T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARKLI AMİN GRUBU İÇEREN KALİKS[4]AREN/β-SİKLODEKSTRİN' LERİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE BAZI PROFEN TÜRÜ RASEMİK İLAÇLARIN LİPAZ KATALİZLİ ENANTİYOSEÇİCİ TEPKİMELERDE KULLANILMASI

Selçuk KAPLAN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalını

EKİM-2013

KONYA

Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Selçuk KAPLAN

18/09/2013

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

FARKLI AMİN GRUBU İÇEREN KALİKS[4]AREN/β-SİKLODEXTRİN' LERİN SENTEZİ, KARAKTERİZASYONU VE BAZI PROFEN TÜRÜ RASEMİK İLAÇLARIN LİPAZ KATALİZLİ ENANTİYOSEÇİCİ TEPKİMELERDE KULLANILMASI

Selçuk KAPLAN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

2013, 86 Sayfa

Jüri
Danışmanın Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI

Bu tez çalışmasında, literatürde belirtilen metoda göre başlangıç maddesi olan *p-ter*-bütilkaliks[4]aren **(1)** sentezlendi ve bilinen metoda göre metilbrom asetat ile etkileştirilerek *p-ter*-bütilkaliks[4]arenin ester türevlerine **(2-3)** dönüştürüldü. Sentezlenen ester türevleri hidrazin ya da aminometilpridin ile etkileştirilerek amid **(4-6)** formlarına dönüştürüldü.

Kaliks[4]aren türevlerinin yanı sıra, β-siklodekstrinin metilbrom asetat ile reaksiyonu sonucunda β-siklodekstrinin-heptaester asetat türevi **(7)** sentezlendi ve hidrazin ile etkileştirilerek β-siklodekstrinin-tetrahidrazin-trimetil asetat **(8)** elde edildi ve bu fonksiyonlu β-siklodekstrin manyetik nanopartiküllere immobilize edildi **(CD-Amd-MNP).**

Sentezlenen makrosiklik bileşiklerin yapıları spektroskopik teknikler (^{1}H NMR, FTIR, elementel analizi, TGA) ile aydınlatıldı.

Sentezlenen kaliksaren türevleri (**4-6)** ile manyetik nanopartiküle bağlanan β-Siklodekstrin rasemik Naproksen metil esterinin lipaz katalizli enantiyoseçimli tepkimelerinde kullanıldılar.

Anahtar Kelimeler: Naproksen, kaliksaren, siklodekstrin, lipaz, sol-jel

ABSTRACT

MS THESIS

SYNTHESİS AND CHARACTERİZATİON OF VARİOUS AMİNO GROUPS FUNCTİONALİZED CALİX[4]ARENS/ B-CYCLODEXTRİNS, AND UTİLİZATİON OF THEM İN THE LİPASE CATALYSİS ENANTİOSELECTİVE REACTİON FOR SOME RACEMİC PROFEN DRUGS.

Selçuk KAPLAN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE / DOCTOR OF PHILOSOPHY IN MECHANICAL ENGINEERING

Advisor: Prof. Dr. Mustafa YILMAZ

2013, 86 Pages

Jury
Advisor Danışmanın Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI

In this thesis study, p-tert-butylcalix[4]arene (1) was chosen as the starting material, and it was transformed to the ester derivatives of calixarene (2-3) by the reaction of **1** with methylbromoacetate according to known procedures. Treatment of the ester derivatives (2-3) with hydrazine and/or aminomethyl pyridine afforded amide derivatives (4-6).

Besides of calyx[4]arene derivatives, β-cyclodextrin was functionalized with methylbromoacetate to obtain ester derivative of β-cyclodextrin (7). Then, this ester derivative 7 was treated with hydrazine amin to afford 8, and the resultant derivative 8 was grafted onto magnetic nanoparticles to give CD-Amd-MNP.

All synthesized compounds were fully characterized by using ^{1}H NMR, FTIR, elemental analysis and TGA techniques.

The prepared calixarene derivatives (4-6), and β-cyclodextrin-grafted magnetic nanoparticles was used enantioselective studies of racemic Naproxen methyl ester by means of lipase catalysis.

Keywords: Naproxen, calixarene, cyclodextrin, lipase, sol-gel

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.

Tez konumun hazırlanmasında ve yürütülmesinde bana destek veren, bilgisini, tecrübesini ve görüşlerini bizimle paylaşan saygı değer hocam sayın Prof. Dr. Mustafa YILMAZ'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma TÜBİTAK 111T027 nolu araştırma projesinin bir kısmı olarak ve S.Ü. bilimsel araştırma projeleri koordinatörlüğü tarafından BAP 13201028 nolu yüksek lisans tez projesi mali olarak desteklenmiştir. Bu çalışmayı maddi olarak destekleyen TÜBİTAK ve S.Ü. Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğüne 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 Osman Yılmaz AKBULUT, Hasan YILDIZ ve Mehmet AKTAŞ'a teşekkür ederim.

Ayrıca bu çalışmam boyunca bana maddi ve manevi destek veren aileme ve dostlarıma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Selçuk KAPLAN
KONYA-2013

İÇİNDEKİLER

1

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **x**

1. GİRİŞ **1**

1.1. Kaliksarenler 1
1.1.1. Kaliksarenlerin Adlandırılması 3
1.1.2. *p-ter*-Bütil-kaliks[n]arenlerin sentezi 4
1.1.2.1. *p-ter*-bütil-kaliks[4]aren'in bazik ortamdaki sentezi 4
1.1.3. Kaliks[n]arenlerin bazik ortamdaki sentez mekanizması 6
1.1.4. Kaliksarenlerin Fonksiyonlandırılması 7
1.1.4.1. Kaliksarenlerin fenolik-OH üzerinden fonksiyonlandırılması 8
1.1.4.2. Kaliksarenlerin *p*-konumundan fonksiyonlandırılması 10
1.1.5. Kaliksarenlerin Konformasyonları 11
1.1.6. Kaliksarenlerin Fiziksel Özellikleri 13
1.1.6.1. Erime noktası 13
1.1.6.2. Çözünürlük 14
1.1.6.3. Kaliksarenlerin spektral özellikleri 15
1.1.7. Kaliksarenlerin Kullanım Alanları 16
1.1.7.1. Enzim-Mimik olarak kullanılan kaliksarenler 17
1.1.7.2. Molekül veya iyon taşıyıcı kaliksarenler 18
1.1.7.3. Kaliksarenlerin enantiomerlerin tanınmasında kullanılması 21
1.1.7.4. Kaliksarenlerin sensör ve membran tekniklerinde kullanılması. 23
1.1.7.5. Kolon dolgu maddesi olarak kaliksarenlerin kromatografide kullanılması. 24
1.1.7.6. Katalizör çalışmalarında kaliksarenlerin kullanılması 25
1.2. Siklodekstrinler 27
1.2.1. Siklodekstrinlerin Tarihçesi 27
1.2.2. Siklodekstrinlerin Yapısal Özellikleri 27
1.2.3. Siklodekstrinlerin Fonksiyonlandırılması 28
1.2.4. Siklodekstrinlerin Kullanım Alanları 29
1.3. Lipaz 30
1.3.1. Lipazların Özellikleri 31
1.3.1.1. Optimum pH 31
1.3.1.2. Optimum sıcaklık ve termal kararlılık 31
1.3.1.3. Lipazın aktivasyon ve inhibisyonu 31
1.3.1.4. İzoelektrik nokta (pI) 32
1.3.2. Lipazların Kaynakları 32

1.3.2.1. *Candida rugosa* lipaz....32
1.3.3. Lipazların Endüstriyel Kullanım Alanları....33
1.3.3.1. Deterjan endüstrisinde kullanımı....33
1.3.3.2. Gıda endüstrisinde kullanımı....34
1.3.3.3. İlaç endüstrisinde kullanımı....34
1.3.3.4. Organik sentezlerde kullanımı....35

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI....36

3. MATERYAL VE YÖNTEM....41

3.1. Enstürümental Teknikler....41
3.2. Deneysel Bölüm....41
3.2.1. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28-tetrahidroksikaliks[4]aren (1) (Gutsche 1990)....41
3.2.2. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren (2) (Collins 1991)....42
3.2.3. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28 tetrametoksikarbonilmetoksi kaliks[4]aren (3) (McKewey 1985)....43
3.2.4. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-dihidrazinamitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren (4) (Alekseeva 2000)....44
3.2.5. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28-tetrahidrazinamitkarbonilmetoksi-kaliks[4]aren (5) (Jun Han 1997)....44
3.2.6. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-di(4-aminometil) pridin amid-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren (6)....45
3.2.7. β-Siklodekstrin-heptametil asetat (7)....46
3.2.8. β-siklodekstrin-tetrahidrazin-trimetil asetat (8)....47
3.2.9. F_3O_4 Nanopartükülünün Sentezi (Zeng 2005)....47
3.2.10. [3-(2,3-Epoksipropoksi)-propil]-trimetoksi silan ile modifiye edilmiş manyetik Fe_3O_4 nanopartüküllerin sentezi (EPPTMS-MN) (Sayin 2010)....48
3.2.11. β-siklodekstrin-heptahidrazin bileşiğinin Fe_3O_4-manyetik nanopartiküllere immobilizayonu (CD-Amd-MNP).....48
3.3. Lipaz Aktivitesi ve Protein Tayini....49
3.3.1. Lipaz aktivitesinin tayini....49
3.3.2. Protein tayini (Bradford 1976)....50
3.3.3. Optimum pH tayini....51
3.3.4. Optimum sıcaklık tayini....51
3.3.5. Tekrar kullanılabilirlik....51

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA....52

4.1. Kaliks[4]aren ve β-Siklodekstrin Türevlerinin Sentezi....52
4.2. İmmobilize Lipazların Enantiyoseçimli Tepkimelerde Kullanılması....61
4.2.1. Serbest lipaz ve immobilize lipazların aktivitesine pH ve sıcaklığın etkisi..63
4.4.2. Tekrar Kullanılabilirlik....68

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER....70

KAYNAKLAR....71

EKLER....78

ÖZGEÇMİŞ.....86

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

δ	Kimyasal kayma degeri
g	Gram
mg	Miligram
n	Mol
M	Molarite
M_A	Molekül ağırlığı
mL	Mililitre
mmol	Milimol
-p-	Para
J	Etkilesme Sabiti
pH	Asitlik Derecesi
ter-	Tersiyer
eq	Equvalent
^{o}	Derece

Kısaltmalar

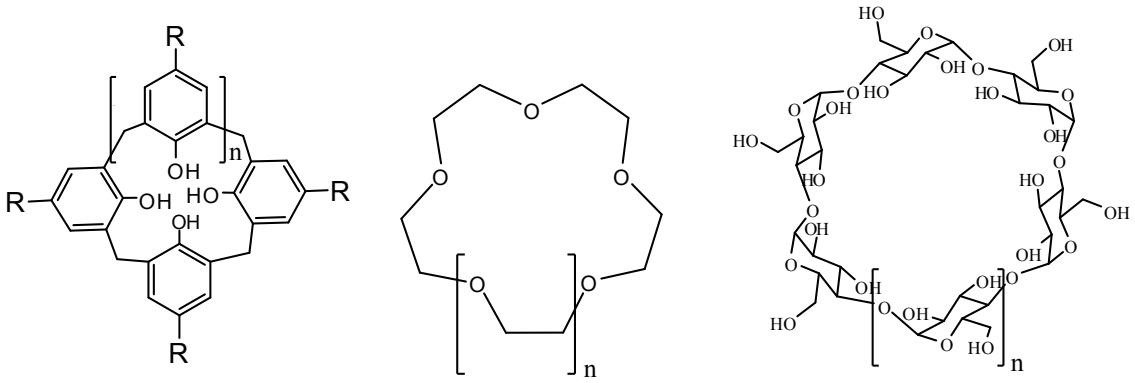
E.N.	Erime noktası
DMF	Dimetil formamid
DCM	Diklrometan
THF	Tetrahidrofuran
EtAc	Etilasetat
Büt	Tersiyer bütil
NMR	Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi
IR	Kızıl ötesi
ITK	ince tabaka kromotografisi
UV	Ultraviole visible spektroskopisi
β	Beta
s	Singlet
d	Dublet
t	Triplet
m	Multiplet

1. GİRİŞ

Son yıllarda sanayinin de gelişmesiyle birlikte çevre kirliliğinde önemli derece artış görülmüştür. Bu konuyla ilgili birçok araştırma yapılmıştır. Supramoleküler kimya bu sorunları çözmek için çeşitli metotlar geliştirmiştir. Bunlara örnek crown eterler (Pedersen 1967), Kriptatnlar (Lehn 1995), Siklofanlar (Vögtle 1993) ve siklodekstrinler (Bender 1978; szejtle 1988) verilebilir. Bunun yanı sıra son yıllarda ise kolaylıkla sentezlenebilen ve fonksiyonlandırılabilen fenol formaldehit oligomeri olan kaliksaren molekülü üzerine çalışmalar yapılmıştır.

Supramoleküler kimyada daha önceki yıllarda yapılan çalışmalar crown eter ve kriptantlar gibi nötral iyonoforların bazı iyonik moleküllerle iki boyutlu kompleksleri üzerine yoğunlaşmıştı. Son yıllarda ise halkalı yapıda bir fenol-formaldehit oligomeri olan kaliksarenler, crown eterlerde olduğu gibi halkalı yapıda olduklarından dolayı katyon, anyon ve nötral moleküllerle seçimli kompleks yapabilmektedirler.

Kaliksarenler, crown eter ve kriptantlara göre daha ucuz çıkış maddelerinden kolayca sentezlenmeleri bakımından supramoleküler ve konuk-konak kimyasında vazgeçilmez hale gelmiştir (Şekil 1.1).

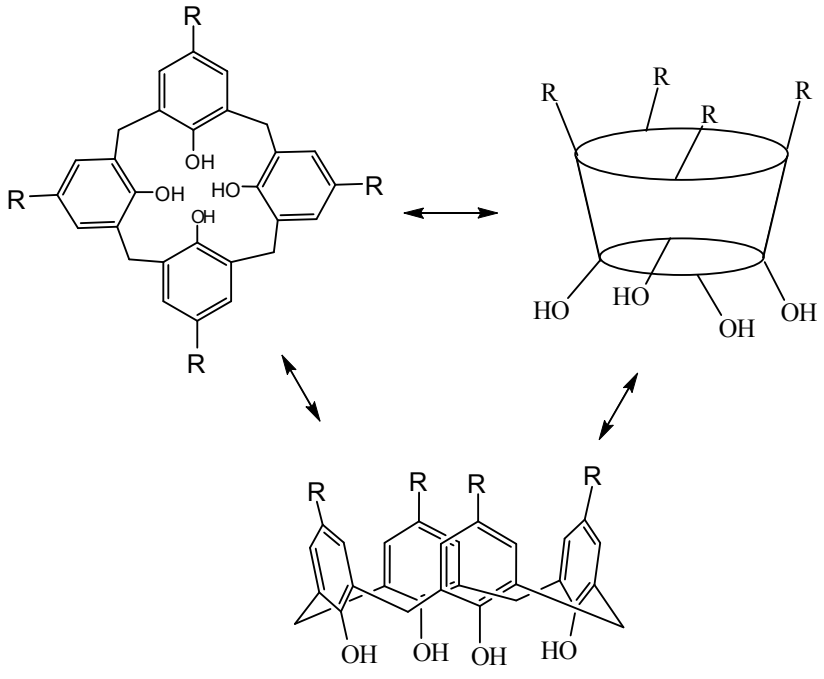


Şekil 1.1. kalik[n]saren, crown eter ve siklodekstrin supramoleküllerin yapısı.

1.1. Kaliksarenler

Kaliksarenler, *p-ter*-bütil fenol ile formaldehitin bazik ortamdaki reaksiyonu sonucu elde edilen yapılardır. Kaliksarenlerin sentezi, ilk olarak alman kimyacı Adolph Von Baeyer tarafından 1872 yılında yapılmıştır (Thurman 1982). Enstrümantal

tekniklerin yetersizliğinden dolayı yapısı tam olarak aydınlatılamamış ve ticari olarak kullanılamamıştır. Leo Baekeland 20. Yüzyılda gerçekleştirdiği çalışmada, fenol ile formaldehit reaksiyonundan katı esnek bir reçine elde etmiştir (Baekeland 1908). Bakelite olarak bilinen reçinenin patentini almış ve ilk ticari başarıyı kazanmıştır. Bu başarı birçok araştırmacının da dikkatini çekmiştir. Yaklaşık olarak 40 yıl sonra Avusturyalı kimyacı Alois Zinke ve arkadaşları p-ter-bütil fenol ve formaldehiti NaOH varlığında 200^{o}C ye kadar ısıtarak etkileştirmiştirler. Büyük molekül ağırlığına sahip erime noktası yaklaşık 340 olan bir molekül elde etmişler ve bu ürünün tetramerik yapıda olduğunu savunmuşlardır (Zinke 1944). Kaliksarenin babası olarak bilinen David Gutsche ve arkadaşları tarafından 1980 yılından itibaren yaptıkları çalışmalarda elde edilen yapının tetramer olmayıp tetramer, hekzamer, oktamer ve halkalı oligomer karışımı olduğunu ispatlamışlardır. Daha sonra Gutsche ve arkadaşları siklik tetramer, hekzamer, oktameri ayrı ayrı saf olarak elde etmeyi başarmışlardır (Gutsche 1990) (Şekil 1.2).



p-alkil-kaliks[4]aren

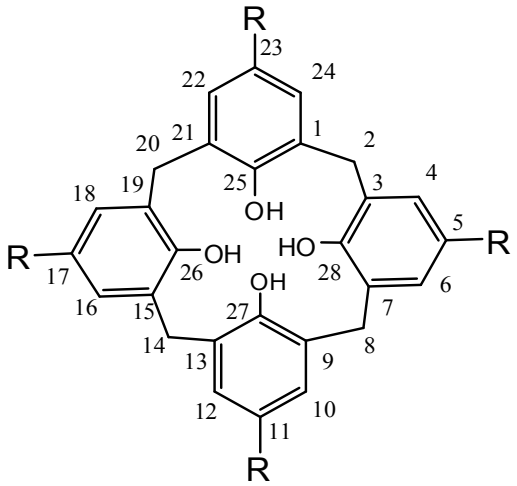
Şekil 1.2. Halkalı tetramerin değişik yapılarda ki gösterimi**.**

1.1.1. Kaliksarenlerin Adlandırılması

Kaliksarenler, hidroksil gruplarına göre orta pozisyonunda bulunan fenol birimlerinin metilen köprüleriyle birbirine bağlanmasıyla oluşan, metasiklofan sınıfına bağlı makrosiklik yapıdaki bileşiklerdir. Kaliksarenlerin (IUPAC) göre isimlendirilmesinin zor olması nedeniyle, kaliksaren üzerine çalışan birçok araştırmacı tarafından isimlendirme yapılmıştır. Kaliksarenlerin adlandırılması IUPAC' a göre çok zor olduğu için Gutsche bu bileşikleri daha kolay ve pratik olarak adlandırmış ve IUPAC' a kabul ettirmiştir.

Kaliks[n]aren terimi, yunanca taç anlamına gelen 'Chalice' ve organik kimyada aromatik halkayı ifade eden 'aren' kelimesinin birleşmesiyle meydana gelmiştir. Parantez içindeki 'n' ise kaliksaren de bulunan aromatik halkanın sayısını belirtmektedir (Gutsche 1978). Kaliksaren türevlerinin çoğalması nedeniyle adlandırmayı sistemli hale getirmek için aromatik halka üzerinde bulunan sübstitüentlerin yerlerini belirleyen numaralandırma sistemi kullanılır. İkinci olarak fenolün sübstitue kısmıyla beraber fenolik birimin sayısını ifade eden isimlendirme sistemi kullanılır.

Gutsche, p-alkil fenolden oluşan tetramer yapıdaki kaliksareni 5,11,17,23-tetra-alkil-25,26,27,28-tetrahidroksi Kaliks[4]aren olarak isimlendirmiştir. Daha kısa yazmak istersek p-alkil kaliks[n]aren şeklinde isimlendirilebilir. (Gutsche 1989) (Şekil 1.3).



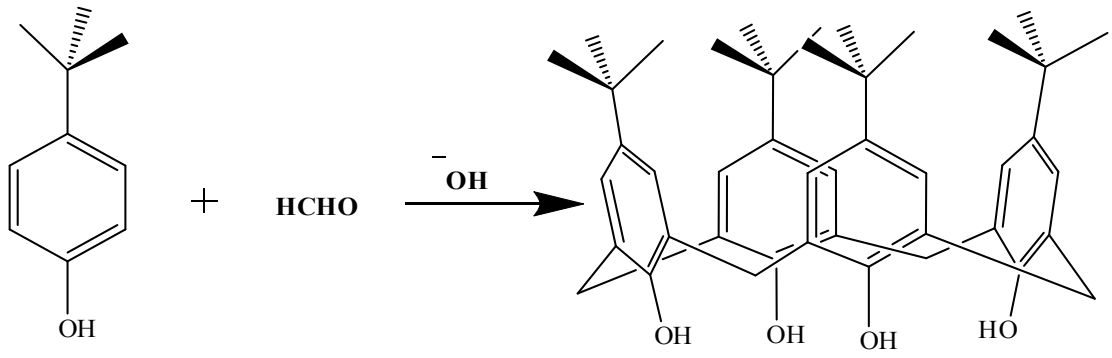
5,11,17,23-tetraalkil-25,26,27,28-tetrahidroksi-kaliks[4]aren

Şekil 1.3. Kaliks[4]arenlerin numaralandırması ve adlandırılması.

1.1.2. *p-ter*-Bütil-kaliks[n]arenlerin sentezi

Kaliksarenlerin sentezi için gerekli olan ortam şartları uzun yıllar süren çalışmalar sonucunda fenol-formaldehit kondenzasyonunda p-sübstitüe fenollerin kullanılması gerektiği, aksi taktirde sadece fenolün kullanılması ile orto ve para köşesinden bağlanmaların olmasıyla çapraz bağlı polimerlerin elde edileceği kanıtlanmıştır (Hultzsch 1950). İlk olarak Zinke ve arkadaşları tarafından tek basamakta kaliksaren sentezi yapılmıştır. Zinke ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda yüksek verimli (n-4,6,8,) ve düşük verimli (n-5,7) olmak üzere 5 çeşit kaliks[n]aren karışımı elde edilmiştir fakat enstrümantal tekniklerinin yetersizliğinden dolayı tam olarak aydınlatılamamıştır.

Gutsche ve arkadaşlarının kaliks[4]aren ve türevleri ile ilgili yoğun çalışmalar yapmışlardır. Bunun nedeni ise bu tür kaliksarenlerin kolay ve yüksek verimle sentezlenebilmesidir. Gutsche ve arkadaşlarının yaptığı çalışmalarda p-ter-bütil fenol kullanılarak en iyi sonucun elde edildiğini kanıtlamışlardır (Gutsche 1990). Ayrıca Gutsche'nin dört (Gutsche ve Iqbal 1990), altı (Gutsche 1990), sekiz (Munch ve Gutsche 1990), p-ter-bütilkaliksarenler için tek basamaklı sentez yönteminin yayınlanmasıyla da literatürde kaliksaren ve türevlerinin artmasına destek sağlamışlardır. (Gutsche ve Iqbal 1990) (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. *p-ter*-Bütil kliks[4]aren'in sentezi

1.1.2.1. *p-ter*-bütil-kaliks[4]aren'in bazik ortamdaki sentezi

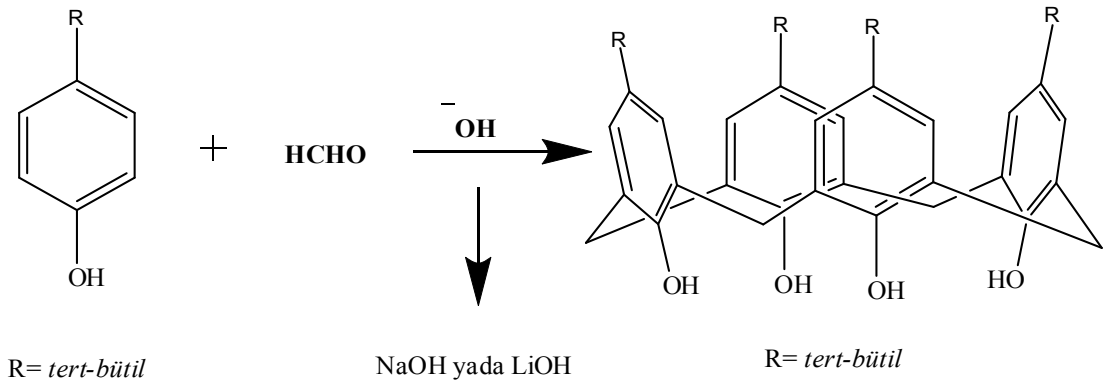
Kaliksarenlerin bazik ortamdaki sentezi ile ilgili yapılan çalışmalarda *p-ter*-bütil kaliks[4]arenin sentezinde en iyi verimi elde etmek için gerekli olan baz miktarının yaklaşık olarak 0.03-0.04 eşdeğer oranda olması gerektiği bulunmuştur. Baz miktarı Bu

eşdeğer oranın dışında kullanılırsa verimde düşme görülür. Bazın eşdeğer miktarından daha fazla baz ilave edilmesi sonucunda halkalı tetramerin miktarının azaltarak sıfıra kadar düşürebilir. Eğer daha da fazla baz alınacak olursa siklik tetramer yerine siklik hekzamer oluşacaktır. Sentezlenecek oligomere göre uygun miktarda baz kullanılmalıdır. Tetramer ve oktomer için katalitik miktarda, hekzamer için stokiyometrik oranda baz kullanılmalıdır (Gutsche 1981, 1984; Dhawan 1987).

Kaliksaren sentezinde bazın miktarı kadar, kullanılan bazlar'ın türleri de önemlidir. Atom çaplarını da düşünürsek, Kaliksaren de bulunan oksijen atomları arasındaki uzunluklara uygun olarak kullanılan bazın atom çapının da ne kadar önemli olduğu anlaşılır. Tetramer, hekzamer ve oktomerin sentezlerinde kullanılan baz türleri de değişiklik göstermektedir. Hekzamer ile yapılan denemelerde LiOH ve NaOH bazları kullanıldığında hiç ürün oluşmadığı, KOH ve CsOH bazları kullanıldığında ise ürün oluştuğu görülmektedir. RbOH bazı kullanıldığında ise en yüksek verimle ürün elde edilmiştir. Bu durum "template etki" ile açıklanmaktadır.

Kaliksarenlerde bulunan fenolik oksijenler arasındaki uzunluk halkalı tetramerde 0.8 Å, halkalı hekzamerde 2.0-2.9 Å, halkalı oktomerde 4.5 Å olarak bulunmuştur. Kullanılan bazların iyon çaplarına göre, halkalı tetramer ve oktomerin sentezi için LiOH ve NaOH tercih edilirken, halkalı hekzamerde ise RbOH ve CsOH tercih edilmektedir.

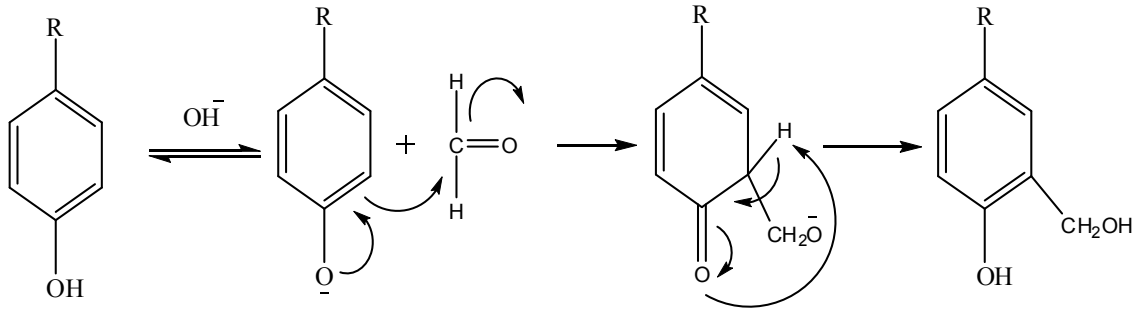
1 (eq) *p-ter*-bütil fenol, 0.045 (eq) NaOH varlığında 1.5 (eq) % 37'lik formaldehit ile 110-120 ^{o}C de yaklaşık 2 saat etkileştirilir oluşan viskoz karışım difenil eter ile süspanse edilerek, N_2 gazı altında 220 ^{o}C'de 2 saat geri soğutucu altında etkileştirilmektedir. Elde edilen renksiz sıvı soğutularak etil asetat ilave edilir ve oda sıcaklığında 1 saat karıştırılır. Çöken ürün süzülerek alınır ve etil asetat, asetik asit ve su ile yıkanır daha sonra toluende kristallendirilerek parlak beyaz kristaller elde edilir. Oluşan beyaz kristallerin erime noktası 342-344^{o}C' dir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. p-ter-bütilkaliks[4]aren'in sentezi

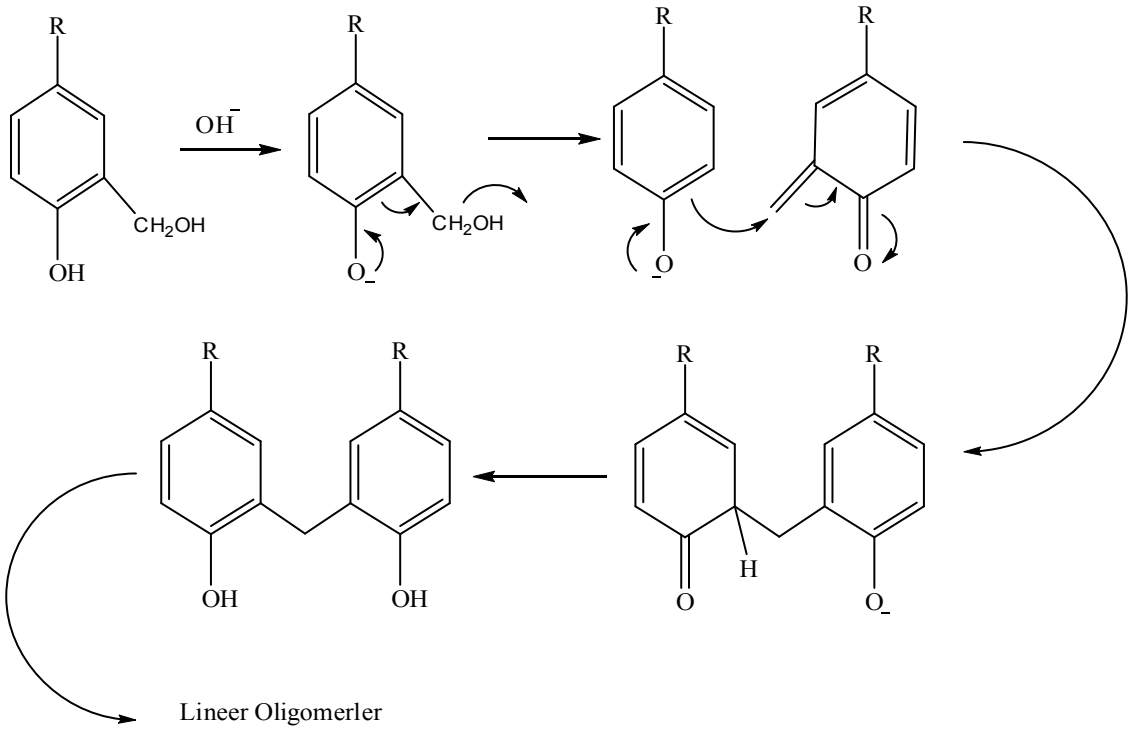
1.1.3. Kaliks[n]arenlerin bazik ortamdaki sentez mekanizması

Kaliksarenlerin bazik ortamdaki sentezlerinde ilk olarak kullanılan bazın etkisiyle nükleofil olarak davranan fenoksit iyonunun oluşumudur. Oluşan fenoksit iyonu formaldehitte bulanan karbonil karbonuna saldırarak hidroksimetilfenollerin oluşmasıyla devam eder (Şekil 1.6).



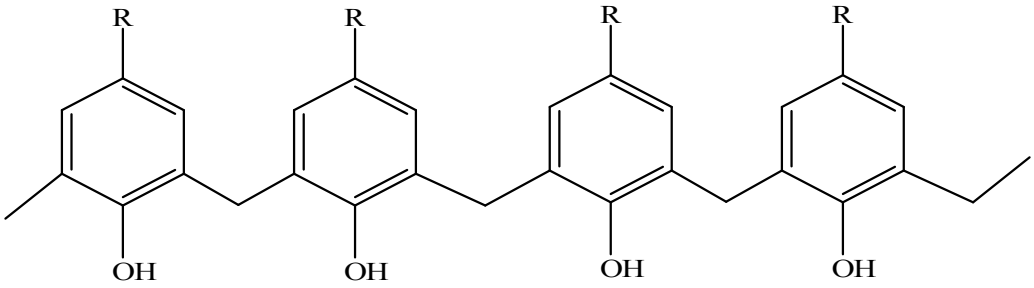
Şekil 1.6. hidroksimetilfenolün oluşumu

Hidroksimetilfenoller o-kinon metit ara ürünlerine dönüşerek reaksiyon ortamında bulunan diğer fenoksit iyonuyla ılıman şartlar altında tepkimeye sürdürerek lineer dimer, trimer, tetramer bileşikleri oluşturur (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. lineer Oligomerlerin Oluşumu

Reaksiyonun devam etmesi sonucunda önce trimer daha sonrada tetramerik oligomerler oluşur (Şekil 1.8).



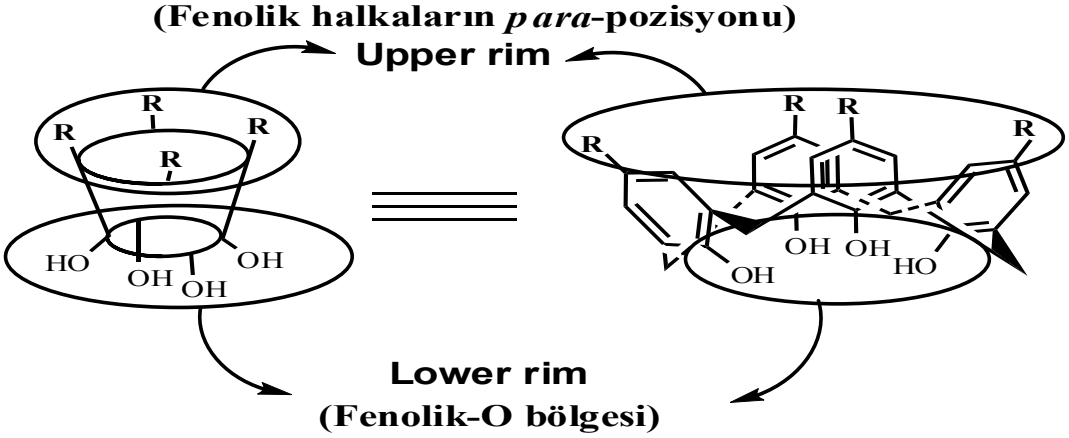
Şekil 1.8. lineer tetramerin oluşumu

Sonuç olarak fenol-formaldehit karışımı bazla etkileştirilip oluşan ara ürün yüksek sıcaklıklarda ısıtıldığı zaman kaliksaren ve türevlerine dönüşür.

1.1.4. Kaliksarenlerin Fonksiyonlandırılması

Kaliksarenlerin organik sentezde crown eterler ve siklodekstirnlere göre daha çok tercih edilmesinin en önemli nedenlerinden birisi de çok kolay

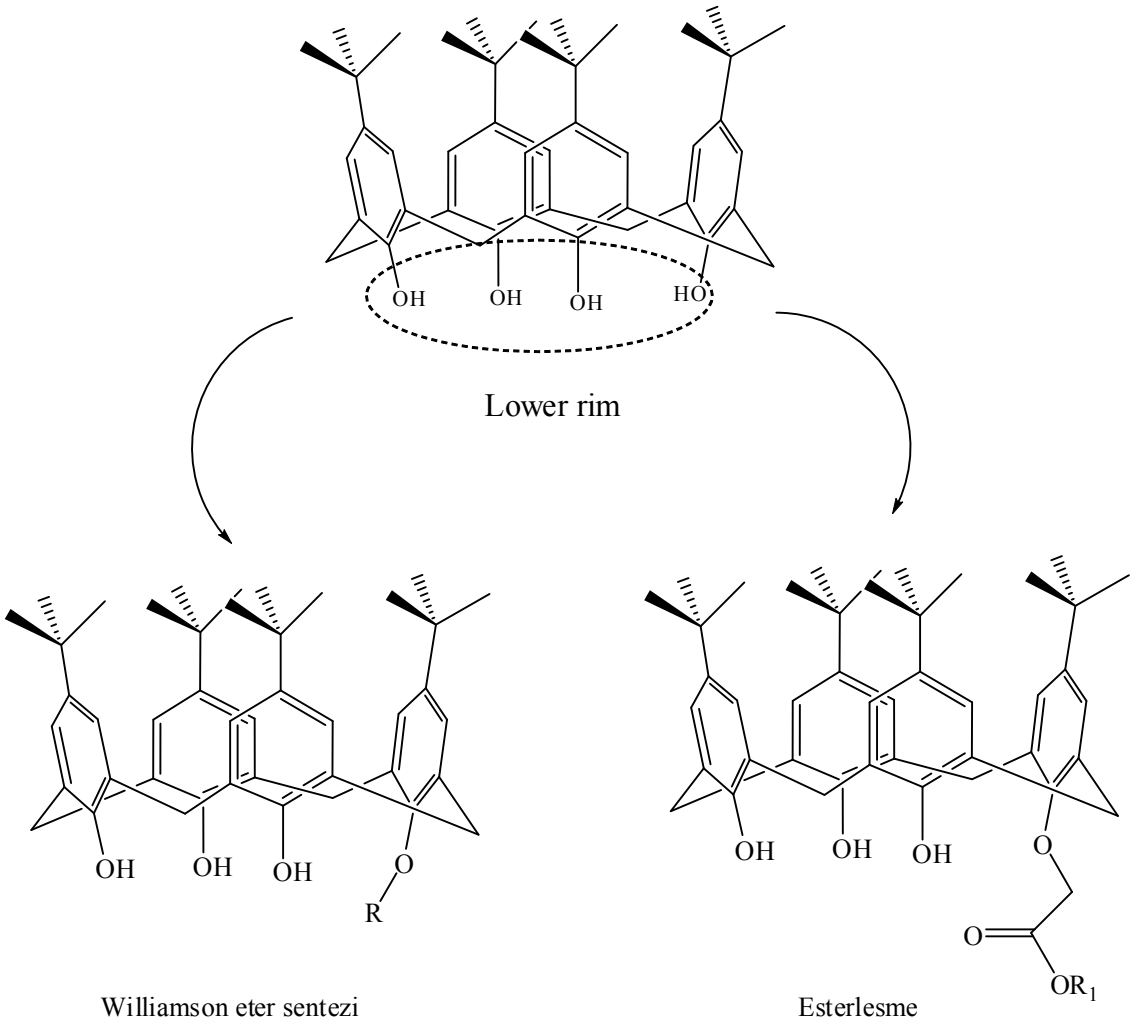
fonksiyonlandırılmasıdır. Halkalı bir yapısı olan kaliksarenler anyon, katyon ve nötral bileşikler ile seçimli olarak kompleks oluşturmasından dolayı araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir. Kaliksarenler, organik çözücülerdeki çözünürlüklerinin az olmasından dolayı farklı fonksiyonel gruplarla fonksiyonlandırılması gerekir. Kaliksarenlerin fenolik –OH gruplarının bulunduğu dar kısmına "lower rim", aril halkalarının para posizyonunun bulunduğu geniş kısma ise "upper rim" olarak adlandırılmıştır. Kaliksarenler, hem fenolik –OH üzerinden "lower rim", hem de *p-ter*-bütil gruplarının dealkilasyonu ile "upper rim" sınırsız fonksiyonlandırılabilirler (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. kaliksarenlerin "lower rim" ve "upper rim" bölgesi

1.1.4.1. Kaliksarenlerin fenolik-OH üzerinden fonksiyonlandırılması

Kaliksarenlerin, fenolik-OH üzrinden fonksiyonlandırılabilmesi için öncelikle eter, ester, keton, oksim, imin, fosfin gruplarının bağlanması ile mümkün olur (Yilmaz 1999, Ting 1990, Cameron 1995). Williamson eter sentezine göre fenolik-OH grubunun alki halojenürlerle verdiği reaksiyon sonucu eter türevleri bağlanabilir. α-halokarbonil ile verdikleri reaksiyon sonucunda ise ester, amit, keton gibi türevleri de elde edilmektedir (Gutsche 1989; Arnaud-Neu 1991) (Şekil 1.10).



Williamson eter sentezi

$R=CH_2COCH_3$

$R=CH_2COOCH_3$

$R=CH_2COONH_2$

Esterlesme

$R_1=COCH_3$

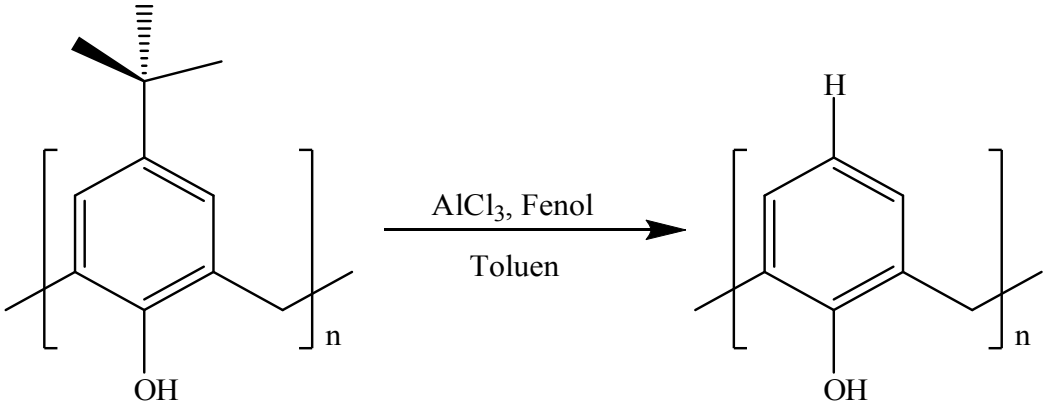
$R_1=COC_6H_5$

Şekil 1.10. Kaliksarenlerin fenolik-O üzerinden türevlendirilmesi

Kaliksarenlerin 1,2-di, 1,3-di, tri yada tetra ester türevlerinin sentezlenmesinde kullanılacak olan bazın ve çözücünün etkisi çok önemlidir. Çözücü olarak aseton veya asetonitril, baz olarak da Na_2CO_3 veya KCO_3 kullanıldığında 1,3-difonksiyonlu kaliksarenler elde edilir. Çözücü olarak DMF, baz olarak da NaH kullanıldığında 1,2-difonksiyonlukaliksarenler, yine aynı çözücüde baz olarak $Ba(OH)_2$ kullanıldığında trifonksiyonlu kaliksaren türevleri sentezlenebilir (Groenen 1991).

1.1.4.2. Kaliksarenlerin *p*-konumundan fonksiyonlandırılması

Kaliksarenlerin, fenil halkalarına bağla *ter*-bütil gruplarının $AlCl_3$ ve toluen ortamındaki dealkilasyonu ile fenil halkalarının *para*- konumuna birçok fonksiyonel grubun bağlanmasına imkan sağlar (Şekil 1.11).

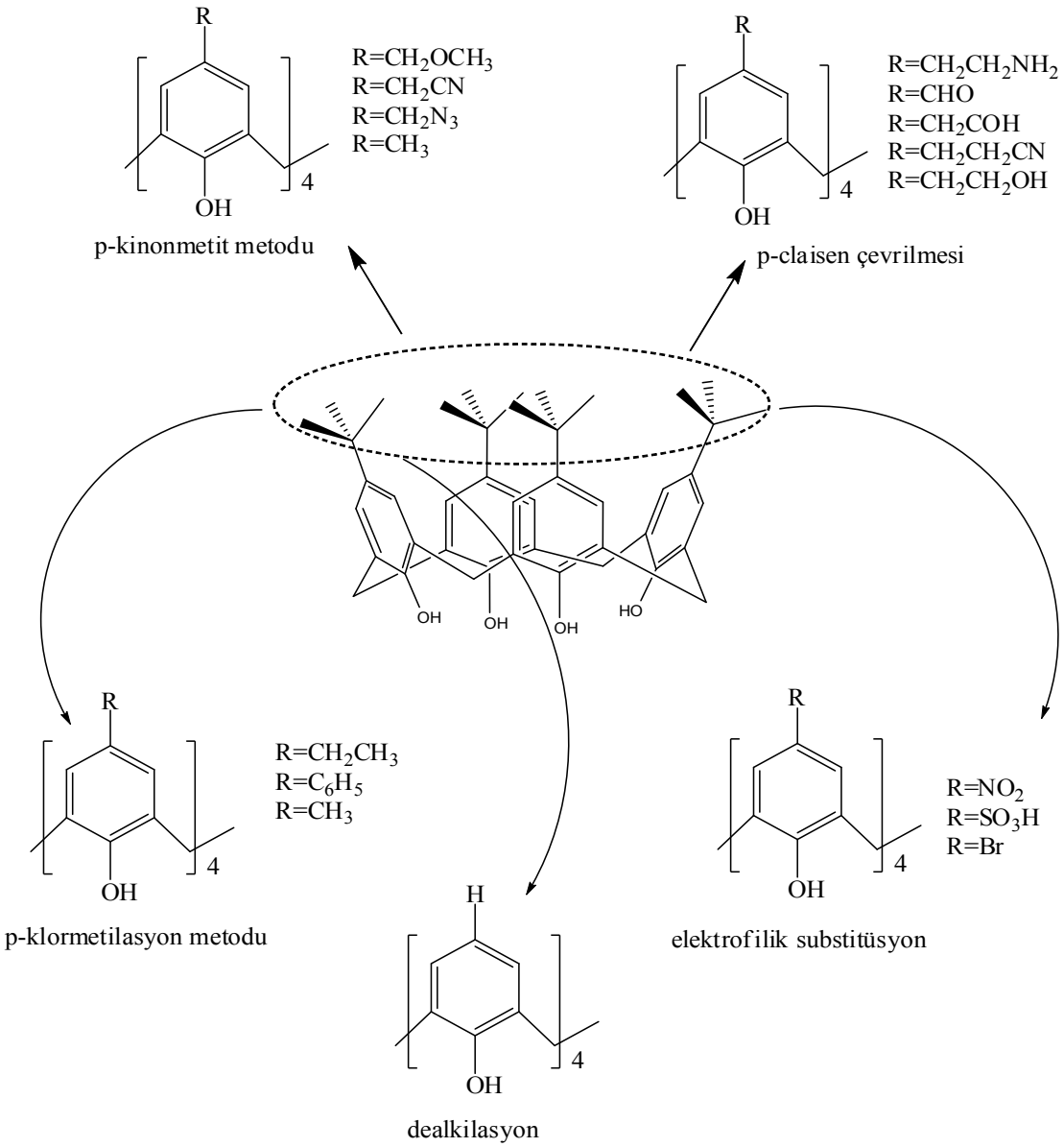


Şekil 1.11. p-ter-bütilkaliks[n]arenlerin dealkilasyonu

Shinkai ve çalışma grubu kailks[n]arenlerin 100°C'de sülfirik asit ile yaptıkları reaksiyondan *p*-sülfonatokaliks[n]arenleri sentezlemişlerdir (Shinkai 1986).

Kaliksarenler, genellikle *para*-konumu üzerinden yapılan fonksiyonlandırma çalışmaları iyotlama (Arduni 1990), bromlama (Gutsche 1985; Hamada 1990), sülfolama (Gutsche 1985; Shinkai 1986), açilleme (Gutsche 1986), klorsülfolama (Marzherin 1993) gibi "kinon-metit" sübstitüsyon reaksiyonlarıdır.

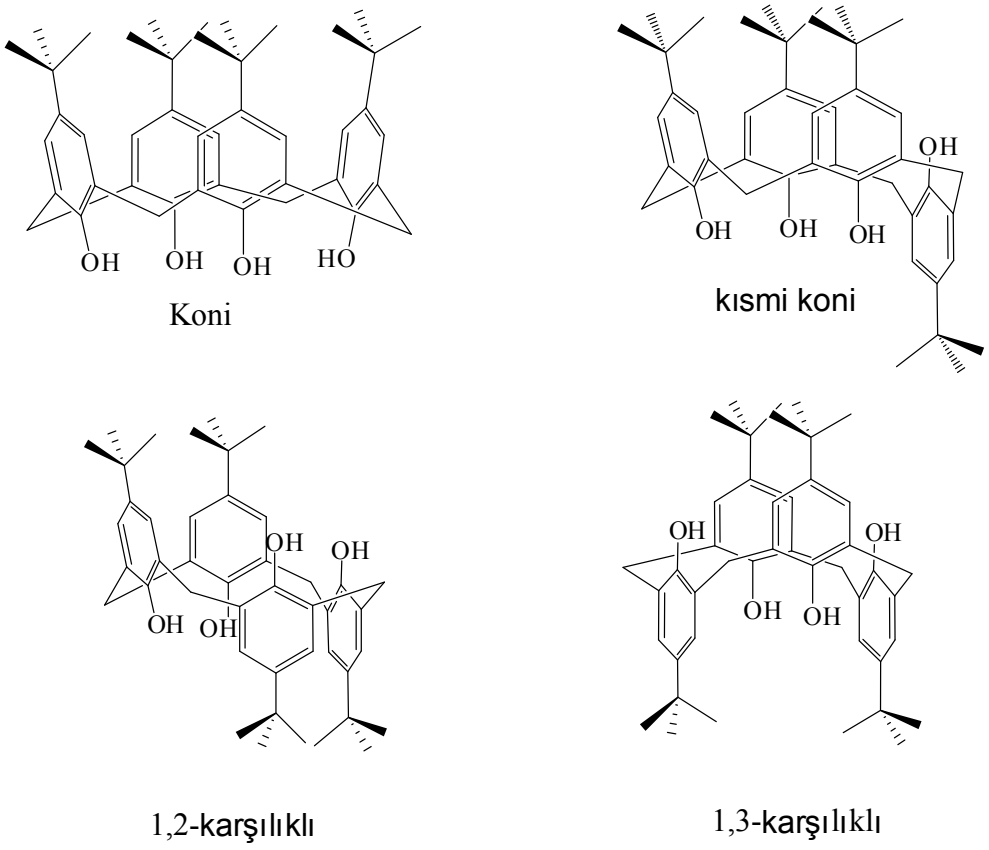
p-Clasien çevrilmesi ise, kaliksaren de bulunan fenol gruplarının *p*-pozisyonuna farklı fonksiyonel grupların bağlandığı bir metottur (Gutsche 1985).



Şekil 1.12. Kaliksarenlerin *para*-konumundan türevlendirilmesi

1.1.5. Kaliksarenlerin Konformasyonları

Kaliks[4]arenler, bünyesinde bulunan aril halkalarının aşağı yada yukarı hareket etmesiyle değişik konformasyonda bulunurlar. Koni, kısmi koni, 1,2-karşılıklı ve 1,3-karşılıklı olmak üzere 4 farklı konformasyonları vardır (Gutsche 1989) (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. *p-ter*-bütilkaliks[4]aren'in konformasyonları

Genellikle *p-ter*-bütilkaliks[4]aren'in bu konformasyonları ^{1}H-NMR spektrumlarına bakılarak kolaylıkla ayırt edilebilir (Çizelge 1.1).

Çizelge 1.1. *p-ter*-bütilkaliks[4]arenlerin konformasyonlarına ait H-NMR spektrumları.

Konformasyon	**^{1}H-NMR *spektrumun* görülen Ar-CH_2-Ar protonları**
Koni	Bir çift dublet
Kısmi koni	İki çift dublet (1:1) yada bir çift dublet ve bir singlet (1:1)
1,2-karşılıklı	Bir singlet ve 2 dublet (1:1)
1,3-karşılıklı	Bir singlet

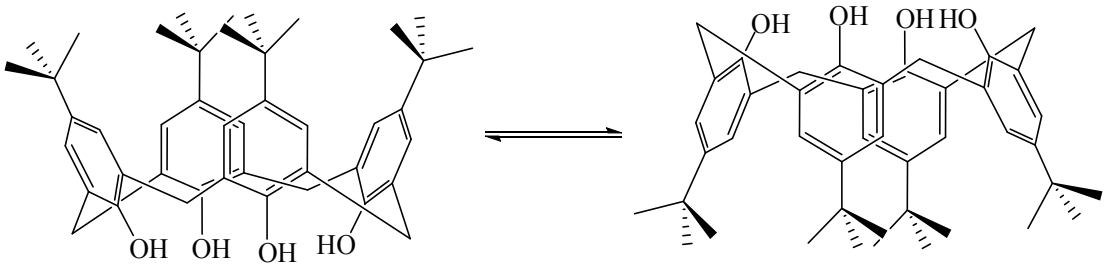
Kaliksarenlerin fenolik-OH grubu üzerinden fonksiyonlandırılmamış halleri oda sıcaklığında ve çözelti ortamında oldukça hareketlidir. Bu kaliksarenlerin kristal yapısı incelendiğinde koni konformasyonunda olduğu görülmüştür. Buda molekülde bulunan hidroksil gruplarının molekül içi hidrojen bağı yapmasıyla açıklanmıştır.

Kaliksarenlerin, konformasyonları arasındaki dönüşüm hızının kullanılan çözücülerinde etkisi olduğu bulunmuştur. Toluen ve karbontetra klorür gibi apolar

çözücüler kullanıldığı zaman, kaliksarenlerle kuvvetli kompleks yapmasından dolayı dönüşüm hızını yavaşlatmaktadır. Aseton ve pridin gibi polar çözücüler kullanıldığı zaman ise molekül içi hidrojen bağını etkileyerek dönüşüm hızını arttırmaktadır (Gutsche 1981).

Aromatik halka arasındaki metilen hidrojenleri yüksek sıcaklıkta singlet pik verdiği, düşük sıcaklıkta ise bir çift dublet pik verdiği görülmüştür. Buda sıcaklığın değişmesiyle *p-ter*-bütilkaliks[4]arenlerin konformasyonlarının değiştiğini göstermiş olur (Gutsche 1989).

p-ter-bütilkaliks[4]arenlerin koni konformasyonunda her bir metilen grubunun 2 protonu beklenenin aksine birbirine eş değildir. 20^{o}C ve daha düşük sıcaklıklarda $CDCl_3$ gibi apolar bir çözücü ile alınan ^{1}H-NMR spektrumunda bir çift dublet görülür. Sıcaklık arttıkça bu iki pik arasındaki mesafe artar. Fakat sıcaklık 60^{o}C'nin üstüne çıktığında sadece bir singlet pik görülür. Bu durum şu Şekilde açıklanabilir, koni konformasyonundaki fakat karşıt olan kaliksarenlerin değişimi ile olabilir. Hidroksil grupları makrosiklik yapının içinden geçerek ekvatoral olan protonlar aksiyal, aksiyal olan protonlarda ekvatoral düzleme hızlı bir Şekilde geçişinden dolayı, H-NMR spektrumu alındığında sadece ortalama tek bir pik gösterir (Şekil 1.14).



Şekil 1.14. iki karşıt koni konformasyonu

1.1.6. Kaliksarenlerin Fiziksel Özellikleri

1.1.6.1. Erime noktası

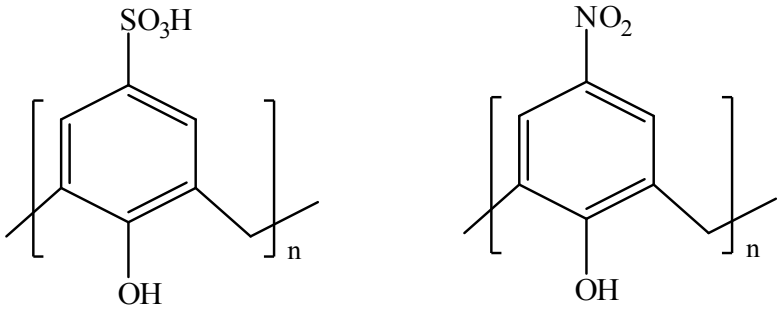
Yaklaşık olarak *p-ter*-bütilkaliks[4]aren'in erime noktası 344^{o}C, *p-ter*-bütilkaliks[6]aren'in erime noktası 380^{o}C, *p-ter*-bütilkaliks[8]aren'in erime noktası ise 412^{o}C'dir. Kaliksarende bulunan hidrojen bağları erime noktasını belirlemektedir. Kaliksarenler taşıdıkları fonksiyonlara göre erime noktası değişmektedir.

Kaliksarenlerin eter ve ester türevleri kendilerini oluşturan bileşikten daha düşük erime noktasına sahiptirler. Örneğin; *p-ter*-bütilkaliks[4]aren'in erime noktası yaklaşık olarak 344^{o}C olmasına rağman *p-ter*-bütilkaliks[4]aren'in diester türevinin erime noktası yaklaşık olarak 202-206^{o}C arasındadır.

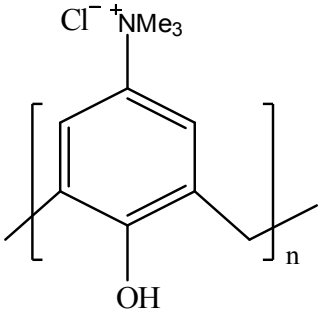
1.1.6.2. Çözünürlük

Kaliksarenlerin organik çözücüleri düşündüğümüzde çözünürlükleri oldukça sınırlıdır. Genel olarak kaliksarenler kloroform, pridin ve karbondisülfürde yeteri kadar çözünürler. *Para*- köşelerine uzun zincirli alkil grupları bağlandığı zaman kaliksarenlerin çözünürlükleri artmaktadır. Kaliksarenlere eter ve ester türevlerinin bağlanması organik çözücülerdeki çözünürlüklerini arttırır. Karışım halindeki kaliksarenler, türevlendirme ya da sürekli ekstraksiyon ile birbirlerinden ayrıştırılabilirler. Örneğin; *p*-fenilkaliks[6]aren ve *p*-fenilkaliks[8]aren karşımı sürekli ekstraksiyon yöntemi ile birbirlerinden ayrıştırılabilirler (Gutsche 1989).

Genel olarak kaliksarenler suda çözünmezler. Bu durum kaliksarenlerin sulu çözeltilerdeki substrat-bağlanma için kullanımını engeller. Kaliksarenlerin daha geniş bir Şekilde kullanılabilmesi için suda çözünebilen türevlerinin sentezlenmesi gerekir. İlk olarak ungaro ve arkadaşları suda çözünebilen *p-ter*-bütilkaliks[4]aren'in tetrakarboksilik asit türevini sentezlemiştir (Arduni1984). Aynı yıl içerisinde Shinkai ve arkadaşları *p*-sülfonatokaliks[6]aren türevini sentezleyerek suda çözünen kaliksaren elde etmiştir. Shinkai ve arkadaşları hem anyonik molekülleriyle kuvvetli bağ yapabilen hem de enzim mimik aktivitesi gösterin ilk katyonik kaliksaren türevini sentezlemiştir (Shinkai 1989). Bundan sonraki süreçte araştırmacılar suda çözünen kaliksaren türevleri ile ilgili araştırmalar yaprak birçok sonuç elde etmişlerdir. Suda çözünebilen bazı kaliksaren türevleri (Şekil 1.15).

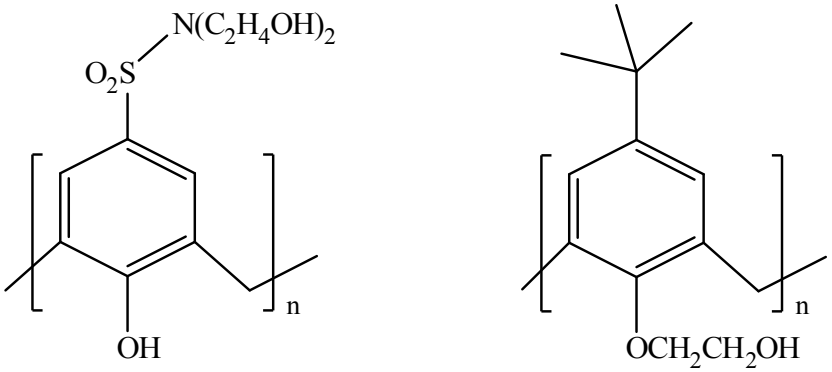


Anyonik kaliksarenler



n=4,6,8

Katyonik kaliksarenler



Nötral kaliksarenler

Şekil 1.15. Suda çözünen kaliksarenler

1.1.6.3. Kaliksarenlerin spektral özellikleri

Kaliksarenlerin birçok çalışmasında, fiziksel ve kimyasal özellikleri için Ultraviyole (UV), İnfrared spektroskopisi (IR), Nükleer manyetik rezonans (NMR), Kütle spektroskopisi (MS) gibi spektroskopik metotlar kullanılmıştır. Kaliksarenlerin yapısında bulunan fenolik gruplardan dolayı yaklaşık olarak 280 nm'de absorbansının olduğu görülür (Gutsche 1989).

Kaliksarenlerin infrared spektrumlarına bakıldığında göze çarpan en önemli özellik yaklaşık olarak 3150 cm^{-1} de OH gruplarına ait olan düşük frekanslı titreşimlerdir. Bu durum kaliksarenlerde bulunan güçlü molekül içi hidrojen bağlarıyla açıklanmaktadır. Bütün kaliksarenlerin 900-1500 cm^{-1} olan parmak izi bölgesi birbirinin aynısıdır. Kaliksarenler tek başına incelendiğinde 762 cm^{-1}'de siklik hekzamere, 600-500 cm^{-1}'de siklik oktamere ait bantlar gözlenir. Kaliks[4]aren alkil 18 eterleri 850 cm^{-1}'de ve kaliks[6]arenin alkil eterleri 810 cm^{-1}'de kuvvetli titreşim bandına sahiptir (Özcan 2009).

Kaliksarenlerin tayininde ve konformasyonlarının belirlenmesinde en çok kullanılan spektroskopik metot ^{1}H-NMR'dır. ^{1}H-NMR spektrumlarına bakıldığında kaliksarende bulunan fenolik –OH pikleri 10 ppm civarında olması beklenirken, molekül içi hidrojen bağlarının etkisiyle pikler yukarı alana kaymıştır ve singlet olarak görülmektedir (Özcan 2009).

Kaliksarenlerin molekül ağırlıklarının ölçülmesi yapılarının aydınlatılması için önemli bir faktördür. Kaliksarenlerin düşük çözünürlüğe sahip olması ebüliyoskopik ve krisyoskopik yöntemler ile molekül ağırlıklarının ölçülmesi oldukça güçtür. Molekül kütleleri daha sağlıklı olarak kütle spekttrofotometresi (MS) ile belirlemek mümkündür. Siklik tetrametik yapıları için m/e oranına bakıldığında 648 olarak sinyal verir. Fakat bu bileşiğin oktatrimetil sillil türevleri için m/e oranına bakıldığında 1872'de bir sinyal verirken, sonrada ikinci olarak m/e 936'da sinyal vermesi bu bileşiğin iki eşit iyona parçalandığını göstermektedir (Özcan 2009).

1.1.7. Kaliksarenlerin Kullanım Alanları

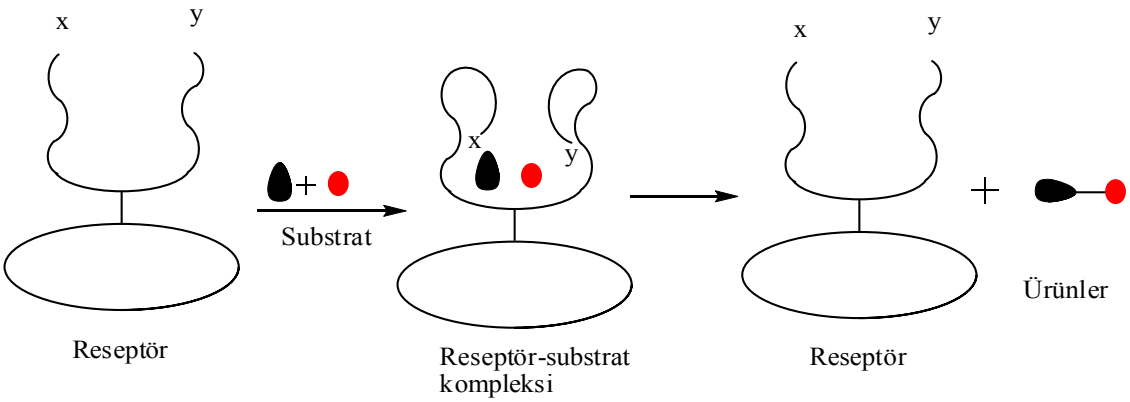
1. Enzim-Mimik olarak kullanılması.
2. Molekül ve iyon taşıyıcı olarak kullanılması.
3. Enantiomerlerin tanınmasında kullanılması.
4. Sensör ve membran tekniklerinde kullanılması.
5. Kolon dolgu maddesi olarak kromotografide kullanılması.
6. Katalizör çalışmalarında kullanılması.

1.1.7.1. Enzim-Mimik olarak kullanılan kaliksarenler

Kaliksarenler enzim-mimik özelliği kazanabilecek şekilde uygun fonksiyon gruplar ile fonksiyonlandırılırsa enzimin aktif bölgesi oluşturarak substratların katalitik olarak ürünlere dönüşmesini sağlayabilirler. Enzim-mimik yapısının ana fikri, enzimin aktif bölgesini kaliksaren odaklı sentetik bir model yapmaktır. Bu durumda enzim, diger fonksiyonel gruplar ile beraber baglanan subtsratlar için bir bosluk oluşturacaktr. Böylece substratlarla etkileşerek katalitik olarak substratların ürünlere dönüsmesini saglayacaktır (Breslow 1995) (Şekil 1.16).

Biyolojik çalışmalar için uygun model veya mimiği tasarlanabilmesi için araştırmacılar tarafından birçok çalışma yapılmıştır. Bunlar tasarlanırken belli başlı özellikleri taşıması istenir. Bunlar:

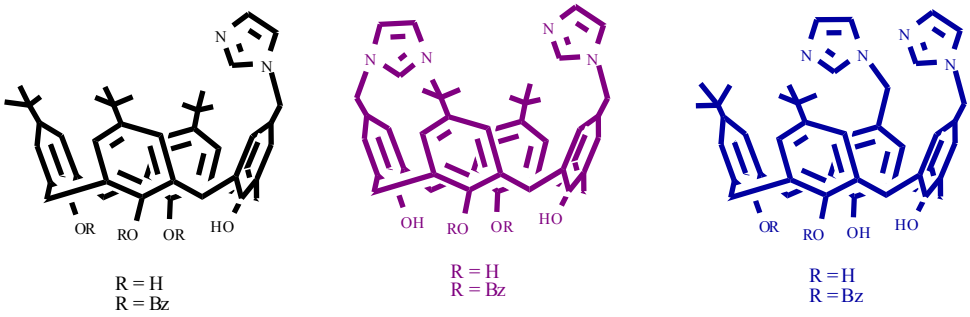
- Uygun büyüklüğe, şekle ve boşluğa sahip olmaları.
- Reaktif bağlanma bölgelerinin bulunması.
- Dallar ve köprülerin bulunması.
- Dallar ve köprülerin bulunması.



Şekil 1.16. Fonksiyonlandırılmış kaliksarenler üzerinde enzim modellerinin şematik gösterimi.

Supramoleküler kimyanın bu alanı enzimlerle aynı katalitik fonksiyona sahip fakat yapısal olarak daha karmaşık olan ve daha kararlı olan enzim modelleri ya da yapay enzimlerin sentezini içerir. Enzim mimik yapısının ana amacı enzimin kaliksaren-bazlı aktif bölgelere sahip sentetik bir model oluşturmaktır. Bu model, kaliksaren-bazlı enzimin taşıdığı fonksiyonel gruplar sayesinde substratlarla onları ürünlere katalitik olarak dönüştürmek için etkileşim kurar (Şekil 1.16) (Yılmaz 2008).

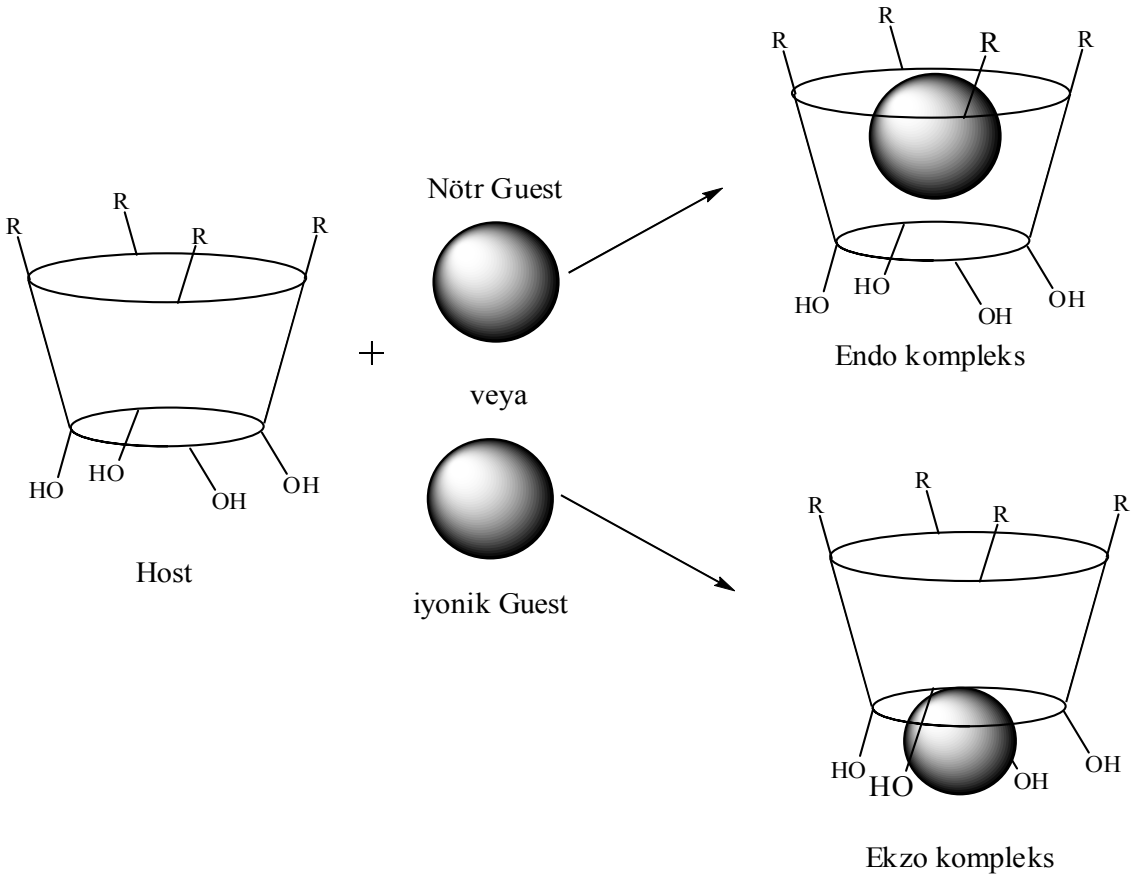
Dospil ve Schatz (2001), *p*-konumundaki farklı pozisyonlarda imidazol grupları taşıyan kaliks[4]aren türevlerini sentezlemişlerdir. Bunların tampon çözeltilerde *p*-nitrofenil esterlerden *p*-nitrofenolü açığa çıkaran enzim gibi davrandıkları görülmüştür (Şekil 1.17).



Şekil 1.17. *p*-Konumunda farklı şekillerde imidazol grubu taşıyan kaliks[4]arenler.

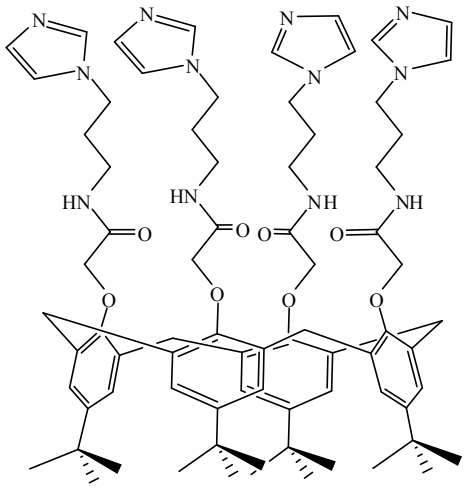
1.1.7.2. Molekül veya iyon taşıyıcı kaliksarenler

Kaliksarenler halkalı yapıya ve sepet gibi boşluklara sahip olmasından dolayı farklı yapılara sahip birçok organik bileşik ve iyonlarla kompleks yapma özelliğine sahiptir. Kaliksarenler bu özelliğinden dolayı molekül ve iyon taşıyıcı olarak yaygın bir Şekilde kullanılırlar. Bu bileşiklerin kompleksleri endo- ve ekzo- kompleks şeklindedir (Şekil 1.18).



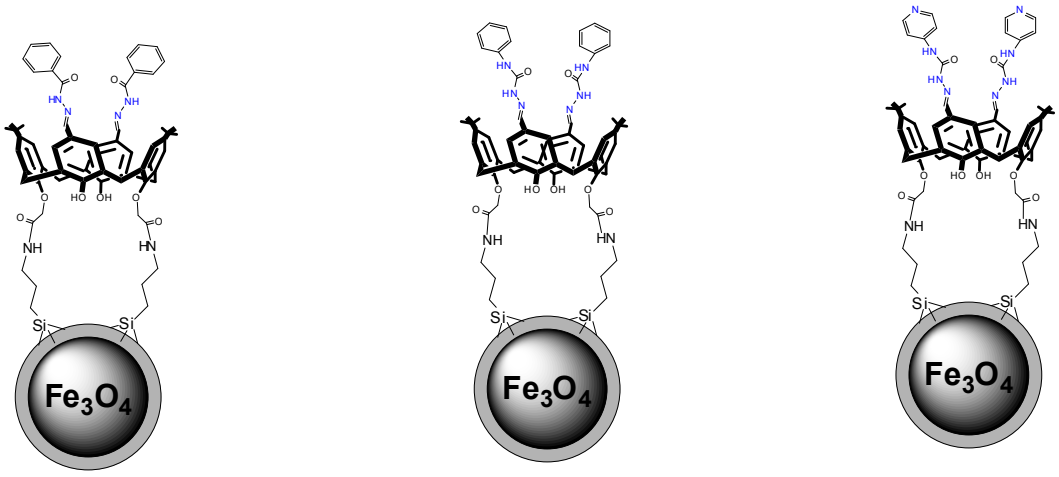
Şekil 1.18. Kaliksarenlerin kompleks oluşturması

Akin ve ark. (2012) yaptıkları bir çalışmada imidazol grubu bulunduran kaliks[4]aren türevini sentezlemişlerdir. Daha sonra sıvı membran çalışmlarında paladyum(II)'nin taşınmasında kullanılmıştır. Taşıyıcı zamanı, faz konsantrasyonu, taşıyıcı konsantrasyonu ve pH'ın etkilerini incelemişlerdir. En iyi sonucu 24 saat sonunda 10^{-3} M konsantrasyonda %95 olarak bulmuşlardır. (Şekil 1.19).



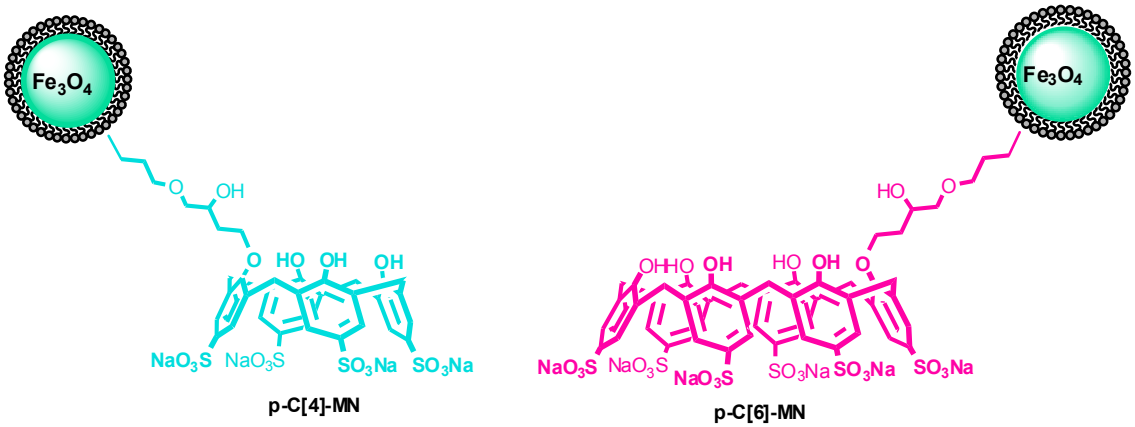
Şekil 1.19. Kaliks[4]aren imidazol türevi.

Akoz ve ark. (2011), yaptıkları bir çalışmada kaliks[4]arenin semikarbazon türevlerini sentezlemişler. Daha sonra Fe(III) and Fe(II) iyonları ile Fe_3O_4 demir nanopartükülü sentezlenmiş ve 3-(aminopropiltrietoksi silan) ile modifiye edilerek yüzeyinde amin grubu bulunan demir nanopartükülleri elde etmişlerdir. Daha sonra demir nanopartükülün bağlı olduğu kaliks[4]areni elde etmişlerdir ve Cr(IV) iyonunun taşınmasında kullanmışlardır (Şekil 1.20).



Şekil 1.20. Semikarbazon türevleri.

Aksoy ve ark. (2012), yaptıkları bir çalışmada kaliks[4,6]arenin sülfonat türevini sentezleyerek ilk defa manyetik nanopartüküle bağlamışlardır ve aromatik aminlerin taşınmasında kullanmışlardır. pH (3-8.5) aralığında aromatik aminlerin, kaliks[4]aren türevinin 44-97% oranında taşıdığı, kaliks[6]aren türevinin ise 63-97% oranında taşıdığı gözlenmiştir (Şekil 1.21).

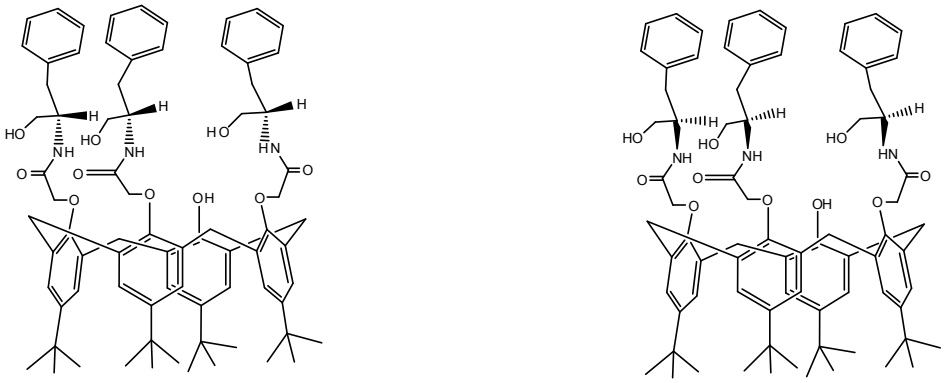


Şekil 1.21. Demir nanopartükülüne bağlı kaliks[4,6]aren türevi.

1.1.7.3. Kaliksarenlerin enantiomerlerin tanınmasında kullanılması

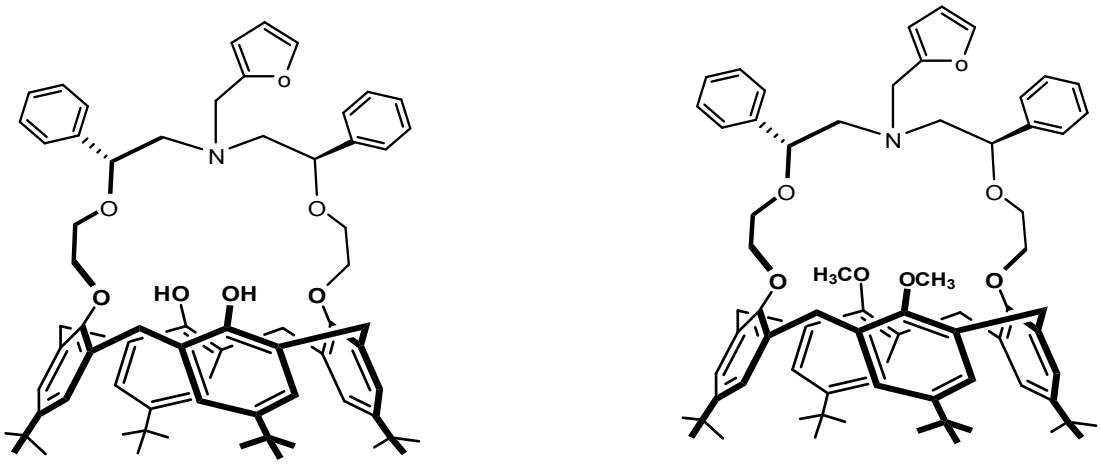
Enantiomerlerin biyolojik özellikleri çoğu zaman birbirinden önemli derecede farklılık gösterir. Özellikle kiral bileşikler farmakolijide pek çok ilacın etken maddesi olduğu için bir bileşiğin enantiomerlerinin ayrı bir şekilde elde edilmesi oldukça önemlidir. Çünkü kiral bir maddenin enantiomerlerinden birisi vücutta fizyolojik olarak yararlı değişiklik yaparken diğer enantiomeri etkili olmaz veya ciddi fizyolojik zararlar verebilir. Bu yüzden ilacın etki sistemlerinin üzerindeki çalışmaların çoğu enantiomerik ayrılmalar üzerine kurulmuştur. Kiral moleküller asimetrik konak (host) moleküller ile kompleks yapabildikleri için kiral gruplar taşıyan bazı kaliksaren türevleri enantiomerlerin ayrılması amacıyla kullanılmaktadır.

Yılmaz ve arkadaşları (2006), yaptıkları bir çalışmada yeni kiral kaliks[4]aren triamid türevlerini sentezlemişler ve bu türevlerin sıvı-sıvı ekstraksiyon metoduyla seçilmiş olan amino asit metil esterlerine karşı ekstraksiyon özelliklerini incelemişlerdir (Şekil 1.22).



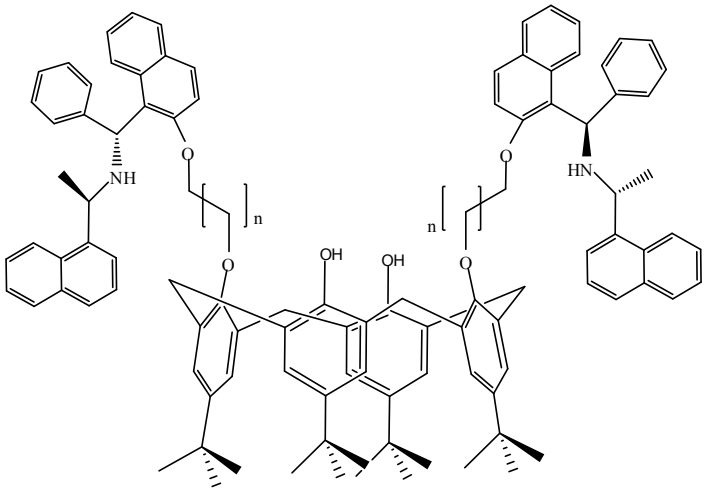
Şekil 1.22. Kiral kaliks[4]aren triamid türevleri.

Demirtas ve ark. (2008), yaptıkları bir çalışmada nitrojen atomu üzerinde bir furfuril grup içeren yeni kiral kaliks[4]azacrown eter türevleri sentezlemişlerdir. Rasemik karboksilik asitlerin enantiomerleri için reseptörlerin tanınmasında kullanmışlardır (Şekil 1.23).



Şekil 1.23. Kiral kaliks[4]azacrown eter türevleri.

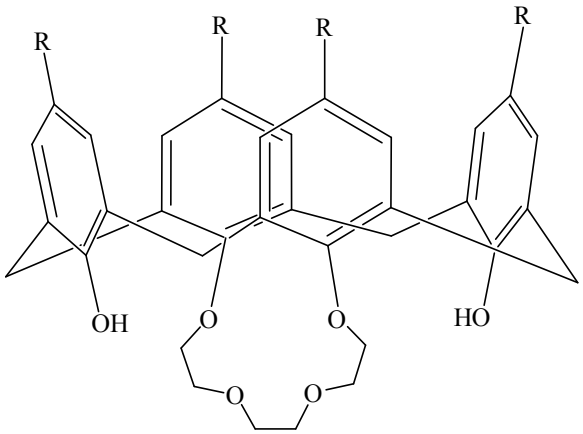
Durmaz ve ark. (2011), yaptıkları bir çalışmada kiral aminonaftol birimleri ile 1,3 konumundan kiral kaliks[4]aren türevleri sentezlemişlerdir. Reseptörleri, rasemik metaryallerin enantiomerleri için farklı kiral yapıların tanınmasında kullanmışlardır (Şekil 1.24).



Şekil 1.24. Aminonaftol birimlerinden elde edilen kiral kaliks[4]aren türevi.

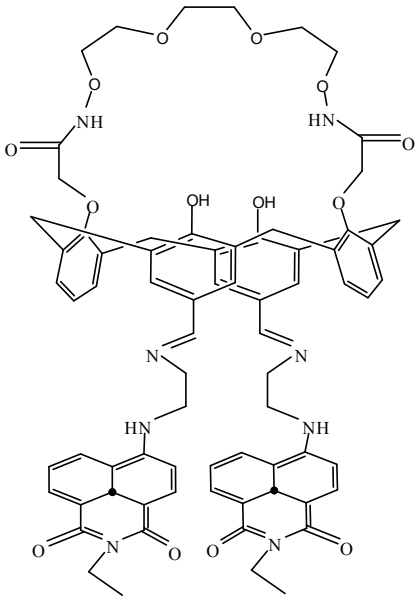
1.1.7.4. Kaliksarenlerin sensör ve membran tekniklerinde kullanılması.

Yılmaz ve arkadaşları (2004), sentezledikleri bir kalikscrown bileşiğini metal iyonlarının ekstraksiyon çalışmalarında iyon seçici bir elektrot olarak kullanmışlardır. Hidrojen elektrot olarak kullanılan kaliksaren (Şekil 1.25)'de görülmektedir.



Şekil 1.25. Hidrojen elektrot olarak kullanılan kalikscrown bileşiği.

Sahin ve Yilmaz (2012), yaptıkları bir çalışmada seçimli metal iyonları arasında Cu^{+2} için yüksek floresans özeliği olan naftalimid kaliks[4]aren türevi sentezlemişlerdir. Farklı metal iyonları (Na^{+}, Li^{+}, Mg^{+2}, Ni^{+2}, Ba^{+2}, Ca^{+2}, Cu^{+2}, Pb^{+2}, Zn^{+2}) ve anyonları (F^{-}, Cl^{-}, Br^{-}, $H_2PO_4^{-}$, NO_3^{-} , I^{-}, HSO_4^{-} , CH_3COO^{-}) için floresans özelliklerini incelemişlerdir. Metal iyonları arasında sadece Cu^{+2} ile emisyon etkisine bakmışlar ve en yüksek floresans özellik gösterdiğini gözlemlemişlerdir.(Şekil 1.26).

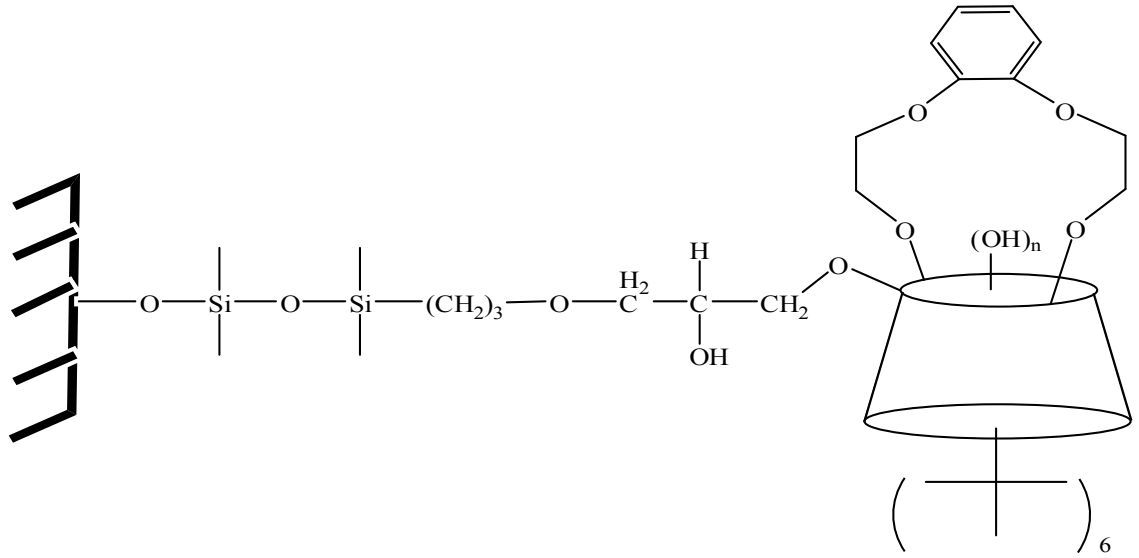


Şekil 1.26. Naftalimid kaliks[4]aren türevi.

1.1.7.5. Kolon dolgu maddesi olarak kaliksarenlerin kromatografide kullanılması.

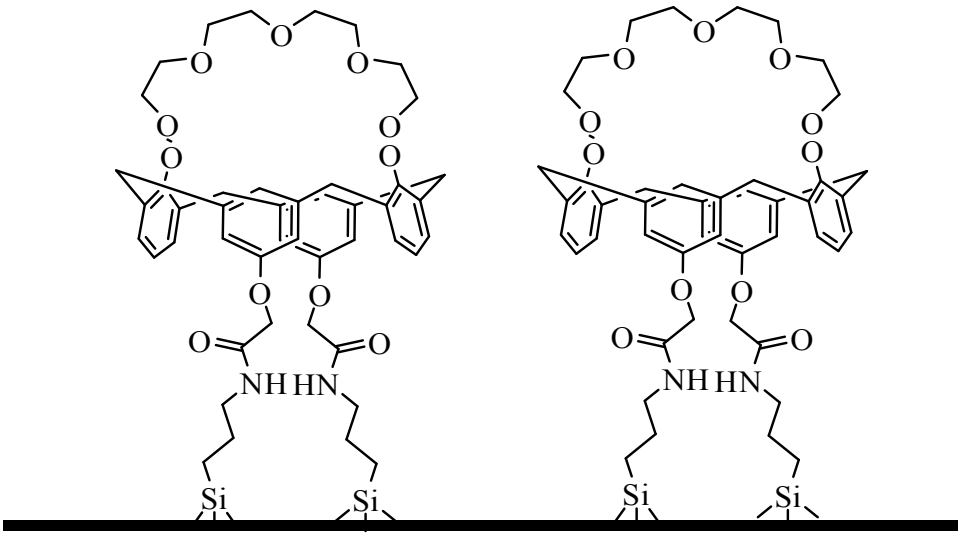
Kaliksarenler gaz kromatografisi (GC), sıvı kromatografisi ve kapiler elektroforez için hareketli faza eklenmiş olarak ya da durgun faz olarak immobilize edilmişlerdir. Sonuçlar gösteriyor ki birçok madde için ve özellikle aromatikler için makrosiklik yapıların seçiciliğe önemli ölçüde katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Glennon ve arkadaşları (1994), ilk olarak silikaya bağlı kaliks[4]aren tetraesterini hazırlamışlar ve bunu HPLC'de aminoasit esterlerini ve metal iyonlarını ayırmada kullanmışlardır. Park ve arkadaşları (1997)'de bazı sübstitüe aromatik pozisyonel izomerlerinin kaliks[6]aren-*p*-sülfonat bağlı silika durgun fazı üzerinde ayrılmasını incelemişlerdir (Şekil 1.27).



Şekil 1.27. *p-ter*-bütilkaliks[6]aren-1,4-benzocrown-4 bağlı silika jel durgun fazı.

Erdemir ve Yilmaz (2011), yaptıkları bir çalışmada silikaya bağlanan yeni kaliks[4]crown-5 sentezlemişler ve aromatik aminler, fenoller ve bazı ilaçların ayrlmasında kullanmışlardır. Yapılan çalışmalarda aromatik aminler, fenoller ve ilaçlarda yüksek oranda seçimlilik gösterdiğini gözlemlemişlerdir (Şekil 1.28).

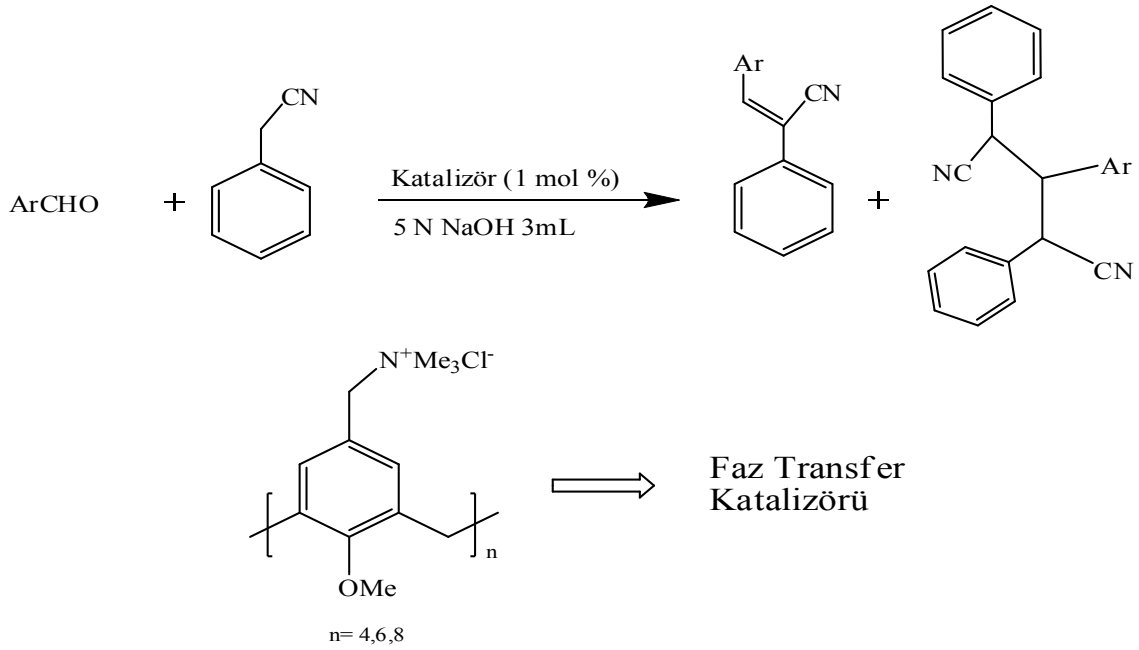


Şekil 1.28. Silikaya bağlı kaliks[4]crown-5.

1.1.7.6. Katalizör çalışmalarında kaliksarenlerin kullanılması

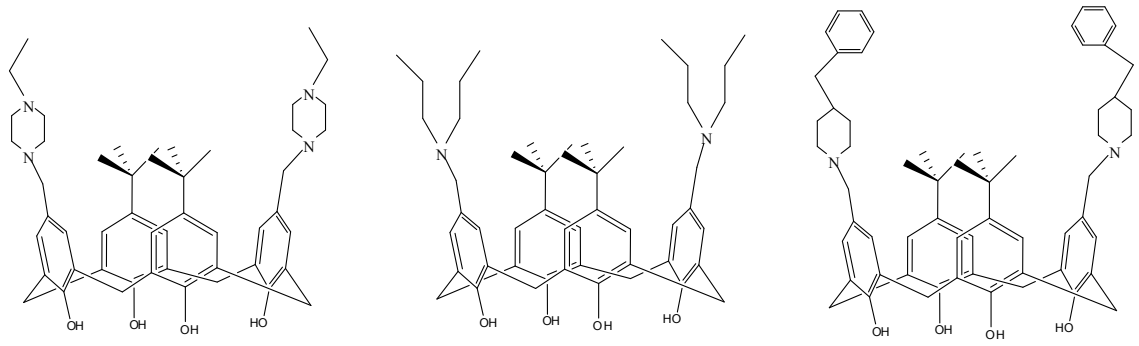
Shimizu ve ark (2001) yaptıkları bir çalışmada suda çözünebilen kaliksaren türevlerini sentezlemişler ve sulu NaOH çözeltisi içerisinde aktiflenmiş metil ve metilen

bileşiklerinin aldol-tipi kondezasyon ve Michael katılma reaksiyonlarının herhangi bir organik çözücü kullanmadan ve yüksek verimlerde gerçekleştirmişlerdir (Şekil 1.29).



Şekil 1.29. Katalizör olarak kullanılan kaliks[n]aren türevleri ve katalizlediği Michael katılma reaksiyonu.

Akceylan ve Yilmaz (2011) yaptıkları bir çalışmada N-etilpiperazin, diallilamin ve 4-benzilpiperidin ile faz-transfer katalizörü olarak kaliks[4]aren alkilamin türevlerini sentelemişlerdir. P-nitrobenzil bromid ile alkali metal karbokilatların ester oluşumunu incelemişlerdir. 25^{o}C'de diklorometan içerisinde kaliks[4]arenin N-etilpiperidin amin türevinin en iyi sonucu verdiğini gözlemlemişlerdir (Şekil 1.30).



N-etilpiperazin Diallilamin 4-benzilpiperidin

Şekil 1.30. Katalizör olarak kullanılan kaliks[4]aren türevleri.

1.2. Siklodekstrinler

1.2.1. Siklodekstrinlerin Tarihçesi

Siklodekstrinler (CD) ilk olarak 1891 yılında selülozin adıyla Villiers tarafından araştırılmıştır. Schardinger (1903), nişasta içeren bir besin ortamındaki gıda bozulmasına neden olan mikroorganizmalar üzerine çalışırken, selüloza benzeyen bir kristal izole ederek bu maddeye 'cellulosine' adını vermiştir. Schardinger (1911) yılında ise, Bacillus Macerans adındaki basili izole ederek nişastadan daha çok miktarda kristal şeker ürettiğini açıklamış ve bu madde Schardinger şekerleri olarak adlandırılmıştır (Szejtli 1989). Almanya'dan Pringsheim (1911-1935) yılları arasında, bu alanda önemli araştırmalar yapmış ve izole edilen bu şekerlerin birçok farklı molekül ile kararlı sulu çözeltiler oluşturabileceğini söylemiştir.

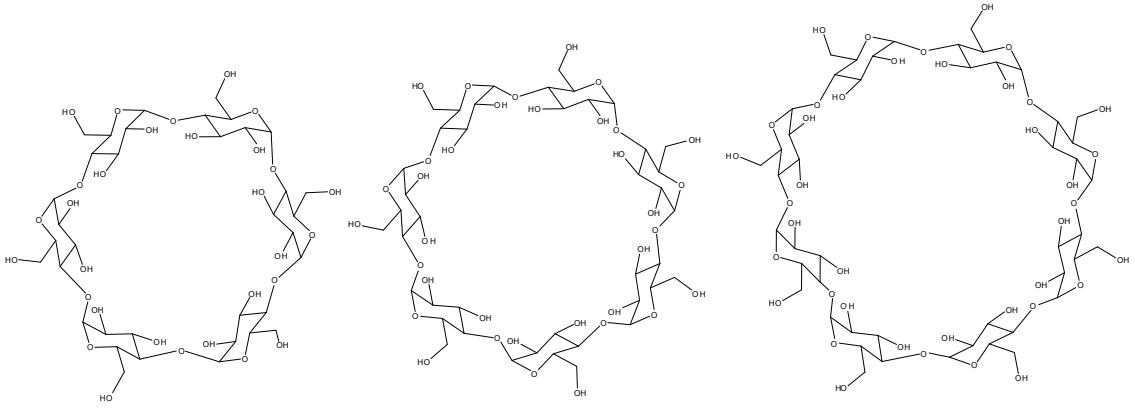
Siklodekstrinin yapısı hakkında 1942 yılına kadar tam olarak net bir bilgi yoktu. Fakat Freudenburg ve Cramer 1942 yılında X-ray kristolografisini kullanarak α- ve β-CD'lerin yapısını aydınlatmış ve bu sırada γ-siklodekstrini keşfetmişlerdir. Daha sonra siklodekstrinlerin konuk-konak kompleksleri oluşturabileceği bulunmuştur. 1950'lerde French ve Cramer, çalışma gruplarıyla birlikte, siklodekstrinleri saf bileşenlerine ayırmayı başardılar ve bileşenlerin doğru kimyasal ve fiziksel özelliklerini karakterize ettiler. Bununla birlikte siklodekstrinlerin endüstriyel üretimleri hızlı bir Şekilde artmış ve bu konu hakkında birçok makale, patent ve toksikolojik çalışmalar yapılmıştır.

Siklodekstrinler 1970'lerin başlarında pahalı olması, bulunmasının zor olması ve toksit olarak düşüldüğünden dolayı çok az kullanılmıştır. Ancak 1980'li yıllara gelindiğinde bazı şirketler siklodekstrinleri endüstri alanında kullanarak bu bileşiklerin önerildiği gibi kullanılması halinde toksit bir etkisinin olmadığını bildirmişlerdir (Szejtli 1998). Siklodekstrinlerin kullanılabilirliği artınca 1900'lü yıllarda binlerce siklodekstrin uygun fiyatlara kullanıcılara sunulmuştur. Son 15 yıla gelindiğinde ise, Almanya, Macaristan, Fransa, Amerika, Japonya gibi birçok ülkede siklodekstrin fabrikaları kurulmuştur (Van der veen 2000; Min 2005; Arslan 2012).

1.2.2. Siklodekstrinlerin Yapısal Özellikleri

Siklodekstrinler, nişastasnın glikoziltransferaz enzimi katalizliğinde parçalanarak halkalı bir yapının meydana gelmesiyle oluşur. Gerçekleşen bu reaksiyon

molekül içi reaksiyondur ve su oluşmaz. Bu reaksiyon sonucunda birbirlerine α-1,4 bağları ile bağlanmış olan glikopiranoz birimlerinden oluşan halkalı yapılar oluşmaktadır (Şekil 1.31).



Şekil 1.31. Siklodekstrin Yapısı

Siklodekstrinler sterik engelden dolayı en az 6 tane glikopiranoz biriminden oluşurlar. Daha az glikopiranoz biriminin bir araya gelmesi mümkün değildir. Altı adet glikopiranoz biriminden oluşan alfe (α), yedi adet glikopiranoz birimden oluşan beta (β), sekiz adet glikopiranoz birimden oluşan ise gama (γ) siklodekstrinlerdir. Sekizden fazla glikopiranoz birimine sahip siklodekstrin üretmek mümkündür. Ancak suda çözünürlüklerinin artması ve kompleks oluşturma özelliğinin zayıflaması nedeniyle fazla tercih edilmemektedirler (Arslan 2012).

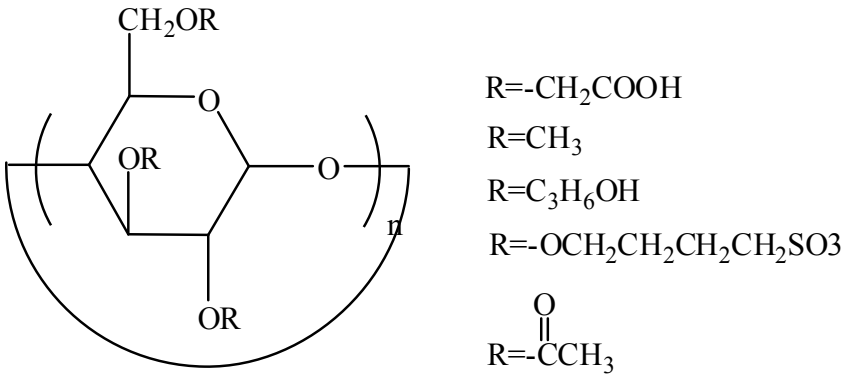
1.2.3. Siklodekstrinlerin Fonksiyonlandırılması

Siklodekstrinlerin, bir elektrofil ile hidroksil gruplarının reaksiyonu sonucu mono fonksiyonlandırma elde edilebilir. Hidroksil gruplarının farklı pozisyonlarda bulunması istenilen yere modifikasyon yapmamızı sağlar. Farklı pozisyonların, reaktivite ve kimyasal özelliklerinin farklı olmasından dolayı özel ürünlerin elde edilmesi sağlanır (Bender ve Komiyana 1978).

p-toluensülfonilklorürün β-CD ile reaksiyona girmesi ve ürünün suda kristallendirilmesiyle mono-6-deoksi-6-tosil-β-siklodekstrin (TsCD) oluşur (Mazzaglia ve ark. 2003, Sortino ve ark. 2006) . TsCD, en yaygın kullanılan başlangıç molekülüdür. Bu sülfonatlı siklodekstrinler bir ara ürün olarak kullanılır. Daha sonra ise, bazı

nükleofiller siklodekstrinlerdeki tosil grubuyla yer değiştirerek, modifiye siklodekstrinlerin eldesinde kullanılır (Arslan 2012).

Siklodekstrinler –OH grupları seçimli olarak fonksiyonlandırabilmenin yanında hepsi metillenir, asetillenir (açillenir) ve karboksi metillenebilir (Şekil 1.32).



Şekil 1.32. Siklodekstrinler.

1.2.4. Siklodekstrinlerin Kullanım Alanları

Siklodekstrinler apolar yapıda bulunan birçok alifatik ve aromatik bileşikler ile kompleks oluşturabilmektedir. Bundan dolayı konuk komplekslerin kimyasal ve fiziksel özelliklerinde önemli ölçüde farklılık oluşabilmektedir. Bu özelliğinden dolayı siklodekstrinler ilaç, kozmetik, tarım, gıda ve kimya endüstrilerinde geniş bir kullanım alanına sahiptir.

Kimyada ise enantiyomerlerin birbirlerinden ayrılmasında kullanılmaktadır. Ayrıca, bazı reaksiyonları katalize etmede ve atıklardaki toksik maddelerin uzaklaştırılmasında kullanılmaktadır (Del Valle 2004; Ceylan 2009).

Modifiye edilmiş siklodekstrinler, bazı reaksiyonları başlatabildiği, ayrıca modifiye olmayan siklodekstrinlerden reaksiyon hızını 1000 kat daha fazla arttırdığı tespit edilmiştir (Singh 2002; Dönmez ve Avcı 2009).

Siklodekstrinler son yıllarda tekstil endüstrisinde oldukça yaygın olarak kullanılmaya başlamıştır. Siklodekstrinler kumaşa ter ve sigara kokusunu maskelemek, kumaş boyamada kullanılarak, boyanın kumaş tarafından alınımını arttırmak ve sudaki boya miktarını azaltmak gibi özellikler kazandırmıştır (Singh 2002; Ceylan 2009).

Siklodekstrinler, çevre kimyasında, ağır metallerin ve organik kirleticilerin toprak, hava ve sudan uzaklaştırılmasında, atık su arıtımında kirleticilerin adsorbsiyon

ve kapsüllemesinde kullanılmaktadır. Fenol ve *p*-klorfenol gibi çevreye zararlı aromatik bileşikler, β-siklodekstrinler ile konuk-konak kompleksi oluşturarak uzaklaştırılabilmektedirler (Del Valle 2004; Dönmez ve Avcı 2009; Arslan 2012).

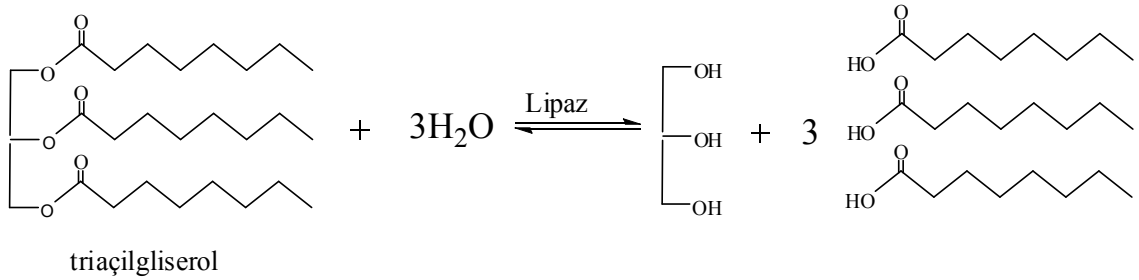
1.3. Lipaz

Lipazlar, triaçilgliserolleri yağ asitleri ve gliserole hidrolizini sağlayan enzimlerdir. Bu enzimler, bazı bitkilerde, insan ve hayvansal organizmalarda ve mikroorganizmalarda bulunur. Çeşitli biyolojik sıvılarda, organlarda, hücrelerde ve çeşitli dokularda bulunurlar (Fennema 1985).

Lipazlar genellikle suda çözünebilen enzimlerdir ve suda çözünmeyen substratlar için önemli rol oynarlar (Beisson ve ark. 2000; Yilmaz 2010).

Lipazlar normal şartlarda bitkisel ve hayvansal yağların tersinir hidrolizini kataliz eden enzimler olup, (E.C. 3.1.1.3.) Triaçilgliserol açil hidrolaz şeklinde adlandırılırlar. Lipazların benzersiz yapısal karakteristiklerinden dolayı son 10 yıl içinde lipaz enzimine olan ilgi ve araştırmalar artmıştır. Yüksek sıcaklık ve pH'da ve organik çözücülere karşı yüksek oranda kararlılık sağlarlar. Ayrıca kimyasal olarak ürünlerine karşı yüksek seçiciliğe sahiptir. Lipazın bu özellikleri, düşük sıcaklık ve basınç altında reaksiyonları kataliz etme imkanı sağlamaktadır (Paiva ve ark. 2000; Villeneuve ve ark. 2000; Yilmaz 2010).

Lipazların genel olarak etkin olduğu hidroliz reaksiyonu şu Şekilde gösterilebilir (Şekil 1.33).



Şekil 1.33. Lipazların katalitik aktivasyonu.

Lipazların yaygın kullanımı ve araştırmacıların dikkatini çekmesinin temel nedeni, mükemmel bir kimyasal, bölgesel ve çift yönlü seçiciliğe sahip olması ve fungi ve bakteriler gibi birçok mikroorganizma tarafından yüksek verimle üretildiğinden bol

miktarda kullanılabilir olmasıdır. Ayrıca bilimsel araştırmalar sonucunda çoğu lipazın kristal yapısının aydınlatılmış olması lipazlara olan ilgiyi arttırmıştır. Bütün bu özellikleri ile lipazlar, organik kimya sektöründe en yaygın kullanılan biyokatalizör olmasının temel nedenleridir (Kamini ve ark. 2000; Yilmaz 2010).

1.3.1. Lipazların Özellikleri

1.3.1.1. Optimum pH

Genellikle yüksek pH'da enzimler etkinliğini kaybederler. Enzimlerin en yüksek verimle çalıştığı pH değerine "optimum pH" denir. Pepsin ve arginaz gibi istisnai enzimler dışında çoğu enzimlerin optimum pH değeri 4,5-8,5 aralığındadır. Yüksek pH'da enzimi yapısında bulunan proteinleri bozulmasından dolayı, enzim etkinliği geri dönüşü olmaksızın düşer (Fennema 1985; Yilmaz 2010).

Çoğu lipazlar için optimum pH değeri 7,0 ile 8,0 arasında değişir. Mikrobiyolojik kaynaklı lipazlar ise pH 6,0-7,5 arasında yüksek kararlılığa sahiptirler (Fadıloglu 1996; Yilmaz 2010).

1.3.1.2. Optimum sıcaklık ve termal kararlılık

Genellikle lipazların maksimum aktivite gösterdiği sıcaklık değeri 30-40 ^{o}C'dir. Mantar ve bakteri gibi mikrobiyal lipazlar, hayvan ve bitki lipazlarına göre daha fazla kararlılık gösterirler (Fadıloglu 1996).

1.3.1.3. Lipazın aktivasyon ve inhibisyonu

İyonların ve reaktiflerin lipaz aktivitesine olan etkilerinin incelenmesi sonucu, ağır metal iyonlarının lipaz aktivitesini inhibe ettiği, alkali metal iyonlarının ise artırdığı görülmüştür. Lipaz aktivitesi üzerinde en etkili iyon Ca^{+2} olduğu görülmüştür (Öztürk 2001; Yilmaz 2010).

Co^{2+}, Ni^{2+}, Hg^{2+}, Sn^{2+},nin bazı tuzları, boronik asitler ve dietil-p-dinitrofenil fosfat gibi maddeler, lipaz aktivitesini inhibe eden maddelere örnek olarak verilebilir (Akoh ve Min 1998; Yilmaz 2010).

1.3.1.4. İzoelektrik nokta (pI)

İzoelektrik nokta net yükü sıfır olan noktadır. İzoelektrik noktaya yakın proteinler suda daha az çözünürken, izoelektrik noktadan uzaklaştıkça suda daha fazla çözünürler. Bunun nedeni ise izoelektrik noktadan uzaklaşıldıkça iyonlaşmış grupların sayısının artmasıdır. Proteinlerin çözünürlüğünü etkilediği için izoelektrik nokta öenmlidir (Whellcuright 1991; Yilmaz 2010).

1.3.2. Lipazların Kaynakları

Lipazlar daha çok bakteri, mantar ve maya hücrelerinde bulunmaktadır. Ayrıca domuz ve insan gibi memelilerde, kene otu tohumu ve kolza tohumu gibi yüksek yapılı bitkilerde de bulunmaktadır. biyoteknolojide mikrobiyal lipazlar daha çok ilgi görmektedir. Genellikle saflaştırılmış ticari enzimler tecih edilmektedir (Pandey ve ark. 1999; Yilmaz 2010).

Biyoteknolojide yaygın olarak kullanılan lipazlar şu Şekilde sınıflandırılabilir (Jaeger ve Reetz 1998; Yilmaz 2010).

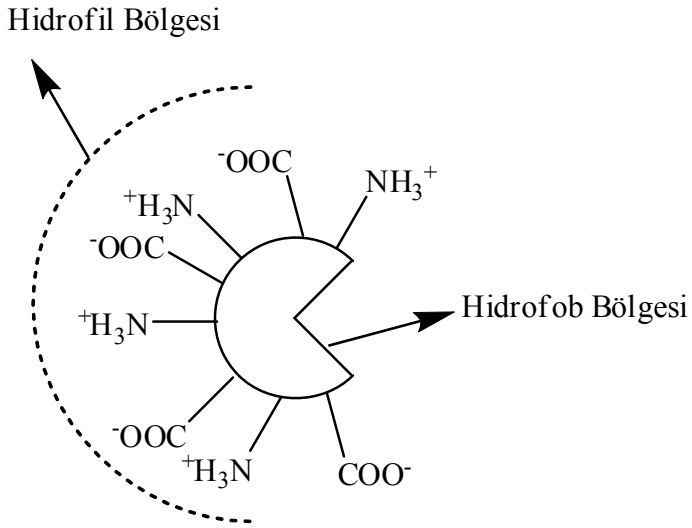
Mantar türü lipazlar: *Candida rugosa, Candida antarctica, Thermomyces lanuginosus ve Rhizomucor miehei.*

Bakteriyel türü lipazlar: *Burkholderia cepacia, Pseudomonas alcaligenes, Pseudomonas mendocina ve Chromobacterium viscosum*

1.3.2.1. *Candida rugosa* lipaz

Candida rugosa sporsuz, tek hücreli, patojenik olmayan bir yapıya sahip, yüksek verimli lipaz üretiminden dolayı ticari olarak kullanılan bir mikroorganizmadır. Serin, Glutamin ve Histidin üçlüsünden oluşmaktadır. 31 amino asitten oluşan bir kapağa sahip yapısı vardır. Kapağın iç yüzeyi hidrofobik, dış yüzeyi ise hidrofilik yapıdadır. Aktif bölge kapak tarafından kapatıldığı zaman ‘kapalı form’ enzimin aktivitesi düşerken, kapağın hidrofilik yüzeyle etkileşerek açılması durumunda ise ‘açık form’ enzimin aktivitesi önemli ölçüde artmaktadır (Benjamin ve Pandey 1998; Paiva ve ark. 2000; Yilmaz 2010).

Çevreye zarar vermeyen kimyasalların sentezi ve rezulasyonunda önemli bileşiklerin sentezinde ve sterospesifik hidrolizlerinde ve 7 maksimum optik saflıkta saf enantiyomerlerin sentezinde bu enzim oldukça ilgi görmüştür (Bianchi ve ark. 1992). Bundan başka son yıllarda bu enzim ile birçok amino asit türevi ve etkili karbonhidrat esterlerinin sentezi gerçekleştirilmiştir (Lalonde 1995; Park ve ark. 1996; Yilmaz 2010) (Şekil 1.34).



Şekil 1.34. Enzimin genel yapısı**.**

1.3.3. Lipazların Endüstriyel Kullanım Alanları

Lipazlar organizmalar içindeki lipidlerin biyodönüşümü için önem taşıyan enzimlerdir. Genellikle enzimlerin çoğu bikrobiyal kaynaklı olmasına rağmen bitkisel kaynaklı enzimlerde endüstride ticari amaçlı olarak kullanılmaktadır. Lipazlar endüstride geniş bir kullanım alanına sahiptir (Yilmaz 2012).

1.3.3.1. Deterjan endüstrisinde kullanımı

Enzimler deterjanlarda bulunması istenmeyen kimyasalların azaltılmasını sağlar ve enzimler zararlı bir kalıntı bırakmadan biyolojik olarak ayrıştırılabilirler. Ayrıca yıkama sıcaklığını daha düşük tutarak enerji tasarrufu sağlarlar. Günümüzde hidrolitik lipazların en önemli ticari uygulama alanı ev ve sanayideki çamaşır yıkama ile evde bulaşık yıkamak için kullanılan deterjanlara katılmalarıdır. Her sene yaklaşık 13 milyar ton deterjan üretilmekte ve bunun içine 1000 ton lipaz katılmaktadır. Deterjana suyun

eklenmesi ile birlikte deterjandaki lipaz, amilaz, selülaz ve proteaz enzimleri deterjandaki kimyasal bağların parçalanmasına katalizörlük yaparlar (Jaeger ve Reetz 1998; Pandey ve ark. 1999; Yilmaz 2012).

1.3.3.2. Gıda endüstrisinde kullanımı

Gıda üretiminde kimyasal prosesleri geliştirmek için enzim kullanımı tercih edilmektedir. Gıda endüstrisinde lipazların önemli bir kısmı bitkisel ve hayvansal yağların biyokatalizinde kullanılmaktadır (Macrae ve Staines 1994; Mcgee 1986).

Depolama sırasında lipit fraksiyonunda olan önemli bir değişiklik de bu ürünlerin karakteristik lezzeti için çok önemli olan serbest yağ asitleri tutularak lipazlar ile katalizlenmiş trigliseritlerin hidrolizidir (Langrand ve ark. 1990). Aksi takdirde trigliseritte bulunması istenilen fonksiyonel grubu, kontrollü ester yer değiştirme reaksiyonları ve esterifikasyon ile çıkarılabilir veya yer değiştirilebilir.

Unilever kuruluşu gliseritler ve yağların inter-esterfikasyonu gerçekleştirmek için bir seri patent elde etmiştir. Bu proseslerin amacı dondurma, suni krema, margarin vb. yağ bazlı gıdasal ürünleri ve emülsiyonda kullanmak için uygun yağların interesterifikasyonu yapmaktır (Benjamin ve Pandey 1998; Jaeger ve ark. 1994, Yilmaz 2012).

1.3.3.3. İlaç endüstrisinde kullanımı

Bir ilaç üreticisinin en büyük hedeflerinden biri hidroliz gibi sentetik reaksiyonlarla lipaz katalizli biyoaktif bileşikleri yapmaktır. Kimyasal yollarla üretilmeyen yeni ilaçların sentezinde kullanılır ve kiral bileşiklerin elde edilmesinde lipazlardan yararlanılır. Bunun yanında angiotensin-I dönüştürücü enzimler, antiinflamatuar ilaçlar ve β-blokerlerin üretiminde de lipazlar kullanılır (Kıerkels ve ark. 1990).

Etkili kinetik rezulasyon prosesi, biyokimyasal inhibitörler, ilaç ara ürünleri, antibiyotikler, sekonder alkoller ve alkoloidlerin enantiyospesifik sentezi için, potansiyel virucide carbovir (HIV'e karşı uygulanır) ve optik olarak aktif steroidal olmayan anti-inflamatör ilaçların ve daha birçok ilacın hazırlanmasında lipazlardan yararlanılır (Yilmaz 2012).

1.3.3.4. Organik sentezlerde kullanımı

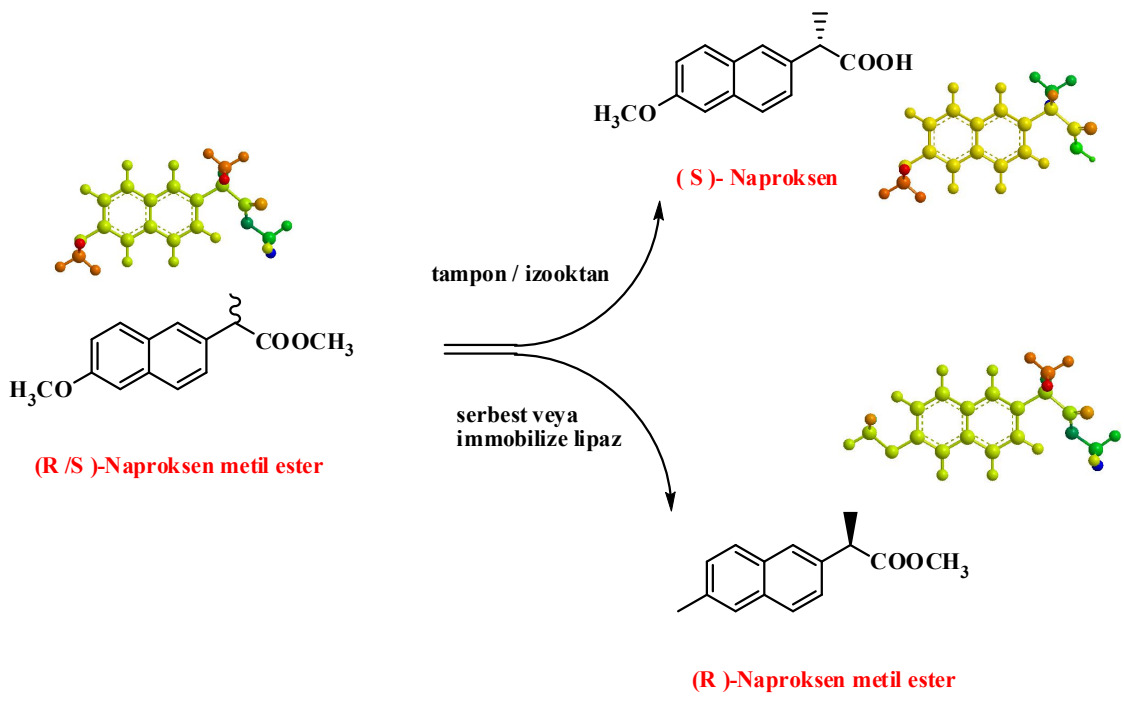
Organik sentez uygulamalarında katalizör olarak kullanılan lipazlar, substrat farklılıklarına göre etki göstermelerinden dolayı sentetik kimya için büyük avantaj sağlamaktadırlar (Ghosh ve ark. 1996). Lipazlar geniş bir çeşitlilik gösteren kemoselektif (kimyasal seçicilik), regioselektif ve stereoselektif transformasyonları katalizlemede kullanılmaktadır. Organik kimyada katalizör olarak kullanılan lipazların büyük çoğunluğu mikrobiyal kaynaklıdır (Sharma ve ark. 2001; Yilmaz 2012).

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Lipazların rasemik aromatik esterlerin enantiyoseçimli olarak hidrolizinde kullanılabileceği bilinmektedir. Bu amaçla en yaygın kullanılan enzim *Candida Rugoza* lipazdır. Lipazın bu tip hidroliz tepkimlerinde aromatik esterlerin enantiyoseçimli olarak s-asit türevine dönüştürdüğü bilinmektedir. Literatürde bu tip hidroliz tepkimelerine bazı tuzlar, crown eterler ve siklodekstrinler gibi bileşikler ilave edildiğinde enantiyomerik oranın (E) ve enantiyomerik fazlalığın (% ee) arttığı gözlenmiştir.

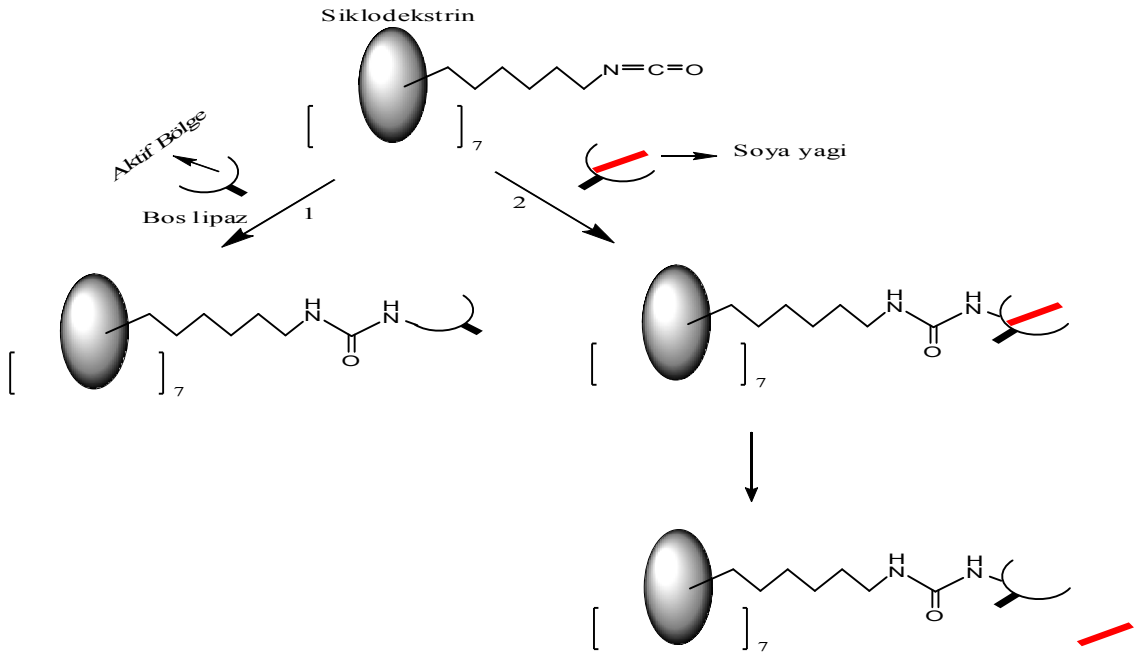
Lipaz enzimi ilk olarak 1956 yılında H. Brandenberger tarafından kovalent bağlama yöntemi ile iyon değiştirici reçine üzerine immobilize edilmiş (Iwai ve ark. 1964), ancak lipazın ester hidrolizinde veya ester sentezinde kullanılması ile ilgili uygulamaya yönelik çalışmalar Iwai ve arkadaşlarının (1964)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

Son yıllarda yaptıkları bir çalışmada (Sahin ve ark. 2009), amino ve karboksil grubu taşıyan kaliks[4, 6 ve 8]aren bileşikleri sentezlenerek lipaz immobilizasyonunda kullanmışlar ve rasemik naproksen metil esterinin hidrolizin çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Enantiyoseçimliliğin yapılan çalışmalarda kaliksaren türevlerinin önemli ölçüde görülmüş (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. (R/S)-Naproksen metil ester.

Bir başka çalışmada (Yilmaz ve ark. 2009), *Candida Rugosa* lipaz enzimine immobiize edilmeden önce 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 aktivitesinin yanında daha kararlı bir yapıya sahip olduğunu bildirmişlerdir (Şekil 2.2).

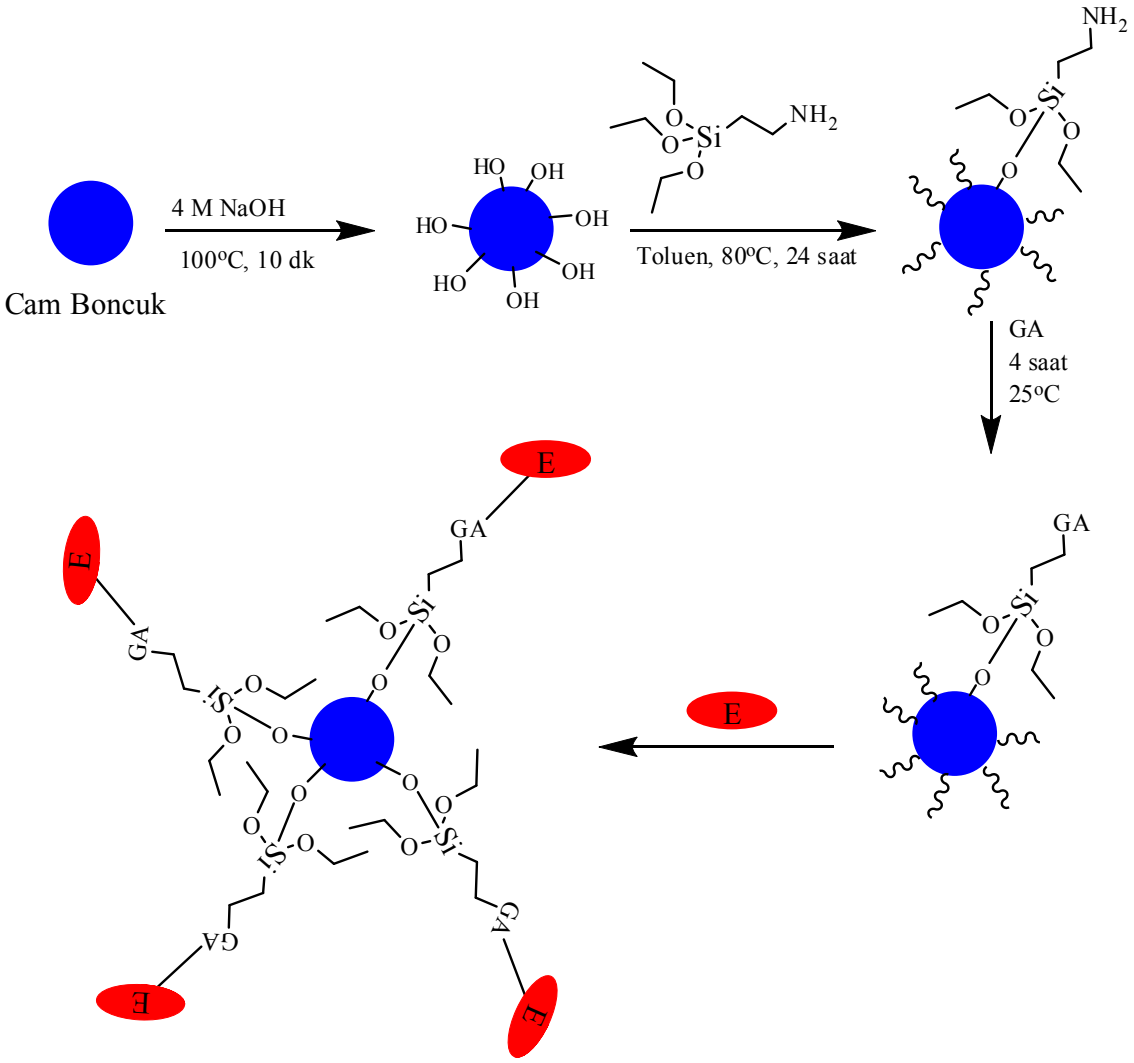


Şekil 2.2. Candida rugoza lipazın soya yağı ile etkileşimi.

Sporopollen ile yapılan bir çalışmada (Tutar ve ark. 2009), *Candida Rugosa* lipazı immobilize edilerek farklı pH ve sıcaklıktaki aktivitesi incelenmiştir. İmmobilize edilmeyen lipaz ve immobilize lipazın optimum pH'ının sırayla 6.0 ve 7.0 olduğu bildirilmiştir. Aynı zamanda immobilize edilmeyen lipaz ve immobilize lipazın sıcaklığa bağlı aktivitelerinin de sırasıyla 35^{o}C ve 40^{o}C olduğu bildirilmiştir.

Son yıllarda yapılan bir çalışmada (Yilmaz ve ark. 2011), cam boncuk ve aminopropil grubu taşıyan silika ile etkileştirilerek elde edilen aminopropil cam boncukları glutaraldehitle tepkimeye sokulduktan sonra serbest dialdehit grubu bulunduran ve enzim immobilizasyonunda kullanılabilecek yeni bir yapı sentezlemişlerdir. Sentezlenen bu meteryaller rasemik naproksen metil esterinin hidrolize çalışmalarında kullanılmıştır. S-naproksen için %98 ee değeri ile immobilize

lipazın (E>400) mükemmel enantiyoseçimliliğe sahip olduğunu görmüşlerdir (Şekil 2.3).

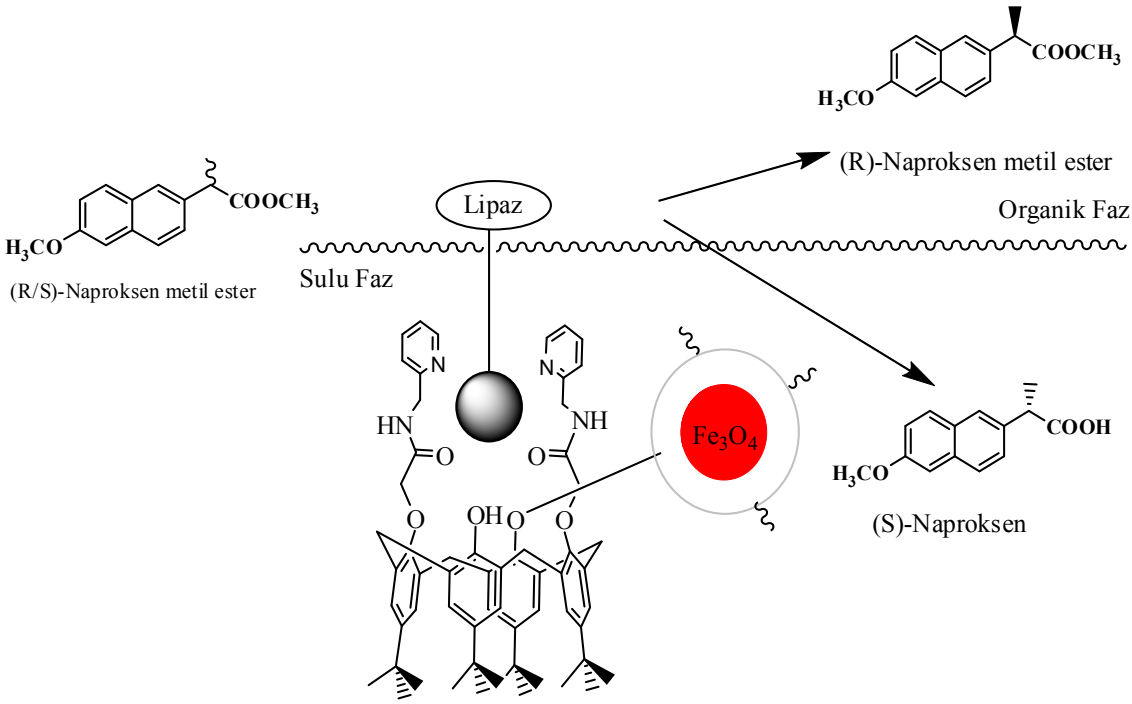


Şekil 2.3. Cam boncuk yüzeyine immobilizasyonun gösterimi.

Son yıllarda yapılan bir başka çalışmada (Ozyilmaz ve Sayin 2013), selüloz ve çitosan biopolimerleri üzerine uygun kaliksaren türevini immobilize ederek yeni biopolimerleri sentezlemişlerdir. *Candida Rugosa* lipaz enzimini sol-jel metodunu kullanarak tetraetoksisilan (TEOS) ve oktiltrietoksisilan (OTES) varlığında yeni biopolimere immobilize etmişlerdir. Bu yapılar, Rasemik naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolize çalışmalarında kullanılmış ve yüksek oranda (E=300) enantiyoseçimliliği gözlemlemişlerdir.

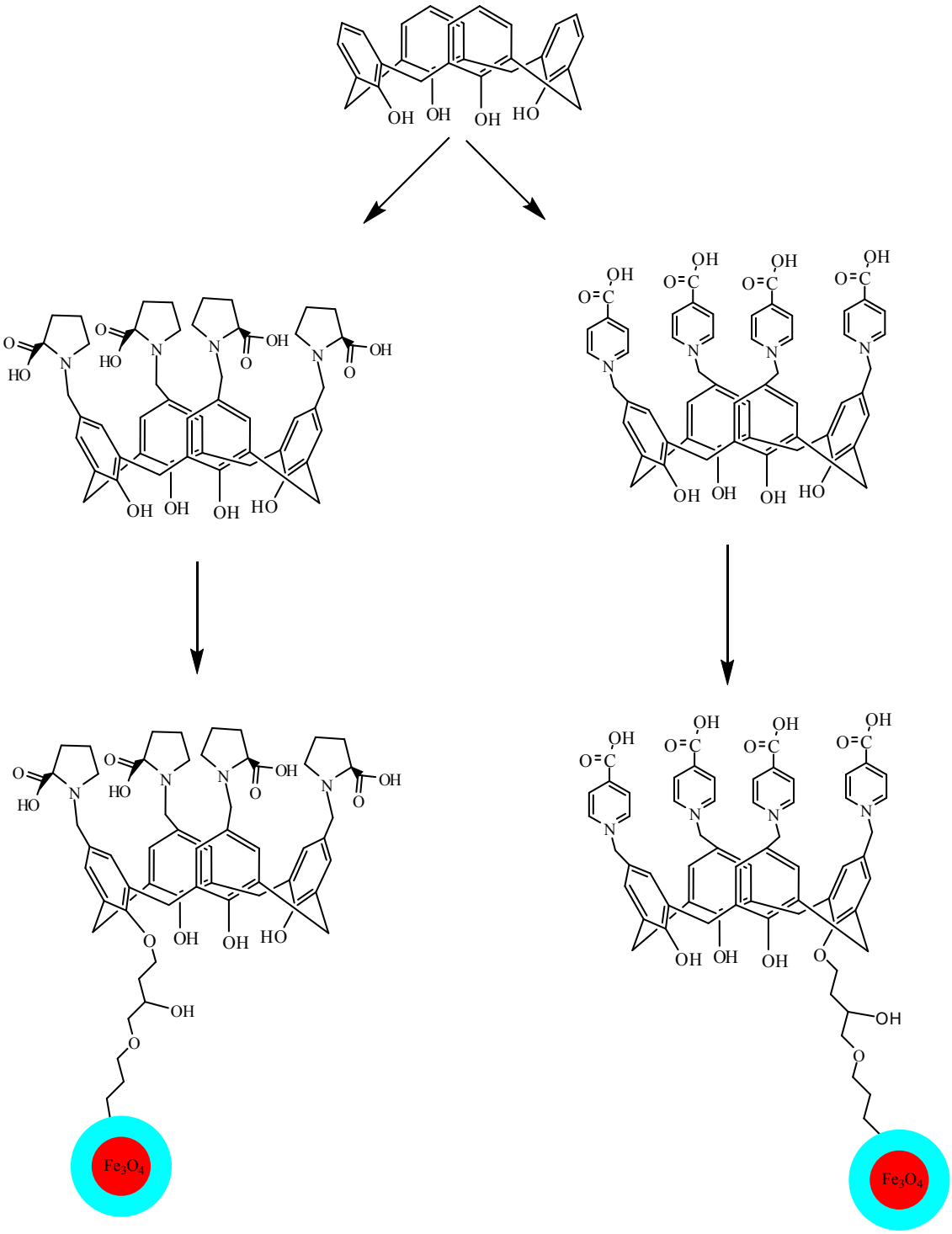
Bir başka çalışmada (Ozyilmaz ve Sayin 2013), manyetik Fe_3O_4 nanopartükülüne bağlı kaliks[4]aren'in dipridil türevini, *Candida Rugosa* lipaz ile immobilize

etmişlerdir. İmmobilize lipaz ile *p*-nitro fenil palmitatın (*p*-NPP) hidrolizi ve rasemik naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi çalışılmıştır. İmmobilize lipazın katalitik akitivitelerinin ve enantiyoseçiciliğinin (E>400) yüksek olduğu gözlenmiştir (Şekil 2.4).



Şekil 2.4. Naproksen metil esterinin immobilize lipaz ile etkileştirilmesi.

Kaliksarenler kullanılarak son yıllarda yapılan bir başka çalışmada (Akceylan ve ark. 2013), kaliks[4]aren karboksilik asit türevleri manyetik nanopartüküle immobilize edilmiştir. İmmobilize lipaz, *p*-nitro fenil palmitatın (*p*-NPP) hidrolizi ve naproksen metil esterinin enantiyoseçici olarak hidrolizi çalışılmış ve immobilize lipazların kaliksarenlerin kullanılmadığı serbest enzime göre mükemmel bir enantiyoseçimlilik gösterdiği gözlemlenmiştir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. kaliks[4]aren türevlerinin manyetik Fe_3O_4 nanopartükülüne bağlanması.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

3.1. Enstürümental Teknikler

Kullanılan kimyasal maddeler ve çözücüler; Merck, Fluka, Aldrich firmalarından temin edilmiştir. Yine kullanılan başlangıç maddeleri laboratuvar şartlarında sentezlenmiştir. Erime noktası Büchi B-545 marka erime noktası tayin cihazı ile yapıldı. ^{1}H NMR spektrumları $CDCl_3$ içinde Varian 400 MHz spectrofotometre ile yapıldı. NMR spektrumunda kimyasal kayma değerleri (δ) ppm cinsinden belirtildi. Sigma 2-16 PK santifürüj cihazı ile santrifüj işlemleri yapıldı. GFL MARKA İnkibatör ile ekstraksiyon işlemleri yapıldı. IR spektrumları KBr diskleri halinde Perkin Elmer 1605 FTIR spektrofotometresinden alındı. UV-vis. Ölçümlerin de Shimadzu 160A UV-visible spectrofotometresi kullanıldı. Tüm sulu çözeltiler, Millipore Milli-Q Plus su arıtma cihazıyla saflaştırılan saf su ile hazırlanmıştır. HPLC analizleri Agilent 1100 Series cihazıyla yapılmıştır.

Analitik ITK'lar silika jel tabakasıyla (SiO2, Merck 60 F254) kaplanmış alüminyum plakalar kullanılarak yapıldı. Kolon Kromatografisi çalışmalarında silika jel 60 (Merck, tanecik büyüklüğü 0.040-0.063 mm, 230-240 mesh) kullanıldı.

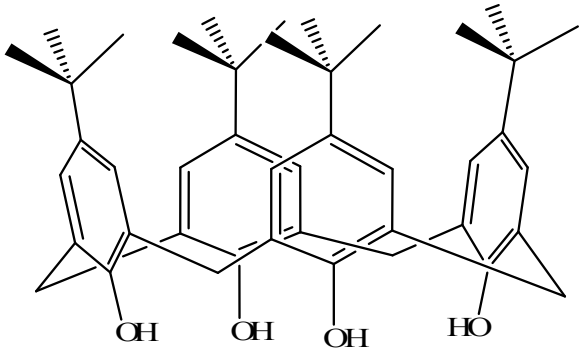
3.2. Deneysel Bölüm

Bu çalışmada sentezlenen bileşiklerden bazıları literatürdeki metotlara göre hazırlanmış diğerleri ise yeni geliştirilen metotlara göre sentezlenmiştir. Aşağıda bu çalışmada kullanılan bileşiklerin genel sentetik prosedürleri verilmiştir.

3.2.1. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28-tetrahidroksikaliks[4]aren (1) (Gutsche 1990)

1 L'lik bir balona, 100 g (0.665 mol) *p-ter*-bütilfenol, 62.3 ml (0.83 mol) %37'lik formaldehit ve 1.2 g (0.03 mol) NaOH alınır. Reaksiyon karışımı banyonun (yağ banyosu) sıcaklığı 110-120^{o}C de sabit tutularak ksilol cihazı takılı bir geri soğutucu sistemi altında azot gazı geçirilerek 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 800-1000 mL difenil eter ile

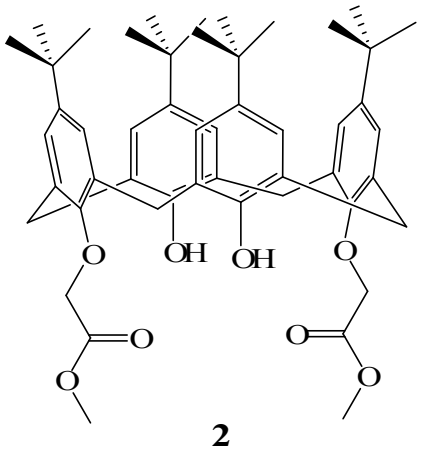
süspanse edilip 1 saat oda sıcaklığında karıştırılır, azot girişi ve bir ksilol cihazı takılır, balon ısıtılarak suyun ortamdan uzaklaştırılması ve karışımın berraklaşması sağlanır. Su çıkışı tamamlandığında karışım bir geri soğutucu takılarak 1.5-2 saat kaynatılır. Daha sonra reaksiyon karışımı oda sıcaklığına soğutulur, 1 L 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. Kurutulan 66.5 g (%62) ham ürün toluenden yeniden kristallendirilerek 61.6 g parlak, beyaz kristal yapıda, E.N: 344^{o}C (Lit., 344-346^{o}C) olan başlangıç maddesi **1** elde edilir. ^{1}H-NMR ($CDCl_3$): δ 1.20 (s, 36H, Bu^t), 3.45 (d, 4H, $ArCH_2Ar$), 4.25 (d, 4H, $ArCH_2Ar$), 7.05 (s, 8H, ArH), 10.35 (s, 4H, OH).



1

3.2.2. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-dimetoksikarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren (2) (Collins 1991)

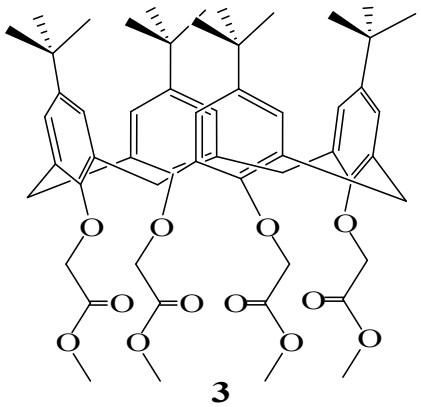
250 mL'lik iki boyunlu balona 2.5 g (3.8 mmol) *p-ter*-bütilkaliks[4]aren (**1**), 0.63 g (4.6 mmol) K_2CO_3 ve 8.4 mmol metil bromasetat 100 mL aseton içerisinde 24 saat kaynatılarak karıştırıldı. Reaksiyon karışımı TLC ve IR spektrofotometresinde takip edilerek 1750 cm^{-1} de bulunan ester karbonil bandının oluşumu gözlendi. Soğutulan karışım süzüldü, süzüntü distillendi. 200 mL DCM'de çözülerek ayırma hunisine alınır. Organik faz nötral pH'a kadar saf su ile yıkanır, $MgSO_4$ ile kurutuldu, süzüldü, süzüntü distillendi. Kalan ürün metanol içerisinde kristallendirildi. Verim: 2.05 g, (%73); E.n: 202-207^{o}C. FTIR:1750 cm^{-1} (C=O). ^{1}H NMR ($CDCl_3$): δ 0.97 (s, 18H, Bu^t), 1.24 (s, 18H, Bu^t), 3.35 (d, 4H, *J*= 12.6 Hz, $ArCH_2Ar$), 3.85(s, 6H, OCH_3), 4.45 (d, 4H, *J*= 12.6 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.78 (s, 4H, OCH_2CO), 6.85 (s, 4H, ArH), 7.05 (s, 4H, ArH), 7.10 (s, 2H, OH) (EK-1).



2

3.2.3. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28 tetrametoksikarbonilmetoksi kaliks[4]aren (3) (McKewey 1985)

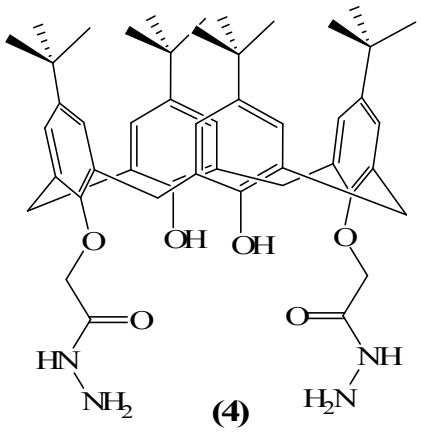
250 mL'lik iki boyunlu balona 2.5 g (3.8 mmol) *p-ter*-bütilkaliks[4]aren (**1**), 21.4 g (154.7 mmol) K_2CO_3, 5.2 g (31.6 mmol) ve (154.7 mmol) metil bromasetat 100 mL asetonitril içerisinde 24 saat kaynatılarak karıştırıldı. Reaksiyon karışımı TLC ve FTIR spektrofotometresinde takip edilerek 1750 cm^{-1} de bulunan ester karbonil bandının oluşumu gözlendi. Soğutulan karışım süzüldü, süzüntü distillendi. 100 mL Eter'de çözülerek ayırma hunisine alınır. Organik faz nötral pH'a kadar saf su ile yıkanır, $MgSO_4$ ile kurutuldu, süzüldü, süzüntü distillendi. Kalan ürün DCM, metanolde çöktürüldü. Verim: 1,75 g, (%48.6); E.n: 210-213^oC. IR:1750 cm^{-1} (C=O) . ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.07 (s, 36H, Bu^t), 3.17 (d, 8H, *J*=12.9 Hz, $ArCH_2Ar$), 3.7 (s, 12H, OCH_3), 4.81 (s, 8H, OCH_2CO), 6.7 (s, 8H, ArH) (EK-2).



3

3.2.4. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,27-dihidrazinamitkarbonilmetoksi-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren (4) (Alekseeva 2000)

100 mL'lik tek boyunlu bir balon içerisine 1.5 g (2.08 mmol) **2** nolu bileşik toluen:metanol (20 mL:15 mL) içerisinde çözüldü. Üzerine (24.6 mmol) hidrazinmonohidrat ilave edildi ve 8 saat geri soğutucu altında kaynatıldı. reaksiyon İTK'den takip edilerek çıkış maddesinin ürüne dönüşümü izlendi (hekzan:etilasetat, 1:2). Ayrıca reaksiyon IR spektroskopisinde 1750 cm^{-1} deki ester karbonil bandının 1684 cm^{-1} deki amid karbonil bandına dönüşümü ile reaksiyonun tamamlandığı anlaşıldı. Reaksiyon sonunda çözücü distillendi. Geriye kalan katı ham ürün saf su ile nötral pH'a kadar yıkandı ve etüvde kurutuldu. Son olarak (DCM:metanol) ile çöktürüldü. Verim: 0.72 g, (%48); E.n: 330-333^oC FTIR:1684 cm-1 (N-C=O). ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 0.97 (s, 18H, Bu^t), 1.24 (s, 18H, Bu^t), 2.15 (s, 4H, -N-NH_2) 3.35 (d, 4H, *J*= 12.6 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.45 (d, 4H, *J*= 12.6 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.78 (s, 4H, OCH_2CO), 6.85 (s, 4H, ArH), 7.05 (s, 4H, ArH), 7.60 (s, 2H, OH), 9.6 (s, 2H, -NH-N) (EK-3).

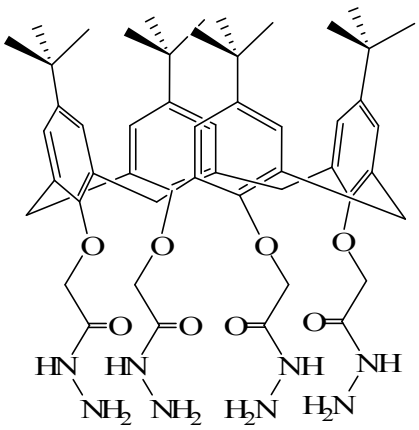


(4)

3.2.5. 5,11,17,23-Tetra-*ter*-bütil-25,26,27,28-tetrahidrazinamitkarbonilmetoksi-kaliks[4]aren (5) (Jun Han 1997)

100 mL'lik tek boyunlu bir balon içerisine 1 g (1.06 mmol) **3** nolu bileşik toluen:metanol (20 mL:15 mL) içerisinde çözüldü. Üzerine (17.07 mmol) hidrazinmonohidrat ilave edildi ve 10 saat geri soğutucu altında kaynatıldı. Reaksiyon İTK'den takip edilerek çıkış maddesinin ürüne dönüşümü izlendi (hekzan:etilasetat, 1:2). Ayrıca reaksiyon IR spektroskopisinde 1750 cm^{-1} deki ester karbonil bandının

1678 cm^{-1} deki amid karbonil bandına dönüşümü ile reaksiyonun tamamlandığı anlaşıldı. Reaksiyon sonunda çözücü distillendi. Geriye kalan katı ham ürün saf su ile nötral pH'a kadar yıkandı ve etüvde kurutuldu. Daha sonra eter:hekzan çözücü karışımı ile etkileştirilerek bileşik **5** saf olarak elde edildi. Verim: 0.8 g (%80); E.n: >350^oC. FTIR:1678 cm^{-1} (N-C=O). ^1H NMR ($CDCl_3$): δ 1.07 (s, 36H, Bu^t), 3.2 (s, 8H, -N-NH_2), 4.2 (d, 8H, *J*=12.8 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.4 (s, 8H, OCH_2CO), 6.8 (s, 8H, ArH), 9.3 (s, 4H, -NH-N) (EK-5).

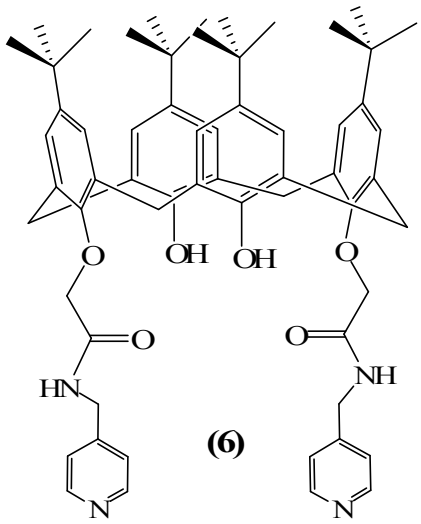


(5)

3.2.6. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-di(4-aminometil) pridin amid-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren (6)

100 mL'lik tek boyunlu bir balon içerisine 1 g (1.2 mmol) **2** nolu bileşik DCM:metanol (15 mL:10 mL) içerisinde çözüldü. Üzerine (21.7 mmol) pridin ilave edildi ve 48 saat oda sıcaklığında karıştırıldı. Reaksiyon İTK'den takip edilerek çıkış maddesinin ürüne dönüşümü izlendi (hekzan:etilasetat, 1:2). Ayrıca reaksiyon IR spektroskopisinde 1750 cm^{-1} deki ester karbonil bandının 1681 cm^{-1} deki amid karbonil bandına dönüşümü ile reaksiyonun tamamlandığı anlaşıldı. Reaksiyon sonunda 60^oC'de çözücü distillendi. Geriye kalan katı ham ürün saf su ile nötral pH'a kadar yıkandı ve etüvde kurutuldu. Son olarak metanol ile kristallendirildi. Verim: 0.75 g, (%63); E.n: 241-243^oC. FTIR:1681 cm^{-1} (N-C=O). ^1H NMR (400 MHz $CDCl_3$): δ 1.03 (18H, s, tBu), 1.25 (18H, s, tBu), 3.37 (4H, d, *J*=13.3 Hz, ArCH2Ar), 3.90 (4H, d, *J*=13.3 Hz, $ArCH_2Ar$), 4.48 (4H, s, OCH_2), 4.56 (4H, d, *J*=4.9 Hz, Ar-CH2–NH), 6.90 (4H, s,

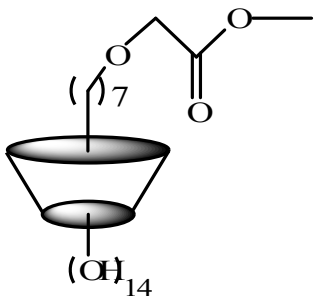
ArH), 7.00 (4H, s, ArH), 7.23 (4H, d, *J*=4.6 Hz, PyH), 7.55 (2H, s, OH), 8.45 (4H, d, *J*=4.5 Hz, PyH), 9.36 (2H, t, *J*=5.0 Hz, NH) (EK-4).



(6)

3.2.7. β-Siklodekstrin-heptametil asetat (7)

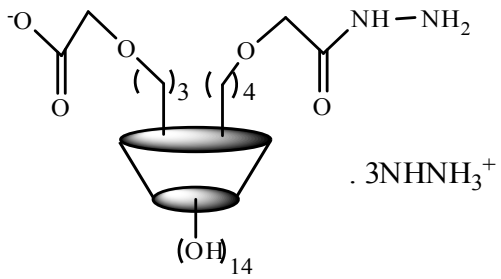
100 mL'lik iki boyulu bir balonda, 1 g (0.8 mmol) β-siklodekstrin 20 mL dimetilformamid (DMF)'de çözüldü. 0.2 g (9.2 mmol) NaH ilave edilerek 60^{o}C'de N_2 atmosferinde 10 dakika karıştırıldı. Aynı sıcaklıkta (7.6 mmol) metil bromasetat ilave edilerek 7 saat karıştırıldı. Reaksiyon karışımı TLC ve FTIR spektrofotometresinde takip edilerek 1743 cm^{-1} de bulunan ester karbonil bandının oluşumu gözlendi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra oda sıcaklığına kadar soğutuldu ve aseton ile yıkanarak sıvı kısım dekante edildi. Katı kısım 50^{o}C'de vakumlu etüvde kurutuldu. Verim: 1.03 g, (%72); E.N: >350^{o}C FTIR:1655 cm^{-1} (C=O). ^{1}H NMR (400 MHz DMSO): δ 3.35 (21H, s, OCH_3), 3.55-3.69 (42H, m), 4.11 (14H, d, *J*=4.3 Hz $ArCH_2O$), 4.47 (14H, s, OCH_2CO), 4.83 (7H, q, ArH), 5.71 (14H, m, OH) (EK-6).



(7)

3.2.8. β-siklodekstrin-tetrahidrazin-trimetil asetat (8)

100 mL'lik tek boyunlu bir balona 0.76 g (0.46 mmol) **9** ilave edilerek toluen:metanol (20:15)'de çözündü. Üzerine (13.9 mmol) hidrazinmonohidrat ($N_2H_4.H_2O$) ilave edilerek 10 saat geri soğutucu altında kaynatıldı. Reaksiyon IR spektroskopisinde 1658 cm^{-1} deki amid karbonil bandından dönüşümü ile reaksiyonun tamamlandığı anlaşıldı. Reaksiyon sonunda 60°C'de çözücü distillendi. Aseton ile yıkandı ve katı kısım 50°C'de vakumlu etüvde kurutuldu. Verim: 0.62 g, (%81); E: >350°C. FTIR:1658 cm^{-1} (C=O), 958-1071 cm^{-1} (C-O-C). ^{1}H NMR (400 MHz DMSO): δ 2.15 (8H, s, -NH_2), 3.60(51H, m, CH_3, OH), 4.15 (7H, d, *J*=0.9 Hz), 4.46 (14H, d,Ar-CH_2-O), 4.80 (14H, s, O-CH_2-CO), 7.10 (7H, t, *J*=6.8 Hz, OH), 9.18 (4H, s, -NH) (EK-7).

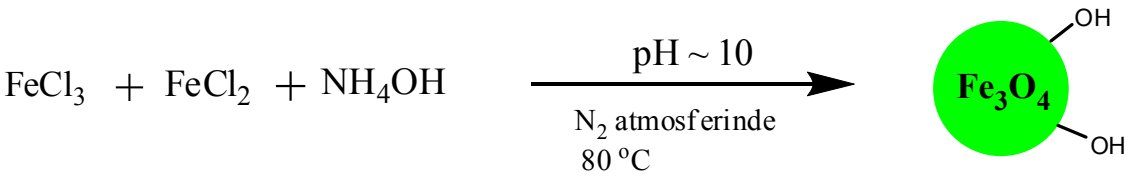


(8)

3.2.9. F_3O_4 Nanopartükülünün Sentezi (Zeng 2005)

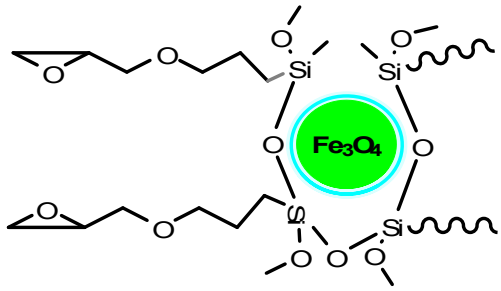
9.95 g (50 mmol) $FeCl_2$ ve 23.65 g (87.5 mmol) $FeCl_3$ alınarak ayrı ayrı 50 mL saf su ile çözeltileri hazırlandı. 250 mL'lik iki boyunlu balon içerisine hazırlanan çözeltiler ilave edilerek 50°C sıcaklıkta ve N_2 gazı altında 30 dakika karıştırıldı. pH (10-11) olana kadar NH_3 ilave edildi ve 80°C'de 1 saat karıştırıldı. Reaksiyon IR

spektroskopisinde 568 cm^{-1} deki Fe-O bandının oluşumu gözlemlendi. Son olarak etanol ile yıkandı ve kurutuldu



3.2.10. [3-(2,3-Epoksipropoksi)-propil]-trimetoksi silan ile modifiye edilmiş manyetik Fe_3O_4 nanopartüküllerin sentezi (EPPTMS-MN) (Sayin 2010)

İçinde 60 mL etanol bulunan 250 mL'lik tek boyunlu bir balona 1.0 g Fe_3O_4 nanopartükülü ilave edilerek 1 saat karıştırıldı. Üzerine 12 mL NH_4OH eklenerek homojenliği sağlamak için 10 dakika karıştırıldı. Daha sonra 6 mL EPPTMS ([3-(2,3-epoksipropoksi)propil]trimetoksi silan) eklenerek 50°C'de 8 saat karıştırıldı. Reaksiyon IR spektroskopisinde 1097 cm^{-1} (si-O), 563 cm^{-1} (Fe-O) bandlarının oluşumu gözlendi. Sıvı kısım dekante edildi. katı kısım ise önce metanolle daha sonra nötral pH'a kadar saf su ile yıkandı. Son olarak oda sıcaklığında bulunan vakum altında kurutuldu.

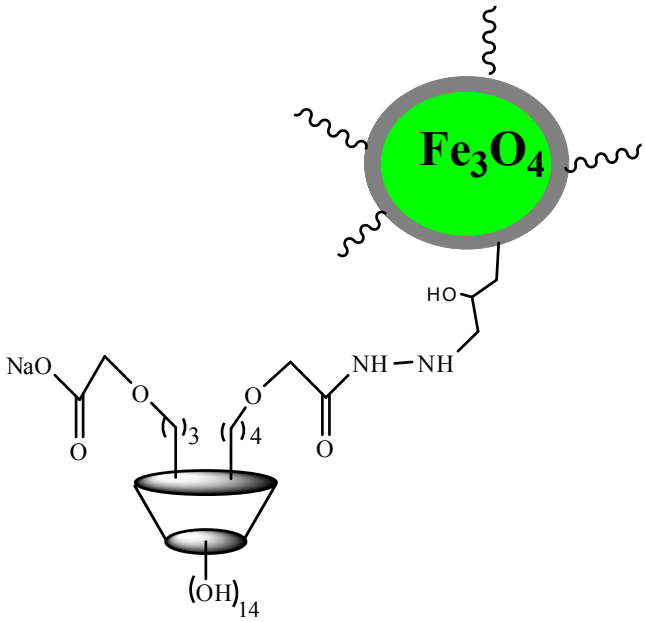


EPPTMS-MN

3.2.11. β-siklodekstrin-heptahidrazin bileşiğinin Fe_3O_4-manyetik nanopartiküllere immobilizayonu (CD-Amd-MNP).

50 mL tek boyunlu bir balona 1.5 g EPPTMS-MN THF:DMF (30:20)'de 10 dakika oda sıcaklığında karıştırıldı. 0.6 g (0.36 mmol) β-siklodekstrin-tetrahidrazin-trimetil asetat (**8**) DMSO ile çözülerek reaksiyon karışımına ilave edilerek 48 saat geri soğutucu altında kaynatıldı. Reaksiyon IR spektroskopisinde 556 cm^{-1} deki Fe-O bandının oluşumu gözlendi. Reaksiyon tamamlandıktan sonra immobilize edilen

manyetik nanopartiküller **CD-Amd-MNP** bir mıknatıs yardımı ile reaksiyon karışımından alınarak sırasıyla etanol ve su ile yıkandı. Manyetik nanopartiküller 50 ^{o}C'de vakumlu etüvde kurutuldu. Verim: 1.2 g. FTIR :562 cm^{-1} (Fe-O).

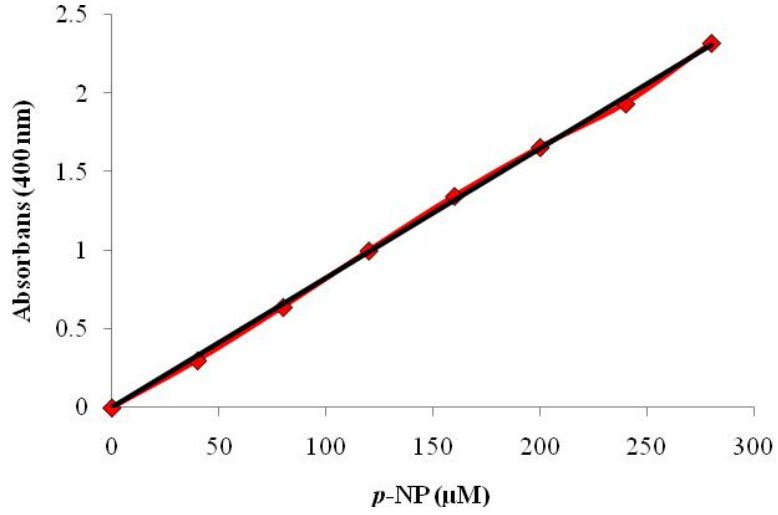


CD-Amd-MNP

3.3. Lipaz Aktivitesi ve Protein Tayini

3.3.1. Lipaz aktivitesinin tayini

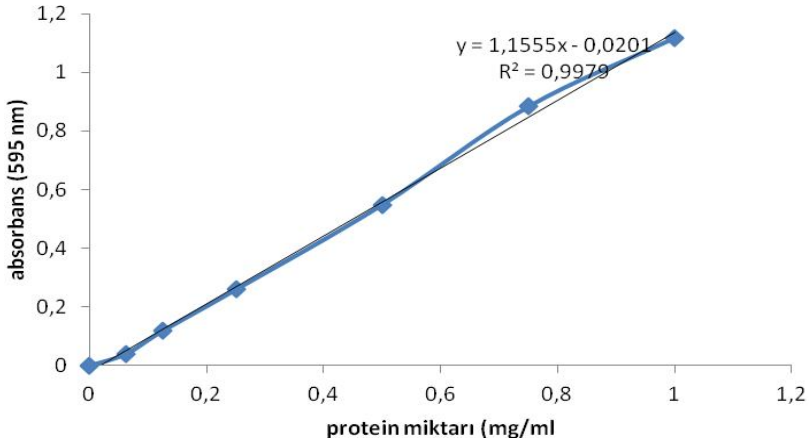
1 mL fosfat tampon çözeltisi (pH=7) içerisinde belli miktarlarda bulunan serbest lipaz ve immobilize lipaz karışımına 1 mL p-NPP (p-nitrofenil palmitat) çözeltisiyle birlikte ilave edilerek 5 dk karıştırılır. Daha sonra reaksiyon 2 mL 0.5 N Na_2CO_3 ile durdurulur. Oluşan çözelti 10 dk santrifüj edilir ve aktivite UV-visible spektrofotometresinde 410 nm dalga boyundaki absorbansından bulunur. Bu absorbans değeri standart olarak çizilen *p*-NP (mol/litre) kalibrasyon grafiğinde (Şekil 3.12) yerine konularak elde edilen *p*-NP'ın miktarı belirlenir. Lipazın 1 Unit (U)'i, dakikada 1 µmol *p*-NPP hidroliz etmek için gerekli olan lipaz miktarıdır. Bu verilerden faydalanarak serbest ve immobilize lipazların aktiviteleri belirlenir.



Şekil 3.12. Standart p-NP (p-nitrofenol)- absorbans grafiği (λmax=410 nm).

3.3.2. Protein tayini (Bradford 1976)

Serbest ve immobilize lipaz içerisindeki protein miktarı Bradford metoduna göre tayin edildi. Bunun için standart olarak Bovine 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 UV-visible spektrofotometresinde ölçüldü. Standart olarak, absorbans-protein miktarı (mg/ml) grafiği çizildi (Şekil 3.13) ve yapılan bütün protein çalışmalarında bu grafik referans alındı.



Şekil 3.13. Standart protein miktarı (mg/ml)- absorbans grafiği (λmax =595 nm).

3.3.3. Optimum pH tayini

Serbest ve immobilize enzim, farklı pH değerlerinde (pH 4,0-9,0) 50 mM sodyum fosfat tamponunda 1 saat inkübe edildikten sonra standart ölçüm koşullarında (pH: 7, 30^{o}C), aktivite ölçümleri gerçekleştirilir.

3.3.4. Optimum sıcaklık tayini

Serbest ve immobilize enzimin aktifliğine, sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile serbest ve immobilize enzim farklı sıcaklıklarda (25-60°C) fosfat tamponu içinde 20 dk karıştırılıp soğutulur. Daha sonra aktivite tayin etme metoduna göre ölçümler pH=7'de gerçekleştirilir.

3.3.5. Tekrar kullanılabilirlik

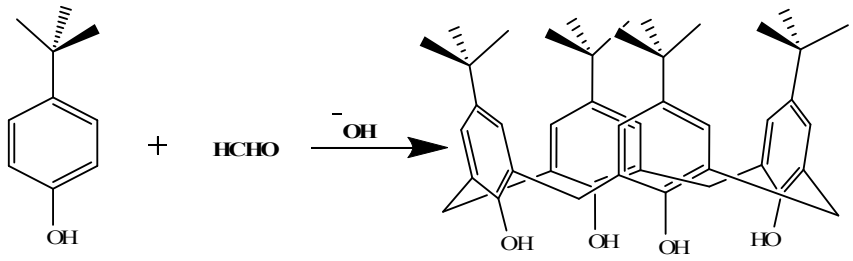
İmmobilize enzimlerin endüstriyel kullanımları açısından önemli bir parametredir. Sporopollenin de immobilize edilen lipaz standart ölçüm koşullarında (pH:7, 30^{o}C), arka arkaya 5 kez p-PNP (*p*-nitrofenol) hidrolizinde kullanılır ve aktivitesindeki değişim gözlenir. İmmobilize lipazın tekrar kullanım sayısını ölçmek amacı ile kısım 4.2.1'de belirtilen metod kullanılarak arka arkaya gerçekleştirilen deneylerle aktiflikleri tayin edilir.

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

4.1. Kaliks[4]aren ve β-Siklodekstrin Türevlerinin Sentezi

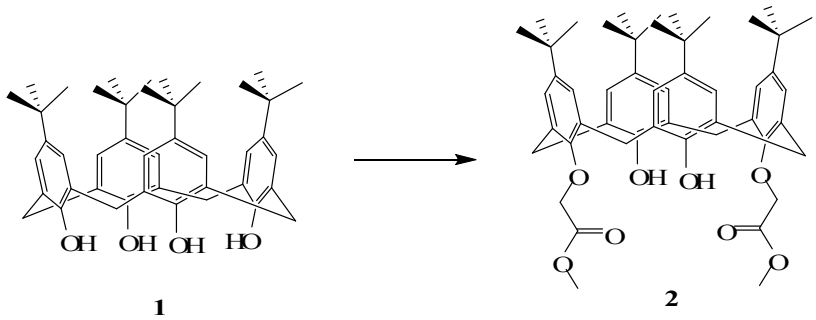
Supramoleküler kimyanın üçüncü kuşak moleküllerini oluşturan kaliksarenlerin önemi konuk-konak (host-guest) kimya alanında her geçen gün artmaktadır. Bununla birlikte kaliksarenler, laboratuar, çevre ve endüstri işlemlerinde kullanılmak üzere katyon, anyon ve nötral molekül taşıma özelliklerine sahip, kolay elde edilebilen değişik fonksiyonel gruplar taşıyan türevlerine dönüştürülebilmektedir. Bu bileşikler supramoleküler kimyanın birinci ve ikinci kuşağını oluşturan taç eterlere, siklodekstrinler ve kriptantlara göre daha kolay ve daha yüksek verimle sentezlenebilmekte ve sınırsız bir Şekilde fonksiyonlandırılabilmektedir. Bizim bu çalışmamızın amacı amin bazlı kaliks[4]aren ve β-siklodekstrin türevlerinin sentezlenmesi ve bunların rasemik naproksen metil esterinin enantiyoseçimli tepkimelerinde kullanılmasıdır.

Başlangıç maddesi olarak literatürde sentez metodu verilen 5,11,17,23- tetra-*ter*-bütilkaliks[4]aren (**1)** sentezini yapıldı (Gutsche 1990). *p-ter*-bütilkaliks[4]aren (**1**), bilinen bazik ortamdaki fenol ile formaldehitin kondensasyonu ile elde edildi. Sentezlenen *p-ter*-bütilkaliks[4]aren (**1**) bileşiğinin koni komformasyonunda olduğu ^{1}H-NMR spektrumu AB spin sisteminde 3.45 ppm ve 4.25 ppm'de görülen bir çift dublet piklerinden anlaşıldı.



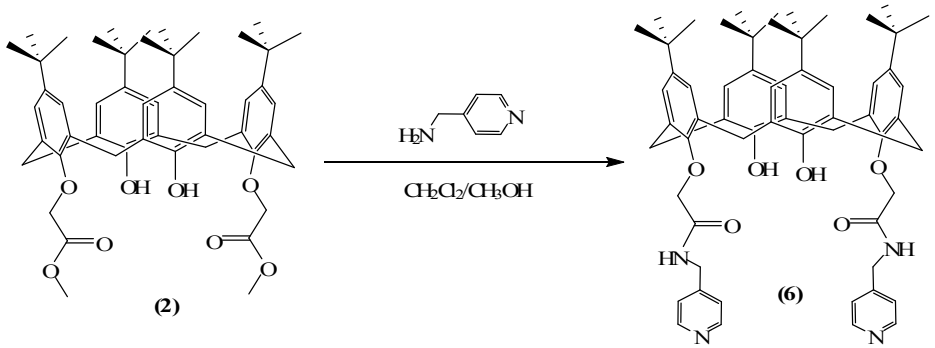
Bu bileşiğin (*p-ter*-bütilkaliks[4]arenin) farklı amit türevlerini sentezlemek amacıyla, *p-ter*-bütilkaliks[4]aren ile metilbrom asetat uygun miktarlarda alınarak K_2CO_3 varlığında etkileştirilerek *p-ter*-bütilkaliks[4]aren diesteri sentezlendi. Bileşik **2'** nin ^{1}H-NMR spektrumuna bakıldığında metil ester grubuna ait 3.85 ppm'de görülen singlet pikin 2 adet (OCH_3) grubuna, 4.75 ppm'de görülen singlet piki ise 2 adet (OCH_2CO) protonlarına ait olduğu gözlendi. FTIR spektrumunda ise 1750 cm^{-1} de ester

karboniline ait band gözlendi. Elde edilen tüm bu veriler reaksiyonun gerçekleştiğini gösterir (Collins 1991).

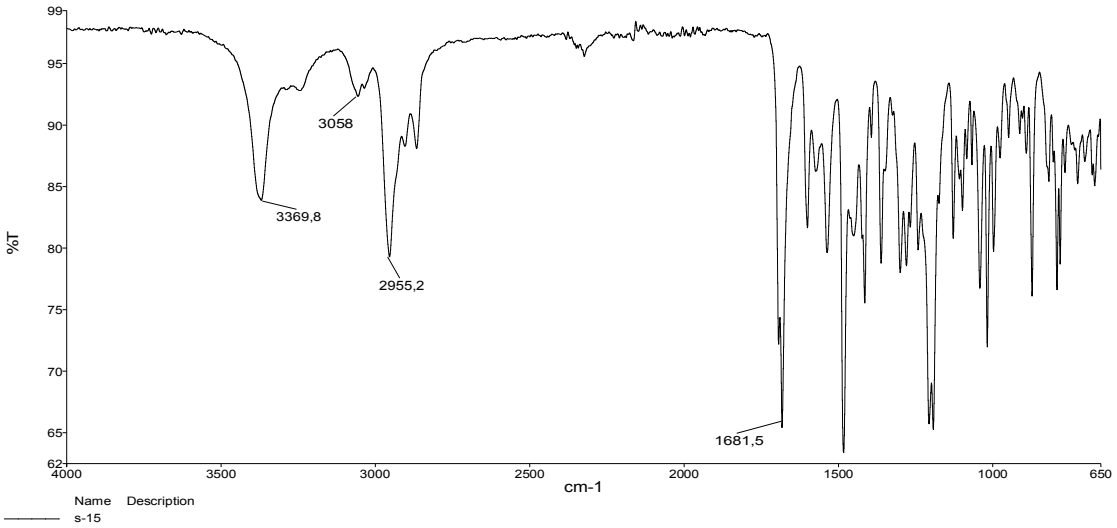


1 **2**

Bir sonraki basamakta elde edilen *p-ter*-bütilkaliks[4]aren diester türevi **(2)** primer bir amin olan 4-aminometil pridin ve hidrazinmonohidrat ile ayrı ayrı etkileştirilerek *p-ter*-bütilkaliks[4]arenin amid türevleri sentezlendi. Bu bileşiklerden 4-aminometil piridin CH_2Cl_2:MeOH (15 mL:10 mL) ortamında 48 saat süre boyunca tepkimeye sokularak p-terbütilkaliks[4]arenin diamid türevine dönüştüğü İTK (hekzan:Etilasetat, 1:2), FTIR ve ^{1}H-NMR spektrumundan gözlemlendi. FTIR spektrumunda 1750 cm^{-1} deki ester karbonil bandının 1681 cm^{-1} amid karbonil bandına dönüşümü ile reaksiyonun tamamlandığı anlaşıldı (Şekil 4.1). ^{1}H-NMR spektrumunda metil ester grubuna ait 3.85 ppm'de görülen 2 adet (OCH_3) singlet pikin kaybolduğu, 9.36 ppm'de 2 adet triplet (-OCNH-CH_2-) amid grubu ve 8.45 ppm'de 4 adet dublet (PyH) ait piklerin oluşumu gözlendi (EK-1). 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-di(4-aminometil) pridin amid-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren (**6**) % 63 verimle elde edildi.

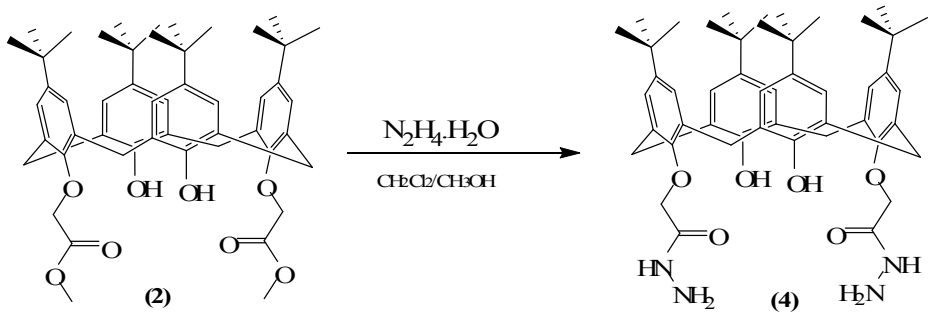


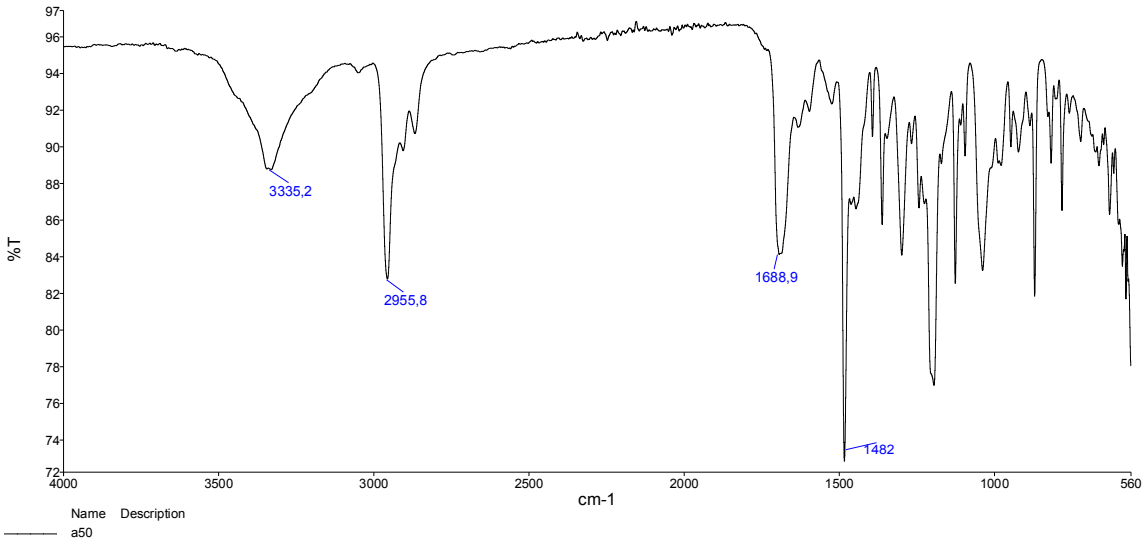
(2) **(6)**



Şekil 4.1. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-di(4-aminometil) pridin amid-26,28-dihidroksi-kaliks[4]aren.

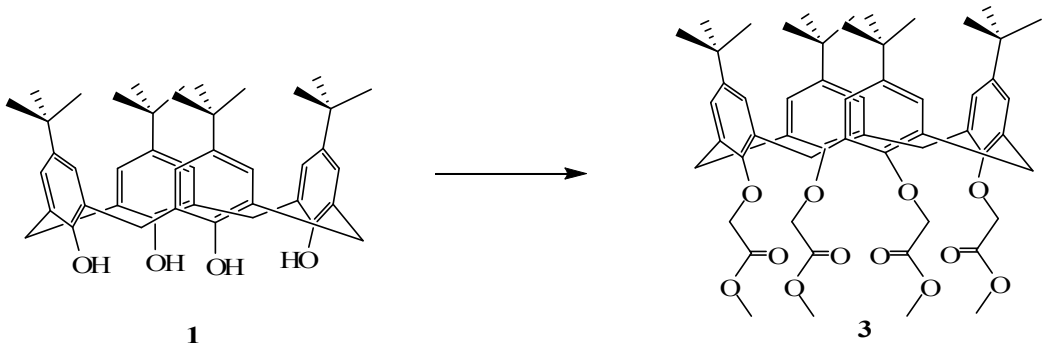
Diğer bileşik için *p-ter*-bütilkaliks[4]aren, hidrazinmonohidrat ($N_2H_4.H_2O$) ile toluen:MeOH (20 mL:15 mL) ortamında 8 saat sonunda reaksiyonun gerçekleşerek *p-ter*-bütilkaliks[4]arenin diamid türevine dönüştüğü İTK (hekzan:etilasetat, 1:2), FTIR ve ^{1}H-NMR spektrumundan gözlemlendi. FTIR spektrumunda 1750 cm^{-1} deki ester karbonil bandının 1684 cm^{-1} amid karbonil bandına dönüşümü ile reaksiyonun tamamlandığı anlaşıldı (Şekil 4.2). ^{1}H-NMR spektrumunda metil ester grubuna ait 3.85 ppm'de görülen 2 adet (OCH_3) singlet pikin kaybolduğu, 2.15 ppm'de 2 adet singlet (-N-NH_2) amin ve 9.6 ppm'de 2 adet singlet (-NH-N) amid grubuna ait piklerin oluşumu gözlendi (EK-3). 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,27-dihidrazinamitkarbonilmetoksi-26,28 dihidroksi-kaliks[4]aren (**4**) %48 verimle elde edildi (Alekseeva 2000).





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

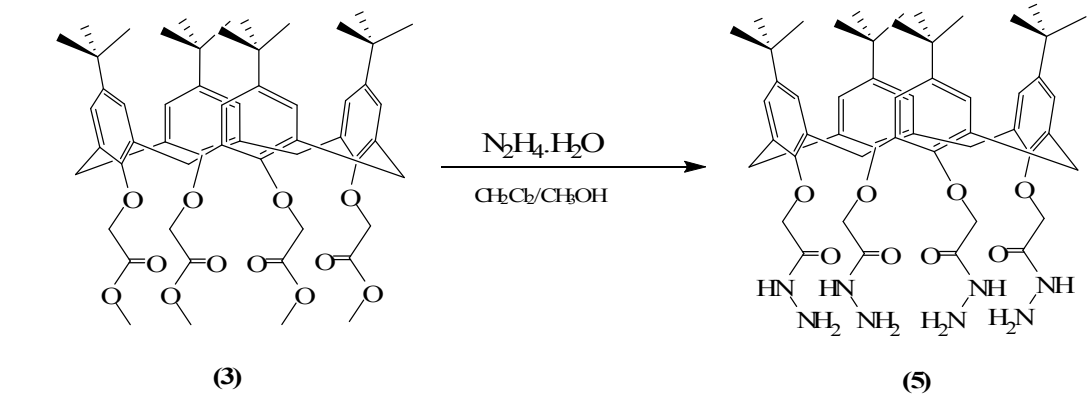
p-ter-bütilkaliks[4]aren tetraester **(3)** türevini sentezlemek için, *p-ter*-bütilkaliks[4]aren **(1)** ile metilbrom asetat K_2CO_3 ve KI varlığında etkinleştirilerek reaksiyon gerçekleştirildi. Bileşik **3'** ün FTIR spektrumunda 1750 cm^{-1} de ester karboniline ait band gözlendi. Ayrıca ^{1}H-NMR spektrumuna metil ester grubuna ait 3.7 ppm'de görülen singlet pikin 4 adet (OCH_3) grubuna ait olduğu gözlendi (EK-2). Elde edilen tüm bu veriler reaksiyonun gerçekleştiğini gösterir (McKerwey 1985).

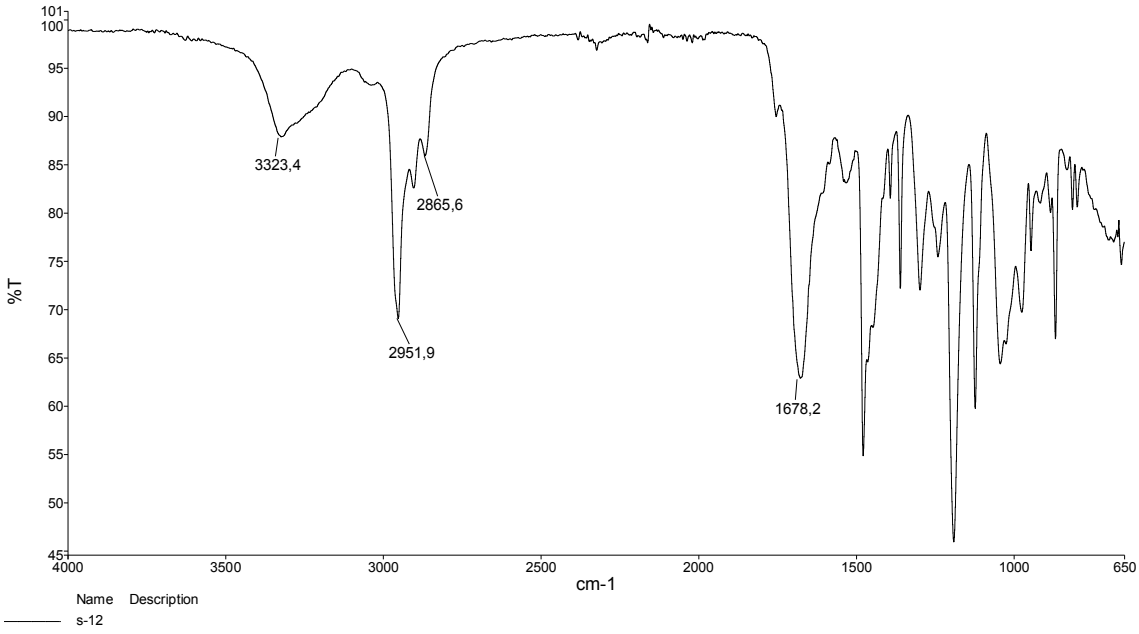


1 **3**

Bu bileşik (3) hidrazinmonohidrat ($N_2H_4.H_2O$) ile CH_2Cl_2:MeOH (20 mL:15 mL) ortamında 10 saat süre ile etkileştirilerek *p-ter*-bütilkaliks[4]arenin tetraamid türevine dönüştüğü İTK (hekzan:Etilasetat, 1:2), FTIR ve ^{1}H-NMR spektrumundan gözlemlendi. FTIR spektrumunda 1750 cm^{-1} deki ester karbonil bandının kaybolarak 1678 cm^{-1} amid karbonil bandına dönüşümü gözlendi (Şekil 4.3). ^{1}H-NMR spektrumunda metil ester grubuna ait 3.7 ppm'de görülen 4 adet (OCH_3) singlet pikin kaybolduğu, 3.2 ppm'de 4 adet singlet (-N-NH_2) amin ve 9.3 ppm'de 4 adet singlet (-

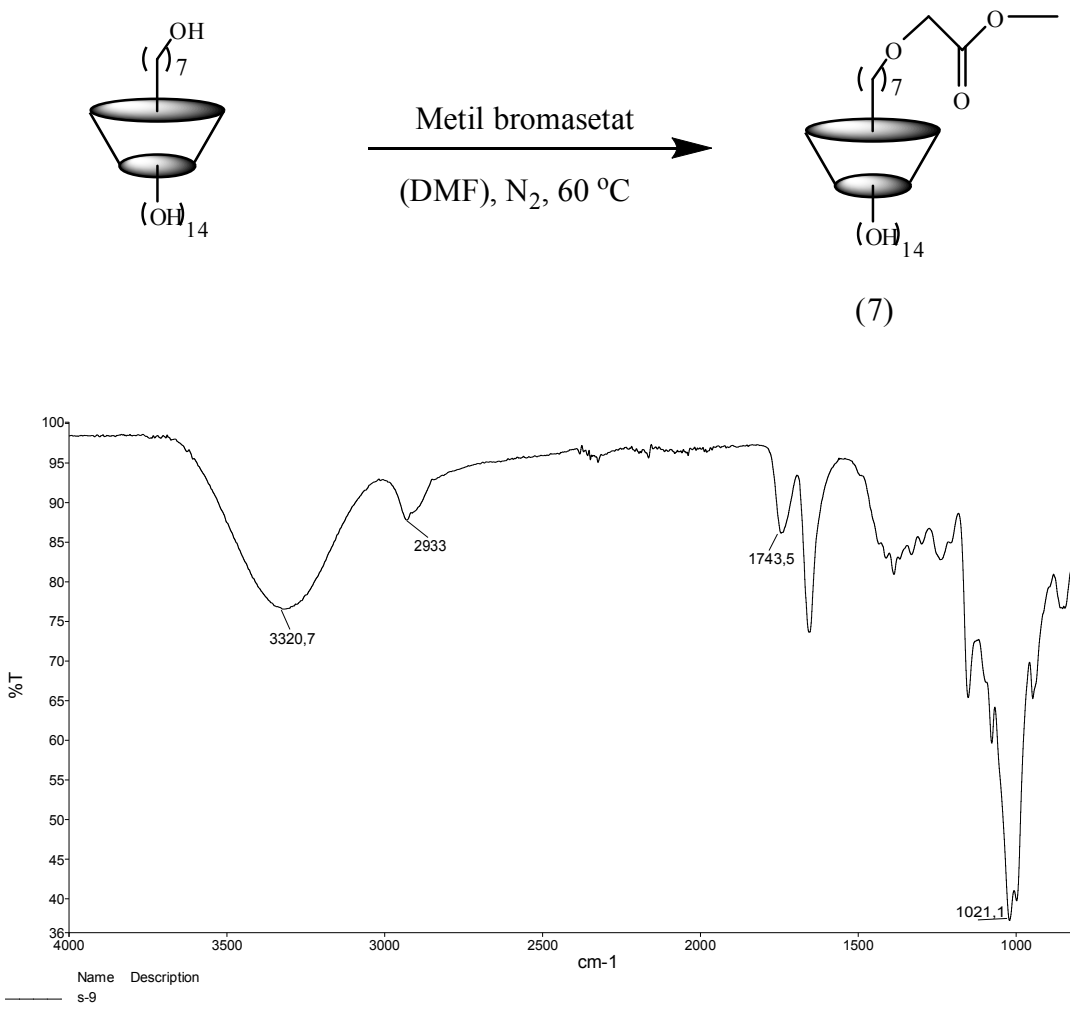
NH-N) amid grubuna ait piklerin oluşumu gözlendi (EK-5). 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,26,27,28-tetrahidrazinamitkarbonilmetoksi-kaliks[4]aren (**5**) %80 verimle elde edildi (Jun Han 1997).





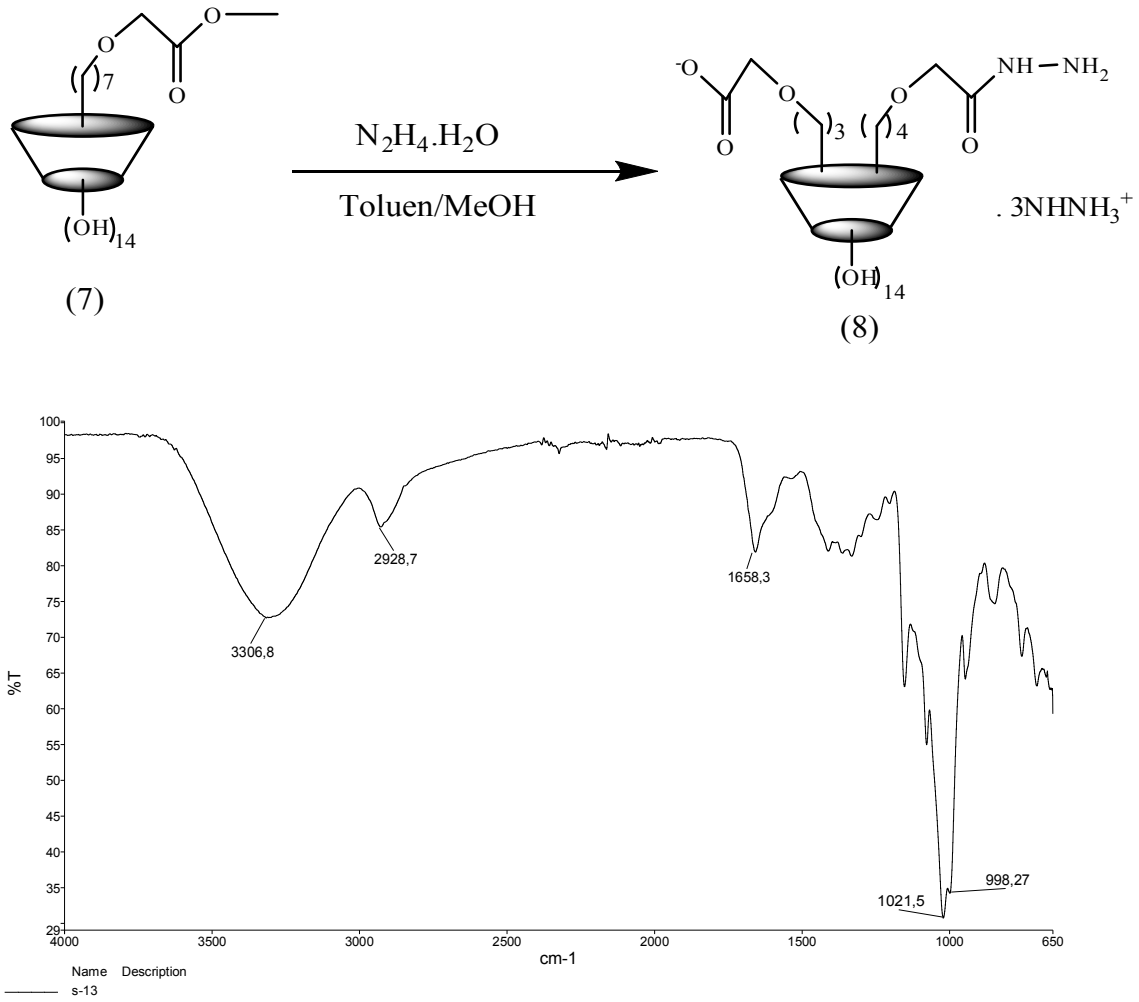
Şekil 4.3. 5,11,17,23-Tetra-ter-bütil-25,26,27,28-tetrahidrazinamitkarbonilmetoksi-kaliks[4]aren.

β-siklodekstrin-heptametil asetat türevini sentezlemek amacı ile β-siklodekstrin dimetilformamid (DMF) içerisinde NaH varlığında metil bromasetat ilave edilerek 7 saat karıştırıldı. β-siklodekstrin-heptametil asetata dönüştüğü **(7)** FTIR ve ^{1}H-NMR spektrumundan anlaşıldı. FTIR spektrofotometresinde takip edilerek 1743 cm^{-1} de bulunan ester karbonil bandının oluşumu ile reaksiyonun tamamlandığı anlaşıldı (Şekil 4.4). ^{1}H-NMR spektrumunda metil ester grubuna ait 3.35 ppm'de görülen singlet pikin 7 adet (OCH_3) protonlarına ait olduğu gözlendi (EK-6).



Şekil 4.4. β-siklodekstrin-heptametil asetat.

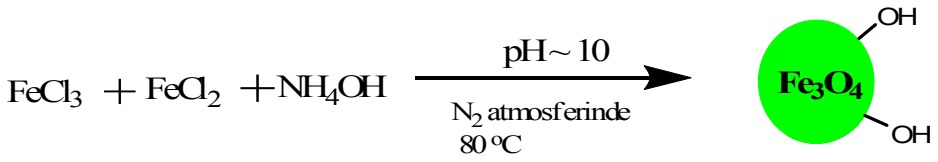
β-siklodekstrin-heptametil asetat türevi (**7)** toluen:MeOH (20:15) içerisinde hidrazinmonohidrat ($N_2H_4.H_2O$) ilave edilerek 10 saat geri soğutucu altında kaynatıldı. β-siklodekstrin-tetrahidrazine-trimetil asetata dönüştüğü **(8)** FTIR ve ^{1}H-NMR spektrumundan anlaşıldı. Reaksiyon IR spektroskopisinde 1658 cm^{-1} deki amid karbonil bandına dönüşümü ile reaksiyonun tamamlandığı anlaşıldı (Şekil 4.5). Ancak yapılan ^{1}H-NMR çalışmasında 3.35 ppm'deki 4 adetsinglet (OCH_3) metil gruplarına ait piklerin kaybolduğu ve 2.15 ppm'de 8 adet singlet(-N-NH_2) amin ve 9.18 ppm'de 4 adet (-NH-N) amid grubuna ait pikler gözlenmesi 4 adet hidrazin grubunun bağlandığı ve 3 adet esterin hidroliz olarak karboksilat şeklinde bulunduğu anlaşıldı (EK-7).



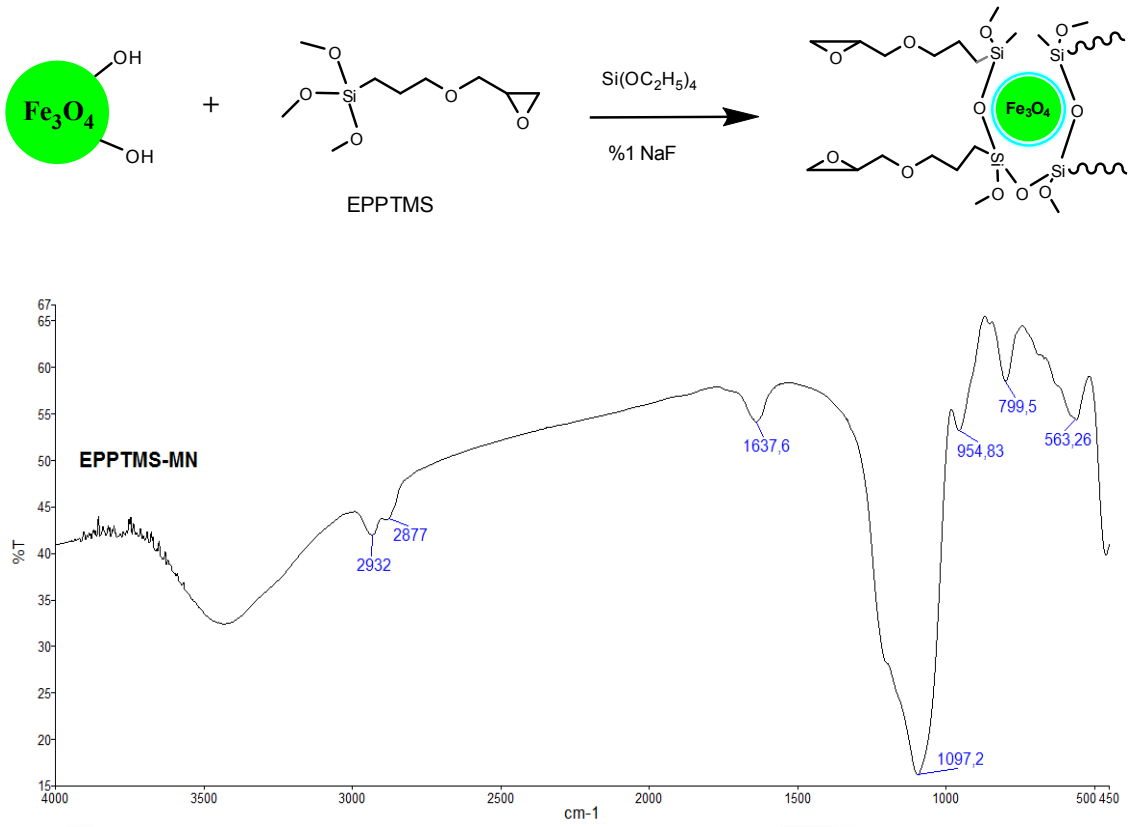
Şekil 4.5. β-siklodekstrin-tetrahidrazin-trimetil asetat.

İyi bir molekül taşıyıcı olan β-siklodektrinlerin manyetik nanopartiküle kovalent bağla bağlanması ayırma işlemlerinde büyük kolaylıklar sağlayacaktır. Silika ile modifiye edilmiş nanopartiküller, elektrostatik ve hidrojen bağı yapabilecek uygun fonksiyonel gruplar taşıdığından, lipaz enzimininin içerdiği serbest amino grupları ile çok noktadan etkileşerek immobilize olacaktır. Bu çok noktadan bağlanma hem enzimin kararlılığını artıracak hem de aktif merkezlerin zarar görmesini engelleyecektir.

Fe_3O_4 nanopartüküllerini sentezlemek amacı ile uygun koşullarda $FeCl_2$ ve $FeCl_3$ ile 50 ^oC'de 30 dakika karıştırıldı. Daha sonra pH 10-11 olana kadar NH_3 ilave edildi ve 80 ^oC'de 1 saat karıştırıldı Fe_3O_4 nanopartükülü hazırlandı **(9)**. Hazırlanan Fe_3O_4 nanopartüküllerinin IR spektroskopisinde 568 cm^{-1} deki Fe-O bandının oluşumu gözlemlendi.

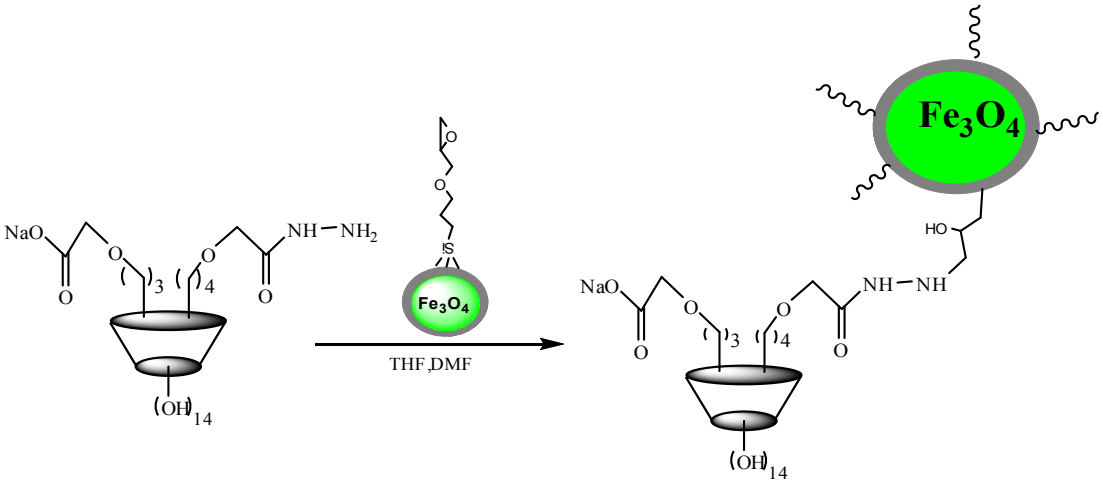


Daha sonra Fe_3O_4 nanopartükülünün etrafını silika kaplamak amacıyla **(10)**, etanol içerisinde Fe_3O_4 ilave edilerek 1 saat karıştırıldı üzerine NH_4OH ilave edildi ve homojen hale gelene kadar karıştırıldı. Daha sonra [3-(2,3-epoksipropoksi)propil]trimetoksi silan (EPPTMS) eklenerek 50°C'de 8 saat karıştırıldı ve silika kaplı Fe_3O_4 nanopartükül elde edildi. Reaksiyon IR spektroskopisinde 1097 cm^{-1} (si-O), 563 cm^{-1} (Fe-O) bandlarının oluşumu ile reaksiyonun tamamlandığı anlaşıldı (Şekil 4.6).

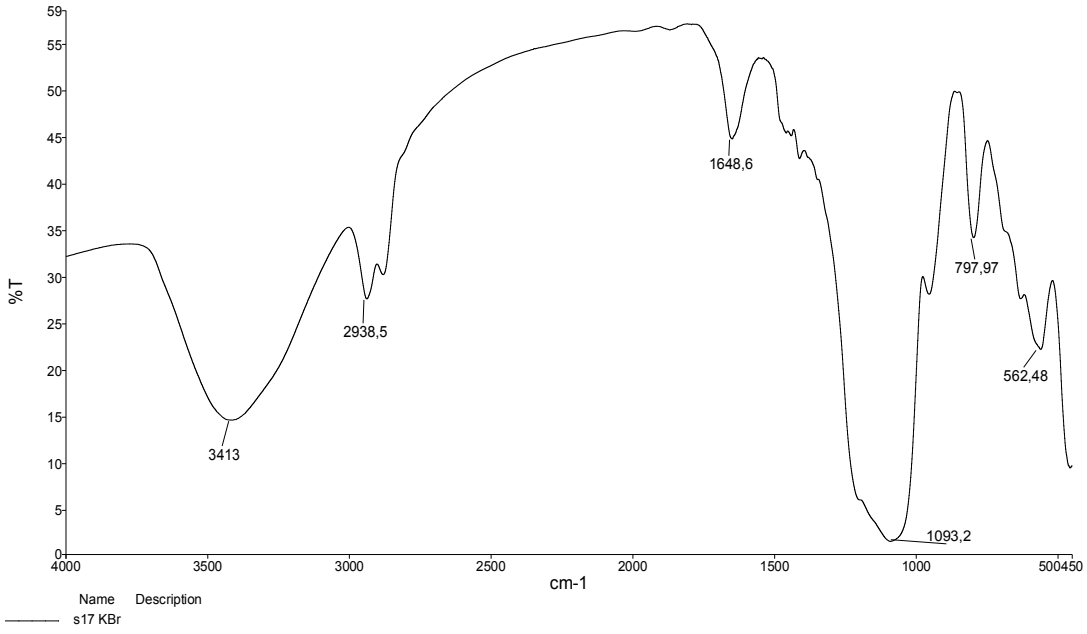


Şekil 4.6. [3-(2,3-Epoksipropoksi)-propil]-trimetoksi silan ile modifiye edilmiş manyetik Fe_3O_4.

β-siklodekstrin-tetrahidrazin-trimetil asetat, Fe_3O_4 nanopartükülüne bağlamak amacıyla, EPPTMS-MN THF:DMF (30:20) içerisinde 10 dakika oda sıcaklığında karıştırıldı ve β-siklodekstrin-tetrahidrazin-trimetil asetat DMSO ile çözülerek reaksiyon karışımına ilave edildi ve 48 saat geri soğutucu altında kaynatıldı. Reaksiyon IR spektroskopisinde gözlemlenerek 562 Fe-O cm^{-1} bandının oluşumu gözlendi (Şekil 4.7).



(8) **CD-Amd-MNP**



Şekil 4.7. CD-Amd-MNP.

Nanopartikül **CD-Amd-MNP**'nin termal özellikleri termogravimetrik analiz kullanılarak araştırıldı. TGA analizinden Fe_3O_4 üzerine absorbe olan su molekülleri **(Fe_3O_4-EPPTMS)** 150-250 ^oC arasında % 1.7 oranında uzaklaştığı gözlendi. Diğer yandan **CD-Amd-MNP**'nin β-CD birimi 350-700 ^oC sıcaklık aralığında %18 oranında ayrıldığı tespit edildi (EK-8).

Elementel analiz sonucuna bakıldığında. 1 gr Fe_3O_4 yüzeyinde 0.91 mmol/g ligantın bağlı olduğu anlaşılmıştır. Başlangıçta azot (N) bulunmazken, bileşik ile etkileşimi sonucunda Azot (N)'un varlığı anlaşıldı ve bağlanma miktarı hesaplandı (Çizelge 4.1).

Çizelge 4.1. **CD-Amd-MNP** elementel analiz sonucu.

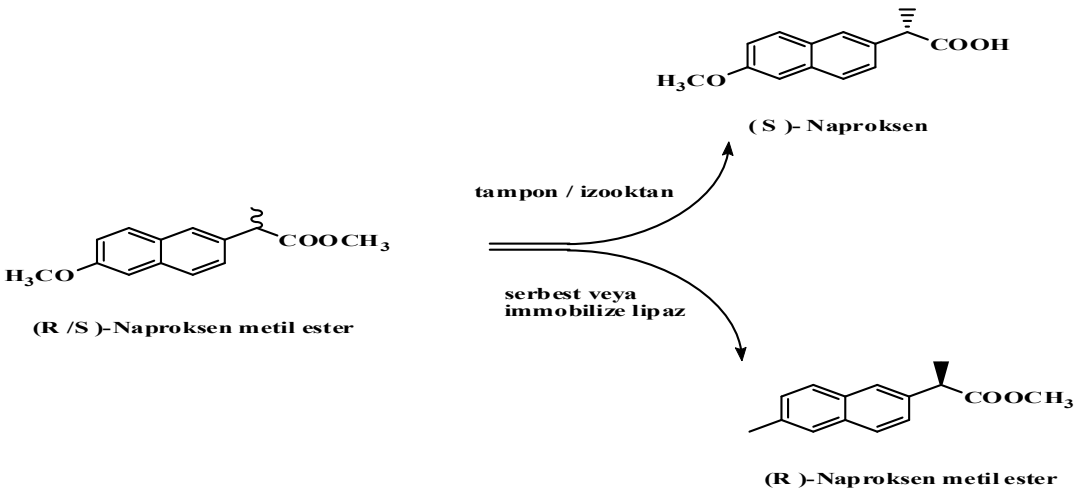
Numune adı	% C	%H	%N	[1]Bağlanan Miktar mmol/g
CD-Amd-MNP	15.53	3.35	0.09	0.91

[1] N miktarına göre hesaplandı.

4.2. İmmobilize Lipazların Enantiyoseçimli Tepkimelerde Kullanılması

Bu çalışmada sentezlenen kaliks[4]aren türevleri ile manyetik nanopartüküller üzerine immobilize edilen β-siklodekstrin türevleri sol-jel tutuklama metoduna göre lipaz immobilizasyonunda kullanıldı. Daha sonra bu immobilize enzimler rasemik (R,S)-Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizinde kullanıldı (Yilmaz 2010).

Naproksen metil esteri sentezinde, ilk olarak piyasada tek enantiyomeri bulunan *S*-Naproksen rasemleştirilerek (R,S)-Naproksen rasematına dönüştürüldü. Daha sonra Fischer esterleşme metoduna göre metanol ile asidik ortamda etkileştirilerek (R,S)-Naproksen metil ester türevi elde edildi. 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 4.8) (Yilmaz 2010).



Şekil 4.8. (R-S) Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidrolizi.

HPLC'de elde edilen sonuçlara göre formüller kullanılarak enantiyoseçimliliği hesaplanmıştır. Enantiyomerik fazlalık (ee), dönüşüm oranı (x), enantiyoseçimlilik (E) gibi değerler literatürdeki Chen metoduna göre hesaplandı (Chen ve ark. 1982).

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

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

ee_s : Kalan substratın enantiyomerik fazlalığı

ee_p : Oluşan ürünün enantiyomerik fazlalığı

C_R : R enantiyomerinin konsantrasyonu

C_S : S enantiyomerinin konsantrasyonu

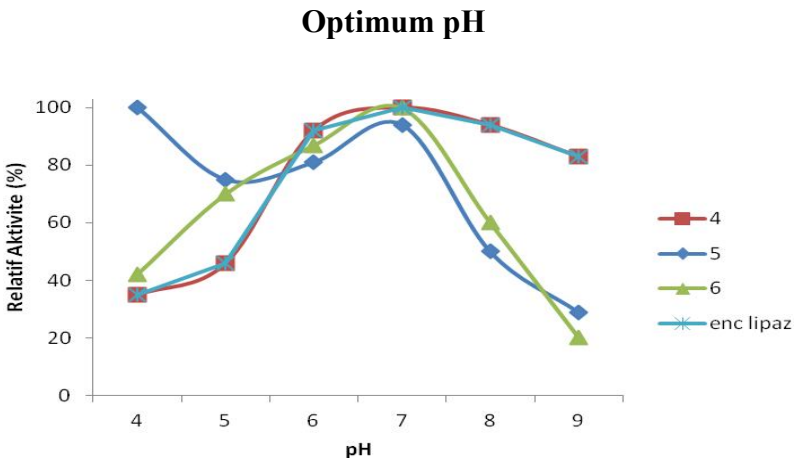
Çizelge 4.2. Optimum reaksiyon şartlarında serbest ve immobilize lipazların aktivitesi (p-nitropalmitatın hidrolizi ile belirlendi).

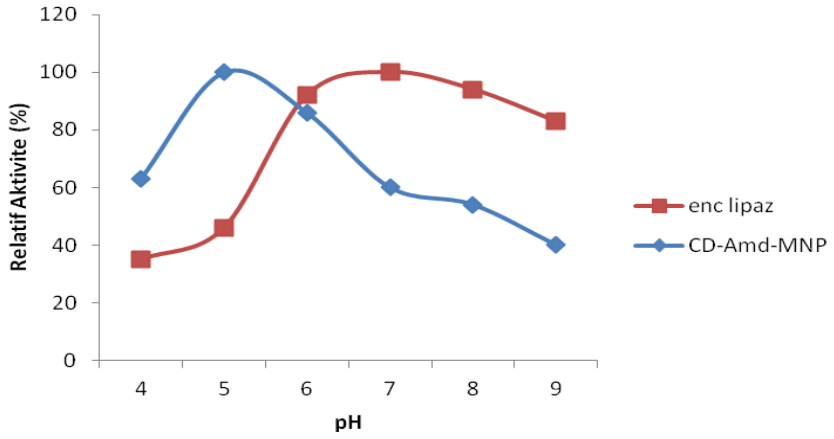
	Tutuklanan Protein (mg/g)	*Tutuklanan Protein Yüzdesi (%)*	*Lipaz Aktivitesi (U/g)*	*Spesifik Aktivite (U/ mg-protein)*
Enc-Lipaz	28.5	58.4	95	3.3
(4)	20.4	47.5	96	**4.7**
(5)	25.2	58.7	116	**4.6**
(6)	27.2	63.5	82	**3.0**
CD-Amd-MNP	32.8	76.6	49	**1.5**

[a] Destek maddeleri kullanmadan tutuklanmış serbest lipaz

Çizelge 4.2'de immobilize enzimlerin spesifik aktiviteleri kaliks[4]aren ve β-siklodekstrin amidleri kullanmadan serbest enzimin 3.3 olarak gözlenirken, **4** nolu bileşik için 4.7, **5** nolu bileşik için 4.6, **6** nolu bileşik için 3.0 ve **CD-Amd-MNP** için 1.5 olarak tespit edildi. Bu sonuç bize hidrazin grubu bulunduran kaliks[4]aren diamid türevi olan **4** nolu bileşiğin enziminin aktif merkezlerini ve konformasyonunu daha fazla koruduğunu göstermektedir.

4.2.1. Serbest lipaz ve immobilize lipazların aktivitesine pH ve sıcaklığın etkisi

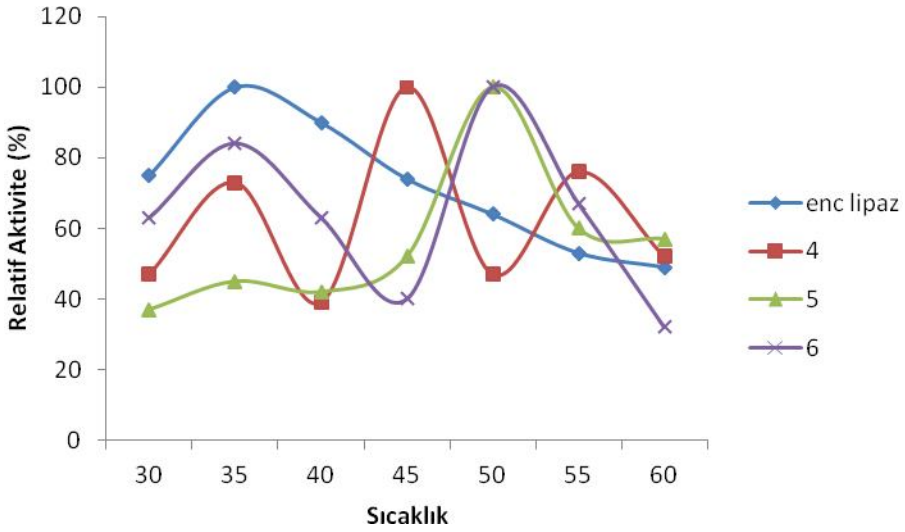


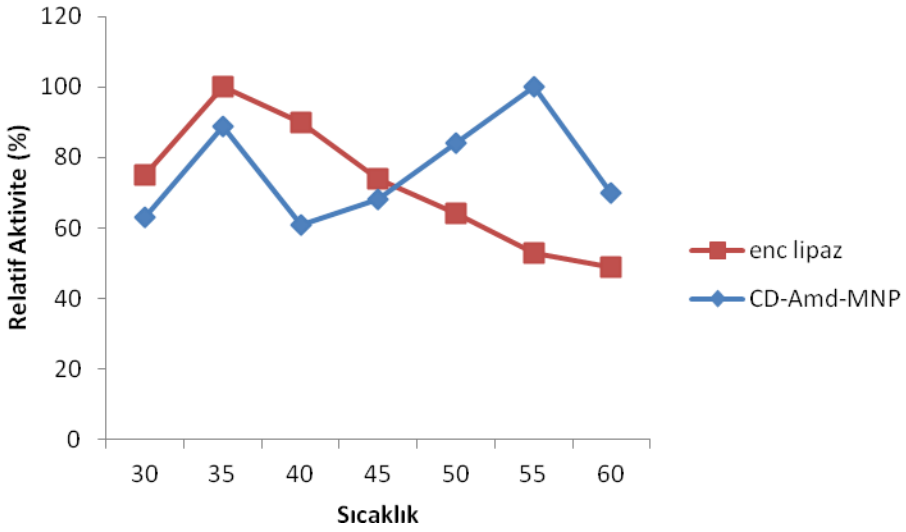


Şekil 4.9. Serbest lipaz ve immobilize lipazların aktivitesi üzerine pH'nın etkisi.

Enzim aktivitesinde pH'nın büyük önemi vardır**.** Enzim sol-jel metoduna göre tutuklanarak kaliksaren ve β-siklodekstrin katkılı sol-jel enzimlerle karşılaştırıldı. Bunun için farklı pH larda, 0.05 M fosfat tampon çözeltisi içerisinde immobilize lipazlar etkileştirilerek aktivitesi tayin edildi (Şekil 4.9). Grafik incelendiğinde serbest lipaz ve kaliksaren katkılı (**4**, **5, 6)** nolu bileşiklerin optimum pH'ı 7.0 olarak tespit edildilirken **CD-Amd-MNP** optimum pH değeri ise 5.0 olarak tespit edildi. pH'ın asidik bölgeye kayması enzimin katkı maddesi ile etkileştikten sonra polikatyonik yapıya dönüşmesinden kaynaklanmaktadır (Faber, 1993).

Optimum sıcaklık





Şekil 4.10. Serbest lipaz ve immobilize lipazların aktivitesi üzerine sıcaklığın etkisi.

Serbest ve katkı maddelerinin kullanıldığı sol-jel immobilize lipazların aktivitesine sıcaklığın etkisini incelemek amacı ile farklı sıcaklıklarda (30-60^{0}C) gerçekleştirilen tepkimelere ait relatif aktivite değerlerinin sıcaklık ile değişimi verildi (Şekil 4.10). Şekilde görüldüğü gibi serbest lipazın optimum sıcaklığı 35 ^{o}C iken **4** nolu bileşiğin 45 ^{o}C, **5** ve **6** nolu bileşiğin 50 ^{o}C ve **CD-Amd-MNP** ise 55 ^{o}C olarak bulundu. Bu sonuçlardan **5** ve **6** nolu bileşikler ile manyetik nanopartüküllere immobilize β-siklodekstrin yapıları yüksek sıcaklıkta enzimin aktivitesinin korunmasını sağlamıştır.

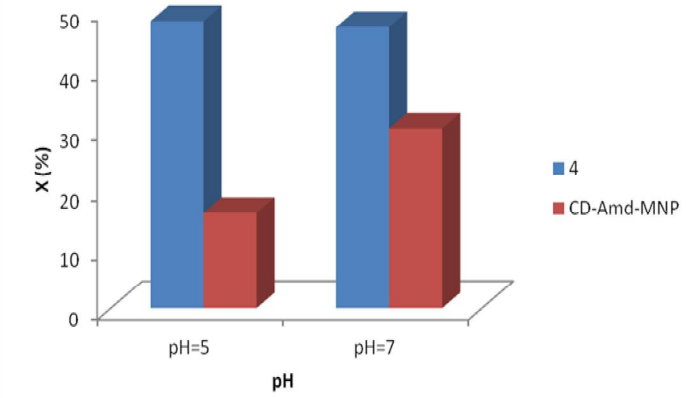
Çizelge 4.3. Serbest ve immobilize lipaz kullanarak rasemik Naproksen metil esterin enantiyoseçimli hidrolizi.

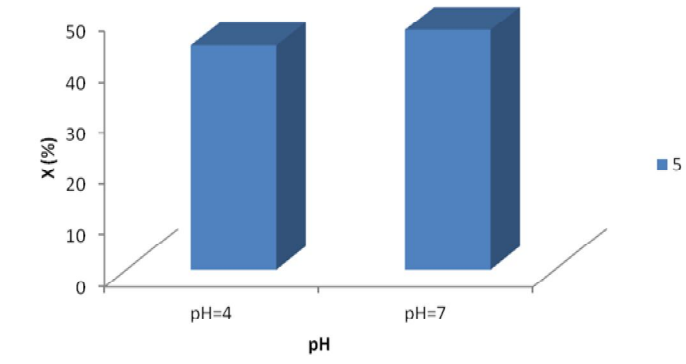
	***x* (%)**	***ee*$_s$ (%)**	***ee*$_p$ (%)**	***E***
Lipaz$_{tut}$[a]	20	25	>98	137
(4) (pH=5)	48	92	>98	**328**
(4) (pH=7)	47	90	>98	**307**
(5) (pH=4)	43	76	>98	228
(5) (pH=7)	47	87	>98	**283**

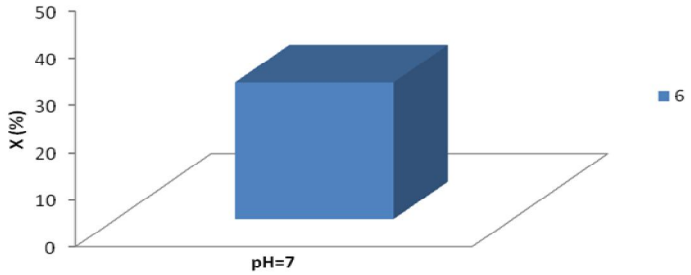
(6) (pH=7)	29	40	>98	146
CD-Amd-MNP (pH=5)	47	88	>98	**290**
CD-Amd-MNP (pH=7)	36	56	>98	174

[a] Destek maddesi kullanmadan tutuklanmış serbest lipaz
[b] Enantiyomerik fazlalık (ee), Kiral HPLC, Agilent 1200 Serisi –kiral kolon (Chiralcel OD-H); n hekzan/2-propanol/trifluoroasetik asit (100/1/0.1, v/v/v) mobil faz sistemi (naproksen için); zaman, 24 saat; substrat konsantrasyonu, 20 mM; sıcaklık, 35 ^{o}C, belirlendi.

Serbest ve kaliksaren katkılı immobilize lipazların rasemik (R,S)-Naproksen metil esterinin enantiyoseçimli hidroliz sonuçlarına bakıldığında yapılan çalışmada en yüksek enantiyoseçimliliğe kaliks[4]arenin hidrazin türevinde **(4)** gözlendi hem pH=5'de hemde pH=7'de yüksek enantiyoseçimlilik gözlendi (Çizelge 4.3). β-siklodekstrin immobilize manyetik nanopartükülün ise pH=5'de yani optimum pH'ında en yüksek enantiyoseçimlilik gözlendi.

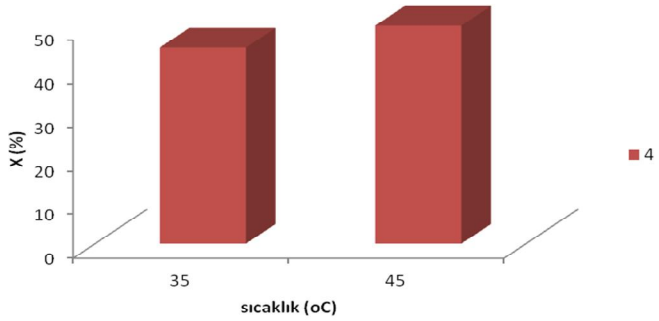


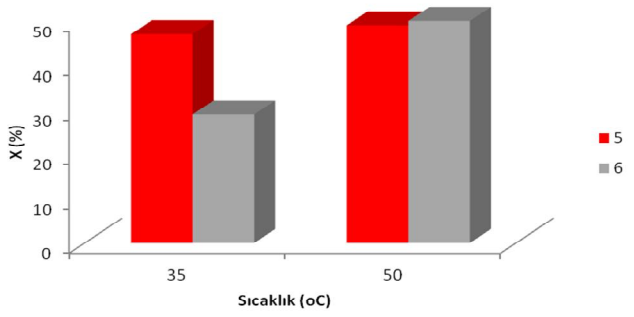




Şekil 4.11. Rasemik Naproksen metil esterinin hidrolizinde dönüşüme karşı pH' ın etkisi.

Tutuklanmış lipazların enantiyoseçimliliğine pH'ın etkisi farklı pH'larda farklı katkı maddeleri varlığında tutuklanmış lipazları inkübe ederek belirlendi. Şekil 4.11'de görüldüğü gibi **5**, **6**, **CD-Amd-MNP** bileşik ile yapılan enantiyoseçimlilik hidrolizinde pH=7 en yüksek dönüşüm ve enantiyoseçimliliğe ulaştığı belirlendi. **4** nolu bileşiğin ise yapılan enantiyoseçimlilik hidrolizinde pH=5 en yüksek dönüşüm ve enantiyoseçimliliğe ulaştığı belirlendi. Genel olarak bakıldığında kullanılan katkı maddelerinin pH=7'de enzim aktivitesini en üstte tutarak enantiyoseçimliliği arttırdığını söyleyebiliriz.

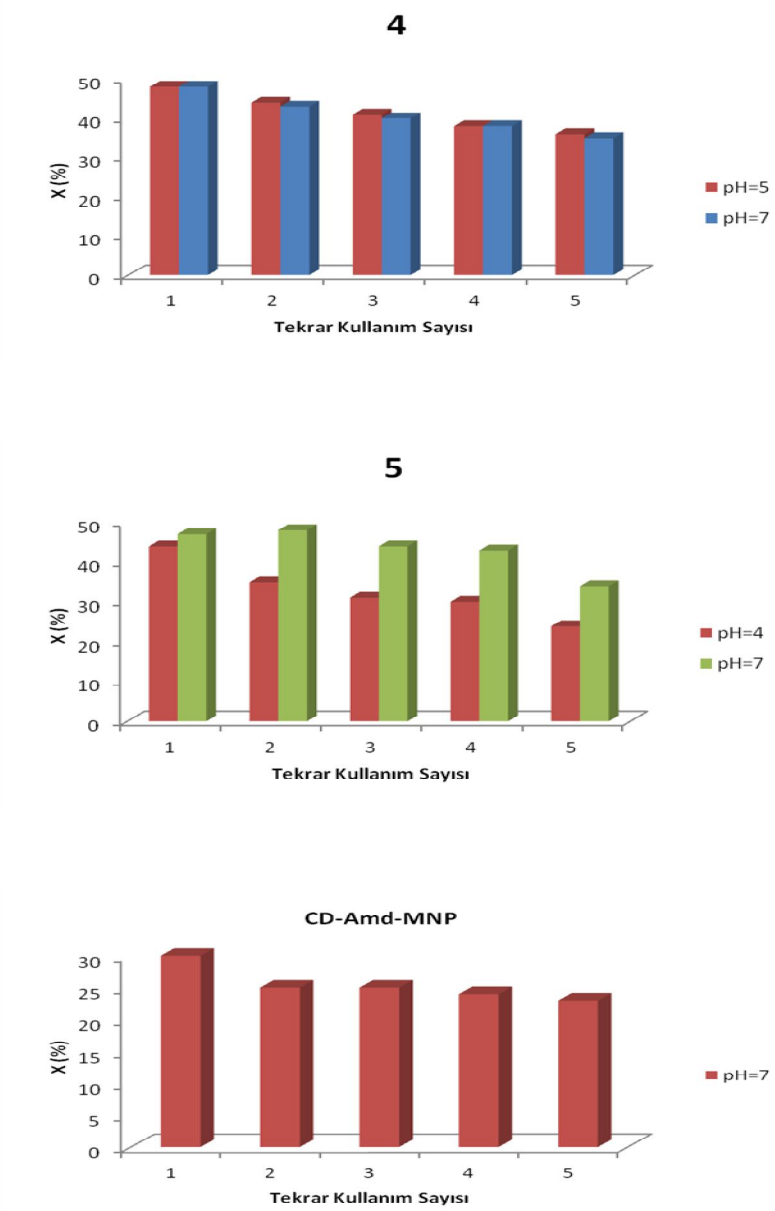




Şekil 4.12. Rasemik Naproksen metil esterinin hidrolizinde dönüşüme karşı sıcaklığın etkisi.

Tutuklanmış lipazların enantiyoseçiciliğine sıcaklığın etkisi görmek için farklı sıcaklıklarda farklı destek maddeleri varlığında tutuklanmış lipazları inkübe ederek belirlendi. Enantiyoseçimli hidroliz çalışmalarında en iyi dönüşüm ve enantiyoseçimlilik Şekil 4.12'de görüldüğü gibi **4** nolu bileşiğin için 45°C olarak bulundu. **5** ve **6** nolu bileşiklerin ise 50°C olarak bulundu.

4.4.2. Tekrar Kullanılabilirlik



Şekil 4.13. Rasemik Naproksen metil esterinin hidrolizinde dönüşüme karşı tekrar kullanılabilirliğin etkisi.

İmmobilize lipazların, özellikle endüstriyel uygulamalarda tekrar kullanılabilmesi oldukça önemlidir. immobilize lipazların tekrar kullanılabilirliği, immobilize lipazın ilk kullanımdan sonra 3 kez 0.05M, pH;7.0 fosfat tamponu ile yıkanıp tekrar aktivitesine bakılarak yapıldı. Tutuklanmış lipazların tekrar kullanılabilirliğini test etmek için pH=7'de optimum sıcaklıklarda denemeler yapıldı ayrıca 35^{o}C'de optimum pH'larda testler yapıldı. İmmobilize lipazın dönüşümü 5. Kullanımdan sonra **4** nolu bileşik için pH=5'de %36, pH=7'de %35 olarak bulundu. Buda **4** nolu bileşiğin enzimin aktivitesine uzun süre katkı sağladığını anlayabiliriz. **5** nolu bileşiğin dönüşümü 5. Kullanımdan sonra pH=4'de %24, pH=7'de %34 olarak bulundu. **CD-Amd-MNP** ise dönüşümü 5. Kullanımdan sonra pH=7'de %23 olarak bulundu. Genel olarak bakıldığında kullanılan destek maddelerinin pH=7'de 5. Kullanımındaki dönüşümün yüksek olduğunu söyleyebiliriz (Şekil 4.13).

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

- Dihidrazin (4), tetrahidrazin (5), dipridil (6) gruplarını bulunduran *p-ter*-bütilkaliks[4]arenin amid türevleri ile β-siklodekstrin-heptahidrazin-EPPTMS-MNP uygun koşullar altında sentezlendi.
- Sentezlenen bileşiklerin yapıları spektroskobik metotlarla tayin edildi.
- β-Siklodekstrin-tetrahidrazin-trimetil asetat (8) epoksi grubu taşıyan Fe_3O_4 nanopartükülüne immobilize edildi.
- Sentezlenen kaliks[4]aren ve β-Siklodekstrinin amid türevleri sol-jel tutuklama tekniğine göre *Candida Rugosa* lipaz enzimi ile birlikte tutuklandı.
- Kaliks[4]aren ve β-Siklodekstrinin amid katkılı tutuklanmış lipazların spesifik aktivitesi tayin edildi.
- Tutuklanan lipazlar rasemik naproksen metil esterinin enantiyoseçimli tepkimelerinde kullanıldı.
- HPLC tekniği kullanılarak dönüşüm (% x) ve Enantiyoseçimli (E) değerleri hesaplandı.
- Tutuklanan kaliks[4]aren ve β-Siklodekstrinin amid katkılı enzimler için optimum pH ve sıcaklık değerleri araştırıldı.
- Optimum pH ve sıcaklıklarda yapılan tekrar kullanılabilirlikleri araştırıldı.
- Kaliks[4]aren ve β-Siklodekstrinin amid katkılı sol-jel tutuklanmış enzim çalışmalarında dihidrazin grubu taşıyan kaliks[4]aren türevi bu çalışmada pH=7 ve 50^{o}C'de en yüksek dönüşümü gösterdi.

KAYNAKLAR

Akceylan, E., and 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 widerim substituted calix[4]arene carboxylic acid-grafted magnetic nanoparticles, *J Incl Phenom Macrocycl Chem*, (İmpress).

Akin, İ., Erdemir, S., Yilmaz, M., Ersoz, M., 2012, Calix[4]arene derivative bearing imidazole groups as carrier fort he transport of palladium by using bulk liquid membrane, *Journal of Hazardosu Materials,* 223-224, 24-30

Akoh, C.C., Min, D.B. 1998, Microbial lipases and enzymatic interesterification in food lipids-chemistry, nutrition and biotechnology, *Marcel Deccer, Inc, New York*, 641-698.

Akoz, E., Erdemir, S., Yilmaz, M., 2011, Immobilization of novel the semicarbazone derivatives of calix[4]arene onto magnetite nanoparticles for removal of Cr(VI) ion., *Journal of İnclution Phenomena and Macrocyclic Chemistry*., 73, 449-458.

Aksoy, T., Erdemir, S., Yildiz, H. B., Yilmaz, M., 2012, Novel water-soluble calix[4,6]arene appended magnetic nanoparticles for the removal of the carcinogenic aromatic amines., *Water Oil Soil Pollut*., 223, 4129-4139.

Alekseeva E.A., Bacherikov V.A., Gren A.I., Baukov Yu.I., 2000, *Russian Journal of General Chemistry.,* 70, 490-492.

Arduini, A., Pochini, A., Reverberi, S. and Ungaro, R., 1984, '*p-ter-butyl* – Calix[4]arene Tetracarboxylic Acid. A Water soluble calixarene in a cone structure' , *J. Chem. Soc., Chem. Commun*., 981

Arduini, A., Pochini, A., Sicuri, A.R., Secchi, A. and Ungaro, R., 1990, "A Novel synthesis of *p*-phenylcalix[4]arenes via tetraiodo derivatives", *Tetrahedron Lett*., 31, 4653-56.

Arnoud-Neu, F., Schwing-Weill, M. J., Zia, K., Cremin, S., Horris, S. J., McKerwey, M. A., 1991, "Selective alkali and alkaline earth cation complexation by calixarene amide". *New J. Chem*., 15, 33-37.

Arslan, M., 2012, Manyetik β-siklodekstrin nanopartüküllerin sentezi ve bazı kiral karboksilik asitlere karsı ekstraksiyon özeliklerinin incelenmesi", Yüksek lisans, *Selçuk Üni. Fen Bil. Ens.,* Konya, 1-19.

Anonymous, 1989, Farm accountancy data network, an A-Z of methodology" Commission Report of the EC, Brussels, 16-19.

Baekeland, L. H. *U. S. Patent 942*, 699, October 1908.

Beisson, F., Tiss A., Riviere, C., Verger, R. 2000, Methods for Lipases Etection and Assay: A Critical Review. *Eur. J. Lipid Sci. Technol*., 102, 133-153.

Bender, M. L.; Komiyama, M., 1978a, *Cyclodextrin Chemistry*; Springer Verlag: Berlin.

Bender, M.L., Momiyama, M. 1978. Cyclodextrin Chemistry; *Springer*: Berlin.

Benjamin S., Pandey A. 1998a, *Candida rugosa* Lipases: *Molecular Biology and Versatility in Biotechnology*., Yeast 14, 1069–1087.

Benjamin, S., Pandey, A. 1998. *Candida rugosa* and its Lipases-a Retrospect. *J. Sci. Ind. Res.* 57, 1-9.

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

Breslow, R., 1995, "Biomimetic Chemistry and Artificial enzymes" *Acc. Chem. Res*. 28, 146-153.

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.

Ceylan, D., 2009, Bazı bacıllus izolatlarının siklodekstrin glukanotransferaz enziminin saflastırılması ve karakterizasyonu, Yüksek Lisans Tezi*, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü*, Ankara, 5-24.

Collins, E.M., McKervey, M.A, Madigan, E., Moran, M.B., Owens, M., Fergusaon, G. and Harris, S.J., 1991, *J.Chem.Soc.Perkin Trans*, 1, 3137-3142.

Del Valle, E.M.M. 2004. Cyclodextrin and Their Uses: a review. *Process Biochemistry*, 39, 1033-1046.

Demirel, A., Dogan, A., Canel, E., Memon, S., Yilmaz, M., Kilic, E., 2004, ldquo Hydrogen Ion-Selective Poly(Vinyl Chloride) Membrane Electrode Based On A p-Tert-Butylcalix4arene-Oxacrown-4&rdquo, *Talanta*, 62, 123-129.

Demirtas, H. N., Bozkurt, S., Durmaz, M., Yilmaz , M., Sirit, A., 2008, Synthesis Of New Chiral Calix4Azacrowns For Enantiomeric Recognition Of Carboxylic Acids, *Tetrahedron*: *Asymmetry* 19, 2020-2025.

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.

Dönmez, S., Avcı, A., 2009, Siklodekstrin Glikozil Transferaz Enzimi (SGTaz) Üreten Ekstrem Termofil Anaerobik Bakterilerin izolasyonu ve Siklodekstrin Üretiminin Optimizasyonu, *Proje*, Ankara, 4-23.

Durmaz, M., Yilmaz, M., Sirit, A., 2011, Synthesis of chiral calix[4]arenes bearing aminonaphthol moieties and their use in the enantiomeric recognition of carboxylic acids., *Org. Biomol. Chem.*, 9, 571.

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

Fadıloğlu, S. 1996. Kinetics of Olive Oil Hydrolysis by Free and Immobilised *Candida rugosa* Lipase, Ph.D. Thesis, *University of Gaziantep*.

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

Fennema, O.R., 1985, "Food Chemistry", Second Edition, Mdi Dekker, Wisconsin, Madison, USA, 371-475.

Ghosh, P.K., Saxena, R.K., Gupta, R., Yadav, R.P., Davidson, S. 1996, Microbial Lipases: Production and Applications. *Science Progress*. 79, 119-157.

Glennon, J.D., Horne, E., O'Connor, K., Kearney, G.A., Harris, S.J., McKervey, M.A., 1994, "Chromatographic selectivity for amino acid esters and alkali metal ions on a silica bonded calix[4]arene tetraester stationary phase", *Anal. Proc*., 31, 33-35.

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., 1981a, " Calixarenes. 4. The Synthesis, Characterization and Properties of the Calixarenes from ptert-Butylphenol", *J. Am. Chem. Soc*., 103, 3782-92. Idem, ibid., 1984, 106, 1891.

Gutsche, C. D., Dhawan, B., No, K. H., Muthukrishnan, R., 1981b, " Calixarenes. 4. The Synthesis, Characterization and Properties of the Calixarenes from ptert-Butylphenol", *J. Am. Chem. Soc*., 103, 3782-92. Idem, ibid., 1984, 106, 1891.

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., Iqbal, M., Stewart, D., 1986a, "Calixarenes. 18. Synthesis Procedures for p-tert-Butylcalix[4]arene" *J. Org. Chem*. 51, 742-5.

Gutsche, C.D. and Lin, L.-G., 1986b, "Calixarenes. 12. The Synthesis of Functionalized Calixarenes". *Tetrahedron*, 42 (16), 1633-40.

Gutsche, C.D., 1989, "Monograph in Supramolecular Chemistry: Calixarenes"; *The Royal Society of Chemistry, Cambridge, London*.

Gutsche, C. D., Iqbal, M., 1990, "p-tert-Butylcalix[4]arene", *Org.Syn*. 68, 234-237.

Groenen, L.C., Ruel, B.H.M., Casnati, A., Timmerman, P., Verboom, W., Harkema, S., Pochini, A., Ungaro, R., Reinhoudt, D.N., 1991, "Syn-1,2-Dialkylated Calix[4]arenes-General Intermediates In The Nah/Dmf Tetraalkylation of Calix[4]arenas", *Tetrahedron Lett*., 32, 2675-2678.

Hamada, F., Bott, S.G., Orr, G.W., Coleman, A.W., Zhang, H. and Atwood, J.L., 1990, "Thiocalix[4]arenes .1. Synthesis and Structure of Ethylthiocalix[4]arene Methyl-Ether and The Related Structure of Bromocalix[4]arene Methyl-Ether", *J. Incl. Phenom. Mol. Recog. Chem*., 9, 195-206.

Hultzch, K., 1950, 'Chemie der Phenolharze', Springer-verlag, Berlin.

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.

Jaeger, K.E., Reetz, M.T. 1998, Microbial Lipases form Versatile Tools for Biotechnology. *TIBTECH*, 16, 396-403.

Jaeger, K.E., Ransac, S., Dijkstra, B. W., Colson, C., Van Heuvel, M., Misset, O. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* 5, 29–63.

Jun Han, Ya Hua Cai, Li Liu, Chao Guo Yan, and Qi Li, 2007, Syntheses, crystal structures, and electrochemical properties of multi-ferrocenyl resorcinarenes, *Tetrahedron*, 63, 2275–2282.

Kamini, N.R., Fujii, T., Kurosu, T., and Iefuji, H., 2000, "Production, Purification and Characterization of an Extra Cellular Lipase from The Yeast Cryptococcus sp.S-2", *Process Biochemistry*, 36, 317-324.

Kierkels, J.G.T., Vleugels, L.F.W., Kern, J.H.A., Meıjer, E.M., Kloosterman, M., 1990, "Lipase Kinetics: On-line Measurement of the Interfacial Area of Emulsions", *Enzyme and Microbial Technology*, 12, 760-763.

Lalonde, J. 1995, The Preparation of Homochiral Drugs and Peptides Using crosslinked Enzyme Crystals. *Chim. Oggi*. 13, 33–37.

Langrand, G., Rondot, N., Triantaphilides, C. And Baratti, S. 1990, Short Chain Flavour Esters Synthesis by Microbial Lipases. *Biotechnol. Lett.* 12, 581–586.

Lehn, J. –M., 1995, " Supramolecular Chemistry", VCH, Weinheim.

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

Mazzaglia, A., Angelini, N., Darcy, R., Donohue, R., Lombardo, D., Micali, N., Villari, V., Sciortino, M. T., Scolaro, M., 2003, Novel heterotopic colloids of anionic

porphyrins entangled in cationic amphiphilic cyclodextrins: spectroscopic investigation and intracellular delivery, *Chem. Eur. J.,* 9, 5762-5769.

Mc Kervey, M.A., Seward, E.M., Ferguson, G., Ruhl, B. And Harris, J., 1985, "Synthesis, X-ray Crystal Structures and Cation Transfer Properties of Alkyl Calixaryl Acetates, a New series of molecular Receptors", *J. Chem. Soc., Chem. Commun*., 388-390.

Min, O. R., 2005, Molecular cloning of cyclodextrin glucanotransferase gene from bacillus sp. G1, Master thesis, *Universiti Teknologi Malaysia*, Malaysia.

Ozcan, F., Sahin, O., Yilmaz, M., 2009, Synthesis of a glutaraldehyde derivative of calix[4]arene as a cross-linker reagent for lipase immobilization, *J. Incl. Phenom. Macro.*, *63*, 123-129.

Ozcan, F., 2009, "Yeni kaliks[4]aren türevlerinin sentezi ve arsenat anyonun sulardan giderilmesinde kullanılması", Yüksek lisans Tezi, *Selçuk Üni. Fen Bil. Ens.,* Konya, 17-19.

Ozyilmaz, E., ve Sayin, S., 2013a, Preparation of New Calix[4]arene-Immobilized Biopolymers for Enhancing Catalytic Properties of Candida rugosa Lipase by Sol–Gel Encapsulation, *Appl Biochem Biotechnol*, 170, 1871–1884.

Ozyilmaz, E., ve Sayin, S., 2013, a magnetically separable biocatalyst for resolution of racemic naproxen methyl ester, Bioprocess Biosyst Eng., (İmpress).

Öztürk, B. 2001, Immobilization of lipase from *Candida rugosa* on Hydrophobic and Hydrophilic Supports, Yüksek Lisans Tezi, *İzmir Institute of Technology,* İzmir, Turkey.

Paiva, A.L., Balcao, V.M., Malcata, F.X. 2000, Kinetics and Mechanisms of Reactions Catalyzed by Immobilized Lipases. *Enzyme and Microbial Technology*, 27, 187-204.

Pandey, A., Benjamin, S., Soccol, C.R., Nigam, P., Krieger, N., Soccol, V.T. 1999, The Realm of Microbial Lipases in Biotechnology. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29, 119-131.

Park, O.J., Park, H.G., Yang, J.W. 1996, Enzymatic Transesterification of Monosaccharides and Amino Acid Esters in Organic Solvents. *Biotechnol. Lett*. 18, 473-478.

Pedersen C J., 1967, "Cyclic Polyethers and Their Complexes with Metal Salts" *J. Am. Chem. Soc*. 89, 7017.

Sahin, 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, *Appl. Catal. A-Gen.*, *369*, 36-41.

Sahin, O., Yilmaz, M., 2012, Synthesis and fluorescence sensing properties of a new naphthalimide derivative of calix4arene., *Tetrahedron Letters,* 53, 2319-2324.

Sayin, S., Ozcan, F., Yilmaz, F., 2000, Synthesis and Evaluation of Chromate and arsenate Anions Extraction ability of a N-Methyl-Glucamine Derivative of Calix4arene Immobilized onto Magnetic. *J. Hazard. Mater.*, 178, 312-319.

Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C. 2001. Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases. *Biotechnology Advances*, 19, 627-662.

Shinkai, S., Mori, S., Koreishi, H., Tsubaki, T., Manabe, O., 1986, "Hexasulfonated Calix[6]arene Derivatives: A New Class of Catalysts, Surfactants and Host Molecules", *J. Am. Chem. Soc*., 108, 2409-2416.

Shinkai, S., Araki, K., Shibata, J., Tsugawa, D., Manabe, O., 1989, "Diazo-Coupling Reactions with Calix[4]arene - pKa Determination with Chromophoric Azocalix[4]arenas", *Chem. Lett*., 6, 931-934.

Singh, M., Sharma, R. and Banerjee, U.C. 2002, Biotechnological applications of cyclodextrins, *Biotechnology Advances*, 20 (5-6), 341-359.

Sortino, S., A. Mazzaglia, 1. Monsu Scolaro, F. Marino Merlo, V. Valveri, M. T. Sciortino, 2006, Nanoparticles of Cationic Amphiphilic Cyclodextrins Entangling Anionic Porphyrins as Carrier-Sensitizer System in Photodynamic Cancer Therapy, *Biomaterials*, 27, 4256-4265.

Sökmen, B. B., 2005, Kayısı (*Armeniaca Vulgaris* Lam.) Tohumlarından Lipazın Saflaştırılması ve Çeşitli Taşıyıcılara İmmobilize Edilmesi, Doktora Tezi, *Kimya Anabilim Dalı Biyokimya Programı*, İstanbul.

Szejtli, 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.

Szejtli, J,. 1998, Introduction and General Overview of Cyclodextrin Chemistry. *Chem. Rev*. 98, 1743-1753.

Thurman, C., 1982, "Phenol. Ln: Kirk-Othmer, Encyclopedia of Chemical Technology." Vol.17, P.373, *J. Wiley and Sons*, New York.

Ting, Y., Verboom, W., Groenen, L.C., Van Loon, J-D. and 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.

Tutar, H., Yılmaz, E., Pehlivan, E., Yılmaz, M., 2009, Immobilization of *Candida Rugosa*Lipase on Sporopollenin from Lycopodium Clavatum, *International Journal of Biological Macromolecules*, 45, 315–320.

Whellcuright, S.M. 1991, Protein Characteristic In Protein Purification: Design and Scale up of Downstream Processing, 26-40, *Oxford University Press*, New York.

Van der veen BA., Uitdehaag JC., Dijkstra BW., Dijkhuizen L., 2000, Engineering of cyclodextrin glycosyltransferase reaction and product specificity, *Biochim Biophys Acta*, 1543 (2), 336-360.

Villeneuve, P., Mudehwa, J.M., Haas, M.J. 2000, Customizing Lipases for Biocatalysis a Survey of Chemical, Physical and molecular Biological Approaches. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 9, 113-148.

Vögtle, F., 1993, *Supramolecular Chemistry: An Introduction*, J. Wiley and Sons, New York.

Yilmaz, F., 2008, "Bazı amin grubu taşıyan kaliks[4]aren türevlerinin sentezi ve özelliklerinin incelenmesi", Yüksek lisans Tezi, *Selçuk Üni. Fen Bil. Ens.,* Konya, 24-26.

Yilmaz, M., 1999, "Synthesis of An Oligomer-Supported Calix[4]arene and Selective Extraction of Li+", React. and Func. *Polym*., 40, 129-133.

Yilmaz, M., Ozman, Y.E., 2009, Pretreatment of *Candida rugosa* lipase with soybean oil before immobilization on beta-cyclodextrin-based polymer, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 69, 58–62.

Yilmaz, E., Sezgin, M., Yılmaz, M., 2010, Enantioive hydrolysis of rasemic naproxen methyl ester with solgel Encapsulated lipase in the presence of sporopollenin, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 62, 162–168.

Yilmaz, E., 2010, Farklı teknikler kullanarak değişik destek materyallerine lipaz immobilizasyonu ve bir antiinflammator olan *s*-naproksenin oluşumunda kullanılması", Doktora Tezi, *Selçuk Üni. Fen Bil. Ens.,* Konya, 3-15.

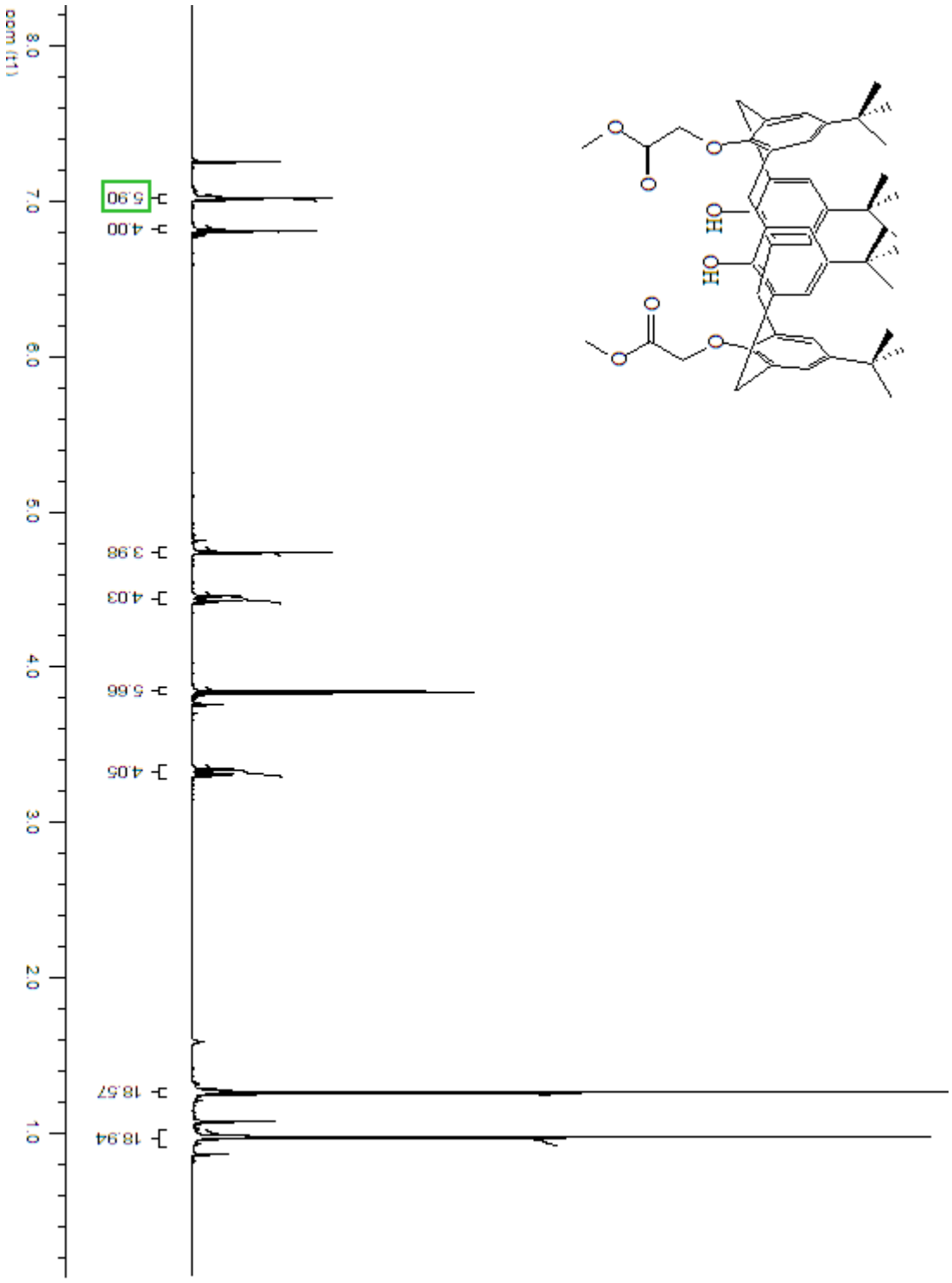
Yilmaz, E., Can, K., Sezgin, M., Yilmaz, M., 2011a, Immobilization of Candida rugosa lipase on glass beads for enantioselective hydrolysis of racemic Naproxen methyl ester, *Bioresource Technology*, 102, 499–506.

Yilmaz, E., Sezgin, M., Yilmaz, M., 2011b, 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.

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.

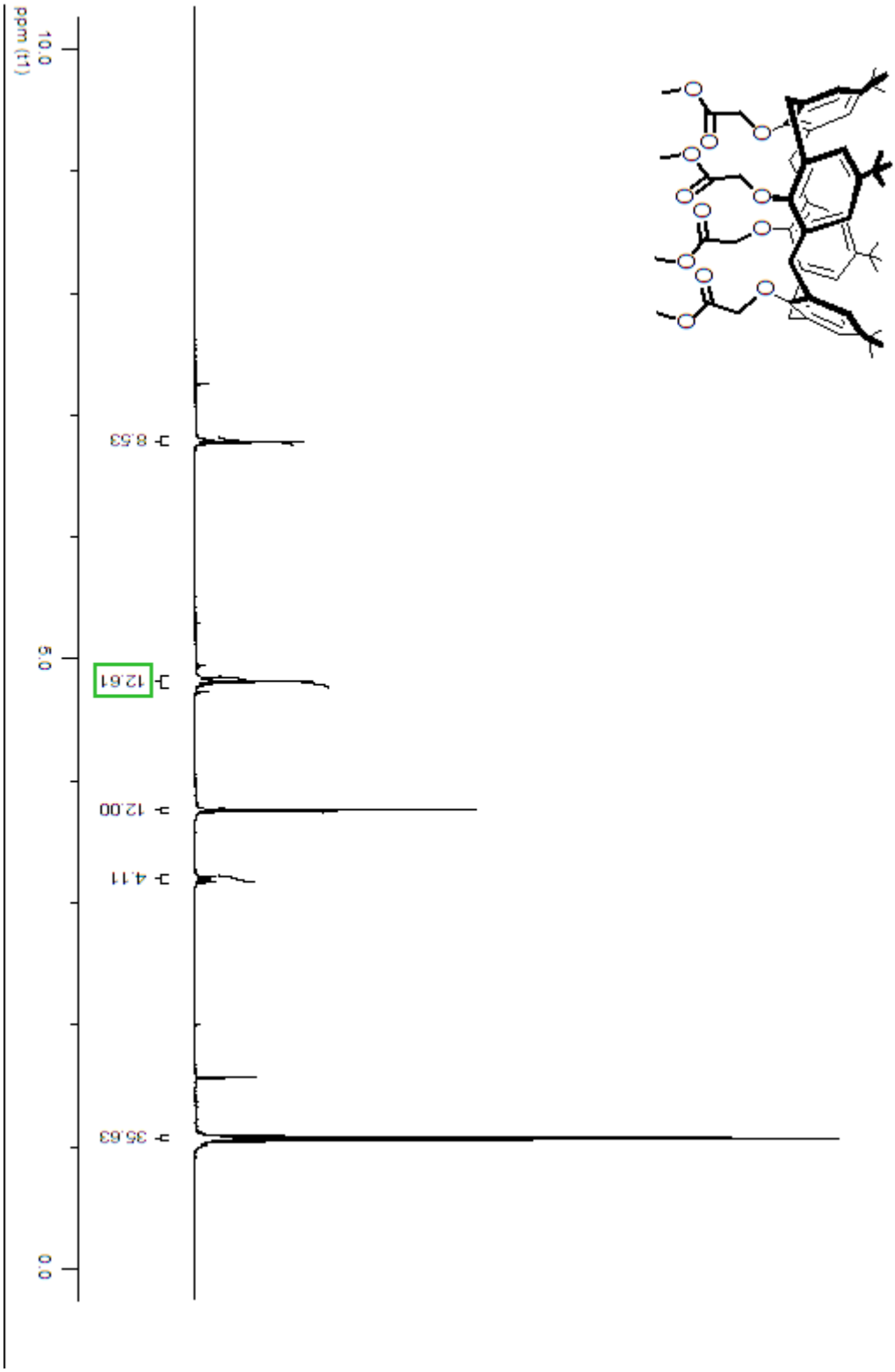
EKLER

EK-1



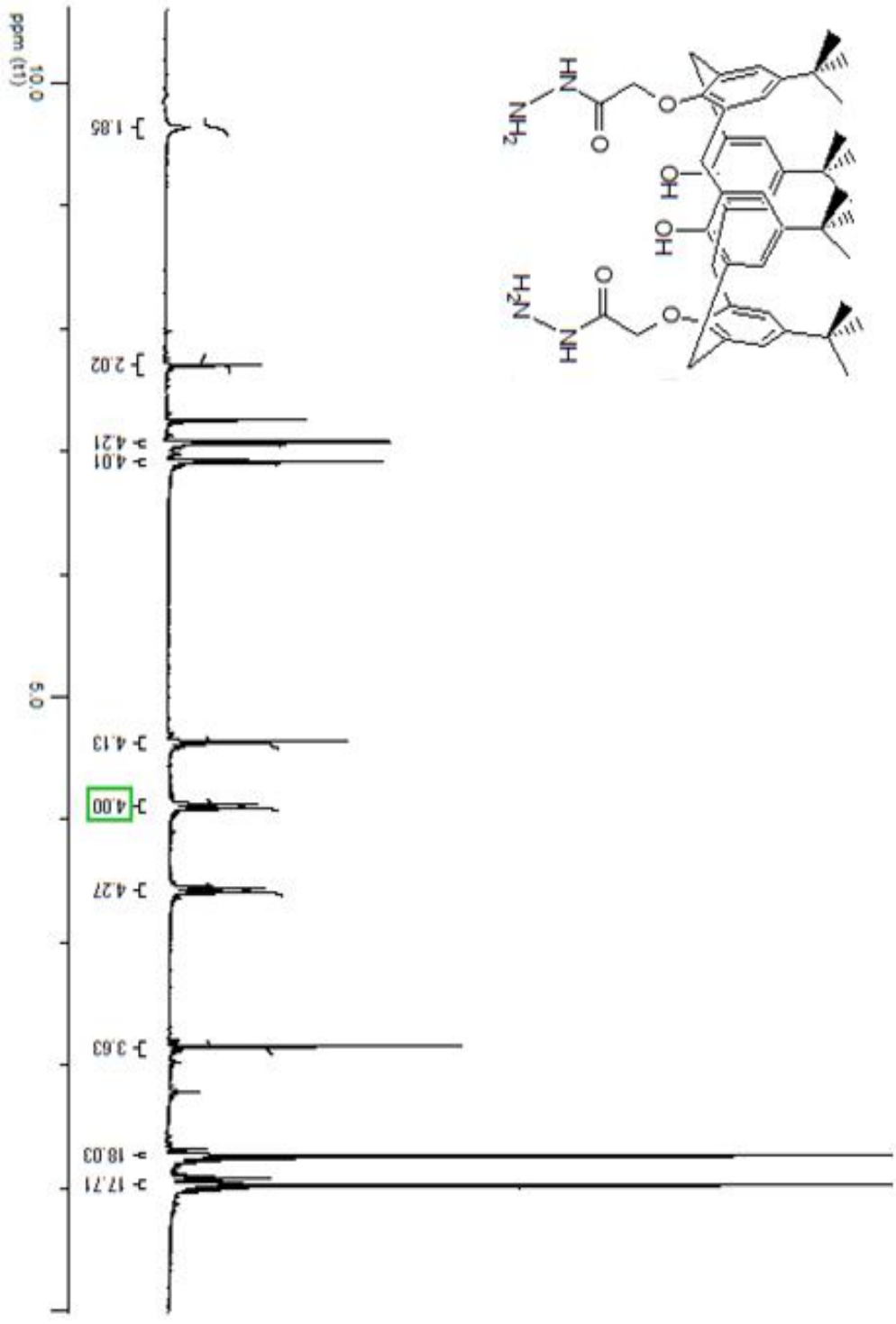
Şekil 5.1. 2 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrometresi.

EK-2



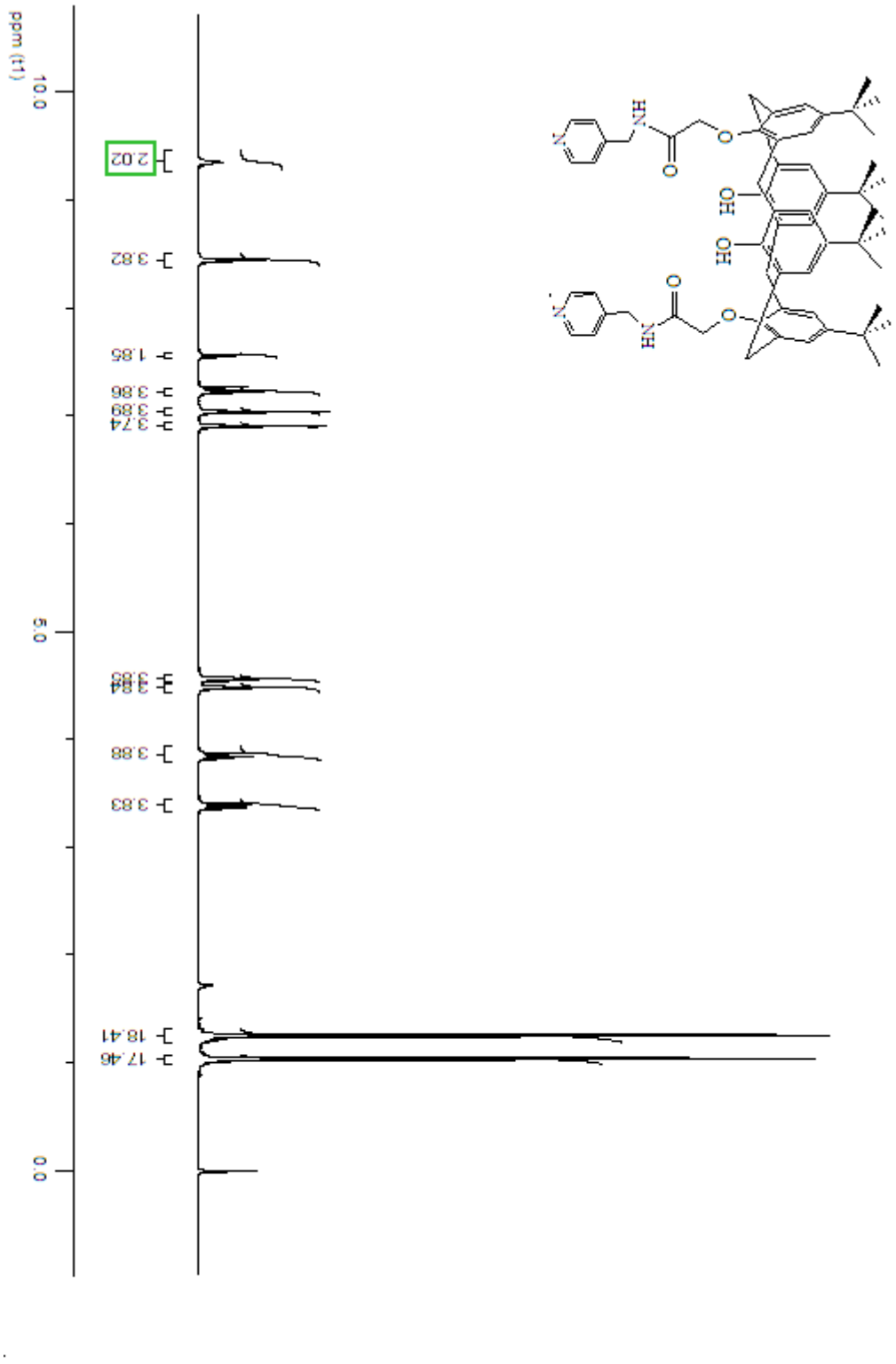
Şekil 5.2. 3 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrometresi.

EK-3



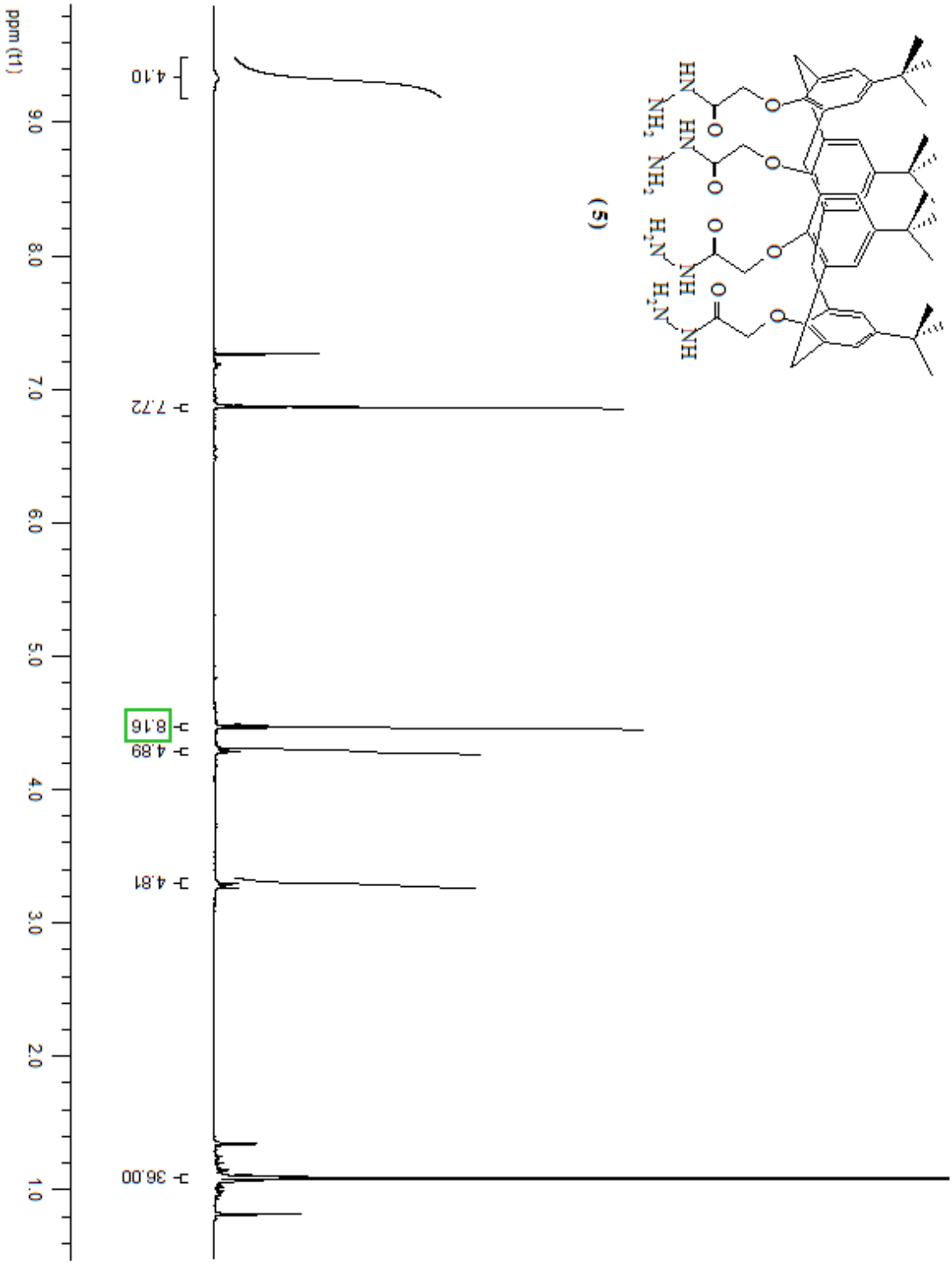
Şekil 5.3. 4 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrometresi.

EK-4



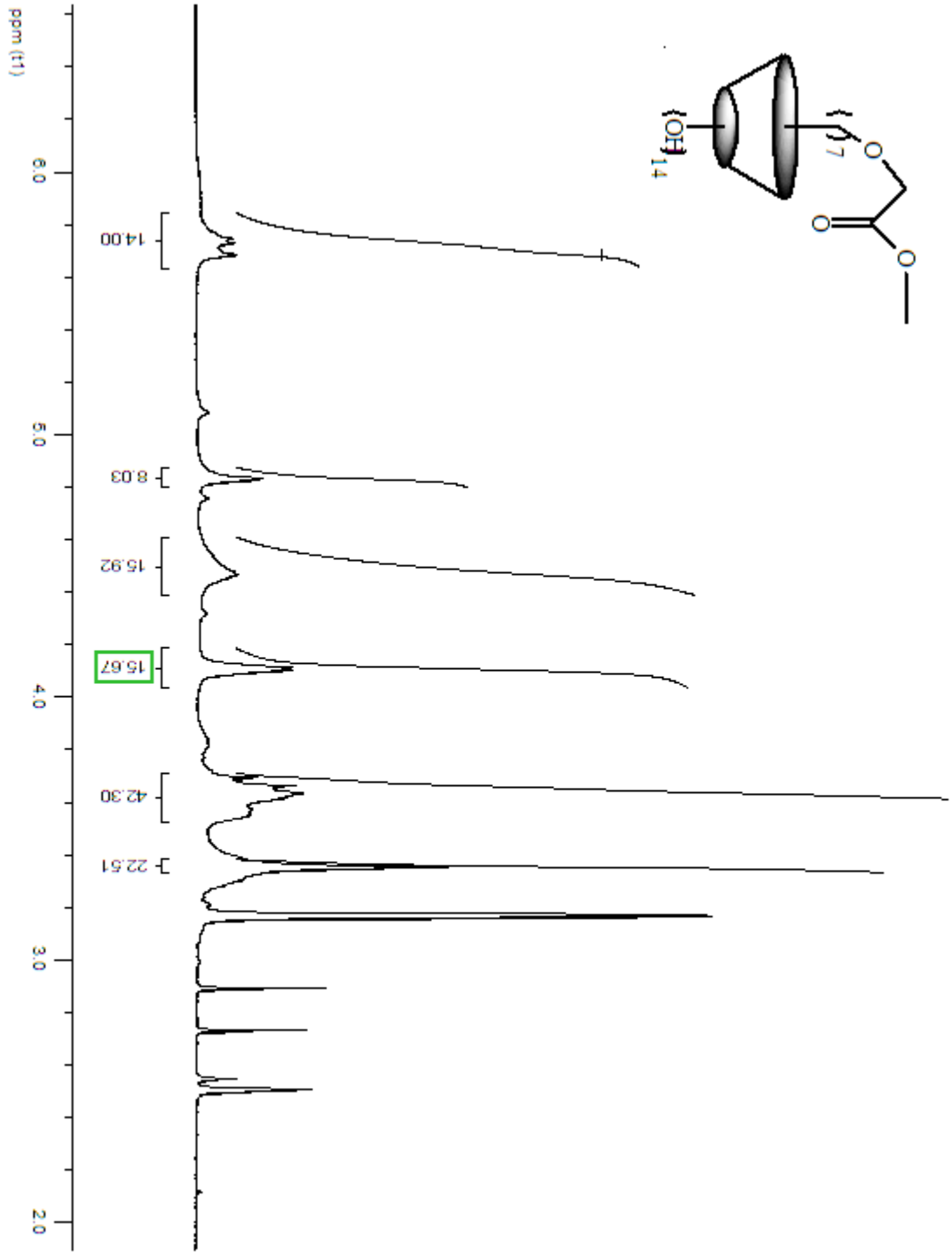
Şekil 5.4. 6 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrometresi.

EK-5



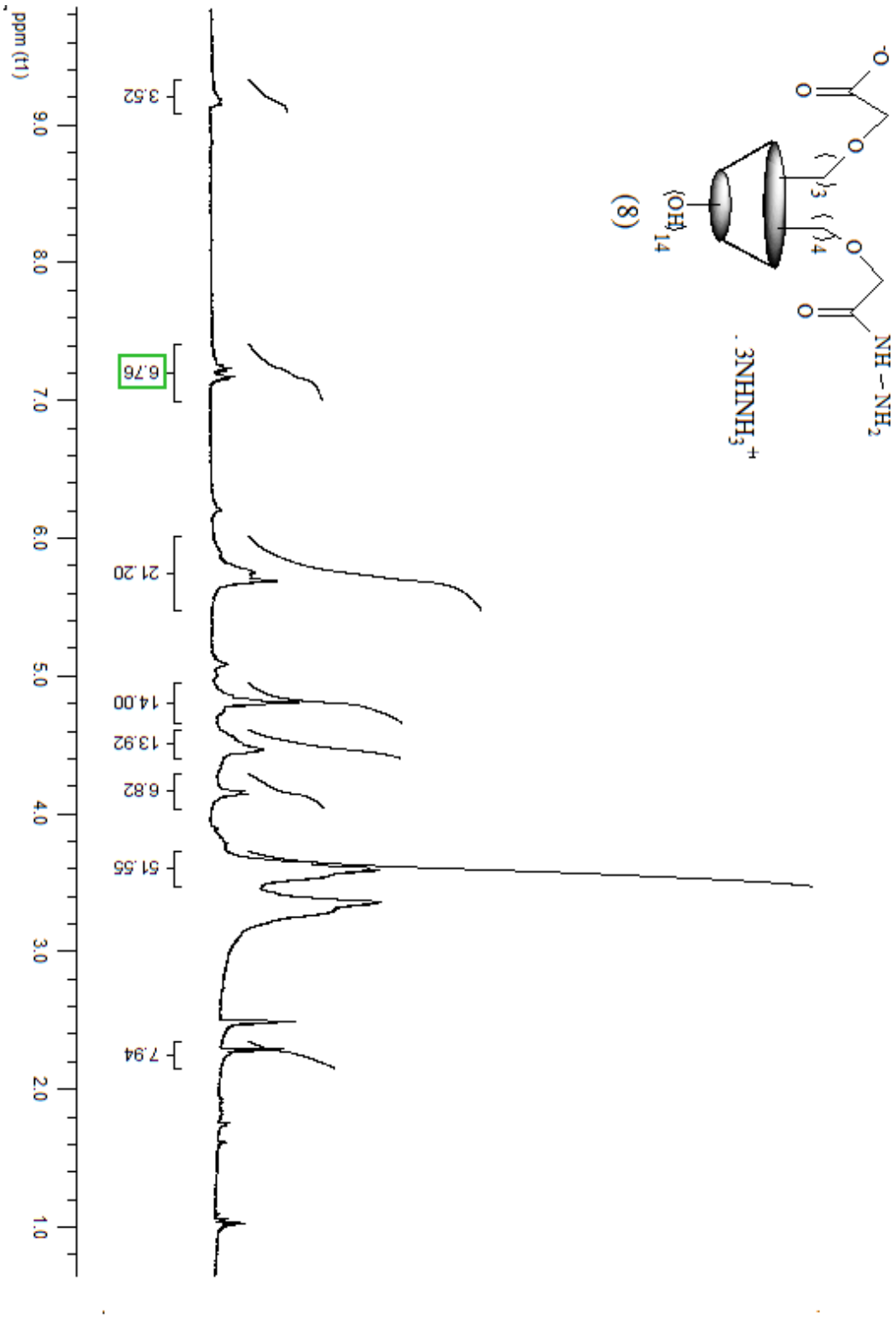
Şekil 5.5. 5 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrometresi.

EK-6



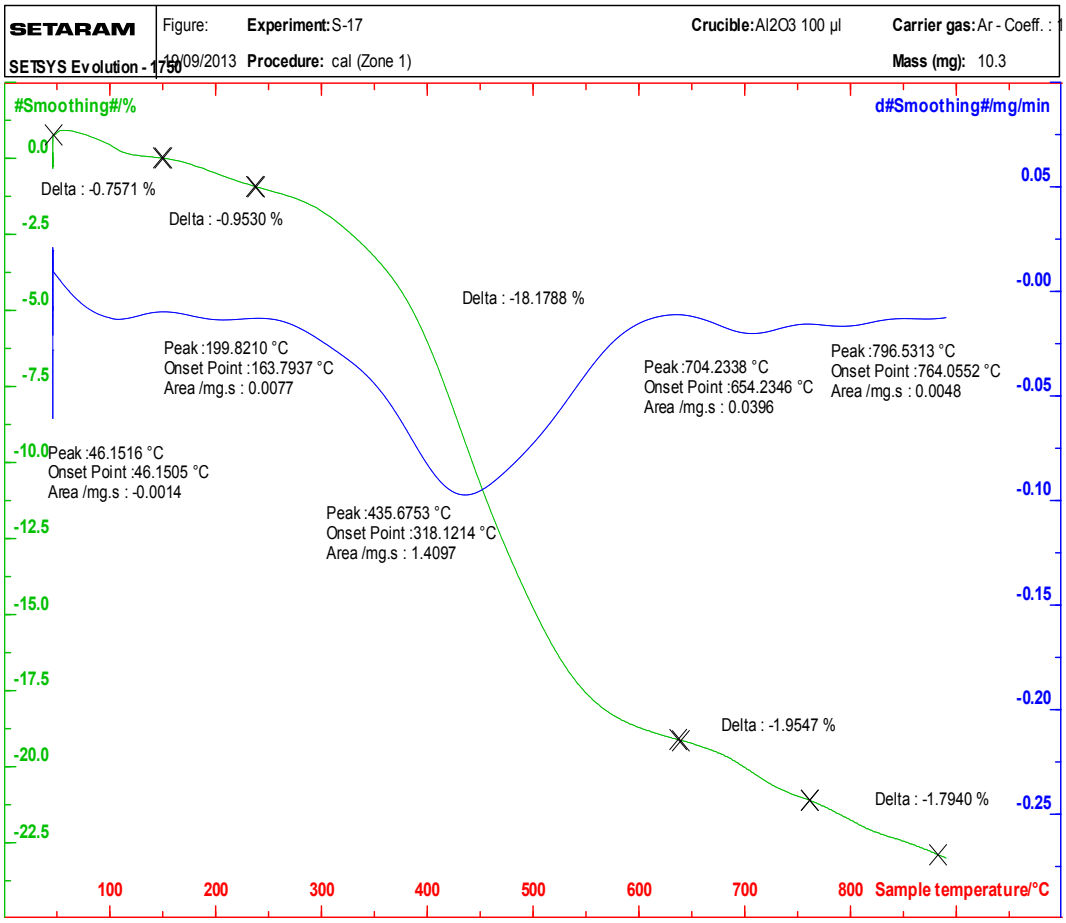
Şekil 5.6. 7 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrometresi.

EK-7



Şekil 5.7. 8 nolu bileşiğin ^{1}H-NMR spektrometresi.

EK-8


SETARAM
SETSYS Evolution - 1750
Figure:
Experiment: S-17
19/09/2013
Procedure: cal (Zone 1)
Crucible: Al2O3 100 µl
Carrier gas: Ar - Coeff. : 1
Mass (mg): 10.3
#Smoothing#/%
d#Smoothing#/mg/min
0.0
-2.5
-5.0
-7.5
-10.0
-12.5
-15.0
-17.5
-20.0
-22.5
0.05
-0.00
-0.05
-0.10
-0.15
-0.20
-0.25
Delta : -0.7571 %
Delta : -0.9530 %
Delta : -18.1788 %
Peak :199.8210 °C
Onset Point :163.7937 °C
Area /mg.s : 0.0077
Peak :46.1516 °C
Onset Point :46.1505 °C
Area /mg.s : -0.0014
Peak :435.6753 °C
Onset Point :318.1214 °C
Area /mg.s : 1.4097
Peak :704.2338 °C
Onset Point :654.2346 °C
Area /mg.s : 0.0396
Peak :796.5313 °C
Onset Point :764.0552 °C
Area /mg.s : 0.0048
Delta : -1.9547 %
Delta : -1.7940 %
100
200
300
400
500
600
700
800
Sample temperature/°C

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Selçuk Kaplan
Uyruğu : T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi : Üsküdar 19/06/1989
Telefon : 05063494034
Faks :
e-mail : Selcukkaplan89@gmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Samandıra Düz Lisesi, Sancaktape, İstanbul	2006
Üniversite	:	Selçuk üniversitesi, Selçuklu, Konya	2011
Yüksek Lisans	:	Selçuk üniversitesi, Selçuklu, Konya	devam
Doktora	:		