



**KİRAL BİLEŞİKLERİN ENANSİYOMERLERİNE
AYRIMI**

Esmâ KARACA KARADOĞAN

İLÂÇ ENDÜSTRİSİNDE AR-GE ve ÜRETİM ANABİLİM DALI

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Zeynep ÖZDEMİR**

Yüksek Lisans Tezi-2022

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

KİRAL BİLEŞİKLERİN ENANSİYOMERLERİNE AYIRIMI

Esmâ KARACA KARADOĞAN

**İlaç Endüstrisinde AR-GE ve Üretim Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Tez Danışmanı
Doç. Dr. Zeynep ÖZDEMİR**

**MALATYA
2022**

T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğüne

ETİK BEYANI

İnönü Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tez Yazım Kurallarına uygun olarak Doç. Dr. Zeynep ÖZDEMİR danışmanlığında hazırlayıp sunduğum “Kiral Bileşiklerin Enansiyomerlerine Ayrımı” başlıklı Yüksek Lisans tezim içinde elde ettiğim verileri, bilgileri, belgeleri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu, tezimde yararlandığım eserlere bilimsel kurallara uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi, tezimin özgün olduğunu, tezimin çalışma ve yazımında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığını, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. 08/01//2023

İÇİNDEKİLER

ÖZET	vii
ABSTRACT.....	viii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	ix
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İzomeri	3
2.1.1. Optik İzomer (Enansiyomerler)	3
2.1.2. Enansiyomerin Biyolojik Aktiviteye Ektisi	4
2.2. Enansiyomerlerin Ayırımı	7
2.2.1. Sentetik Yöntemler	8
2.2.2. Analitik Yöntemler	10
2.3. Tedavide Kullanılan Asimetrik Merkez Taşıyan İlaçlar.....	28
2.4. Kiral İlaç Örneği Olarak Mikonazol ve Etkileri	29
2.4.1. Mikonazolün Yapısı.....	29
2.4.2. Mikonazol Bileşiğinin Biyolojik Aktiviteleri	29
2.4.3. Mikonazol Türevi Azol Antifungaller ve Yapı-Aktivite İlişkileri.....	30
3. MATERYAL VE METOT	34
3.1. Kimyasal Çalışmalar.....	34
3.1.1. Materyal	34
3.1.2. Sentez Yöntemleri.....	34
3.1.3. Analitik Yöntemler	35
4. BULGULAR.....	38
4.1. Kimyasal Çalışmalar	38
4.2. Analitik Çalışmalar	39
5. TARTIŞMA	41
5.1. Sentez Çalışmaları	42
5.2. Enansiyomer Ayırım Çalışmaları ve Kromatogramların Yorumlanması	44
6. SONUÇ ve ÖNERİLER	48
KAYNAKLAR	49

EKLER.....	56
EK 1. Özgeçmiş	56
EK 2. Etik Kurul Yazısı	57



TEŐEKKÖR

Yüksek lisans çalışmalarım süresince her zaman sabırla karşılaştığım sorunlarda bana çözüm yolları bulan, yardımlarını hiçbir zaman esirgemeyen, sonsuz tecrübeleriyle bilime ve bilgiye ulaşmamda yol gösteren danışman hocam Doç. Dr. Zeynep ÖZDEMİR'e bilgi, deneyim ve önerilerinden yararlandığım, iyi niyeti ve yardım severliliğinden dolayı yakın arkadaşım Öğr. Gör. Beyzanur TUTUŐ'a laboratuvar çalışmalarına yardımcı olan Ar. Gör. Yaren Nur ZENNİ'ye sonsuz kere teşekkür ederim. Hayatımın her alanında sevgi ve desteğini esirgemeyen canım eşim Muhammet KARADOĞAN'a sonsuz kere teşekkür ederim.



ÖZET

Kiral Bileşiklerin Enansiyomerlerine Ayırımı

Amaç: Bu çalışma, mikonazol türevi kiral bileşiklerin enansiyomerlerine ayırımının yapılması ve enansiyomerik saflığı belirlenmesi ile kiral bileşiklerin farmakolojik aktivitelerini ve toksisitelerini değerlendirerek, analitik çalışmaların preparatif çalışmaya uyarlanabileceğini göstermek amacıyla yapılmıştır.

Materyal ve metot: Kiral bileşiklerin ayrılması için çeşitli yöntemler bulunur. Bu araştırmada antifungal farmakolojik etkisi olan mikonazol türevi dört farklı bileşiğin kiral ayrımı HPLC cihazı ile yapılmıştır. Sabit faz olarak Chiralpak AD kolonu hareketli faz olarak 0,2 ml/dakika akış hızında çeşitli oranlarda (h/h) metanol-n-hekzan karışımları kullanılarak enansiyomerler ayrılmıştır. Cihaza uyumlu dedektör yardımı ile analizi yapılan maddelerin maksimum absorsiyonda verdikleri dalga boyları tespit edilerek kromatogramlar elde edilmiştir. Bu kromatogramlar sabit fazı tanımamıza yardımcı olan ayırma kapasitesi (k_1 ve k_2), selektivite (α), etkinlik (teorik tabaka sayısı, N_1 ve N_2) ve rezolüsyon (R_s) kromatografi parametrelerini hesaplamamıza yardımcı olmuştur.

Bulgular: Çalışmada kullanılan bileşiklerden ikisi metanol/n-heksan (70:30) mobil faz Chiralpak AD kiral sabit fazda daha iyi ayırım sağlamışken diğer iki bileşik kullanılan kolon ve mobil faz sistemi ile enansiyomer ayrımı gerçekleşmemiştir.

Sonuç: Geliştirilen analitik HPLC yöntemi ile elde edilen kromatografik sonuçlar, mikonazol türevi kiral bileşiklerin enansiyomerik ayrımı için optimum koşullar başarılı bir şekilde belirlenmiştir. Ayrıca Chiralpak AD kolonun kiral bileşiklerin preparatif ayırımında da uygulanabileceğini gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Antifungal, Enantiyomer, HPLC, Kiralite, Mikonazol

ABSTRACT

Separation of Enantiomers of Chiral Compounds

Aim: This study was carried out to show that analytical studies can be adapted to preparative studies by evaluating the pharmacological activities and toxicities of chiral compounds by separating miconazole derivative chiral compounds into their enantiomers and determining their enantiomeric purity.

Material and Method: Various methods exist for the separation of chiral compounds. In this study, chiral separation of four different miconazole derivative compounds with antifungal pharmacological effect was made by HPLC device. The enantiomers were separated by using methanol-n-hexane mixtures at various ratios (v/v) at a flow rate of 0.2 ml/min as the stationary phase with a Chiralpak AD column. With the aid of a detector compatible with the device, the wavelengths of the analyzed substances at maximum absorption were determined and chromatograms were obtained. These chromatograms helped us to calculate the separation capacity (k_1 and k_2), selectivity (α), efficiency (theoretical layer number, N_1 and N_2) and resolution (R_s) chromatography parameters that help us to identify the stationary phase.

Results: Two of the compounds used in the study, methanol/n-hexane (70:30) mobile phase Chiralpak AD provided better separation in the chiral stationary phase, while the enantiomer separation could not be achieved with the other two compounds using the column and mobile phase system.

Conclusion: Chromatographic results obtained by the developed analytical HPLC method, the optimum conditions for the enantiomeric separation of miconazole derivative chiral compounds have been successfully determined. It has also been shown that the Chiralpak AD column can be applied in the preparative separation of chiral compounds.

Keywords: Antifungal, Enantiomer, HPLC, Chirality, Miconazole

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACN	: Asetonitril
BEV	: Bevantolol
CE	: Kapiler Elektroforez
CEC	: Kapiler Elektrokromatografi
CGE	: Kılcal Jel Elektroforezi
CSP	: Kiral Sabit Faz
CZE	: Kılcal Bölge Elektroforezi
E.D	: Erime Derecesi
FDA	: The Food and Drug Administration
GC	: Gaz Kromatografisi
HPLC	: Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografisi
k'	: Alıkoyma Faktörü
MEKC	: Misel Elektrokinetik Kromatografisi
MIC	: Minimum İnhibitör Konsantrasyon
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
ROS	: Reaktif Oksijen Türlerinin
Rs	: Çözünürlük Faktörü
SFC	: Süperkritik Akışkan Kromatografisi
TFA	: Trifloroasetik asit
UV	: Ultraviyole
W	: Pik Taban Çizgisi Genişliği
α	: Ayırma Faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sekil No	Sayfa No
Şekil 2.1. İzomerlerin Sınıflandırılması	3
Şekil 2.2. Optik izomeri örneği	4
Şekil 2.3. Enansiyomerlerde oluşan aktivite farkının şematize edilmesi	6
Şekil 2.4. Sakinavir, nelfinavir, daklatasvir, sofosbuvir ilaç moleküllerinin yapısı.....	7
Şekil 2.5. Ampisilin, timolol, ibuprofen, kloramfenikol, diltiazem bileşiklerinin kimyasal yapısı	9
Şekil 2.6. α -, β -, ve γ - Siklodekstrinlerin Yapısı	12
Şekil 2.7. Pirkle ve Arkadaşları Tarafından Hazırlanan Pirkle Tip CSP'nin Yapısı.....	12
Şekil 2.8. Chiralpak QN-AX (8S,9R) ve Chiralpak QD-AX (8R,9S) Yapısı	13
Şekil 2.9. Polisakkarit Temelli CSP'nin Yapısı	14
Şekil 2.10. Selüloz Türevleri	15
Şekil 2.11. Etodolakın yapısı.....	17
Şekil 2.12. Bevantololün yapısı.....	18
Şekil 2.13. Protiyokonazol, (RS)-2-[2-(1-klorosiklopropil)-3-(2-klorofenil)-2-hidroksipropil]-2,4-dihidro-1,2,4-triazol-3-tiyon.....	19
Şekil 2.14. Protiyokonazol-destiyo, (2RS)-2-(1-klorosiklopropil)-1-(2-klorofenil)-3-(1H-1,2,4-triazol-1-il)propan-2-ol	19
Şekil 2.15. İmazalil yapısı	20
Şekil 2.16. Klinik olarak kullanılan bazı ilaçların kimyasal yapıları	21
Şekil 2.17. Unikonazol ve imazalilin yapısı	23
Şekil 2.18. Siprokonazol, Bromukonazol ve Dinikonazol Yapısı	26
Şekil 2.19. Mikonazolün kimyasal yapısı.....	29
Şekil 2.20. Biyoizosterizm ile elde edilen selenyum içeren antifungal bileşiklerin yapısı	31
Şekil 2.21. 1,4,5- ve 1,5- Süstitüe Triazol Türevleri	31
Şekil 2.22. Tiyazol Schiff Bazı Türevlerinin Sentezi	32
Şekil 4.1. 1-(Naftalen-2-il)-2-(1H-imidazol-1-il)etanol	38
Şekil 4.2. 1-(4-Klorofenil)-2-(1H-imidazol-1-il)etanol.....	38
Şekil 4.3. 1-(3,4-Diklorofenil)-2-(1H-imidazol-1-il)etanol.....	39

Şekil 4.4. 1-(4-Klorofenil)-2-(1 <i>H</i> -1,2,4-triazol-1-il)etanol	39
Şekil 5.1. Bileşiklerin sentez şeması	42
Şekil 5.2. Başlangıç maddesinin Br ile reaksiyon şeması	42
Şekil 5.3. Nafimidon hidroklorür, 2-bromo-1-(naftalen-2-il)etanon ile imidazolün N-alkilasyon reaksiyon şeması.	43
Şekil 5.4. Başlangıç maddelerinin keton sodyum borhidrür ile redüksiyon şeması.....	43
Şekil 5.5. Sentezlenen bileşikler ile CSP arasındaki etkileşmeler ((A) Amiloz CSP ile bileşiklerin alıcı hidrojen bağlarının önerilen etkileşimleri, (B) amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamit) yapısı ve (C) amiloz CSP arasındaki bileşiklerle π - π bağlarının önerilen etkileşimleri).....	44
Şekil 5.6. Bileşik 1'in C18 kolon ve normal kolon ile alınan kromatogramları.....	46
Şekil 5.7. n-heksan içeriğinin, alıkonma zamanı, seçicilik ve rezolüsyon üzerindeki etkisi.....	47

TABLÖLAR DİZİNİ

Tablo No	Sayfa No
Tablo 2.1. Tek enansiyomer versiyonuna geçilen rasemat ilaçlar	28
Tablo 4.1. Bileşikler amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) (Chiralpak AD) kiral stasyonier faz üzerinde enansiyomerlerine ayırımı.....	40



1. GİRİŞ

Kiral molekül, aynı molekül formülüne ve aynı bağlanış düzenine sahip, optikçe aktif atom içeren, ayna görüntüleri birbiri ile çakışmayan moleküllerdir. Kiral bir ilacın enansiyomerleri farklı biyolojik, farmakokinetik, farmakodinamik ve toksikolojik özellikler gösterebilir (1). Çünkü vücutta bulunan amino asitler, nükleik asitler, lipitler, karbonhidratlar, metabolik ara bileşikler ve diğer pek çok biyomolekül de kiraldir. Farklı özellikler gösteren kiral yapıdaki bu enansiyomerlerden biri istenilen terapötik etkiden, diğeri yan etkilerden sorumlu olabileceği gibi; biri aktif, diğeri inaktif veya her ikisi de farklı terapötik etkilere sahip olabilir. Enansiyomerlerin intestinal kanaldan absorpsiyonu, reseptörle etkileşmesi, plazma proteinlerine bağlanması, biyotransformasyonu ve vücuttan atılımı farklılıklar gösterebilir (2). Bu nedenle FDA (The Food and Drug Administration) ilaç olarak piyasaya girebilecek ilaç molekülleri rasemik karışımlardan oluşuyor ise, enansiyomerlerin etkilerinin ayrı ayrı incelenmesini zorunlu kılmaktadır (3). Bu konu ilaç araştırmaları alanında önemli bir araştırma konusudur.

Vücudumuz kiral biyolojik bileşikleri tanımaktadır. Enansiyomerlerin rasemik karışımlara göre çok daha etkilidir ayrıca saf haldeki enansiyomerlerin yan etkileri yok diyebileceğimiz kadar daha azdır. Son yıllarda enansiyomerik saf bileşiklerden oluşan farmasötik ve zirai ilaçlara, besin katkı bileşikler gibi yararlı kimyasal maddelere ihtiyaç her geçen gün artmaktadır. Saf izomerlerin sağladığı avantajlar ve güvenilir olmasından dolayı bu moleküllerin geliştirilmesi ve yenilenmesi için büyük bir çaba verilmektedir (4).

Rasemat halindeki ilaçların ruhsatlandırılabilmesi için sadece aktif enansiyomeri içeren, safsızlık olarak tanımladığımız diğeri enansiyomeri içermeyen preparatların hazırlanması gerekmektedir. Oysa geleneksel sentez yöntemleri sonucu rasemik karışımlar elde edilmektedir. Bu nedenle tek tek enansiyomeri elde etmek veya ayırmak güncel bir konudur. Stereospesifik sentezde kullanılan kiral bileşikler maliyetinin yüksek olması ve tek izomerin saf bir şekilde elde edilmesindeki zorluklar sebebi ile ilaç endüstrisi tarafından tercih edilen yol genellikle rasemik karışımların rezolüsyonudur. Fiziksel ve kimyasal özellikleri aynı olan enansiyomerlerin klasik ayırma yöntemleri ile ayrılması mümkün değildir (5).

Saf ilaçların elde edilmesi içi mali olarak büyük bir uğraş verilmektedir. Rasemik karışımları birbirinden ayırmak için kullanılan metodlar zor ve pahalı olduğundan spesifik metodların geliştirilmesi gerekmektedir. Kromatografi enansiyomerlerin ayrılması için en çok tercih edilen metodlardan bir tanesidir. Bu amaçla kiral adsorbentler kullanılır ve enantiyometrik ayrımlar kolay bir şekilde yapılabilir. Enansiyomerlerin analitik veya preparatif ayırımında ve her bir enansiyomerin optik saflığının tayininde Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi (High Pressure Liquid Chromatography- HPLC) yaygın olarak kullanılmaktadır (6).

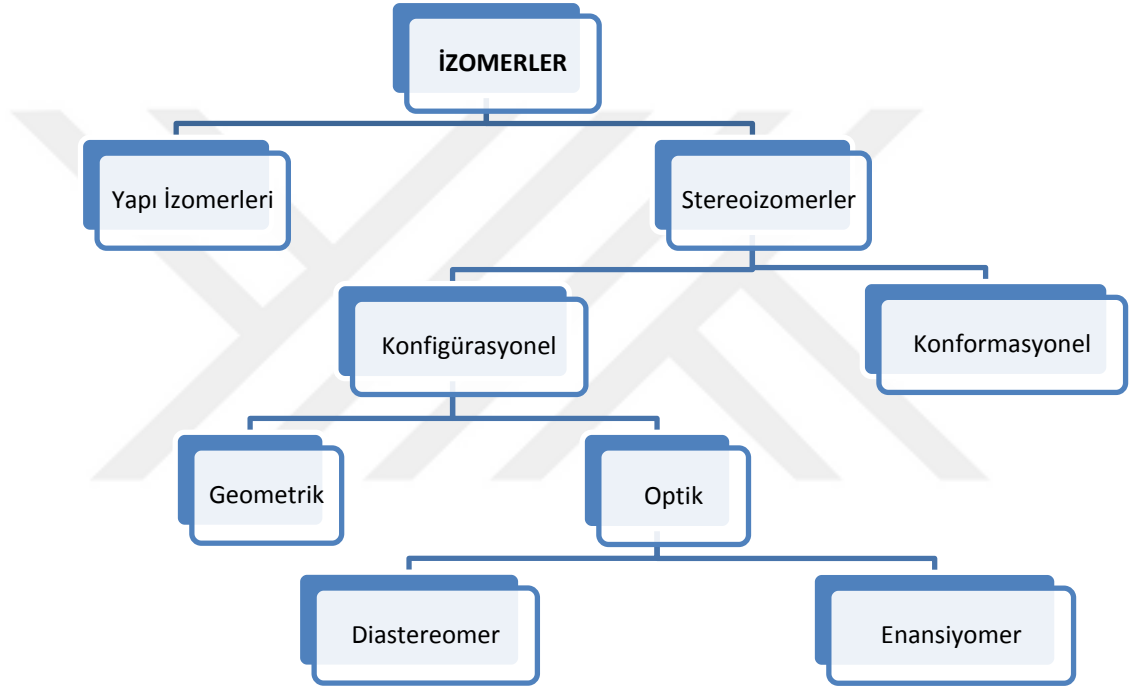
Kiral bileşiklerin ayrımlarının ve analizlerinin HPLC 'de gerçekleştirilmesi bazı artılar sağlamaktadır. Bunlar; sıcaklıkla bozulan kararsız bileşiklerin ayrımı daha iyi gerçekleştirilebilmesi, kiral sabit faz bulunması güç olmaması, gaz kromatografi yönteminin tam tersine hareketli faz ile birlikte seçiciliğin ayarlanabilir, büyük ölçekte kullanıma uygun olması şeklinde sıralanabilir. Literatürde kullanılan mevcut yöntemlerle rasemik bileşiklerin enansiyomerlerine ayrılması, analizlerin yapılması zorlu bir süreç değildir (7). Burada önemli olan kiral bileşiklerin enansiyomerlerinin yanı sıra oluşan bozunma ürünlerin, metabolitlerin ve safsızlıkların aynı zamanda tespit edilmesidir. Bu açı ile yaklaştığımızda yapılan analizlerde hem enantiyoseçimlilik sağlamak hem de kimyasal seçicilik sağlamak önemlidir.

Fakültemiz araştırma laboratuvarlarında yeni ve etkin ilaç moleküllerine ulaşmak amacıyla yapılan sentez çalışmalarında, tedavide kullanılan ve etkin bir ilaç molekülü olan, aynı zamanda kiral merkez de içeren mikonazol bileşiğinin türevlerinin sentezleri gerçekleştirilmekte ve antifungal aktivite tarama çalışmaları yapılmaktadır. Bu çalışmalar kapsamında mikonazole yapısal benzerlik gösteren arilalkilazol türevleri ve onların metabolitleri olabileceğini düşündüğümüz alkol türevlerinin sentez ve aktivite çalışmaları yapılmaktadır (8-10). Hedef moleküllerimizin mikonazole üstünlük sağlaması durumunda ileri araştırmalara geçebilmesi amacıyla ayrıca araştırma laboratuvarlarımızda enansiyomer ayrımı çalışmaları da yapılmaktadır. Bu bilgiler ışığında bu tez kapsamında, geleneksel yöntemlerden ziyade HPLC ile çevreye daha duyarlı daha hızlı ve eş zamanlı birçok analizin yapılabilmesi yöntemi mikonazol benzeri arilalkilazol türevi kiral bir bileşiğin enansiyomer ayrımı gerçekleştirilmiş olacak, literatüre daha hızlı ve güvenilir bir şekilde çalışma sunma imkanı elde edilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İzomeri

Kimyasal olarak izomerler, özdeş moleküler formüllere sahip moleküller veya çok atomlu iyonlar olarak tanımlanırlar. İzomerlerin her biri aynı sayıda ve türde atom taşımakla beraber bu atomların dizilişleri ya da uzaydaki düzenlemeleri farklıdır. İzomerler yapılarına göre stereoizomerler ve yapı izomerleri olmak üzere ikiye ayrılırlar (Şekil 2.1.).



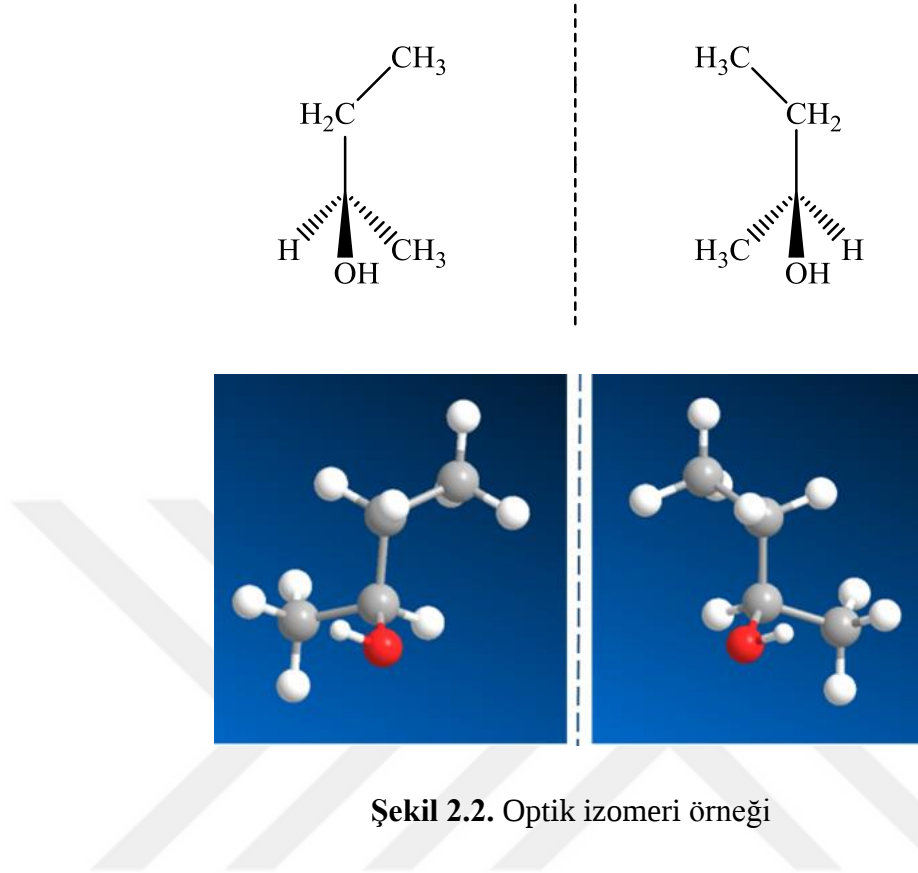
Şekil 2.1. İzomerlerin Sınıflandırılması

Yapı izomerleri, molekül formülleri aynı olup atomların birbirine farklı bir düzen ile bağlanmaları ile oluşan izomerlerdir. Geometrik izomerler ve optik izomerler olarak ikiye ayrılan stereoizomerlerde ise izomer bileşiklerin atomlarının üç boyutlu konfigürasyonu farklı düzendedir (11).

2.1.1. Optik İzomer (Enansiyomerler)

Birbirinin ayna görüntüsü olan ve birbirleriyle üst üste çakışmayan stereoizomerlere enansiyomer denir. Optik izomerin varlığından söz edebilmek için molekülün yapısında bir kiral merkez (asimetrik merkez) bulunması gerekmektedir. Kiral

merkezi oluşturan atoma farklı fonksiyonel grup veya atomlar bağlıdır. Örneğin dört farklı grup ya da atoma bağlı olan karbon atomu bir kiral merkez oluşturur (Şekil 2.2.) (11).



Bunun dışında azot, fosfor ve kükürt atomlarında kiral merkez atomu olabilir. Bileşiğin yapısında birden fazla kiral merkez olduğu durumlarda enansiyomerlerin yanı sıra, birbirinin ayna görüntüsü olmayan ve üst üste çakıştırılmayan diastereoizomerleri oluşur. Enansiyomer ve diastereoizomer arasında bazı farklılıklar vardır. Diaseterizomerler birbirinden farklı fizikokimyasal özellikler gösteren bileşikler olduğu için kromatografi ile ayrılırken sabit fazın kiral olma zorunluluğu yoktur, akiral sabit faz ile ayrılabilirler. Enansiyomerler ise birbirinin aynısı olduğundan ve polarize ışığı çevirme yönleri ve optikçe aktif bileşiklerle karşılaştığındaki davranışları dışında tüm fizikokimyasal özellikleri aynı olduğundan ayrılması için kesinlikle kiral bir seçici bulunmalıdır. Enansiyomerler için kırılma indisleri, çözünürlükleri, erime noktası, kaynama noktası gibi fiziksel özellikleri birebir aynıdır, diastereoizomerlerde bu kriterler farklı olabilir (11).

2.1.2. Enansiyomerin Biyolojik Aktiviteye Ektisi

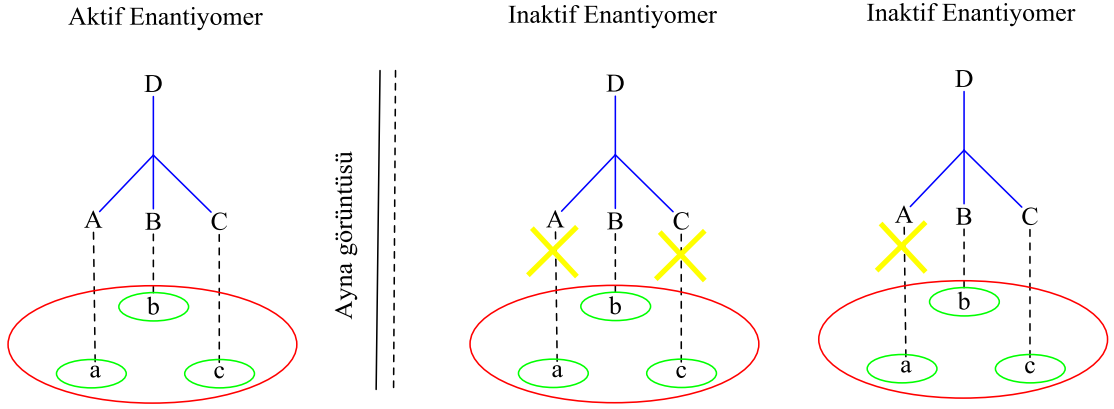
Enansiyomerler, biyolojik olarak farklı özellikler göstermektedir. Bunlar; koku, tat, toksisite ve farmakolojik etkiler olarak sıralanabilir. Koku bakımından

enansiyomerleri birbirlerinden farklı olan moleküle örnek verecek olursak limonen molekülünün (R)-enansiyomeri portakal kokusunun ortaya çıkmasını sağlarken (S)-limonen limon esansı oluşturmaktadır. Tat ve koku bakımından farklılık gösteren ikiyüz elliden fazla enansiyomer molekül çifti mevcuttur. Bazı moleküllerde enansiyomerlerden biri koku yayarken bir diğeri tamamen kokusuz olabilir (11,12).

Kiral ilaçlar farmakolojik ve toksikolojik olarak enansiyomerlerin biyolojik farklılık gösterdiği en kapsamlı ve somut alandır. Bu alandaki en bilinen örnek Talidomit olayıdır. 1954 yılında piyasaya sürülen Contegran adlı müstahzar hamilelerde bulantıyı bastırmak için kullanılmıştır. Piyasaya sunulmadan önce bazı toksikolojik durumlarla karşılaşılsa da fareler üzerinde yapılan in vivo deneyler neticesinde herhangi bir sorunla karşılaşmadığı için ilaç piyasaya sürülmüştür. İlacı kullananlarda uyuma isteği, halsizlik, deride alerji, mide ağrıları, uyuşma, sinirlilik, vertigo gibi yan etkiler ortaya çıkmıştır. Bu belirtilerin dışında, ilacı kullananların doğan bebeklerinde normal insanlara göre boyların daha kısa olması, işitme ve görme engeli, yüzgeç benzeri kol ve bacakların oluşması (fokomeli) gibi anomaliler meydana gelmiştir (13). Yapılan araştırmalarda talidomitin (R)-enansiyomeri sedatif etki gösterirken, (S)-enansiyomeri teratojenik etki gösterdiği bulunmuştur. Bu durum kiral merkez taşıyan moleküllerin ilaç olarak onay alabilmesi için mutlaka enansiyomerlerine ayrılmasının gerekli olduğunu göstermiştir (13).

Vücudumuzda yer alan pekçok endojen madde de kiral yapıdadır. Bunların bir örneği olan epinefrinin enansiyomerlerinden bir tanesinin diğerine kıyasla kan basıncını onbeş kat artırdığı bilinmektedir (14). 1926 yılında İskoç farmakolog Arthur Robertson Cushny farmakolojik açıdan enansiyoseçiciliğin öneminden bahsetmiş ve yaptığı geniş çaptaki çalışmalarda kiral moleküllerin enansiyoseçiciliğin farmakolojik etki ve metabolizma yönünden önemini vurgulamıştır. Bu çalışmaların üzerine enzim ve reseptörlerin enansiyomerleri seçebilmesi ve bunun sonucundaki farmakolojik etkileri ile ilgili tartışmalar gündeme gelmiştir (15).

Easson ve Stedman, enansiomerlerin ilaç-reseptör etkileşmesini 1933 yılında kolay ve anlaşılır bir modelle anlatmışlardır. Bu modele göre bileşikte bulunan üç grup, kiral reseptör üzerindeki mevcut tamamlayıcı kısımlarla etkileşmektedir. Üç boyutlu düzlemdeki yönelmesi dikkat edildiğinde aynı bileşiğe ait üç grup reseptöre net olarak yerleşmektedir. Ancak diğer enansiyomer molekülü incelendiği zaman reseptör ve bileşiğin birbiriyle uyumlu olmadığı ve dolayısıyla da etkileşimin yaşanmadığı gözlenmektedir (Şekil 2.3.) (16).

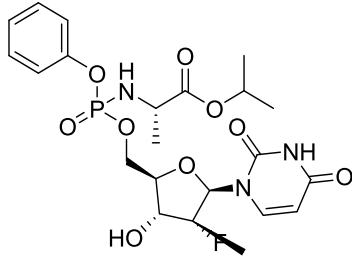


Şekil 2.3. Enansiyomerlerde oluşan aktivite farkının şematize edilmesi

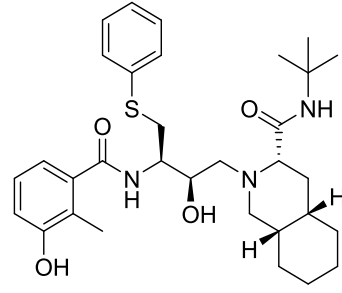
Bundan dolayı enansiyomerlerin biyolojik etkilerinin farklı olduğu görülmektedir. Buna göre oluşması muhtemel afinite çeşitleri ve sonuçlarına bakacak olursak, iki enansiyomer aynı reseptör ile etkileşmek isteyebilir ancak biri diğerine kıyasla daha iyi afinite gösterebilir. İki enansiyomer aynı hedefe aynı afinite gösterir fakat sinerjistik etki olmayabilir. İki enansiyomer farklı reseptörlere bağlanarak farklı terapötik etki gösterebilir. Enansiyomerlerden bir tanesi istenen etkiyi gösterebilir, diğeri yan etkilere neden olabilir. İnaktif enansiyomer aktif olan enansiyomerin yan etkilerini meydana çıkarabilir (16).

Saf kiral ilaçlar, rasemik haldeki ilaçlarla karşılaştırıldığında daha umut verici ve güvenilir olmaları nedeniyle, ilaç piyasasında hızlı bir şekilde büyüme göstermiştir. Kiral moleküllerin enantiyoseçici üretimleri için yeni metotların geliştirilmesi ile birlikte, enantiyoseçici analitik metotların dikkate alınması gerekmektedir. Bu analitik metotlar geliştirilirken bir enansiyomerin varlığında diğeri enansiyomerin çok az oranlardaki safsızlığının tespit ve tayin edilmesi de çok önemli ve dikkat edilmesi gereken bir durumdur (17).

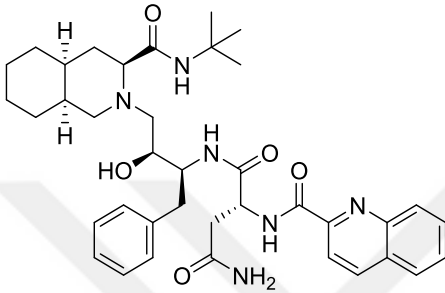
Şu anda mevcut birçok kiral ilaç bulunmaktadır. AIDS hastalığında uygulanan tedavideki antivirallerden, sakonavir, nelfinavir ayrıca hepatitte uygulanan, daklatasvir, sofosbuvir, ledipasvir, kiral bileşiklere örnektir (Şekil 2.4.).



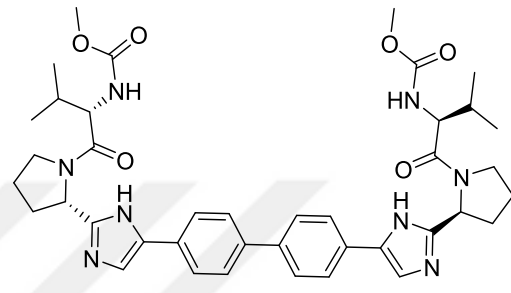
Sofosbuvir



Nelfinavir



Sakinavir



Daklatasvir

Şekil 2.4. Sakinavir, nelfinavir, daklatasvir, sofosbuvir ilaç moleküllerinin yapısı

Birçok rasemik ilacın etkileri araştırılıp incelenmektedir. Saf enansiyomer moleküllerin sentezlenmesi ve ilaç formülasyonlarında yer almasının bazı artıları vardır. Karışım halindeki enansiyomerler yerine bileşiğin tek bir enansiyomeri formülasyonda yer alacak, tek enansiyomer yer alan formülasyonda tedavinin seyrini, farmakolojik, toksikolojik, farmakokinetik etkileri analiz etmek daha sağlıklı sonuçlar doğurmuş olacak. Ayrıca ilaçların toksik etkisi, hastaya uygulanacak dozun miktarı ve ilaç-ilaç etkileşimlerinde düşüş gözlenmiş olacaktır. Bu sebeble, günümüzdeki ve gelecekteki araştırmalar için rasemik ilaçların analiz yöntemlerinin geliştirilmelisi, saf ilaç üretimi, rasemik ilaç ayrımı önemlidir.

2.2. Enansiyomerlerin Ayrımı

Rasemik haldeki bileşiklerin ayrılmasında ve analizinde temel olarak sentetik ve aletli analiz metodlar kullanılmaktadır.

Bu yöntemler aşağıdaki şekilde sıralanır:

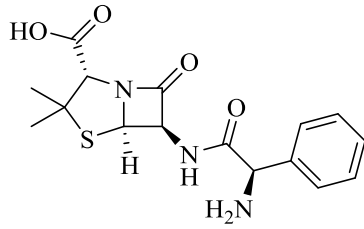
- ✓ Sentetik Yöntemler
- Kristalizasyon
- Tercihli kristalizasyon

- Diastereomer kristalizasyonu
- Kinetik Ayırma
- Enzimatik
- Kimyasal
- Asimetrik Sentez
- ✓ Aletli Analiz teknikleri
- Gaz kromatografi
- Yüksek basınçlı (performanslı) sıvı kromatografi
- Süperkritik Akışkan Kromatografi
- Kapiler elektroforez
- Kapiler elektrokromatografi

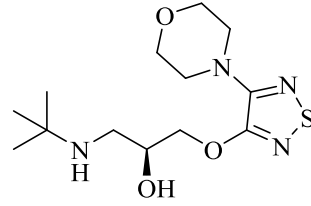
2.2.1. Sentetik Yöntemler

Kristalizasyon, rasemik moleküllerin enansiyomerlerine ayrılması için laboratuvar üstünden imalat ölçeğine kadar yaygın olarak kullanılmaktadır. En yaygın olarak kullanılan çözünürlük yöntemi, enansiyomerlerin kristalli diastereomerik tuzlarının ve optik olarak aktif çözücü maddelerin oluşturulması ve ayrılmasıdır (18).

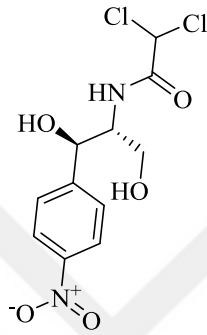
Diastereomerik tuzlar, sırasıyla enansiyomerik asitler ve bazlarla veya kiral çözücü bazlar ve asitler arasında oluşturulur. Enansiyomerlerin aksine, diastereomerler ayna simetrisi göstermezler ve bunun sonucu olarak da çözünürlük dahil olmak üzere farklı fizikokimyasal özelliklere sahiptirler. Çözünürlükteki bu farklılık, iki diastereomerin kristalizasyon yoluyla ayrılmasını mümkün kılmaktadır. Ayrıca, çözünürlükteki farkın boyutu ayırmanın etkinliğini belirler. Bu yöntemle ampisilin (antibiyotik), timolol (betabloker), ibuprofen (antienflamatuvar), kloramfenikol (antienfektif), diltiazem(kalsiyum antagonisti) gibi bazı ilaçlar ayrılabilmiştir (Şekil 2.5.).



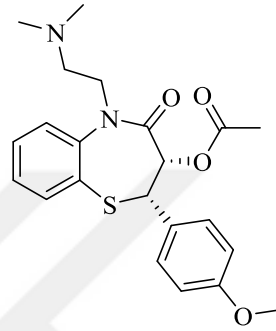
Ampisilin



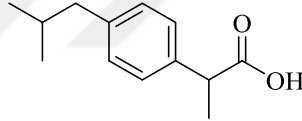
Timolol



Kloramfenikol



Diltiazem



Ibuprofen

Şekil 2.5. Ampisilin, timolol, ibuprofen, kloramfenikol, diltiazem bileşiklerinin kimyasal yapısı

Bu ilaçların üretimi için bahsettiğimiz gibi ortama ayrımı sağlayan kiral molekül eklenir. Örneğin ibuprofen ilacı için L-lisin kullanılır ve ibuprofen D-lisinat ile İbuprofen L-lisinat tuzları elde edilmiş, çözünürlüğü yüksek olan L bileşiğin ayrımı sağlanmıştır (18).

Kristalizasyon metodları uğraştırıcı, vakit harcayan ve otomatize edilemeyen metodlardır. Eklenen kiral ayırıcı molekülün son bileşiğe kontamine olma ihtimali bulunmaktadır. Bu nedenle farklı ayırım teknikleri geliştirilmiştir. Bunlardan biri de kinetik ayırma yöntemidir. Enstrüman kullanılmayan bu yöntemin esası iki enansiyomerin kiral bileşik varlığında hızları farklı olacak şekilde reaksiyon vermesidir. Kiral bileşik olarak ortama enzim (lipazlar) veya mikroorganizma (bakteri ve mayalar)

gibi bir biyokatalizör veya kiral bir metal kompleks gibi kemokatalizör eklenmektedir. Böylece rasemik karışımdaki enansiyomerlerden birinin diğerinden daha hızlı ürüne dönüşmesi sağlanır. Bu yöntemin de yine dezavantajları bulunmaktadır. Yöntem maliyeti yüksek, ortam şartlarından etkilendiğinden dolayı kararlılığı düşük ve tekrarlanabilirliği güçtür. Ayırma işleminde katalizlenme olayı enzimler tarafından meydana geliyor ise bu duruma da yöntem enzimatik kinetik ayırım adını almaktadır (19).

Bir başka enansiyomer ayırım yöntemi olan asimetrik sentez, kiral havuz, kiral yardımcı maddeler, asimetrik katalizörler ve enzimlerin kullanıldığı yöntemleri içerir. Bu yaklaşımla büyük miktarda enansiyomerin ekonomik olarak üretilmesine olanak sağlanmasına rağmen, enansiyomerlerden yalnızca biri genellikle doğal kiral kaynaktan elde edilebilmektedir. Bu durum her iki enansiyomerin gerekli olması halinde, her enansiyomer için en az iki tür kiral kaynağın gerekli olduğu anlamına gelmekte, ancak bazen ikisini birden elde etmek zor olduğundan bu da yöntemin kullanımını kısıtlamaktadır (19).

2.2.2. Analitik Yöntemler

Enansiyomerler, HPLC, gaz kromatografisi (GC), süperkritik akışkan kromatografisi (SAK), kapiler elektroforez (CE) ve kapiler elektrokromatografi (KEK) gibi aletli analiz yöntemleri kullanılarak da tayin edilebilir ve ayrı ayrı elde edilebilir.

HPLC ile Enansiyomer Ayırımı

Bu yöntemler arasında, HPLC ile kiral sabit fazların (CSP) kullanıldığı doğrudan ayırım, hem analitik hem de hazırlayıcı amaçlar için uygulanabilen basit ve pratik bir yöntem olarak literatürde önemli bir yer almaktadır (20). Son zamanlarda, kiral bileşiklerin saflığı çoğunlukla üç ana yöntem ile tayin edilmektedir. Bunlar nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi, GC ve kiral sabit fazların kullanıldığı HPLC teknikleridir. Bunlar arasında en sık kullanılanı HPLC yöntemidir. Belirlemelerin %50'den fazlası kiral HPLC ile gerçekleştirilmiştir. Otuz yıl önce enansiyomer seçici polimerizasyon çalışmalarında, enansiyomerik fazlalık yalnızca düşük hassasiyete sahip bir polarimetre ile ölçülen optik saflık ile tahmin edilebilirdi. Bu belirleme yöntemi, neredeyse tamamen yukarıdaki üç yöntemle değiştirilmiştir (21). HPLC yöntemindeki son ilerleme, verimli CSP'lerin ve son derece hassas dedektörlerin geliştirilmesinden kaynaklanmaktadır. HPLC ile yapılan analizlerde enansiyomerler CSP'ler üzerinde farklı etkileşimde bulunurlar. Enansiyomerler HPLC ile ayrıldıklarında tipik bir kromatogram elde edilir. Burada (-)-izomer önce (-)-izomeri ayrıştırır, ardından (+)-izomer ve tam

taban ayrımı elde edilir. Bir CSP'nin tanıma yeteneği alıkoyma faktörü (k), ayırma faktörü (α) ve çözünürlük faktörü (R_s) olmak üzere üç parametre kullanılarak nicel olarak değerlendirilebilir (20). Bunlardan birincisi enansiyomerin kolon üzerindeki kalıcılığını ölçmek için kullanılan bir parametre olan alıkonma/kapasite faktörüdür (k). Kapasite faktörünü enansiyomerlerin yapısı, sabit faz ve hareketli fazın türü belirler. Bir diğer parametre olan seçicilik/ayırım faktörü (α) iki enansiyomer pikin maksimumu arasındaki zamanın veya mesafenin bir ölçüsüdür. Kısacası kapasite faktörlerinin oranıdır. Ayırım faktörü (α): $\alpha = k_2 / k_1$. Bu formülde k_1 birinci enansiyomerin kapasite faktörüken k_2 ise ikinci enansiyomerin kapasite faktörüdür. Üçüncü parametre olan rezolüsyon/çözünürlük faktörü (R_s) pikler arası ayırımın bir ölçüsüdür ve bir kolonun ilgili pikleri ayırma kapasitesini ifade eder. Böylelikle rezolüsyon ne kadar yüksek olursa iki pik arasındaki taban çizgilerinin ayrımı o kadar iyi olur (22). Rezolüsyon, “Etkinlik/Teorik Plaka Sayısı (N)”, “Seçicilik/Ayırım Faktörü (α)” ve “Alıkonma/Kapasite Faktörü (k)” parametreleri ile ilgilidir. Bu ilişki şu şekilde formülize edilir:

$$\text{Teorik tabaka sayısı (N): } N_1 = 16(t_1 / w_1)^2 \quad N_2 = 16(t_2 / w_2)^2$$

t_1 : Birinci enansiyomere ait pikin enjeksiyon noktasına uzaklığı (cm)

t_2 : İkinci enansiyomere ait pikin enjeksiyon noktasına uzaklığı (cm)

w_1 ve w_2 : Birinci ve ikinci enansiyomere ait pik genişliği (cm)

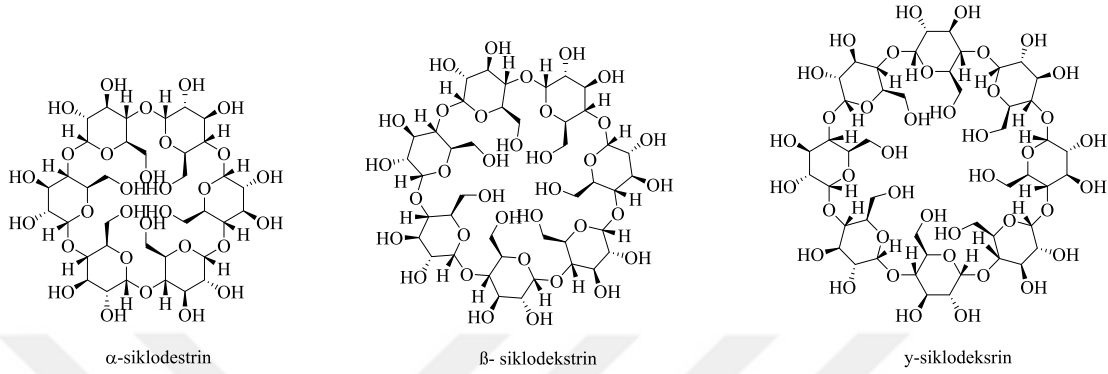
Rezolüsyon faktörü (R_s): $R_s = 2(t_2 - t_1) / w_1 + w_2$

Rasemik karışımların HPLC cihazında ayırım ve analizinin yapılması bazı avantajları sağlar; sıcaklık durumundan etkilenen kararsız bileşiklerin ayrımı gerçekleştirilebilir, geniş aralıkta istenilen kiral sabit fazın temin edilmesi, gaz kromatografisi ve süper akışkan kromatografi metodlarına kıyasla hareketli faz ile birlikte enantiyoseçiciliğin ayarlanabilmesi, büyük ölçekte kullanıma uygun olmasıdır.

Enansiyomerlerin ayrılmasında **kiral sabit fazlar (KSF, CSP)** ile kiral kolonlar bu sistemin ana bileşeni niteliğindedir. CSP’ler akiral katı bir destek maddesi üzerine kiral bir molekülün kimyasal bağlarla bağlanması sonucu elde edilirler ve enansiyomerik rezolüsyonda çok önemli bir yere sahiptirler (23). Piyasada en çok tercih edilen ve kullanılan CSP’ler:

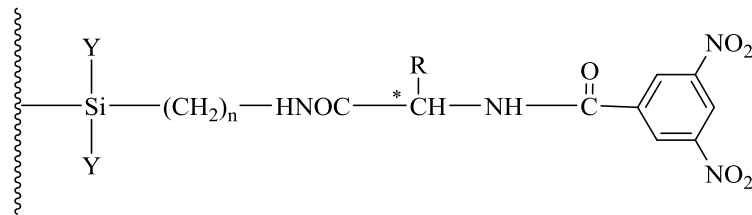
Siklodekstrin bazlı CSP’ler: Siklodekstrinler, 6, 7 ve 8 üyeli toroidal şekillere sahip siklik oligosakkaritlerdir. Glikoz birimlerinin 6 pozisyonundaki birincil hidroksil grupları, toroidin daha dar açıklığının çevresinde yer alır. 2 ve 3 konumlarındaki ikincil hidroksi grupları, boşluklarının karşısındaki daha geniş açıklığı hizalar. Polar hidroksi grupları siklodekstrinlerin dışında olduğundan, iç boşluk hidrofobiktir. Siklodekstrinler

ve türevleri, kapiler elektroforezde kiral hareketli fazlar ve HPLC'de kiral durağan fazlar için kullanılmıştır. HPLC için çok çeşitli siklodekstrin bazlı CSP'ler ticarete sunulmuş ve kiral bileşiklerin analitik olarak ayrılması için yaygın olarak kullanılmıştır (Şekil 2.6.). Ancak düşük yükleme kapasitelerinden dolayı, preparatif ayırma için çok kullanışlı değildirler (24).



Şekil 2.6. α -, β -, ve γ - Siklodekstrinlerin Yapısı

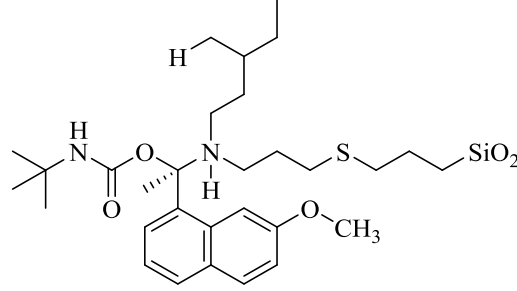
Donör-Akseptör tipi CSP'ler: 1979'da Pirkle ve House tarafından tanıtılmıştır (Şekil 2.7.). 3,5-dinitrobenzoil-fenilglisin bazlı bu tür CSP ilk olarak HPLC için bir CSP olarak ticarileştirilmiştir. Bu CSP'ler ayrıca enansiyomerlerin analitik veya hazırlayıcı ayırımı için ticari olarak mevcuttur. Donör-akseptör tipi CSP'ler için, elektronca zengin ve elektronca eksik aromatik gruplar arasındaki π - π etkileşimi, hidrojen bağı, dipol-dipol ve sterik etkileşimlere ek olarak kiral bileşiklerin ayırt edilmesinde önemli bir rol oynar. Genellikle normal faz koşulları altında kullanılır, ancak ters faz koşulları altında kiral ayrımlar da kullanılabilir (25).



Şekil 2.7. Pirkle ve Arkadaşları Tarafından Hazırlanan Pirkle Tip CSP'nin Yapısı

Anyon değişim tipi CSP'ler: 1996'da Lindner ve Lammerhofer, önemli farmasötikler ve asimetrik sentez için verimli kiral yardımcıları dahil olmak üzere kiral asidik bileşikler için mükemmel tanıma yeteneklerine sahip olan Cinchona alkaloid türevlerine dayanan anyon değişim tipi CSP'leri geliştirmişlerdir. Kinin ve kinidin 9-O-tert-Bütilkarbammat türevleri, sırasıyla Chiralpak QN-AX ve Chiralpak QD-AX ticari isimleri altında CSP'ler

olarak ticarileştirilmiştir (Şekil 2.8). Bu kiral seçiciler 5 µm küresel silika jel üzerinde sabitleştirilmiştir. Kuiniklidin kısmının protonize olmuş tersiyer azotu ile anyonik analitlerin etkileşmesi kiral seçicinin enansiyomeri tanıma mekanizmasıdır. Bu iyon eşleşmesine ek olarak hidrojen bağı, dipol-dipol, π - π etkileşmesi, hidrofobik etkileşme ve sterik etkileşim olan moleküller arası etkiler eşlik eder (26).



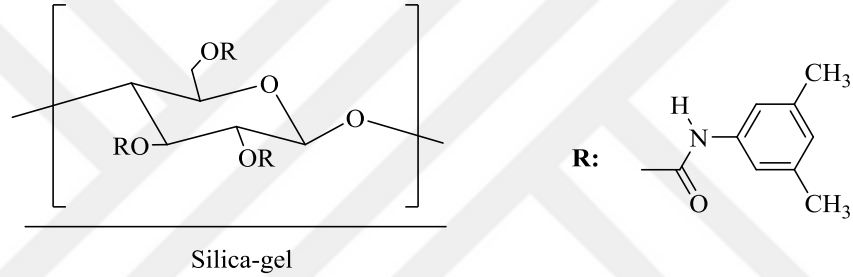
Şekil 2.8. Chiralpak QN-AX (8S,9R) ve Chiralpak QD-AX (8R,9S) Yapısı

Sentetik polimer bazlı CSP'ler (Moleküler baskılı tip CSP'ler): Enantioselektif bağlanma boşluklarına sahip çapraz bağlı polimer jellerdir. Amino asitler, peptitler, hormonlar ve antibiyotikler gibi biyolojik olarak aktif bileşiklerin çözünürlüğü için çok sayıda moleküler baskılı tip CSP kullanılmıştır. Poli(met)akrilamid bazlı CSP'ler, Polimetakrilat bazlı CSP'ler, Poliamid bazlı CSP'ler, Tartardiamid bazlı CSP'ler sentetik polimer bazlı CSP'lerdir (27).

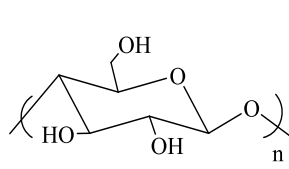
Doğal polimer bazlı CSP'ler (Protein bazlı CSP'ler): Proteinler, monomerik birim olarak α -amino asitlerden oluşan ve kiral molekülleri ayırt etme yeteneğine sahip, doğal olarak oluşan polimerlerdir. Bazı enzimlerin, örneğin hidrolazların, kataliz sırasında yüksek bir enansiyomer seçimi sergiledikleri iyi bilinmektedir. Ticari olarak mevcut olan çeşitli protein bazlı CSP'ler bulunmaktadır. Örneğin sığır serum albümini, insan serum albümini, α -asit glikoproteini, tavuk yumurta beyazından elde edilen ovomukoid, avidin ve selobiyohidrolaz I'dir. Protein bazlı CSP'ler biyolojik olarak aktif bileşikleri ters faz koşulları altında türevlendirme olmaksızın doğrudan çözebildiğinden, bu CSP'ler vücuttaki kiral bir ilacın biyoanalitik izlenmesinde vazgeçilmez bir rol üstlenir. Ancak, protein bazlı CSP'ler, sınırlı sayıda tanıma bölgesi nedeniyle preparatif amaçlar için kullanışlı değildir. Ayrıca stabilite de bir problemdir, çünkü bazı proteinler konformasyonlarını kolayca değiştirebilmektedir (28).

Polisakkarit bazlı CSP'ler: Kiral HPLC ile tayinlerin %90'ı bu sabit fazlar kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Selüloz ve amiloz gibi polisakkaritler yeryüzünde en bol bulunanlardır ve optik olarak aktiftirler. Doğal polisakkaritlerin kendileri enansiyomerleri

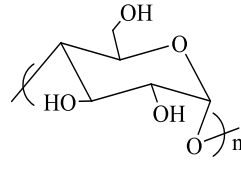
ayırt edebilir ve sıvı kromatografi ile birkaç rasemik bileşiği ayırabilir. Ancak, tanıma yetenekleri pratikte CSP'ler olarak kullanılmak için yeterli değildir. 1980'lerden beri, kiral tanıma yeteneklerini değerlendirmek için çok sayıda selüloz esteri hazırlanmıştır. Bunlar arasında, selüloz benzoat ve analogları, silika jel üzerine kaplandıklarında HPLC için CSP'ler olarak yüksek kiral tanıma gösterirler (Şekil 2.9. , 2.10.). Benzoat ve karbamat türevlerinin kiral olarak tanıma yetenekleri, fenil grupları üzerindeki süstitüentlere bağlıdır. Alkil grupları gibi elektron veren süstitüentler veya halojenler gibi elektron çeken süstitüentler taşıyan selüloz fenilkarbamatlar, süstitüe edilmemiş olandan daha yüksek kiral tanıma sergiler. Süstitüentlerin, endüktif bir etki yoluyla karbamat grubunun polaritesini etkilediği ve selüloz türevleri ile rasematlar arasındaki etkileşim modunu değiştirdiği bilinmektedir. Bu polisakkarit bazlı CSP'ler ayrıca süper kritik akışkan kromatografisi için de kullanılabilir (29).



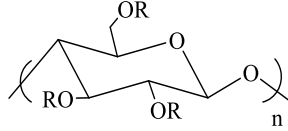
Şekil 2.9. Polisakkarit Temelli CSP'nin Yapısı



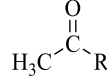
Selüloz (β -1,4)



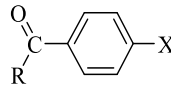
Amiloz (α -1,4)



Selüloz triasetat

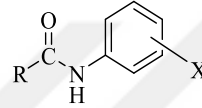


Benzoil selüloz



X: -H; -CH₃

Selüloz karbamat



X: -H; 4-CH₃;
4-Cl; 3,5-CH₃

Şekil 2.10. Selüloz Türevleri

Crown eter tabanlı CSP'ler: Crown eter çerçevelerine uygun kiral birimlerin eklenmesiyle çeşitli taç eter tabanlı CSP'ler hazırlanmıştır. Bunlar arasında, optik olarak aktif binaftil ve tartarik asit birimleri taşıyan kiral crown eterler ve fenolik yalancı kiral crown eterler, CSP'ler olarak en başarılı şekilde kullanılmıştır (30).

Makrosiklik Antibiyotik Temelli Kiral Sabit Fazlar: Vankomisin, ristosetin A, teikoplanin ve teikoplanin aglikon, glikopeptid (aglikon) bazlı CSP'ler için ticari kiral seçiciler olarak mevcuttur. Bu fazlar, glikopeptitlerin (aglikon) silika jel üzerinde immobilizasyonu yoluyla kullanılmıştır. Makrosiklik glikopeptidler (aglikon), birkaç kiral boşluğa ve aromatik, hidroksil, amino, ester, karboksil ve amido grupları gibi çeşitli fonksiyonel gruplara sahiptir. Makrosiklik glikopeptidler (aglikon) üzerindeki işlevselliklerin çeşitliliği nedeniyle, bu CSP'ler çeşitli mobil faz modları ile kullanılabilir ve çok çeşitli rasematları ayırabilirler (31).

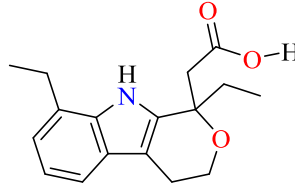
Ligand değişim tipi CSP'ler: 1971 yılında, enansiyomerlerin sıvı kromatografisi ile ilk temel çözünürlüğü, Davankov ve Rogozhin tarafından siklik bir amino asit olan L-prolin'in poli(stiren-ko-divinilbenzen) üzerine immobilize edilmesi yoluyla geliştirilen bir ligand-değişim tipi CSP kullanılarak elde edildi ve sınırlı bir rasemat aralığını çözebildiğinden ve daha sonra geliştirilen CSP'lere kıyasla çalışma yöntemi oldukça karmaşık olduğundan, uygulanma sıklığı azalmıştır (32).

Sıvı kromatografik tekniklerle enansiyomerlerin ayrımı yapılırken üç farklı **hareketli faz** türü kullanılır. Bunlardan biri normal fazdır. Sulu ortamda kararsız olan veya az çözünen enansiyomer bileşikler için özellikle de büyük ölçekli ayırmalarda avantajlıdır. İkinci olarak polar organik fazlar kullanılır. Analiz sürelerini daha çok kısaltır ve kromatografide daha keskin pikler oluşur. Ayrıca sinyal/gürültü oranını azalttığından avantajlıdır. Bir diğer hareketli faz ise ters fazdır. Vücut sıvıları ile yapılan analizlerde daha iyi ayrımlar elde edilir. Doğrudan enjekte edilebilen vücut sıvıları streoseçici ilaç-reseptör ilişkilerini ortaya çıkardığı için tercih edilir (33).

Polarimetrik Dedektörler: Enansiyomerlerin ayırımında optik çevirme dağılımı ve dairesel dikroizm dedektörleri kullanılır. Çalışma prensipleri, polarize ışının optikçe aktif taneciklerle etkileşimine bağlıdır. Optik çevirme dağılımında, bileşiğin moleküler çevirmesinin dalga boyuna bağımlılığını ölçer. Optik çevirme, herhangi bir dalga boyundaki bir maddenin d ve l dairesel polarize ışın için gösterdiği refraktif indeks farkına, yani "daireysel aralık" ($n_l - n_d$)ye bağlıdır. Bu değer dalga boyunun fonksiyonu olarak özel bir şekilde değişir. Tam tersi olarak, optikçe aktif bir bileşiğin bu iki tip dairesel polarize ışık için gösterdiği molar absorbtiviteler farklıdır; dairesel dikroizm ise bu temele dayanır.

Polarimetrik dedektörler kiral bileşiğin düzlem polarize ışığın artı veya eksi yönde çevrilmesiyle ilgili bilgi vermektedir. Polarimetrik dedektörler, yalnızca optik olarak aktif moleküllerde kullanılmaktadır. UV dedektörde anlaşılmayan, absorbansı olmayan veya düşük oranlarda absorbansı olan moleküller eğer optik olarak aktifse bu dedektör kullanılarak tespit edilebilir, polarlıkları birbirinden farklı iki (veya bazen daha fazla) çözücü sistemlerinin kullanıldığı teknik olan gradient çalışmalarda tercih edilir. Araştırılan analitin optik saflığı hakkında bilgi sahibi olmamızı sağlar (34).

Enansiyomerlerin ayrımları ile ilgili HPLC'nin kullanıldığı pekçok çalışma bulunmaktadır. *Caccamese ve diğerleri* yaptığı çalışmada CSP kullanarak etodolak enansiyomerlerini doğrudan HPLC ile ayırmıştır (35). Etodolak (1,8-dietil-1,3,4,9-tetrahidropirano[3,4-b]-indol-1-asetik asit), rasemik bir karışım olarak pazarlanan nonsteroid antiinflamatuvar bir ilaçtır (Şekil 2.11.) (36).

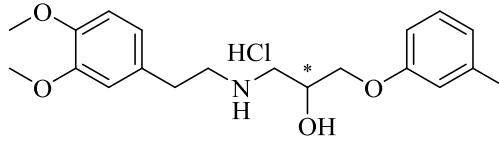


Şekil 2.11. Etodolakın yapısı

Etodolakın (+)-(S)-enansiyomerinin, ilacın prostaglandin sentetaz inhibe edici özelliklerinden ve dolayısıyla antiinflamatuvar etkisinin neredeyse tamamından sorumlu olduğu literatürde bildirilmiştir (37). Araştırmacılar yapmış oldukları bu enansiyomer ayırım çalışmasında etodolakın her bir enansiyomerini, türevlendirme ajanları olan (-)-1- α -feniletilamini kullanarak HPLC yöntemiyle, (+) -S-amfetamini ise GC yöntemi kullanarak diastereomerleri oluşturma yoluyla ayırmışlardır. Rasemik etodolak analizini ters fazlı HPLC prosedürleri kullanılarak gerçekleştirmişlerdir. Çalışmada ticari olarak mevcut CSP kolonlarının (Chiralcel OD veya Pirkle DNBPB) kullanıldığı basit, izokratik bir yöntem kullanılmıştır. Yapılan araştırmanın sonucuna göre Chiralcel OD kolonu kullanılarak elde edilen ayırma (α) ve çözünürlük (R) faktörlerinin, Pirkle tipi DNBPB fazı kullanılarak elde edilenlerden daha iyi olduğu belirlenmiştir. Mobil fazdaki 2-propanolün miktarının azaltarak çözünürlük faktörünün(k') en iyi değerlerini elde etmişlerdir. Yine çalışma sonucunda Chiralcel OD kolonu kullanarak 2-propanole az miktarda trifloroasetik asit (TFA) ilave edilince hem ayırma hem de çözünürlük faktörleri üzerinde faydalı bir etki sağladığı tespit edilmiştir. Mobil fazda TFA'nın varlığı, DNBPB fazı kullanıldığında yeterli ayırma ($\alpha = 1.08$) elde edilmesi için oldukça önemli bulunmuştur. TFA'nın analitin karboksil grubunun iyonizasyonunu baskılayarak etki ettiği ve böylece çözünen maddenin CSP'nin polar bölgeleriyle etkileşimini azalttığı gözlenmiştir. DNBPB fazı kullanıldığında (+)-(S)-enansiyomerinin (-)-(R)-enansiyomerine göre daha güçlü etkileşimi ortaya çıkınca bu durumu Pirkle tarafından önerilen kiral tanıma modeli ile açıklamışlardır. Üç eşzamanlı etkileşim öngörmüşlerdir. Buna göre analitin 8-etilfenil halkası ile CSP'nin 3,5-dinitrobenzoil grubu arasında bir π - π verici alıcı etkileşimi olduğu, analitin karboksilik asit grubunun -OH'si ile CSP'deki 3,5-DNB karboksamidin karbonil grubu arasındaki hidrojen bağı yaptığı ve analitin 1-etil grubu ile CSP arasında sterik bir etkileşim olduğu sonucuna varılmıştır (35).

Aboul-Enein ve Serignese normal ve ters selüloz kiral sabit fazlar üzerinde HPLC ile bir beta-bloker bileşiği olan bevantolol bileşiğinin doğrudan enantioselektif ayırımını yapmışlardır (38). Kromatografik ayırım için kiral durağan faz olarak Chiralcel OD (%100

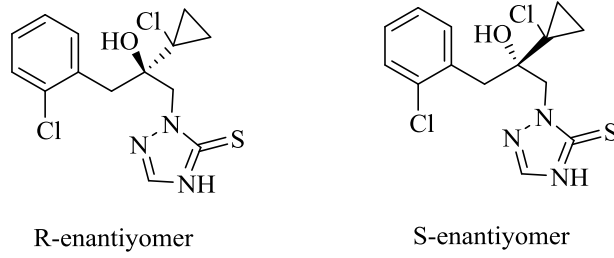
metanol-%0.2dietilamin) ve Chiralcel OD-R (sodyum perklorat: asetonitril) (50: 50) v/v) kullanmışlardır.



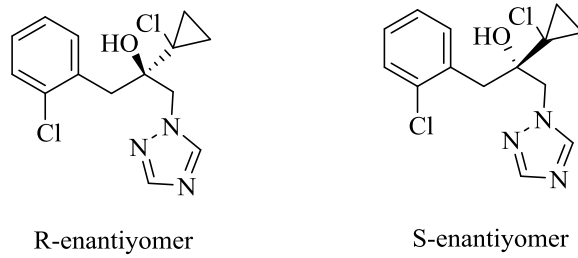
Şekil 2.12. Bevantololün yapısı

Araştırmacılar bu çalışmada hareketli fazdaki düz ve dallı zincirli alifatik alkollerin bevantololün stereoselektif ayrımı üzerinde etkili olduğunu anlamışlardır. Primer, sekonder ve tersiyer alkoller içeren mobil fazlar için bevantolol enansiyomerlerinin ayırma (α) ve çözünürlük (R) faktörleri hesaplamışlardır (38). Bu parametreler, primer alkollerin, yani 1-bütanol>1-propanol ve 2-metil-1-propanol>etanol>metanolün karbon zinciri uzunluğundaki artışla doğru orantılı olmuştur. Dallanmış zincirli sekonder ve tersiyer alkoller, ayırma faktörü (α) değeri için aynı ilişkiyi, ancak 2-propanol çözünürlük faktörü (Rs) için ters sırayı göstermiştir. Bu sonuçlar, alkollerin değiştiriciler olarak hareket ettiğini ve esas olarak hidrojen bağı ve ayrıca alkil karbon zinciri yoluyla van der Waals kuvvetleri ile CSP üzerindeki etkileşimli yerler için analit ile rekabet ettiğini göstermiştir. Kullanılan Chiralcel CSP uzamsal düzende kiral boşluklara sahiptir. Mobil faz ve analit bu kiral boşluklara farklı yerleşir bu durum Rs ve k' arasındaki farka neden olduğu çalışmada belirtilmiştir. Sonuç olarak iki farklı kiral sabit faz kolonunda bevantolol enansiyomerlerinin kromatogramları elde edilmiştir. Chiralcel OD-R kolonunda (+)-R-Bevantolol 8.14'de, (-)-S-Bevantolol 10.35'de; Chiralcel OD kolonunda ise (+)-R-Bevantolol 9.15'de, (-)-S-Bevantolol 13.53'de pik göstermiştir (38).

Bir diğer araştırılan kiral molekül protiyokonazol, Bayer Company tarafından geliştirilen geniş spektrumlu triazol tiyon fungusit türüdür (39). Protiyokonazol-destiyo, protiyokonazol'un ana metabolitidir (Şekil 2.13. ve Şekil 2.14.). Liu ve Ding bu çalışmada protiyokonazol ve protiyokonazol-destiyo'nun enansiyomerlerinin ayrımını, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile çeşitli kiral durağan fazlar üzerinde gerçekleştirmiştir (40).



Şekil 2.13. Protioykonazol, (RS)-2-[2-(1-klorosiklopropil)-3-(2-klorofenil)-2-hidroksipropil]-2,4-dihidro-1,2,4-triazol-3-tiyon

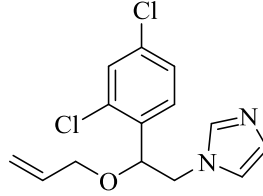


Şekil 2.14. Protioykonazol-destiyo, (2RS)-2-(1-klorosiklopropil)-1-(2-klorofenil)-3-(1H-1,2,4-triazol-1-il)propan-2-ol

Araştırmacılar protioykonazol ve protioykonazol-destiyo enantiomerlerinin ayrımı için Chiralpak IA, Chiralpak IB, Chiralpak IC, Chiralcel OD, Chiralpak AY-H, Chiralpak AZ-H ve LuxCellulose-1 kullanmışlardır. Protioykonazol ve protioykonazol-destiyonun eşzamanlı enansiyomerik ayrımı, mobil faz olarak n-heksan/IPA veya n-heksan/etanol ve metanol/su veya ACN/su kullanılarak 10-20-30°C sıcaklıklarında bahsi geçen kolonlarda gerçekleştirmişlerdir. Enansiyomerlerin elüsyon sırasını optik detektörle ölçmüşlerdir. Protioykonazol enansiyomerleri, Chiralcel OD kolonda n-heksan/IPA ve Chiralcel OJ-H kolonda n-heksan/etanol kullanıldığında daha iyi ayrılmıştır. Protioykonazol-destiyo enansiyomerleri için ise başarılı ayrım, Chiralcel OJ-H hariç, bahsedilen diğer tüm kolonlarda gerçekleştirilmiştir. Mobil fazın türünün ve oranının ayırma işlemi üzerinde önemli bir etkiye sahip olduğunu anlamışlardır. Araştırmanın sonuçlarına göre düşük sıcaklık, iki bileşiğin ayrılmasını kolaylaştırmıştır. Genel olarak, Rs değerinin sıcaklıkla ters orantılı olduğu ve enansiyomerlerin kiral çözünürlüğünün entalpi tarafından yönlendirildiği sonucuna ulaşılmıştır (40).

Enantioselektiflik, enzimler veya diğer doğal olarak oluşan kiral moleküller ile etkileşimlerinin bir sonucu olarak, zirai kimyasallar alanında da önemlidir (41). Imazalil

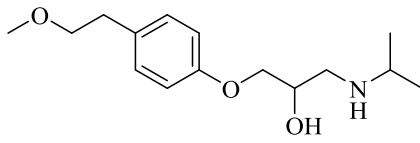
([1-(β -alliloksi-2,4-diklorofenetil)imidazol]), narenciyelerin hasat sonrası, depolama ve nakliye sırasında mantar gelişimine karşı korunmasında kullanılan sistemik bir kiral fungusittir (Şekil 2.15.) (42). *Aguilar ve diğerleri* fungusit etkili kiral imazalilin HPLC ile enansiyomerlerin analizini, bozunma oranlarını ve çıkarma/zenginleştirme teknikleri üzerine çalışma yapmışlardır (43).



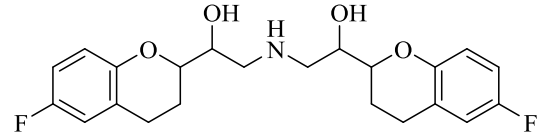
Şekil 2.15. İmazalil yapısı

Bunun için öncelikle taze sıkılmış portakal suyundan imazilil enansiyomerlerinin ekstraksiyonu ve konsantrasyonu için dispersif sıvı-sıvı mikro ekstraksiyon ve katı faz ekstraksiyonu ile portakal suyundan imazilili ekstrakte etmişlerdir. Elde edilen numuneleri farklı mobil fazlar (metanol, etanol, izopropanol, asetonitril) kullanarak enansiyomerlerine ayırmışlardır. En iyi ayırım izopropanol: tampon (1:99, v/v) (-) ve (+)-imazalil sırasıyla pH 4'te elde edilmiştir. Enansiyomerlerin elüsyon sırası, R_s değerleri, pik taban çizgisi genişliği (W_1 , W_2) ve enansiyomerlerin alıkonma süreleri (t_1 , t_2) elde edilen tepe noktaları CD dedektörü ile belirlenmiştir. UV-vis ve CD dedektörleri, 25-450 lg mL konsantrasyon aralığında enjekte edilen ($\pm$)-imazolile doğrusal olarak yanıt vermiştir. Tüm durumlarda, doğrusal uyum $R > 0.97$ olarak tespit edilmiştir. Araştırmacılar eklenmiş portakal suyu örneklerinden imazalil enansiyomerlerinin geri kazanım analizlerinden yüksek geri kazanım değerleri elde etmek için katı faz ekstraksiyonunun daha iyi bir seçim olduğunu ifade etmişlerdir. Enansiyomerlerin bozunma hızlarını belirleyip (-)-imazolilin (+)-imazolilden daha hızlı bir enantiyoselektif dönüşüm işlemi sonucunda bozunduğunu göstermişlerdir (43).

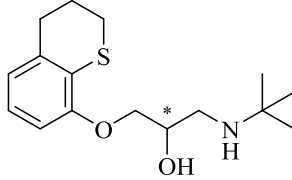
Ali ve Aboul-Enein HPLC ile selüloz Tris(3,5-diklorofenilkarbamat) CSP kullanılarak bazı ilaçların enantioseparasyonunu gerçekleştirmişlerdir (44). Klinik olarak kullanılan metoprolol, teratolol, tolamolol, nebivolol (-adrenerjik blokerler), ekonazol, mikonazol (anti-fungal ajanlar), kromakalim (anti-hipertansif) ve etodolak (anti-inflamatuar) gibi bazı ilaçların selüloz tris (3,5-diklorofenilkarbamat) CSP üzerinde kiral rezolüsyonu sağlanmıştır (Şekil.2.16).



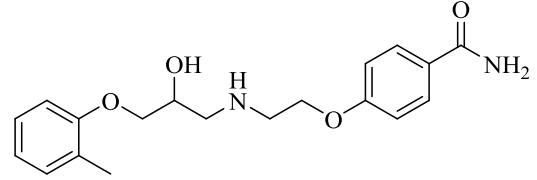
Metoprolol



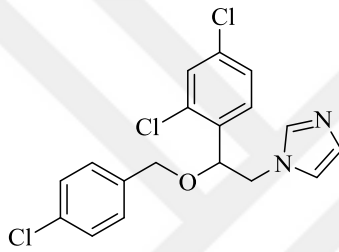
Nebivolol



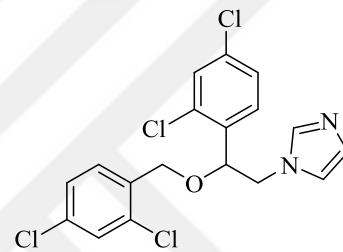
Teratolol



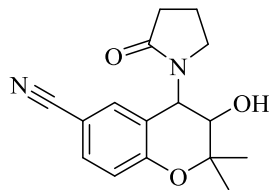
Tolamolol



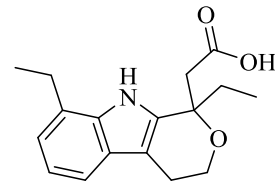
Ekonazol



Mikonazol



Kromakalim



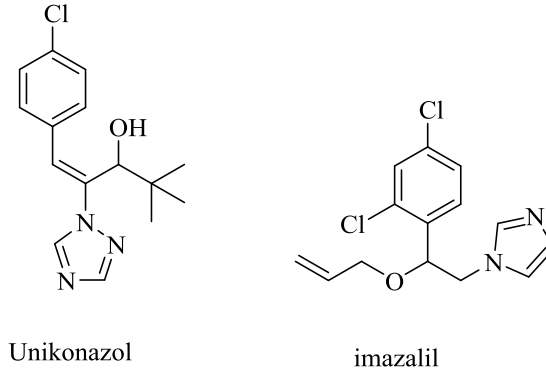
Etodolak

Şekil 2.16. Klinik olarak kullanılan bazı ilaçların kimyasal yapıları

Araştırmacılar 220 ppm'de ölçüm aldıkları çalışmalarında mobil faz olarak 0.5 mL/dk'da 2-propanol kullanmışlardır. Bu ilaçların ayırma faktörleri (α) 1.24 ile 3.90 arasında değişirken, çözünürlük faktörleri 1.05 ile 5.0 arasında değişim göstermiştir. Bu ilaçların çözünürlüğü sırasıyla kromakalim> mikonazol> teratolol> ekonazol> nebivolol> etodolak> metoprolol> tolamolol şeklinde olduğunu ifade etmişlerdir. İlaçların yapısı, aromatik halkalarla birlikte azot, oksijen, kükürt ve klor gibi birkaç elektronegatif atom içermektedir. Bu nedenle, bu ilaçların enansiyomerlerinin ayrımının, rasematların elektronegatif atomları ve rapor edilen selüloz kiral durağan faz arasındaki farklı hidrojen

bağları ve dipol-dipol kaynaklı farklı büyüklüklerdeki etkileşimler nedeniyle meydana geldiğini ifade etmişlerdir. Selüloz bazlı CSP'nin süstitüe edilmiş fenil kısımları ile analitlerin aromatik halkaları arasındaki π - π etkileşimlerinin kiral rezolüsyon mekanizmalarında önemli bir rol oynadığı da bildirilmiştir. Sterik etkinin kiral ayırırda da çok önemli bir rol oynadığı gözlemlenmiştir. Temel olarak, rasematların kiral çözünürlüğü bağların genel etkisi, sterik etki ve enansiyomerlerin kiral oluklara oturma modeli tarafından kontrol edilir (45). Araştırmacılar kromakalimin en iyi ayrılan molekül olması, daha az sterik kuvvete maruz kalan ve dolayısıyla CSP'nin kiral oluşuna maksimum uyum sağlamasını küçük boyutundan dolayı olduğunu düşünmüşlerdir. Mikonazolün ekonazole kıyasla daha iyi ayırır, mikonazolün klor bulundurması sonucu daha güçlü hidrojen bağı ile bağlanması olabileceği düşünülmüştür. Araştırmacılar, kiral ayırırın mekanizmalarını belirlemek için, bu ilaçları selüloz Tris (3,5-dimetilfenilkarbamat) (Chiralcel OD), selüloz Tris (4-metilfenilkarbamat) (Chiralcel OG), selüloz trifenilkarbamat (Chiralcel OC) ve selüloz 4-klorofenilkarbamat (Chiralcel OF) CSP'leri, aynı deneysel kromatografik koşulları kullanarak analiz yapmışlardır. Bu CSP'lerde hiçbir ayırır gözlemlememişlerdir. Bahsedilen CSP'ler hidrojen ve π - π bağları için çeşitli yerler içermekte, ancak bunlar selüloz Tris (3,5-diklorofenilkarbamat) CSP'ye kıyasla hiç denilecek kadar zayıf kiral yetenek göstermişlerdir. Selüloz Tris (3,5-diklorofenilkarbamat) CSP, selüloz birimi başına altı klor atomu içerir ve bu nedenle daha güçlü hidrojen bağı sağladığını ve selüloz Tris (3,5-diklorofenilkarbamat) kolonuna kıyasla zayıf bağlanma kapasitesine sahip olduğunu ifade etmişlerdir (44).

Pan ve arkadaşları uniconazol ve imazalilin çeşitli selüloz kiral kolonlarında HPLC ile enantioseparasyonunun karşılaştırmışlardır (46). Unikonazol ((E)-(RS)- β -((4-klorofenil)metilen)- α -(1,1-dimetiletil)-1H-1,2,4-triazol-1-etanol) ve imazalil ((RS))-1-[2-(2,4-diklorofenil)-2-(2-propeniloksi)etil]-1H-imidazol) rasematlarının enantioseparasyonu, alkol değıştirici olarak sırasıyla etanol, n-propanol, izo-propanol ile selüloz türevi kiral kolonlar selüloz tribenzoat (CTB), selüloz tris(4-metilbenzoat) (CTMB), selüloz trifenilkarbamat (CTPC) ve selüloz tris(3,5-dimetilfenil karbamat) (CDMPC) üzerinde denenmiştir.



Şekil 2.17. Unikonazol ve imazalilin yapısı

Yapılan bu çalışmada kromatografik parametreler incelenmiş ve imazalilin her zaman unikonazolden daha fazla tutulduğu gösterilmiştir. Unikonazol ve imazalilin yapısında elektronegatif atomlar, yani azot, oksijen ve klor ile birlikte iki aromatik halka (bir fenil halkası ve bir triazol veya imidazol halkası) bulunur. Araştırmacılar ayrımı yapılacak moleküller ile sabit fazlar arasında π - π etkileşimi, dipol-dipol, hidrojen bağı etkileşiminin var olduğunu belirtmişlerdir. Unikonazolün enantioseparasyonunun CTPC ve CDMPC'de meydana geldiği, ancak CTB ve CTMB'de olmadığı da gözlemişlerdir. CTPC'de dipol-dipol etkileşimi ve CDMPC ise unikonazol ile hidrojen bağı oluşmuştur. İmazalile gelince, CTPC'de enantioseparasyona uğramazken, diğer üç kolonda farklı derecelerde ayırma elde edilmiştir, en iyi enantioseparasyon CTMB'de olmuştur. Unikonazol ve imazalil en iyi ayrımı elde edilen kolonlarda alkol değiştirici olarak etanol kullanılmıştır. Bu nedenle, alkol değiştirici olan etanolün konsantrasyonunun etkisi araştırılmış ve alkol değiştiricinin CSP üzerinde akiral ve kiral bağlanma bölgeleri için analit ile rekabet edebildiği ve böylece çözünen maddenin alıkonmasını ve kiral seçiciliğini etkileyebildiği çalışmada anlaşılmıştır (46).

Du ve diğerleri LC-MS/MS ile sıçan plazmasındaki kiral mikonazolün enantioselektif belirlenmesi ve ayrılması için stereoselektif bir farmakokinetik çalışma uygulamışlardır (47).

Bunun için yeni bir kiral sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometri yöntemi geliştirmişlerdir. Temel ayırmayı, asetonitril ve sulu amonyum hidrojen karbonattan (5 mM; 80:20, v/v) oluşan bir mobil faza sahip bir Chiralpak IC kolonu üzerinde gerçekleştirmişlerdir. Verileri, üçlü dört kutuplu kütle spektrometrisi ile pozitif elektrosprey iyonizasyonu ile çoklu reaksiyon izleme modunda elde etmişlerdir. 5 ve 10 mg/kg dozlarında rasemik mikonazolün sıçanlara oral yoldan verilmesinden sonra

sıçanlardaki mikonazol enansiyomerlerinin enantioselektif farmakokinetik çalışmasının sonuçlarına göre (–)-(R)-mikonazolün plazmada (+)-(S)-mikonazolden daha yüksek bir konsantrasyona sahip olduğunu ve her iki doz için 1.3-1.7 oranında olduğunu ifade etmişlerdir. Araştırmacılar enantioselektifliğin doz artışı ile değişmediğini dile getirmişlerdir. Daha sonra her bir enansiyomerin doğrusallığı, doğruluğu, kesinliği, ekstraksiyon geri kazanımı, matris etkisi ve kararlılığı ile ilgili yöntemin validasyonunu yapmışlardır ve sıçan plazmasındaki her enansiyomer için 0.50 ng/mL'lik bir LLOQ ile kesin saptama sağlamışlardır (47).

GC ile Enansiyomer Ayırımı

Gaz kromatografisi hareketli fazın gaz olması sabit fazın ise sıvı veya katı olan ayırma yöntemidir. Gaz kromatografisinde sabit faz sıvı olduğunda, gaz-sıvı kromatografisi sabit faz katı olduğunda gaz-katı kromatografisi olarak isimlendirilir. Enansiyomerlerin gaz kromatografisi ile ayrılması, CSP'ler üzerinde hidrojen bağı, koordinasyon ve inklüzyon ile gerçekleştirilir. Bu nedenle kullanılan kiral seçiciler, amino asit türevleri, terpen türevli metal koordinasyon bileşikleri ve modifiye edilmiş siklodekstrinlerdir. Yüksek verimlilik, hassasiyet ve ayırma hızı, enansiyomerlerin yüksek çözünürlüklü kapiler gaz kromatografisi ile ayrılmasının önemli avantajlarıdır (48). Çok boyutlu gaz kromatografisi (seri bağlantılı kolon işleminde), arayüz oluşturma ve birleştirme yöntemleri (gaz kromatografisi-kütle spektrometrisi, GC-MS) gibi yerleşik yardımcı teknikler kiral analize uygundur. Kiral gaz kromatografisi özellikle, esansiyel yağların, anesteziklerin ve koku verici maddelerin analizinde tercih edilmektedir. Enantioselektif gaz kromatografisi, örneğin, uçucu enansiyomerlerin doğrudan numune matrisinin buhar fazından analiz edildiği aromaların ve feromonların analizi gibi, numune türevlendirmesinin gerekli olmadığı durumlarda kiral analiz için özellikle uygundur. Sıvı kromatografik yöntemlerin aksine, gaz kromatografisinde çözücüler, değiştiriciler ve gradyanlı elüsyon sistemlerinin hassas seçimi yoktur. Sabit faz çeşitliliği sınırlıdır, hareketli faz açısından seçiciliğe kolay müdahale edilememesi ve preparatif ölçekli analizlerde kullanımının zorlaştırması bu yöntemin kullanımını sınırlamaktadır. Bununla birlikte, gaz kromatografisinin kullanımı için ön koşullar, kiral analitin uçuculuğu, termal kararlılığı ve çözülebilirliği olup, özel kullanımını kısıtlar. Bu durumda sadece termal olarak dayanıklı bileşiklerin analizinin yapılması gaz kromatografisinin dezavantajıdır (49).

Süperkritik Akışkan Kromatografisi (SFC)

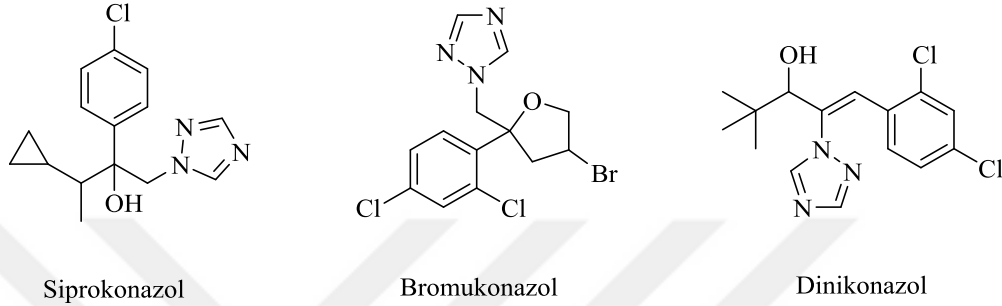
Günümüzde SFC, çoğunlukla HPLC ile aynı donanım ve yazılımı kullanan yüksek performanslı sıvı kromatografisine benzer bir ayırma tekniğidir. SFC'yi HPLC sistemlerinden ayıran iki fark vardır; bunlardan bir tanesi SFC pompa sistemi, karbondioksiti sıvı halde tutmak için soğutulmuş bir pompa kafasına sahip olmalıdır, ikincisi UV tespiti için tüm sistem veya sadece MS tespiti için paketlenmiş kolon basınç altında olmalıdır. Mobil faz, ana bileşen olarak karbondioksit ile ikili veya üçlü bir karışımdır. Ayırma tekniği genellikle hareketli fazın bileşiminin zamana göre değiştiği bir gradyan elüsyonu olarak gerçekleştirilir. Silika, siyanopropilsilika, 3-aminopropilsilika ve 2-etilpiridilsilika gibi polar sabit fazlar çoğunlukla kullanılır. SFC'nin daha yüksek hız/verim, daha fazla numune/gün, daha hızlı dengeleme ve daha kısa döngü süresi gibi ters fazlı HPLC'ye göre sayısız pratik avantajı vardır. SFC, daha düşük işletme maliyeti ve daha düşük kolon basınç düşüşü sağlar. Solvent tüketimi düşüktür; bu nedenle, atık üretimi de minimum düzeydedir. Ayırımı yapılacak olan bileşikler, karbondioksit buharlaşarak uzaklaştığından, nispeten küçük bir çözücü miktarı içinde izole edilebilir. Bu özellik, elüsyon hacimlerinin büyük olabileceği preparatif uygulamalar için özellikle önemlidir (50).

Kapiller Elektroforez (CE) ile Enansiyomer Ayırımı

Kapiler elektroforez, genellikle hem biyokimyasal hem de biyolojik analiz ihtiyaçları için uyarlanmış enstrümantal bir tekniktir. CE, bir kılcal boru içinde gerçekleştirilen elektroforezdir. Hem büyük hem de küçük moleküllerin analizi için mevcut en verimli ayırma tekniğidir. Geleneksel elektroforezin modern CE'ye dönüşümü, gaz kromatografisi için pahalı olmayan dar delikli kapillerlerin üretilmesi ve HPLC için son derece hassas online saptama yöntemlerinin geliştirilmesiyle desteklenmiştir. CE analizleri biyolojik, çevresel, farmasötik, klinik ve gıda analizlerinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ayrıca CE, hızlı ayırma, yüksek çözelti ve minimum numune ve reaktif miktar gereksinimleri açısından diğer ayırma tekniklerine göre üstündür. CE teknolojisinin karşılaştığı en zorlu konulardan biri hassasiyettir. Genel olarak HPLC ile karşılaştırıldığında, CE daha az duyarlı bir tekniktir. Bu, CE'de kullanılan kapillerin hem enjekte edilebilecek hacmini hem de spektrofotometrik algılama sırasında optik yol uzunluğunu kısıtlayan küçük boyutlarından kaynaklanır. Enansiyomerlerin ayrılmasında CE, HPLC'ye kıyasla ayırma ortamını kolayca değiştirme kabiliyetine sahip olma avantajına sahiptir. Bunun yanı sıra, CE, kılcal bölge elektroforezi (CZE), kılcal jel elektroforezi (CGE), elektrokinetik kromatografi (EKC), misel elektrokinetik

kromatografisi (MEKC), kılcal izoelektrik odaklama (CIEF) ve kapiler elektrokromatografi (CEC) gibi birçok ayırma tekniğinde uygulanabilir olduğu için çok yönlü esnekliğe sahiptir (51).

İbrahim ve diğerleri, siprokonazol, bromukonazol ve dinikonazol enansiyomerlerinin eşzamanlı enantioseparasyonu için etkili bir yöntem olarak, kiral seçici olan nötr siklodekstrinlerin ikili bir karışımını kullanan siklodekstrin ile modifiye edilmiş MEKC geliştirmişlerdir (Şekil 2.19) (52).



Şekil 2.18. Siprokonazol, Bromukonazol ve Dinikonazol Yapısı

MEKC, tampon çözeltisine yüzey aktif maddelerin eklendiği bir elektrokinetik kromatografi modudur. Analistlere göre MEKC enansiyomerlerin ayrılması için güçlü bir ayırma tekniğidir. Pahalı kiral reaktiflerin ve gerekli çözücülerin minimum kullanımı gibi enansiyomerlerin ayrılması için geleneksel kromatografik yöntemle karşılaştırıldığında birçok avantajı vardır. Ayrıca, sadece küçük numune hacimleri gereklidir ve verimlilik çok yüksektir. Enansiyomerlerin ayrılması için iki MEKC modu vardır. Birincisi, kiral yüzey aktif maddeler kullanan MEKC'dir ve ikincisi, kiral seçici olarak siklodekstrin kullanan MEKC'dir (53). Araştırmacılar bu çalışmada, siklodekstrin ile modifiye edilmiş MEKC (CD-MEKC) kullanılmıştır. Kullanılan triazol antifungaller siprokonazol, bromukonazol ve dinikonazoldür. Siprokonazol ve bromukonazole iki kiral merkeze sahipken, dinikonazol bir kiral merkeze sahiptir. Bu nedenle, siprokonazol ve bromukonazolün her biri iki çift enansiyomer (dört stereoizomer) içerirken, dinikonazol bir çift enansiyomer (iki stereoizomer) içerir. Bu çalışmada, iki çift siprokonazol enansiyomerinin, iki çift bromukonazol enansiyomerinin ve bir çift dinikonazol enansiyomerinin aynı anda ayrılması için CD-MEKC kullanmışlardır. Tekli ve ikili doğal siklodekstrinlerin (CD), yani γ -CD, 2-hidroksipropil- γ -CD (HP- γ -CD) ve hidroksipropil- β -CD (HP- β -CD)'nin etkileri de incelenmiştir. Tek CD kullanımı dinikonazol, bromukonazol ve siprokonazolün tüm stereoizomerlerini başarılı bir şekilde

ayıramadığından, ikili doğal CD sisteminin kullanımını araştırmışlardır. Analistlerie göre bromukonazol ve siprokonazol enansiyomerlerinin ayrılması HP-β-CD kullanılarak başarılı bir şekilde gerçekleştirilirken, dinikonazol enansiyomerlerinin ayrılması HP- γ -CD kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada, HP- β -CD ve HP- γ -CD içeren ikili CD sisteminin kullanılması daha iyi bir ayırım sağladığı belirtilmiştir. Uygun ayırma çözeltisi, 40 mM SDS, 25 mM fosfat tamponu (pH 3), 27 mM HP- β -CD, 3 mM HP- γ -CD ve %10:5 v/v metanol:asetonitril ilavesiyle elde etmişlerdir. Misel ve CD benzer fizikokimyasal özellikleri paylaşmaktadırlar. Miselin iç kısmı veya CD boşluğu nispeten hidrofobik iken dış kısım daha hidrofiliktir. Bu nedenle, çözünenin log P değerleri ne kadar büyükse, kiral seçici CD'lerin kaviteye olan afinitesi o kadar büyük olur ve bu nedenle misel tarafından güçlü bir şekilde tutulur. Log P verilerinden, siprokonazol en az hidrofobiktir ve dinikonazol en fazla hidrofobiktir. Bu bilgiler ışığında çalışma da asidik pH'da (3.0) üç triazol fungusitinin migrasyon sırası hidrofobiklik değerinin tersini takip ettiği anlaşılmıştır, yani dinikonazol> bromukonazol> siprokonazol. Çift yerel kullanımı CD sistemi, seçilen üç triazol antifungal ilacın ayrılmasını Rs 1.1–15.9, pik verimi N4200 000 ve ayırma süresi 21 dakikadan az olarak sonuçlanmasını sağlamıştır (52).

Kapiler Elektrokromatografi (CEC)

Bu yöntemde kapiler elektroforez cihazı kullanılır. Elektrokinetik göç ilkeleri ve kromatografik ayırım ilkelerinin uygulandığı bir metoddur. Ayrıca bu metodla sıvı kromatografi seçiciliği ve kapiler elektroforezin yüksek etkinliği bir aradadır. Yüksüz bileşiklerin ayrımı bu metodla yapılabilmektedir. CE'den farklı olarak kolon olarak C18 gibi bir hidrofobik ligant ile türevlendirilen 1-7 µm boyutlarda poröz silika, core-shell veya monolit bir malzeme ile doldurulmuş silika kapilerlerdir. Çeşitli parçacık boyutuna, doğasına, yüzey alanına, gözenek boyutuna ve gözenek hacmine sahip silika jeller, CEC'de kiral seçiciler için en yaygın olarak kullanılan taşıyıcı malzemeleri temsil eder. CEC'de kullanılan mobil fazlar, doğası, bileşimi, viskozitesi, pH'ı, difüzyon özellikleri, elektriksel ve termo iletkenliği, iyonik gücü vb. açısından farklılık gösterebilir. Hareketli faz olarak sulu tamponlar ve asetonitril, metanol gibi bir organik çözücünün karışımından oluşan klasik HPLC ters faz çözeltileri kullanılır. Tamponun pH'ı ve iyonik gücü birbirine bağlı olan bazı şeylerdir ve değiştirilmesi kolay değildir. CEC'de hareketli fazlar olarak uygulanan sulu-organik ve saf polar organik çözücüler, çeşitli inorganik ve organik elektrolitler eklenerek iletken hale getirilir. İnorganik elektrolitlerden en yaygın olarak fosfat, sitrat, asetat ve formiat tuzları kullanılır (54).

2.3. Tedavide Kullanılan Asimetrik Merkez Taşıyan İlaçlar

Kiralite ilaç sektöründe önemli bir yere sahiptir. Enansiyomerler kiral ortamda iki farklı molekül olarak davranmaktadır. Bu sebepten kiral ortamdaki kimyasal özellikleri farklıdır. İn vivo ortamda kiral özelliğe sahip olması sebebiyle enantiomerler etki şekilleri farklıdır (1,2,5). Ayrıca birbirlerine zıt etki gösterebilir. Örneğin, (S)-(-)-propranolol kardiyovasküler hastalıklarda β -bloker olarak etki eder fakat enansiyomeri (R)-(+)-propranolol gebelik önleyici olarak etki etmektedir. Bu durum kiral bileşiklerin tedavide kullanıldığı zaman saf olması gerekliliğini vurgulamış olur. Kardiyovasküler hastalıklar için pravastin sodyum, antidepresan tedavide setralin hidroklorür, astım ve KOAH hastaları için salmeterol, antikoagülan olarak klopidogrel bisülfat, mide koruyucu olarak esomeprazol magnezyum, antibiyotik olarak potasyum klavulanat örnek verilebilir. Bu moleküllerin hepsi asimetrik merkez taşıyan ilaçlardır. Şu an mevcut olarak kullanılan ilaçların %56'sı kiral bileşik olmakla beraber bunların %88 oranı rasemik karışım halindedir (55). Ancak rasemik ilaçları kullanılırken etken madde dozunun etkili olabilmesi için rasemik karışımdan iki kat kullanmak gerekebilmektedir. Tek bir enantiomer, rasemik karışıma göre daha fazla biyolojik aktivite göstermektedir. Örneğin (R,R)-kloroamfenikol antibakteriyel özellik gösterirken, (S,S)- kloroamfenikol inaktif özellik göstermektedir. Bundan dolayı rasemik karışımlar kullanmak kaynakların yarısı boşa harcaması ve maliyeti artırması nedeniyle ekonomik değildir (56). Bu durumdan dolayı çoğu ilaç tek enansiyomer versiyonuna geçmiştir (Tablo 2.1.).

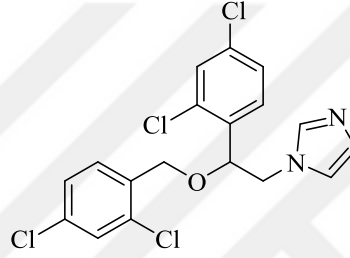
Tablo 2.1. Tek enansiyomer versiyonuna geçilen rasemat ilaçlar

Etken madde	Endikasyonu	Tek enansiyomer
Lansoprazol	Proton pompası inhibitörü	(R)-(+)-lansoprazole (dexlansoprazole)
Modanafil	Narkolepsi	(R)-(-)-modanafil (armodanafil)
Formoterol	KOAH	(R,R)-(-)-formoterol (arformoterol)
Zopiklon	Anksiyete	(S)-(+)-zopiclone (eszopiclone)
Setrizin	Antihistaminik	(R)-(-)-cetirizine (levocetirizine)

2.4. Kiral İlaç Örneği Olarak Mikonazol ve Etkileri

2.4.1. Mikonazolün Yapısı

Bir fenetil imidazol türevi olan mikonazol azol grubu taşıyan bir bileşiktir ve gram pozitif bakterilere karşı antibakteriyel aktiviteye sahip geniş spektrumludur. Hem oral hem de vajinal enfeksiyonlar dahil olmak üzere mukozal maya enfeksiyonlarını tedavi etmek için yaygın olarak kullanılır. Moleküler formülü $C_{18}H_{14}Cl_4N_2O$ olan mikonazolün sistemik adı 1-[2-(2,4-diklorofenil)-2-[(2,4-diklorofenil)metoksi]etil] imidazol'dür (Şekil 2.19.). Molekül ağırlığı 416 g/mol'dür. Oda sıcaklığında katı formda bulunur ve erime noktası 159-163 °C'dir. Suda çözünürlüğü 0.000763 mg/mL; oktanol/su dağılıma katsayısı (logP) değeri 5.86'dır. Protonasyon değeri (pKa) 6.48 olarak tahmin edilmiştir (57).



Şekil 2.19. Mikonazolün kimyasal yapısı

2.4.2. Mikonazol Bileşiğinin Biyolojik Aktiviteleri

Mikonazolün tıpta kullanımı, yüzeysel mantar enfeksiyonlarının tedavisi için bir dizi azol bileşiğinin, çoğunlukla topikal biçimde piyasaya sunulduğu 1970'lerin başlarına kadar uzanır (58). İlk olarak 1969'da sentezlenmiştir ve 8 Ocak 1974'te FDA onayı almıştır (59). Uzun bir süre klinik kullanımda olmasına rağmen, duyarlı organizmalar arasında mikonazole direnç nispeten düşüktür. Bu ilacın invaziv mantar hastalıkları için sistemik (intravenöz) kullanımı başlangıçta olumlu sonuçlara sahip olmakla birlikte bu kullanım yolu toksisite, hepatik ve kardiyovasküler yan etkiler nedeniyle durdurulmuştur. Mikonazolün yaygın olarak bulunmasına ve kullanımına rağmen, bu ilaca karşı mantar direnci düşüktür. Minimum inhibitör konsantrasyonu, *Candida albicans* dahil olmak üzere test edilen patojenlerin çoğu için 1-10 µg/ml konsantrasyon aralığında kalmıştır. Bu gerçek, HIV ile enfekte, bağışıklığı zayıflamış bir popülasyonda sürekli olarak tekrarlayan fırsatçı mantar hastalığının ışığında son derece önemli hale gelmektedir (58). Ekzemant jel, Persmant jel, Neo-penotran ovül, Mixovül, Exagyn tablet, Nidazol-M

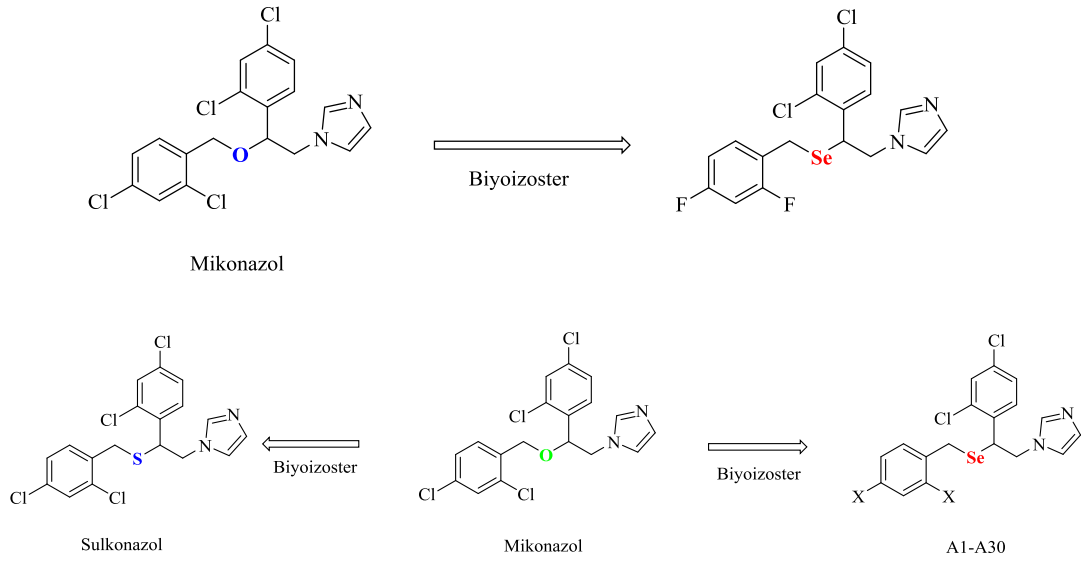
vajinal tablet, Lotrimin sprey, Fungucit pomat günümüzde piyasada bulunan müstahzarlarındanr.

2.4.3. Mikonazol Türevi Azol Antifungaller ve Yapı-Aktivite İlişkileri

Klinik kullanımdaki antifungal ajanlar olan imidazoller ve triazoller bu gurubun en büyük sınıfını oluşturur. İmidazoller halkalı grupta iki azot içerirken triazoller üç azot atomu içerir (60).

Triazol türevleri, imidazol türevleri ile aynı antifungal etki alanına ve aynı etki mekanizmasına sahiptir. Farmakopedeki en yaygın antimikotikler olan azoller, ergosterol biyosentezine müdahale ederek mantar organizmalarına zarar verir ve bu da 14- α -metilsterollerin birikmesine ve toksik metillenmiş sterol seviyelerinin artmasına sebep olur. Bu metilsteroller, ATPaz ve elektron transport sistemlerinin enzimleri gibi başlıca membrana bağlı enzim sistemlerinin fonksiyonlarını bozan fosfolipidlerin açıl zincirlerinin kapanmasını engeller ve böylece mantar gelişimi inhibe edebilir(58). Son zamanlarda, *Kobayashi ve diğerleri* mikonazol için ek bir antifungal mekanizma tanımlamışlardır (61). Mantar organizması içinde ilaca bağlı reaktif oksijen türlerinin (ROS) birikmesi oksidatif hasar ve hücre ölümü ile sonuçlanır. Bu mekanizma *Thevissen ve diğerleri* tarafından yapılan bir başka bir çalışmada bu doğrulanmıştır (62). Bu son yazarlar, mikonazolün *Saccharomyces cerevisiae* ve *C. albicans* üzerindeki etkilerini incelemişler ve antifungallerin aktin filamentlerine zarar verdiğini ve bunun da aktin hücre iskeletinin organizasyonuna müdahale ettiğini göstermişlerdir. Çalışma sonuçlarına göre, aktin hücre iskeletinin, mitokondriyal aktiviteyi ve endojen ROS seviyelerini düzenlediğinden, mikonazolün bu varsayılan etkisinin, apoptozun takip ettiği ROS indüksiyonu için bir tetikleyici görevi olabileceği bilgisine ulaşılmıştır (61,62).

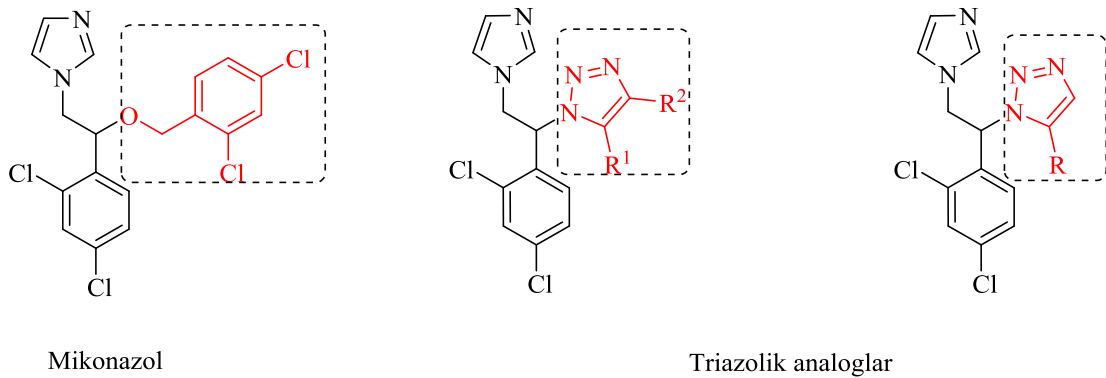
Xu ve diğerleri tarafından güçlü antifungal ajanlar olarak selenyum içeren yeni mikonazol analoglar tasarlanmış ve sentezleri yapılarak biyolojik olarak değerlendirilmiştir. Burada, biyoizosterizm teorisine dayalı olarak, selenyum içeren bir dizi yeni mikonazol analogu sentezlenmiş ve bunların on üç patojenik mantar suşu üzerindeki inhibitör etkilerini değerlendirilmiştir (63).



Şekil 2.20. Biyozosterizm ile elde edilen selenyum içeren antifungal bileşiklerin yapısı

Sentezlenen bileşikler A01-A30 olarak adlandırmışlardır (Şekil 2.21.) Tüm yeni hedef bileşikler, test edilen tüm suşlara karşı önemli antifungal aktiviteler sergilemiştir. Ayrıca, tüm hedef bileşikler, flukonazole dirençli mantarlar üzerinde mükemmel inhibitör etkiler gösterdiği belirtilmiştir. Araştırmacılar ön mekanistik çalışmalar yaparak, A03 olarak adlandırılan bileşiğin *C. albicans* üzerinde CYP51'i hedef alarak en güçlü inhibitör etkiyi gösteren bileşik olduğunu tespit etmişlerdir (63).

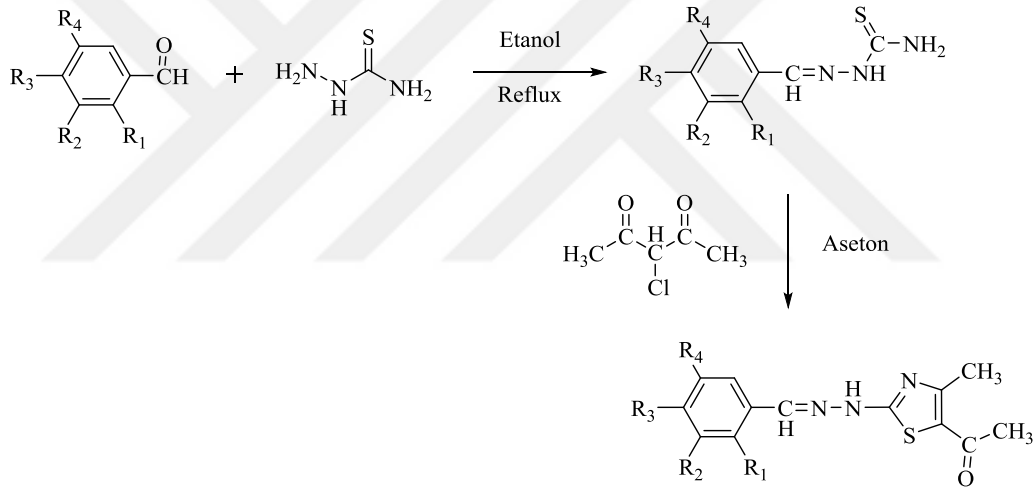
Başka bir çalışmada *Gonzalez-Calderon ve diğerleri* umut verici antifungal ajanlar olarak yeni triazol bazlı mikonazol analoglarının sentezinde azid-enolat 1,3-dipolar siklo sübstitüenti eklemişlerdir. 1,4,5-tri ve 1,5-disübstitüe triazol kısımları içeren yedi tane mikonazol analogu, azid-enolat 1,3-dipolar siklo ilavesi ile sentezlemişlerdir (Şekil 2.22.) (64).



Şekil 2.21. 1,4,5- ve 1,5- Sübstitüe Triazol Türevleri

Bu bileşiklerin antifungal aktivitesi maya örnekleri olarak *Aspergillus fumigatus*, *Trichosporon cutaneum*, *Rhizopus oryzae* ve *Mucor hiemalis*'in yanı sıra üç *Candida spp* türü dahil olmak üzere dört filamentli mantara karşı *in vitro* olarak değerlendirilmiştir. Araştırmacılar yaptığı klinik öncesi çalışmalar, sentezlenen bazı bileşiklerin *C. albicans* ve *C.tropicis*'e karşı iyi bir antifungal aktiviteye sahip olduğunu göstermiş ve sentezlenen bileşiklerin, güçlü antifungal aktiviteleri nedeniyle gelecekteki tamamlayıcı biyolojik araştırmalar için ilaç adayları olarak kabul edilebileceğini göstermiştir (64).

Tiyazol türevleri antimikrobiyal aktivite gösterirken Schiff bazı bileşikler önemli tıbbi değerlere sahiptir ve mikroorganizmalara karşı önemli bir rol oynar (65). *Shah ve diğerleri* yeni tiyazol Schiff bazı türevlerini *in silico* çalışmaları ile tasarlayıp sonrasında sentezleyerek antimikrobiyal ve antioksidan aktivite açısından değerlendirmişlerdir (66). Bundan hareketle bir dizi on dokuz tiyazol Schiff baz türevi (2a-2s) bileşiklerini iyi verimlerle iki aşamalı reaksiyonlar yoluyla sentezlemişlerdir (Şekil 2.23).



Şekil 2.22. Tiyazol Schiff Bazı Türevlerinin Sentezi

Araştırmacılar bileşiklerin iki gram pozitif ve iki gram negatif bakteri ve iki mantar suşuna karşı *in vitro* antimikrobiyal etkilerini agar disk difüzyon yöntemi kullanarak değerlendirmişlerdir. Ayrıca yine bu çalışmada sentezlenen türevlerin DPPH (1,1-difenil-2-pikrilhidrazil) serbest radikali temizleme aktiviteleri de araştırılmıştır. Elde edilen verilere göre sentezlenen bileşikler siprofloksasin ve mikonazol ile karşılaştırıldığında orta derecede antimikrobiyal aktivite sergilediği görülmüştür. Bileşiklerden bir kaç tanesi DPPH serbest radikal süpürme deneyinde standart askorbik aside (IC₅₀ = 27.34 ± 1.86 µg/mL) kıyasla çok güçlü antioksidan etkinlik (IC₅₀ = 3.52 ± 0.86 µg/mL) göstermiştir. *In silico* analiz, sentezlenen bileşiklerin Lipinski'nin beş

kuralına ve Veber'in bir istisna dışında kuralına uyduğu öngörülmüştür. Moleküler yerleştirme çalışmalarına göre, sentezlenen tiyazol Schiff bazı türevlerinin varsayılan reseptör bağlanma bölgelerinde tolere edilebilir olduğu varsayılmıştır (66).

Sari ve diğerleri, *Candida spp.*'nin planktonik ve biyofilm formlarına karşı güçlü antifungal etkiler gösteren naftalenli azol türevleri ile *in vitro* ve *in silico* çalışması yapmışlardır (67). Bu çalışmada, dirençli *Candida spp.*'nin planktonik ve biyofilm formlarına karşı isabetleri bulmak için naftalen halkası içeren azol bileşikleri test edildi. Araştırmacılar bileşik serisinde, *Candida*'nın duyarlı suşlarına karşı, minimum inhibitör konsantrasyon (MIC) değerleri ile referans ilaç olan flukonazolunkinden daha düşük dozda etki eden güçlü türevler tanımlamışlardır. *C. albicans*'a karşı 0.125 µg/ml, *C. parapsilosis*'e karşı 0.0625 µg/ml ve özünde azole dirençli *albicans* olmayan bir *Candida* olan *C. krusei*'ye karşı 2 µg/ml MIC değerleri elde etmişlerdir. Türevlerin bazıları, *C. tropicalis*'in flukonazole dirençli klinik izolatına karşı oldukça aktif bulunmuştur. *C. albicans* biyofilmlerinin inhibisyonunu, antibiyofilm aktivitesi ile bilinen referans ilaç olan amfoterisin B'ye benzer şekilde 4 µg/ml'de de gözlemişlerdir. Moleküler yerleştirme çalışmaları yoluyla, bileşiklerin azollerin hedef enzimi olan fungal lanosterol 14a-demetilaz (CYP51) ile afiniteleri ve temel etkileşim gösterdiği tahmin edilmiştir (67).

Artigo ve diğerleri güçlü mantar önleyici maddelerin yeni bir sınıfı, yani 3-aril-4- α -(1H-imidazol-1-il)arilmetil]-pirolleri tarif etmişlerdir (68). Bu bileşikler, antimikotik ilaçlar sınıfına ait iki bileşik olan bifonazol ve pirrolnitritin ile yapısal benzerlik göstermektedir. Pirollerin sentezi, 3-aroil-4-arilpirolleri vermek üzere tosilmetil izosiyanid ile reaksiyona sokulan 1,3-diaril-2-propen-1-onlardan başlanarak gerçekleştirilmiştir. Nihai bileşiklerin lityum alüminyum hidrit ile indirgenmesi, gerekli imidazol türevlerini vermek üzere 1,1'-karbonildimidazol ile işlenen ilgili alkollerini sağlamıştır. 3-arilpirol yapısında bir (arilmetil)imidazol parçası içeren kırk dört yeni pirol yukarıdaki prosedüre göre hazırlanmış ve *Candida albicans* ve *Candida spp.*'ye karşı *in vitro* testler yapmışlardır. Test bileşikleri arasından 10 tanesinin *C. albicans*'a karşı oldukça aktif olduğu bulunmuştur. En aktif türev bifonazolden iki kat daha güçlü olduğu ve aktivitesinin mikonazol ve ketokonazolden 4 kat daha fazla olduğu belirtilmiştir. Diğer dokuz bileşik, bifonazolünkiyle aynı düzende antifungal aktivite göstermiştir ve mikonazol ve ketokonazolden yaklaşık 2 kat daha aktiftir (68).

3. MATERYAL VE METOT

3.1. Kimyasal Çalışmalar

3.1.1. Materyal

Bu tez kapsamında kullanılan kiral moleküller Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Araştırma Laboratuvarında tarafımızdan sentezlenmiştir. Mikonazol benzeri antifungal aril(alkil) azol türevlerinin tasarımının ve sentezinin gerçekleştirildiği araştırma laboratuvarında, sentezlenecek bir seri mikonazol türevinin başlangıç maddesi olan 4-klorofenaçil imidazol alkol, 3,4-diklorofenaçil imidazol alkol, naftačilaçil imidazol alkol, 4-klorofenaçil triazol alkol bileşikleri sentezlenmiştir. Bu tez kapsamında, kiral yapıda olan bu dört molekülün enansiyomer ayrımı çalışmaları yapılmıştır. Sentez aşamasında kullanılan 1-(naftalen-2-il)-2-bromoetanon, 1-(4-klorofenil)-2-bromoetanon, 1-(3,4-diklorofenil)-2-bromoetanon, 1-(naftalen-2-il)-2-(1*H*-imidazol-1-il)etanon, 1-(4-klorofenil)-2-(1*H*-imidazol-1-il)etanon ve 1-(3,4-diklorofenil)-2-(1*H*-imidazol-1-il)etanon literatür yöntemlerine göre tarafımızdan hazırlanmıştır (8-10). Laboratuvar ortamında hazırladığımız kimyasalların sentezi ve HPLC analizi için kullanılan 2-asetilnaftalen (Merck), imidazol (Aldrich), brom (Fluka), metanol (Honeywell, HPLC grade) ve n-hekzan (Sigma-Aldrich) ticari olarak satın alınmıştır.

3.1.2. Sentez Yöntemleri

1-(Naftalen-2-il)-2-bromoetanon, 1-(4-klorofenil)-2-bromoetanon, 1-(3,4-diklorofenil)-2-bromoetanon

0.05 mol 2-asetilnaftalen/4-kloroasetofenon/3,4-dikloroasetofenon buz banyosunda asetik asit içerisinde çözülür. Üç boyunlu balonda gerçekleştirilen reaksiyon ortamına birkaç damla hidrobromik asit eklenir ve sonrasında asetik asitle seyreltilmiş 0.05 mol brom reaksiyon balonu üzerine takılan damlatma hunisi yardımıyla, sürekli karıştırılarak damla damla eklenir. Brom ilavesi tamamlanır ve sonrasında da reaksiyon oda ısısında 3 saat karıştırılarak devam ettirilir. Bileşikler reaksiyon sonunda buzlu suya dökülerek katılaştırılır. Süzülerek alınan çökelek sodyum bikarbonat çözeltisi ile yıkanır ve karanlıkta kurutulur. Metanol/su karışımından kristallendirilerek saflaştırılır (8-10).

1-(Naftalen-2-il)-2-(1H-imidazol-1-il)etanon, 1-(4-klorofenil)-2-(1H-imidazol-1-il)etanon, 1-(4-klorofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)etanon, 1-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-imidazol-1-il)etanon

Buz banyosunda soğutulan 0.03 mol imidazolün 2.5 ml dimetilformamitteki çözeltisi üzerine, 0.01 mol keton türevinin 2.5 ml dimetilformamitteki çözeltisi yavaş yavaş eklenir. 2 saat buz banyosunda, sonrasında 1 gece oda sıcaklığında karıştırılır. Reaksiyon ortamı buzlu suya dökülür; çöken madde süzülür, kurutulur. Metanolden kristallendirilerek saflaştırılır (8-10).

1-(Naftalen-2-il)-2-(1H-imidazol-1-il)etanol, 1-(4-klorofenil)-2-(1H-imidazol-1-il)etanol, 1-(4-klorofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)etanol, 1-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-imidazol-1-il)etanol

1.5 mmol keton türevleri 25 ml metanolde çözülür ve buz banyosunda 5°C'ye kadar soğutulur. Sonrasında reaksiyon kabına 4.5 mmol sodyum borhidrür ilave edilir ve 1 saat buz banyosunda karıştırılır. Reaksiyon sonunda metanol uçurulur, kalan artık buzlu su ilave edilerek katılaştırılır ve uygun çözücüler yardımıyla kristallendirilerek saflaştırılır (8-10).

3.1.3. Analitik Yöntemler

Erime Derecesi Tayinleri

Bileşikler daha önceden araştırma ekibimiz tarafından sentez edildiğinden erime dereceleri literatürde kayıtlıdır. Bileşiklerin yeniden saf olarak elde edilip edilmediğini anlamak amacıyla erime dereceleri belirlenerek kontrolleri yapılmıştır.

İnce Tabaka Kromatografisi ile Yapılan Kontroller

Materyal:

Plaklar: Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) hazır plaklar kullanılmıştır. Çözücü sistemleri ve belirteçlerin hazırlanmasında kullanılan kimyasal maddeler Merck firmasının ürünleridir.

Çözücü sistemleri: Bileşiklerin kromatografik kontrollerinde aşağıda verilen çözücü sistemleri kullanılmıştır:

S-1: Kloroform - Metanol (90:10)

S-2: Kloroform (100)

S-3: Hekzan-Etilasetat (50:50)

Yöntem

Sürüklenme şartları: Kromatografi tanklarına çözücü sistemleri konulduktan sonra 24 saat oda sıcaklığında bekletilerek tankların doygunlukları sağlanmıştır. Kieselgel 60 F₂₅₄ (Merck) hazır alüminyum plaklara sentez ürünleri ile bunların hazırlanmasında kullanılan başlangıç maddelerinin uygun çözücülerdeki çözeltileri tatbik edilmiş, R_f değerleri oda sıcaklığında 10 cm'lik sürüklenme sağlandıktan sonra tayin edilmiştir.

Lekelerin belirlenmesi: Kromatogramlarda sentez ürünlerine ve başlangıç maddelerine ait lekelerin belirlenmesinde UV ışıktan (254 ve 365 nm) yararlanılmıştır.

HPLC Yönteminin Geliştirilmesi

Bileşiklerin kiral ayırımı Agilent 1100 Series Yüksek Basınçlı Sıvı Kromatografisi cihazı ile Agilent Quaternary Pump ve Agilent Multiple Wavelength Detector kullanılmıştır. Analizler maddelerin maksimum absorpsiyon verdikleri dalga boylarında, oda sıcaklığında yapılmıştır.

Ayırımında silika jel üzerine kaplanmış amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) (Chiralpak AD; 25 cm x 4.6 mm iç çap; partikül büyüklüğü 10 µm) yapısındaki kiral kolon (Daicel Chemical Industries, Ltd.) kullanılmıştır.

Hareketli faz olarak aşağıda belirtilen çözücü sistemleri yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kalitesinde çözücüler (HPLC saflıkta Merck) kullanılarak hazırlanmıştır:

Metanol - n-Hekzan (100:0)

Metanol - n-Hekzan (90:10)

Metanol - n-Hekzan (80:20)

Metanol - n-Hekzan (70:30)

Akış hızı 0.2 ml/dakika olarak ayarlanmıştır.

Ayırımlarda kapasite (k_1 ve k_2), selektivite (α), etkinlik (teorik tabaka sayısı, N_1 ve N_2) ve rezolüsyon (R_s) parametreleri aşağıda verilen eşitliklere göre hesaplanmıştır:

Kapasite faktörü (k): $k_1 = (t_1 - t_0) / t_0$

$k_2 = (t_2 - t_0) / t_0$

t_1 ve t_2 : Birinci ve ikinci enansiyomerin retensiyon zamanı (dk)

t_0 : Alıkonmamış pikin retensiyon zamanı (dk)

Selektivite faktörü (α): $\alpha = k_2 / k_1$

k_1 ve k_2 : Birinci ve ikinci enansiyomerin kapasite faktörü

Teorik tabaka sayısı (N): $N_1 = 16(t_1 / w_1)^2$

$N_2 = 16(t_2 / w_2)^2$

t₁: Birinci enansiyomere ait pikin enjeksiyon noktasına uzaklığı (cm)

t₂: İkinci enansiyomere ait pikin enjeksiyon noktasına uzaklığı (cm)

w₁ ve w₂: Birinci ve ikinci enansiyomere ait pik genişliği (cm)

Rezolüsyon faktörü (R_s): $R_s = 2(t_2 - t_1) / (w_1 + w_2)$

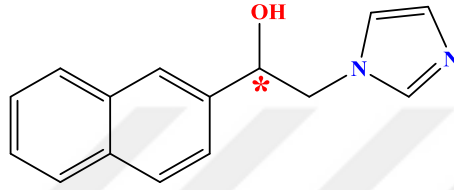
Tüm bileşikler, yaklaşık 0.5 mg/mL konsantrasyonlarda metanol içerisinde çözülmüştür. Analizler, oda sıcaklığında (22°C), normal faz moduna göre Chiralpak AD kolonu ile yapılmıştır. Mobil faz elüsyonu, çeşitli yüzdelerde metanol ve n-heksan karışımı kullanılarak izokratik olarak yapılmıştır. Tüm çözücüler HPLC saflığındadır. Akış hızı 0.2 mL dk⁻¹'e ayarlandı ve UV tespit dalga boyu 254 nm idi. Alıkonmamış pikin retensiyon zamanı (t₀) gallik asit ile tayin edilmiştir. Sabit bir akış hızında her bir kromatografik çalışma için değişmemiş ve sonraki hesaplamalarda kullanılmıştır. Alıkonma süreleri, çift belirlemelerin ortalama değerleridir.

4. BULGULAR

4.1. Kimyasal Çalışmalar

Bileşikler daha önceden sentezlenmiş türevler olduğundan saflık kontrolleri erime derecesi kontrolleriyle literatür verileri kıyaslanarak yapılmıştır. Ayrıca tüm bileşikler için C18 kolon kullanılarak ters faz HPLC yöntemiyle de bileşiklerin saflık kontrolleri yapılmıştır.

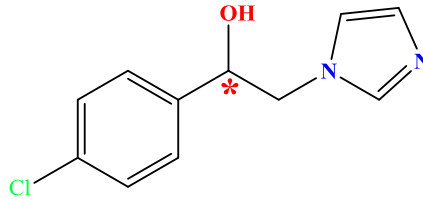
1-(Naftalen-2-il)-2-(1*H*-imidazol-1-il)etanol (Bileşik 1)



Şekil 4.1. 1-(Naftalen-2-il)-2-(1*H*-imidazol-1-il)etanol

1.5 mmol 1-(naftalen-2-il)-2-(1*H*-imidazol-1-il)etanon ve 4.5 mmol sodyumborohidürden genel sentez yöntemine göre elde edilir. Metanol/sudan kristallendirilerek saflaştırılır. Sarı renkte, kristalize bir maddedir. E.D. 156-8°C. Eter, petrol eteri ve suda çözünmez; aseton, etil asetat, kloroform ve metanolde soğukta çözünür.

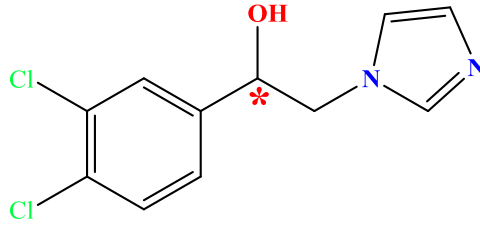
1-(4-Klorofenil)-2-(1*H*-imidazol-1-il)etanol (Bileşik 2)



Şekil 4.2. 1-(4-Klorofenil)-2-(1*H*-imidazol-1-il)etanol

1.5 mmol 1-(4-klorofenil)-2-(1*H*-imidazol-1-il)etanon ve 4.5 mmol sodyumborohidürden genel sentez yöntemine göre elde edilir. Metanol/sudan kristallendirilerek saflaştırılır. Sarı renkte, kristalize bir maddedir. E.D. 126-8°C. Eter, petrol eteri ve suda çözünmez; aseton, etil asetat, kloroform ve metanolde soğukta çözünür.

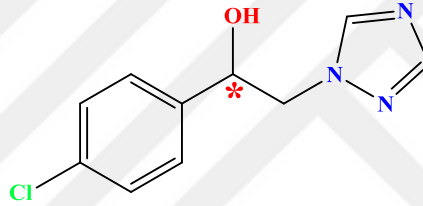
1-(3,4-Diklorofenil)-2-(1H-imidazol-1-il)etanol (Bileşik 3)



Şekil 4.3. 1-(3,4-Diklorofenil)-2-(1H-imidazol-1-il)etanol

1.5 mmol 1-(3,4-diklorofenil)-2-(1H-imidazol-1-il)etanon ve 4.5 mmol sodyumborohidrürden genel sentez yöntemine göre elde edilir. Metanol/sudan kristallendirilerek saflaştırılır. Sarı renkte, kristalize bir maddedir. E.D. 134-6°C. Eter, petrol eteri ve suda çözünmez; aseton, etil asetat, kloroform ve metanolde soğukta çözünür.

1-(4-Klorofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)etanol (Bileşik 4)



Şekil 4.4. 1-(4-Klorofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)etanol

1.5 mmol 1-(4-klorofenil)-2-(1H-1,2,4-triazol-1-il)etanon ve 4.5 mmol sodyumborohidrürden genel sentez yöntemine göre elde edilir. Metanol/sudan kristallendirilerek saflaştırılır. Sarı renkte, kristalize bir maddedir. E.D. 117-9°C. Eter, petrol eteri ve suda çözünmez; aseton, etil asetat, kloroform ve metanolde soğukta çözünür.

4.2. Analitik Çalışmalar

Bileşikler amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbammat) (Chiralpak AD) kiral stasyonier faz üzerinde enansiyomerlerine ayırımı (Mobil faz olarak metanol ile hekzan karışımı aşağıda verilen oranlarda kullanılmıştır.

Tablo 4.1. Bileşikler amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) (Chiralpak AD) kiral stasyonier faz üzerinde enansiyomerlerine ayırımı

Bileşik	Hekzan	k ₁	k ₂	α	R _s	N ₁	N ₂	t ₁	t ₂
	%								
1	0	0.12	0.18	1.50	0.69	6527	1499	10.10	10.65
	10	0.23	0.28	1.23	0.54	7872	1527	12.20	12.70
	20	0.39	0.47	1.21	0.74	3660	2166	12.10	12.80
	30	0.36	0.44	1.23	0.83	4860	2218	12.20	12.95
4	0	0.02	0.12	6	1.46	3721	3331	9.15	10.10
	10	0.06	0.22	3.70	2.31	4011	3951	9.50	11.00
	20	0.06	0.28	4.64	3.07	4053	4356	9.55	11.55
	30	0.07	0.31	4.44	3.38	4096	4546	9.60	11.80

^a Analizler $\lambda_{\max}$ 'da, 0.2 ml/dk akış hızı ile yapılmıştır.

^b Bileşik enansiyomerlerine ayrılmamıştır.

* α değeri olarak bilgisayarın hesaplaması kullanılmıştır.

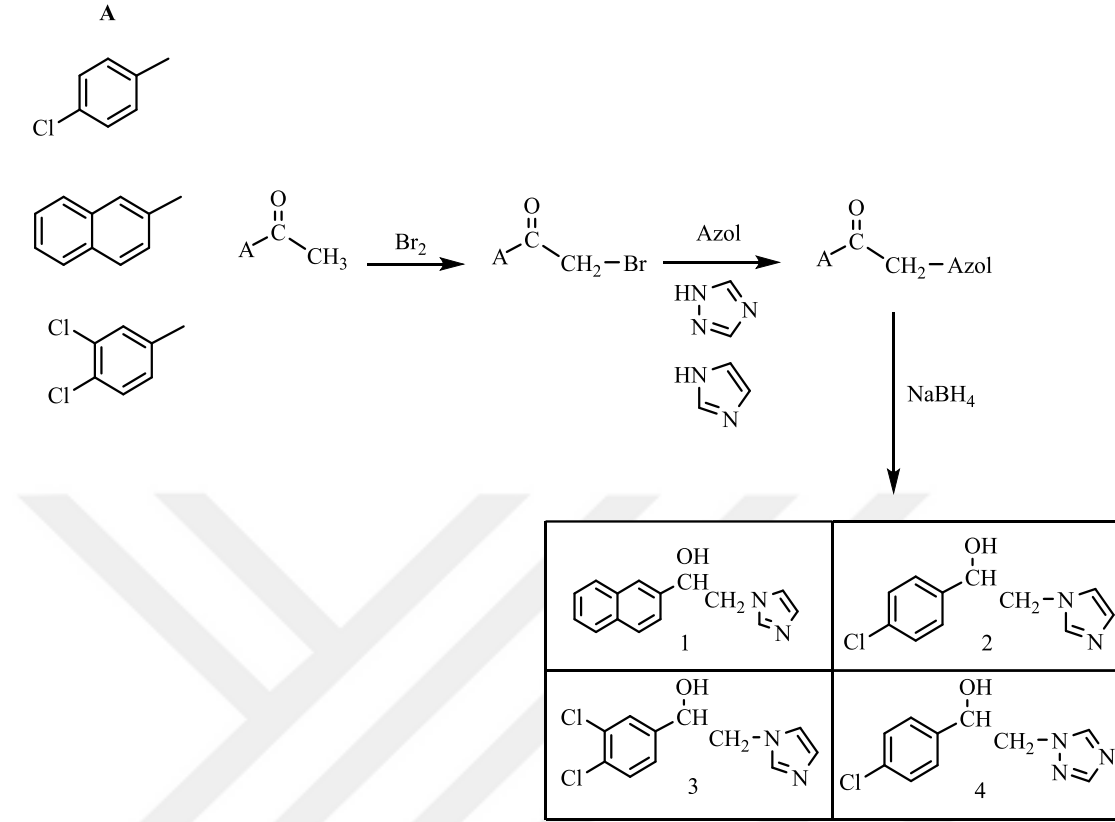
5. TARTIŞMA

Son yıllarda, kiral ayırma, yeni kiral ilaçların geliştirilmesi için hala en büyük zorluklardan biridir. Enansiyomerlerin verimli bir şekilde kiral ayrımı için çeşitli HPLC, GC, süper kritik sıvı kromatografisi (SFC), CE ve kılcal elektrokromatografi (CEC) yöntemleri geliştirilmiştir. Bu ayırma teknikleri arasında, HPLC, enansiyomerlerin analitik veya preparatif ayrılmasında ve her bir enansiyomerin optik saflığının belirlenmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Enansiyomerlerin kromatografik yöntemlerle doğrudan ayrılması, kiral sabit faz üzerinde kiral mobil faz kullanılarak veya kiral sabit faz üzerinde kiral olmayan mobil faz kullanılarak gerçekleştirilir. CSP'ler üzerinde HPLC ile enantiyoseparasyon, enansiyomerlerin doğrudan ayrılması için giderek daha önemli bir teknik haline gelmiştir. Ayrıca, polisakkarit bazlı CSP'lere sahip HPLC en yaygın şekilde kullanılır. Bunlar arasında, makro gözenekli silika jel üzerine adsorbe edilen selüloz ve amiloz türevleri geniş kullanım alanına sahiptir (1-3).

(Arilalkil)azoller, antikonvülsan ve antifungal aktiviteleri nedeniyle artan ilgi gören önemli bir bileşik sınıfıdır. Yapı-aktivite ilişkisi çalışmaları, bu grubun antikonvülsan özelliklerinin, imidazol/triazol halkalarına ek olarak alkilen köprüsünde küçük bir oksijen fonksiyonel grubunun (karbonil, etilen dioksi, metoksi, asiloksi, hidroksi ikame edicileri ve oksim eter/ester türevleri gibi) varlığıyla ilişkili olduğunu göstermektedir. Araştırma grubumuz tarafından çok sayıda (arilalkil)azol alkol esterinin antikonvülsan ve antifungal aktivite profilini tasarlanmış, sentezlenmiş ve değerlendirilmiştir (8-10). Tüm bu bileşikler arasından kiral bir merkeze sahip olanların, emilimleri, reseptörler ve enzimlerle etkileşimleri, plazma proteinlerine bağlanmaları, biyotransformasyonları ve enansiyomerlerin vücuttan atılmaları stereoselektif olabilir. Bu nedenle, her bir enansiyomerin biyolojik özelliklerini elde etmek ve araştırmak için bu bileşiklerin rasemik karışımlarını ayırmak için uygun HPLC yöntemi geliştirmek önem arz etmektedir.

Tez kapsamında çalışılan (arilalkil)azol grubu bileşiklerin antifungal bileşikler içinde önemli yeri olan ve kiral yapıdaki mikonazol ile yapısal olarak benzerliği vardır. Ayrıca literatürde naftalen halkasının çeşitli konumlarında genellikle alkil, halojenoalkil sübstitüe naftalen-1-ol türevi bileşiklerin antibakteriyel ve antiseptik etkilerinin olduğu bildirilmektedir (8). Literatürde yapıları, sentezleri ve farmakolojik aktivite çalışmaları kayıtlı olan bu (arilalkil)azol türevi bileşikler ayırım çalışmaları için bu tez kapsamında

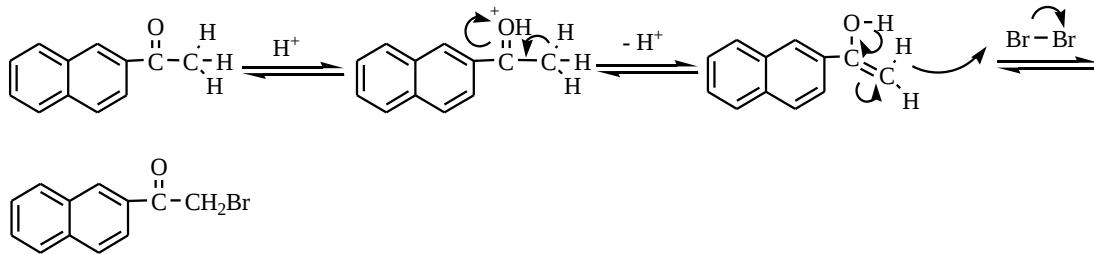
yeniden sentezlenmiş ve saflaştırılmıştır. Sentezi yapılan bileşiklerin yapıları ve sentez yöntemleri şemaları Şekil 5.1’de verilmiştir.



Şekil 5.1. Bileşiklerin sentez şeması

5.1. Sentez Çalışmaları

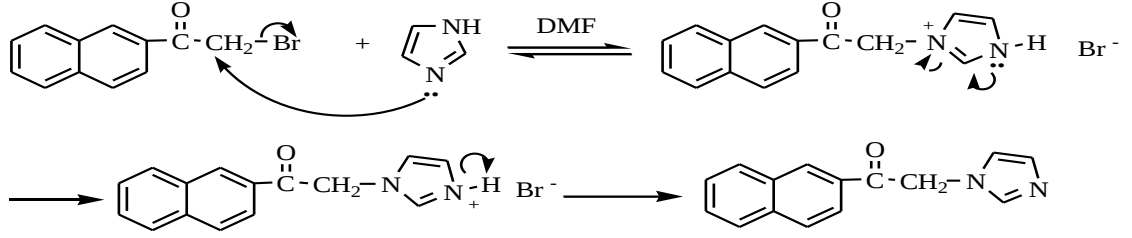
Başlangıç maddesi olarak kullanılan 2-bromo-1-(naftalen-2-il)etanon, 2-asetilnaftalenin asetik asitli ortamda eser miktarda hidrojen bromür varlığında bromlanmasıyla hazırlanmıştır (Şekil 5.2.).



Şekil 5.2. Başlangıç maddesinin Br ile reaksiyon şeması

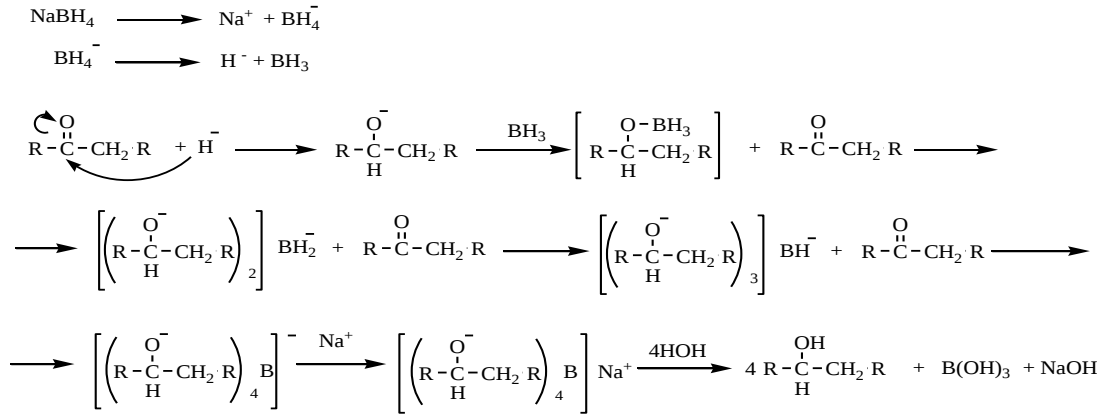
Nafimidon hidroklorür, 2-bromo-1-(naftalen-2-il)etanon ile imidazolün N-alkilasyon reaksiyonu ve ardından gaz hidroklorik asit ile tuzuna geçilerek elde edilmiştir. Reaksiyonda imidazolün 2 mol fazlası baz olarak kullanılmıştır. Bileşik metanol/etilasetat

ile kristallendirilmiştir. Reaksiyonun mekanizmasının SE^2 olduğu ve süstitüsyonun önce tersiyer azot atomu üzerinden yürüdüğü, daha sonra çifte bağın diğer azot atomuna kayması ile ürünün oluştuğu öngörülmektedir (Şekil 5.3.) (69).



Şekil 5.3. Nafimidon hidroklorür, 2-bromo-1-(naftalen-2-il)etanon ile imidazolün N-alkilasyon reaksiyon şeması.

Mikonazol benzeri (arilalkil)azol eter türevlerinin başlangıç maddesi olan kiral alkol türevi bileşiklerin hazırlanmasında kullanılan 4-klorofenaçil imidazol alkol, 4-klorofenaçil triazol alkol 3,4-diklorofenaçil imidazol alkol, nafimidon alkol, keton sodyum borhidrür ile redüksiyonu sonucu elde edilmiştir. Redüksiyonda sodyum borhidrürün 3 kat fazlası kullanılmış ve reaksiyon ekzotermik olduğu için buz banyosunda gerçekleştirilmiştir. Karbonil bileşiklerinin sodyum borhidrür ile redüksiyonunda metalden karbonil grubuna hidrür iyonu transfer olur. Bu transferde hidrür iyonu nükleofil olarak hareket eder. Bu adım bütün hidrojen atomları transfer olana kadar devam eder (Şekil 5.4.) (69).

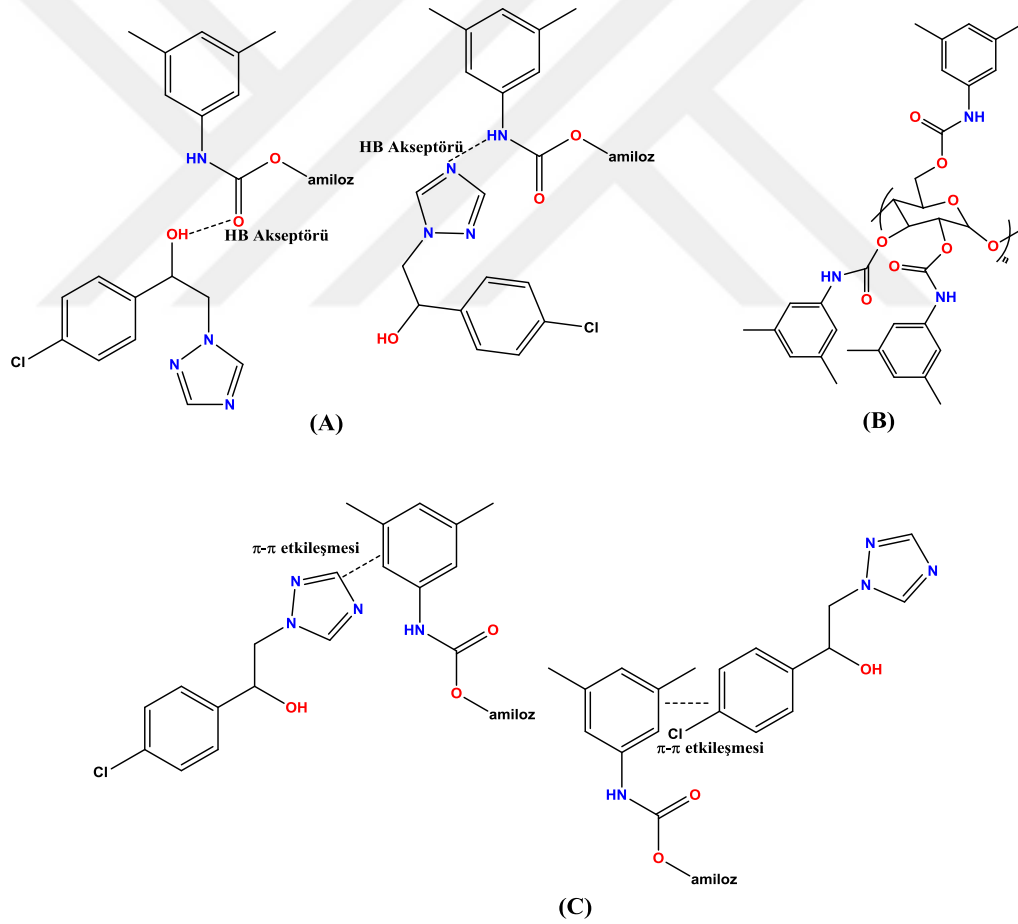


Şekil 5.4. Başlangıç maddelerinin keton sodyum borhidrür ile redüksiyon şeması

Sentezi yapılan bileşiklerin erime derecesi değerleri ve ince tabaka kromatografisi ile yapılan kontrolleri literatür verileri kıyaslanmış ve bileşiklerin tekrar saf olarak elde edildiğinden emin olunmuştur.

5.2. Enansiyomer Ayırım Çalışmaları ve Kromatogramların Yorumlanması

Sentezi yapılan bileşikler yapılarında asimetrik bir merkez taşıdığından rasemik karışımlar halinde elde edilmişlerdir. Bileşiklerin enansiyomerlerine ayırımı HPLC ile silika jel üzerine kaplanmış amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) (Chiralpak AD) yapısında kiral kolon kullanılarak yapılmıştır. Polisakkarit fenilkarbamat türevi CSP grubu olan Chiralpak AD kolon ile ayırımın esas diastreomerik solut-CSP kompleksinin oluşumuna dayanır. CSP yapısında bulunan polar karbamat gruplarının, bileşiklerin O-H ve N-H grupları ile hidrojen bağı oluşturması ve aromatik halkalar aracılığı ile π - π etkileşimlerine girmesi sonucu solut-CSP kompleksi oluşur. Bileşiklerin yapısında bulunan aromatik halkaların da CSP'nin kiral boşluğuna yerleşmesi sonucu solut-CSP kompleksi stabilize olmakta ve bu boşluğa olan sterik uyum enansiyomerler arasında farklılık göstermektedir (Şekil 5.5.).

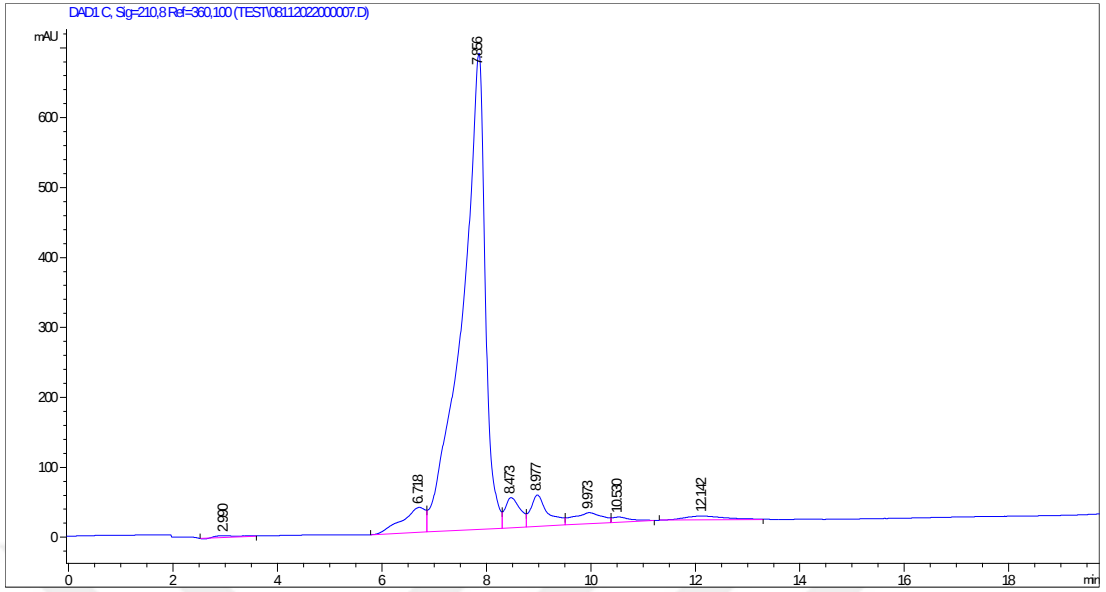


Şekil 5.5. Sentezlenen bileşikler ile CSP arasındaki etkileşmeler ((A) Amiloz CSP ile bileşiklerin alıcı hidrojen bağlarının önerilen etkileşimleri, (B) amiloz tris(3,5-dimetilfenilkarbamat) yapısı ve (C) amiloz CSP arasındaki bileşiklerle π - π bağlarının önerilen etkileşimleri) (70).

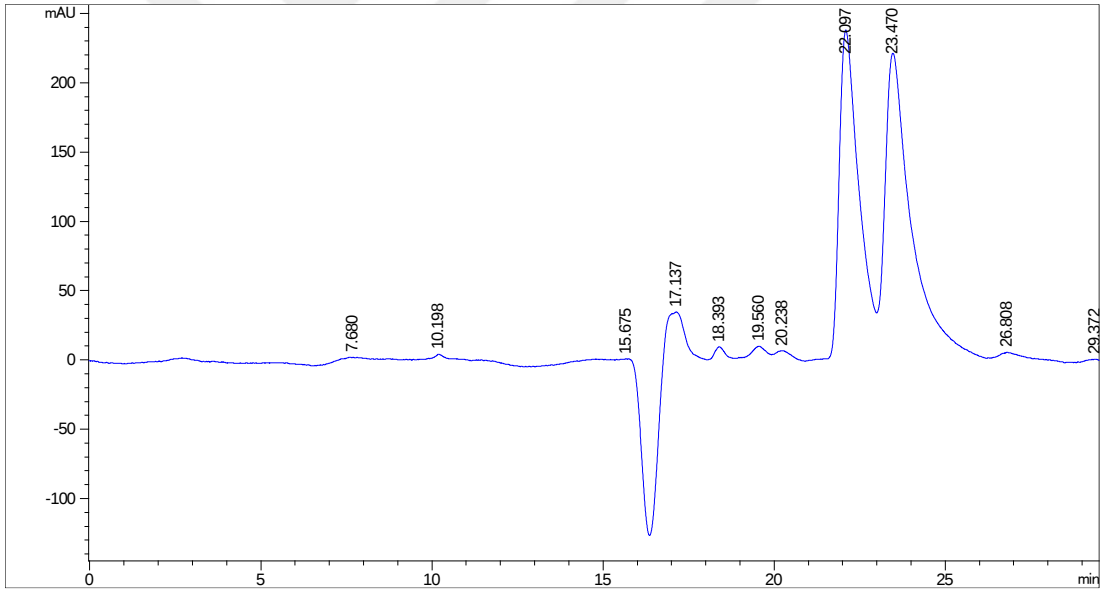
Bu çalışmada, bileşiklerin kiral ayrımı için sadece metanol ve çeşitli miktarlarda n-heksan (%0-30) içeren metanol:n-heksan karışımı mobil fazlar kullanıldı. Mobil fazımızda metanol oranı yüksek olduğundan, kromatografik sistemimiz normal faz modu çerçevesinde düşünülmüştür. Bileşik **1** ve **4** için bütün oranlarda ayırım elde edilmiş ve hekzan oranının artması ile rezolüsyon ve selektivite değerlerinin arttığı görülmüştür. Bileşik **2** ve **3** için kullanılan kolon ve mobil faz sistemi ile enansiyomer ayrımı gerçekleştirilememiştir. Bileşiklerin kiral ayırım çalışmalarının Chiralpak AD kolon ile gerçekleştirilebildiği ayrıca C18 kolonlar kullanılarak yapılan ters faz HPLC analizleri ile de gösterilmiştir (Şekil 5.6.).



C18 Kolon

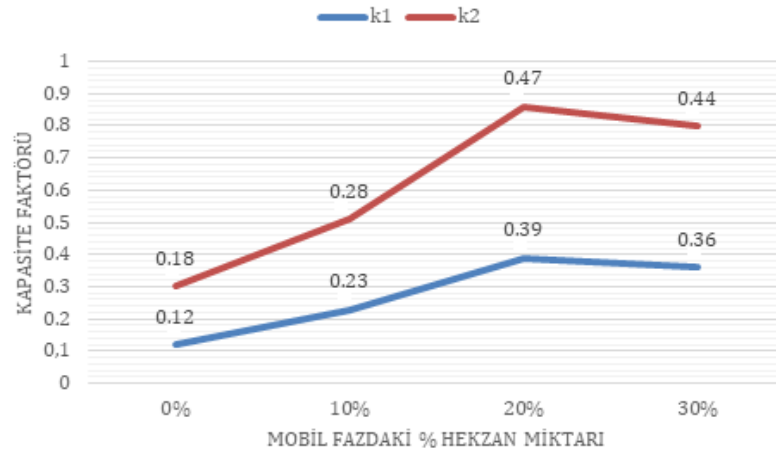


ChiralPak AD

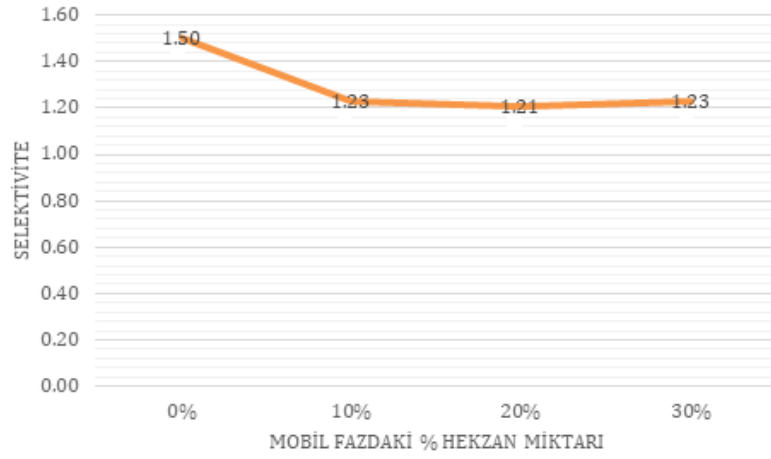


Şekil 5.6. Bileşik 1'in C18 kolon ve normal kolon ile alınan kromatogramları

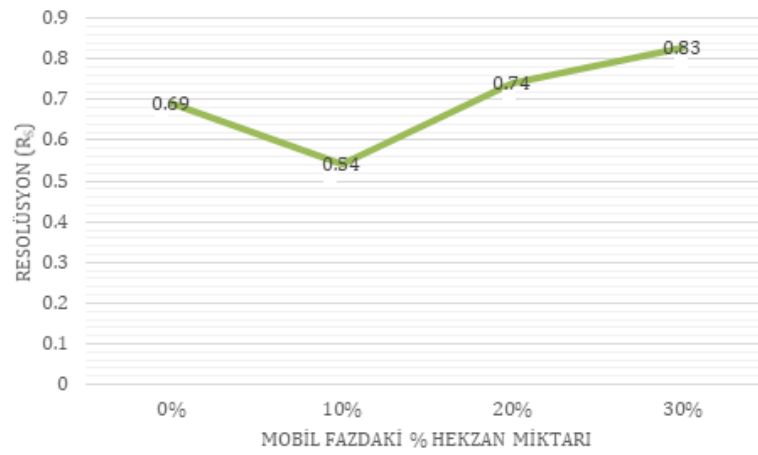
Hareketli faz olarak kullanılan metanoldeki n-heksan içeriğinin, alıkonma zamanı, seçicilik ve rezolüsyon üzerindeki etkisi grafiklenerek Şekil 5.7'te gösterilmiştir.



(A)



(B)



(C)

Şekil 5.7. n-heksan içeriğinin, alıkonma zamanı, seçicilik ve rezolüsyon üzerindeki etkisi

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu çalışmada, İnönü Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya anabilim dalı tarafından oluşturulan arilalkil azol antifungalleri bileşik serisinden başlangıç maddesi 4-klorofenaçil imidazol alkol, 4-klorofenaçil triazol alkol 3,4-diklorofenaçil imidazol alkol, nafimidon alkol bileşiğinin enansiyomerleri 0.2 ml/dakika akış hızında çeşitli oranlarda (h/h) metanol/n-hekzan karışımları kullanılarak Chiralpak AD kolonlar ile analitik olarak ayrılmıştır. Mobil faz bileşimi kromatografik parametreleri etkilemiştir. Araştırılan bileşiklerin temel ayrımları, mobil faz olarak sadece metanol ve etanol kullanıldığında gözlenmezken, metanol/n-heksan karışımları kullanıldığında baseline ayrımları elde edilmiştir. Metanol/n-heksan (70:30) mobil fazı, en kısa sürede baseline ayrımını sağlama açısından en uygundur. Kromatografik sonuçlar, bu çalışmada geliştirilen analitik HPLC yönteminin, her enansiyomerin farmakolojik aktivitesini değerlendirmek için Chiralpak AD kolonu üzerindeki bileşiğin preparatif ayrımında da uygulanabileceğini göstermiştir.

KAYNAKLAR

1. Bahar A, Sönmez Nİ, Vızdıklar C, Aydın V, Akıcı A. The concept of chirality and its association with drug safety: Raditional review. *J Lit Pharm Sci* 2022,11:77-85.
2. Gal J, The discovery of stereoselectivity at biological receptors arnaldo piutti and the taste of the asparagine enantiomers historyand analysis on the 125th anniversary. *Chiralty*, 2012, 24: 959- 76.
3. FDA US Food and Drug Administration. Development of new stereoisomeric drugs, <https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/development-new-stereoisomeric-drug>. Son Erişim Tarihi 4 Kasım 2022.
4. Ye X, Liu Y, Li F. Biomarkers of oxidative stress in the assessment of enantioselective toxicity of chiral pesticides. *Curr Protein Pept Sci* 2017, 18:33-40.
5. Stalcup AM. Chiral separations. *Annu Rev Anal Chem*, 2010, 3:341-63.
6. Remelli M. Chiral ligand–exchange chromatography of pharmaceutical compounds on dynamically coated(home-made) stationary phases. *Curr Med Chem* 2017, 24: 818-28.
7. Rasmussen H, Wang X. Chiral seperations In: Ahuja S (ed). *HPLC Method Development for Pharmaceuticals*, 2nded. USA, San Diego, 2007:115.
8. Sarı S, Akkaya D, Zengin M, Sabuncuoğlu S, Özdemir Z, Alagöz MA, Karakurt A, Barut B. Antifungal azole derivatives featuring naphthalene prove potent and competitive cholinesterase inhibitors with potential cns penetration according to the in vitro and in silico studies. *Chem Biodiversity* 2022, 19:27.
9. Bozbey İ, Uslu H, Türkmenoğlu B, Özdemir Z, Karakurt A, Levent S. Conventional and microwave prompted synthesis of aryl(alkyl)azole oximes, ¹H-NMR spectroscopic determination of E/Z isomer ratio and homo-lumo analysis. *J Mol Struct* 2022, 1251:1-12.
10. Karakurt A, Bozbey I, Uslu H, Sarı S, Özdemir Z, Şalva E. Synthesis and cytotoxicity studies on new pyrazole-containing oxime ester derivatives. *Trop J Pharm Res* 2019, 18:1315-22.

11. Solomons G, Fryhle CB, Snyder A. Constitutional Isomers and Stereoisomers. In: Kalkut J (ed). *Organic Chemistry*, 12nd (ed). USA, River Street Hoboken, 2016: 194-7.
12. Fernandes C, Carraro ML, Riberio J, Araujo J, Tititan ME, Pinto MM. Synthetic chiral derivatives of xanthenes: Biological activities and enantioselectivity studies. *Molecules* 2019, 24:791.
13. Tokunaga E, Yamamoto T, Ito E, Shibata N. Understanding the Thalidomide Chirality in Biological Processes by the Self-disproportionation of Enantiomers. *Sci Rep* 2018, 8:17131.
14. Kirkpatrick D, Yang J, Trehly M. Determination of the enantiomeric purity of epinephrine by HPLC with circular dichroism detection. *J Liq Chromatogr Relat Technol.* 2017, 1:8.
15. Hubbard R, Gregerman IR, Wald G. Geometrical Isomers Of Retinene. *J Gen Physiol* 1953, 36: 415-29.
16. Güven EC, Bolat D, Gedik K, Karakuş PB. Kiral kirleticiler ve çevresel önemi. *Pamukkale Univ Muh Bilim Derg* 2016, 22: 486-96.
17. Nguyen LA, He H, Pham-Huy C. Chiral Drugs. *Int J Biomed Sci.* 2006, 2: 85–100.
18. Rekoske JE. Chiral separations. *AIChE J* 2001, 47:1.
19. Singh N, Sharma L. Enantioseparation of D- and L- isomers of Chiral Drugs for Improving their Bioavailability: Some Techniques Including Micellization with Gemini Surfactants. *Indian J Pharm Educ* 2018, 52:334-341.
20. Ali I, Alam DS, Al-Othman ZA, Farooqi JA. Chiral-HPLC methods for enantiomeric separation of chiral drugs in biological samples. *J Chromatogr Sci* 2013, 51: 645–54.
21. Peikova L, Tzankova D, Dineva A, Georgieva M, Zlatkov A. Development of a chiral RP-HPLC method for identification of stereomers of newly synthesised xanthine-based hydrazidehydrazone compound. *Pharmacia* 2019, 66: 1–6.
22. Gupta V, Jain A, Guptan K. Development and validation of HPLC method- a review. *J Appl Pharm Sci* 2012, 4: 17-25.

23. Tang M, Zhang J, Zhuang S, Liu W. Development of chiral stationary phases for high-performance liquid chromatographic separation. *Trends Analyt Chem* 2012, 39: 180- 94.
24. Tang J, Zhang S, Lin Y, Zhou J, Pang L, Nie X, Zhou B, Tang W. Engineering cyclodextrin clicked chiral stationary phase for high-efficiency enantiomer separation. *Sci Rep* 2015, 5: 11523.
25. Pirkle WH, Pochapsky TC, Mahler GS, Field RE. Chromatographic separation of the enantiomers of 2-carboalkoxyindolines and N-aryl- α -amino esters on chiral stationary phases derived from N-(3,5-dinitrobenzoyl)- α -amino acids. *J Chromatogr A* 1985, 348:89-96.
26. Calderón C, Horak J, Lämmerhofer M. Chiral separation of 2-hydroxyglutaric acid on cinchonan carbamate based weak chiral anion exchangers by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr A* 2016, 1467:239-45.
27. Lough WJ. Classification of LC chiral stationary phases: wainer types I–V revisited. *J Chromatogr B* 2014, 968:1-7.
28. Bi C, Zheng X, Azaria S, Beeram S, Li Z, Hage DS. Chromatographic Studies of Protein-Based Chiral Separations. *J List* 2016, 3:27.
29. Chankvetadze B. Polysaccharide-based chiral stationary phases for enantioseparations by high-performance liquid chromatography, *J Mol Biol Methods* 2019, 1985:93
30. T.UpmanisH.KažokaP.Arsenyan A study of tetrapeptide enantiomeric separation on crown ether based chiral stationary phases. *J Chromatogr A* 2020, 1622:461152.
31. Ilisz I, Orosz T, Peter A. High-performance liquid chromatography enantioseparations using macrocyclic glycopeptide-based chiral stationary phases. *J Mol Biol Methods* 2019, 1985:201-37.
32. Xiong O, Jin J, Lv L, Bu Z, Tong S. Chiral ligand exchange countercurrent chromatography: Enantioseparation of amino acids. *J Sep Sci* 2018, 41:1479-88.
33. Qu F, Shi R, Peng L, Zhanf Y, Gu X, Wang X, Murad S. Understanding the effect of zeolite crystal expansion/contraction on separation performance of NaA zeolite membrane: A combined experimental and molecular simulation study. *J Membr Sci* 2017, 539:14-23.

34. Lima JJ, Aguilar A, Sanchez FG, Díaz AZ. Enantiomeric fraction of styrene glycol as a biomarker of occupational risk exposure to styrene. *Chemosphere* 2017, 168:903-7.
35. Caccamese S. Direct high-performance liquid chromatography (HPLC) separation of etodolac enantiomers using chiral stationary phases. *Chirality* 1993, 5: 164-7.
36. Humber LG, Demerson CA, Swaminathan P, Bid PH. Etodolac (1,8-diethyl-1, 3,4,9-tetrahydropyrano[3,4-b] idole-1-acetic acid): A potent antiinflammatory drug. *J Med Chem* 1986, 29:871:874.
37. Demerson CA, Humber LG, Abraham NA, Schilling G, Martel RR, Pace-Asciak C. Resolution of etodolac and antidamma tory and prostaglandin synthetase inhibiting properties of the enantiomers. *J Med Chem* 1983, 26 :1778-80.
38. Serignese V, Aboul-Enein HY. Direct enantioselective separation of bevantolol by high-performance liquid chromatography on normal and reverse cellulose chiral stationary phases, *Biomed Chromatogr* 1994, 8:22-5.
39. Zhou F, Dai L, Wei S, Cheng G, Li L. Toxicokinetics and tissue distribution of prothioconazole in male adult Sprague–Dawley rats following a single oral administration. *Xenobiotica* 2015, 45:450- 55.
40. Liu H, Ding W. Enantiomeric Separation Of Prothioconazole And Prothioconazole-Desthio On Chiral Stationary Phases. *Chirality* 2019, 31:219-29.
41. Baagnall J, Malia L, Lubben A, Kasprzyk-Horden B. Stereoselective biodegradation of amphetamine and methamphetamine in river microcosms. *Water Research* 2013, 47: 5708–18.
42. Kodama S, Yamamoto A, Ohura T, Akinobu M, Toshio K. Enantioseparation of imazalil residue in orange by capillary electrophoresis with 2-hydroxypropyl- β -cyclodextrin as a chiral selector. *J Agric Food Chem* 2003, 51: 6128 – 31.
43. Ruiz-Rodríguez L, Aguilar A, Díaz AN, Sánchez FG. Enantioseparation of the fungicide imazalil in orange juice by chiral. *Food Chemistr* 2015, 178: 179-85.
44. Ali I. Aboul-Enein H.Y. Enantioseparation of some clinically used drugs by HPLC using cellulose Tris(3,5-dichlorophenylcarbamate) chiral stationary phase. *Biomed Chromatogr* 2003, 17: 113–7.

45. Aboul-Enein HY and Ali I. A comparison of chiral resolution of econazole, miconazole and sulconazole by HPLC using normalphase amylose CSPs. *Fresenius J Anal Chem* 2001, 370: 951–5.
46. Pan C, Xu X, Zhang X, Chen J, Shen B. Comparative study of the enantioseparation of econazole and imazalil by hplc on various cellulose chiral columns. *Anal Lett* 2006, 39: 631-8.
47. Du Y, Luo L, Sun S, Jiang Z, Guo X. Enantioselective separation and determination of miconazole in rat plasma by chiral LC–MS/MS: application in a stereoselective pharmacokinetic study, *Anal Bioanal Chem* 2017, 409:6315–23.
48. Schurig V. Chiral separations using gas chromatography. *Trends Analyt Chem* 2002, 21:647-67.
49. Schurig V. Enantiomer separation by gas chromatography on chiral stationary phases. *J Chromatogr A* 1994, 666:111-29.
50. Gopaliya P, Kamble PR, Chauhan CS. A review article on supercritical fluid chromatography. *Int J Pharma Res Rev* 2014, 5:59-66.
51. Chankvetadze B. Enantioseparation of chiral drugs and current status of electromigration techniques in this field. *J Sep Sci* 2001, 24: 691–705.
52. Ibrahim WAW, Warno SA, Aboul-Enein HY, Hermawan D, Sanagi M. Simultaneous enantioseparation of cyproconazole, bromuconazole, and diniconazole enantiomers by CD-modified MEKC, *Electrophoresis* 2009, 30: 1976–82.
53. Nishi H, Terabe S. Micellar electrokinetic chromatography perspectives in drug analysis. *J Chromatogr A* 1996, 735: 3-27.
54. Keith DB, Peter M. Theory of capillary electrochromatography. *J Chromatogr A* 2001, 916:3–23
55. Nguyen LA, He H, Pham-Huy C. Chiral drugs: an overview *Int J Biomed Sci* 2006, 2: 85–100.
56. Calcaterra A, D’Acquarica I. The market of chiral drugs: chiral switches versus *de novo* enantiomerically pure compounds. *J Pharm Biomed Anal* 2018, 147:323-40.

57. Tsutsumi S, Iida M, Tada N, Kojima T, Ikeda Y, Moriwaki T, Higashi K, Moribe K, Yamamoto K. Characterization and evaluation of miconazole salts and cocrystals for improved physicochemical properties. *Int J Pharm* 2011, 421:230-6.
58. Barasch A, Griffin AV. Miconazole revisited: new evidence of antifungal efficacy from laboratory and clinical trials. *Future Microbiol* 2008, 3:265-9.
59. Ahmed NJ, Yusufoglu HS. The outpatient prescribing of miconazole in a tertiary hospital in Riyadh region. *J Pharm Res Int* 2021, 33:816-20.
60. Odds FC, Brown AJP, Gow ARN. Antifungal agents: mechanisms of action. *Trends Microbiol* 2003, 11:272-9.
61. Kobayashi D, Kondo K, Uehara N. Endogenous reactive oxygen species is an important mediator of miconazole antifungal effect. *Antimicro Agents Chemother* 2002, 46: 3113–7.
62. Thevissen K, Ayscough KR, Aerts AM. Miconazole induces changes in actin cytoskeleton prior to reactive oxygen species induction in yeast. *J Biol Chem* 2007, 282: 21592–7.
63. Xu H, Xin S, Guo M, An R, Yan-hua M, Hou Z, Guo C. Design, synthesis, and biological evaluation of novel miconazole analogues containing selenium as potent antifungal agents. *Eur J Med Chem* 2020, 198: 112360.
64. Gonzalez-Calder D, María G, Marco A, Reza M, Villalva A, Rodríguez M, Jauregui B, Torres E, Gonzalez C. Azide-enolate 1,3-dipolar cycloaddition in the synthesis of novel triazole-based miconazole analogues as promising antifungal agents. *Eur J Med Chem* 2016, 112: 60-5.
65. Sinha D, Tiwari AK, Singh S, Shukla G, Mishra P, Chandra H, Mishra AK. Synthesis, characterization and biological activity of Schiff base analogues of indole-3-carboxaldehyde. *Eur J Med Chem* 2008, 43:160–5.
66. Shaha S, Islam RM, Al-Macktuf DA, Ahmed J, Nishino H, Haque A. Synthesis, antimicrobial and antioxidant evaluation with in silico studies of new thiazole Schiff base derivatives. *J Mol Struct* 2022, 1248:157.

67. Sari S, Koçak E, Kart D, Özdemir Z, Acar F, Sayoğlu B, Karakurt A, Dalkara S. Azole derivatives with naphthalene showing potent antifungal effects against planktonic and biofilm forms of *Candida* spp:an in vitro and in silico study. *Int Microbiol* 2021, 24: 93-102
68. Artico M, Di Santo R, Costi R, Massa S, Retico A, Apuzzo, Simonetti G. Antifungal agents. 9. 3-Aryl-4-[alpha-(1H-imidazol-1-yl)arylmethyl]pyrroles: a new class of potent anti-*Candida* agents, *J Med Chem* 1995, 21: 4223-33.
69. Karakurt A, Özalp M, Işık Ş, Stables JP, Dalkara S. Synthesis, anticonvulsant and antimicrobial activities of some new 2-acetylnaphthalene derivatives, *Bioorg Med Chem* 2010, 18: 2902–11.
70. Gambacorta N, Özdemir Z, Doğan İS, Ciriaco F, Zenni YN, Karakurt A. Integrated experimental and theoretical approaches to investigate the molecular mechanisms of the enantioseparation of chiral anticonvulsant and antifungal compounds. *J Mol Struct* 2022, 1270: 133905.

EKLER

EK 1. Özgeçmiş



EK 2. Etik Kurul Yazısı

13 Nisan 2013 tarih ve 28617 sayı ile T.C. Resmi Gazetede yayınlanan ‘Klinik Araştırmalar Hakkında Yönetmelik’ in Birinci Bölümünün 2. Maddesinin 1. Fıkrası (Bu Yönetmelik biyoyararlanım ve biyoeşdeğerlik çalışmaları dahil, ruhsat veya izin alınmış olsa dahi insanlar üzerinde yapılacak olan ilaç, tıbbi ve biyolojik ürünler ile bitkisel ürünlerin klinik araştırmaları, klinik araştırma yerlerini ve bu araştırmaları gerçekleştirecek gerçek veya tüzel kişileri kapsar.) gereğince hazırlanmış olan bu tez, bir klinik araştırma değil, sadece laboratuvar ortamında yapılan aletli analiz çalışması olması sebebiyle Etik Kurul kararı alınmamıştır.

Doç. Dr. Zeynep ÖZDEMİR

Tez Danışmanı