedir. İkinci basamakta, bazik pH' da, silisyum hidroksit fonsiyonel grupları arasında kondenzasyon reaksiyonu biyomoleküllerin tutuklanacak (Si-O-Si) matriksini oluştururlar (Guisan, 2006; Campàs ve Marty, 2006) (Şekil 1.41).



Şekil.1.41. Enzimlerin sol-jel tutuklanması (Nouger, 2002; Gao, 2004)

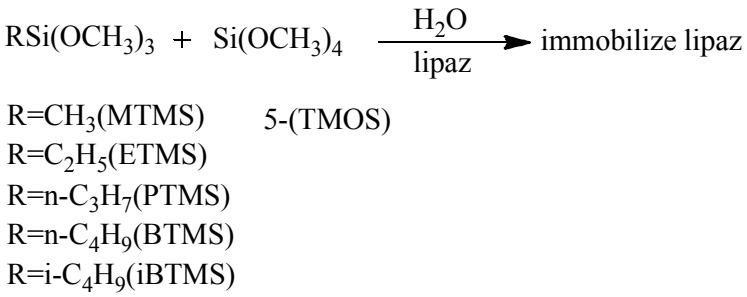
NaF gibi temel katalizörler sol-jel metodunda kullanılmaktadır. Böylece silika matriksinde büyük gözenekler olması sağlanmıştır (Reetz, 2006; Guisan, 2006). Daha sonra enzimin kararlı halde olması için polivinilalkol ve metiltrimetoksisilan $CH_3Si(OCH_3)_3$ (MTMS) kullanılmıştır (Reetz ve ark., 1995; Reetz ve ark., 1996; Reetz, 2006; Guisan, 2006). Enzim immobilizasyonu için eklenen TMOS ile birlikte alkil grubu metil-, etil-, n-propil-, n- bütil-, n- $C_{18}H_{37}$ ya da 1,6 bis(trimethoxysilyl)-hexane) olan fonksiyon edilmiş alkoksitleri kullanmışlardır. Eklenen sol- jel katkı maddesinin alkil grupları arttıkça (CH_3<C_2H_5<n-C_3H_7<n-C_4H_9) immobilize lipazın relatif aktivitesinin keskin bir şekilde artığı bulunmuştur (Gao, 2004).



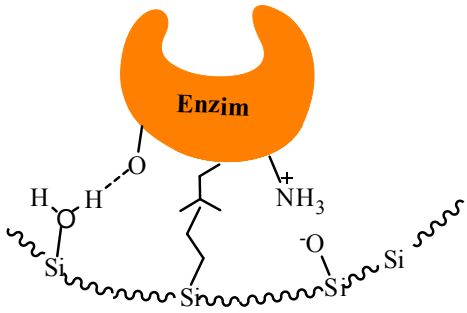
Şekil.1.42. Manyetik Fe_3O_4partiküller ilesol-jel tutuklama metodu

Reetz ve ark., (2003) yaptıkları çalışmada metil<etil<n-propil< n-butil gibi farklı alkiltrimetoksisilan bileşiklerini kullanarak lipaz aktivitesinin artışında alkil etkisini

gözlemlemişlerdir (Reetz, 1997), yani silisyum oksit matriksinde artan hidrofobik gruplarla enzim aktivitesinin arttığı görülmüştür. Reetz ve ark., (2003) enantiyoseçimli reaksiyonlarda heterojen katalizör olarak sol-jel tutuklamanın çok uygun olduğunu gözlemişlerdir.

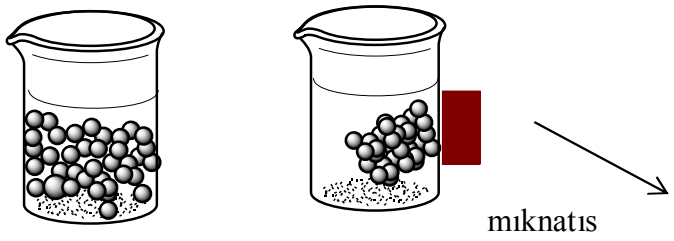


Daha yüksek termal kararlılık ve aktivite, Van der Walls ve hidrojen bağlarıyla sağlanmaktadır (Şekil 1.43).



Şekil.1.43. Enzimle jel matriks arasında kovalent içetkileşimin olmadığını gösteren genel sol-jel tutuklama şeması (Guisan, 2006)

Bu konuda diğer bir gelişme özellikle sol-jel işlemi sırasında manyetik demir oksitin lipaz immobilizasyonunda kullanılması ile tekrar kullanılabilirliğine büyük pratiklik getirilmesidir (Reetz ve ark., 1998; Reetz, 2006; Guisan, 2006) (Şekil 1.44).

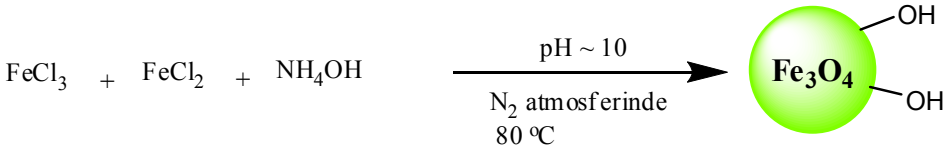


Şekil.1.44. Manyetik Fe_3O_4 nanopartiküller a) manyetik alan olmadığı durum b) manyetik alan altında olduğu durum

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

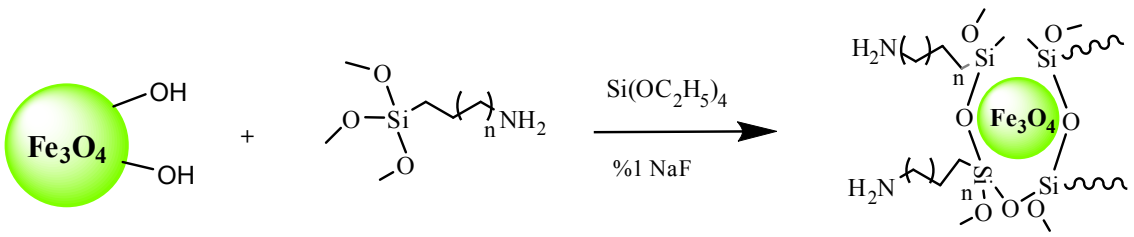
Lipaz enzimi ilk olarak 1956 yılında H. Brandenberger tarafından kovalent bağlama yöntemi ile iyon değiştirici reçine üzerine immobilize edilmiş (Iwai ve ark.1964), ancak lipazın ester hidrolizinde veya ester sentezinde kullanılması ile ilgili uygulamaya yönelik çalışmalar Iwai ve arkadaşlarının (1964) çalışmalarıyla başlamıştır (Sökmen, 2005).

Zeng ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada $FeCl_2$, ve $FeCl_3$'den yola çıkarak bazik ortamda azot atmosferinde manyetik özellik gösteren Fe_3O_4 manyetik nanopartikülleri sentezlemişlerdir (Şekil 2.1).



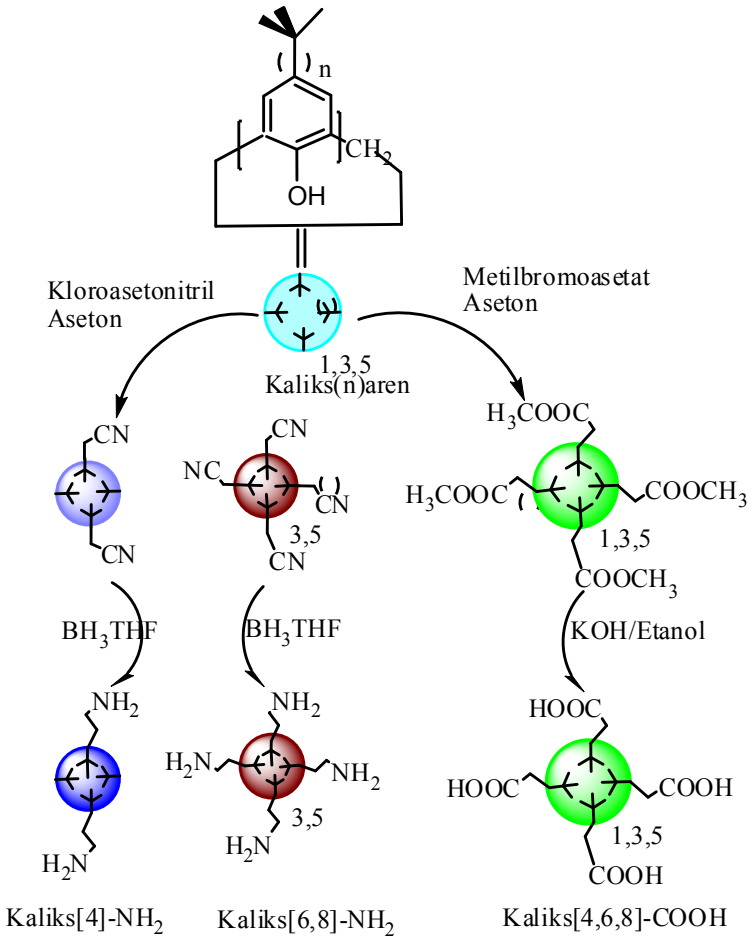
Şekil 2.1. Fe_3O_4 Manyetik nanopartiküllerin sentezi

Zeng ve ark. (2005), yaptıkları çalışmada Fe_3O_4 manyetik nanopartiküllerini hazırladıktan sonra amino alkil trimetoksisilan ile etkileştirerek silika-bazlı alkil amino Fe_3O_4 manyetik nanopartikülleri sentezlenmişlerdir (Şekil 2.2).



Şekil 2.2. Alkil amino-Fe_3O_4 Manyetik nanopartiküllerin sentezi

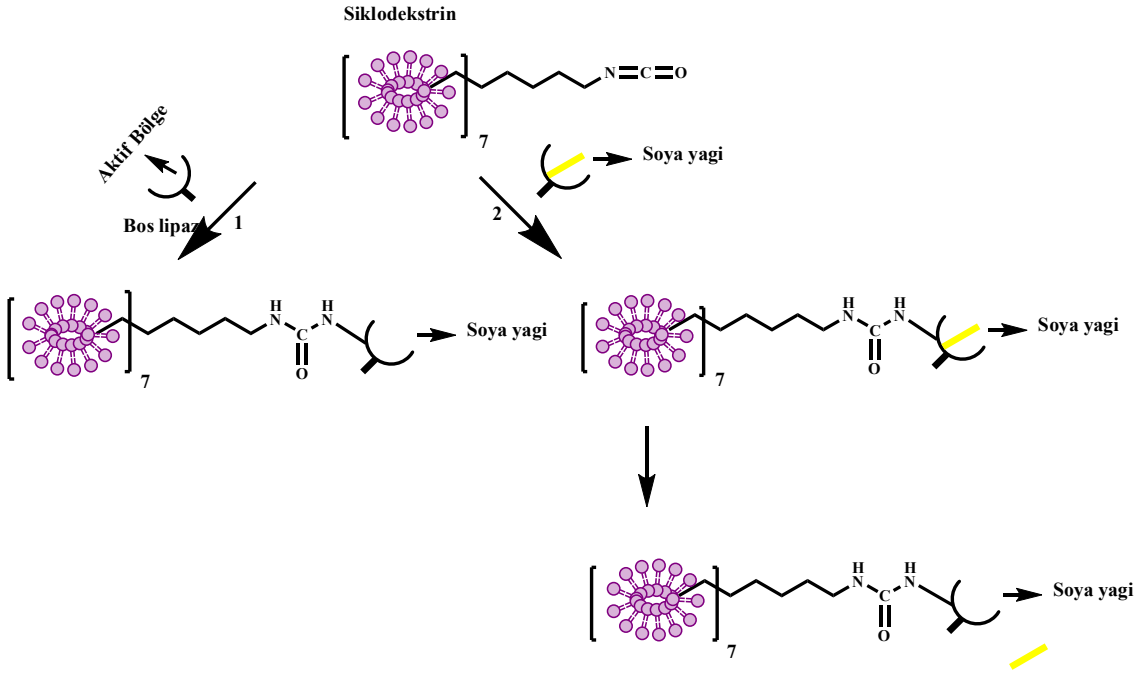
Sahin ve ark. (2009), bu çalışmada amino ve karboksil grubu taşıyan kaliks [4, 6 ve 8]aren bileşiklerini sentezleyerek lipaz immobilizasyonunu gerçekleştirmiş ve rasemik naproksenin enantiyoseçimli çalışmalarında kullanmışlardır. Bu çalışmada rasemik naproksen esterinin enantiyoseçimli hidrolizi yapılmış ve enantiyoseçimliliğinin çok yüksek olduğu görülmüştür (Şekil 2.3).



Şekil 2.3. Kaliksaren asit ve amin türevleri

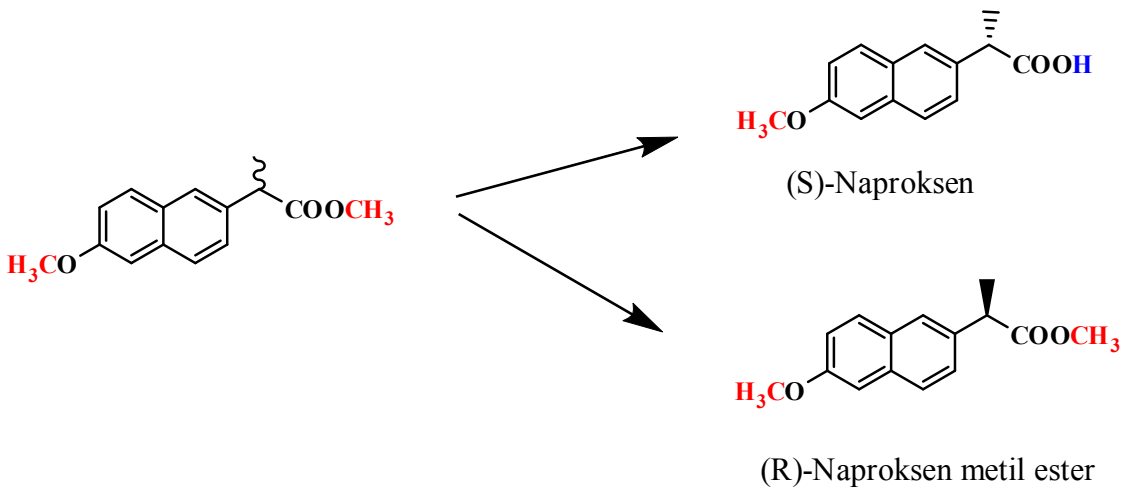
Tutar ve ark. (2009), bu çalışmada sporopollen'e *Candida Rugosa* lipazı immobilize ederek farklı pH ve sıcaklıktaki aktivitesini incelenmiştir. İmmobilize edilmeyen lipaz ve immobilize lipazın optimum pH'ının sırayla 6.0 ve 7.0 olduğu görülmüştür. Aynı zamanda immobilize edilmeyen lipaz ve immobilize lipazın sıcaklığa bağlı aktivitelerinin de sırasıyla 35°C ve 40°C olduğu görülmüştür.

Yilmaz ve ark. (2009), *Candida Rugosa* lipaz enzimini soya yağı ile etkileştirerek hekzametilen diizosiyonat fonksiyonlu *β*-siklodekstrin üzerine immobilizasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Elde edilen *β*-siklodekstrin-içeren immobilize lipazın, soya yağı ile etkileştirilmeyen immobilize lipaz'dan daha yüksek bir katalitik aktivitenin yanı sıra daha kararlı bir yapıya sahip olduğunu da görmüşlerdir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Candida rugoza lipazın soya yağı ile etkileşimi.

Yılmaz ve ark. (2010) *Candida Rugosa* lipaz enzimini sol-jel tutuklama metodunu kullanarak tetraetoksisilan (TEOS) ve oktiltrietoksisilan (OTES) varlığında sporopollenin'e immobilize etmişlerdir. Daha sonra hazırlanan immobilize lipazın katalitik özellikleri incelenmiş ve bulunan sonuçlar doğrultusunda resemik naproksenin enantiyoseçimli çalışmalarında kullanmışlardır (Şekil 2.5).

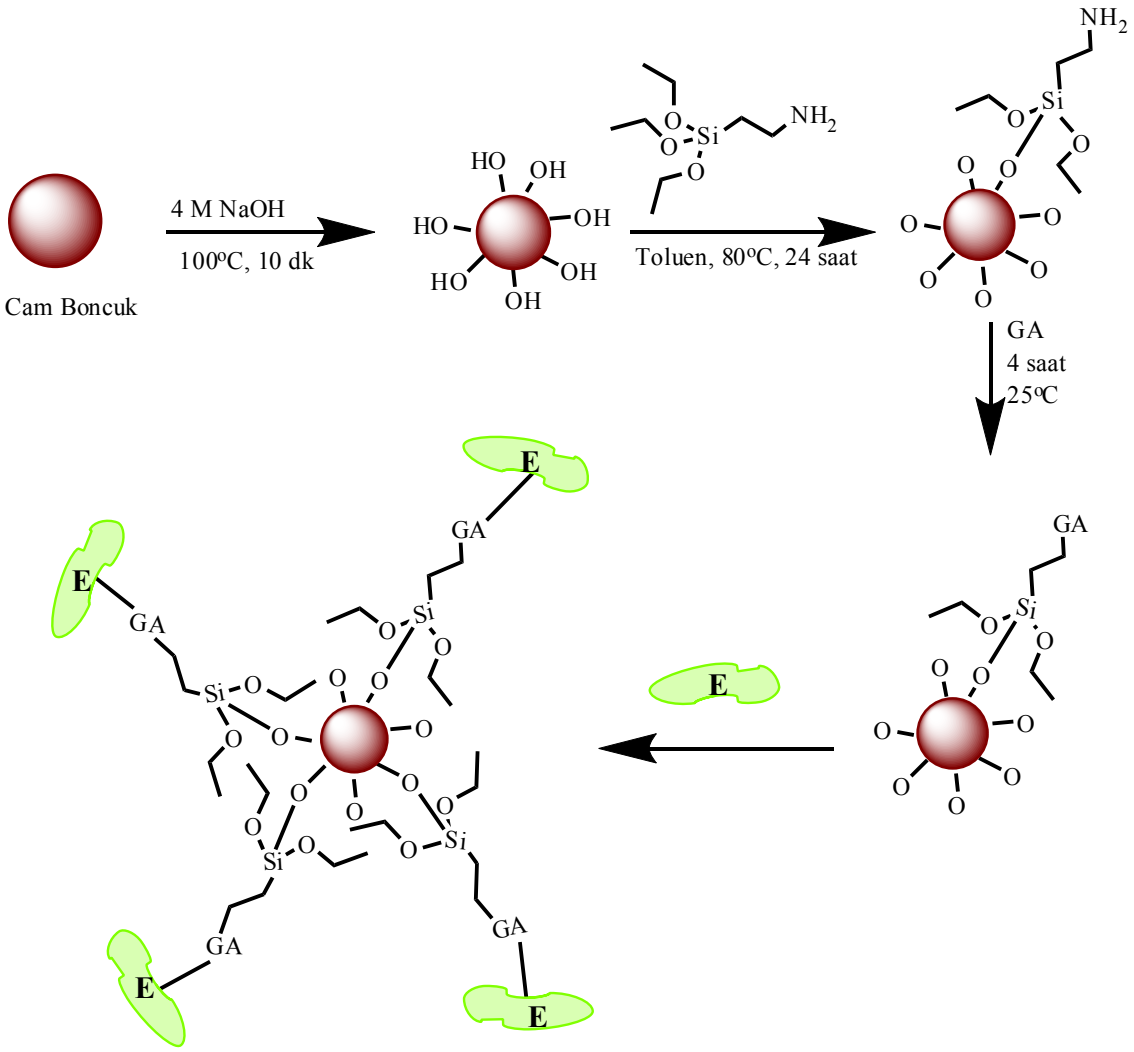


Şekil 1.5. Naproksen metil ester.

Yilmaz ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada *Candida Rugosa* lipazı, manyetik Fe_3O_4 nanopartükül ya da Fe_3O_4 bağlı sporopollenin varlığında ve yokluğunda sol-jel metodunu kullanarak tetraetoksisilan (TEOS) ve oktiltrietoksisilan (OTES) varlığında immobilize etmişlerdir. İmmobilize lipaz, *p*-nitro fenil palmitatın (*p*-NPP) ve rasemik naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz tepkimelerinde kullanılmıştır. Sporopollen bazlı lipazın (E>400), serbest enzime (E=166) göre daha yüksek enantiyoseçimliliğe sahip olduğu görülmüştür. S-Naproksen için enantiyoseçimliliği yaklaşık olarak %98 olarak bulunmuştur.

Uyanık ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada *Candida Rugosa* lipazı kaliks(aza)crows destek maddeleri varlığında sol-jel tutuklama metoduna göre immobilize etmişler ve rasemik naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz reaksiyonunda kullanmışlardır. Bu reaksiyon sonucunda immobilize lipazların 6 kullanımdan sonra kalan dönüşüm yüzdesinin % 18 olduğunu gözlemlemişlerdir.

Yilmaz ve ark. (2011), yaptıkları çalışmada cam boncukları aminopropil grubu taşıyan silika ile etkileştirilerek aminopropil cam boncukları elde etmişlerdir. Elde edilen bu cam boncuklarının glutaraldehitle reaksiyon sonucunda sonra serbest dialdehit grubu bulunduran ve enzim immobilizasyonunda kullanılabilecek yeni bir bileşik elde etmişlerdir. Sentezlenen bu bileşik rasemik naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz çalışmalarında kullanılmıştır. S-naproksen için %98 ee değeri ile immobilize lipazın (E>400) yüksek enantiyoseçimliliğe sahip olduğunu gözlemişlerdir (Şekil 2.6).

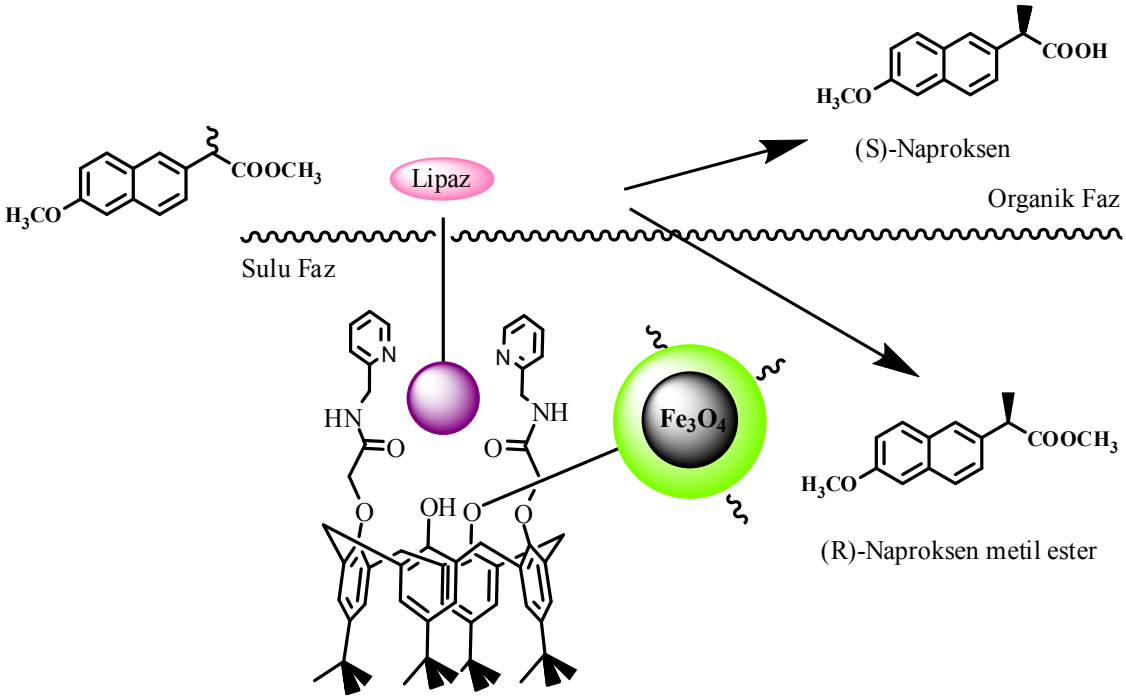


Şekil 2.6. Cam boncuk yüzeyine immobilizasyonun gösterimi.

Ozyilmaz ve Sayin (2013), yaptıkları çalışmada selüloz ve çitosan biopolimerleri üzerine uygun kaliksaren türevini immobilize ederek yeni biopolimerler elde etmişlerdir. *Candida Rugosa* lipaz enzimini sol-jel metodunundan yararlanarak tetraetoksisilan (TEOS) ve oktiltrietoksisilan (OTES) varlığında yeni biopolimere immobilize etmişlerdir. Bu bileşik, Rasemik naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz çalışmalarında kullanılmıştır. Kaliksaren bazlı meteryalin, naproksenin (E=300) enantiyoseçimliliğinin yüksek olduğu gözlenmiştir.

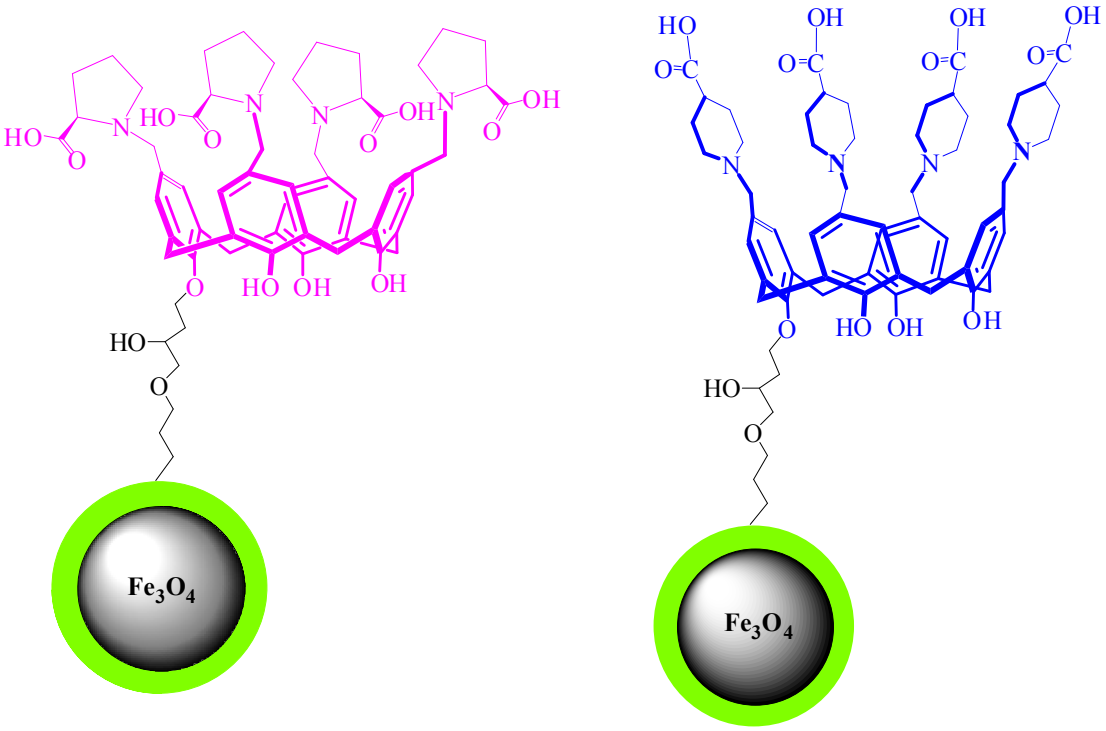
Ozyilmaz ve Sayin (2013), yaptıkları çalışmada manyetik Fe_3O_4 nanopartükülüne bağlı kaliks[4]aren'in dipridin türevini, *Candida Rugosa* lipaz ile immobilize etmişlerdir. İmmobilize lipazın, *p*-nitro fenil palmitatın (*p*-NPP) hidrolizi ile aktivitesi tayin edilmiş ve bu immobilize lipaz rasemik naproksen metil esterinin

enantiyoseçimli hidroliz tepkimelerinde kullanılmıştır. İmmobilize lipazın katalitik akitivitelerinin ve enantiyoseçiciliğinin (E>400) yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 2.7).



Şekil 2.7. Naproksen metil esterinin ekstraksiyon ile ayrılması

Akceylan ve ark. (2013), yaptıkları çalışmada *Candida Rugosa* lipazı, sol-jel metodundan yararlanarak manyetik nanopartükül ile kaplanan kaliks[4]aren karboksilik asit türevleri üzerine immobilize etmişlerdir. İmmobilize lipaz, *p*-nitro fenil palmitatın (*p*-NPP) ve naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizinde kullanılmıştır. İmmobilize lipazların (E=373, E=381) serbest enzime (E=137) daha yüksek enantiyoseçimliliğe sahip olduğu görülmüştür (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Kaliks[4]aren türevlerinin manyetik Fe_3O_4nanopartükülüne bağlanması.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1.Enstrümantal Teknikler

Erime noktası EZ-Melt marka erime noktası tayin cihazı ile yapıldı. NMR analizleri DMSO, D_2O ve $CDCl_3$ içinde Varian 400 MHz spektrofotometre ile gerçekleştirildi ve spektrumlardaki kimyasal kayma değerleri (δ) ppm cinsinden belirtildi. FT-IR spektrumları Perkin Elmer spektrum 100 ile alındı. UV-Vis ölçümlerinde Shimadzu160A UV-visible spektrofotometresi kullanıldı. TGA analizleri Seteram Evalution-1750'de argon ortamında gerçekleştirildi. HPLC ölçümleri Chiralcel OD-H (25 cm, 4.6 mm) kiral kolonu kullanılarak Agilent 1200 HPLC modeli ile gerçekleştirildi.

Analitik TLC'ler silika jel tabakasıyla (SiO_2, Merck 60 F_{254}) kaplanmış alüminyum plakalar kullanarak yapıldı. Sentez işlemlerinde kullanılan tüm kimyasallar Merck, Sigma-Aldrich ve Fluka'dan alındı. Tüm sulu çözeltiler, Millipore Milli-Q Plus su arıtma cihazıyla saflaştırılan saf su ilehazırlandı. HPLC de kullanılan çözücüler ve analitler HPLC saflıkta olup Merck' ten temin edildi.

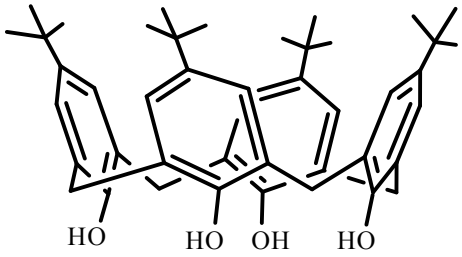
3.2.Kimyasal Sentezler ve Karakterizasyon

Bu çalışmada sentezlenen bileşiklerden bazıları literatürde bulunan metotlara göre hazırlandı bazıları ise daha önceki metotların modifiye edilmesiyle elde edildi. Aşağıda bu çalışmada kullanılan **1-17** nolu bileşiklerin genel sentetik prosedürleri verildi.

3.2.1. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28-tetrahidroksikaliks[4]aren (Gutsche, 1990)

1 L'lik bir balona, 50 g (0.665 mol) *p-t*-bütilfenol, 31.15 mL (0.83 mol) %37'lik formaldehit ve 0.6 g (0.03 mol) NaOH alınır. Reaksiyon karışımı, mantolu ısıtıcı ile sıcaklığı 110-120 ^oC da sabit tutularak ksilol cihazı takılı bir geri soğutucu sisteminde azot gazı altında 1.5-2 saat ısıtılır. Bu esnada reaksiyon karışımı viskoz bir halden önce turuncu renge daha sonra katı sarı bir kütleye dönüşür. Bu noktada karışım oda sıcaklığına kadar soğutulur ve 400-500 ml difenil eter ile süspanse edilip 1 saat

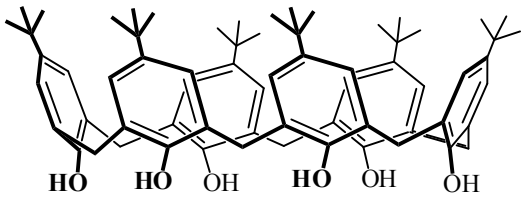
oda sıcaklığında karıştırılır. Azot girişi ve bir ksilol cihazı takılır, balon ısıtılarak suyun ortamdan uzaklaştırılması ve karışımın berraklaşması sağlanır. Su çıkışı tamamlandığında karışım bir geri soğutucu takılarak 1.5-2 saat kaynatılır. Daha sonra reaksiyon karışımı oda sıcaklığına soğutulur, 400-500 etil asetat ile muamele edilerek 1 saat karıştırılır ve sonra da çökmenin tamamlanması beklenir. Oluşan beyazımsı çökelek süzülüp iki kez 100 mL etil asetatla, bir kez 200 mL asetik asitle ve en son su ile yıkanır. Verim: 33.25 g (%62) E.n.: 342-344^{o}C (lit: 344-346 ^{o}C) ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.20 ppm (s, 36H, Bu^t), 3.45 ppm (d, 4H, $ArCH_2Ar$), 4.25 ppm (d, 4H, $ArCH_2Ar$), 7.05 ppm (s, 8H, ArH), 10.35 ppm (s, 4H, OH). Anal. Hesapl. $C_{44}H_{56}O_4$: C, 81.44; H, 8.70%. Bulunan: C, 81.59; H, 8.61%.



(**1**)

3.2.2. 5,11,17,23,29,35-Hekza-*ter*-bütil-37,38,39,40,41,42-hekzahidroksi kaliks[6]aren (Gutsche, 1990)

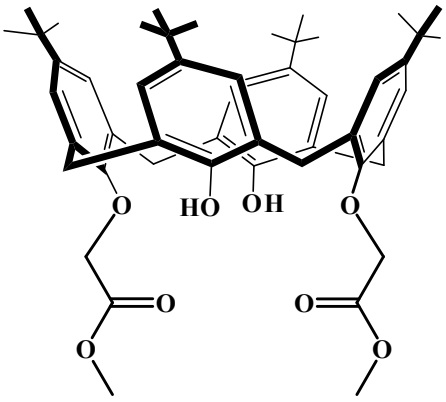
2 litrelik 3 ağızlı bir balona 100 g *p-ter*-bütil fenol (0,665 mol), %37'lik 135 mL formaldehit (1,80 mol) ve 15 g KOH (0,227 mol) eklenir. Reaksiyon karışımı 2 saat süre ile ısıtılır. Bu süre sonunda yaklaşık 85 mL su toplanır. Limon sarısı renkli çözelti altın sarısı rengini alır. Soğuduktan sonra bunun üzerine 1 litre ksilen eklenip, 3 saat boyunca geri soğutucu altında kaynatılır. Bu esnada reaksiyon karışımı sarıdan turuncuya döner. Karışım oda sıcaklığına soğutulur ve oluşan madde süzülür. Ürün 2,5 L kloroform da çözülür (hepsi çözünmez). 800 mL, 1M HCI ile etkileştirilir. Organik faz ayrılır, 250 mL kalıncaya kadar distile edilir. Daha sonra üzerine 1000 mL sıcak aseton dökülerek soğumaya bırakılır. Oluşan beyaz çökelek süzülerek alınır. Verim: 90-98 g (%88). E.n.: 371-373 ^{o}C (Lit., 372-374^{o}C). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.29 ppm (s, 54H, Bu^t), 3.90 ppm (d, 12H, $ArCH_2Ar$), 7.16 ppm (s, 12H, ArH), 10.42 ppm (s, 6H, OH). Anal. Hesapl. $C_{68}H_{90}O_6$: C, 81.39; H, 9.04%. Bulunan: C, 81.62; H, 9.31%.



(2)

3.2.3. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren (Collins, 1991)

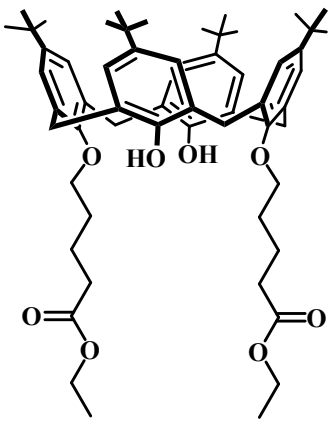
5 g (7.71) mmol *p-ter*-bütilkaliks[4]aren ve 1.29 g (9.4 mmol) K_2CO_3 250 mL aseton içerisinde 2 saat geri soğutucu altında kaynatıldı daha sonra 1.48 mL (16.19 mmol) metil bromasetat ilave edildi ve 24 saat kaynatılarak karıştırıldı. Soğutulan karışım süzüldü, süzüntü distillendi. Kalan katı etanol içerisinde kristallendirildi. Verim: % 65, E.n: 206-210 ^oC. IR: 3436 cm^{-1} (OH), 1755 cm^{-1} (C=O). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 0.97 ppm (s, 18H, Bu^t), 1.27 ppm (s,18H,Bu^t), 3.35 ppm (d, J = 13.1, 4H, $ArCH_2Ar$), 3.85 ppm (s, 6H, OCH_3), 4.48 ppm (d, J = 13.1, 4H, $ArCH_2Ar$), 4.75 ppm (s, 4H, OCH_2CO), 6.81 ppm (s, 4H, ArH), 6.97 ppm (s, 2H, ArOH),7.03 ppm (s, 4H, ArH). Anal. Hesapl. $C_{50}H_{64}O_8$: C, 75.73; H, 8.13%. Bulunan: C, 75.91; H, 8.29%. (Ek:1)



(3)

3.2.4. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-dietoksikarbonilbütoksi-26,28-dihidroksi kaliks[4]aren (Bitter, 1998)

2 g (4.63 mmol) *p-ter*-Bütilkaliks[4]aren ve 2.56 g (18.52 mmol) K_2CO_3 kuru aseton içerisindeki süspansiyonu geri soğutucu altında kaynatılarak 15 dk karıştırılır. Daha sonra üzerine 2,93 mL (18.52 mmol) etil-5-bromovalerat ilave edilir ve 5-7 gün geri soğutucu altında kaynatılır. Reaksiyon sonrasında karışım süzülür ve çözücünün büyük bir kısmı distile edilir ve kalan kısım metanol ile çöktürülür. Oluşan çökelek süzülerek alınır. Elde edilen katı ürün etanol-diklorometandan kristallendirilir. Verim: % 65, E.n: 169-171^oC (Lit.: 170-172^oC). IR: 3303 cm^{-1} (OH), 1722 cm^{-1} (C=O). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 0.97 ppm (s, 18H, Bu^t), 1.23 ppm (t, 6H, $OCH_2C\mathbf{H_3}$), 1.29 ppm (s,18H,Bu^t), 2.20 ppm (p, 8H, $OCH_2(C\mathbf{H_2})_2$), 2.49 ppm (t, 4H, CH_2CO), 3.35 ppm (d, J = 13.1, 4H, $ArCH_2Ar$), 4.00 ppm (t, 4H, OCH_2), 4.25 ppm (q, 4H, $OC\mathbf{H_2}CH_3$), 4.32 ppm (d, J = 13.1, 4H, $ArCH_2Ar$), 6.81 ppm (s, 4H, ArH), 7.03 ppm (s, 4H, ArH), 7.62 ppm (s, 2H, ArOH). Anal. Hesapl. $C_{60}H_{86}O_8$: C, 77.05; H, 9.27%. Bulunan: C, 77.51; H, 9.59%. (Ek:2)



(4)

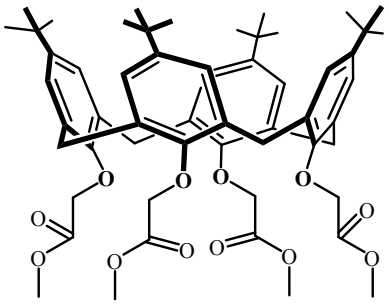
3.2.5. p-ter-Bütil kaliks(4)aren ile p-ter-bütil kaliks(6)arenlerin ester türevlerinin sentezi (Arnaud-Neu, 1989)

Genel prosedür:

p-ter-Bütilkaliks[4-6]aren ve K_2CO_3 (%50 mol fazlası)'ın kuru aseton içerisindeki süspansiyonu (yaklaşık %5) geri soğutucu altında kaynatılarak 15 dk karıştırılır. Daha sonra üzerine metil bromoasetat (%100 mol fazlası) ilave edilir ve 3-5 gün geri soğutucu altında kaynatılır. Reaksiyon sonrasında karışım süzülür ve çözücünün büyük bir kısmı distile edilir ve kalan kısım metanol ile çöktürülür. Oluşan çökelek süzülerek alınır. Elde edilen katı ürün etanol-diklorometandan kristallendirilir.

- **5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28-tetrametoksikarbonilmetoksi kaliks[4]aren**

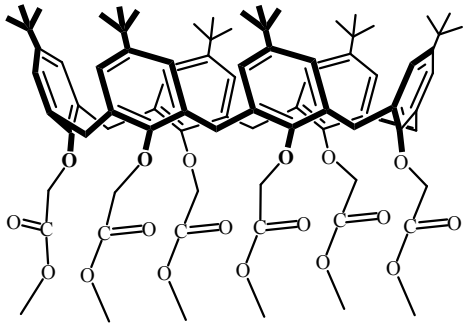
Verim: % 65, E.n: 215-218 ^oC. IR: 3430 cm^{-1} (OH), 1752 cm^{-1} (C=O). ^1H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.10 ppm (s,36 H,Bu^t), 3.20 ppm (d, J = 13.1, 4H, $ArCH_2Ar$), 3.85 ppm (s, 12H, OCH_3) 4.80 ppm (d, J = 13.1, 4H, $ArCH_2Ar$), 4.75 ppm (s, 8H, OCH_2CO), 6.81 ppm (s, 8H, ArH). Anal. Hesapl. $C_{56}H_{72}O_{12}$: C, 71.77; H, 7.24%. Bulunan: C, 71.89; H, 7.62%. (Ek:3)



(5)

- **5,11,17,23,29,35-hekza-*ter*-bütil-37,38,39,40,41,42-hekzametoksikarbonil metoksikaliks[6]aren**

Verim: %85, E.n.: 245-252^{o}C. IR: 1751 cm^{-1} (C=O). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.15 ppm (s, 54H, Bu^{t}), 3.40 ppm (brs, 18H), 4.10-4.33 ppm (m, 24H), 7.25 ppm (s, 12H). Anal. Hesapl. $C_{86}H_{114}O_{18}$: C, 71.94; H, 8.0 %. Bulunan: C, 72.19; H, 8.32%. (Ek:4)



(6)

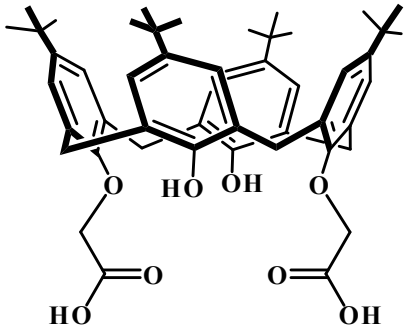
3.2.6. Kaliks(n)arenlerin ester türevlerin hidrolizi (Collins 1991)

6 g *p*-ter-Bütilkaliks[n]arenin ester türevi ve 30 mL %15'lik sulu NaOH çözeltisi 300 mL etanol içerisinde 24 saat geri soğutucu altında karıştırılarak kaynatılır. Bu süre sonunda çözücü distillenir. Geriye kalan kısım 300 mL su ve 3 M HCl den 25 mL ilave edilerek pH=1'e ayarlanır. Çökelti süzülür, kloroform fazına alınarak 3 M HCl ve daha sonra da su ile yıkanır ve kurutulur. Oluşan ham ürün sıcak etanolden kristallendirildirilerek %95 verimle elde edildi.

- **5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-dihidroksikarbonilmetoksi-26,28-di hidroksikaliks[4]aren**

E.n.:>220^{o}C bozunma IR : 3417 cm^{-1} (OH), 1731 cm^{-1} (C=O). ^{1}H NMR ($CDCl_3$) δ: 1.03 ppm (s, 18H, Bu^{t}), 1.30 ppm (s, 18H, Bu^{t}), 3.38 ppm (d, 4H, *J*= 13.8 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.23 ppm (d, 4H, *J*= 13.8 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.70 ppm (s, 4H, OCH_2CO),

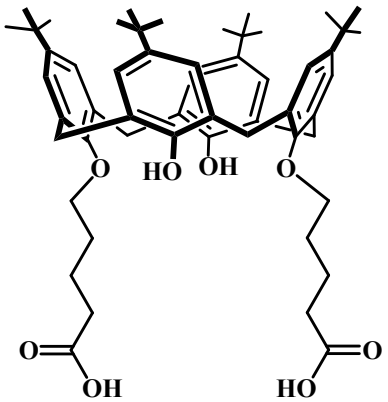
6.88 ppm (s, 4H, ArH), 7.08 ppm (s, 4H, ArH). Anal. Hesapl. $C_{48}H_{60}O_8$: C, 75.36; H, 7.91%. Bulunan: C, 75.68; H, 8.25%. (Ek:5)



(7)

- **5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dihidroksikarbonilbütoksi-26,28-di hidroksikaliks[4]aren**

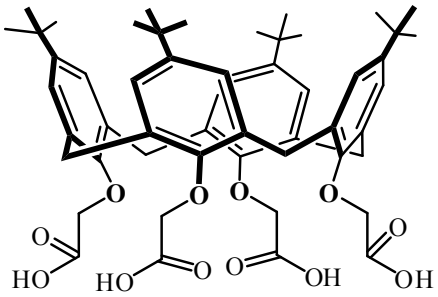
Verim: % 70, E.n: 202-205^{o}C. IR: 3304 cm^{-1} (OH), 1708 cm^{-1} (C=O). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.00 ppm (s, 18H, Bu^t), 1.20 ppm (s, 18H, Bu^t), 2.05 ppm (p, 8H, $OCH_2(CH_2)_2$), 2.56 ppm (t, 4H, CH_2CO), 3.35 ppm (d, J = 13.1, 4H, $ArCH_2Ar$), 3.98 ppm (t, 4H, OCH_2) 4.30 ppm (d, J = 13.1, 4H, $ArCH_2Ar$), 6.81 ppm (s, 4H, ArH), 7.65 ppm (s, 2H, ArOH),7.03 ppm (s, 4H, ArH). Anal. Hesapl. $C_{54}H_{72}O_8$: C, 76.38; H, 8.55%. Bulunan: C, 76.81; H, 8.83%. (Ek:6)



(8)

- **5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28-tetrahidroksikarbonilmetoksi-kaliks[4]aren**

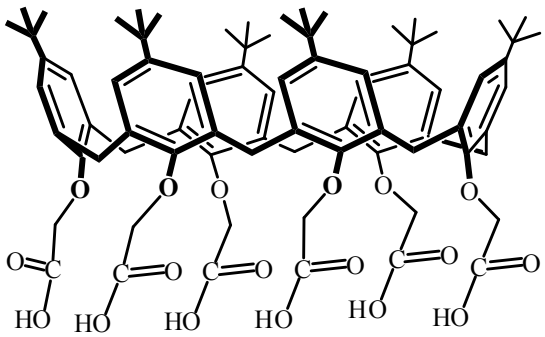
Verim: %65, E.n: 215-218°C. IR: 3430 cm^{-1} (OH), 1734 cm^{-1} (C=O). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.10 ppm (s, 36 H, Bu^t), 3.20 ppm (d, J = 13.1, 4H, $ArCH_2Ar$), 4.80 ppm (d, J = 13.1, 4H, $ArCH_2Ar$), 4.75 ppm (s, 8H, OCH_2CO), 6.81 ppm (s, 8H, ArH), 6.97 ppm (s, 4H, ArOH). Anal. Hesapl. $C_{52}H_{64}O_{12}$: C, 70.89; H, 7.32%. Bulunan: C, 71.27; H, 7.79%. (Ek:7)



(9)

- **5,11,17,23,29,35-Hekza-*ter*-bütil-37,38,39,40,41,42-hekzahidroksikarbonil metoksikaliks[6]aren**

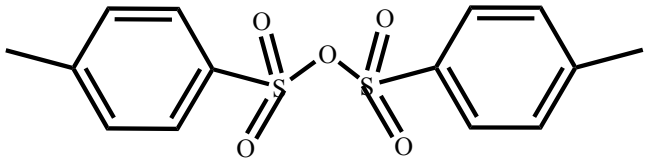
Verim: %85, E.n.: 245-255°C. IR: 1734 cm^{-1} (C=O). ^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 1.15 ppm (s, 54H, Bu^t), 4.10-4.33 ppm (m, 24H), 7.25 ppm (s, 12H). Anal. Hesapl. $C_{80}H_{102}O_{18}$: C, 71.09; H, 7.61%. Bulunan: C, 71.22; H, 7.83%. (Ek:8)



(10)

3.2.8. *p*-Toluensulfonik anhidritin hazırlanması (Luzardo-Alveraz, 2012)

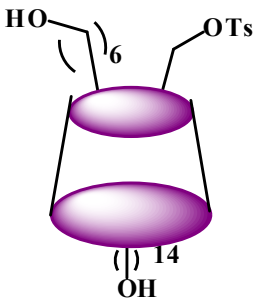
5.0 g (26.234 mmol) tosil klorür ve 1.28 g (6.726 mmol) tosik asit'in 150 mL lik CH_2Cl_2 deki karışımı 12 saat oda sıcaklığında karıştırıldıktan sonra karışım silikajel üzerinden süzülür. Ham ürün n-heksan ile saflaştırılarak, saf *p*-toluensulfonik anhidrit (2.9 g) elde edilir.E.n.:75-78 ^oC.^{1}H-NMR ($CDCl_3$) δ: 2.48 ppm (s, 6H, -CH_3), 7.40 ppm (d, 4H, *J*=6.8 Hz, ArH), 7.90 ppm (d, 4H, *J*= 7.6 Hz, ArH). $C_{14}H_{14}O_5S_2$: C, 51.52; H, 4.32; S, 19.65%. Bulunan: C, 51.61; H, 4.47; S, 19.81%. (Ek:9)



(11)

3.2.9. Mono-6-deoksi-6-(*p*-toluensulfonil)-β-siklodekstrin (Luzardo-Alveraz, 2012)

5.75 g siklodekstrin (5.066 mmol) 150 mL saf su içinde çözülür ve 2.45 g Ts_2O (7.506 mmol) bu karışıma ilave edilerek oda sıcaklığında 2 saat karıştırılır. Sulu 2.5 g NaOH (50 mL H_2O) çözeltisi bu karışıma ilave edilir ve 10 dakika sonra çöken fazla Ts_2O süzülerek ortamdan alınır. Süzüntünün pH'ı NH_4Cl ve HCl kullanılarak 8.0 yapılır. Çöken saf bileşik vakum etüvünde kurutulur. Verim: 2.14 g (% 33). E.n.: 180-182°C. ^{1}H-NMR (DMSO) δ: 2.43 ppm (s, 3H, -CH_3), 3.15-3.35 ppm (m, HOD perdelemiş, 12H), 3.41-3.80 ppm (m, 30H), 4.41-4.60 ppm (m, 6H, OH), 4.75-4.91 ppm (m, 7H), 5.85-5.65 ppm (m, 14H, OH), 7.48 ppm (d, 2H, J=8.21 Hz, ArH), 7.79 ppm (d, 2H , *J*=8.21 Hz, ArH). $C_{49}H_{76}O_{37}S$: C, 45.65; H, 5.94; S, 2.49%. Bulunan: C, 46.07; H, 6.28; S, 2.93%. (Ek:10)

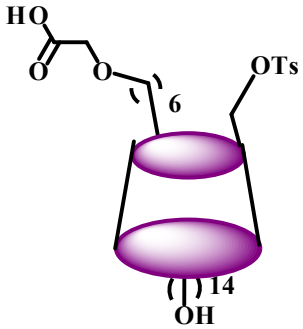


(TsCD)

(12)

3.2.10. Heksa-etanoik asit-mono-(*p*-toluensulfonil)-β-siklodekstrin (CD-(COOH)$_6$)

1 g TsCD (0.776 mmol) nin 10 mL DMF ve 20 mL THF'den oluşan karışımına 0,16 g NaH (6.593 mmol) ilave edilir ve 10 dakika azot gazı altında 60^{o}C de karıştırılır. Sonra 0.47 g klor asetik asit (4.965 mmol) bu karışıma ilave edilerek 15 saat boyunca geri soğutucu altında kaynatılır. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığına getirildikten sonra aseton eklenerek çökelek oluşturulur. Oluşan katılar süzülerek ayrılır ve vakum etüvünde kurutulur. Verim: 0.64 g (% 50.4). En: 203-205 ^{o}C. ^{1}H-NMR (DMSO) δ: 2.40 ppm (s, 3H, -CH_3), 3.16-3.63 ppm (m, 42H), 4.52 ppm (brs, 14H, -CH_2), 4.82 ppm (brs, 7H, -O-CH), 7.28-7.47 ppm (m, 22H, ArH ve -OH), 7.72 ppm (d, 2H , *J*=8.0 Hz, ArH). $C_{61}H_{88}O_{49}S$: C, 44.75; H, 5.42; S, 1.96%. Bulunan: C, 45.13; H, 5.97; S, 2.32%. (Ek:11)

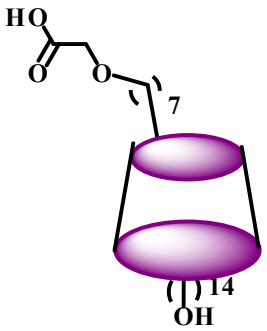


CD-(COOH)$_6$

(13)

3.2.11. Karboksimetil-β-siklodekstrin (CD-$(COOH)_7$) (Li, 2011)

2.84 g β-CD (0.776 mmol) 20 ml su içerisine alınır ve karışım üzerine 2,5 g NaOH (62.5 mmol) ilave edilir ve 10 dakika azot gazı altında 70^oC de karıştırılır. Daha sonra 2 g klor asetik asit (4.965 mmol) bu karışıma ilave edilerek 7 saat boyunca 70 ^oC de karıştırılır. Reaksiyon tamamlandıktan sonra karışım oda sıcaklığına getirilir sonra pH 4-6 olacak sekilde (HCl ile) ayarlanır. Aseton eklenerek çöktürülür. Oluşan katılar süzülerek ayrılır ve vakum etüvünde kurutulur.Verim: 3,14 g (% 70); IR: 1731 cm^{-1} (C=O). ^{1}H-NMR (DMSO) δ: 3.48 ppm (m, 14H, -CH), 3.65-3.81 ppm (m, 49H, -OCH, $-OCH_2$, $-CH_2COO$), 4.94 ppm (brs, 9H, -OH), 5.16 ppm (brs, 5H, -OH). $C_{56}H_{84}O_{49}$: C, 43.64; H, 5.49%. Bulunan: C, 43.99; H, 5.92%. (Ek:12)



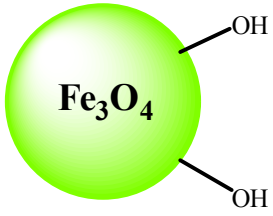
CD-$(COOH)_7$

(14)

3.2.12. Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülünün sentezi (Zeng, 2005)

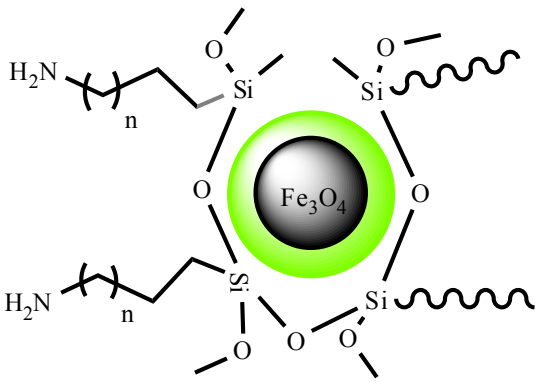
1 M $FeCl_2$ ve 1,75 M $FeCl_3$ çözeltileri 1:1 oranında alınır ve 250 mL'lik üç boyunlu reaksiyon balonunda geri soğutucu altında N_2 atmosferinde 60^oC ye kadar ısıtılır. Reaksiyon ortamı 60 ^oC'ye ulaştığında % 25 NH_4OH ile pH ~ 10-11'e ayarlanır. Ortam bazik olduğunda demir oksit partiküllerinin oluşması ile birlikte reaksiyon ortamı koyu kahverengi renge dönüşür. Bu aşamadan sonra reaksiyon 80^oC de 1 saat daha geri soğutucu altında ısıtılır. Reaksiyon sonunda manyetik nanopartiküller bir mıknatıs yardımıyla su içerisinden alınır ve yine deiyonize su ile pH nötral oluncaya kadar

yıkanır. Nanopartiküller vakumlu etüvde 70°C'de 12 saat kurutulur. Koyu kahverengi Fe_3O_4 partikülleri elde edilir. FTIR: (Fe_3O_4) Fe-O bandı 578 cm^{-1}'de görüldü.



3.2.13. Manyetik Fe_3O_4 nanopartikülünün APTES ile modifiye edilmesi (Zeng, 2005)

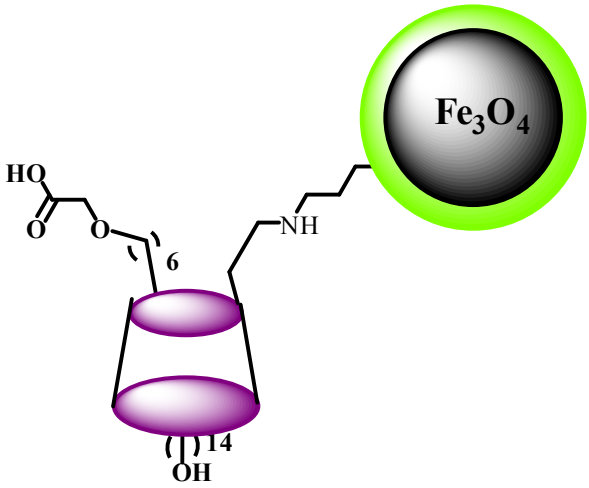
1 g Fe_3O_4 nanopartikülleri 60 mL etanol içerisine ilave edilir ve 1 saat karıştırılır. Ardından 12 mL NH_4OH çözeltisi eklenir ve 10 dk süre ile karışım homojen oluncaya kadar karıştırılır. Sürekli mekanik karıştırma altında, reaksiyon karışımına 6 mL APTES eklenir. Reaksiyon 50°C'de 8 saat karıştırılır. Reaksiyon sonucunda manyetik partiküller bir mıknatıs yardımıyla alınır ve sırasıyla etilalkol, deyonize H_2O ile nötral pH' a kadar yıkanır. Ardından manyetik partiküller vakum altında 12 saat kurutulur. FTIR: 2984 cm^{-1} (-CH_2) titreşim bandları, 1637 cm^{-1}amin bandı (NH_2), 1115 ve 1047 cm^{-1}(Si–O) ve 578 cm^{-1} Fe–O



(15)

3.2.14. CD-$(COOH)_6$-MN sentezi

0.5 g Heksa-etanoik asit-mono-(*p*-toluensulfonil)-β-siklodekstrin ve 1 g Fe_3O_4-APTES, 30 mL DMF içinde suspanse edilir. Daha sonra bu karışım 70°C de 24 saat karıştırılır. Reaksiyon sonrası ürün manyetik ayırma ile alınır ve manyetik nanopartiküller EtOH ve distile su ile yıkanır. Daha sonra vakum etüvünde kurutulur. FT-IR; 1658 cm^{-1} (COONa), 1414 ve 1318 cm^{-1} (siklodekstrine ait), 1146, 1029, 946 ve 793 cm^{-1} (Si-O ve sikodekstrine ait), 576 cm^{-1} (Fe-O).

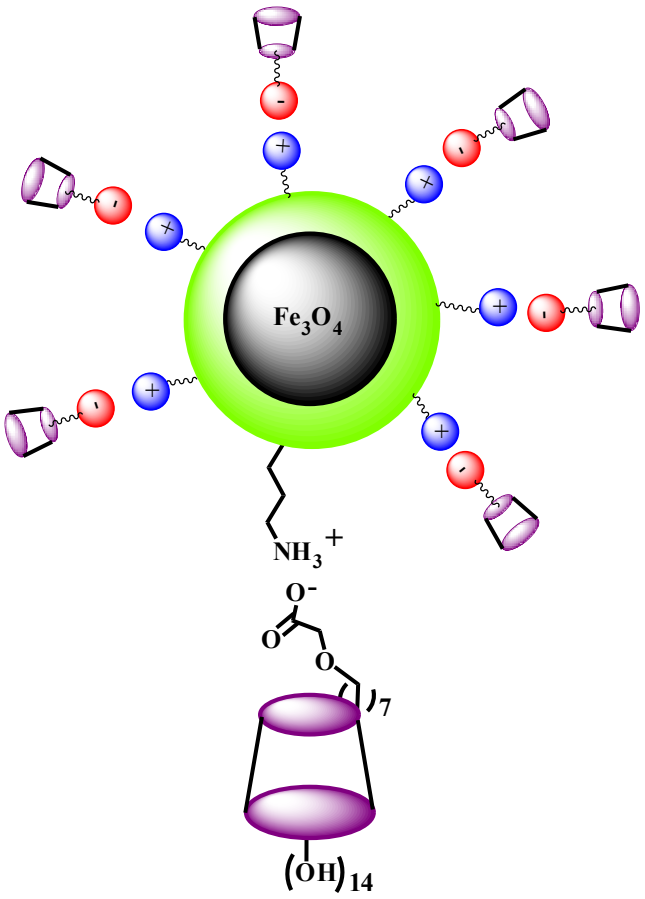


CD-$(COOH)_6$-MN

(16)

3.2.15. CD-$(COOH)_7$-MN sentezi

1 g Fe_3O_4-APTES' in 80 mL DMF/THF (1:1) deki karışımına 1 g CD-$(COOH)_7$ ilave edilerek 48 saat geri soğutucu altında karıştırılarak kaynatıldı. Reaksiyon sonrası ürün manyetik ayırma ile alınır ve manyetik nanopartiküller EtOH ve distile su ile yıkanır. Daha sonra vakum etüvünde kurutulur. FT-IR; 1659 cm^{-1} (COONa), 1596 cm^{-1} (amid C=O), 1414 ve 1318 cm^{-1} (siklodekstrine ait), 1147, 1046, 943 ve 790 cm^{-1} (Si-O ve sikodekstrine ait), 590 cm^{-1} (Fe-O).



CD-(COOH)$_7$-MN

(17)

3.2.16. Sol-gel metoduna göre Lipaz İmmobilizasyonu

- **Kaliksarenlerin Sol-jel tutuklama metodu (Reetz, 2003)**

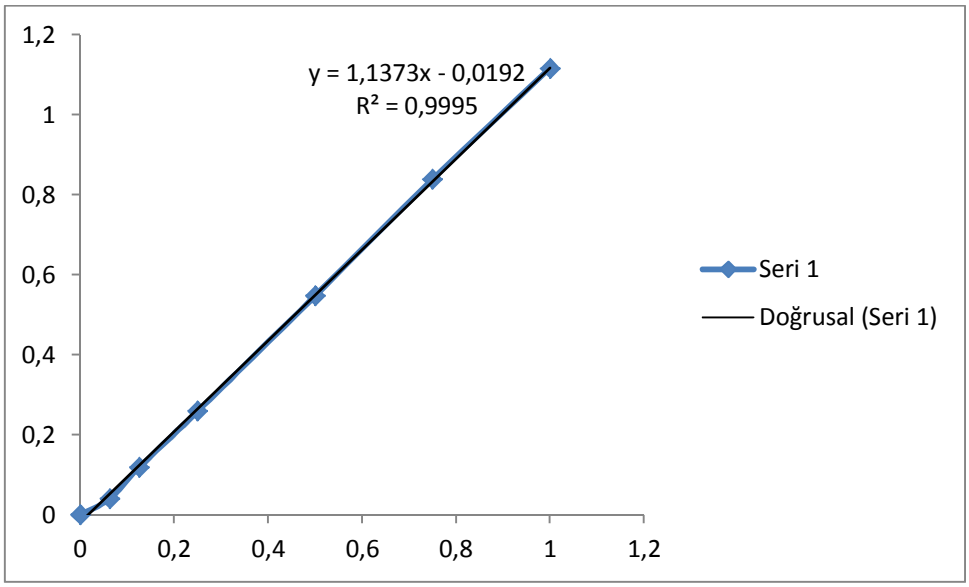
245 mg *Candida rugosa* lipazı, 1,56 mL fosfat tamponu içerisinde (0,05 M, pH 7,0) karıştırıldı. Karışım üzerine 0,1 g kaliksaren, 0,1 g Fe_3O_4, 400 µL polivinil alkol (%4 w/v), 200 µL NaF çözeltisi (0,1 M) ve 400 µL isopropil alkol ilave edilerek karıştırılıp homojenize edilir. Daha sonra 460 µL tetrametoksisilan (TMOS, 0,5 mmol) ve 3144 µL oktil trietoksisilan (2,5 mmol) konularak karıştırılır. 1-2 dk sonra jel oluşumu başlar. Oluşan bu jelatimsi karışım bir gece +4^{o}C de bekletilerek 10 mL distile su ve 10 mL izopropil alkol ile yıkandı. Yıkama çözeltileri Bradford metoduna göre protein tayininde kullanıldı. Daha sonra karışım liyofilizatörde kurutuldu.

- **β-Siklodekstrinlerin Sol-jel tutuklama metodu (Reetz, 2003)**

245 mg *Candida rugosa* lipazı, 1,56 mL fosfat tamponu içerisinde (0,05 M, pH 7,0) karıştırıldı. Karışım üzerine 0,2 g siklodekstrin bazlımanyetik nanopartikül, 400 µL polivinil alkol (%4 w/v), 200 µL NaF çözeltisi (0,1 M) ve 400 µL isopropil alkol ilave edilerek karıştırılıp homojenize edildi. Daha sonra 460 µL tetrametoksisilan (TMOS, 0,5 mmol) ve 3144 µL oktil trietoksisilan (2,5 mmol) konularak karıştırıldı. 1-2 dk sonra jel oluşumu başladı. Oluşan bu jelatimsi karışım bir gece +4^{o}C de bekletilerek 10 mL distile su ve 10 mL izopropil alkol ile yıkandı. Yıkama çözeltileri Bradford metoduna göre protein tayininde kullanıldı. Daha sonra karışım liyofilizatörde kurutuldu.

- **Protein miktarı (Bradford, 1976)**

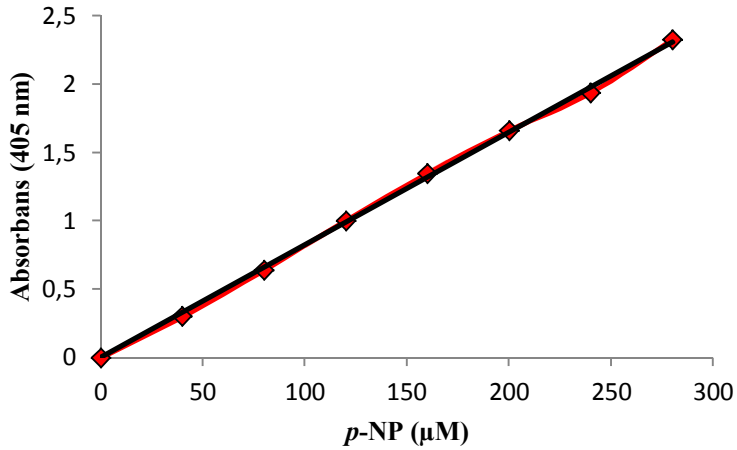
Serbest ve immobilize lipaz içerisindeki protein miktarı Bradford metoduna göre bulunur. Bunun için standart olarak Bovin serum albumin (BSA)'in belirli konsantrasyonlardaki çözeltileri hazırlanarak bu çözeltilerin 0,1 mL'si 3 mL Bradford reagent (Coomassie Brilliant Blue G-250) ile etkileştirilip 595 nm dalga boyundaki absorbansları ölçülür. Standart olarak, absorbans-protein miktarı (mg/ml) grafiği çizilir ve yapılan protein çalışmalarında bu grafik referans alınır (Şekil 3.1).



Şekil 3.1. Standart protein miktarı (mg/ml)- absorbans grafiği (λmax =595 nm)

- **Aktivite Tayini (Hung, 2003; Chiou, 2004)**

1 mL fosfat tampon çözeltisi (pH 7,0) içerisinde bulunan belirli miktarlardaki serbest lipaz veya immobilize lipaz (belli miktarda alınan) karışımına 2-propanol içerisinde hazırlanan 14,4 mM'lık *p*-NPP çözeltisinden 1 mL ilave edilerek oda sıcaklığında 5 dk karıştırılır. Daha sonra reaksiyon 2 mL 0,5 N Na_2CO_3 ilavesiyle durdurulur. Karışım santrifüj edilerek, enzimatik aktivite UV-visible spektrofotometresinde, açığa çıkan *p*-nitrofenol'ün (*p*-NP) 405 nm dalga boyundaki absorbansı ölçülerek bulunur. Bu absorbans değeri standart olarak çizilen *p*-NP (mol/litre) kalibrasyon grafiğinde yerine konularak açığa çıkan *p*-NP'ın miktarı spektrofotometrik olarak tespit edilir. Lipazın 1 Unit (U)'i, dakikada 1 µmol *p*-NPP hidroliz etmek için gerekli olan lipaz miktarıdır. Bu verilerden yararlanılarak serbest ve immobilize lipazların aktiviteleri belirlenir (Şekil 3.2).



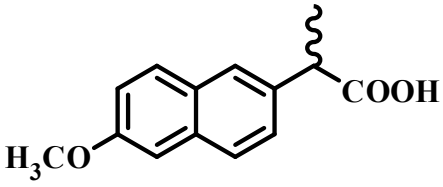
Şekil 3.2. Standart *p*-NP (*p*-nitrofenol)- absorbans grafiği (*λmax=405 nm*)

3.2.17. HPLC çalışmaları

- **(*S*)-Naproksen'in Rasemleştirilmesi (Wu ve Liu 2000)**

2 g (*S*)-Naproksen ve 1.78 g sodyum hidroksit (NaOH) 15 mL etilenglikol içerisinde 175°C'de 6 saat geri soğutucu altında karıştırılarak kaynatılır. Reaksiyon

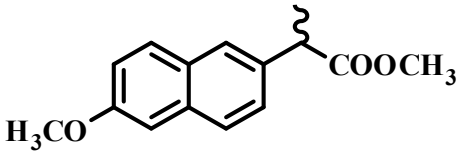
sonrasında karışım üzerine distile su ilave edilir ve pH 4.0'e ayarlanır. Oluşan ürün süzülerek su ile yıkanır ve vakum altında kurutulur.



(R/ S)- Naproksen

- **(*R*/*S*)-Naproksen Metil Ester Sentezi (Takaç ve Bakkal, 2007)**

4 mmol (R/S)-Naproksen 30 mL metanol içerisinde çözülür. Daha sonra üzerine 1 mL H_2SO_4 ilave edilerek karıştırılarak kaynatılır. 2 saat sonra reaksiyon ortamına distile su ilave edilerek ürün çöktürülür. Oluşan ürün kloroform ile ekstraksiyon yapılarak organik faza alınır. Organik faz $MgSO_4$ ile kurutulur. Organik fazın vakum altında uzaklaştırılması ile (R/S)-Naproksen metil ester türevi elde edilir. Verim % 90 ^{1}H-NMR $CDCl_3$ δ: 1.6ppm (d,3H, *J*=7.4 Hz), 3.63 ppm (s, 3H), 3.86 ppm (q, 1H, *J*=7.0 Hz), 3.92 ppm (s, 3H) 7.15 ppm (m, 2H), 7.4ppm (m, 1H), 7.65 ppm (m, 3H) (Ek:15)



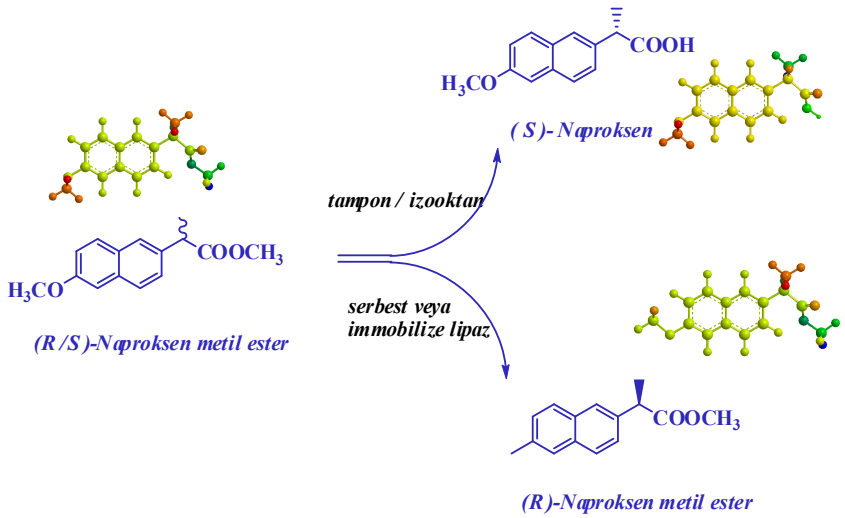
(R/S)-Naproksen metil ester

- **Enantioseçimli Tepkimelerin Genel Prosedürü (Cernia, 2002)**

5 mL'lik vial içerisine 2 mL serbest enzim çözeltisi (0,781mg/mL, pH 7.0, 0,05 M fosfat tamponu) ya da serbest lipaz'a eşdeğer Unit'de immobilize lipaz konulur. Daha sonra üzerine 100 µL (R/S)-Naproksen metil esterinin izooktandaki çözeltisi (20 mM) ilave edilir ve 24 saat 35 ^oC de çalkalamalı inkübatör içerisinde karıştırılır. Daha sonra karışım üzerine 2 mL izooktan konularak ekstraksiyon yapılır. İzoktan fazındaki

numune, HPLC cihazına verilerek (R/S)-Naproksen metil esterinin (R)-Naproksen ya da (S)-Naproksen'e enantiyomerik olarak dönüşümü belirlenir.

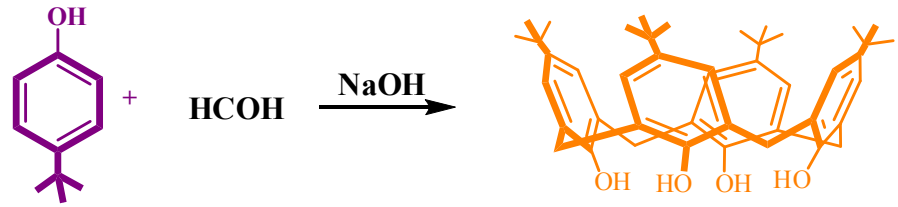
Bunun için kiral bir kolon olan Chiralcel OD-H kolon, n- hekzan / 2-propanol /trifloroasetikasit 100/1/0,1 (h/h/h) oranında taşıyıcı fazında 1 ml/ dk akış hızında gerçekleştirilmiş ve UV dedektörde (λ = 254 nm) okunur (Şekil 3.3).



Şekil 3.3.(R/S)-Naproksen metil ester

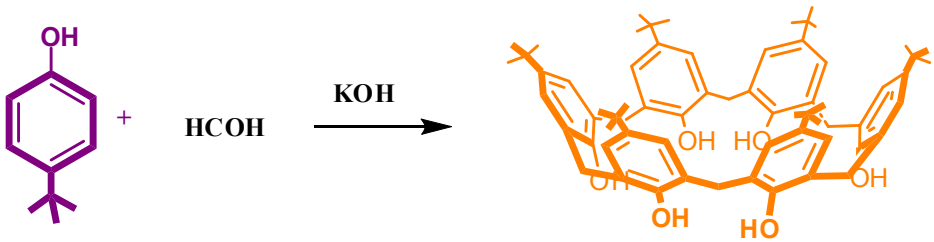
4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

Supramoleküler kimyada makrosiklik bileşiklerin, kullanımının yaygın olması sebebiyle, önemi her geçen gün artmaktadır. Son yıllarda bu bileşikler içerisinden en çok kullanılanı kaliksarenlerdir. Çünkü kaliksarenler diğer bileşiklere göre yüksek verimde ve kolay sentezlenebilmekte, ayrıca daha kolay ve yaygın modifiye edilebilmektedir. Bu çalışmada amaç, farklı karboksilik asit grubu taşıyan kaliks[n]aren (n = 4 ve 6) ve siklodekstrinlerin türevlerini hazırlayarak, bazı profen türü ilaçlarla lipaz katalizli enantiyoseçimli tepkimelerin çalışmasında kullanılmaktadır.



(1)

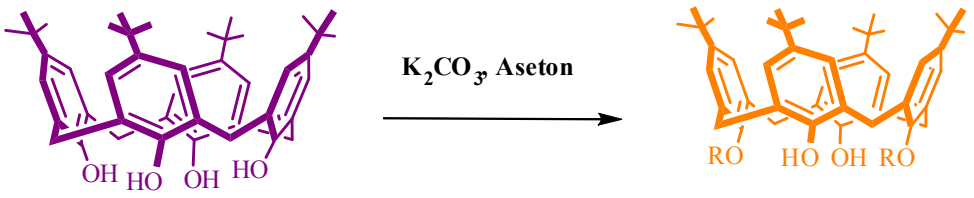
Bu amaçla başlangıç maddesi olan *p-ter*-bütilkaliks[4]aren (**1**) literatüre (Gutsche 1990) göre sentezlendi. ^{1}H-NMR spektrumunda δ: 3.45 ppm'de ve δ: 4.25 ppm'de görülen dublet 4 protonun ArC**H$_2$**Ar grubuna ait olduğu gözlendi. Bu sonuçlar *p-ter*-bütilkaliks[4]aren'in oluştuğunu doğrulamaktadır.



(2)

Daha sonra halka boşluk hacmi *p-ter*-bütilkaliks[4]arenden daha büyük olan *p-ter*-bütilkaliks[6]aren (**2**), bir diğer başlangıç maddesi olarak literatüre (Gutsche, 1990) göre sentezlendi. ^{1}H-NMR spektrumunda δ: 3.90 ppm'de görülen dublet 12 protonun

Ar**CH$_2$**Ar grubuna ait olduğu gözlendi. Bu sonuçlar *p-ter*-bütilkaliks[6]aren'in oluşturduğunu doğrulamaktadır.

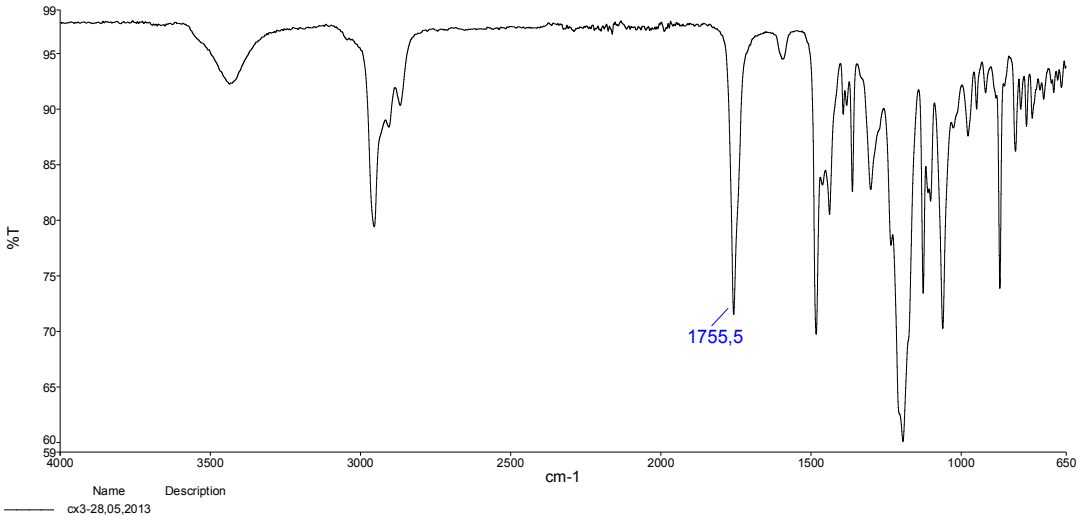


R= CH_2COOCH_3 (3)

R=$CH_2(CH_2)_3COOCH_2CH_3$ (4)

Sentezlenen *p-tert*-bütilkaliks[4]aren, brom alkil ester türevi ile K_2CO_3 varlığında kuru aseton içerisinde literatüre göre (Collins 1991) etkileştirilerek *p-tert*-bütilkaliks[4]aren diester türevlerine dönüştürüldü.

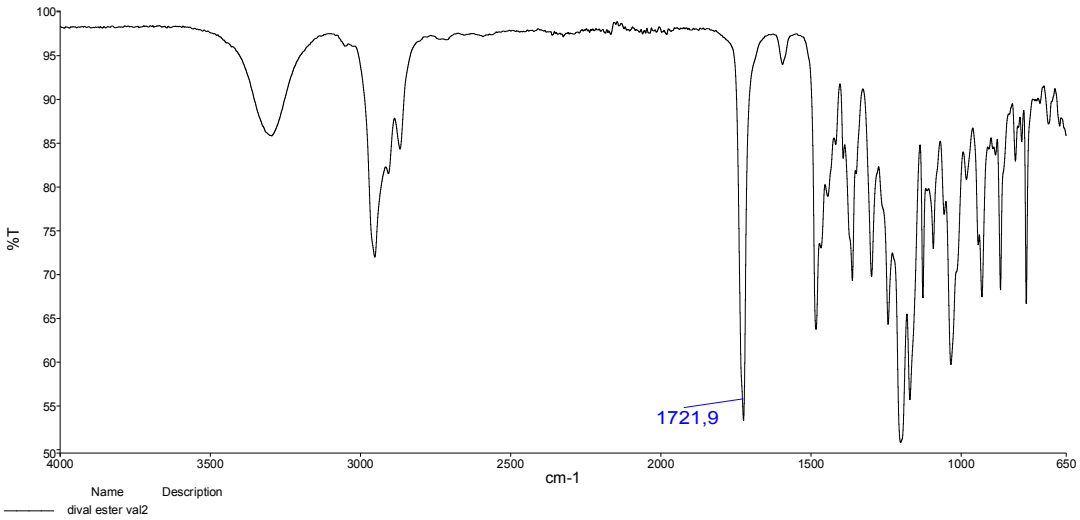
Bileşik **(3)**'ün; IR spektrumunda görülen 1755 cm^{-1}'deki ester karbonil bandına ait titreşim bağlanmanın gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.1). Ayrıca bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda δ: 3.85 ppm'de görülen singlet 6 protonun OC**H$_3$** grubuna, δ: 4.75 ppm'de görülen singlet 4 protonun OC**H$_2$**CO grubuna ait olduğu gözlendi. Bu sonuçlar diester türevinin oluştuğu doğrulamaktadır (Ek:1)



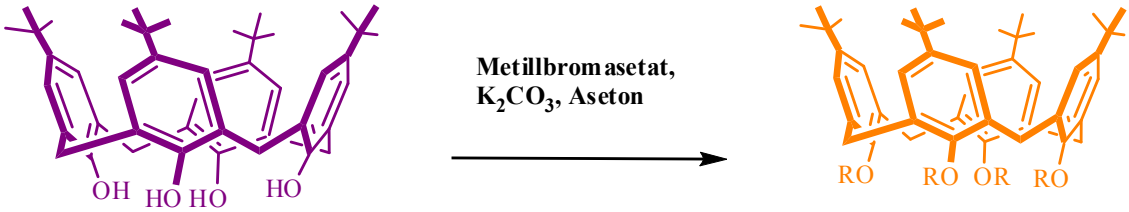
Şekil 4.1. 5,11,17,23-Tetra-*tert*-bütil-25,27-dimetoksikarbonilmetoksi-26,28- dihidroksikaliks[4]aren bileşiğin IR spektrumu

Bileşik **(4)**'ün; IR spektrumunda görülen 1722 cm^{-1}'deki ester karbonil bandına ait titreşim bağlanmanın gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.2). Ayrıca bileşiğin ^{1}H-

NMR spektrumunda δ: 1.23 ppm'de görülen triplet 6 adet $OCH_2C\mathbf{H_3}$, δ: 2.20 ppm'de görülen pentet 4 protonun $OCH_2(C\mathbf{H_2})_2$ grubuna, δ: 2.49 ppm'de görülen triplet 4 protonun $C\mathbf{H_2}CO$ grubuna, δ: 4.00 ppm'de görülen triplet 4 protonun $OC\mathbf{H_2}$ grubuna, δ: 4.24 ppm'de görülen kuvartet 4 protonun $O\mathbf{CH_2}CH_3$ grubuna ait olduğu gözlendi. Bu sonuçlar divalerat türevinin oluştuğu doğrulamaktadır. (Ek:2)



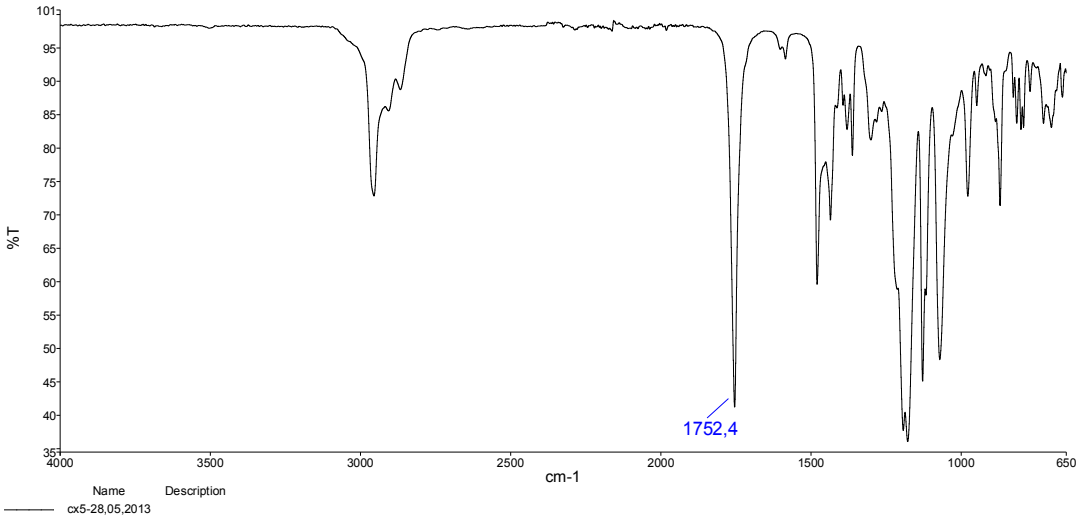
Şekil 4.2. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dietoksikarbonilbütoksi-26,28-dihidroksikaliks[4]aren bileşiğin IR spektrumu



R= CH_2COOCH_3

(5)

p-ter-Bütilkaliks[4]arenin metilbromasetat ile K_2CO_3 varlığında kuru aseton içerisinde literatüre göre (Collins 1991) etkileştirilmesinden *p-tert*-Bütilkaliks[4]arenin tetra ester türevi elde edildi. Bu bileşik **(5)** %65 verimle elde edildi. IR spektrumunda görülen 1752 cm^{-1}'deki ester karbonil bandına ait titreşim bağlanmanın gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.3). Ayrıca bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda δ: 3.85 ppm'de görülen singlet 12 protonun $OC\mathbf{H_3}$ grubuna, δ: 4.75 ppm'de görülen singlet 8 protonun $OC\mathbf{H_2}CO$ grubuna ait olduğu gözlendi. Bu sonuçlar tetraester türevinin oluştuğu doğrulamaktadır. (Ek:3)

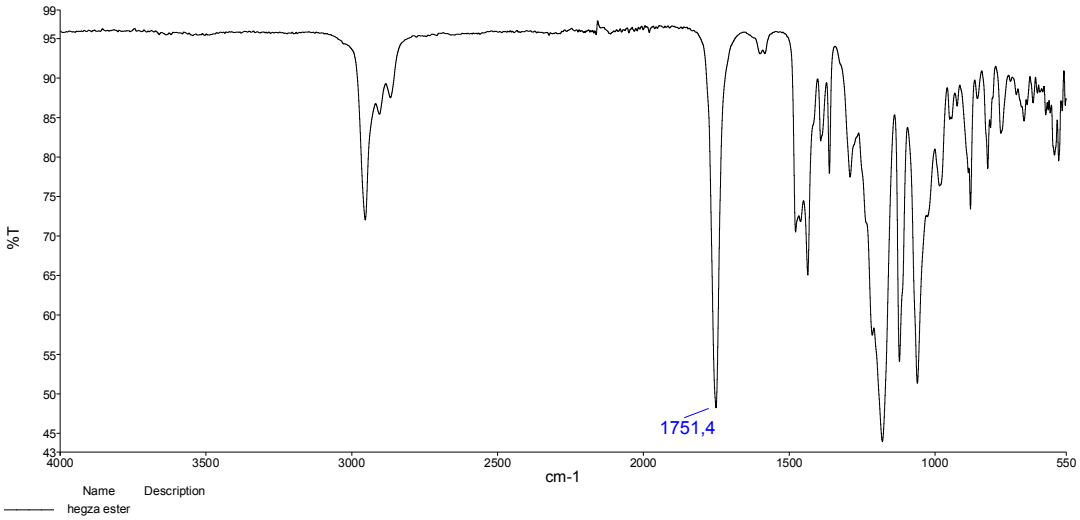


Şekil 4.3. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,26,27,28-tetrametoksikarbonilmetoksi- kaliks[4]aren bileşiğin IR spektrumu



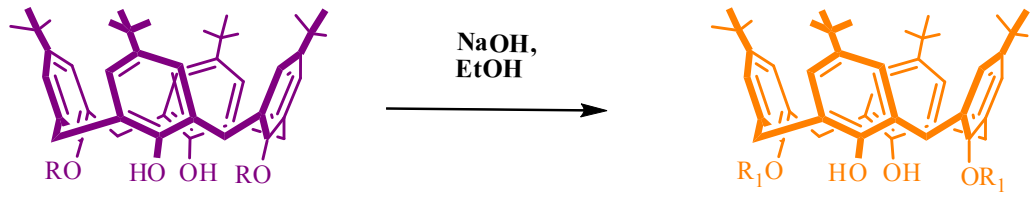
(6)

p-tert-Bütilkaliks[6]aren, metilbromasetat ile K_2CO_3 varlığında kuru aseton içerisinde literatüre göre (Collins 1991) etkileştirilerek hekzaester türevi **(6)** %85 verimle elde edildi. IR spektrumunda görülen 1751 cm^{-1}'deki ester karbonil bandına ait titreşim bağlanmanın gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.4). Ayrıca bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda δ: 3.40 ppm'de görülen broad singlet 18 protonun O**CH$_3$** grubuna, δ: 4.10-4.33 ppm'de görülen multiplet 12 protonun **CH$_2$**COO grubuna ait olduğu gözlendi. Bu sonuçlar hekzaester türevinin oluştuğu doğrulamaktadır. (Ek:4)



Şekil 4.4. 5,11,17,23,29,35-hekza-ter-bütil-37,38,39,40,41,42-hekzametoksi karbonilmetoksikaliks[6]aren bileşiğin IR spektrumu

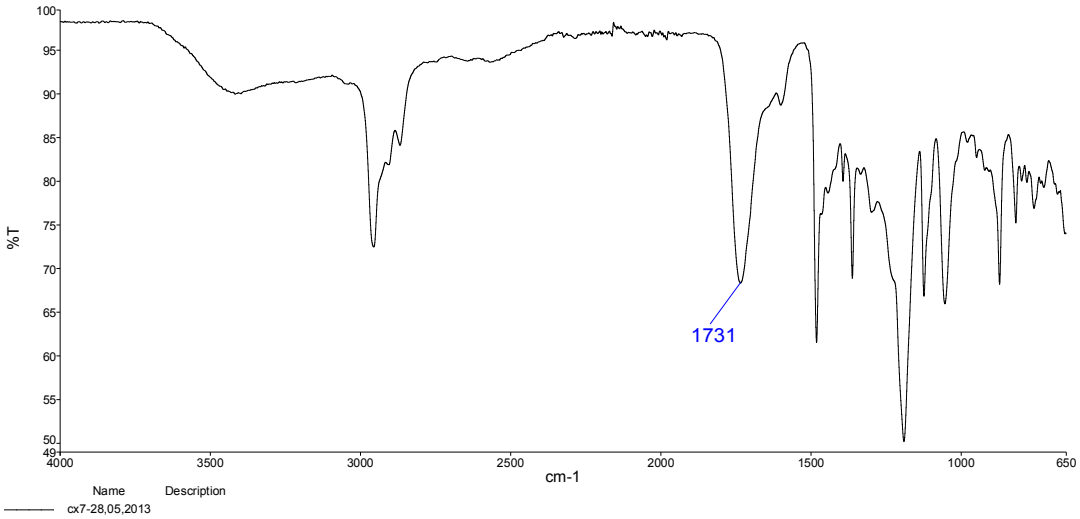
p-tert-bütilkaliks[4-6]aren ester türevleri, %15 NaOH ile etanol içerisinde literatüre göre (Collins 1991) etkileştirerek asit türevlerine dönüştürüldü.



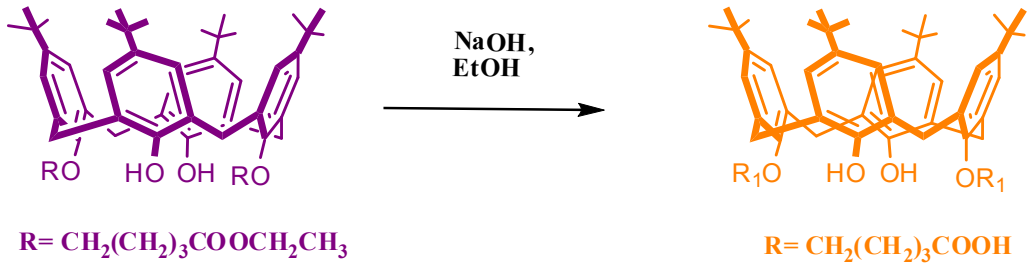
R= CH_2COOCH_3 **R_1=CH_2COOH**

(7)

Bileşik **(7)**, IR spektrumunda görülen 1755 cm^{-1}'deki ester karbonil bandına ait titreşimin kaybolarak 1731 cm^{-1}'deki asit karbonil bandına ait titreşimin oluşması hidrolizin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.5). Ayrıca bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda δ: 3.85 ppm'de singlet 6 protonun O**CH_3** grubuna ait piklerin kaybolması ve δ: 4.75 ppm'de görülen singlet 4 protonun O**CH_2**CO grubuna ait olduğu ve bu sonuçla diasit türevinin oluştuğu doğrulanmaktadır. (Ek:5)



Şekil 4.5. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dihidroksikarbonilmetoksi-26,28- dihidroksikaliks[4]aren bileşiğin IR spektrumu

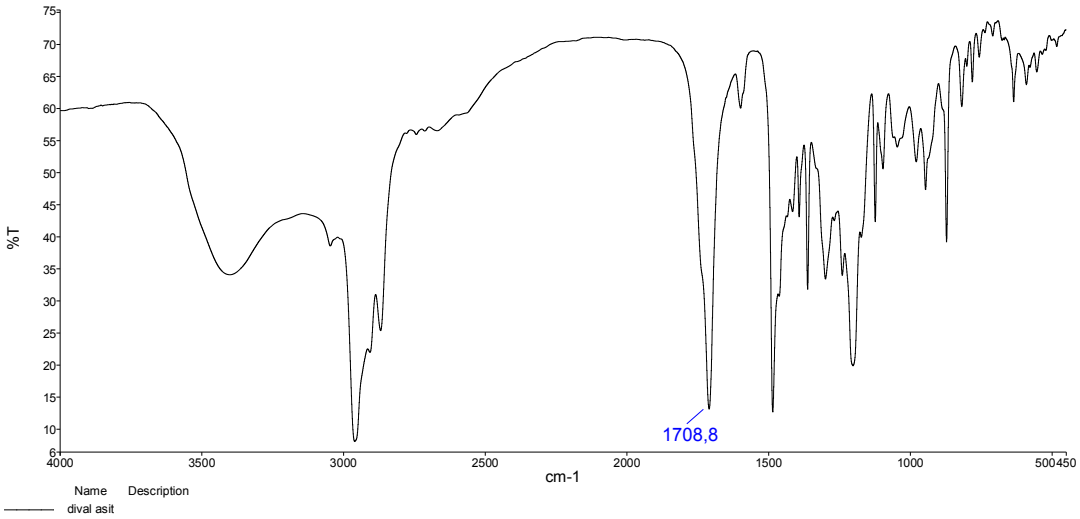


R= $CH_2(CH_2)_3COOCH_2CH_3$

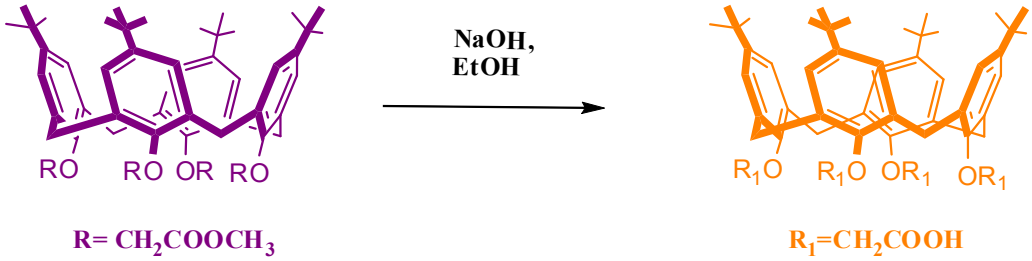
R= $CH_2(CH_2)_3COOH$

(8)

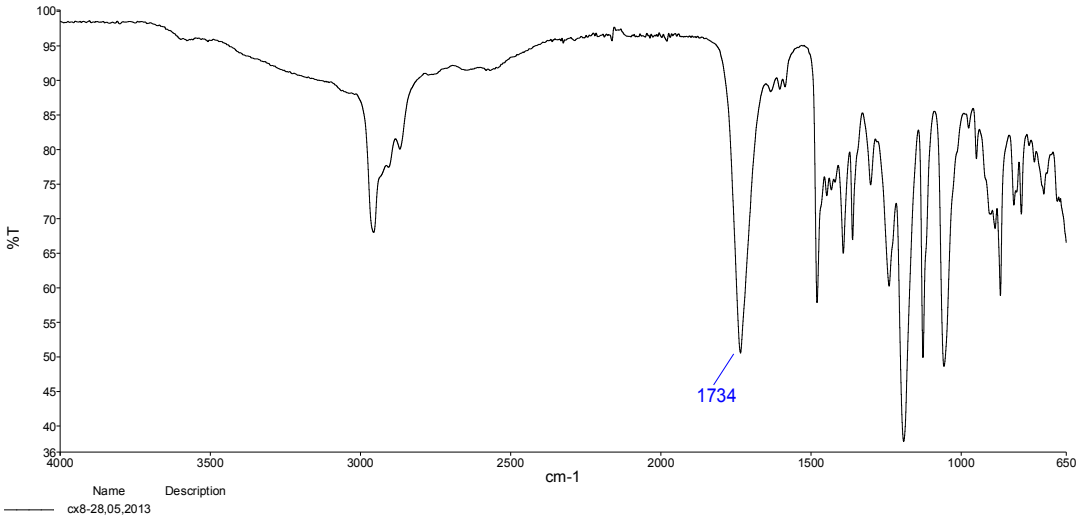
Bileşik **(8)'**in oluştuğu; IR spektrumunda görülen 1722 cm^{-1}'deki ester karbonil bandına ait titreşimin kaybolarak 1708 cm^{-1}'deki asit karbonil bandına ait titreşimin oluşması hidrolizin gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.6). Ayrıca bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda δ: 1.23 ppm'de triplet 6 protonun $OCH_2C\mathbf{H_3}$, δ: 4.25 ppm'de kuvartet 4 proton $OC\mathbf{H_2}CH_3$ grubuna ait piklerin kaybolması ve δ: 2.20 ppm'de pentet 8 protonun $OCH_2(C\mathbf{H_2})_2$, δ: 2.49 ppm'de görülen triplet 4 protonun $C\mathbf{H_2}CO$, δ: 4.00 ppm'de triplet 4 protonun $OC\mathbf{H_2}$ grubuna ait protonların görülmesi divalerat asit türevinin oluştuğu doğrulamaktadır. (Ek:6)



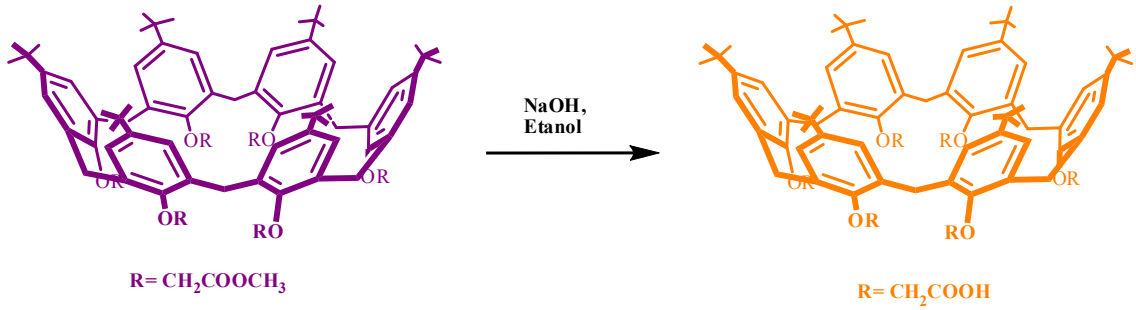
Şekil 4.6. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dihidroksikarbonilbütoksi-26,28-dihidroksikaliks[4]aren bileşiğin IR spektrumu



Bileşik **(9)**'un oluştuğu; IR spektrumunda görülen 1752 cm^{-1}'deki ester karbonil bandına ait titreşimin kaybolarak 1734 cm^{-1}'deki asit karbonil bandına ait titreşimin oluşması (Şekil 4.7), ayrıca ester bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda δ: 3.85 ppm'de singlet 12 protonun O**CH$_3$** grubuna ait piklerin kaybolması ve δ: 4.75 ppm'de singlet 8 protonun O**CH$_2$**CO grubuna ait olduğu, tetraasit türevinin oluştuğu doğrulamaktadır. (Ek:7)

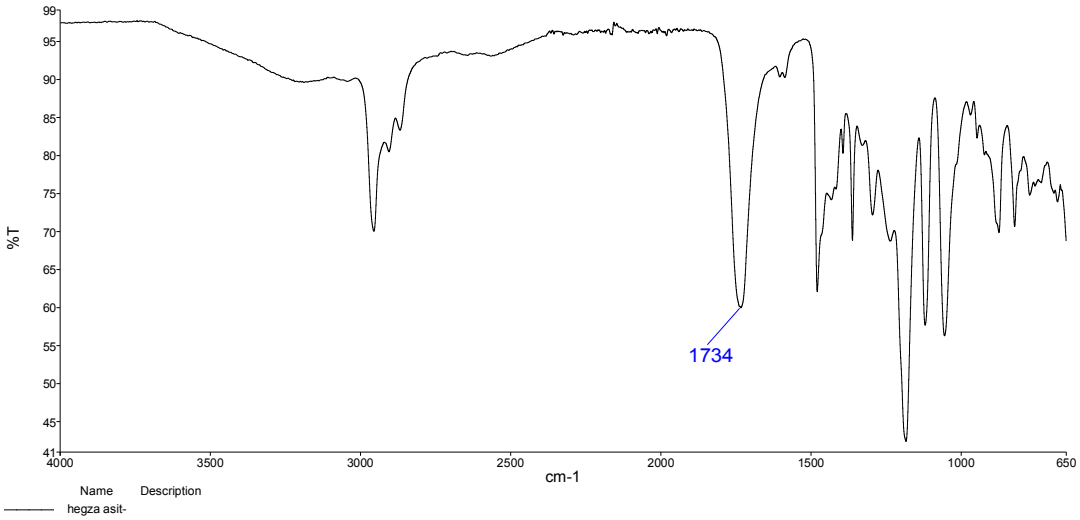


Şekil 4.7. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,26,27,28-tetrahidroksikarbonilmetoksi- kaliks[4]aren bileşiğin IR spektrumu

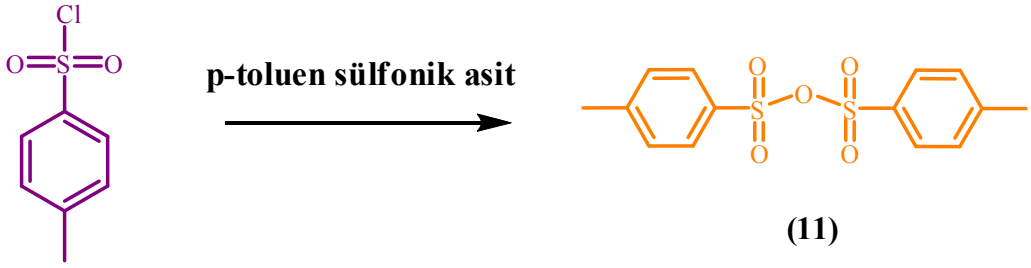


(10)

Bileşik **(10)**'un oluştuğu, IR spektrumunda görülen1751 cm^{-1}'deki ester karbonil bandına ait pikin kaybolarak 1734 cm^{-1}'deki asit karbonil bandına ait pikin oluşması (Şekil 4.8). ve ayrıca bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumunda δ: 3.40 ppm'de broad singlet 18 protonun O**C**$\mathbf{H_3}$ grubuna ait piklerin kaybolması ve δ: 4.10-4.33 ppm'de singlet 12 protonun O**C**$\mathbf{H_2}$CO grubuna ait olması hekzaasit türevinin oluştuğu doğrulamaktadır. (Ek:8)

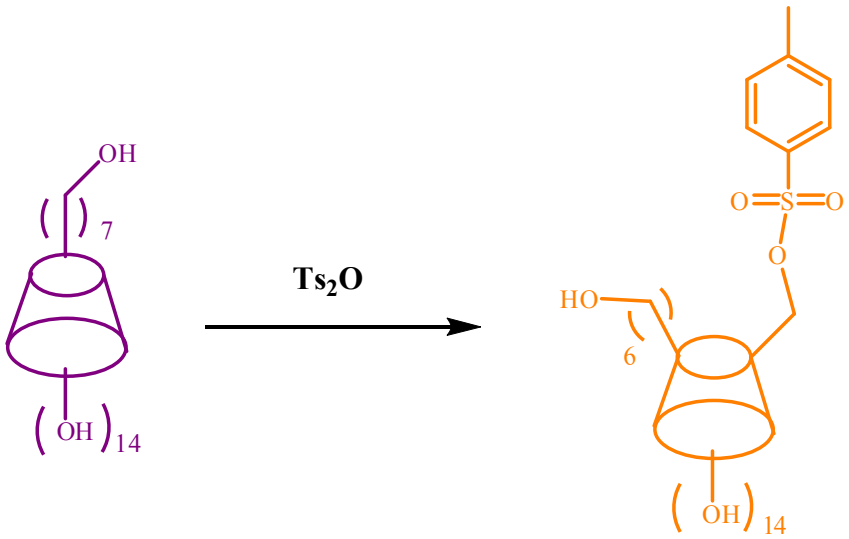


Şekil.4.8. 5,11,17,23,29,35-hekza-*ter*-bütil-37,38,39,40,41,42-hekzahidroksi karbonilmetoksikaliks[6]aren bileşiğin IR spektrumu



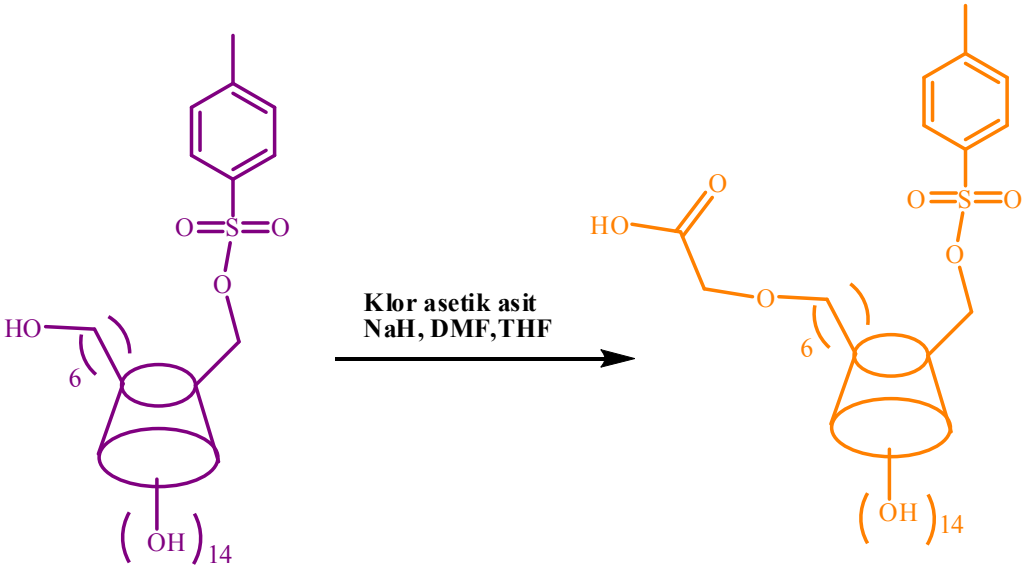
(11)

Bu çalışmada; tosil klorür, *p*-toluen sülfonik asit ile CH_2Cl_2içerisindeliteratüre göre (Luzardo-Alveraz, 2012) etkileştirilerek *p*-toluen sülfonik anhidrite dönüştürüldü.^{1}H-NMR spektrumunda görülen aromatik protonlara ait pikler δ: 7.40 ppm ve δ: 7.90 ppm'de Tosil anhidrit (**Ts_2O)** yapısını doğrulamaktadır. (Ek:9)



(12)

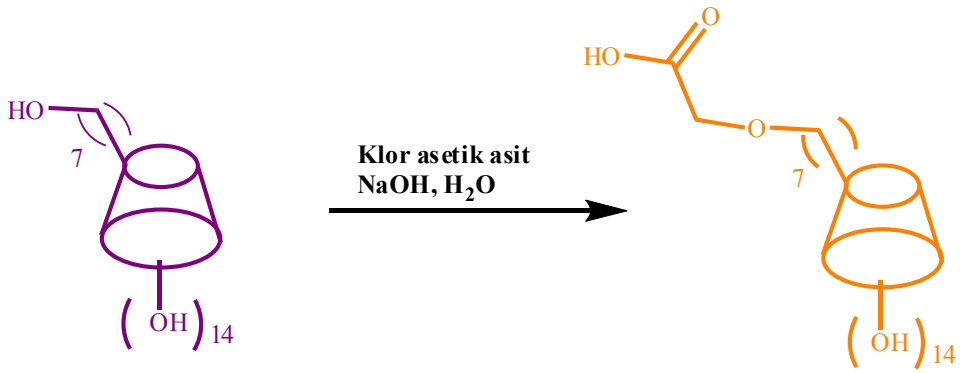
Mono-6-deoksi-6-(*p*-toluensulfonil)-β-siklodekstrin (TsCD) türevi; β-siklodekstrin, Ts_2O ile H_2O içerisinde literatüre göre (Luzardo-Alveraz 2012) etkileştirilerek **TsCD** dönüştürüldü. ^{1}H-NMR spektrumunda β-CD spektrumundaki piklere ek olarak aromatik protonlara ait pikler δ: 7.40 ppm dublet 2 adet Ar**H** ve δ: 7.90 ppm'de dublet 2 adet Ar**H** protonların görülmesi **TsCD** yapısını doğrulamaktadır. (Ek:10)



(13)

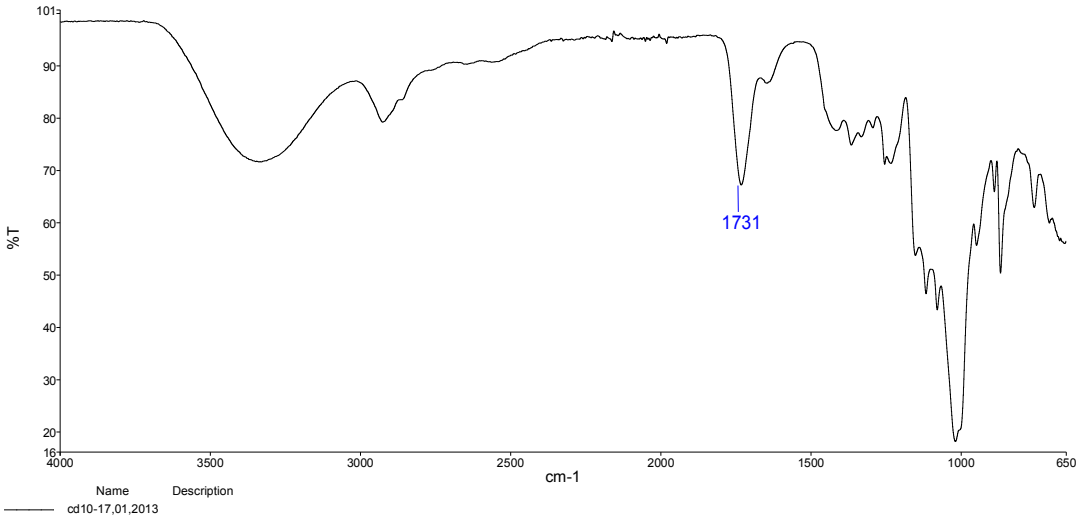
Bileşik mono-6-deoksi-6-(*p*-toluensulfonil)-β-siklodekstrin, klor asetik asit, NaH varlığında DMF ve THF içerisinde literatüre göre (Luzardo-Alveraz, 2012)

etkileştirilerek heksa-etanoik asit-mono-(*p*-toluensulfonil)-β-siklodekstrin türevine dönüştürüldü. ^{1}H-NMR spektrumunda TsCD spektrumuna ek olarak δ: 4.52 ppm'de broad singlet 12 protonun OC**H$_2$**CO grubuna ait piklerin görülmesi bileşiğin **CD-(COOH)$_6$** yapısının doğru oluştuğunu göstermektedir. Aynı zamanda bileşiğin ^{13}C NMR spektrumunda δ: 214 ppm'dekarbonil grubuna ait olan pikin görülmesi de bileşiğin yapısının doğruluğunu desteklemektedir. (Ek:11)

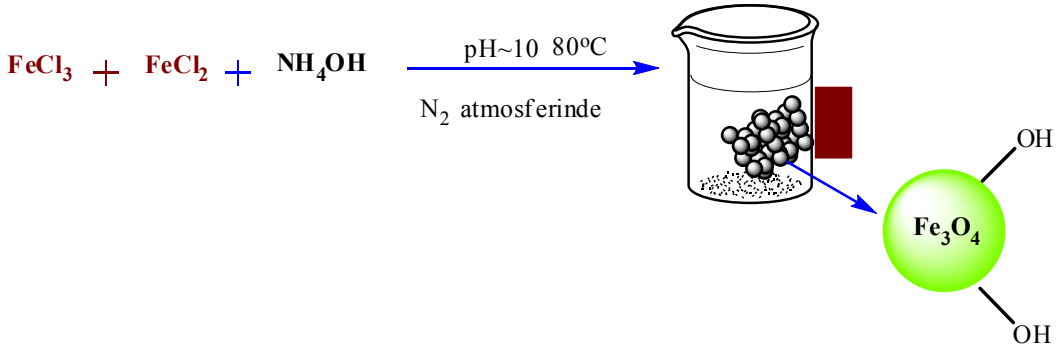


(14)

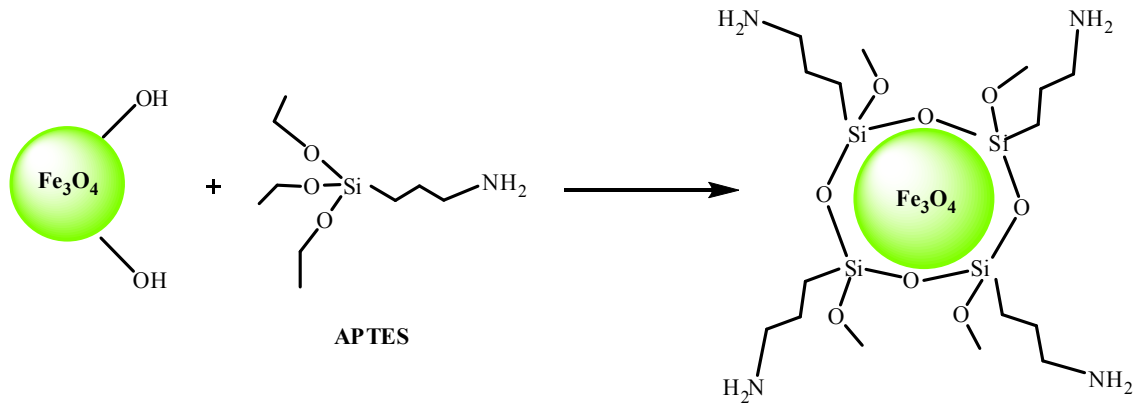
Karboksimetil-β-siklodekstrin (CD-(COOH)$_7$); β-siklodekstrin, klor asetik asit, NaOH varlığında H_2O içerisinde etkileştirilerek (CD-(COOH)$_7$) dönüştürüldü. IR spektrumunda görülen 1731 cm^{-1} (COOH) (Şekil 4.9), asit karbonil bandın görülmesi CD-(COOH)$_7$ türevinin oluştuğunu göstermektir. ^{1}H-NMR spektrumunda, β-CD spektrumuna ek olarak δ: 3.65-3.81 ppm'de multiplet OC**H$_2$**CO pikin görülmesi bileşiğin CD-(COOH)$_7$ yapısında olduğunu doğrulamaktadır. Aynı zamanda bileşiğin ^{13}C NMR spektrumunda δ: 174 ppm'de CH_2**C**O karbonil grubuna ait olduğu bileşiğin yapısını doğrulamaktadır. (Ek:12)



Şekil.4.9. Karboksimetil-β-siklodekstrin (CD-$(COOH)_7$) bileşiğin IR spektrumu

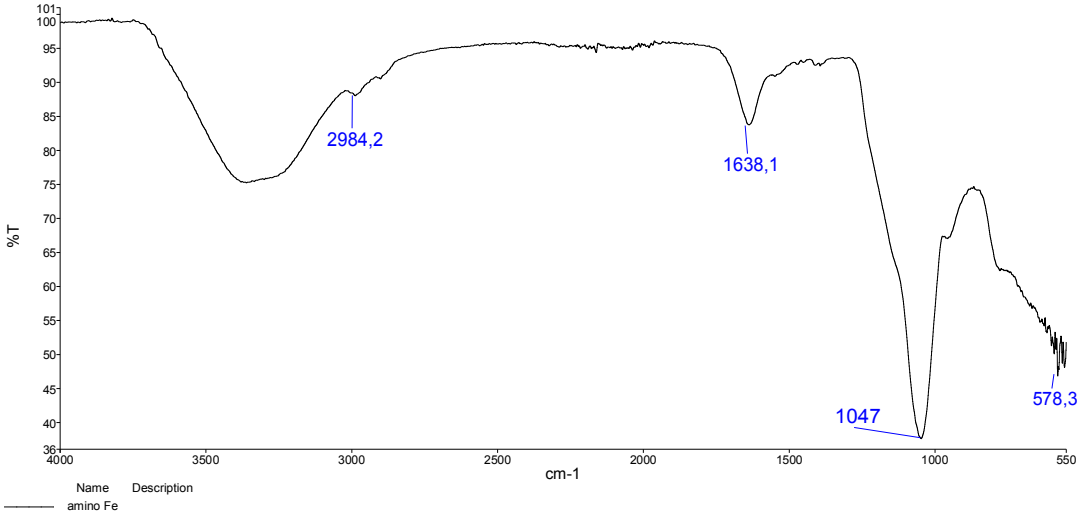


Fe_3O_4 manyetik nanopatiküller, $FeCl_2$ ve $FeCl_3$ su içerisinde literatüre göre (Zeng,2005) etkileştirilerek Fe_3O_4 nanopartiküllerine dönüştürüldü. Bunların IR spektrumunda 568 cm^{-1}görülen Fe-O bandına ait titreşim yapının oluştuğunu göstermektedir.

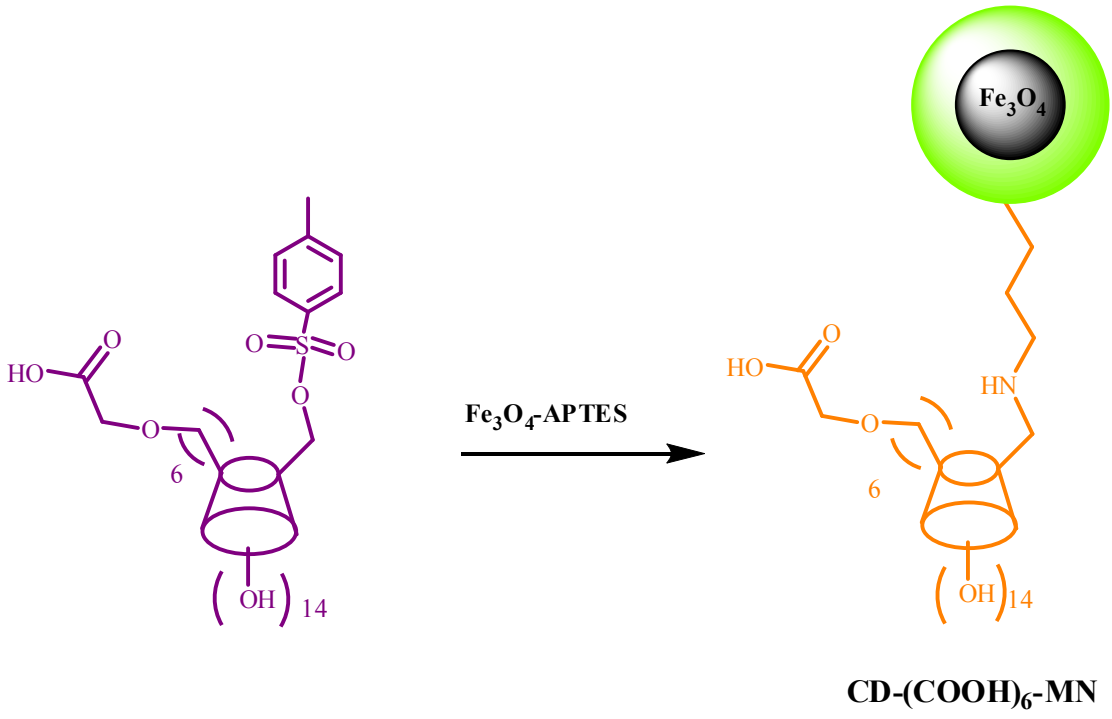


Fe_3O_4-APTES

Fe_3O_4, 3-aminopropiltrietoksisilan (APTES) ve NH_4OH varlığında etanol içerisinde literatüre göre (Zeng, 2005) etkileştirilerek **Fe_3O_4-APTES** yapısına dönüştürüldü. IR spektrumunda 2984cm^{-1} (-CH_2) bandına ait titreşim, 1638 cm^{-1} amin bandına ait titreşim (NH_2), 1047 cm^{-1}(Si–O) ve 578 cm^{-1} Fe–O bandına ait titreşimin görülmesi bağlanmanın gerçekleştiğini göstermektedir (Şekil 4.10).

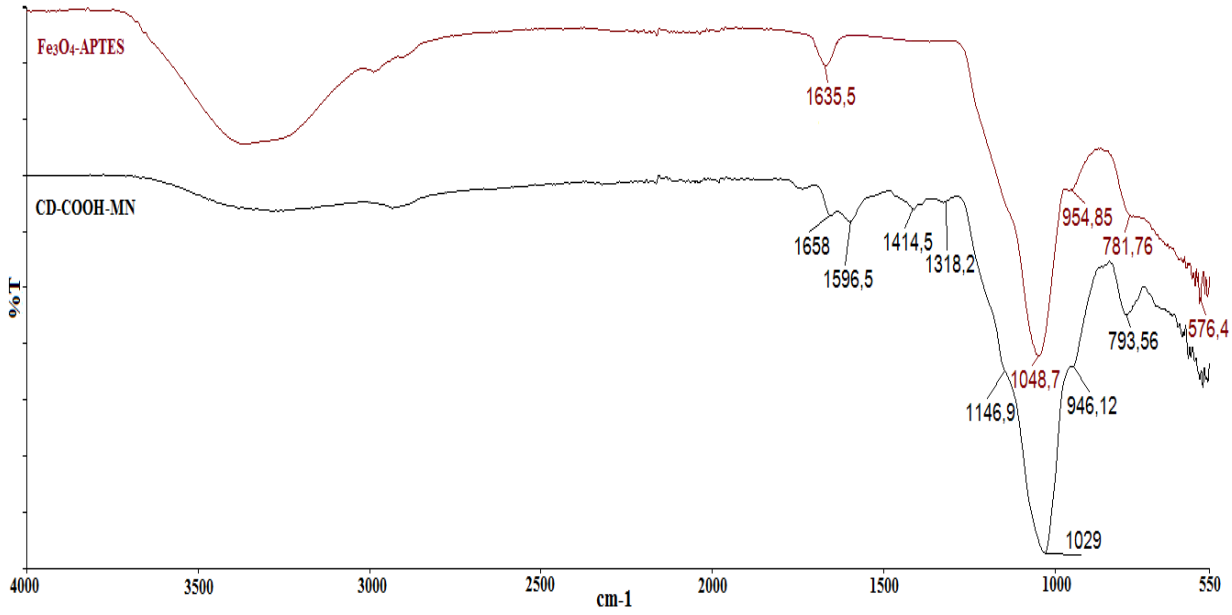


Şekil.4.10. Fe_3O_4-APTES bileşiği IR spektrumu



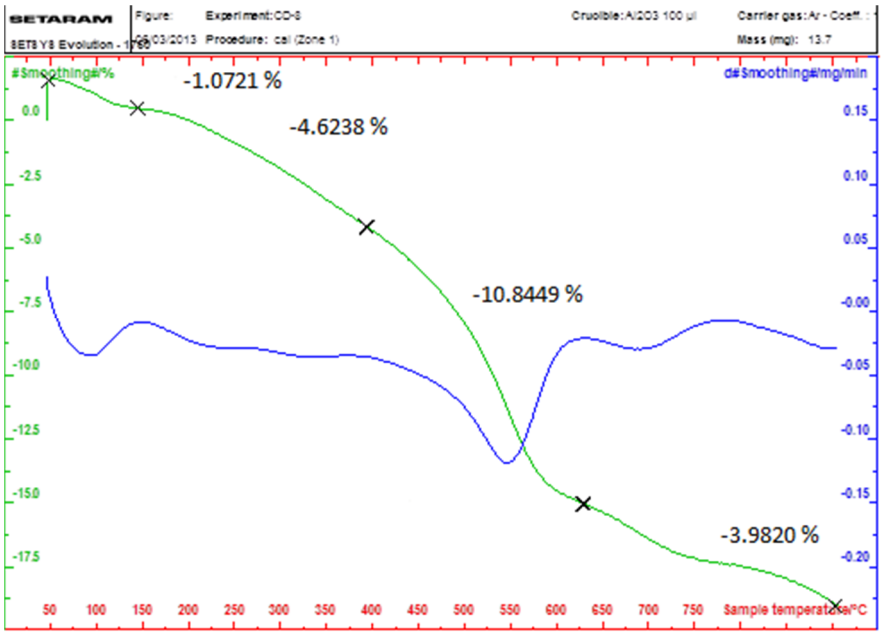
CD-$(COOH)_6$-MN

CD-$(COOH)_6$, Fe_3O_4-APTES varlığında DMF içerisinde etkileştirilerek **CD-$(COOH)_6$-MN** haline dönüştürüldü. IR spektrumunda görülen 1659 cm^{-1}(COONa), 1414 ve 1318 cm^{-1} (siklodekstrine ait), 1150, 1054, 949 ve 797 cm^{-1} (Si-O ve sikodekstrine ait), 570 cm^{-1} (Fe-O) titreşimlerin oluşması CD-$(COOH)_6$'nın manyetik özellik kazandığını doğrulamaktadır (Şekil 4.11).

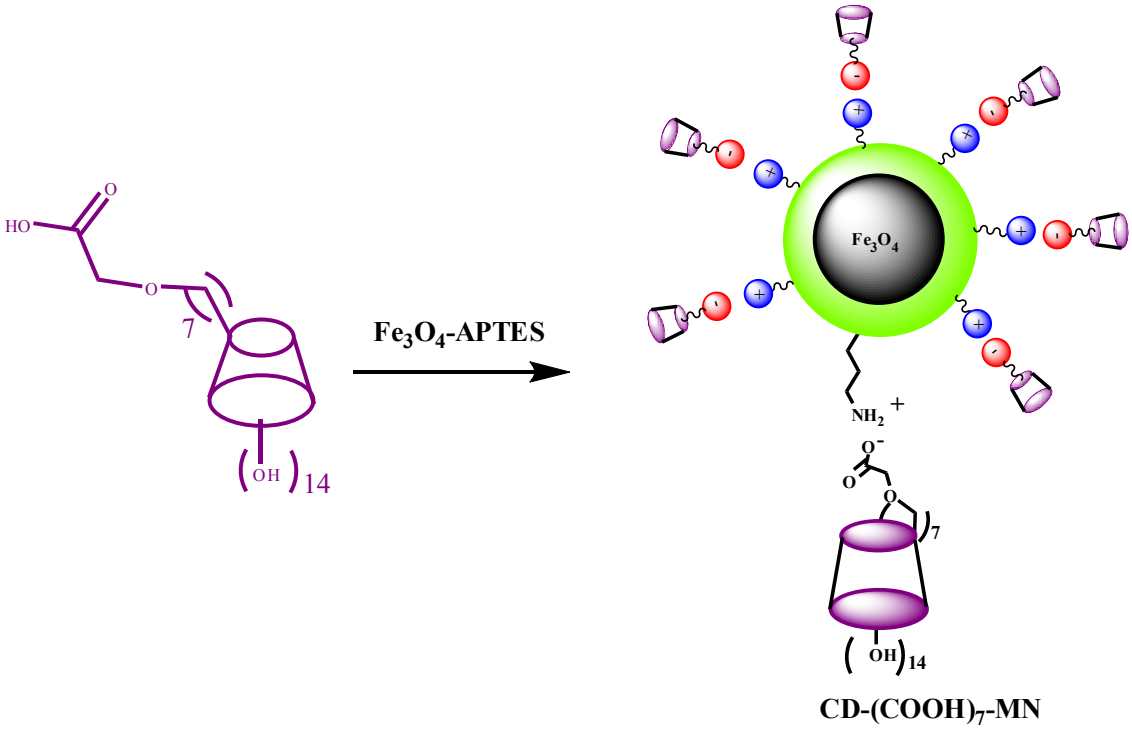


Şekil 4.11. CD-$(COOH)_6$-MN bileşiğin IR spektrumu

Nanopartikül **CD-$(COOH)_6$-MN**'nin termal özellikleri termogravimetrik analiz kullanılarak araştırıldı. TGA analizinden Fe_3O_4 üzerine immobilize amino propil gruplarının **(Fe_3O_4-APTES)** 250-600 ^oC arasında % 4.7 oranında uzaklaştığı gözlendi (Yılmaz, 2009). Diğer yandan **CD-$(COOH)_6$-MN**'nin β-CD birimi ve aminopropil gruplarının aynı sıcaklık aralığında (250-600 ^oC) %18 oranında ayrıldığı tespit edildi (Şekil 4.12).



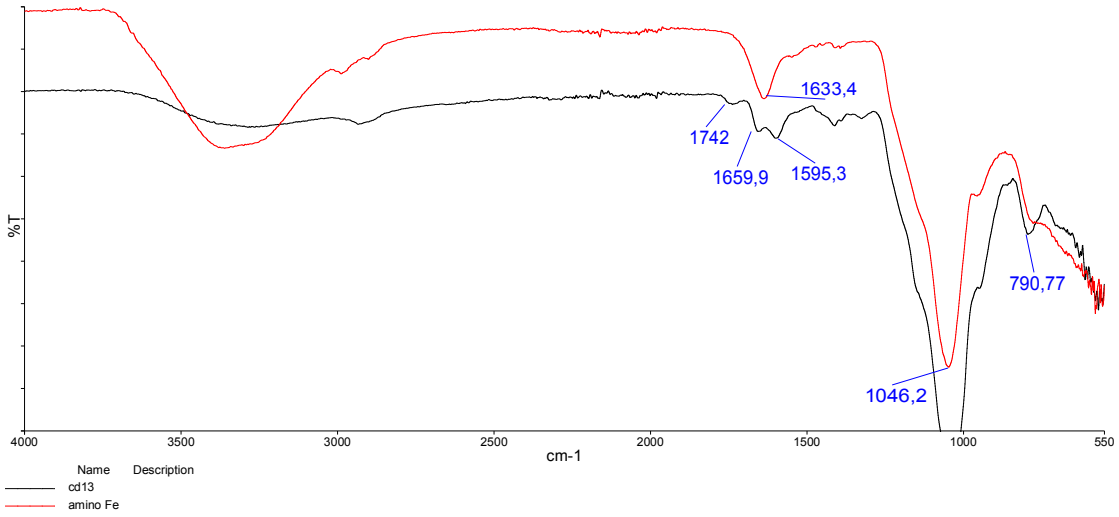
Şekil.4.12. CD-$(COOH)_6$-MN bileşiğin TGA spektrumu



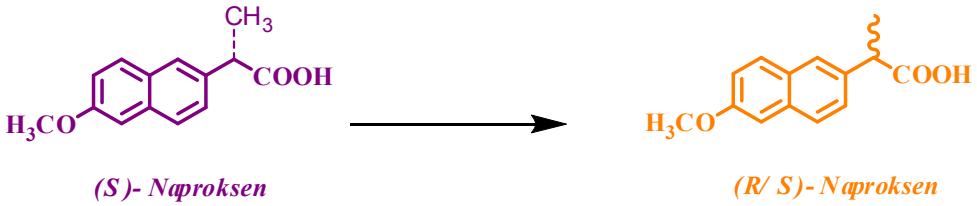
CD-$(COOH)_7$-MN

CD-$(COOH)_7$, Fe_3O_4-APTES varlığında DMF ve THF içerisinde etkileştirilerek **CD-$(COOH)_7$-MN** iyonik olarak etkinleştirildi. IR spektrumunda görülen1742 cm^{-1} (COOH), 1659 cm^{-1} (COONa), 1414 ve 1318 cm^{-1} (siklodekstrine ait), 1046 ve 797 cm^{-1}

(Si-O ve sikodekstrine ait), 570 cm^{-1} (Fe-O) titreşiminlerin oluşması CD-$(COOH)_7$ manyetik özellik kazandığını göstermektedir (Şekil 4.13).

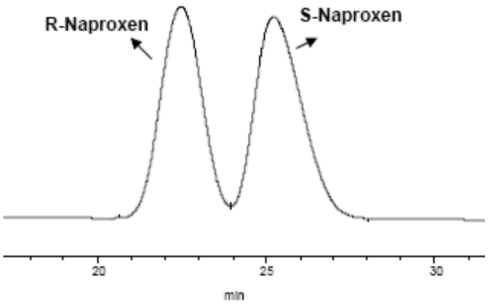


Şekil 4.13. CD-$(COOH)_7$-MN bileşiğin IR spektrumu

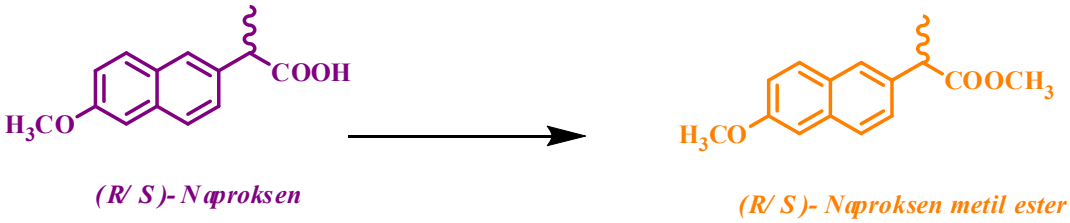


(S)- Naproksen *(R/ S)- Naproksen*

Bileşik **(R/S-Naproksen)**, (S)-Naproksen, NaOH varlığında etilenglikol içerisinde literatüre göre (Wu ve Lıu 2000) etkileştirilerek R/S-Naproksen türevine dönüştürüldü. R/S-Naproksen türevinin oluştuğu, HPLC sisteminde kiral kolon kullanılarak yaklaşık olarak aynı alana sahip piklerin varlığı ile doğrulandı (Şekil 4.14).



Şekil.4.14. (R/S-Naproksen) bileşiğin HPLC diyagramı

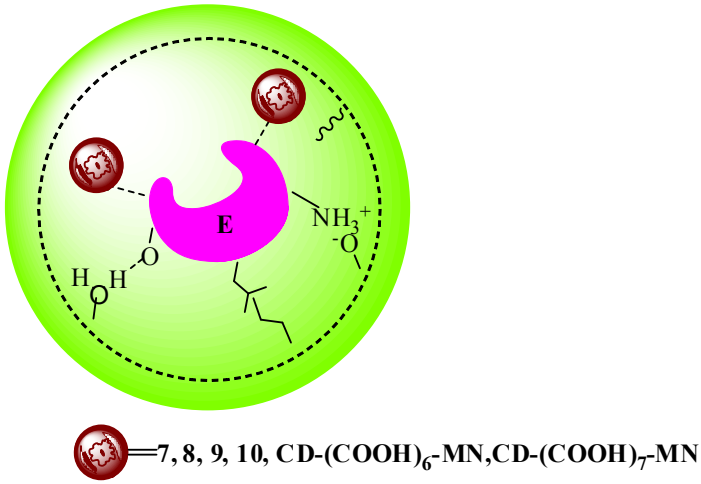


(R/S)-Naproksen *(R/S)-Naproksen metil ester*

R/S-Naproksen metil esteri, (R/S)-Naproksen'in, H_2SO_4 varlığında metanol içerisinde literatüre göre (Takaç ve Bakkal) etkileştirilerek R/S-Naproksenmetil ester türevine dönüştürüldü. ^{1}H-NMR spektrumunda görülen 3.63 (s, 3H, COOC**H$_3$**) pik ile metil ester türevinin oluştuğu anlaşılmaktadır. (Ek:15)

4.1.Sol-Jel Tekniğine göre Lipaz İmmobilizasyonu

Sol-jel tutuklama metoduna göre lipaz immobilizasyonu Bölüm 3.2.16' da ayrıntılı olarakanlatıldı. Bu çalışmada kullanılan *Candida Rugosa* lipaz, sol-jel tutuklama metoduna göre **7, 8, 9** ve **10** nolu bileşikler ve **CD-(COOH)$_6$-MN**, ve **CD-(COOH)$_7$-MN** manyetik nanopartikülleri immobilize edilerek protein ve aktivite tayinleri yapıldı (Şekil 4.15).



Şekil 4.15. Sol-jel metodu ile lipaz immobilizasyonu gösterimi

$$\text{Lipaz aktivite (U/g-destek maddesi)} = \frac{\text{Immobilize lipaz aktivitesi}}{\text{Immobilize lipaz miktari}}$$

$$\text{Spesifik Aktivite (U/mg protein)} = \frac{\text{Immobilize lipazin Aktivitesi}}{\text{Toplam protein miktari}}$$

$$\text{Activite verimi (\%)} = \frac{\text{Immobilize enzimin spesifik aktivitesi}}{\text{Serbest lipazin spesifik aktivitesi}} \times 100$$

Bileşik (7), (8), (9), ve (10) ile Fe_3O_4 nanopartiküllerinin varlığında lipaz aktivitesi

Çizelge 4.1. Optimum reaksiyon şartlarında serbest ve immobilize lipazların aktivitesi

	Tutuklanan Protein (mg/g)	***Tutuklanan Protein Yüzdesi (%)***	***Lipaz Aktivitesi (U/g)***	***Spesifik Aktivite (U/ mg-protein)***
Lipaz[a]$_{tut}$	28.5	58	95	3.3
7	11.6	27	72	**6.2**
8	19.9	46	54	**2.7**
9	11.8	27.5	112	**9.6**
10	24.7	57.4	65	**2.7**

[a]Destek maddeleri kullanmadan tutuklanmış serbest lipaz

Çizelge 4.1'de görüldüğü gibi immobilize bileşiklerin spesifik aktiviteleri kaliksaren karboksilik asitlerin kullamılmadığı zaman serbest enzimin 3,3 gözlenirken, **7** için 6.2, **8** için 2.7, **9** için 9.6 ve **10** için 2.7 olarak gözlendi. Bu sonuçlara göre **9** nolu bileşik tetra asit türevi diğer bileşiklere göre enziminin aktif merkezlerini ve konformasyonunu daha iyi koruduğu göstermektedir.

Fe_3O_4nanopartiküllere immobilize edilmişnanopartiküller CD-$(COOH)_6$-MN ve CD-$(COOH)_7$-MNvarlığında lipazların aktivitesi

Çizelge4.2. Optimum reaksiyon şartlarında serbest ve immobilize lipazların aktivitesi

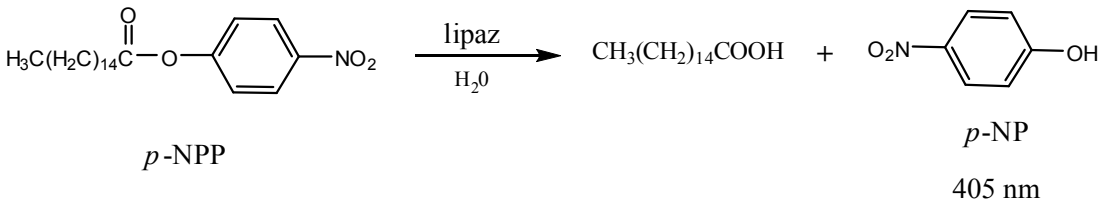
	Tutuklanan Protein (mg/g)	***Tutuklanan Protein Yüzdesi (%)***	***Lipaz Aktivitesi (U/g)***	***Spesifik Aktivite (U/ mg-protein)***
Lipaz$^{a}_{tut}$	28.5	58.4	95	3.3
CD-$(COOH)_6$-MN	25.1	58.4	40	**1.6**
CD-$(COOH)_7$-MN	25.3	58.9	33.6	**1.3**

[a]Destek maddeleri kullanmadan tutuklanmış serbest lipaz

Çizelge 4.2'de manyetik nanopartiküllere immobilize yapıların spesifik aktivitelerine baktığımızda **CD-$(COOH)_6$-MN** için 1.6 ve **CD-$(COOH)_7$-MN** için 1.3 olarak gözlendi. Bu sonuç bize serbest karboksil grupların artmasının, enzimin aktif merkezleri ile etkileşerek deaktive ettiğini göstermektedir. Bu bize kaliksarenlerin karboksilik asit türevlerinin, β-siklodekstrin karboksilik asitlerine göre daha iyi bir katkı materyali olduğunu göstermektedir.

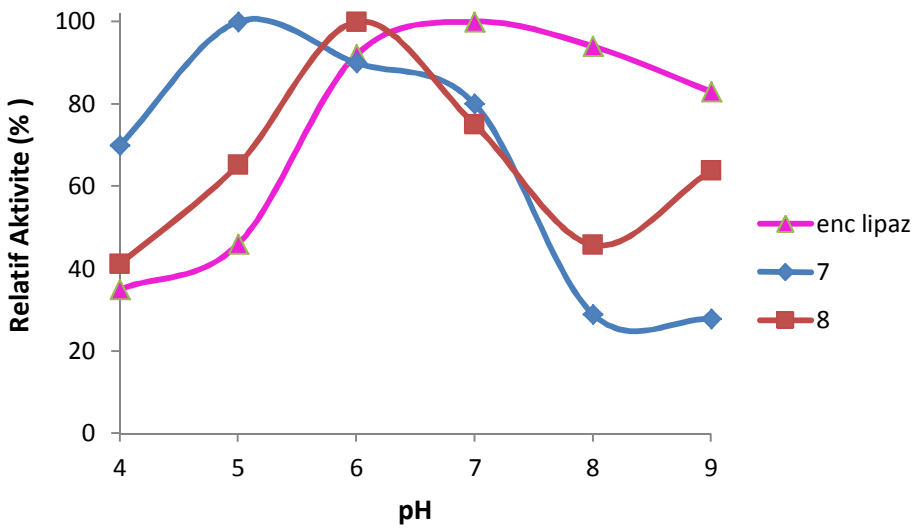
Optimum pH

Enzim aktivitesinde pH'nın büyük önemi vardır**.** Bu çalışmada serbest ve immobilize lipazlar için optimum pH belirlendi. 0.05 M fosfat tampon çözeltisi içerisinde serbest ve immobilize edilen lipazlar *p*-nitrofenilpalmitat ile etkileştirilerek hidrolitik aktivitelerine pH'nın etkisini incelemek amacı ile çeşitli pH'larda (pH=4-9) gerçekleştirilen tepkimelere ait relatif aktivite değerlerinin pH ile değişim grafiği çizildi. Serbest lipazın optimum pH'sı 7.0 olarak bulundu (Şekil 4.16).



Şekil 4.16. *p*-Nitrofenilpalmitatın hidrolizi

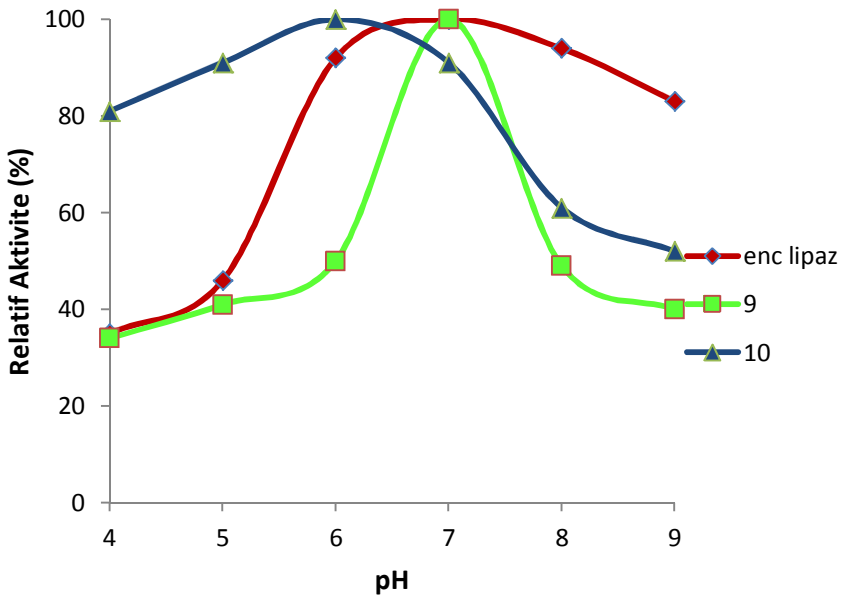
Grafik incelendiğinde **7** nolu bileşiğin optimum pH'ı 5.0 iken, **8** nolu bileşiğin optimum pH' 6.0 olarak bulundu (Şekil 4.17).



Şekil 4.17. 7 ve 8 nolu bileşikleri için lipaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

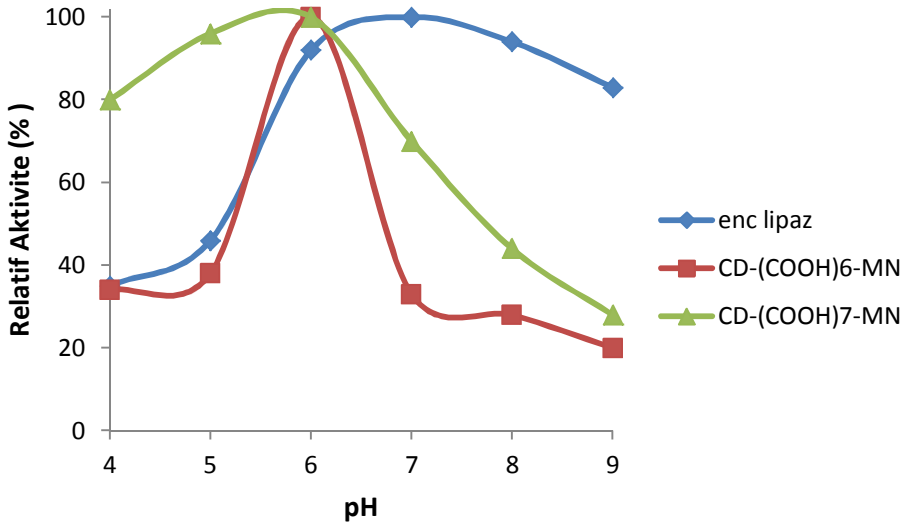
Grafik incelendiğinde **9** nolu bileşiğin optimum pH'ı 7.0 iken, **10** nolu bileşiğin optimum pH'ı 6.0 olarak bulundu (Şekil 4.18).

pH'ın asidik bölgeye kayması enzimin polikatyonik yapıda bir destek materyale bağlanmasıyla olabileceğini göstermektedir (Faber, 1993).



Şekil 4.18. 9 ve 10 nolu bileşikleri için lipaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Grafik incelendiğinde sikledekstrinin karboksilik asit türevini nanopartiküllere immobilize edildiği yapılar için **CD-(COOH)$_6$-MN** ve **CD-(COOH)$_7$-MN** optimum pH'ları 6.0 olarak bulundu (Şekil 4.19).

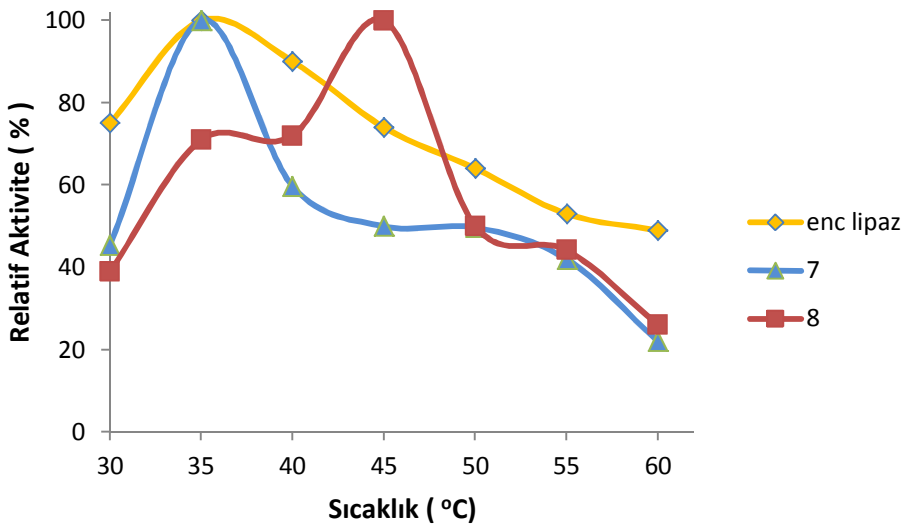


Şekil 4.19. CD-(COOH)$_6$-MN ve CD-(COOH)$_7$-MN manyetik nanopartiküller için lipaz aktivitesi üzerine pH'nın etkisi

Optimum sıcaklık

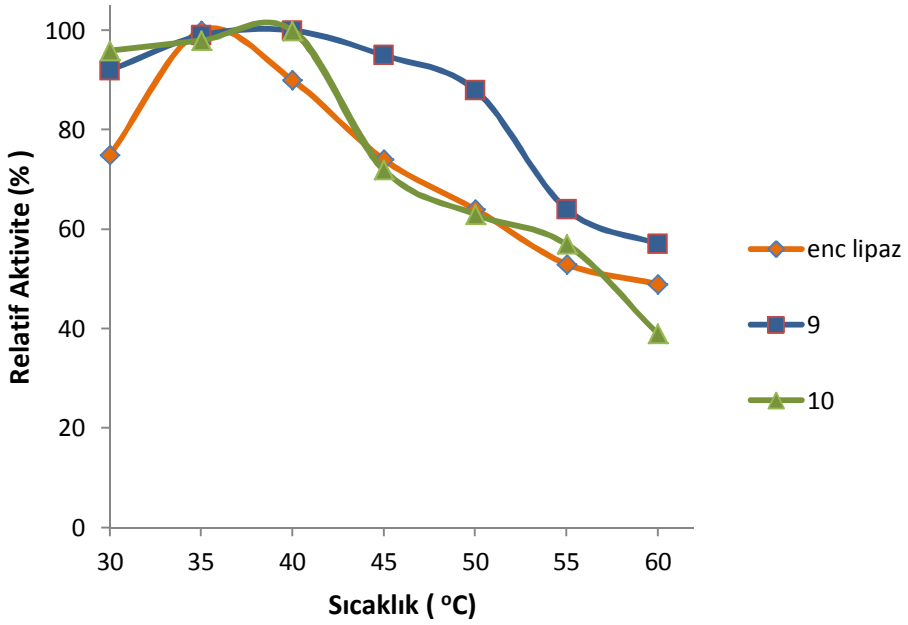
Serbest ve immobilize edilen lipazların aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile farklı sıcaklık değerlerinde (30–60°C), 50 mM fosfat tamponunda (pH 7,0) 20 dk aralıklarla serbest ve immobilize enzimin aktiviteleri ölçülerek optimum sıcaklık değerleri belirlendi. Aktivite ölçümleri pH 7'de gerçekleştirildi. Serbest lipazın optimum sıcaklığı 35°C olarak bulundu.

Grafik incelendiğinde **7** nolu bileşik için optimum sıcaklık 35°C iken, **8** nolu bileşik için 45°C olarak bulundu (Şekil 4.20).



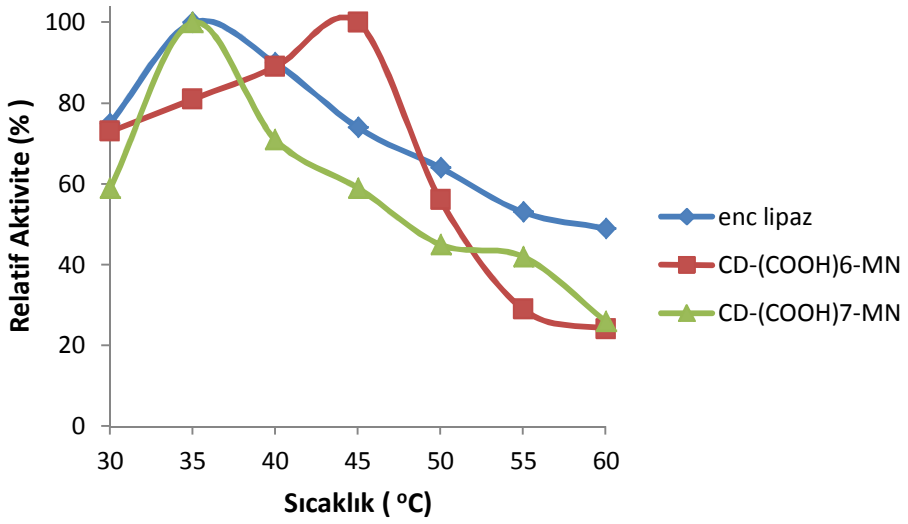
Şekil 4.20. 7 ve 8 nolu bileşikleri için lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Grafik incelendiğinde **9** ve **10** nolu bileşiklerin optimum sıcaklıkları 40°C olarak bulundu (Şekil 4.21).



Şekil 4.21. 9 ve 10 nolu bileşikleri için lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

Şekil 4.22'de verilen grafik incelendiğinde **CD-$(COOH)_6$-MN** manyetik nanopartikülünün optimum sıcaklık 45°C iken, **CD-$(COOH)_7$-MN** manyetik nanopartikülü için 35°C olarak bulundu. Bu iki yapıdan CD$(COOH)_6$-MN kovalent bağlı bir nanopartikül, CD$(COOH)_7$-MN ise iyonik bağlı bir nanopartikül. Burdan CD$(COOH)_7$-MN'nin enzimden ziyade kendi arasında elektrostatik etkileşim yaptığından enzimin konformasyonunu koruyacak uygun konformasyona geçemediğini göstermektedir (Şekil 4.22).

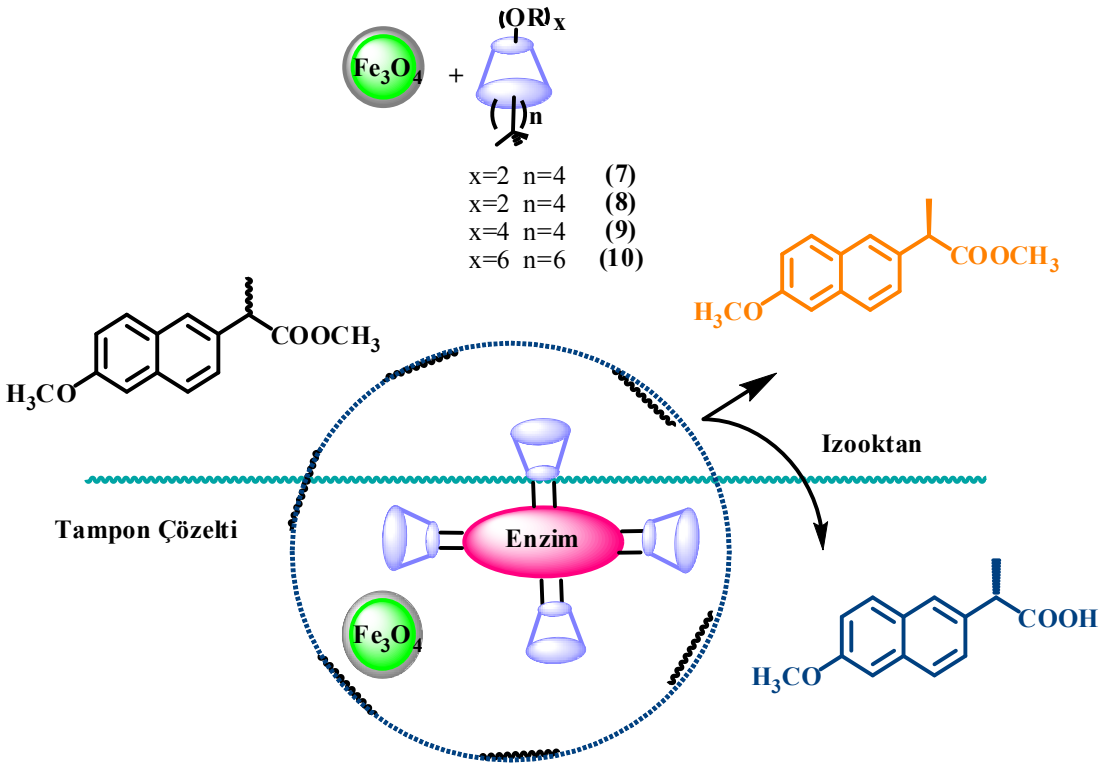


Şekil 4.22. CD-$(COOH)_6$-MN ve CD-$(COOH)_7$-MN manyetik nanopartiküller için lipaz aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi

4.2. İmmobilize Lipazların Enantiyoseçimli Tepkimelerde Kullanılması

Sol-jel tutuklama metoduna göre immobilize edilen lipazların enantiyoseçimlilik oranını belirlemek için hazırlanan kaliks[n]aren ve manyetik nanopartiküllere immobilize β-siklodekstrin türevleri ile rasemik Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi yapıldı.

Rasemik Naproksen metil esteri, öncelikle piyasada tek enantiyomeri bulunan *S*-Naproksenin rasemleştirilerek (R,S)-Naproksen rasematına dönüştürülmesi, daha sonra Fischer esterleşme metoduna göre metanol ile asidik ortamda etkileştirilerek (R,S)-Naproksen metil ester türevine dönüştürülmesiyle elde edildi. Tepkime HPLC ile izlendi, elde edilen ürünlerin enantiyomerik kompozisyon analizi ve enantiyomerik fazlalıkları (%ee) yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (HPLC) kiral kolonlar ile belirlendi. Sonuçlar HPLC'de, hekzan/2-propanol/trifloroasetik asit (100/1/0.1) mobil fazı kullanılarak 254 nm'de 1 mL/dk akış hızında incelendi (Şekil 4.23).



Şekil 4.23. (R/S)-Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi

HPLC'de elde edilen sonuçlara göre yapılan hesaplamalar literatürdeki (Chen ve ark., 1982) formüller kullanılarak yapılmıştır. Enantiyomerik fazlalık (ee), dönüşüm

oranı (X), enantiyoseçimlilik (E) gibi değerler aşağıdaki bağıntılar kullanılarak bulunmaktadır.

$$E = \frac{\ln[(1-X)(1-ee_s)]}{\ln[(1-X)(1+ee_s)]}$$

$$X = \frac{ee_s}{ee_s + ee_p} \qquad ee_s = \frac{C_R - C_S}{C_R + C_S} \qquad ee_p = \frac{C_S - C_R}{C_S + C_R}$$

ee_s : Kalan substratın enantiyomerik fazlalığı

ee_p : Oluşan ürünün enantiyomerik fazlalığı

C_R :R enantiyomerinin konsantrasyonu

C_S:S enantiyomerinin konsantrasyonu

Çizelge 4.3. Serbest ve immobilizelipaz kullanarakrasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizi

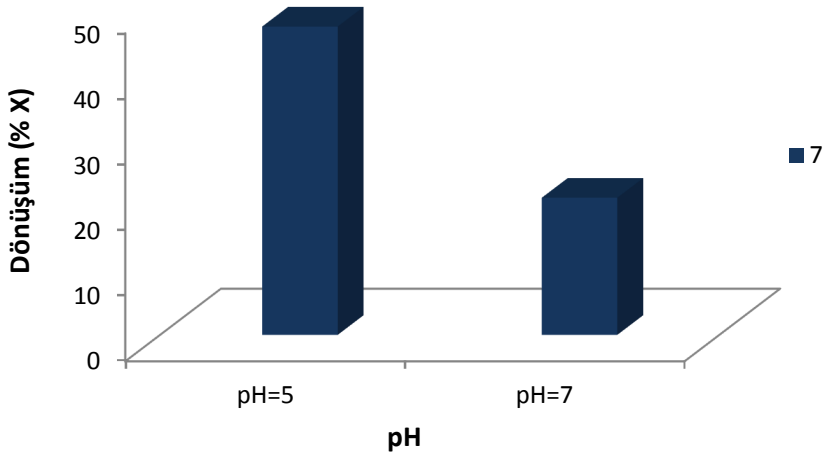
	***X* (%)**	***ee*$_s$ (%)**	***ee*$_p$ (%)**	***E***
Lipaz$_{tut}$[a]	20	25	>98	126
7 (pH=5)	47	87	>98	**283**
7 (pH=7)	21	26	>98	**128**
8 (pH=6)	49	95	>98	**371**
8 (pH=7)	17	20	>98	**120**
9 (pH=5)	45	80	>98	**244**
9 (pH=7)	50	99	>98	**525**
10 (pH=5)	43	74	>98	**221**
10 (pH=7)	37	57	>98	**176**
CD-(COOH)$_6$-MN (pH=6)	48	91	>98	**317**
CD-(COOH)$_6$-MN (pH=7)	48	92	>98	**328**
CD-(COOH)$_7$-MN (pH=7)	43	74	>98	**221**
CD-(COOH)$_7$-MN (pH=4)	28	38	>98	**144**

Farklı pH ve sıcaklıklarda dönüşümler

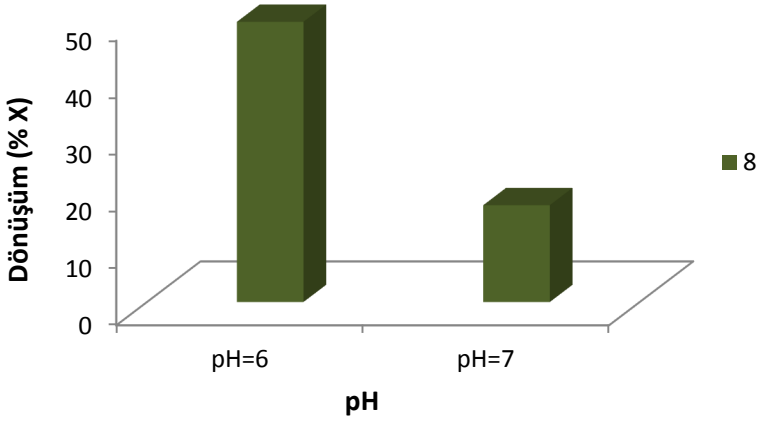
(R,S)-Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizi pH=7 de ve optimum pH' larda farklı destek maddeleri varlığında tutuklanmış lipazlar ile inkübe edilerek belirlendi.

Şekil 4.24- 4.25' de ve Çizelge 4.32' de görüldüğü gibi 7 ve 8 nolu bileşik ile yapılan enantiyoseçimlilik hidrolizinde pH=5 en yüksek, dönüşüm ve enantiyoseçimliliğe ulaştı.

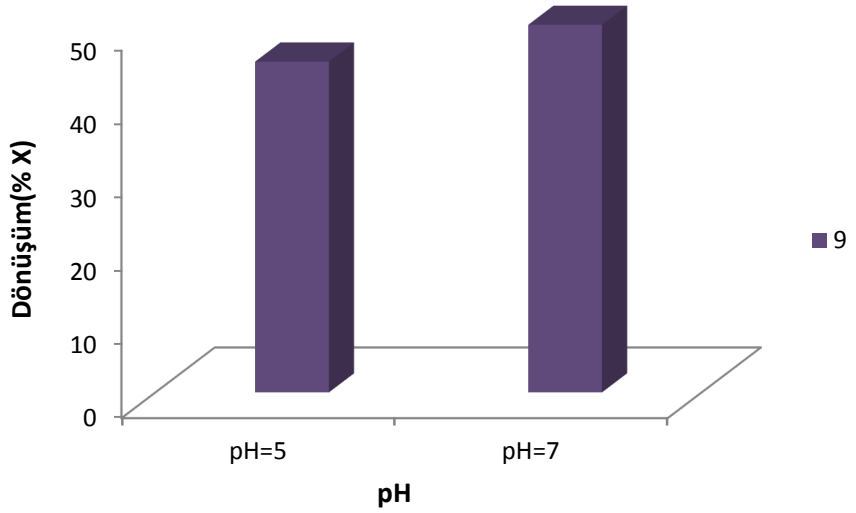
9 nolu bileşik pH=7'de en yüksek enantiyoseçimlilik ve dönüşüm gösterirken, hekzakarboksilik asit türevi (**10**) pH=5 de görüldü. (Şekil 4.26)-(Şekil 4.27).



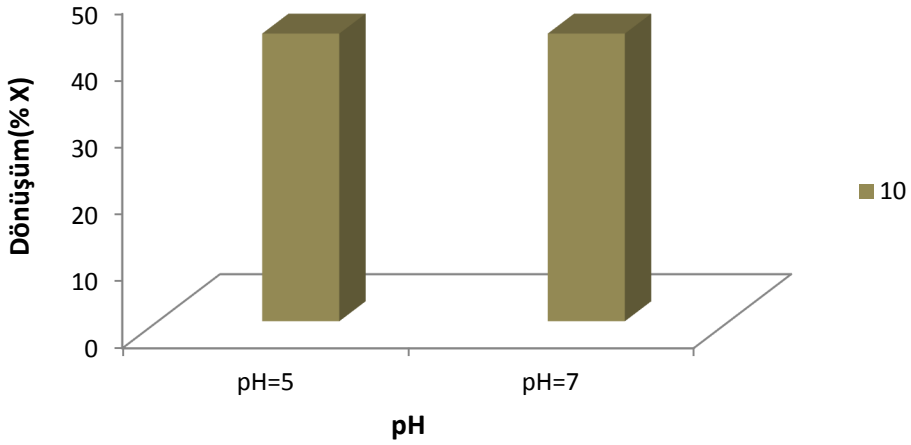
Şekil 4.24. 7 nolu bileşik için (R,S)- Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı pH'nın etkisi



Şekil 4.25. 8 nolu bileşik için (R,S)- Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı pH'nın etkisi

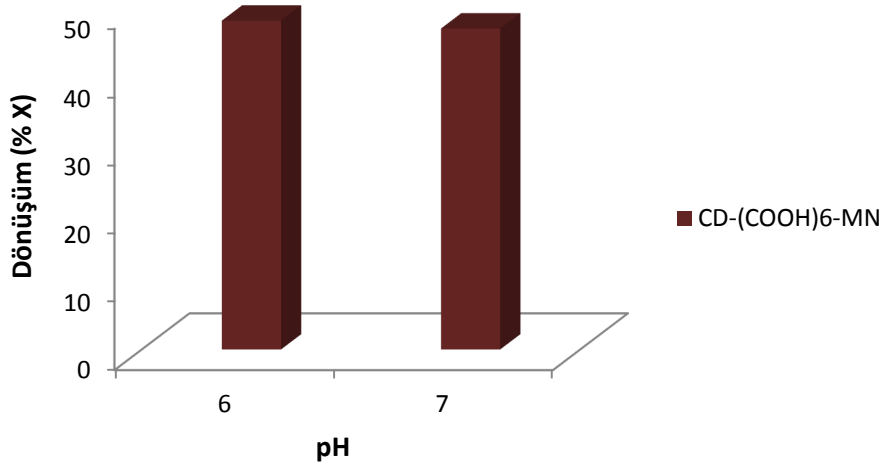


Şekil 4.26. 9 nolu bileşik için (R,S)- Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı pH'nın etkisi

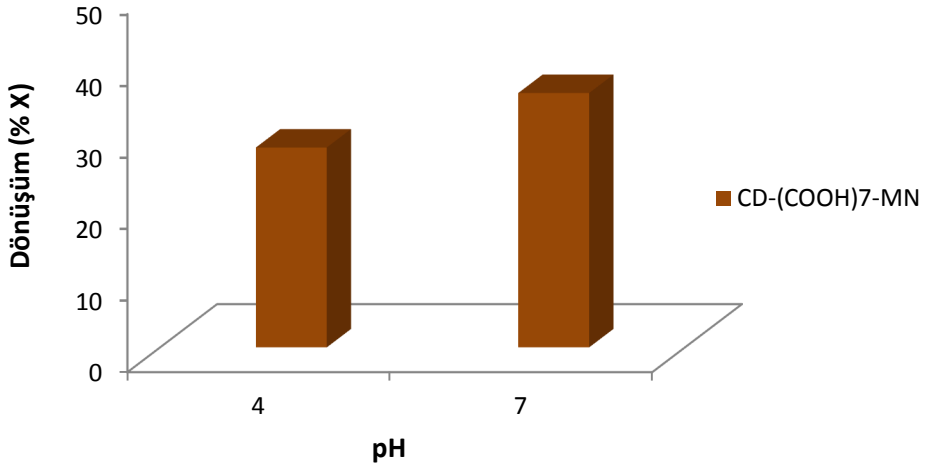


Şekil 4.27. 10 nolu bileşik için (R,S)- Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı pH'nın etkisi

Nanopartikül **CD(COOH)$_6$-MN** ve **CD(COOH)$_7$-MN** ile yapılan enantiyoseçimlilik tepkimelerinde her ikisinde pH=7'de en yüksek dönüşüm gösterdiği görüldü (Şekil 4.28)-(Şekil 4.29).



Şekil 4.28. $CD(COOH)_6$-MN bileşik için (R,S)- Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı pH'nın etkisi

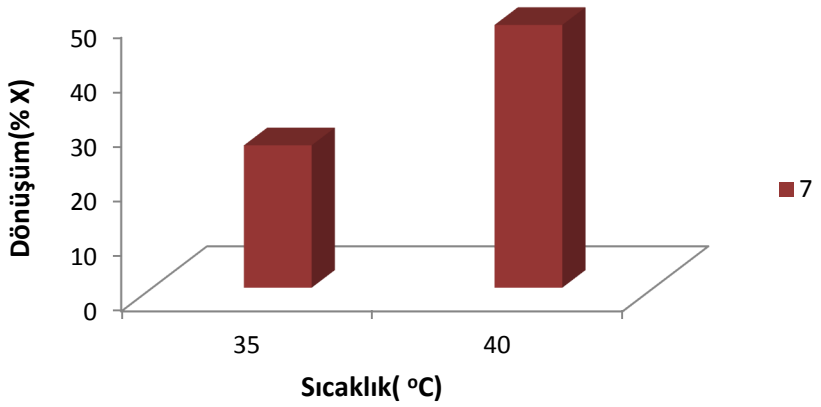


Şekil 4.29. $CD(COOH)_7$-MN bileşik için (R,S)- Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı pH'nın etkisi

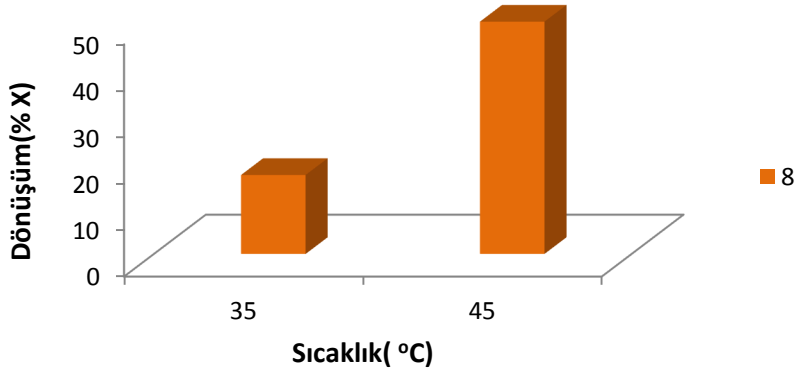
(R,S)-Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizi farklı sıcaklıklarda (35°C, 40°C ve 45°C) farklı destek maddeleri varlığında tutuklanmış lipazları **(7-10 ve $CD(COOH)_6$-MN)** inkübe ederek belirlendi.

Optimum sıcaklık değerleri enantiyoseçimli hidroliz çalışmalarında en iyi dönüşüm ve enantiyoseçimlilik, **7** ve **10** nolu bileşikler için 40°C (Şekil 4.30 ve Şekil

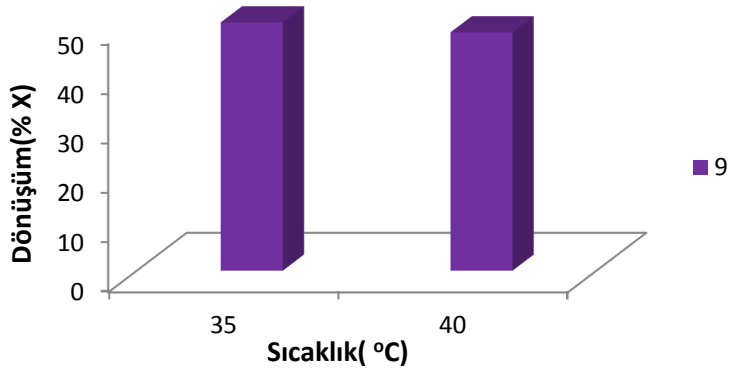
4.33), **(8)** nolu bileşik için 45°C (Şekil 4.31), **(9)** nolu bileşik için 35°C (Şekil 4.32) ve (**CD(COOH)$_6$-MN)** için 45°C (Şekil 4.34) olarak bulundu.



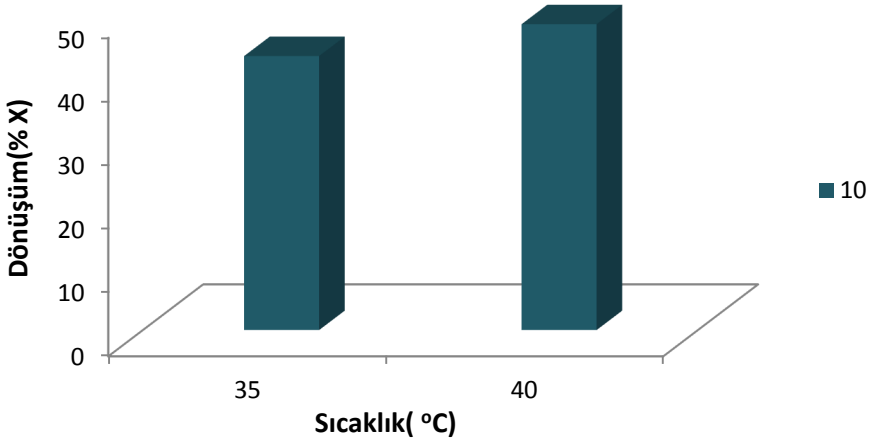
Şekil 4.30. 7 nolu bileşik için (R,S)- Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı sıcaklığın etkisi



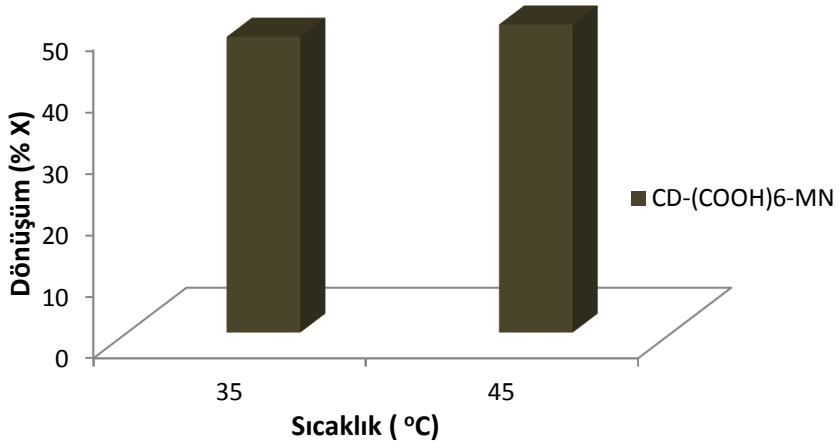
Şekil 4.31. 8 nolu bileşik için (R,S)- Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizinde dönüşüme karşı sıcaklığın etkisi



Şekil 4.32. 9 nolu bileşik için (R,S)- Naproksen metil esterin hidrolizin dönüşümüne karşı sıcaklığın etkisi



Şekil 4.33. 10 nolu bileşik için (R,S)- Naproksen metil esterin hidrolizin dönüşümüne karşı sıcaklığın etkisi



Şekil 4.34. CD-(COOH)6-MN bileşik için (R,S)- Naproksen metil esterin hidrolizin dönüşümüne karşı sıcaklığın etkisi

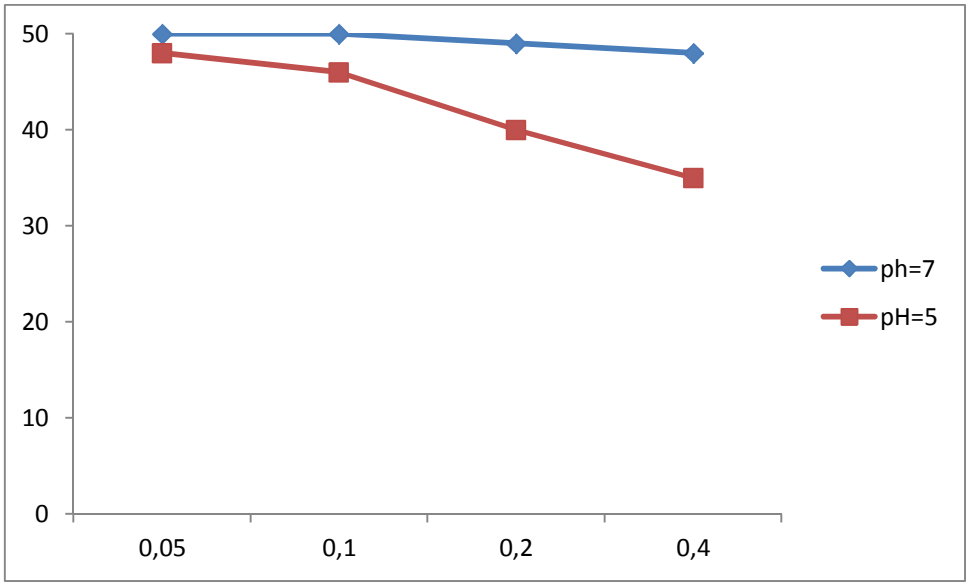
Kaliksaren miktarının (R,S)- Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizine etkisi

Kaliks[4]arenin tetrakarboksilik asit türevinin (**9**) farklı miktarda kullanımının (0,05; 0,1; 0,2; 0,4 g), (R,S)- Naproksen metil esterinin lipaz katalizli enantiyoseçimli hidrolizinde etkisi araştırıldı (Çizelge 4.4).

Bu tabloya baktığımızda kaliks[4]aren tetrakarboksilik asit türevinin bu sol-gel işleminde yaklaşık 0.05- 0.1 g kadar kullanılmasının yeterli olduğu ve bu miktarla pH=7 en büyük dönüşüm ve enantiyoseçimlilik göstermiştir (Şekil 4.35).

Çizelge 4.4. Kaliksaren miktarının değişimi ile rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizine etkisi

	***X* (%)**	***ee*$_s$ (%)**	***ee*$_p$ (%)**	***E***
Lipaz$_{tut}$[a]	20	25	>98	126
0,05 g (pH=5)	48	91	>98	**316**
0,05 g (pH=7)	50	99	>98	**525**
0,1 g (pH=5)	46	80	>98	**244**
0,1 g (pH=7)	50	99	>98	**525**
0,2 g (pH=5)	40	66	>98	**197**
0,2 g (pH=7)	49	93	>98	**340**
0,4 g (pH=5)	35	52	>98	**167**
0,4 g (pH=7)	48	90	>98	**307**

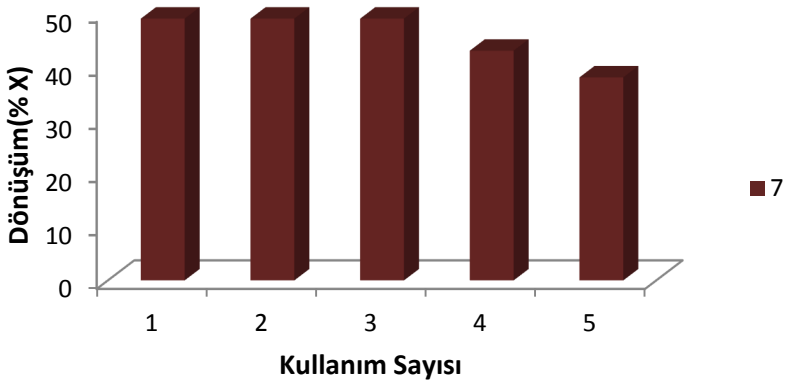


Şekil 4.35. 9 nolu bileşik için pH=7 ve pH=6'de kaliksaren miktarının dönüşüme etkisi

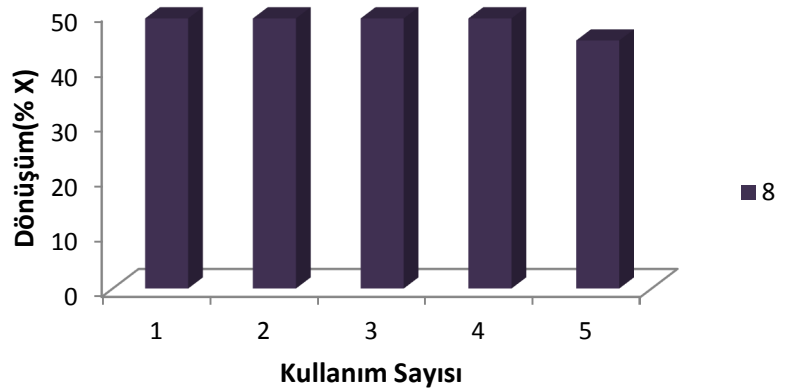
Tekrar kullanılabilirlik

Kaliks[4]aren karboksilik asit türevlerinin (**7, 8, 9, 10**) ve manyetik nanopartiküllere immobilize β-Siklodekstrin'in karboksilik asit türevlerinin (**CD(COOH)$_6$-MN, CD(COOH)$_7$-MN**), tutuklanmış lipazların tekrar kullanılabirlikleri test etmede pH=7'de optimum sıcaklıklarda, ayrıca 35^{o}C 'de optimum pH'larda denemeler yapıldı. Tekrar kullanılabilirlik, immobilize lipazların ilk kullanımdan sonra 3 kez 0.05M, pH 7.0 fosfat tamponu ile yıkanıp tekrar aktivitesine bakılarak yapıldı.

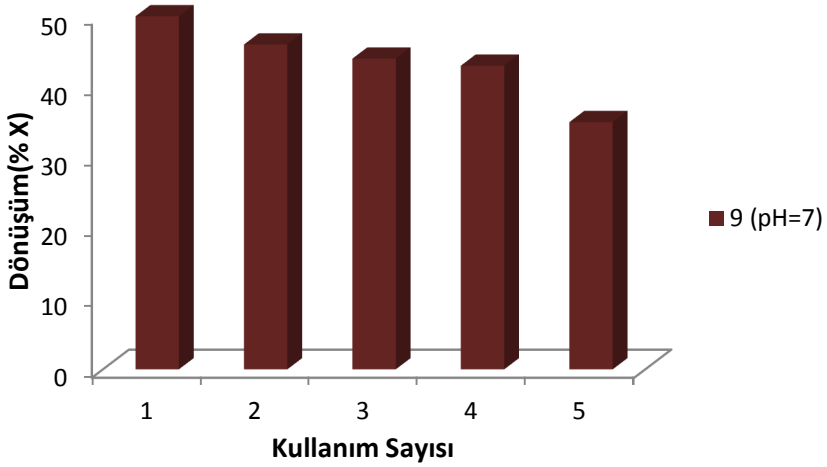
İmmobilize lipazların 5 kullanımdan sonra dönüşümü, **7** nolu bileşik için pH=5'de % 38, **8** nolu bileşik için pH=6'da % 45, **9** nolu bileşik için pH=7'de % 35, **10** nolu bileşik için pH=7'de % 28, **CD(COOH)$_6$-MN** için pH=7'de % 42, **CD(COOH)$_7$-MN** için ise pH=7'de % 40 olduğu görüldü.



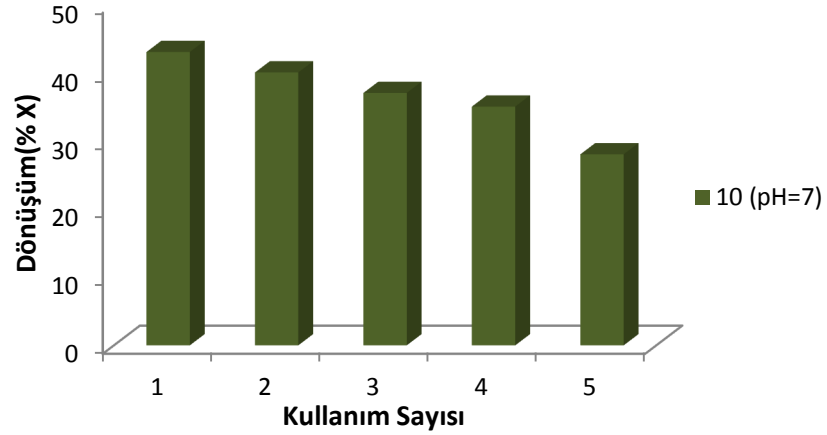
Şekil 4.36. 7 nolu bileşiğin pH=5'de tekrar kullanımı



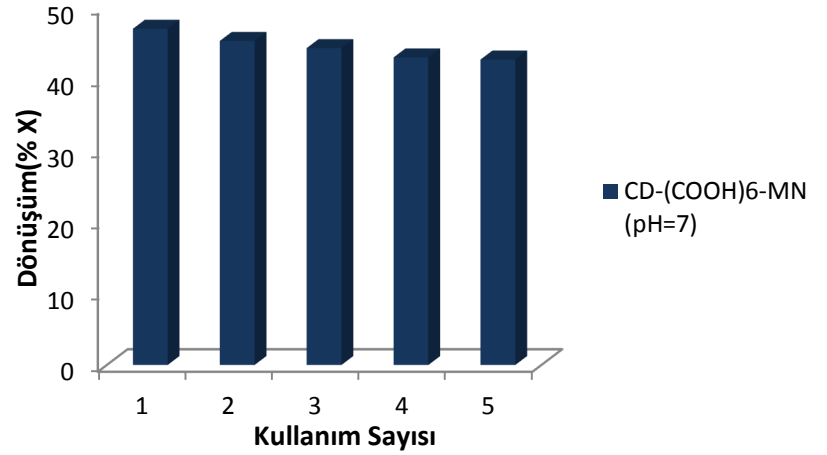
Şekil 4.37. 8 nolu bileşiğin pH=6'de tekrar kullanımı



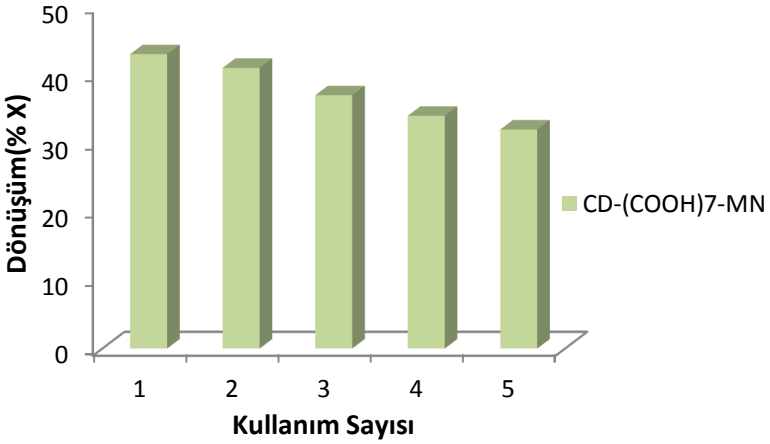
Şekil 4.38. 9 nolu bileşiğin pH= 7'de tekrar kullanımı



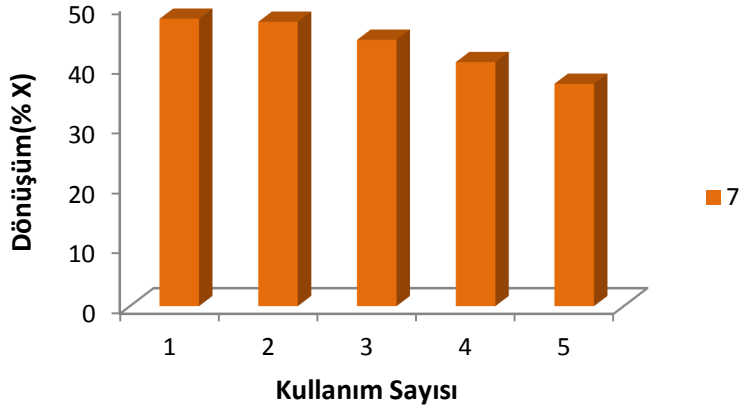
Şekil 4.39. 10 nolu bileşiğin pH= 7'de tekrar kullanımı



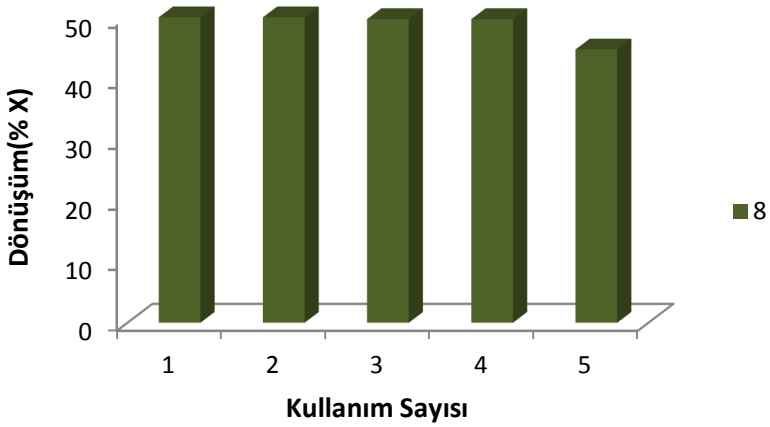
Şekil 4.40. CD-$(COOH)_6$-MN bileşiğin pH= 7'de tekrar kullanımı



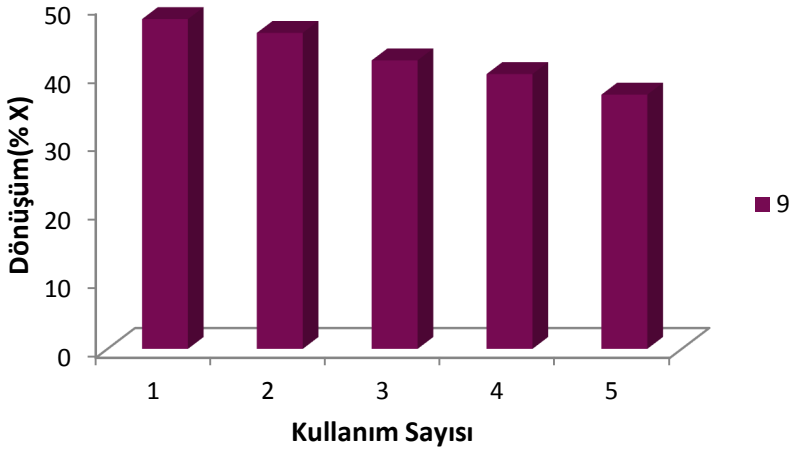
Şekil 4.41.CD-$(COOH)_7$-MNbileşiğin pH= 7'de tekrar kullanımı



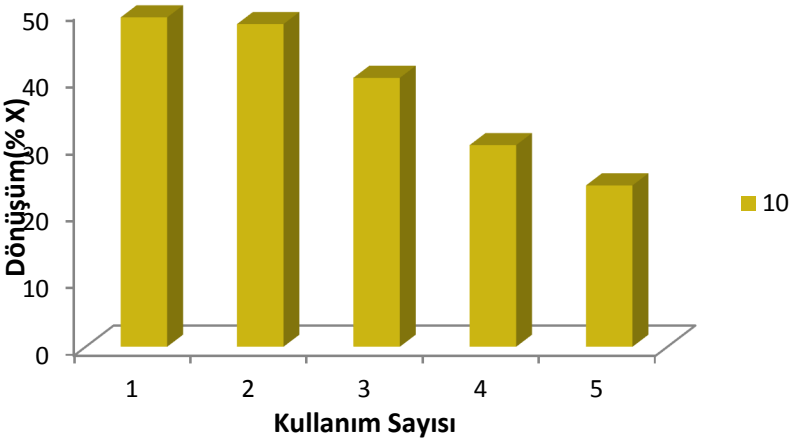
Şekil 4.42.7 nolu bileşiğin 40 ^{o}C'de tekrar kullanımı



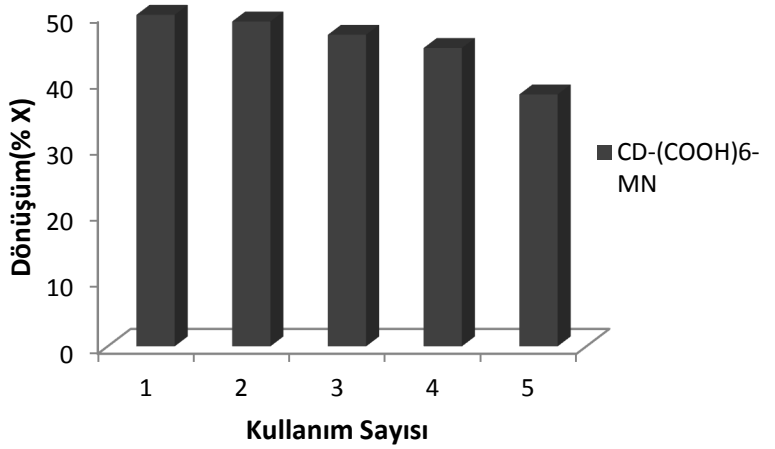
Şekil 4.43.8 nolu bileşiğin 45 ^{o}C'de tekrar kullanımı



Şekil 4.44.9 nolu bileşiğin 40 ^{o}C'de tekrar kullanımı



Şekil 4.45.10 nolu bileşiğin 40 ^{o}C'de tekrar kullanımı



Şekil 4.46.CD-$(COOH)_7$-MNbileşiğin 45 ^{o}C'de tekrar kullanımı

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Bu çalışmada, karboksilik asit grupları taşıyan, kaliks[4]aren'in diasit (**7**), divalerik asit (**8**), tetraasit (**9**) ve hekzaasit (**10**) türevleri ve β-siklodekstrin, heksa-etanoik asit-mono-(*p*-toluensulfonil)-β-siklodekstrin (**13**) ve karboksimetil-β-siklodekstrin (**14**) türevleri hazırlandı.
- Sentezlenen kaliks[4,6]aren ve β-siklodekstrin türevlerinin yapıları spektroskopi teknikler kullanılarak aydınlatıldı.
- Heksa-etanoik asit-mono-(*p*-toluensulfonil)-β-siklodekstrin (**13**) ve karboksimetil-β-siklodekstrin (**14**), amino grubu taşıyan Fe_3O_4 nanopartiküllere immobilize edildi.
- Sentezlenen kaliks[n]arenin karboksilik asit türevi ve β-CD türevi sol-gel tutuklamama tekniğine göre *Candida Rugosa* lipaz enzimi ile enkapsüle edildiler.
- Kaliksaren ve β-CD'nin karboksilik asit katkılı tutuklanmış lipazların spesifik aktiviteleri tayin edildi.
- Tutaklanan lipazların rasemik naproksen metil esterinin enantiyoseciçi tepkimelerde kullandılar.
- HPLC tekniği kullanılarak % dönüşüm (X) ve enantiyoseçimliliği (E) değerleri hesaplandı.
- Tutuklanmış kaliksaren ve β-CD karboksilik asit türevlerinin optimum pH ve sıcaklık araştırmaları yapıldı.
- Optimum pH ve sıcaklıklarda yapılan tutuklanmış lipazların tekrar kullanılabilirlikleri araştırıldı.
- Bu çalışmada kaliks[4]arenin tetraasit türevi (**9**), pH=7 ve 40 ^{o}C'de en yüksek dönüşüm ve enantiyoseçimliliği gösterdiği anlaşıldı.

KAYNAKLAR

Akceylan, E., 2004, Mannich reaksiyonu uygulayarak yeni kaliks[4]aren türevlerinin sentezi ve bu bileşiklerin faz transfer reaksiyonlarında kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya

Akceylan, E., Yilmaz, M., 2011, Synthesis of calix[4]arene alkylamine derivatives as new phase-transfer catalysts for esterification reaction, *Tetrahedron,* 67, 6240-6245

Akceylan, E., Sahin, O., Yilmaz, M., 2013, Improvement of catalytic activity of lipase in the presence of wide rim substituted calix[4]arene carboxylic acid-grafted magnetic nanoparticles, *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, (Baskıda)

Aksoy, C., 2003, Lipaz ve üreaz enzimlerinin çeşitli taşıyıcılara immobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, İstanbul Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, İstanbul, 1-68.

Aksoy, T., 2011, Farklı kaliks[n]aren bağlı manyetik nanopartiküllerin hazırlanması ve toksik bazı aromatik amin ve azo boyaların uzaklaştırılmasında kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya

Andrade, J.D., Hlady, V., 1986, Protein adsorption and materials biocompatibility: A tutorial review and suggested hypotheses, *Advances in Polymer Science*, 79,1-63.

Arnaud-Neu, F., Collins, E. M., Deasy, M., Ferguson, G., Harris, S.J., Kaitner, B., Lough, A.J., McKervey, M.A., Marques, E., Ruhl, B.L., Schwing-Weill, M.J., Sewardt, E.M., 1989, Synthesis, X-ray crystal structures, and cation-bindingproperties of alkyl calixaryl esters and ketones, a newfamily of macrocyclic molecular receptors, *J. Am. Chem. Soc.*, 111,8681-8691

Arica, O, Suzuki, T, Sano Y, Murakami, Y., 1996, Immobilization of a thermostable enzyme using a sol–gel preparation method, *Journal of Fermentation and Bioengineering*,82, 341–345.

Arslan, M., 2012, Manyetik β-siklodekstrin nanopartiküllerin sentezi ve bazı kiral karboksilik asitlere karşı ekstraksiyon özeliklerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya

Baekeland, L. H., 1908, Method of making insoluble products of phenol and formaldehyde, *U. S. Patent Number(s),* 942, 699.

Bakkal, M.,2006, Tutuklanmış *Candida Rugosa* lipazı İle rasemik Naproksen Metil Esterden (S)-Naproksen üretiminde proses parametrelerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-139.

Bekers, O:,Uijtendaal, E.V., Beijnen, J.H., Bult, A., Underberg, W.J.M., 1991, Cyclodextrines in the pharmaceutical field, *Drug Dev. Ind. Pharm*., 17,11, 1503-1549.

Bender, M., Komiyana, L., 1978, Cyclodextrion chemistry*, Springer*, New York.

Bender, M. L.; Komiyama, M., 1978, Cyclodextrin chemistry, *Springer Verlag*, Berlin.

Benjamin, S., Pandey, A. 1998. Candida rugosa lipases, *Molecular biology and versatility in biotechnology*. Yeast, 14; 1069–1087.

Bezbradica, D., Mijin, D., Siler-Marinkovic, S., Knezevic, Z., 2006, The *Candida rugosa* lipase catalyzed synthesis of amyl isobutyrate in organic solvent and solvent-free system: A kinetic study, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 38, 11–16.

Bilensoy, E., Hıncal, A. A. (2008). Cyclodextrin based nanomaterials in pharmaceutical field. *Pharmaceutical Manufacturing Handbook: Production and Processes,* New Jersey, John Wiley&Sons, 1225-1247.

Bitter, I., Grün, A., Toth, G., Balazs, B., Horvarth, G., Toke, L., 1998, Studies on CaIix(aza)crowus, II.' synthesis of novel proximal doubly bridged Calix[4]arenes by intramolecular ring closure of syn l,3-and 1,2- w- chtoroalkylamides, *Tetrahedron,* 54, 3857-3870

Bozkurt, S., Durmaz, M., Yilmaz, M., Sirit, A., 2008, Calixarene-based chiral phase-transfer catalysts derived from cinchona alkaloids for enantioselective synthesis of α-amino acids, *Tetrahedron Asymm*., 19, 618-623.

Böhmer, V., 1995, Calixarenes, macrocycles with (almost) unlimited possibilities, *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 34, 713-745.

Bradford, M.M. 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding, *Anal. Biochem.,* 72, 248-254.

Braun S., Rappoport S., Zussman R., Avnir D., Ottolenghi M., 1990, Sol-gel based enzyme immobilization, *Materials Letters*, 10, 42-49.

Braun, S, Rappoport, S, Zusman, R, Avnir, D, Ottolenghi, M., 1990, Biochemically active sol–gel glasses; the trapping of enzymes, *Materials Letters*,10,1–5.

Breslow, R., 1995, Biomimetic chemistry and artificial enzymes, *Acc. Chem. Res.,* 28, 146-153.

Brinker, C. J., Scherer, G. W., 1990, Sol-gel science: *The Physics and Chemistry of Sol-Gel Processing*, Academic Press, Boston.

Brzozowski, A. M., Derewenda, U., Derewenda, Z. S., 1991, A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex, *Nature* (London), 351, 491–494.

Cernia, E., Deflini, M., Cocco E.D., Palloci, C., Soro, S., 2002, Investigation of lipase catalysed hydrolysis of naproxen methyl ester: use NMR spectrescopy methods to study substrate–enzyme interaction. *Bioorg Chem*, 30, 276–84.

Challa, R., A. Ahuja, J.A., R.K. Khar., 2005,*AAPS Pharm. Sci. Tech.* 6**,** 2, 43.

Chang, S.-W., Shaw, J.-F., Yang, K.-H., Chang, S.-F., Shieh, C.J., 2008, Studies of optimum conditions for covalent immobilization of Candida rugosa lipase on poly(c-glutamic acid) by RSM, *Bioresource Technology*, 99, 2800-2805.

Cameron, B.R. and Loeb, S.J., 1997, Bis(amido)calix[4]arenes in the pinched cone conformation as tuneable hydrogen-bonding anion receptors, *Chem. Comm.*, 573.

Campàs M., Marty J.L., 2006, Encapsulation of enzymes using polymers and Sol-gel techniques, *Humana Press Inc.*, Totowa, NJ.,92-97.

Cao L.Q., 2005, Immobilized enzymes: science or art, *Current Opinion in Chemical Biology*, 9, 217–226.

Cao, L., 2005,Carrier-bound immobilized enzymesprinciples, applications and design, *Strauss GmbH, Morlenbach,Germany* ,373-378.

Chiou, S.H., Wu, W.T., 2004, Immobilization of *Candida rugosa* lipase on chitosan with activation of the hydroxyl groups, *Biomaterials*, 25, 197-204.

Collins, E. M., McKervey, M. A., Madigan, E., Moran, M.B., Owens, M., Ferguson, G., J. Harris, G.J., 1991, Chemically modified Calix[4]arenes. regioselective synthesis of 1,3-(distal) derivatives and related compounds. X-Ray Crystal structure of a diphenol- dinitrile, *J. Chem. Soc. Perkın Trans. I,*3137-3142

Dave, B., Soyez, H., Miller, J. M., Dunn, B., Valentine, J. S., Zink, J. I., 1995, Synthesis of protein-doped sol-gel SiO2 thin films: evidence for rotational mobility of encapsulated cytochrome *c*, *Chemistry of Materials*, 7, 1431–1434.

Debouzy, J.C., Fauvelle, F., Crouzy, S., Girault, L., Chapron, Y., Göschl, M., Gadelle, A., 1997, Mechanism of α-cyclodextrin induced hemolysis 2. A study of the factors controlling the association with serine-, ethanolamine-, and choline-phospholipids, *Journal of Pharmaceutical Sciences,* 87(1), 59-66.

Dhawan, B., Chen, S.-I., Gutsche, C. D., 1987, Calixarenes 19. studies of the formation of calixarenes via condensation of para-alkylphenols and formaldehyde, *Makromol. Chem.,* 188, 921-950.

Dospil, G., Schatz, J., 2001, Synthesis and characterization of imidazole-substituted calix[4]arenes as simple enzyme-mimics with acyltransferase activity, *Tetrahedron Lett*. 42, 7837-7840.

Duchene, D., Wouessidjewe, D., 1990, Pharmaceutical uses of cyclodextrin and derivatives, *Drug Dev. Ind. Pharm*., 16,17, 2487-2499.

Edmiston, P. L., Wambolt, C. L., Smith, M. K., and Saavedra, S. S., 1994, Spectroscopic characterization of albumin and myoglobin entrapped in bulk sol-gel glasses, *Journal of* ***Colloid*** *and* ***Interface Science*****,** 163, 395–406.

Encyclopedia of controled drug delivery, *John Wiley & Sons*, New York 1999, 1, 283

Erdemir, S., 2006, Kiral kaliks[4]aren amit türevlerinin sentezi ve aminoasitlerin seçimli ekstraksiyonunda kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, *Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Konya,

Erdemir, S., Yilmaz, M., 2010, Preparation of a new 1,3-alternate-calix[4]arene-bonded HPLC stationary phase for the separation of phenols, aromatic amines and drugs, *Talanta*, 82, 1240-1246.

Erdemir, S., Yilmaz, M., 2011, Preparation and chromatographic performance of calix[4]crown-5 macrocyclebonded silica stationary phase, *J. Sep. Sci.*, 34, 393-401.

Erden, S., Demirel, A., Memon, S., Yilmaz, M., Canel, E., Kılıc, E., 2006, Using of hydrogen ion-selective poly(vinyl chloride) membrane electrode based on calix[4]arene as thiocyanate ion-selective electrode, *Sensors and Actuators B*, 113, 290-296.

Ertürün, H. E. K., Yilmaz, M., Kilic, E., 2007, Construction of an anion-selective electrode: Dichromate-selective electrode, *Sensors and Actuators B*, 127, 497-504.

Etci, K., 2011, Sol- jel tekniğine göre manyetik nanopartiküllere lipaz immobilizasyonu ve bazı enantiyoseçimli tepkimelerde kullanılması, Yüksek Lisans Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

Faber, K., 2000, Biotransformations in organic chemistry, 4th Edition, *Springer-Verlag*, Berlin.

Faber, K. Ottolina, G. Riva, S., 1993, Selectivity-enhancement of hydrolase reactions, *Biocatalysis,* 8, 91–132.

Gao, X.,2004, Immobilization of lipases via Sol-gel procedures and application of the immobilized lipases in oleochemical reactions, Ph.D., University of Nebraska, Lincoln, NE, 40-49.

Gezer, E.,2009, Lipaz enziminin immobilizasyonu ve aromatik esterlerin sentezinde kullanımı, Yüksek Lisans Tezi, Mustafa Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Antakya/Hatay, 1-67.

Goldsteın, L., Manecke, G., 1976, *Applied Biochemistry And Bioengineering*, Academic Press, New York, 123-125.

Gottfried, D. S., Kagan, A., Hoffman, B. M., Friedman, J. M., 1999, Impeded rotation of a protein in a sol-gel matrix. *J. Phys. Chem. B,* 103, 2803–2807.

Guisan, J. M., 2006, Methods in biotechnology: immobilization of enzymes and cells, *Second Edition, Humana Press Inc.*, Totowa, NJ, 92-100.

Gutsche, C. D. and Mukhukrishnan, R., 1978, Calixarenes. 1. analysis of the product mixtures produce by the base-catalyzed condensation of formaldehyde with *p*-substitued phenols, *J. Org. Chem*., 43(25), 4905-6.

Gutsche, C. D., Dhawan, B., No, K. H., Muthukrishnan, R., 1981, Calixarenes. 4. the synthesis, characterization and properties of the calixarenes from *p*-tert-butylphenol, *J. Am. Chem. Soc.,* 103, 3782-92. *Idem*, *ibid*., 1984, 106, 1891.

Gutsche, C. D., 1983, Calixarenes, *Acc. Chem. Res*., 16, 161.

Gutsche, C. D., Bauer, L. J., 1985, Calixarenes. 14. the conformational properties of the ethers and esters of the calix[6]arene and the calix[8]arene, *J. Am. Chem. Soc.*, 107, 6059-6063.

Gutsche, C.D., Pagoria, P.F., 1985, Calixarenes. 16. functionalized calixarenes: direct substitution route, *J. Org. Chem.,* 50, 5795-5802.

Gutsche, C. D., Lin, L. G., 1986, Calixarenes12. the synthesis of functionalized calixarenes, *Tetrahedron*, 42 (16), 1633-40.

Gutsche, C. D., Iqbal, M., Stewart, D., 1986, Calixarenes 18. synthesis procedures for *p-ter*-butylcalix[4]arene, *J. Org. Chem*.,51, 742-5.

Gutsche, C. D., 1987, "Calixarenes" Prog. *Macrocyclic Chem.*, 3, 93.

Gutsche, C. D., Nam, K. C., 1988, Calixarenes 22. synthesis, properties and metal complexation of aminocalixarenes, *J. Am. Chem. Soc*., 110, 6153-62.

Gutsche, C. D.; Alam, I., 1988, Calixarenes. 23. the complexation and catalytic properties of water soluble calixarenes, *Tetrahedron,* 44, 4689.

Gutsche, C. D., 1989, Monograph in supramolecular chemistry: calixarenes, *The Royal Society of Chemistry, Cambridge, London*.

Gutsche, C. D. and Iqbal, M., 1990, *p-tert*-Butylcalix[4]arene, *Org.Syn.,* 68, 234-7.

Hartnett, A. M., Ingersoll, C. M., Baker, G. A., Bright, F. V., 1999, Kinetics and thermodynamics of free flavin and the flavin-based redox active site within glucose oxidase dissolved in solution or sequestered within a sol-gel-derived glass, *Analytical Chemistry*, 71, 1215–1224.

Hench, L. L. and West, J. K., 1990, The sol-gel process, *Chemical Society,* 90, 33–79.

Hench, L. L. and West, J. K., (1990), The sol-del process, *Chemical Review*, 90, 33–72.

Hung, T.C., Giridhar, R., Chiou, S.H., Wu, W.T., 2003, Binary Immobilization of *Candida Rugosa* Lipase on Chitosan, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 26, 69-78.

Iwai, M., Tsuyisaka, M., Fukumoto, J. 1964, Lipase II. hydrolytic and esterifying actions of crystalline lipase of aspergillus niger, *Genetic Applied Microbiololgy,* 10: 13-22.

Izatt, R. M., Bradshaw, J. S., Pawlak, K., Bruening, R. I., Tarbet, B. J., 1992, Thermodynamıc and kınetıc data for macrocycle interaction with neutral molecules, *Chem. Rev.* 92 (6), 1261-1354.

İşbakan, N., 2006, Lipaz enzimi biyokatalizörlüğünde enantiyomerik saflıkta 1-fenil-1-propanolün transesterleşme tepkimesiyle kinetik rezolüsyonu, Yüksek Lisans Tezi, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-109.

Jaeger, K.E., Reetz, M. T., 1998, Microbial lipases form versatile tools for biotechology, *Trends in Biotechnology*, 16, 396-403.

Kamboh, A., Akoz, E., Memon, S., Yilmaz, M., 2013, Synthesis of amino-substituted p-tert-butylcalix[4]arene for the removal of chicago Sky Blue and Tropaeolin 000 azo dyes from aqueous environment, *Water Air Soil Pollut*, 224, 1424

Karaca, N., 2006, Poli(N,N-dimetilakrilamit-ko-akrilamit) ve poli(N-izopropilakrilamit-ko-akrilamit)/$_K$-Karragenan polimerleri kullanılarak lipaz enziminin immobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, 2006, 1-73.

Karakucuk, A., Kocabas, E., Sirit, A., Memon, S., Yilmaz, M., Roundhill, D.M., 2005, Polymer supported calix[4]arene schiff bases: a novel chelating resin for Hg^{2+} and dichromate anions, *J. Macromol. Sci.-Pure Appl. Chem.,* 42, 691-704.

Kennedy, J.F., 1995, Handbook of Enzyme Biotechnology, Third Edition, *Editör Allen Wisemann, EllisHorwood*, 235-310.

Kim, S. K., Bok, J. H., Bartsch, R. A., Lee, J. Y. and Kim, J. S., 2005, A Fluoride-selective PCT chemosensor based on formation of a static pyrene excimer, *Organic Letters*, 7 (22), 4839-4842.

Kim, D. J., Shin, D. H., Hur, B. K., and Kim, E. K., 2000, Beef tallow hydrolysis by immobilized lipase*, Journal of Microbiology and Biotechnology,* 10, 836.

Knezevic, Z.D., Siler-Marinkovic, S.S., Mojovic, L.V, 2004, Immobilized lipases as practical catalysts, *BIBLID*, 35, 151-164.

Komiyama, M., Yamamoto, Y., Hirai, H., 1984, Complex formation of modified cyclodextrins with organic salts in organic solvents, *Chemistry Letters,* 1081-1084.

Lehn, J. -M., 1988[a], Supramolecular chemistry-scope and perspectives-molecules, supermolecules molecular devices, *J. Incl. Phenom.*, 6 (4), 351-396.

Lehn, J. –M., 1988[b], " Supramolecular chemistry-scope and perspectives molecules, supermolecules, and molecular devices", *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 27, 89-112.

Lehn, J. –M., 1995, " Supramolecular chemistry", *VCH,* Weinheim.

Lei, L., Bai, Y., Li, Y.,Yi, L.,Yang, Y., Xia, C., 2009, Study on immobilization of lipase onto magnetic microspheres with epoxy groups, *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, 321, 252–258.

Li, Z. Y., Chen, J. W., Wang, L., Pan, Y., 2009, Highly enantioselective direct aldol reactions catalyzed by proline derivatives based on a calix[4]arene scaffold in the presence of water, *Synlett*, 14, 2356-2360.

Li, R., Liu, S., Zhao, J., Otsuka, H., Takahara, A., 2011, Preparation of superparamagneyic beta-cyclodextrin-functionalized composite nanoparticles with core-shell structures, *Springer*, 66, 1125-1136

Loftsson, T., E. Stefansson., 1997, *Drug Dev Ind Pharm.* 23**,** 473-481.

Luzardo-Álveraz, A., Antelo-Queijo, A., Soto, V.H., Blanco-Méndaz, J., 2012, Preparation and characterization of b-Cyclodextrin-linked chitosan microparticles, *Journal of Applied Polymer Science*, 123, 3595-3604.

Mosback, K., 1976, *Immobilized enzymes, methods in enzymology, academic press*, New York, 44.

Munch, J. H., Gutsche, C. D., 1990, para-tert-Butylcalix[8]arene, *Org. Syn.*, 68, 243-246.

Mutlu D., 2006, Rasemik Naproksen esterden enantiyoseçimli hidroliz ile S-Naproksen üretiminde reaksiyon parametrelerinin incelenmesi, Yüksek Lisans Tezi Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara, 1-101.

Oh,J.M., Lee,D.H., Song,Y.S., Lee,S.G., Kim,S.W., 2007, Stability of immobilized lipase on poly(vinyl alcohol) microspheres, *Journal of Industrial and Engineering Chemistry***,**13(3), 429-433.

Öztürk, N., 2006, Hidrofobik nano yapılarda *Candida Rugosa* lipaz immobilizasyonu, Yüksek Lisans Tezi, Adnan Menderes Üniverstesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Aydın, 1-128.

Paiva, A.L., Balcao, V.M. and Maltaca, F. X., 2000, Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases, *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 187-204.

Park, S.W., Choi, S.Y., Chung, K.H., Hong, S.I., Kim, S.W., 2002, Characteristics of GL-7-ACA acylase immobilized on silica gel through silanization, *Biochemical Engineering Journal*, 11, 87-93.

Pedersen, C. J., 1967, Cyclic polyethers and their complexes with metal salts, *J. Am. Chem. Soc.*, 89, 2495.

Pedersen, C. J., 1988[a], The discovery of crown ethers, *Chem. Scripta.*, 28 (3), 229.

Pedersen, C. J., 1988[b], The discovery of crown ethers, *J. Incl. Phenom.*, 6, 337.

Petrak, K.,2005, *Drug Discovery Today* 10, 23/24.

Reetz, M. T., Zonta, A., Simpelkamp, J., 1995, Efficient heterogeneous biocatalysts by entrapment of lipases in hydrophobic sol-gel materials, *Angewandte Chemie* 107, 373–376; *Angewandte Chemie International Edition in English*, 34, 301–303.

Reetz, M. T., Zonta, A., Simpelkamp, J., 1996, Efficient immoblization of lipases by entrapment in hydrophobic sol-gel materials, *Biotechnology and Bioengineering* , 49, 527–534.

Reetz, M. T., 1997, Entrapment of biocatalysts in hydrophobic sol-gel materials for use in organic chemistry, *Advanced Materials,* Weinheim, Ger., 9, 943–954.

Reetz, M. T., Zonta, A., Vijayakrishnan, V., Schimossek, K., 1998, Entrapment of lipases in hydrophobic magnetite-containing sol-gel materials: magnetic separation of heterogeneous biocatalysts, *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 134, 251–258.

Reetz, M.T., Tielman, P., Wiesenhoefer, W., Koenen, W., Zonta, A., 2003, Second generation sol–gel encapsulated lipases: robust heterogeneous biocatalysts, *Advanced Synthesis Catalysis*, 345, 717–728.

Reetz, M.T.,2006, Practical protocols for lipase immobilization via Sol-gel techniques, *Humana Press Inc.*, Totowa, NJ., 80-85.

Şahin, O., Erdemir S., Uyanik A., Yilmaz M., 2009, Enantioselective hydrolysis of (R/S)-Naproxen methyl ester with sol–gel encapculated lipase in presence of calix[n]arene derivatives, *Applied Catalysis A: General*, 369, 36-40.

Sahin, O., Yilmaz, M., 2011, Synthesis and fluorescence sensing properties of novel pyrene-armed calix[4]arene derivatives, *Tetrahedron,* 67, 3501-3508.

Santos, J.C., Castro, H.F., 2006, Optimization of lipase-catalysed synthesis of butyl butyrate using a factorial design, *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 22, 1007–1011.

Sayin, S., Ozcan, F., Yilmaz, M., 2010, Synthesis and evaluation of chromate and arsenate anions extraction ability of a N-methylglucamine derivative of calix[4]arene immobilized onto magnetic nanoparticles, *Journal of Hazardous Materials*, 178, 312-319.

Sayin, S., Ozcan, F., Yilmaz, M., Tor, A., Memon, S., Cengeloglu, Y., 2010, Synthesis of calix[4]arene-grafted magnetite nanoparticles and evaluation of their arsenate as well as dichromate removal efficiency, *Clean – Soil, Air, Water*, 38 (7), 639-648

Sayin, S., Yilmaz, M., 2011, Preparation and uranyl ion extraction studies of calix[4]arene-based magnetite nanoparticles, *Desalination*, 276, 328-335.

Sharma, R., Chisti Y., Banerjee, U. C., 2001, Production, purification, characterization,and applications of lipases, *Biotechnology Advances,* 19, 627-662.

Secundo, F., Carrea, G., Tarabiono, C., Brocca, S., 2003, Activity and enantioselectivity of wildtype and lid mutated *Candida rugo*sa lipase ısoform 1 in organic solvents, *Biotechnology and Bioengineering,* 86, 237- 240.

Shimizu, S., Shirakawa, S., Suzuki, T., Sasaki, Y., 2001, Water-soluble calixarenes as new inverse phase-transfer catalysts. Their application to aldol-type condensation and Michael additionreactions in water, *Tetrahedron,* 57, 6169-6173.

Sliwka-Kaszynska, M., Gorczyca, G., Slebioda, M., 2010, Characterization of 1,3-alternate calix[4]arene-silica bonded stationary phases and their comparison to selected commercial columns by using principal component analysis, *Journal of Chromatography A,*1217, 329-336.

Sökmen, B. B. 2005, Kayısı (*Armeniaca Vulgaris* Lam.) tohumlarından lipazın saflaştırılması ve çeşitli taşıyıcılara immobilize edilmesi, Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programı, İstanbul.

Stewart, D. R., Gutsche, C. D., 1993, The one-step synthesis of p-tert-butylcalix[5]arene, *Org. Prep. Proced. Int.*, 25, 137-139.

Szejtle, J., 1988, Cyclodextrin technology, topics in inclusion science, *Kluwer Academic Publishers Dordrecht*, Vol. 1.

Szejtli, J. 1989, Downstream processing using cyclodextrins, *Trends in Biotechnology*, 7 (7), 170-174.

Tabakci, M., Yilmaz, M., 2008, Sorption characteristics of Cu(II) ions onto silica gel-immobilized calix[4]arene polymer in aqueous solutions: Batch and column studies, *J. Haz. Mat.*, 151, 331-338

Takac, S., Bakkal, M., 2007, Impressive effect ofiImmobilization conditions on thecatalytic activity and enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase toward *S*-Naproxen Production, *Process Biochemistry,* 42, 1021–1027.

Taneri, F., 2004, Bazı antimikrobiyal maddelerin siklodekstrin komplekslerinin hazırlanması ve bunların farmasötik formülasyonlarda kullanımı, Doktora Tezi, *Ege Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, İzmir, 1-28.

Tejo, B. A., Salleh, A.B., Pleiss, J., 2004, Structure and dynamics of *Candida rugosa* lipase: The role of organic solvent, *Journal Molecular Model*, 10, 358-366.

Telefoncu A., 1997, Temel ve uygulamalı enzimoloji, biyokimya lisansüstü yaz okulu kitabı, Ege Üniversitesi Basımevi, İzmir.

Ting, Y., Verboom, W., Groenen, L.C., van Loon, J-D., Reinhoudt, D.N., 1990, Selectively dehydroxylated calix[4]arenes and 1,3-dithiocalix[4]arenes-novel classes of calix[4]arenes, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.,* 20, 1432-1433.

Ting, W.J., Tung ,K.Y., Giridhar, R., Wu, W.T., 2006, Application of binary immobilized *Candida rugosa* lipase for hydrolysis of soybean oil, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 42, 32–38.

Tiryaki, Ö. İ., 1993, Endüstriyel proseslerde biyokatalizör pelletlerin kullanımı, Yüksek Lisans Semineri, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Tischer, W. and Wedekind, F., 1999, Immobilized enzymes: methods and applications, *Topics inCurrent Chemistry***,** 200**,** 95–126.

Tutar, H.,Yilmaz, E., Pehlivan, E., Yilmaz, M., 2009, Immobilization of Candida rugosa lipase on sporopollenin from Lycopodium clavatum, *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 315–320.

Uekama, K., Horiuchi, Y., İrie, T., Hirayama, F., 1989, *O*-Carboxymethyl-*O*-ethyl-cyclomaltoheptaose as a delayed release type drug carrier. Improvement of the oral availability of diltiazem, *Carbohydrate Research,* 192, 323-330.

Uyanik, A., Sen, N.,Yilmaz M., 2011, Improvement of catalytic activity of lipase from Candida rugosa via sol–gel encapsulation in the presence of calix(aza)crown, *Bioresource Technology*,102, 4313–4318.

Vogtle, F., 1993, Supramolecular chemistry an introduction, *J. Wiley and Sons*, New York.

Wu, J.Y., Liu, S.W., 2000, Influence of alcohol concentration on lipase-catalyzed enantioselective esterification of racemic naproksen in isooctane: under controlled water activity, *Enzyme and Microbial Technology,* 26, 124–130

Yavuz, B., 2009, Siklodekstrin kompleksi oluşturarak, ekzemestan'ın çözünmesinin ve in vitro geçirgenliğinin arttırılması, Yüksek Lisans Tezi, *Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 4-15.

Yilmaz, M., 1999, Synthesis of an oligomer-supported calix[4]arene and selective extraction of Li^{+}", *React. and Func. Polym.,* 40, 129-133.

Yilmaz, E., Sezgin, M., Yilmaz, M., 2009, Synthesis and characterization of cyclodextrin-based polymers as a support for immobilization of Candida rugosa lipase, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic,* 57, 109-114

Yılmaz, E., 2010, Farklı teknikler kullanarak değişik destek materyallerine lipazimmobilizasyonu ve bir anti-inflammator olan S-naproksenin oluşumunda kullanılması, Doktora Tezi, Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Entitüsü, Konya, 1-275.

Yilmaz, E., Sezgin, M., Yilmaz, M., 2010, Enantioselective hydrolysis of rasemic naproxen methyl ester with sol–gel encapsulated lipase in the presence of sporopollenin, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62, 162-168

Yilmaz, E., Sezgin, M., Yilmaz, M., 2011, Immobilization of Candida rugosa lipase on magnetic sol–gel composite supports for enzymatic resolution of (R,**S**)-Naproxen methyl ester, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 69, 35-41

Yilmaz, E., Can K., Sezgin, M., Yilmaz, M., 2011, Immobilization of Candida rugosa lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester,*Bioresource Technology*, 102, 499-506

Ozyilmaz, E., Sayin, S., 2013, Preparation of New Calix[4]arene-Immobilized Biopolymers for Enhancing Catalytic Properties of Candida rugosa Lipase by Sol–Gel Encapsulation, Appl Biochem Biotechnol,(Baskıda)

Ozyilmaz, E., Sayin, S., 2013,A magnetically separable biocatalyst for resolution of racemic naproxen methyl ester, Appl Biochem Biotechnol,(Baskıda)

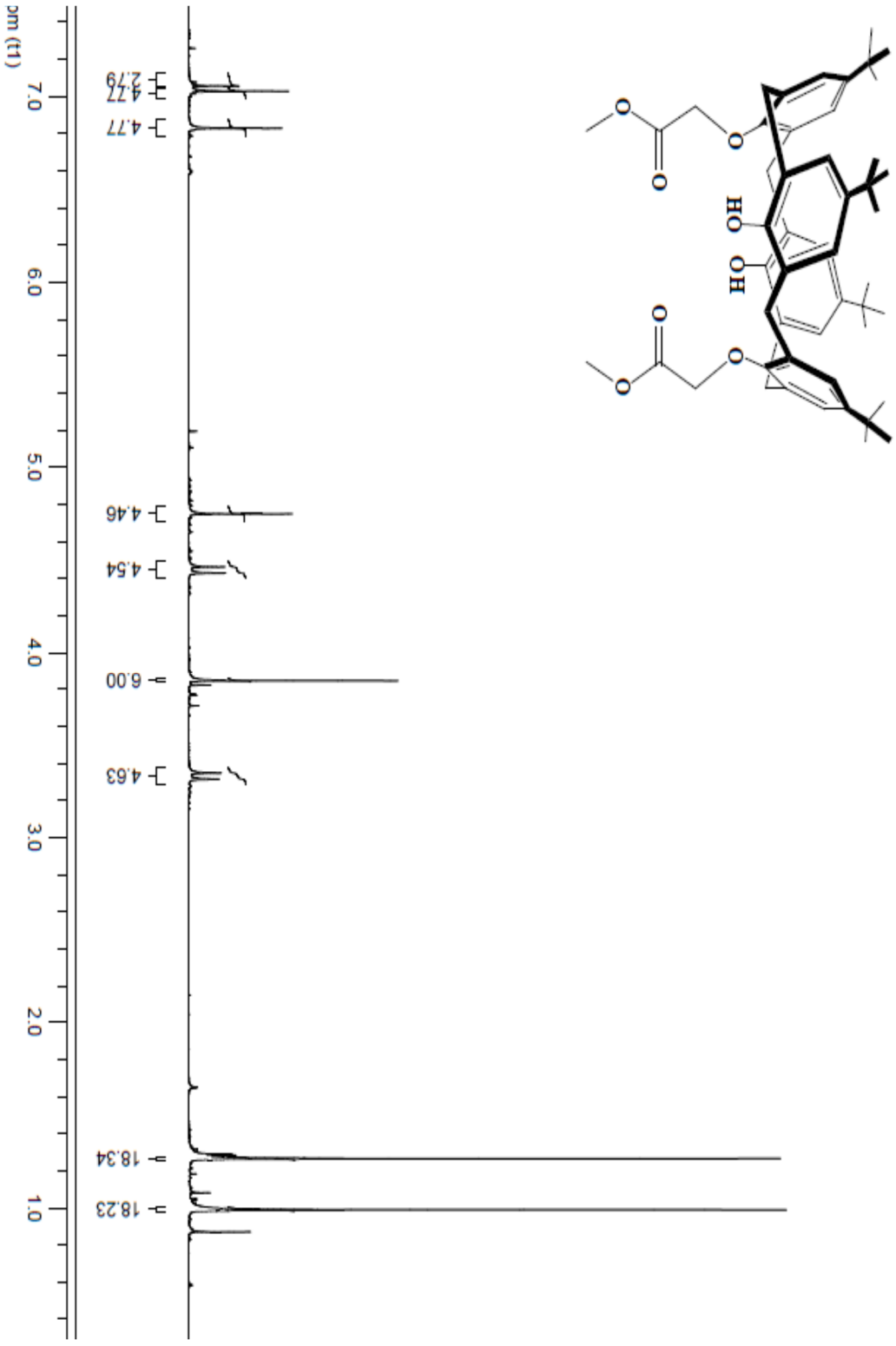
Zeng, L., Luo, K., Gong, Y., 2005, Preparation and characterization of dendritic composite magnetic particles as a novel enzyme immobilization carrier, *Journal of Molecular Catalysis B*:*Enzymatic*, 38, 24–30

Zinke, A., Ziegler, E., Berlin, 1944., Zur kenntnis des hartungs-prozesses von phenol-formaldehyd-harzen, *X. Mitteilung, Ber.*Dtsch. Chem. Ges., 77 (B), 264-72.

EKLER

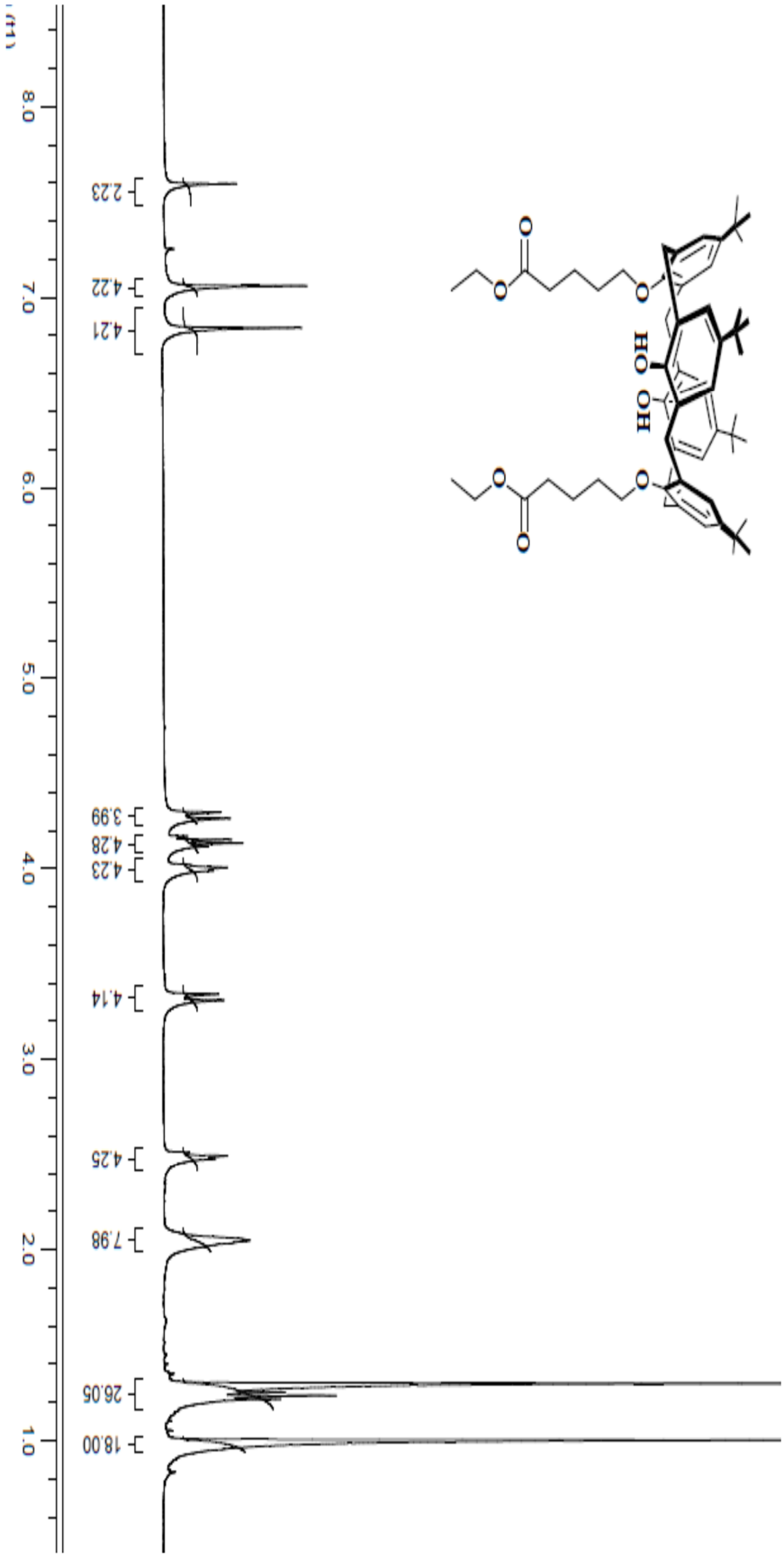
-SENTEZLENEN BİLEŞİKLERİN ^{1}H NMR SPEKTRUMLARI

Ek:1



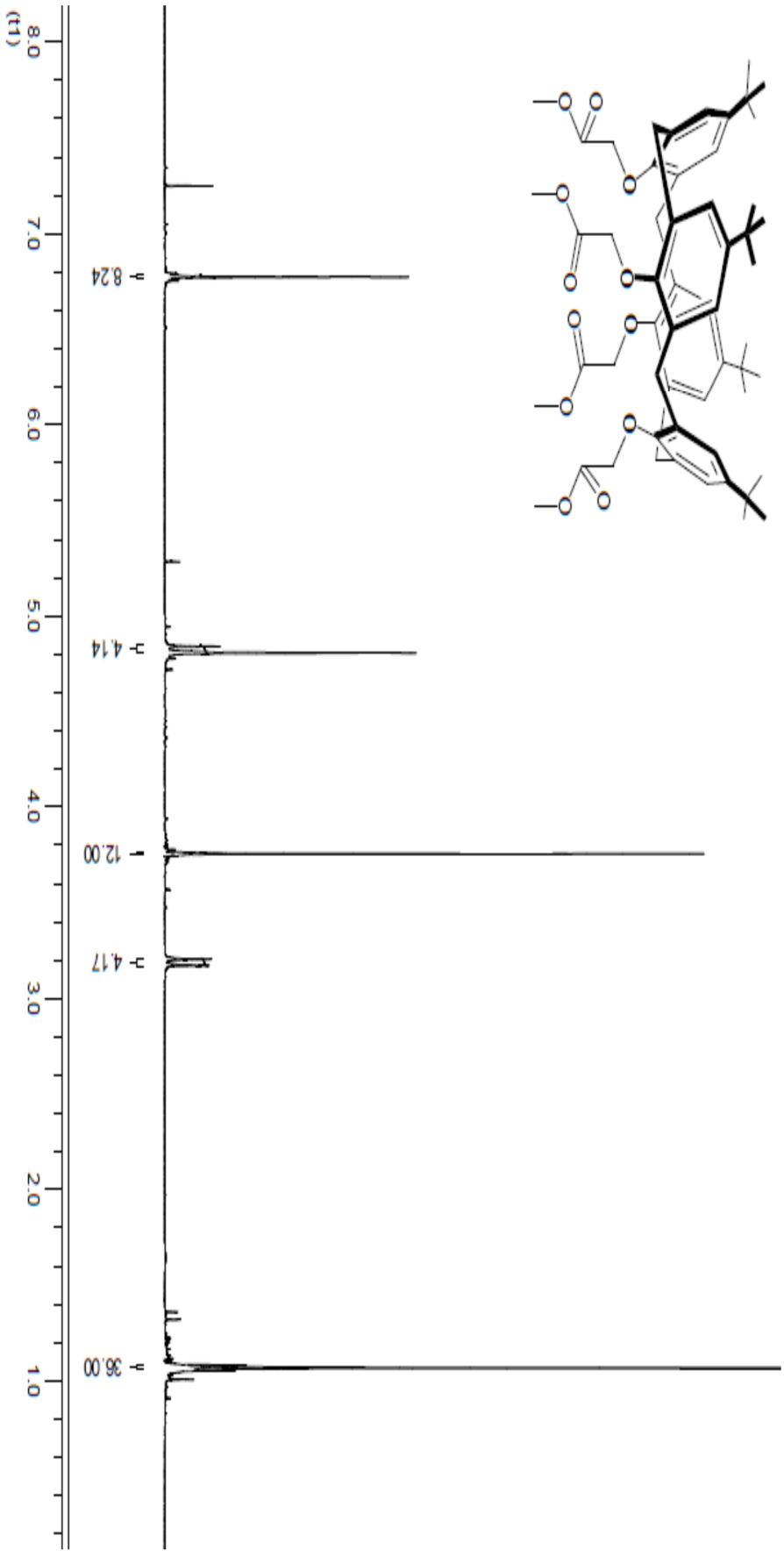
Şekil 1. 3 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

Ek:2



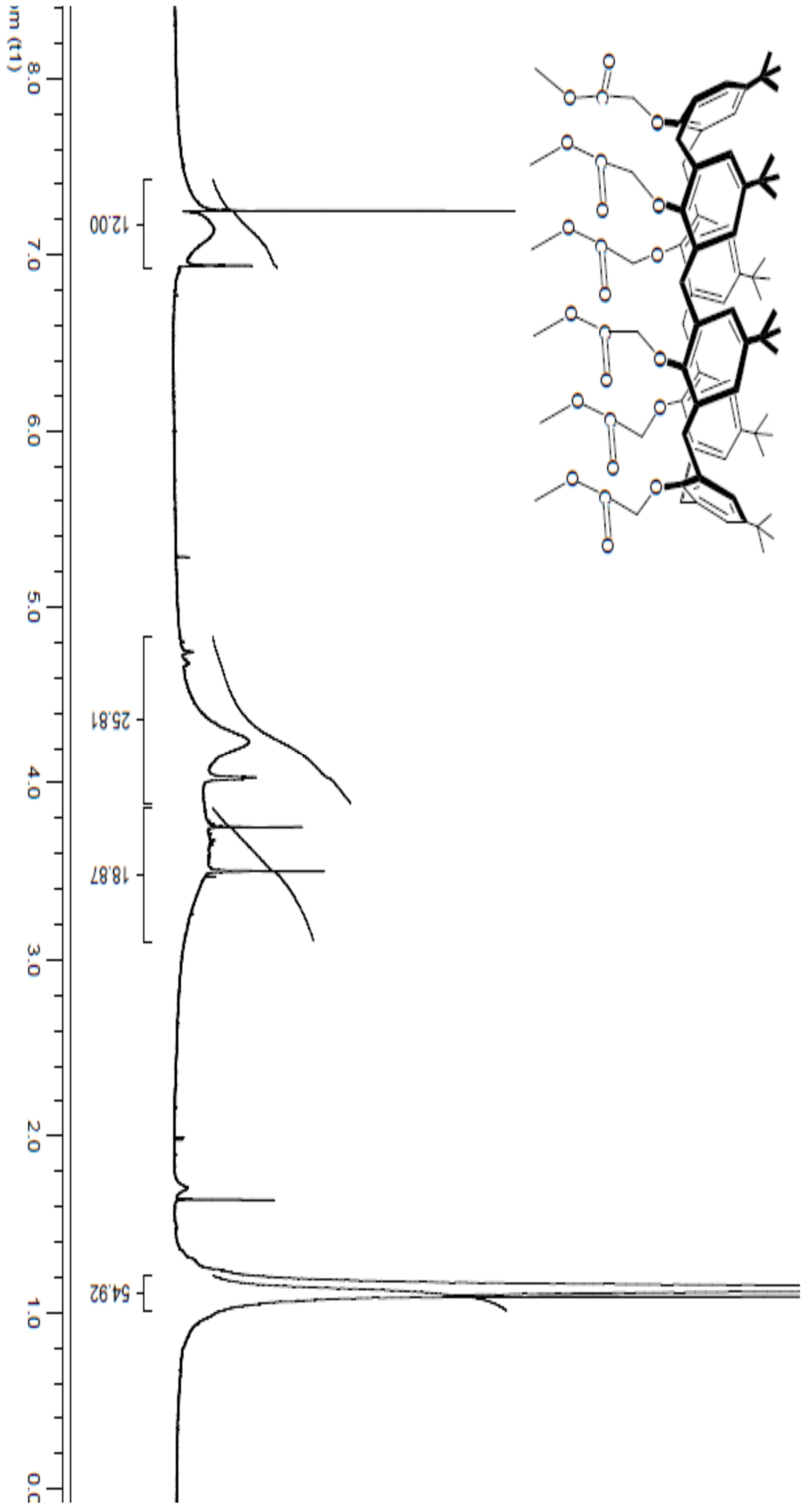
Şekil 2. 4 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

Ek:3



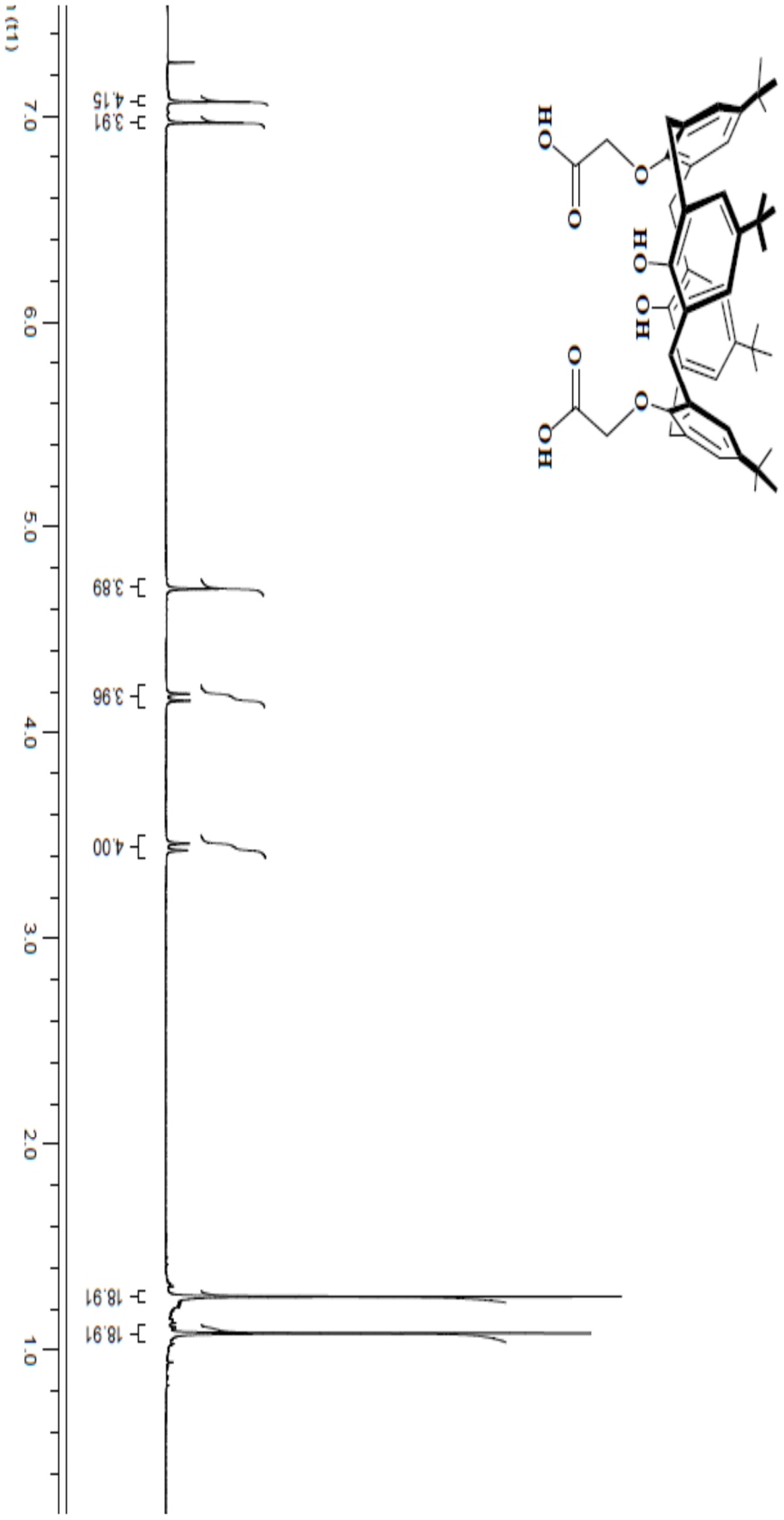
Şekil 3. 5 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

Ek:4



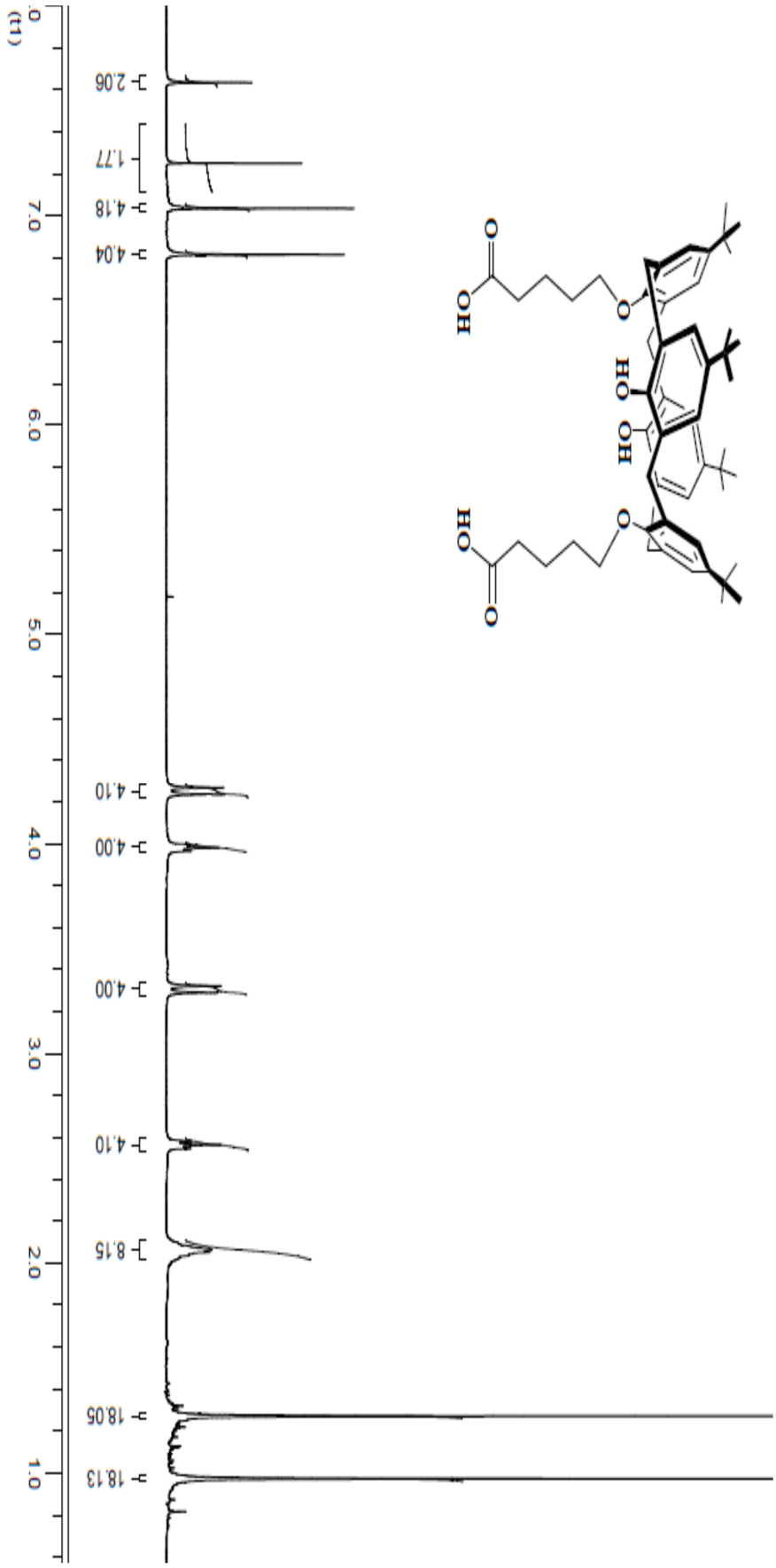
Şekil 4. 6 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

Ek:5



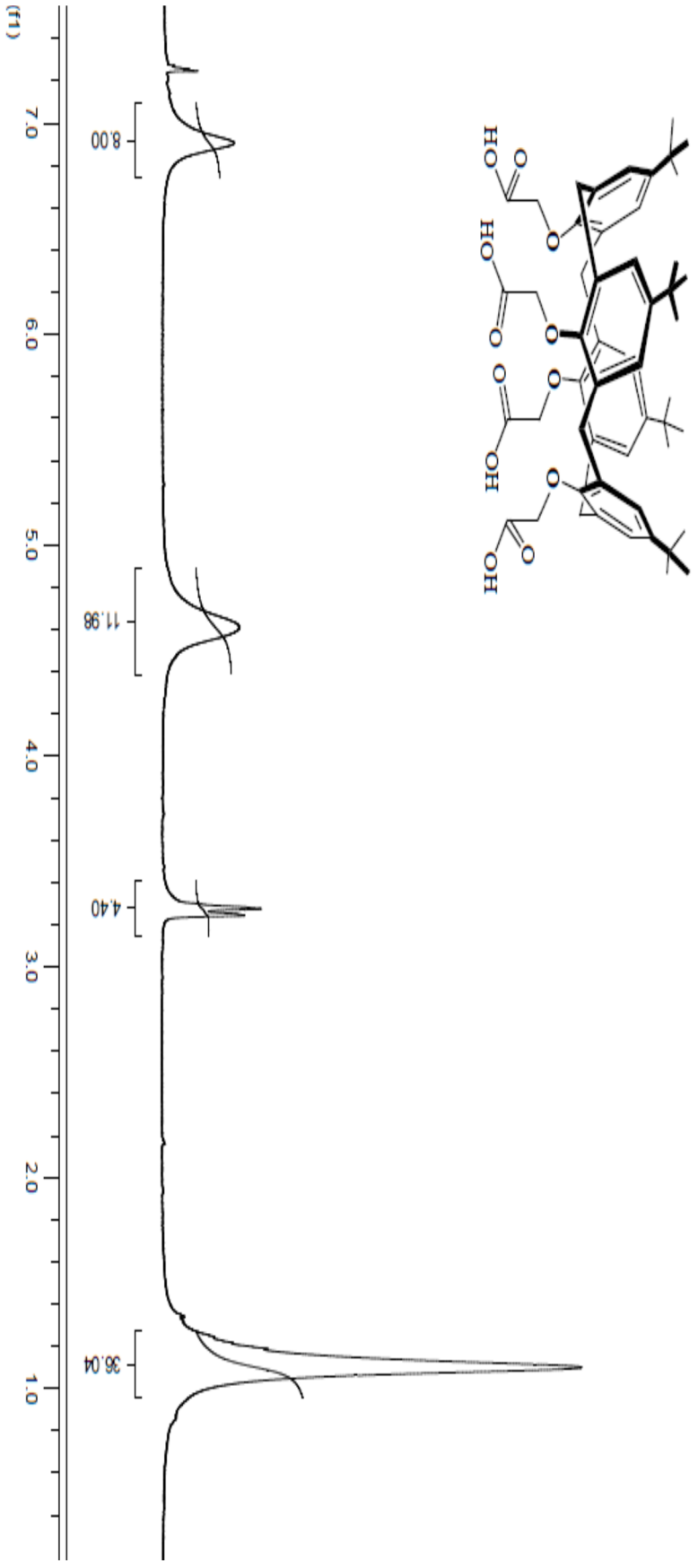
Şekil 5. 7 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

Ek:6



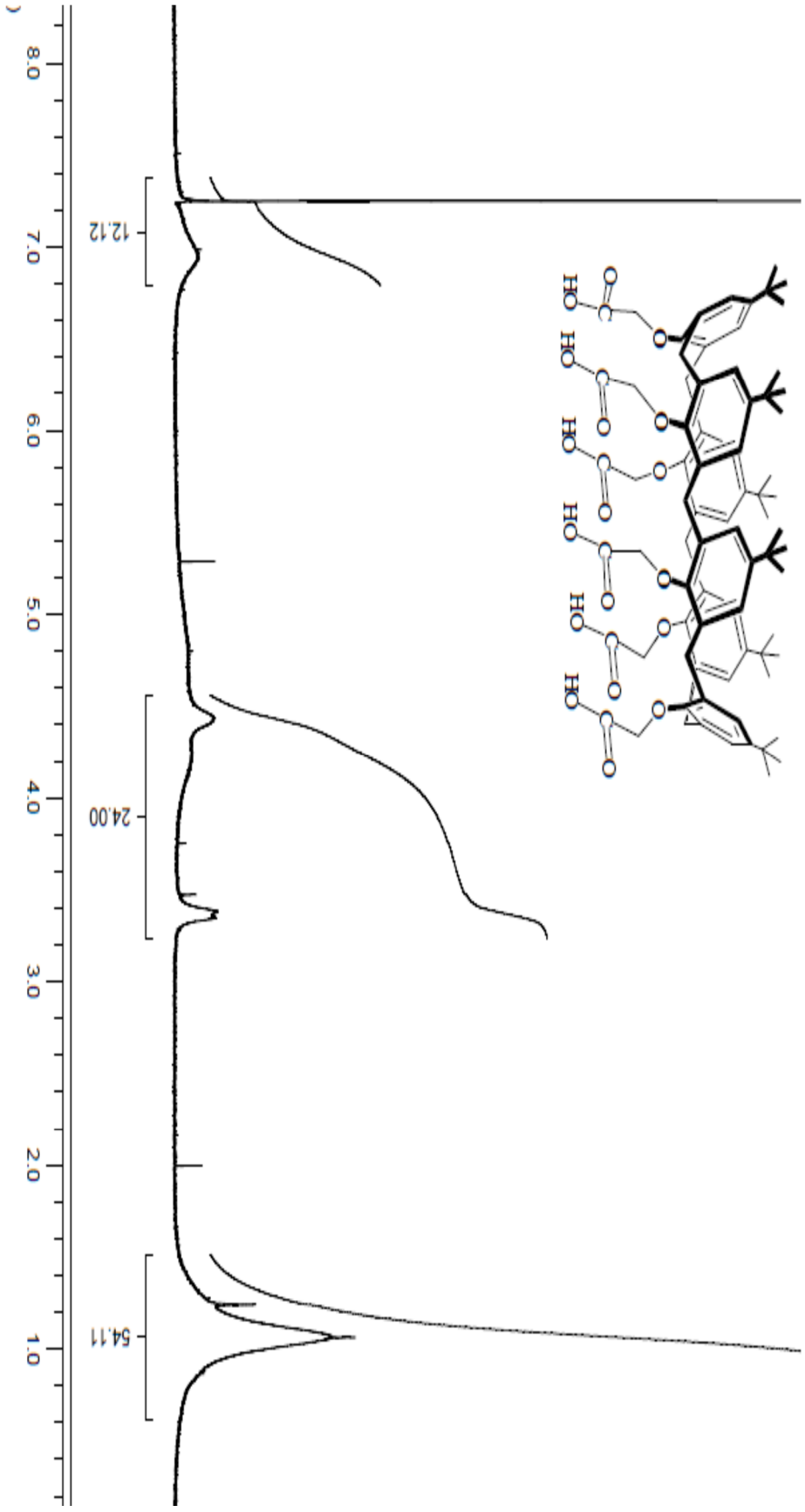
Şekil 6. 8 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

Ek:7



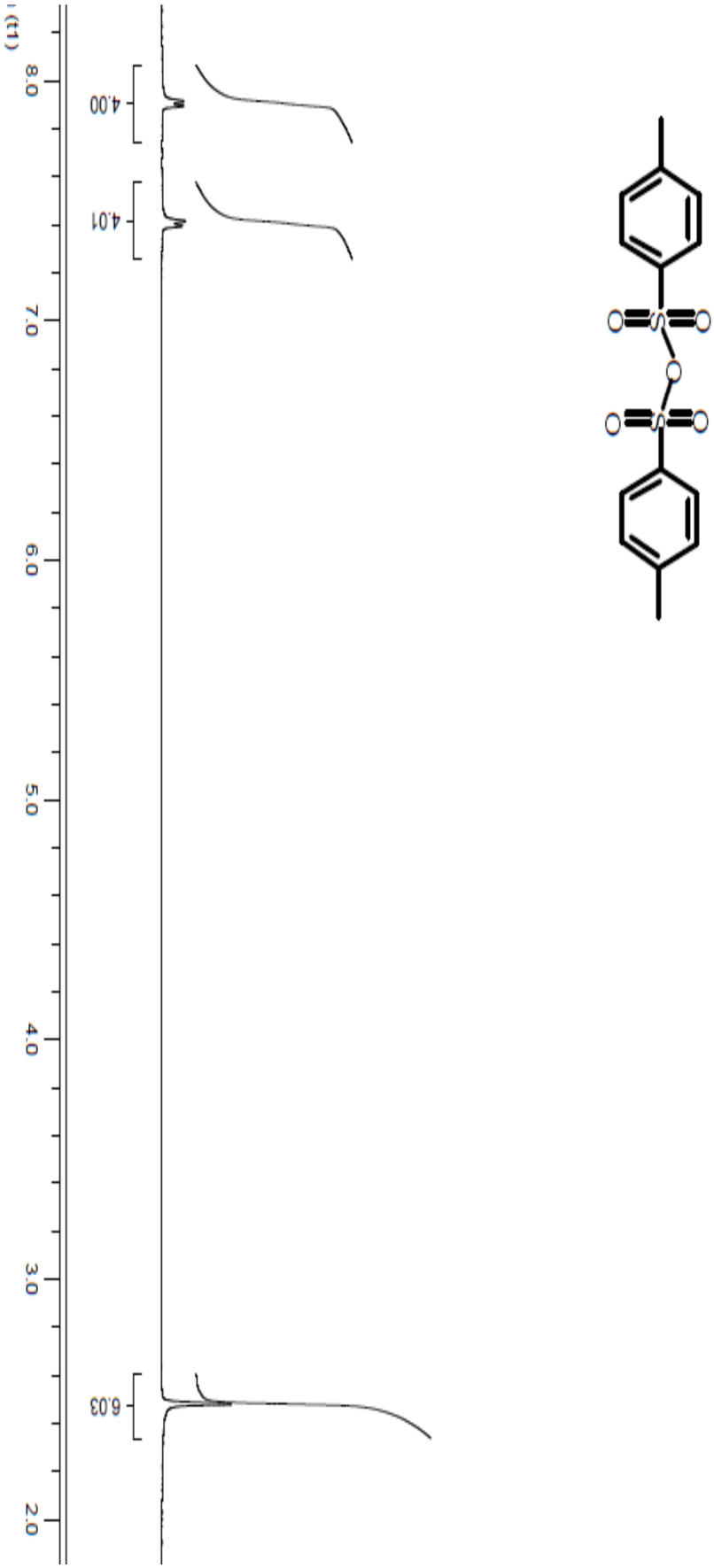
Şekil 7. 9 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

Ek:8



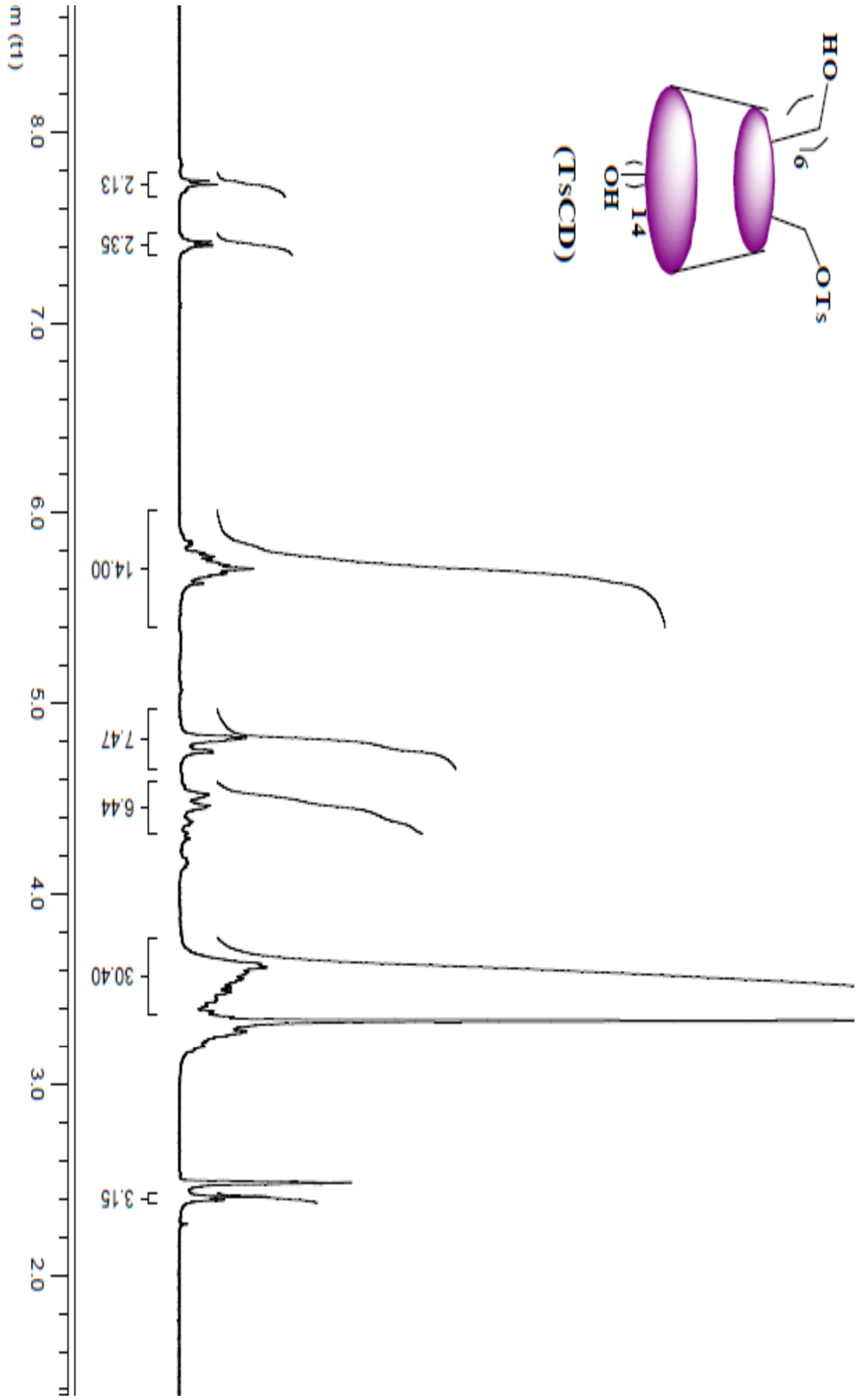
Şekil 8. 10 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

Ek:9



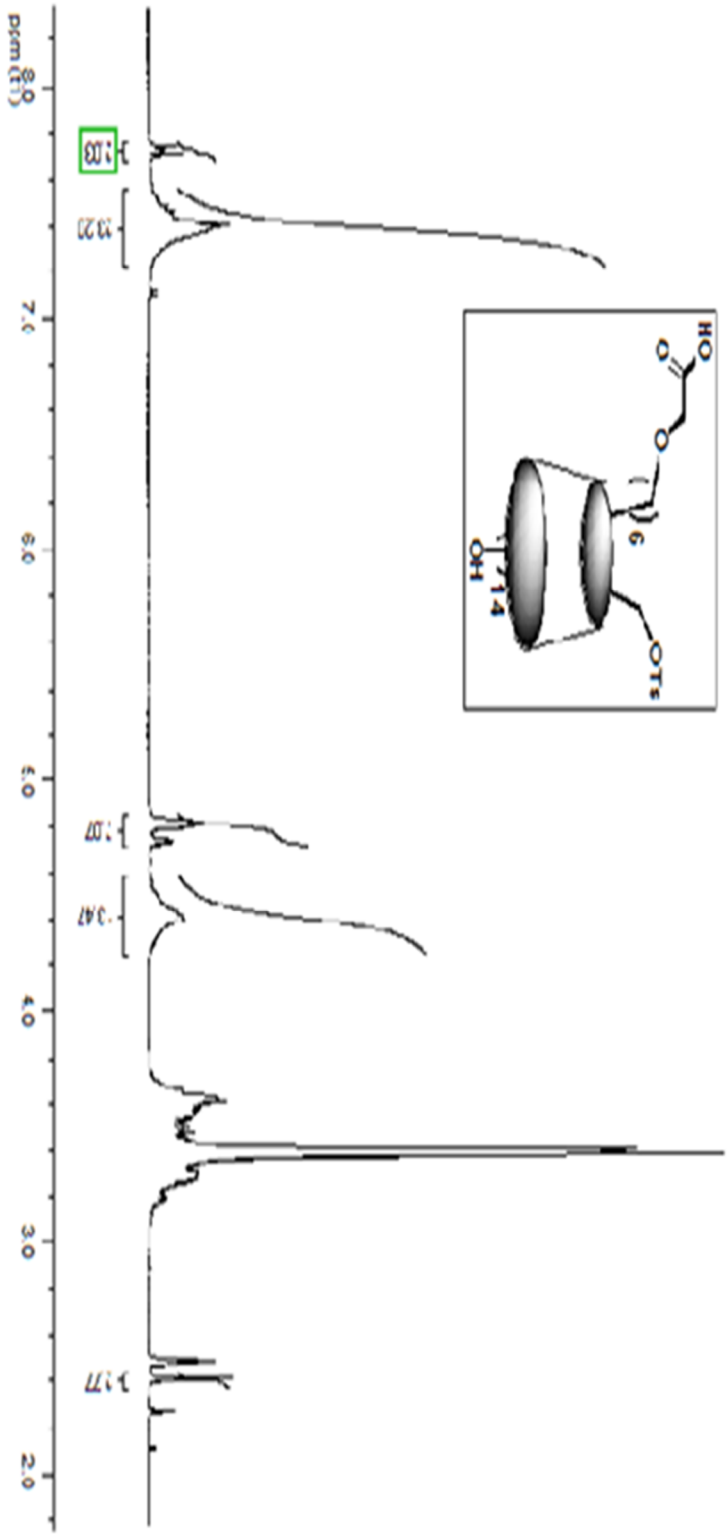
Şekil 9. 11 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

Ek:10



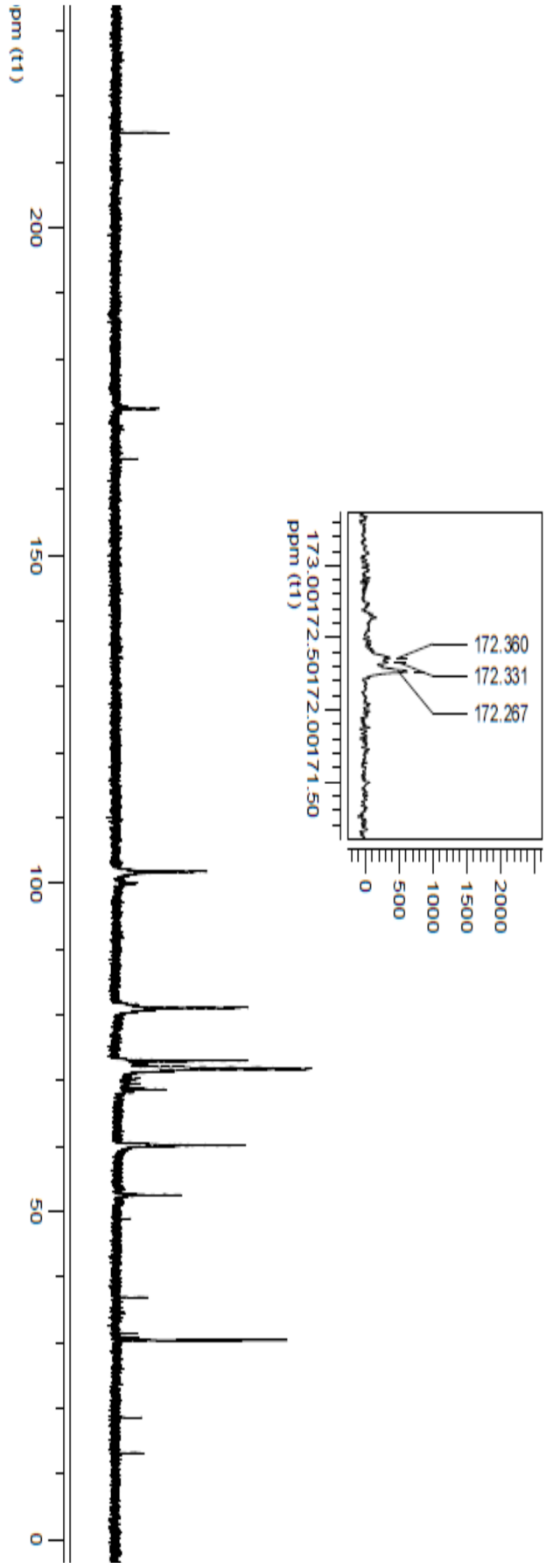
Şekil 10. 12 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

Ek:11



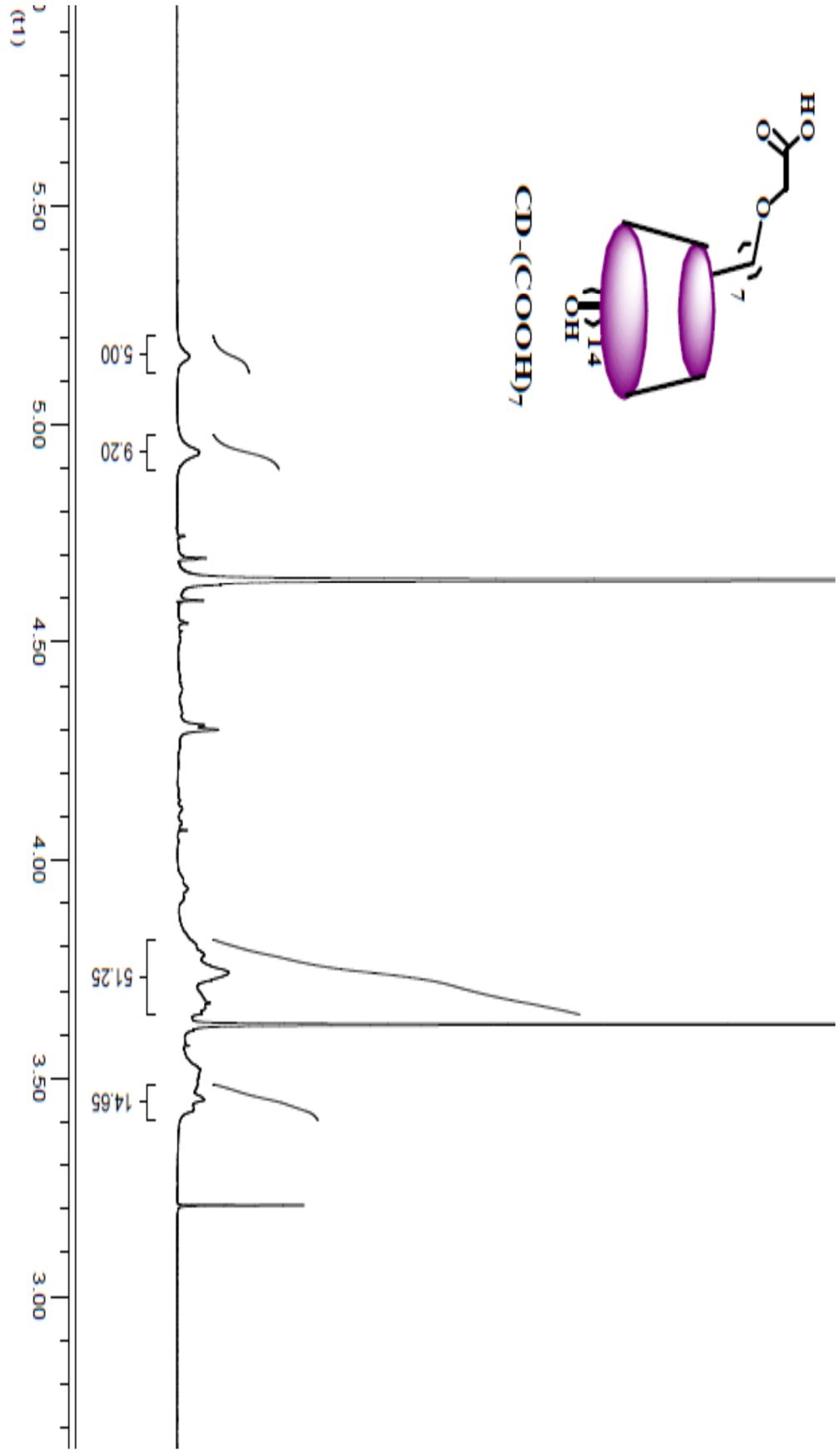
Şekil 11. 13 nolu bileşiğin H-NMR spektrumu

Ek:12



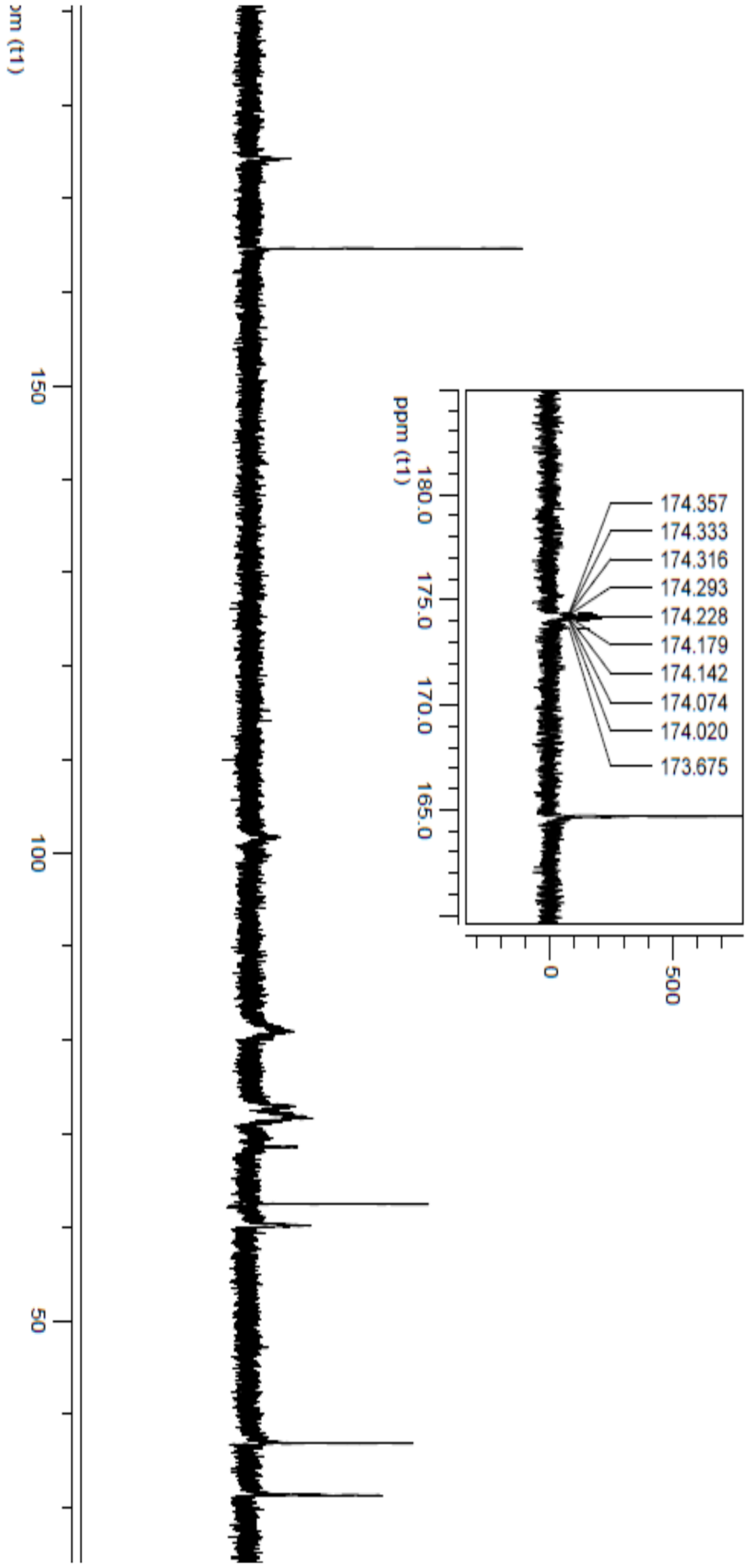
Şekil 12. 13 nolu bileşiğin ^{13}C-NMR spektrumu

Ek:13



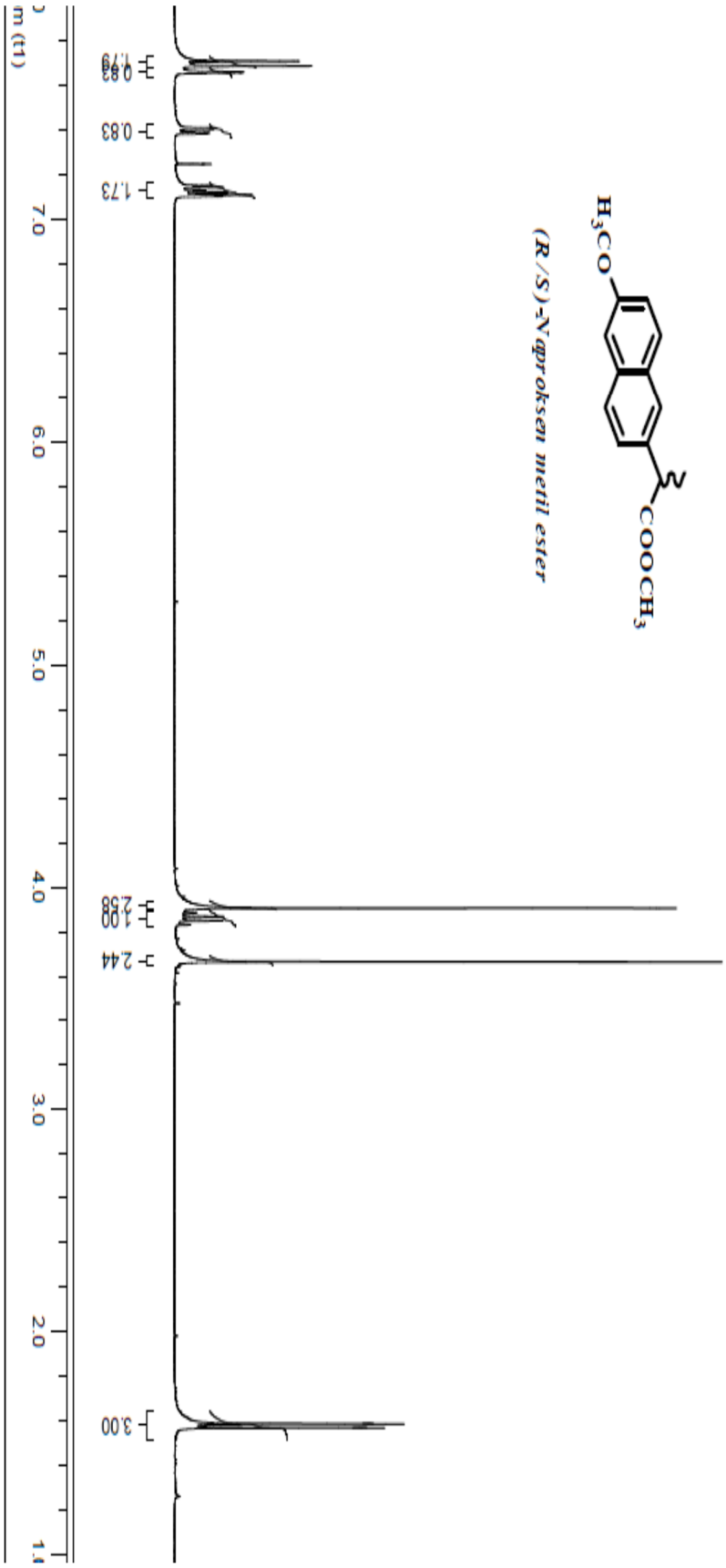
Şekil 13. 14 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrumu

Ek:14



Şekil 14. 14 nolu bileşiğin ^{13}C-NMR spektrumu

Ek:15



Şekil 15. R/S Naproksen metil esteri ^{1}H-NMR spektrumu

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Osman Yılmaz AKBULUT
Uyruğu	**:**	T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Akşehir 01.01.1989
Telefon	**:**	05462089637
Faks	**:**	
e-mail	**:**	o.yilmazakbulut@hotmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Sarkuysan Lisesi Gebze/KOCAELİ	2005
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Selçuklu/KONYA	2011
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsünde Halen Öğrenci Bulunmaktadır.	
Doktora	:		

YABANCI DİLLER

İngilizce