

**KAPİLER ELEKTROKROMATOĞRAFİ YÖNTEMİYLE D,L
AMPİSİLİN ENANTİYOMERLERİNİN AYRIMI**

**ENANTIOMERIC SEPARATION OF D,L AMPICILLIN BY
CAPILLARY ELECTROCHROMATOGRAPHY METHOD**

Duygu SARI AYDIN

PROF. DR. ADİL DENİZLİ

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi
Lisansüstü Eğitim – Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin
Kimya Anabilim Dalı İçin Öngördüğü
YÜKSEK LİSANS TEZİ
olarak hazırlanmıştır.

2017

Duygu Sarı Aydın 'ın hazırladığı "Kapiler Elektrokromatografi Yöntemiyle D,L Ampisilin Enantiyomerlerinin Ayrımı" adlı bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından KİMYA ANABİLİM DALI' nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

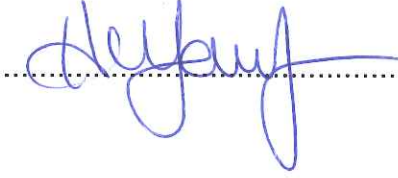
Prof. Dr. Serap Şenel
Başkan



Prof. Dr. Adil Denizli
Danışman



Prof. Dr. Handan Yavuz Alagöz
Üye



Doç. Dr. Nilay Bereli
Üye



Yrd. Doç. Dr. Fatma Yılmaz
Üye



Bu tez Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tarafından YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak onaylanmıştır.

Prof. Dr. Menemşe GÜMÜŞDERELİOĞLU
Fen Bilimleri Enstitüsü Müdürü

YAYINLAMA VE FİKRİ MÜLKİYET HAKLARI BEYANI

Enstitü tarafından onaylanan lisansüstü tezimin/raporumun tamamını veya herhangi bir kısmını, basılı (kağıt) ve elektronik formatta arşivleme ve aşağıda verilen koşullarla kullanıma açma iznini Hacettepe üniversitesine verdiğimi bildiririm. Bu izinle Üniversiteye verilen kullanım hakları dışındaki tüm fikri mülkiyet haklarım bende kalacak, tezimin tamamının ya da bir bölümünün gelecekteki çalışmalarda (makale, kitap, lisans ve patent vb.) kullanım hakları bana ait olacaktır.

Tezin kendi orijinal çalışmam olduğunu, başkalarının haklarını ihlal etmediğimi ve tezimin tek yetkili sahibi olduğumu beyan ve taahhüt ederim. Tezimde yer alan telif hakkı bulunan ve sahiplerinden yazılı izin alınarak kullanması zorunlu metinlerin yazılı izin alarak kullandığımı ve istenildiğinde suretlerini Üniversiteye teslim etmeyi taahhüt ederim.

- Tezimin/Raporumun tamamı dünya çapında erişime açılabilir ve bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir.

(Bu seçenekle teziniz arama motorlarında indekslenebilecek, daha sonra tezinizin erişim statüsünün değiştirilmesini talep etmeniz ve kütüphane bu talebinizi yerine getirirse bile, tezinin arama motorlarının önbelleklerinde kalmaya devam edebilecektir.)

- Tezimin/Raporumun 24.05.2019 tarihine kadar erişime açılmasını ve fotokopi alınmasını (İç Kapak, Özet, İçindekiler ve Kaynakça hariç) istemiyorum.

(Bu sürenin sonunda uzatma için başvuruda bulunmadığım takdirde, tezimin/raporumun tamamı her yerden erişime açılabilir, kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisi alınabilir)

- Tezimin/Raporumun tarihine kadar erişime açılmasını istemiyorum, ancak kaynak gösterilmek şartıyla bir kısmı veya tamamının fotokopisinin alınmasını onaylıyorum.

- Serbest Seçenek/Yazarın Seçimi

24 /05 / 2017



Duygu Sarı Aydın

ETİK

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, tez yazım kurallarına uygun olarak hazırladığım bu tez çalışmada;

- tez içindeki bütün bilgi ve belgeleri akademik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi,
- görsel, işitsel ve yazılı tüm bilgi ve sonuçları bilimsel ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu,
- başkalarının eserlerinden yararlanılması durumunda ilgili eserlere bilimsel normlara uygun olarak atıfta bulunduğumu,
- atıfta bulunduğum eserlerin tümünü kaynak olarak gösterdiğimi,
- kullanılan verilerde herhangi bir tahrifat yapmadığımı,
- ve bu tezin herhangi bir bölümünü bu üniversite veya başka bir üniversitede başka bir tez çalışması olarak sunmadığımı

beyan ederim.

24/05/2017

Duygu SARI AYDIN

ÖZET

KAPİLER ELEKTROKROMATOĞRAFI YÖNTEMİYLE D,L AMPİSİLİN ENANTİYOMERLERİNİN AYRIMI

Duygu SARI AYDIN

Yüksek Lisans, Kimya Anabilim Dalı

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

Mayıs 2017, 107 sayfa

Ampisilin, gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı etkili ve aside önemli ölçüde dayanıklıdır. Sahip olduğu bu özelliklerden dolayı çeşitli enfeksiyonların tedavisinde kullanılabilirliği, farmakolojik açıdan önemli bir antibiyotik olmasını sağlar. Yan zincirinde bulunan asimetrik karbon atomundan dolayı sentezlendiğinde iki farklı enantiyomerik formunun olması ve vücut için sadece birinin yararlı olmasından dolayı kiral olarak ayrılması gerekmektedir.

Kiral bileşiklerin ayrılması için çeşitli yöntemler bulunur. Tez kapsamında bu yöntemlerden kapiler elektroforezin alt dallarından biri olan misel elektrokinetik kapiler kromatografi yöntemi kullanılmıştır. Ampisilinin enantiyomerik ayrımı hazırlanan misellerin kapiler kolon içinde yalancı sabit faz olarak kullanılmasıyla gerçekleştirilmiştir. Kolon içerisinde kullanılan miseller elektrolit çözeltisine kritik misel derişiminin üzerinde anyonik bir yüzey aktif madde (SDS) eklenmesiyle oluşturulmuştur.

Ligand değişim kromatografisi enantiyomerik moleküllerin kiraliteye göre ayrılmasını sağlayan yöntemlerden biridir. Ligand değişimi ligand gibi davranabilen kararsız

komplekslerin oluşumuna dayanır ve enantiyometrik ayırım bu kompleksler vasıtasıyla gerçekleştirilir.

Ligand değişiminde kiral selektörler aracılığıyla enantiyomerler birbirinden ayrılmaktadır. Bu çalışmada L-Lizin monohidroklörür' ün ligand, bakır (II) sülfat pentahidrat' ın merkez iyonu olarak kullanılmasıyla ampisilinin enantiyometrik ayırımı ligand değişim-misel elektrokinetik kromatografi yöntemi ile gerçekleştirilmiştir.

Bu amaçla ampisilin bileşiğinin enantiyomerik olarak ayrılması için öncelikle L-Lys-Cu⁺² aminoasit-metal kompleksi oluşturulmuştur. L-Lys-Cu⁺² kompleksini oluşturmak üzere etkileşime giren L-Lys amino asidi ile Cu⁺² iyonu arasındaki optimize mol oranlarının belirlenmesi için UV-VIS spektrofotometresinden yararlanılmıştır. Kompleksin karakterizasyon çalışmaları ise FTIR-ATR spektrofotometresi kullanılarak yapılmıştır. Akım yoğunluğu ölçümü ile kritik misel derişimi (CMC) belirlenmiştir. Sonrasında sentezlenen L-Lys-Cu⁺² kompleksi ile kritik misel derişimi üzerinde oluşan SDS miseller etkileştirilmiştir. Hazırlanan misellerin ve kiral selektör ile etkileşimde olan misellerin karakterizasyon çalışmaları, yüksek kontrastlı geçirimli elektron mikroskobu, dinamik ışık saçılımı spektrometresi ve zeta boyut ve potansiyel analizörü kullanılarak yapılmıştır.

Enantiyomerik ayrımlar kapiler elektroforez cihazı kullanılarak, misel elektrokinetik kapiler kromatografi yöntemiyle yapılmıştır. Bu kromatografi sisteminde, SDS-L-Lys-Cu⁺² misel-kiral selektör kompleksi ampisilinin enantiyomerik ayırımı için yalancı sabit faz olarak kullanılmıştır. Elektrokinetik koşullar optimize edildiğinde ampisilinin enantiyomerik olarak ayırımı gerçekleştirilmiştir. Ampisilinin elektrokinetik ayırımına pH' ın, SDS miktarının, uygulanan elektrik alanının, basıncın, organik çözücü oranının ve ampisilin enantiyomer oranlarının etkisi incelenmiştir. Hazırlanan yalancı sabit fazın gerçek örneklerdeki penisilin türevi antibiyotik olan ampisilinin enantiyomerik saflığının kontrolünde işe yarayabilirliğini kontrol etmek üzere ilaç olarak satılan Alfasilin eczaneden satın alınmış ve optimize edilen elektrokinetik koşullarda enantiyomerik saflık kontrol edilmiştir.

Sonuç olarak; ampisilin bileşiğinin enantiyomerleri, kapiler elektrokromatografinin alt dalı olan misel elektrokinetik kapiler kromatografi ile ligand değişim mekanizmasının

bir araya getirilmesi ile gerçekleştirilmiş ve enantiyomerik ayırım için optimum koşullar başarılı bir şekilde belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ampisilin, enantiyomer, ligand değişimi, kapiler elektrokromatografi, misel elektrokinetik kapiler kromatografi, misel.

ABSTRACT

ENANTIOMERIC SEPARATION OF D,L AMPICILLIN BY CAPILLARY ELECTROCHROMATOGRAPHY METHOD

Duygu SARI AYDIN

Master of Science, Chemistry

Supervisor: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

May 2017, 107 pages

Ampicillin is effective against gram-positive and gram-negative bacteria and is significantly resistant to acid. Because of these properties, it can be used in the treatment of various infections, making it a pharmacologically important antibiotic. Due to the asymmetric carbon atom in the side chain when synthesized, it is necessary to have two different enantiomeric forms and it needs to be chirally separated because only one form is useful for the body.

There are various methods for separating of chiral compounds. Within the scope of the thesis, a micelle electrokinetic capillary chromatography method, as one of sub category of capillary electrophoresis, was used. The enantiomeric separation of ampicillin was carried out by using miscelles which was used as stationary phase in the capillary column. The micelles used in the column was formed by adding an anionic surfactant (SDS) to the electrolyte solution above the critical micelle concentration.

Ligand exchange chromatography is one of the methods that separates enantiomeric molecules by using chirality. Ligand exchange is based on the

formation of unstable complexes that can act as ligand and the enantiomeric separation is performed through these complexes.

In ligand exchange, the enantiomers are separated from each other by means of chiral selectors. In this study, the enantiometric separation of ampicillin was carried out by ligand exchange-micellar electrokinetic chromatography method using L-Lysine monohydrochloride as a ligand and copper (II) sulfate pentahydrate as a central ion.

For this aim, firstly L-Lys-Cu²⁺ amino acid-metal complex was formed to separate the ampicillin compound enantiomerically. UV-VIS spectrophotometer was used to determine the optimal molar ratios of the interacting L-Lys amino acid with the Cu²⁺ ion forming the L-Lys-Cu²⁺ complex. Characterization studies of the complex were carried out using FTIR-ATR spectrophotometer. Critical micelle concentration (CMC) was determined by current density measurement. SDS micelles obtained above the critical micelle concentration was interacted with L-Lys-Cu²⁺ complex. Characterization studies of the micelles and the micelles interacting with the chiral selector were made using high contrast transmission electron microscope, dynamic light scattering spectrophotometer and zetasizer analyzer.

Enantiomeric separations were performed using a micellar electrokinetic chromatography method using a capillary electrophoresis instrument. In this chromatography system, the SDS-L-Lys-Cu²⁺ micelle-chiral selector complex was used as a pseudostationary phase for the enantiomeric separation of ampicillin. When the electrokinetic conditions optimized, the ampicillin was enantiomerically separated. The effect of pH, SDS amount, applied electrical field, pressure, organic solvent ratio and ampicillin enantiomer ratios were investigated on the electrokinetic separation of ampicillin enantiomers. Alfasilin, sold as a drug was purchased from pharmacy and the enantiomeric purity was controlled under optimized electrokinetic conditions to check the usefulness of the prepared pseudostationary phase to control the enantiomeric purity of ampicillin, the penicillin-derived antibiotic in real samples.

As a result; the enantiomeric separation of the ampicillin compound was carried out by combining the ligand exchange mechanism with micellar electrokinetic capillary

chromatography, the sub category of the capillary electrochromatography, and the optimum conditions for the enantiomeric separation were successfully determined.

Key words: Ampicillin, enantiomer, ligand exchange, capillary electrochromatography, micellar electrokinetic capillary chromatography, micelle.

TEŞEKKÜR

Bioreg grubunun bir üyesi olmamı sağlayan, bilgi birikimi ve tecrübesiyle olaylara bilimsel açıdan bakmamda önemli katkıları olan tez danışman hocam Sayın Prof. Dr. Adil Denizli' ye,

Tezime vermiş olduğu katkılardan dolayı Prof. Dr. Serap Şenel ve Prof. Dr. Handan Yavuz' a,

Tüm tezim boyunca yardımlarını benden esirgemeyen, her koşulda bana destek olan ve bilgi birikimleriyle bana yol gösteren Yrd. Doç. Dr. Fatma Yılmaz ve Ali Derazshamshir ' e,

Yüksek lisans eğitimim süresince tecrübelerinden yararlandığım Doç. Dr. Nilay Bereli, Doç. Dr. Deniz Türkmen, Doç. Dr. Lokman Uzun, Kemal Çetin, Süleyman Aşır, Sabina Hüseyinli, Ilgım Göktürk, Monireh Bakhshpour, Koray Şarkaya, Semra Akgönüllü, Canan Armutçu, Fatma Kartal, Sevgi Aslıyüce Çoban, Yeşeren Saylan ve Bioreg ailesinin diğer tüm üyelerine,

Bu süreçte en büyük destekçim olan aileme teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

| | <u>Sayfa</u> |
|--|---------------------|
| ÖZET | i |
| ABSTRACT | iv |
| TEŞEKKÜR | vii |
| İÇİNDEKİLER | viii |
| ŞEKİLLER | xi |
| ÇİZELGELER | xviii |
| SİMGELER VE KISALTMALAR | xix |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 2. GENEL BİLGİLER | 4 |
| 2.1. Antibiyotikler | 4 |
| 2.1.1. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması | 4 |
| 2.1.1.1. Ampisilin | 7 |
| 2.1.2. Antibiyotiklerin Kullanım Alanları | 9 |
| 2.2. İzomeri | 10 |
| 2.2.1. Enantiyomerler | 12 |
| 2.2.2. Kiralite | 12 |
| 2.2.3. Optikçe Aktiflik | 12 |
| 2.2.4. Rasemik Karışımlar | 13 |
| 2.2.5. Kiral Ayrımın Gerekliği | 13 |
| 2.2.6. Kiral Ayırma Yöntemleri | 14 |
| 2.3. Yüzey Aktif Maddeler | 14 |
| 2.3.1. Yüzey Aktif Maddelerin Sınıflandırılması | 15 |
| 2.3.1.1. Doğal Yüzey Aktif Maddeler | 15 |
| 2.3.1.2. Sentetik Yüzey Aktif Maddeler | 15 |
| 2.3.2. Kritik Misel Derişimi ve Misel Oluşumu | 19 |
| 2.3.3. Yüzey Gerilimi ve Ölçüm Yöntemleri | 21 |
| 2.3.4. Yüzey Aktif Maddelerin Kullanım Alanları | 22 |
| 2.4. Kapiler Elektroforez | 22 |
| 2.4.1. Kapiler Elektrokromatografi | 26 |
| 2.4.1.1. Misel Elektrokinetik Kapiler Kromatografi | 28 |
| 2.4.1.1.1. Alıkonma Faktörü | 30 |

| | |
|--|----|
| 2.4.1.1.2. Ayırıcılık..... | 31 |
| 2.4.2. Ligand Değişim Kapiler Elektroforez (LECE) | 31 |
| 3. Materyal ve Yöntem | 34 |
| 3.1. Kromatografik Analiz Sistemleri | 35 |
| 3.2. Kimyasal Malzemeler ve Materyal..... | 35 |
| 3.3. UV-VIS Spektroskopi Yöntemi ile Ligand:Metal iyon (L-Lys:Cu ⁺²) Oranının Belirlenmesi | 36 |
| 3.4. L-Lys-Cu ⁺² Amino Asit-Metal Kompleksinin Hazırlanması | 36 |
| 3.5. Akım Yoğunluğu Yöntemiyle Kritik Misel Derişiminin Belirlenmesi..... | 37 |
| 3.6. Farklı Derişimlerde SDS Misel ve SDS-L-Lys-Cu ⁺² Misel Kompleks Çözeltilerinin Hazırlanması | 38 |
| 3.7. SDS Misellerinin ve SDS L-Lys-Cu ⁺² Misel Komplekslerinin Karakterizasyon Çalışmaları..... | 39 |
| 3.7.1. Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskobu (CTEM) | 39 |
| 3.7.2. Zeta Boyut ve Potansiyel Analizleri..... | 40 |
| 3.7.3. Dinamik Işık Saçılım Spektroskopisi (DLS)..... | 40 |
| 3.8. D,L Ampisilinin Enantiyometrik Ayırımında Kullanılan Kapiler Kolonun Hazırlanması ve Enjeksiyon Koşulları | 41 |
| 3.9. Enantiyometrik Ayırım için Analiz Koşulları | 41 |
| 3.9.1. Ayrıma Tampon Çözelti pH' ının Etkisini İnceleme | 41 |
| 3.9.2. Ayrıma SDS Derişiminin Etkisini İnceleme..... | 42 |
| 3.9.3. Ayrıma Uygulanan Elektrik Alanının Etkisini İnceleme..... | 42 |
| 3.9.4. Ayrıma Basıncın Etkisini İnceleme..... | 43 |
| 3.9.5. Ayrıma Organik Çözücünün Etkisini İnceleme | 43 |
| 3.9.6. D-Ampisilin ve L-Ampisilin Oranlarının Ayrıma Etkisini İnceleme | 43 |
| 3.9.7. Enantiyomer Türünün Tespit Edilmesi | 43 |
| 3.9.8. Tekrar Kullanılabilirliğin İncelenmesi..... | 44 |
| 3.9.9. Gerçek Örnekten Analizler | 44 |
| 4. BULGULAR | 45 |
| 4.1. L-Lys-Cu ⁺² Amino asit-Metal Kompleks Oranının Belirlenmesi ve Optimizasyonunun Yapılması | 45 |
| 4.2. L-Lys ve L-Lys-Cu ⁺² Amino asit-Metal Kompleksinin Karakterizasyonu | 48 |
| 4.2.1. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi..... | 48 |
| 4.3. Kritik Misel Derişiminin Belirlenmesi..... | 50 |

| | |
|---|-----|
| 4.4. Farklı Derişimlerde Hazırlanan SDS Misellerinin ve SDS-L-Lys-Cu ²⁺ Misel Komplekslerinin Karakterizasyonu | 52 |
| 4.4.1. Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskopisi Analizi | 53 |
| 4.4.2. Zeta Boyut ve Potansiyel Analizleri | 55 |
| 4.4.3. Dinamik Işık Saçılımı Spektrometrik Analizi | 65 |
| 4.5. Kinetik Analizler | 67 |
| 4.5.1. Ayrıma Tampon pH' ının Etkisi | 67 |
| 4.5.2. Ayrıma SDS Derişiminin Etkisi | 70 |
| 4.5.3. Ayrıma Elektrik Alanın Etkisi | 73 |
| 4.5.4. Ayrıma Basıncın Etkisi | 76 |
| 4.5.5. Ayrıma Organik Çözücünün Etkisi | 79 |
| 4.5.6. D-Ampisilin ve L-Ampisilin Oranının Değişiminin İncelenmesi | 82 |
| 4.5.7. D-Enantiyomeri ile Kinetik Analiz | 84 |
| 4.5.8. Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları | 86 |
| 4.5.9. Gerçek Örnekten (Alfasilin Antibiyotiği) Analizler | 87 |
| 4.6. Kromatografik Ayrım Gücü Hesaplamaları | 89 |
| 5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA | 92 |
| 6. KAYNAKLAR | 98 |
| 7. ÖZGEÇMİŞ | 107 |

ŞEKİLLER

| | <u>Sayfa</u> |
|--|--------------|
| Şekil 2.1. Penisilinin kimyasal yapısı. | 4 |
| Şekil 2.2. Ampisilinin H ₂ ve Pd katazörlüğü eşliğinde sentezi..... | 8 |
| Şekil 2.3. Ampisilinin D- ve L-enantiyomerleri. | 8 |
| Şekil 2.4. Ampisilinden asit ve baz etkisiyle katyon ve anyon oluşumu. | 9 |
| Şekil 2.5. cis- ve trans- 1,2-dikloroetenin kimyasal yapıları. | 11 |
| Şekil 2.6. cis- ve trans- 1,2-dimetilsiklopentanin kimyasal yapısı. | 11 |
| Şekil 2.7. Kiral molekülde stereojenik merkez. | 12 |
| Şekil 2.8. Yüzey aktif maddelerin genel yapısı. | 15 |
| Şekil 2.9. Yaygın olarak kullanılan bazı yüzey aktif maddeler. | 18 |
| Şekil 2.10. Misel oluşumunun şematik olarak gösterimi. | 19 |
| Şekil 2.11. Kapiler elektroforez cihazının basitleştirilmiş hali. | 23 |
| Şekil 2.12. Elektro ozmotik akış oluşumu. | 24 |
| Şekil 2.13. Anyonik, katyonik ve yüksüz maddelerin kolon boyunca hareketinin şematik olarak gösterimi. | 25 |
| Şekil 2.14. HPLC ve CE akış profilleri. | 26 |
| Şekil 2.15. MECC sisteminde ayırımın şematik olarak gösterimi. | 29 |
| Şekil 3.1. Kapiler Elektrokromatografi sisteminde kullanılan Prince CEC-760 cihazı. | 35 |
| Şekil 3.2. UV-VIS spektrofotometre cihazı (SHIMADZU UV-1601). | 36 |
| Şekil 3.3. Amino asit-metal kompleksinin oluşmasıyla meydana gelen renk oluşumu. | 37 |
| Şekil 3.4. Hazırlanan SDS misellerinin ve SDS-L-Lys-Cu ⁺² misel komplekslerinin mikroyapısal morfolojik karakterizasyonlarını yapabilmeye kullanılan yüksek kontrastlı geçirimli elektron mikroskobu (CTEM). | 39 |
| Şekil 3.5. SDS miselleri ve SDS-L-Lys-Cu ⁺² misel komplekslerinin ortalama partikül boyutunun ölçümünde kullanılan zeta boyut ve potansiyel analizörü. | 40 |
| Şekil 4.1. L-Lys amino asidinin spektrofotometrik ölçümü. | 45 |
| Şekil 4.2. L-Lys:Cu ⁺² amino asit-metal kompleksinin 1:1 mmol oranındaki spektrofotometrik ölçümü. | 46 |
| Şekil 4.3. L-Lys:Cu ⁺² amino asit-metal kompleksinin 2:1 mmol oranındaki spektrofotometrik ölçümü. | 46 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.4. L-Lys:Cu ²⁺ amino asit-metal kompleksinin 3:1 mmol oranındaki spektrofotometrik ölçümü | 47 |
| Şekil 4.5. L-Lys ve L-Lys:Cu ²⁺ amino asit-metal kompleksinin 1:1; 2:1 ve 3:1 mmol oranındaki spektrofotometrik ölçümü..... | 47 |
| Şekil 4.6. L-Lys amino asidine ait FTIR-ATR spektrumu..... | 48 |
| Şekil 4.7. L-Lys-Cu ²⁺ amino asit-metal kompleksine ait FTIR-ATR spektrumu..... | 49 |
| Şekil 4.8. L-Lys-Cu ²⁺ amino asit-metal koordinasyonu..... | 50 |
| Şekil 4.9. Farklı derişimlerde hazırlanan SDS çözeltilerine ait akım grafiği ve kritik misel derişimi..... | 51 |
| Şekil 4.10. Farklı derişimlerde hazırlanan SDS-L-Lys-Cu ²⁺ misel kompleksi içeren çözeltilere ait akım grafiği ve kritik misel derişimi. | 52 |
| Şekil 4.11. Hazırlanan misellerin CTEM görüntüleri. a) SDS derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0 b) SDS derişimi: 25 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0 c) SDS derişimi: 50 mM, Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0..... | 54 |
| Şekil 4.12. SDS-L-Lys-Cu ²⁺ misel komplekslerinin CTEM görüntüleri. a) SDS derişimi: 10 mM; L-Lys-Cu ²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0 b) SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0 c) SDS derişimi: 50 mM; L-Lys-Cu ²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0..... | 55 |
| Şekil 4.13. SDS misellerinin sayıca ortalama boyut dağılım grafiği. SDS derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0..... | 57 |
| Şekil 4.14. SDS misellerinin sayıca ortalama boyut dağılım grafiği. SDS derişimi: 25 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0..... | 58 |
| Şekil 4.15. SDS misellerinin sayıca ortalama boyut dağılım grafiği. SDS derişimi: 50 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0..... | 58 |
| Şekil 4.16. SDS-L-Lys-Cu ²⁺ misel komplekslerinin sayıca ortalama boyut dağılım grafiği. SDS derişimi: 10 mM; L-Lys-Cu ²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0..... | 59 |
| Şekil 4.17. SDS-L-Lys-Cu ²⁺ misel komplekslerinin sayıca ortalama boyut dağılım grafiği. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0..... | 59 |

| | |
|---|----|
| Şekil 4.18. SDS-L-Lys-Cu ⁺² misel komplekslerinin sayıca ortalama boyut dağılım grafiği. SDS derişimi: 50 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0..... | 60 |
| Şekil 4.19. Farklı derişimlerde hazırlanan SDS çözeltilerinin zeta potansiyel ölçüm grafiği. SDS derişimi: 2.0, 3.0, 5.0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0..... | 62 |
| Şekil 4.20. SDS-L-Lys-Cu ⁺² misel komplekslerinin zeta potansiyeli. SDS derişimi: 10 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0..... | 63 |
| Şekil 4.21. SDS-L-Lys-Cu ⁺² misel komplekslerinin zeta potansiyeli. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0..... | 64 |
| Şekil 4.22. SDS-L-Lys-Cu ⁺² misel komplekslerinin zeta potansiyeli. SDS derişimi: 50 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0..... | 64 |
| Şekil 4.23. SDS-L-Lys-Cu ⁺² misel komplekslerinin ortalama parçacık boyutu dağılım grafiği. SDS derişimi: 10 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0..... | 66 |
| Şekil 4.24. SDS-L-Lys-Cu ⁺² misel komplekslerinin ortalama parçacık boyutu dağılım grafiği. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0..... | 66 |
| Şekil 4.25. SDS-L-Lys-Cu ⁺² misel komplekslerinin ortalama parçacık boyut dağılım grafiği. SDS derişimi: 50 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0..... | 67 |
| Şekil 4.26. Misel ortamında kiral ligand değişim etkileşimleri..... | 68 |
| Şekil 4.27. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına çözelti pH' ının etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 7.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar..... | 68 |
| Şekil 4.28. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına çözelti pH' ının etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 8.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar..... | 69 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.29. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına çözelti pH' ının etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar..... | 69 |
| Şekil 4.30. Çözelti pH' ının D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına etkisini farklı pH değerleri için gösteren elektroferogramların karşılaştırılmış hali. | 70 |
| Şekil 4.31. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına SDS derişiminin etkisi. SDS derişimi: 5.0 mM; L-Lys-Cu ²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar..... | 71 |
| Şekil 4.32. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına SDS derişiminin etkisi. SDS derişimi: 10 mM; L-Lys-Cu ²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar..... | 71 |
| Şekil 4.33. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına SDS derişiminin etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar..... | 72 |
| Şekil 4.34. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına SDS derişiminin etkisi. SDS derişimi: 50 mM; L-Lys-Cu ²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar..... | 72 |
| Şekil 4.35. SDS derişiminin D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına etkisini farklı SDS değerleri için gösteren elektroferogramların karşılaştırılmış hali. | 73 |
| Şekil 4.36. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına elektrik alanının etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 5 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar..... | 74 |
| Şekil 4.37. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına elektrik alanının etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar..... | 75 |
| Şekil 4.38. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına elektrik alanının etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon | |

| | |
|--|----|
| çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 15 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar..... | 75 |
| Şekil 4.39. Uygulanan elektrik alanının D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına etkisini farklı voltaj değerleri için gösteren elektroferogramların çakıştırılmış hali. | 76 |
| Şekil 4.40. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına basıncın etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 0 mbar..... | 77 |
| Şekil 4.41. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına basıncın etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 50 mbar..... | 77 |
| Şekil 4.42. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına basıncın etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar..... | 78 |
| Şekil 4.43. Uygulanan farklı basınç değerlerinin D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına etkisini gösteren elektroferogramların çakıştırılmış hali. | 78 |
| Şekil 4.44. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına organik çözücü oranının etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar; Organik çözücü ACN oranı: %0.0. | 80 |
| Şekil 4.45. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına organik çözücü oranının etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar; Organik çözücü ACN oranı: %15.0. | 80 |
| Şekil 4.46. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına organik çözücü oranının etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar; Organik çözücü ACN oranı: %30.0. | 81 |
| Şekil 4.47. Organik çözücü oranının D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına etkisini farklı ACN hacim değerleri için gösteren elektroferogramların çakıştırılmış hali..... | 81 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.48. D,L Ampisilin oranının değişim etkisinin enantiyomerik ayırmda incelenmesi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar; D,L Amp oranı: 1:1 D:L..... | 82 |
| Şekil 4.49. D,L Ampisilin oranının değişim etkisinin enantiyomerik ayırmda incelenmesi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar; D,L Amp oranı: 2:1 D:L..... | 83 |
| Şekil 4.50. D,L Ampisilin oranının değişim etkisinin enantiyomerik ayırmda incelenmesi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar; D,L Amp oranı: 3:1 D:L..... | 83 |
| Şekil 4.51. D,L Ampisilin oranının değişim etkisinin enantiyomerik ayırmda incelenmesini farklı D:L oranları için gösteren elektroferogramların çakıştırılmış hali..... | 84 |
| Şekil 4.52. Tek tür enantiyomer tipinin tespiti. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar; Örnek: D-Amp. | 85 |
| Şekil 4.53. İki tür enantiyomer tipinin tespiti. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar; Örnek; D,L Amp..... | 85 |
| Şekil 4.54. Tek tür ve iki tür enantiyomer tipinin tespiti için gösterilen elektroferogramların çakıştırılmış hali..... | 86 |
| Şekil 4.55. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımı için kullanılan SDS bazlı misel çözeltilerinin tekrar kullanılabilirliğini gösteren elektroferogram. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH ₄ OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar; dört tekralı ölçüm. | 87 |
| Şekil 4.56. Alfasilin antibiyotik örneğinin enantiyomerik saflığının SDS bazlı misel uygulanarak tespit edilmesini gösteren elektroferogram. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu ⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 | |

mM NH₄OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar; Örnek: Amp içeren Alfasilin ilacı..... 88

Şekil 4.57. Alfasilin antibiyotik örneğinin enantiyomerik saflığının SDS bazlı misel uygulanarak tespit edilmesini gösteren elektroferogram ile 1:1 oranında D,L Ampisilinin enantiyomerik ayrımı gösteren elektroferogramın çakıştırılmış hali.... 88

ÇİZELGELER

| | <u>Sayfa</u> |
|--|---------------------|
| Çizelge 2.1. Yapı izomerlerine ait örnekler..... | 10 |
| Çizelge 2.2. Bazı yüzey aktif madde tipleri, kritik misel derişimleri (CMC) ve ortalama agregat sayıları (n). | 20 |
| Çizelge 2.3. Yüzey gerilimi için kullanılan birimler. | 21 |
| Çizelge 2.4. Ligand değişim kapiler elektroforez yöntemiyle yapılan bazı çalışmalarda kullanılan selektör ligandlar, metal iyonu ve ayrılan analitler..... | 33 |
| Çizelge 3.1. L-Lys:Cu ⁺² kompleksinin hazırlanmasında kullanılan mol oranları. .. | 36 |
| Çizelge 3.2. pH etkisini gözlemlemek için kullanılan elektrolit (tampon) çözeltilerin bileşimi. | 42 |
| Çizelge 3.3. SDS derişiminin etkisini gözlemlemek için kullanılan elektrolit (tampon) çözeltilerin bileşimi | 42 |
| Çizelge 3.4. Organik çözücü etkisini gözlemlemek için kullanılan elektrolit (tampon) çözeltilerin bileşimleri. | 43 |
| Çizelge 4.1. Hazırlanan SDS misel ve SDS-L-Lys-Cu ⁺² misel komplekslerinin sayıca ortalama boyutları ve polidispersite indeksleri..... | 56 |
| Çizelge 4.2. Farklı derişimlerde hazırlanan SDS çözeltilerinin zeta potansiyelleri.61 | |
| Çizelge 4.3. Farklı koşullarda gerçekleştirilmiş olan enantiyomerik ayrımlara ait t _D , t _L , R _s ve k değerleri..... | 91 |

SİMGELER VE KISALTMALAR

SİMGELER

| | |
|-----------------|-----------------------------------|
| σ | Yüzey Gerilimi |
| μ_{eo} | Elektro Ozmotik Hareketlilik |
| ε | Dielektrik Sabiti |
| ε_0 | Vakum Dielektrik Sabiti |
| ζ | Yüzey Zeta Potansiyeli |
| η | Elektrolit Viskozitesi |
| t_D | D-Enantiyomerinin Alıkonma Zamanı |
| t_L | L-Enantiyomerinin Alıkonma Zamanı |
| R_s | Ayırıcılık |
| α | Seçicilik Faktörü |

KISALTMALAR

| | |
|-------|---|
| SDS | Sodyum Dodesil Sülfat |
| L-Lys | L-Lizin Monohidroklorür |
| Amp | Ampisilin |
| CMC | Kritik Misel Derişimi |
| CE | Kapiler Elektroforez |
| CEC | Kapiler Elektrokromatografi |
| MECC | Misel Elektrokinetik Kapiler Kromatografi |
| EOF | Elektro Ozmotik Akış |
| LEC | Ligand Değişim Kromatografisi |
| LECE | Ligand Değişim Kapiler Elektroforez |
| LC | Sıvı Kromatografisi |
| CTEM | Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskobu |
| DLS | Dinamik Işık Saçılımı |

1. GİRİŞ

Biyolojik veya farmakolojik olarak etki gösteren ilaçların %60' ından fazlası asimetri merkezi içerdiğinden dolayı kiraldır. Bununla beraber çoğu durumda farmakolojik etkinin tek bir enantiyomer ile sınırlı olduğu, istenmeyen enantiyomerin daha az aktiviteye sahip olduğu veya hiç aktivitesinin olmadığı hatta toksik etki gösterebileceği belirlenmiştir [1].

Klinikte kullanım alanı bulan antibiyotiklerin bakterilere karşı direnç kazanarak antibiyotiğin etkisini azaltmasından dolayı farklı gruplar içeren yan zincirlere sahip; biyosentetik ve yarı sentetik yeni türlerinin geliştirilmesi hızlandırılmıştır [2]. Bu nedenle β -laktam halkasına sahip, geniş spektrumlu, düşük toksisiteli, yüksek aktiviteye sahip kemoterapötik bileşikler geliştirilmiştir. Ampisilin, yüksek su çözünürlüğü, oral yoldan uygulandığında yüksek emilim hızı ve asidik pH' da yüksek stabilite göstermesi, geniş spektrumlu olması ve gram-negatif ve gram-pozitif bakterilere direnç göstermesi gibi avantajlarından dolayı çeşitli enfeksiyonların tedavisinde başarılı bir şekilde kullanılır [3-5].

Ancak Ampisilin yan zincirinde bulunan asimetrik karbon atomundan dolayı D- ve L- olarak iki enantiyomerik formunun olması ve yalnızca biyolojik sistemlerde aktif olarak D-enantiyomerinin kullanılması [5] bu kiral bileşiğin enantiyomerik olarak ayrımını gerektirmektedir.

Rasemik karışımların enantiyomerik olarak ayrılma işlemleri kapiler elektroforez, kristalizasyon, membran kullanımı, kromatografi, ekstraksiyon ya da enzimatik kinetik rezolüsyon yöntemleriyle yapılır [6].

Elektroforez yöntemlerinden biri olan kapiler elektroforez mikro ve nanosivisal kanallarla veya milimetrik kapilerlerde gerçekleştirilen çok iyi bir elektrik sürücülü ayırma işlemidir. Bu yöntemde analitler, bir elektrik alanın etkisi altında göç ederek, iyonik hareketliliklerine göre birbirinden ayrılırlar [7].

Burada kapiler elektroforez yönteminin seçici, ucuz, basit ve hızlı ayırım sağlama gibi avantajlara sahip olması, enantiyomerlerin ayrımını ve analiz işlemlerini oldukça düşük hacimlerde, yüksek çözünürlükte ve etkinlikte gerçekleştirebilmeye olanak tanımaktadır [8].

Kapiler elektroforezin sahip olduğu yüksek ayırma g¼c¼ ve mikro-y¼ksek performanslı sıvı kromatografisinin yüksek se¼çiciliđinin birleşimden oluşan kapiler elektrokromatografi analitleri birbirinden ayırmak i¼in en yaygın kullanılan kapiler elektroforez ¼eřididir. Kapiler kolon i¼erisinde bir dolgu maddesi veya misellerle doldurularak sabit bir faz elde edilir. Misellerin bulunduğu bu t¼r kapiler elektroforez sistemleri misel elektrokinetik kapiler kromatografiyi (MECC) oluşturmaktadır [9, 10].

Misel elektrokinetik kapiler kromatografi y¼nteminde ayırmda olduk¼a yüksek derişimde sodyum dodesil s¼lfat gibi (SDS) y¼zey aktif madde i¼eren y¼ksek pH' da bir elektrolit ¼ozeltisi kullanılır. Spesifik bir y¼zey aktif madde derişimi üzerinde, y¼zey aktif madde molek¼lleri kendi kendine toplanmaya başlar, miselleri oluştururlar ve başka y¼kl¼ par¼acıklar gibi elektroforetik g¼ç sergileyen k¼resel agregatları oluştururlar. Bu noktaya kritik misel derişimi denir. Miseller uzun zincirli, hidrofobik kuyruk ve hidrofilik baş grubundan oluşan amfifilik y¼zey aktif madde agregatlarıdır [11-14].

Misel elektrokinetik kapiler kromatografi y¼nteminde t¼rler alıkona mayaya benzer Şekilde miselin i¼ kısmında dağılmaya uğramaktadırlar. MECC sisteminde kritik misel derişimi üzerinde oluşan bu miseller yalancı bir sabit faz olarak davranarak analitlerin ayırımını sağlamaktadır [10]. Terabe tarafından 1984 yılında tanıtılan bu y¼ntemde [15]; deneysel koşulların değiştirilmesiyle hem n¼tr hem de y¼kl¼ analitler aynı anda birbirinden ayrılabilir [16].

İlk kez 1970 yılında Davankov ve Rogozhin tarafından tanıtılan kiral ligand değişim kromatografisi, enantiyomerik molek¼llerin kiraliteye g¼re ayırımını sağlayan y¼ntemlerden biridir. S¼z konusu olan bu ayırmda kullanılan kiral selekt¼rler analit ile etkileşerek diastomerik bir ¼çl¼ maddenin oluşumu sağlar [17].

Zare ve grubu tarafından ilk kez tanıtılan kiral ligand değişimi kapiler elektroforez y¼nteminde ayırım, kiral selekt¼r-metal kompleksinin katkı maddesi olarak kullanımıyla ger¼ekleřmektedir [18].

Sunulan ¼alıřmada kiral bir bileşik olan ampisilin antibiyotiğinin D- ve L- enantiyomerleri kapiler elektrokromatografinin alt bir kolu olan misel elektrokinetik kapiler kromatografi kullanılarak, ligand değişim kromatografisi mekanizmasına

göre birbirinden ayrılmıştır. Yürütülen deneysel çalışmalar aşağıdaki başlıklar altında gerçekleştirilmiştir;

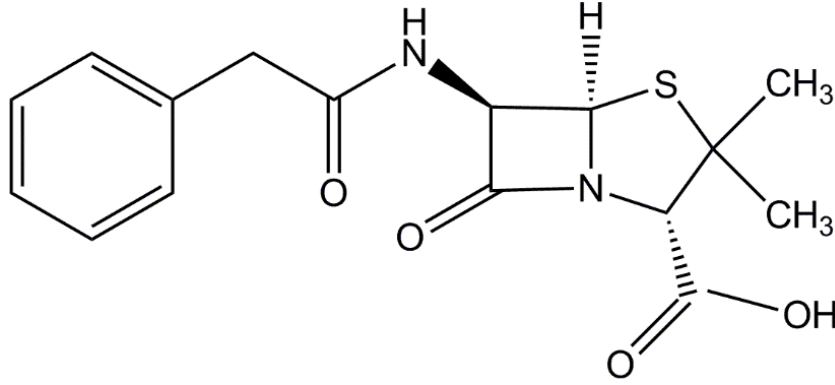
- L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksinin oluşturulması için uygun amino asit-metal oranının belirlenmesi, kompleksin oluşturulması ve karakterizasyonu,
- Kritik misel derişiminin belirlenmesi
- SDS bazlı misel çözeltilerinin hazırlanması ve karakterizasyonu
- Enantiyometrik ayırma; akımın, basıncın, organik çözücünün, farklı SDS derişimlerinin, ampisilin molekülünün farklı mol oranlarının ve farklı tampon çözelti pH' ının etkisini incelemek üzere enantiyometrik ayırım koşullarının belirlenmesi,
- Tekrar kullanılabilirlik çalışmalarının yapılması
- Gerçek örnek olan Alfasilin antibiyotiği ile kinetik analizlerin yapılması.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Antibiyotikler

Antibiyotikler mikroorganizmalar tarafından doğal olarak meydana gelen, yarı sentetik olarak ya da doğal kökenli bileşiklerin modifikasyonu ile sentetik olarak üretilen bileşikler olarak tanımlanır [19, 20].

İlk antibiyotik olan Penisilin (Penisilin G), 1928 yılında Alexander Fleming tarafından keşfedilmiştir [20, 21]. Şekil 2.1' de penisilinin kimyasal yapısı görülmektedir [20].



Şekil 2.1. Penisilinin kimyasal yapısı.

Penisilinin keşfi ile 20.yüzyılın ortalarında birçok hastalığın tedavisi mümkün olmuştur. Bu olay yüzyılın buluşu olarak tarihe geçmiştir. Ancak sonraki yıllarda bakterilerin β -laktamaz enzimi üreterek penisilinin yapısında bulunan 4 üyeli β -laktam halkasını hidrolize ederek bozmasından dolayı bakteriler tarafından antibiyotiklere karşı direnç başlamıştır. Bu sebeple penisilinlerin antibiyotik etkisi de kaybolmaya başlamıştır. Bakterilerin antibiyotiklere karşı gelişen dirençlerinin artması nedeniyle yeni antibiyotiklerin geliştirilmesi hızlandırılmıştır [2, 22].

2.1.1. Antibiyotiklerin Sınıflandırılması

Antibiyotikler etki mekanizmalarına, etki güçlerine ve kimyasal yapılarına göre çeşitli şekillerde sınıflandırılır. Antibiyotikler etki mekanizmalarına göre sınıflandırılırsa 5 farklı gruba ayrılır.

Bakteri hücre duvar sentezini bozan ve litik enzimleri aktive eden antibiyotikler;

- beta laktamlar
 - ✓ penisilinler
 - ✓ sefalosporinler
 - ✓ monobaktamlar
 - ✓ karbapenemler
- siklosein
- ristosetin
- basitrasin
- teikoplanin
- vankomisin

Sitoplazma membran geçirgenliğini bozan antibiyotikler;

- polimiksinler
- gramisidin
- nistatin
- amfoterisin B
- kandisein
- ketokonazol ve diğer antifungal imidazoller,
- flukonazol ve diğer antifungal triazololler,
- heksaklorofen
- katyonik deterjanlar

Ribozomlarda protein sentezini bozan antibiyotikler;

- tetrasiklinler
- aminoglikozidler
- makrolidler
- amfenikoller
- linkozamidler
- fusidik asit

Bakteri genetik materyali üzerine etki yapan antibiyotikler;

- florokinolonlar
- rifamisinler

- nalidiksik asit
- metronidazol
- aktinomisetler
- mitomisinler
- bleomisin
- asiklovir
- doksorubisin
- dounorubisin
- metotreksat

Bakteriyel antimetabolitler;

- sülfonamidler,
- sülfonlar
- PAS
- izoniazid
- etambutol
- trimetoprim [23, 24].

Bakteri hücre duvarı sentezini bozan ve litik enzimleri aktive eden antibiyotiklerden beta laktam halkasına sahip olan penisilinleri etki spektrumlarına ve kimyasal yapılarına göre sınıflandırmak mümkündür.

Dar spektrumlu penisilinler

- Pen-G ve Depo penisilinler
- Fenoksi penisilinler
- Beta-laktamazlara (Penisilinaz) dayanıklı (Antistafilokokal) penisilinler

Genişçe spektrumlu penisilinler

- Aminopenisilinler
 - Ampisilin
 - Amoksisilin
 - Hetasilin
 - Siklasilin
 - Episilin

Geniş Spektrumlu penisilinler

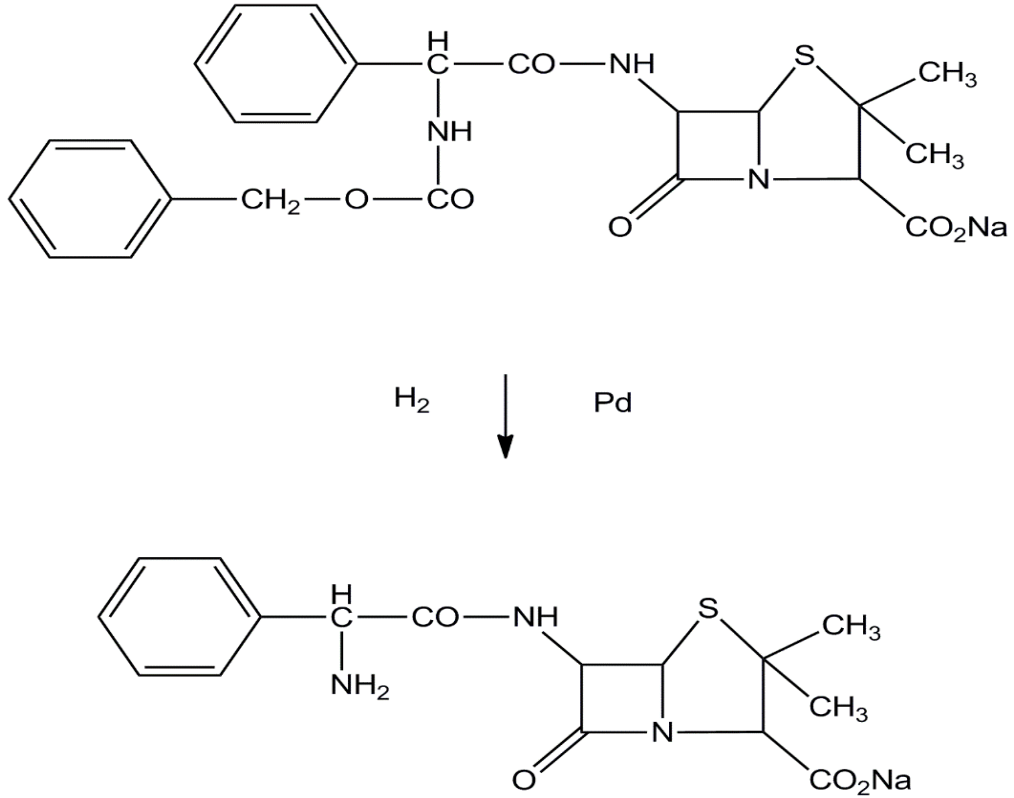
- Karboksipenisilinler
- Asilüreido penisilinler
- Diğer penisilinler [24] .

2.1.1.1. Ampisilin

Beta laktam halkasına sahip olan ve bakteri hücre duvarı sentezini önleyen bu antibiyotik, yarı sentetik olarak laboratuvar ortamında sentezlenir. Ampisilin aminopenisilin grubunda olup IUPAC adı, (2S, 5R, 6R)-6-[(2R)-2-amino-2-fenilasetamido] 3, 3-dimetil-7-okso-4-tiya-1-azobisiklo [3.2.0] heptan-2-karboksilik asittir [25].

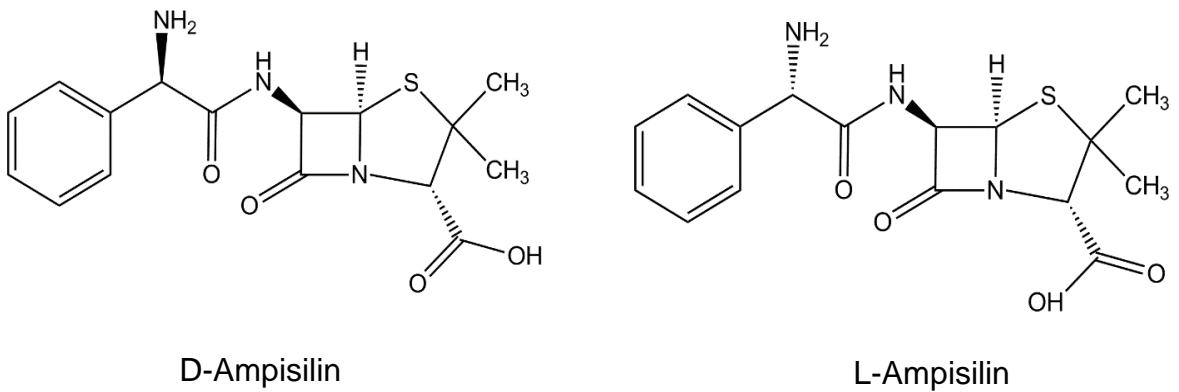
Ampisilin, yıllık en çok üretimi olan β -laktam antibiyotiklerinden biridir. Yüksek su çözünürlüğü, oral yoldan uygulandığında yüksek emilim hızı ve asidik pH' da yüksek stabilite avantajına sahiptir [4]. Özellikle klavulanik asit ile kombine edildiğinde geniş spektrumlu bir antibiyotiktir [3]. Gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı dirençli olan bu antibiyotik insanlarda ve hayvanlarda kullanılır [5, 26].

Doyle ve arkadaşları ilk olarak 1961 yılında ampisilini (alfa amino benzil penisilin) α -benziloksikarbonilaminobenzilpenisilinin sodyum ile paladyum katalizörleri eşliğinde hidrojenleyerek (Şekil 2.2) elde etmişlerdir [27].



Şekil 2.2. Ampisilinin H₂ ve Pd katalizöründe sentezi.

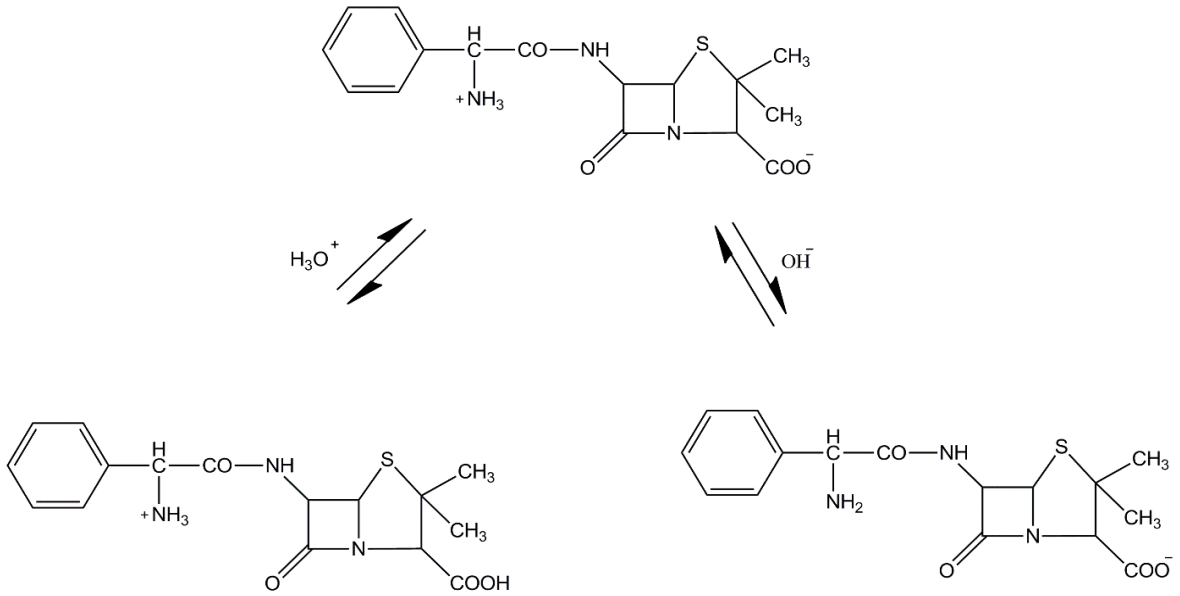
Ampisilinin yan zincirinde asimetrik karbon atomu bulunur. Bu nedenle optikçe aktif olan D- ve L-enantiyomerleri bulunur. D- izomeri L- izomerinden daha aktif olduğu için tedavide kullanılan şekli D-izomeridir [5]. Şekil 2.3' de ampisilinin enantiyomerleri görülmektedir.



Şekil 2.3. Ampisilinin D- ve L-enantiyomerleri.

Bileşik beyaz ve kokusuz olup kristal yapıdadır. Sodyum tuzu olan bileşiği de aynı şekilde beyaz, kokusuz ve kristal olup higroskopik bir özellik göstermektedir. Sodyumlu bileşiğinin yanı sıra ampisilin sesk hidrat, ampisilin monohidrat, ampisilin trihidrat gibi farklı kristal su içeren formları da mevcuttur [28]. Nötral çözeltilerde ampisilin sahip olduğu amin ve karboksilik asit grupları nedeniyle amfoterik bir özellik göstermektedir.

Hou ve Poole ampisilinin farklı pH' da davranışını incelemişlerdir. Nötral halde olan bu iyonun bazik ortamda anyon, asidik ortamda ise katyon haline dönüştüğünü belirlemişlerdir [29]. Şekil 2.4' de ampisilinden asit ve baz etkisiyle katyon ve anyon oluşumu görülmektedir.



Şekil 2.4. Ampisilinden asit ve baz etkisiyle katyon ve anyon oluşumu.

2.1.2. Antibiyotiklerin Kullanım Alanları

Dünya çapında antibiyotik tüketiminin 100.000-200.000 ton arasında olduğu tahmin edilmektedir. Bu ilaçlar günümüzde genel olarak; tıpta insan enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılır. Sadece tıpta değil aynı zamanda veterinerlik alanında da hayvan hastalıklarının tedavisinde ve hayvanlarda büyümeyi destekleyici olarak yaygın bir şekilde kullanılmaktadır [30, 31]. Bunun yanı sıra gıda sektöründe besinlerin korunmasında ve balık gibi suda yaşayan canlıların sağlığı ve büyümesinde ve ilaç sanayinde bilimsel araştırma faaliyetleri için kullanılmaktadır [23].

2.2. İzomeri

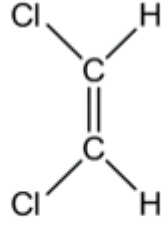
Aynı molekül formülüne sahip farklı bileşikler izomer olarak adlandırılmaktadır. İzomerler yapı izomerleri ve stereoizomerler olarak iki gruba ayrılır.

Yapı izomerliğinde atomların dizilişleri farklı bir sıra ile olur ve bağ yapıları da birbirinden farklıdır. Çizelge 2.1' de yapı izomerlerine ait örnekler görülmektedir.

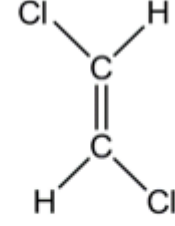
Çizelge 2.1. Yapı izomerlerine ait örnekler.

| Molekül Formülü | Yapı İzomerleri | |
|----------------------------------|--|---|
| C ₂ H ₆ O | Etanol CH ₃ —CH ₂ —OH | Dimetil Eter CH ₃ —O—CH ₃ |
| C ₃ H ₇ Cl | 1-Kloropropan CH ₃ —CH ₂ —CH ₂ —Cl | 2-Kloropropan CH ₃ —CH—CH ₃ Cl |

Stereoizomerlikte ise atomlar aynı sırada bağlanır. Sadece uzaydaki konumları farklılaşmıştır. Örneğin; alkenlerde cis- ve trans-izomerleri stereoizomerlerdir. Şekil 2.5' de cis- ve trans-1,2-dikloroeten görülmektedir. Bu iki yapı aynı molekül formülüne ve aynı bağlanmaya sahiptir. Yalnızca uzayda düzenleme bakımından farklıdır. Her ikisi de karbon-karbon ikili bağı ile birleştirilmiş iki merkez karbon atomu ve bu iki merkeze bağlı klor ve hidrojen atomu içermektedir. Karbon-karbon ikili bağının dönmesi için gerekli enerji kuvvetli olduğundan bu iki izomer kolay bir şekilde birbirine dönüşmemektedir.



cis-1,2- dikloroeten ($C_2H_2Cl_2$)

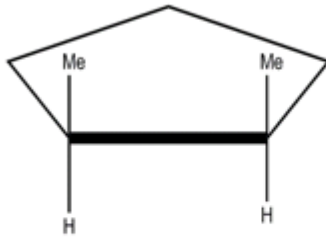


trans-1,2- dikloroeten ($C_2H_2Cl_2$)

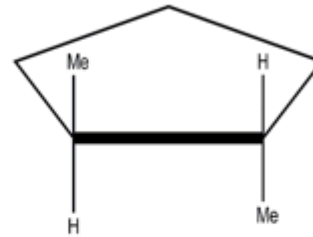
Şekil 2.5. cis- ve trans- 1,2-dikloroetenin kimyasal yapıları.

Stereoizomerler, diastereomerler ve enantiyomerler olarak iki gruba ayrılır. Enantiyomerler, molekülleri birbirinin ayna görüntüsü olan ama birbiriyle çakışmayan stereoizomerlerdir. Diastomerler ise birbirinin ayna görüntüsü olmayan stereoizomerlerdir.

Şekil 2.6' da görülen cis-1,2-dimetilsiklopentan ve trans-1,2 dimetilsiklopentan moleküllerini ele alacak olursak; bu iki yapıda birbirine dönüşemeyen farklı bileşiklerdir ve aynı molekül formülüne sahiplerdir. Bu sebeple izomerlerdir. Aynı sırayla bağlanmalarından dolayı yapı izomeri olamazlar. Öyleyse bu bileşikler uzaydaki düzenlemeleri farklı olduğu için stereoizomerlerdir. Ayna görüntüleri de olmadığından bu iki bileşik birbirinin diastereomeridir [32].



cis-1,2-dimetilsiklopentan



trans-1,2 dimetilsiklopentan

Şekil 2.6. cis- ve trans- 1,2-dimetilsiklopentanın kimyasal yapısı.

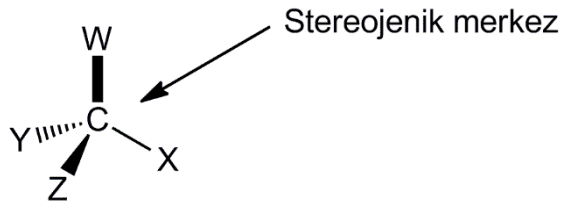
2.2.1. Enantiyomerler

Birbirinin ayna görüntüsü olan ve birbiriyle çakışmayan moleküllere enantiyomer adı verilir. Bir kiral karbon atomuna sahip olan bir molekül enantiyomer olarak adlandırılan iki stereoizomer olarak bulunur. Enantiyomer molekülleri aynı erime ve kaynama noktalarına sahiptirler. Aynı zamanda aynı kırma indisine, yaygın olan çözücülerde aynı çözünürlüğe, aynı kızılötesi spektrumlarına ve akiral reaktiflerle aynı tepkime hızına sahiptirler. Bu bahsedilen özellikler moleküller arası kuvvetlerin büyüklüğüne bağlanmıştır. Birbirinin ayna görüntüsü olan moleküller için de dolayısıyla bu kuvvetler aynı olacaktır [33].

2.2.2. Kiralite

Farmasötik açıdan aktif bileşenlerin yarıdan fazlası kiraldır. Kiral bileşikler, aynı molekül formülüne sahip ayna görüntüsü olan iki enantiyomerik formu bulunan bileşiklerdir [6].

Kiral moleküller, stereojenik merkez olarak adlandırılan dört farklı atom ya da grubun bağlı olduğu en az bir karbon atomu içerirler. Stereojenik merkez ayrıca kiral merkez, asimetric merkez ve stereomerkez gibi farklı isimlerle de adlandırılabilir. Şekil 2.7' de kiral molekülde bulunan stereojenik merkez görülmektedir.



Şekil 2.7. Kiral molekülde stereojenik merkez.

2.2.3. Optikçe Aktiflik

Enantiyomerler sadece başka bir kiral madde ile etkileştiği zaman farklı davranış gösterirler. Diğer moleküllere karşı tek bir enantiyomer veya enantiyomerlerden birinin fazlasını içeren reaktiflere karşı farklı tepkime hızı gösterirler. Bunun gibi farklılıkları incelemek için düzlem polarize ışığa karşı olan davranışları gözlemlenebilir. Düzlem polarize ışığın bir demeti enantiyomerin içerisinde geçirilirse polarizasyon düzlemi dönmektedir. Polarize ışık demetini bu şekilde

çevirebilen maddelere optikçe aktif madde denir. Enantiyomerler polarize ışık düzlemini eşit miktarda ama zıt yönde çevirmektedirler. Düzlemi saat yönünde çeviren izomere dekstro izomeri adı verilerek d- veya (+) işareti şeklinde gösterilir. Düzlemi saat yönünün tersine çeviren izomere ise levo izomeri adı verilir ve l- veya (-) işareti ile gösterilir [32, 33].

Kiral olan bir yapının iki enantiyomerini aynı anda içeren karışımlar optikçe aktif değildir. Ayrıca akiral moleküllerde optikçe aktiflik göstermez. Genel olarak bir maddenin optikçe aktif olabilmesi için kiral olması ve enantiyomerlerden birinin miktarının diğerine göre daha fazla olması gerekmektedir.

2.2.4. Rasemik Karışımlar

Bir kiral bileşiğin (+) ve (-) enantiyomerlerini eşit miktarda içeren karışımlara rasemik karışım adı verilir. Rasemik karışımlar optikçe aktiflik göstermez. Çünkü enantiyomerlerden biri polarize ışık düzlemini sağa çevirirken, diğeri sola çevirerek oluşan etkiyi yok etmektedir. Bu karışımları göstermek için (\pm) işareti kullanılır [34].

2.2.5. Kiral Ayrımın Gerekliliği

Biyolojik moleküllerden olan enzimler, proteinler, hormonlar, besinler, şekerler, yağlar gibi birçok molekül kiraldır. Dahası vücudumuz da kiral bileşikler tanmaktadır [6]. Enantiyomerlerin rasemik karışımlara göre çok daha etken olmalarından dolayı ve tek başına bulunan enantiyomerlerin çok az ya da hiç yan etkisi bulunmamasından dolayı son 30 yılda enantiyomerik saf bileşiklerden oluşan tıbbi ilaçlara, tarımsal ilaçlara, besin katkı maddeleri gibi yararlı kimyasal maddelere ihtiyaç her geçen gün artmaktadır [35].

Tek bir saf enantiyomerin rasemat karışımına göre daha güvenli ve çok daha etkili alternatifler sağlaması gibi özelliklerinden dolayı tek izomerlerin geliştirilmesi ve yenilenmesi için farmasötik alanda büyük bir uğraş verilmektedir [6].

Kiral ilaç etken maddesinin enantiyomerlerinden birisi vücutta fizyolojik olarak değişiklik yaparken diğeri enantiyomer ya etkili olmaz ya da ciddi fizyolojik zararlara yol açabilir. Kısacası her bir enantiyomer bileşiğinin vücutta aktive olması, metabolize olması ve yan etkisi farklı olduğundan bu iki enantiyomerin ayrılması gerekliliği ortaya çıkmaktadır. Böylece biyolojik sistemler ve ilaçların etkileşimlerinde

kiralite çok büyük bir önem arz etmektedir. Örneğin; softenon molekülünün (R)- enantiyomeri insan vücudunda yatıştırıcı bir özellik gösterirken (S)- enantiyomeri embriyoda bozukluğa yol açmaktadır [35].

2.2.6. Kiral Ayırma Yöntemleri

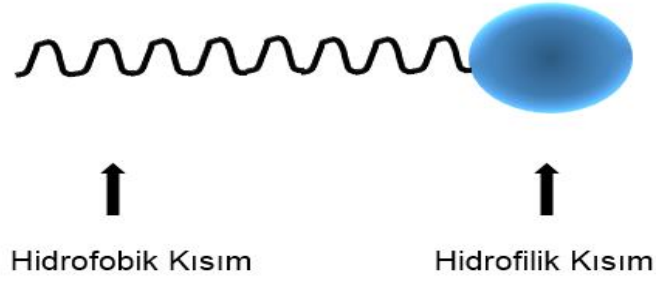
Kiral ayırma teknikleriyle aynı anda tek veya iki enantiyomer birbirinden ayrılabilir. Rasemik bir karışımın enantiyomerlerinin ayrılması için kullanılan yöntemler;

- Kapiler elektroforez yöntemi
- Kromatografi yöntemi
- Kristalizasyon yöntemi
- Ekstraksiyon yöntemi
- Membran kullanılarak yapılan yöntemler
- Enzimatik kinetik rezolüsyon yöntemleridir.

Ekonomik olarak saf ilaçların üretimi için yoğun bir çaba sarf edilmektedir. Bununla beraber bazı rasemik karışımları ayırmak için uygulanan yöntemler zor ve pahalıdır. Bunun için özel yöntemler geliştirilmelidir. Kromatografik yöntemler enantiyomerlerin ayrılması için kullanılan en yaygın yöntemdir. Burada kiral adsorbentler kullanılır. Kiral kromatografiler aracılığıyla enantiyometrik ayrımlar kolay bir şekilde yapılabilir [6].

2.3. Yüzey Aktif Maddeler

Suda, sulu bir çözeltide veya susuz ortamda çözündüklerinde sıvı yüzeyini küçülten, yani yüzey gerilimini azaltan maddelere yüzey aktif madde (Sürfaktant) denir. Çözücünün su olduğu durumlarda hidrofilik bir baş grubu ve hidrofobik bir kuyruk grubuna sahip amfifilik karakterli bir yapıya sahiptirler. Şekil 2.8' de yüzey aktif maddelerin genel yapısı görülmektedir.



Şekil 2.8. Yüzey aktif maddelerin genel yapısı.

Yüzey aktif maddelerin hidrofobik kısmı sulu çözeltilerden ayrılma ve hidrofilik olan baş kısmı sulu çözeltilere doğru eğilim göstermektedir. Bu iki taraflı olan hareket ara yüzeylerde yüzey aktif maddelerin adsorpsiyonunu ve misellerin oluşumunu sağlamaktadır. Yüzey aktif maddelerin birçoğu polidispers sistemlerdir. Yani aynı tipteler ama farklı zincir uzunluğuna sahip ve diğer yapısal özelliklerinin bazılarında farklılık gösteren yapılardır.

2.3.1. Yüzey Aktif Maddelerin Sınıflandırılması

Yüzey aktif maddelerin oluşumlarına göre sınıflandırıldığında doğal ve sentetik olarak iki farklı grupta incelenir.

2.3.1.1. Doğal Yüzey Aktif Maddeler

Doğal olarak meydana gelen amfifiller, basit lipitler (örneğin, karboksil asit esterleri), kompleks lipitler (örneğin fosfor, azot veya şeker içeren yağ asitleri), kolik ve deoksikolik asit gibi safra asitlerini içermektedirler.

2.3.1.2. Sentetik Yüzey Aktif Maddeler

- Anyonik yüzey aktif maddeler

Bu maddelerin yükleri negatiftir. Biyolojik sistemlerde önemli aktiviteleri bulunmaktadır. Nişasta [36], proteinler [37], peptitler ve DNA [38] gibi çeşitli makromoleküllere bağlanarak ya da fosfolipit hücre zarları gibi çeşitli hücre öğelerinin yapısına girerek bu kısımların fonksiyonlarını yerine getirememelerine neden olurlar. Örnek olarak alkilbenzen sülfonat (deterjan), sabunlar (yağ asidi),

lauril sülfat (köpük ajanı), dialkil sülfosüksinat (ıslatıcı madde), lignosülfonat (dağıtıcı) verilebilir [39].

- İyonik olmayan yüzey aktif maddeler

Yüzey aktif maddenin hidrofilik kısmı bir yüke sahip değildir. Hidrofilik grupları alkol, fenol, eter, ester, amit gibi çözünemez türden olduğu için sulu çözümlerde iyonize olamazlar. Bu yapılar uzun hidrofobik alkil bir grup ile yüksek polariteye sahip nötral grupların birleştirilmesiyle oluşmaktadır; sülfat, sülfonat veya karboksilat anyonları.

Yüksek sıcaklıklara çıktığı zaman suda az çözünür ve daha hidrofobik hale gelirler. İyonik olmayan bu yüzey aktif maddelerin büyük bir çoğunluğu etilen oksitin polikondenzasyonu ile elde edilir. Bu yolla oluşan yapılara polietoksilenmiş iyonik olmayan maddeler adı verilir [39].

Bu maddelerin polar kısmı polieter veya polihidroksilden oluşmaktadır. Bu grupta alkol etoksilatlar en geniş kullanım alanına sahiptir. İyonik olmayan yüzey aktif maddelere sodyum dodesil sülfat (SDS), alkil fenoletoksilat, penta etilenglikolmonodesil eter ve poli oksietilen örnek olarak verilebilir.

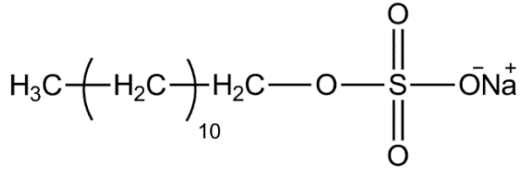
- Katyonik yüzey aktif maddeler

Katyonik yüzey aktif maddelerin yükleri pozitifdir ve suda çözünür bir özelliğe sahiptirler. Bu grubun büyük bir kısmı doğal yağ asitlerinden gelen alkil tipi uzun zincirli kuarterner amonyum ve amin tuzları gibi azotlu bileşiklerden oluşur. Sentezleri yüksek basınçlı hidrojenasyon reaksiyonu ile gerçekleştiğinden dolayı bu yüzey aktif maddeler anyonik yüzey aktif maddelere göre daha pahalıdır. Katyonik yüzey aktif maddelere örnek olarak, setiltrimetilamonyum bromür, dodesilamin hidroklorür, heksadesiltrimetil amonyum bromür verilebilir.

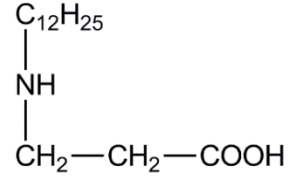
- Amfolitik yüzey aktif maddeler

Tek bir yüzey aktif madde molekülü hem anyonik hem de katyonik bir çözünme sergiliyorsa böyle moleküller amfoterik veya zwitter iyonik madde olarak adlandırılır. Yani hem pozitif hem de negatif yük taşırlar. Amino asitler ve fosfolipitler gibi doğal maddeler ve betainler veya sülfobetainler gibi sentetik ürünlerde bu durum söz konusudur [39].

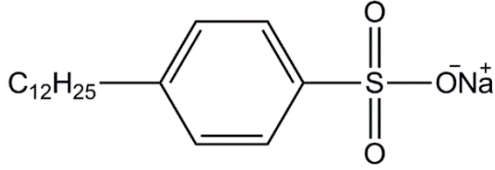
Yüzey aktif maddeler uzun zincirli alkil grupları, uzun zincirli alkil benzen grupları, alkil naftalin grupları, reçine türevleri yüksek molekül ağırlığına sahip propilen oksit polimerleri ve polioksan grupları gibi farklı yapıları içerebilirler. Sahip oldukları hidrofobik grubun yapısı yüzey aktif maddenin çeşitli özellikleri üzerinde etkilidir. Şekil 2.9' da yaygın olarak kullanılan bazı yüzey aktif maddeler görülmektedir [39];



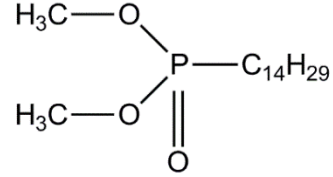
Sodyum dodesil sülfat



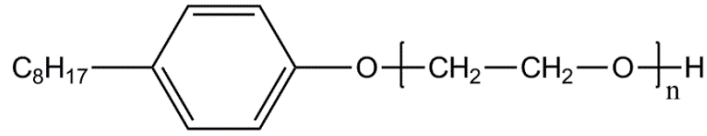
Dodesil betain



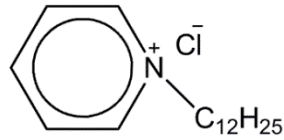
Sodyum dodesil benzen sülfonat



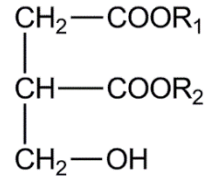
Dimetil eter tetradesil fosfonik



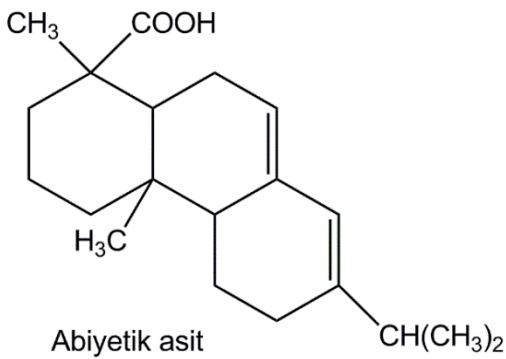
Polietoksillenmis oktilfenol



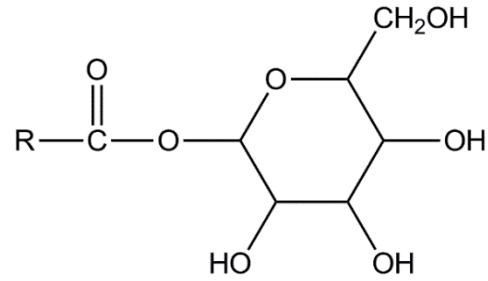
N-dodesil piridinyum klorür



Digliserit



Abiyetik asit

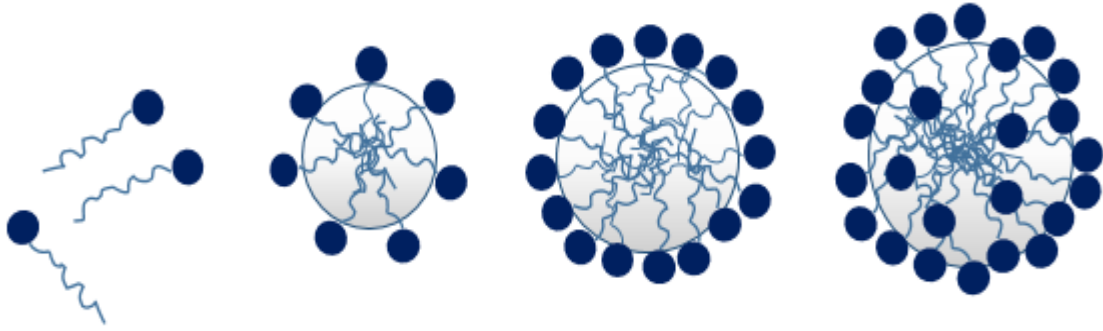


Sorbitan monoester

Şekil 2.9. Yaygın olarak kullanılan bazı yüzey aktif maddeler.

2.3.2. Kritik Misel Derişimi ve Misel Oluşumu

Yüzey aktif maddelerin hidrofilik kısımları dış yüzeyde su ile temas halinde, hidrofobik kısımları ise iç bölgede olacak şekilde meydana gelen yapılara misel adı verilir. Miseller belirli bir yüzey aktif madde derişiminden sonra meydana gelmektedir. Yüzey aktif madde molekülleri sulu çözeltilere ilave edildiğinde monomer yüzey aktif maddeler sıvı-hava yüzeyinde bir tabaka oluştururlar. Yüzey, yüzey aktif ajan monomerleriyle doymuş hale geldiğinde ise yığın çözeltilinde miseller oluşmaya başlar. Bu noktaya kritik misel derişimi denir. Kritik misel derişimi kısaca 'CMC' olarak gösterilir [40]. Şekil 2.10' da misel oluşumu şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.10. Misel oluşumunun şematik olarak gösterimi.

Her yüzey aktif maddenin karakteristik bir kritik misel derişimi ve agregasyon (Bir misel oluşturmak için gerekli yüzey aktif madde moleküllerinin sayısı) sayısı vardır. Bir diğer önemli parametre ise Kraft noktasıdır. Bu da yüzey aktif maddenin çözünürlüğünün misel oluşumundan dolayı hızlı bir şekilde arttığı minimum sıcaklığı temsil eder [12, 41, 42].

Çizelge 2.2. Bazı yüzey aktif madde tipleri, kritik misel derişimleri (CMC) ve ortalama agregat sayıları (n).

| Yüzey aktif madde | Tipi | CMC (M) | n |
|-----------------------------------|----------------|------------------------|-----|
| Sodyum dodesil sülfat (SDS) | anyonik | 8.1×10^{-3} | 62 |
| Sodyum tetradecil sülfat (STS) | anyonik | 2.1×10^{-3} | 138 |
| Sodyum dodekansülfat | anyonik | 7.2×10^{-3} | 54 |
| Sodyum kolat | anyonik | $13-15 \times 10^{-3}$ | 2-4 |
| Setiltrimetilamonyum bromür(CTAB) | katyonik | 0.92×10^{-3} | 61 |
| Dodesiltrimetilamonyum bromür | katyonik | 15×10^{-3} | 56 |
| Brij-35 | İyonik olmayan | 0.1×10^{-3} | 40 |
| Sülfobetain | Zwitter iyonik | 3.3×10^{-3} | 55 |

Su içerisinde apolar bir madde çözündüğünde bu meydana gelen yapılanma artar ve bu sebeple sistemin serbest enerjisinde bir artış meydana gelir. Bu artışla beraber yüzey aktif maddeler sistemin enerjisini düşürmeye çalışırlar. Bunun için hava-su arayüzeyine adsorplanırlar ve adsorpsiyon kapasitesi dolduktan sonra moleküller kümeleşmeye başlarlar. Monomerlerin misellere dönüşmesi hidrokarbonun etrafındaki su yapılanmasının bozulmasına sebep olur. Böylece su molekülleri düzenli bir yapıdan düzensiz bir yapıya geçer. Bu geçiş sonucunda sistemde entropi artar ve entropinin artmasıyla serbest enerjide bir düşüş meydana gelir [43].

Misel oluşumu sınırlı bir derişim aralığı üzerinde kendiliğinden oluşmaya başlayan dinamik bir prosestir. Bu proses sonucunda oluşan misellerin büyüklüğü yalnızca amfifil molekülün yapısıyla değil aynı zamanda çözeltinin şartlarıyla da belirlenir. Oluşan bu yapılar monomerler ile dinamik bir denge içindedir bu özellikleri de diğer assosiyel kolloidlerden ayırmaktadır.

Misel çözeltileri suda çözünemez olan farklı hidrofobik bileşikleri çözünür hale getirebilirler. Miseller, hidrofobik ve elektrostatik etkileşimlere dayalı moleküler düzeyde analitlerle etkileşime girme kabiliyetine sahiptir. Nötr analitler bile, hidrofobik çekirdeğin çok güçlü çözündürme gücü nedeniyle misellere bağlanabilirler [12, 42].

Misel oluşumunun gözleendiği CMC' yi ölçmek için geleneksel yöntemler dışında kullanılan çeşitli yöntemler mevcuttur. Bu yöntemler;

- Akım yoğunluğu yöntemi
- Zonal yöntemler:
 - ✓ alıkonma faktörü yöntemi
 - ✓ alıkonma zamanı yöntemi
 - ✓ mobilite yöntemi
 - ✓ zeta potansiyel yöntemi
- Frontal yöntemleridir [44].

2.3.3. Yüzey Gerilimi ve Ölçüm Yöntemleri

Yüzey gerilimi yalnızca sıvı ve katılar için bahsedilebilen bir olgudur. Kütleli çekim kuvvetinin bulunmadığı bir ortamda boşluğa bırakılan bir miktar sıvı küre şeklini alarak en küçük yüzey alanına sahip olmaya çalışır. Sıvıdaki moleküllere etki eden çekim kuvvetlerinin bileşkesi sıfırdır. Bu durumda bile sıvı yüzeyindeki moleküller sıvı içine doğru çeken net bir kuvvetin etkisi altında kalmaktadır. Yüzeyi küçültmeye çalışan bu kuvvetleri yenmek için dışarıdan sıvıya belirli bir miktar enerji vermek gerekir. Sabit sıcaklıkta ve basınçta sıvı yüzeyini 1 m² veya 1 cm² büyötmek için verilmesi gereken enerjiye yüzey gerilimi adı verilir ve " σ " ile gösterilir. Yüzey gerilimi bir sıvı yüzeyindeki 1m veya 1 cm' lik uzunluğunu dikine keserek yani ikiye bölmek için uygulanması gereken kuvvete eşit olarak da düşünölebilir. Yüzey gerilimi için kullanılan birimler aşağıdaki çizelgede gösterilmiştir [45].

Çizelge 2.3. Yüzey gerilimi için kullanılan birimler.

| Birim Sistemi | Yüzey Gerilimi (σ) |
|---------------|--|
| SI Birimi | Jm ⁻¹ veya Nm ⁻¹ |
| CGS Birimi | erg cm ⁻² veya dyn cm ⁻¹ |

Yüzey gerilimi, istenen kesinlik ve uygunluk derecesine göre, zamanın yüzey gerilimi ile bağlantısının incelenip incelenmemesine göre ve örnek miktarı göz

önüne alınarak bir yöntem seçilmesiyle ölçülür. Yüzey gerilimi ölçüm yöntemleri aşağıdaki gibidir.

- Kılcalda (kapillerde) yükselme yöntemi
- Damla ağırlığı yöntemi
- Asılı damla metodu (Pendant Drop Method)
- Plaka yöntemi (Wilhelmy Plate)
- Halka-koparma yöntemi (Du Noüy Tensiyometresi)
- Salınımlı (Oscilating) Jet Yöntemidir [46].

2.3.4. Yüzey Aktif Maddelerin Kullanım Alanları

Dünyada sabun, deterjan ve diğer yüzey aktif malzemelerin üretimi 1970 yılında 18 milyon ton, 1990 yılında 25 milyon ton ve 2000 yılında ise yaklaşık olarak 40 milyon ton civarındadır. Yüzey aktif maddeler genel olarak kozmetik sektöründe temizleyici, köpük yapıcı, emülgatör, çözünme ve iyileştirme amaçlarıyla kullanılmaktadır. Bunun dışında biyolojik sistemler için; sağlık ve kişisel bakım ürünlerinde, gıdalarda ve bitki korumada kullanılır [47].

Spesifik olarak; yüzey aktif maddelerden biri olan alkil benzen sülfonat (ABS) tipi sentetik deterjanlar evsel yıkama işlemleri için kullanılmaktadır. Zwitter iyonik yüzey aktif maddeler ise göz ve deride çok düşük tahribat gösterdiklerinden dolayı birçok türü şampuan ve kişisel bakım ürünlerinde kullanılır [39].

2.4. Kapiler Elektroforez

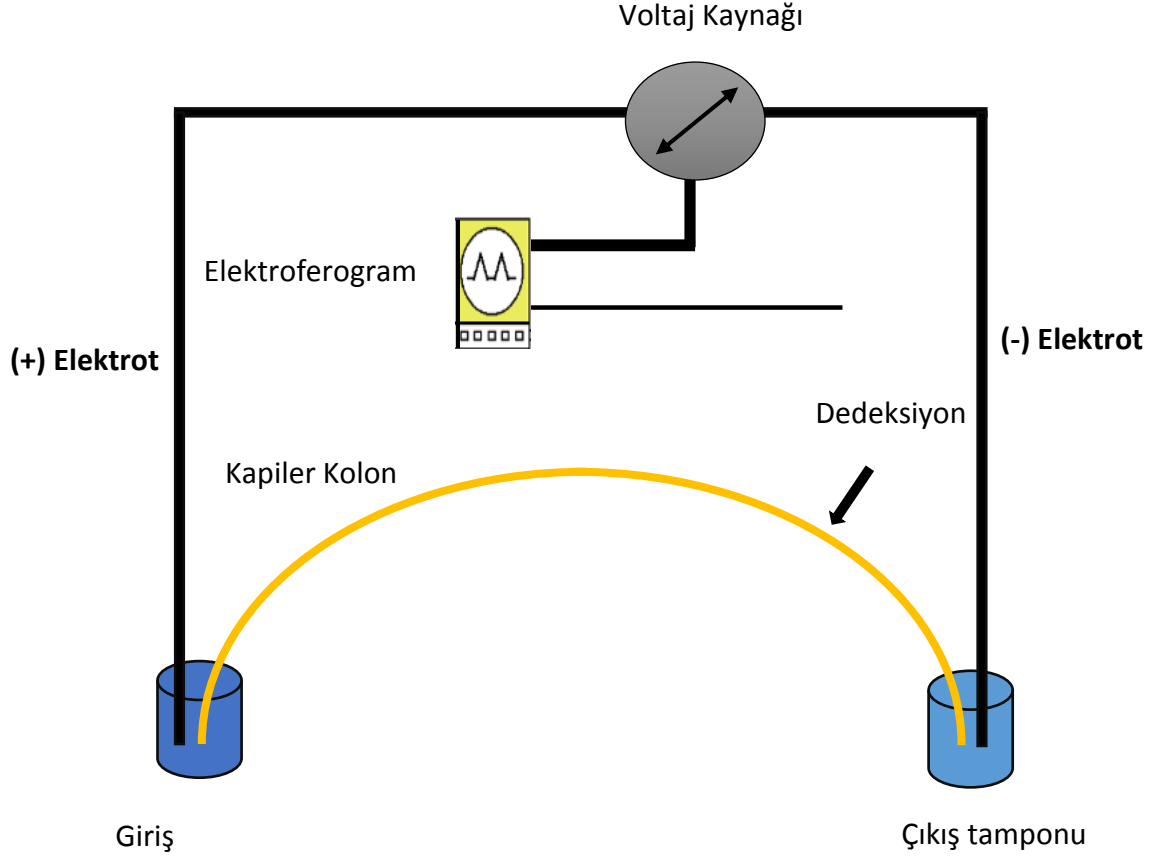
Kapiler elektroforez (CE), bileşiklerin yük/boyut oranlarına göre ayrılmasına dayanan yüksek etkinliğe sahip mikro ölçekli analitik bir tekniktir [48, 49].

İlk olarak 1948 yılında protein analizinde elektroforez tekniğini uygulayan Tselius bu çalışmaları ile Nobel ödülü almıştır [50]. Analitik çeşitlilik, ayrımın yüksek verimde olması, yüksek kütle duyarlılığı, çok küçük miktarlardaki örnek hacimleriyle çalışabilme, düşük analiz süreleri ve ucuz olması gibi özellikleri diğer kromatografik yöntemlere göre üstünlük sağlamaktadır [51].

Bu yöntemde elektrokinetik ayırım, iki ucu açık olan içi silika ile dış yüzeyi poliimit ile kaplı olan 25-75 µm iç çaplı, 330 µm dış çaplı ve 15-100 cm uzunluğundaki silindirik

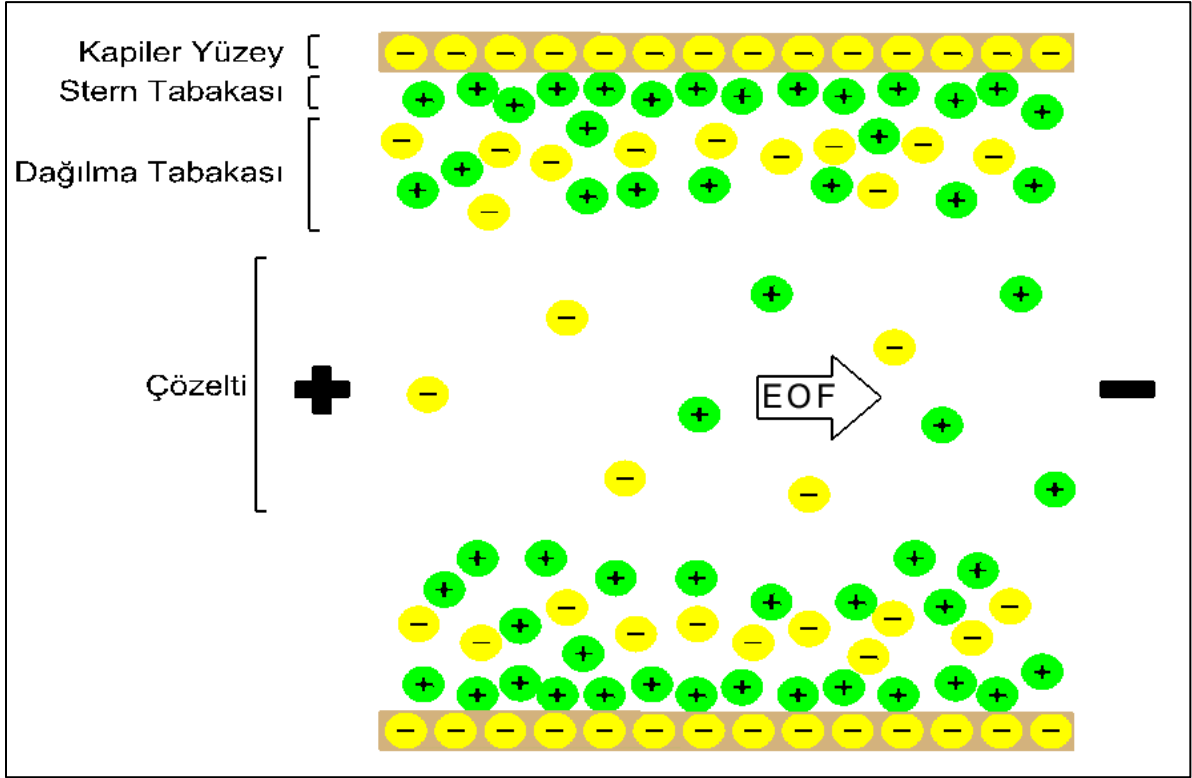
kapiler kolonda gerçekleşir. Kapiler borunun iki ucu arasında 5-30 kV'lık bir doğru akım potansiyeli uygulanarak ayırma işlemi yapılır [52].

Kapiler elektroforez cihazının basitleştirilmiş hali şekil 2.11' de görülmektedir [48].



Şekil 2.11. Kapiler elektroforez cihazının basitleştirilmiş hali.

Kapiler elektroforez metodunda kullanılan kapiler boruların içerisinde silikanın eritilip şekillendirilmesi sonucunda sayısızca silanol (Si-OH) grubu bulunur. Bu gruplar oldukça asidik gruplardır. Bu yapıları aktif hale getirmek için kolonun içerisinde sıklıkla potasyum hidroksit (KOH) veya sodyum hidroksit (NaOH) çözeltileri geçirilir. Bu çözeltilerle muamele edildiğinde silanol grupları proton vererek negatif yüklü (Si-O⁻) grupları haline gelirler. Silanol gruplarının aktif hale gelmesinden sonra tampon çözelti geçirilerek kolonun şartlanması sağlanır. Ardından kolona ayırma için bir akım uygulandığında elektro ozmotik (EOF) bir akış meydana gelir. Şekil 2.12' de elektro ozmotik akış oluşumu gösterilmiştir.

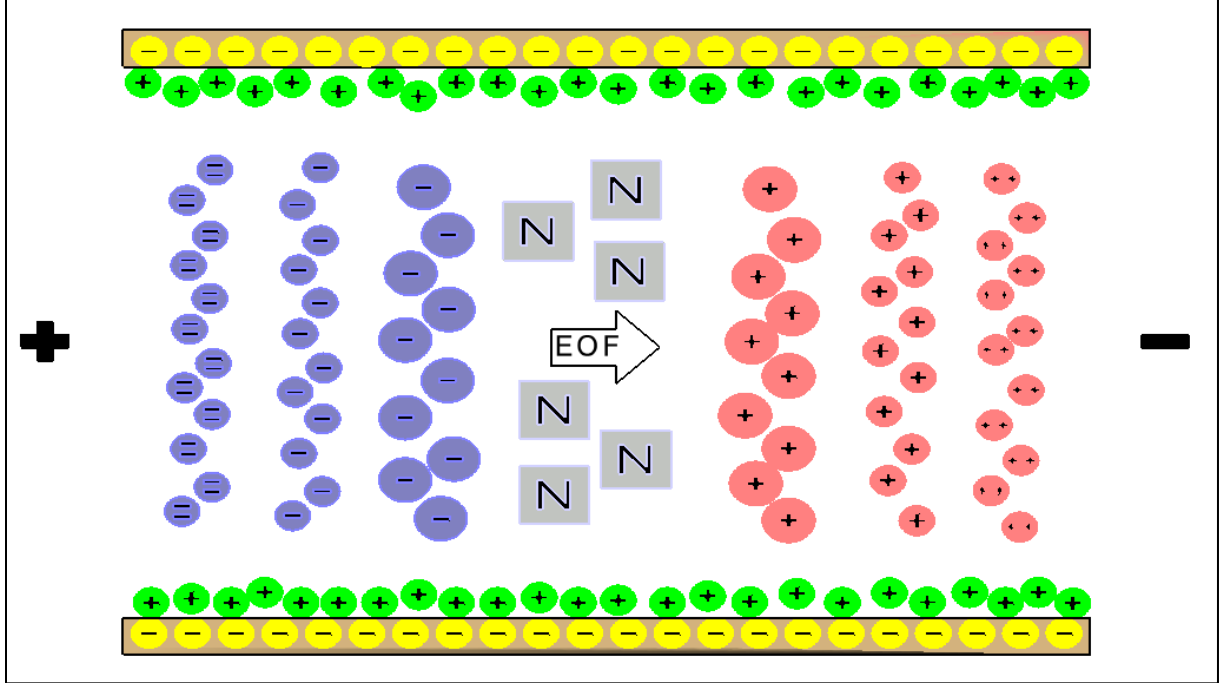


Şekil 2.12. Elektro ozmotik akış oluşumu.

Kapiler kolonun üzerine ilk olarak katyonca zengin gruplar gelir. Bunun sonucunda elektriksel çifte tabaka oluşur. Tabakalardan birisi borunun yüzeyindeki Si-O grubunun yüklerinden, diğeri bu eksi yüklerin hemen üstünde, bunları fazlaca nötralleştirecek sayıda pozitif yüklü iyonlardan meydana gelen diffüze tabakadır. Bu tabakanın üzerinde de kapiler kolona konulan çözeltinin tabakalaşmamış çözelti kısmı bulunur. Sisteme elektrik alan uygulandığında da bahsedilen bu kısımda bir hareketlilik meydana gelir. Katyonlar katoda, anyonlar anoda doğru göç etmeye çalışır. Ancak elektriksel çifte tabakadaki pozitif yük fazlalığından dolayı (pH' a bağlı) kapilerdeki tüm çözelti katoda doğru sürüklenir. Buradaki kolon içerisindeki hareketin hızı sisteme verilen elektrik potansiyeliyle doğru orantılı bir şekilde değişir [53-55].

EOF ile beraber örnekler yüklerine göre kolon boyunca ilerleyerek birbirinden ayrılırlar. İyonların buradaki göçme hızları yüklerine ve boyutlarına göre değişmektedir. Tamponda meydana gelen EOF, örneklerin elektroforetik mobilitelerinden oldukça hızlı olduğu için bu sistem akış yönünün tersine doğru hareket eden maddelerinde ayrılmasına olanak tanır. Yüksüz tanecikler elektro ozmotik akış ile aynı yönde hareket ederler. Bu sebeple bu yapılar sadece misel

elektrokinetik kapiler kromatografi metoduyla birbirinden ayrılırlar [56]. Şekil 2.13' de anyonik, katyonik ve yüksüz maddelerin kolon boyunca hareketi şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 2.13. Anyonik, katyonik ve yüksüz maddelerin kolon boyunca hareketinin şematik olarak gösterimi.

Burada anottan katoda doğru bir elektro ozmotik akış vardır. Kolondan önce fazla yüke sahip ve boyut olarak diğer katyonlara göre daha küçük olan katyonlar ayrılır. Katyonlardan sonra kolondan yüksüz maddeler geçer. Ancak burada yüksüz maddeler birbirinden değil sadece yüklü maddelerden ayrılırlar. Kapiler kolondan en son yüklü anyonlar ayrılır. Anyonların fazla yüklü ve küçük olanı da kolonu en son terk eden analittir.

Elektro ozmotik kuvvetin meydana getirdiği akış profili %99 oranında düzlemseldir. Kapiler olmayan kolonlarda ise hidrodinamik akıntıdan dolayı akış profili paraboliktir. Şekil 2.14' de elektro ozmotik akış ve hidrodinamik akış profilleri görülmektedir [51, 55, 57].



Şekil 2.14. HPLC ve CE akış profilleri.

Kapiler elektroforez yöntemi farklı şekillerde kullanılabilir:

- Kapiler Jel Elektroforez (CGE)
- Kapiler Zone Elektroforez (CZE)
- Kapiler İzotakofrez (CITP)
- Kapiler İzoelektrik Odaklama (CIEF)
- Kapiler Elektrokromatografi (CEC)
 - ✓ Dolgulu Kolon Kromatografi
 - ✓ Misel Elektrokinetik Kapiler Kromatografi (MECC) [9, 10, 58].

Hidrodinamik ve elektrokinetik uygulamanın bir arada olduğu kapiler elektrokromatografi analitleri ayırmak için en yaygın olarak kullanılan kapiler elektroforez yöntemidir [59].

2.4.1. Kapiler Elektrokromatografi

1949 yılında Shepard ve Tiselius elektriksel alan kullanarak, jel boyunca bileşikleri hareket ettirmişlerdir [60]. Elektriksel alanın ince tabaka kromatografisinde kullanımı da üç yıl sonra yayınlanan başka bir çalışmada yer almaktadır [61]. 1974 yılında Proterius ve ark. 1 mm çapındaki dolgulu kolonlarda elektrokromatografik bir uygulama gerçekleştirmişlerdir [62]. 1981 yılında Jorgensen ve Lukacs elektrokromatografik ayırmayı 10 µm çapındaki partiküllerle doldurulmuş 170 µm çaplı kapiler kolonlarda incelemiştirler [63]. 1987 yılında ise kapiler elektrokromatografide ilk kez açık borusal ve dolgulu kolonlar kullanılmıştır [64]. Kapiler elektrokromatografi, bugünkü kullanım şekli için uzun bir süreçten geçmiştir ve bu teknoloji gün geçtikçe daha da gelişerek devam etmektedir.

Kapiler elektrokromatografi yöntemi sıvı kromatografisinin bir özelliği olan yüksek seçicilik ile kapiler elektroforez yönteminin yüksek etkinliğinin birleşiminden oluşan elektrik sürücülü bir ayırma yöntemidir. Bu yöntemde kromatografik destek bir katı ve ayırmanın gerçekleştiği sıvı fazın bulunduğu kapiler kolona bir basınç ve akım uygulanarak ayırma işlemleri gerçekleştirilir [65, 66].

CEC sistemi kolonda durgun faz içermesinden dolayı kapiler elektroforez ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sistemlerine göre çok daha yüksek pik kapasitesine ve seçiciliğe sahiptir. Bu sistemlerde hareketli fazın miktarı oldukça azdır. Kısacası kapiler kolon içerisinde analitin ve hareketli fazın elektriksel alanla hareket etmesi prensibine dayanan bu yöntem CE sisteminin modifikasyonundan oluşmaktadır.

CEC sisteminde hareketli faz, sabit faz boyunca elektro ozmotik akış ile yürütülür. Elektro ozmotik hareketlilik μ_{eo} , Eşitlik 2.1'deki *Smoluchowski* denklemi ile hesaplanır:

$$\mu_{eo} = \varepsilon \varepsilon_0 \zeta / \eta \quad (2.1)$$

Burada ζ , yüzeyin zeta potansiyelini, η elektrolit viskozitesini, ε dielektrik sabitini, ε_0 ise vakumdaki dielektrik sabitini göstermektedir.

CE sistemlerinde elektro ozmotik akış kapiler kolondaki aktif hale gelen yani yüklenen duvar üzerindeki yüklerden kaynaklanırken, CEC sisteminde çoğunlukla partiküller üzerindeki yüklenmelerden elektro ozmotik akışa katkı sağlanır. CEC' de kullanılan partiküllerin tipi, çeşidi, silanol gruplarının ve diğer yüklü ligandların sayısı da elektro ozmotik akışı etkilemektedir. Elektro ozmotik akış, pH, iyonik güç ve organik modifiye ediciler ile kontrol edilmektedir [67].

Kapiler elektrokromatografide sıvı kromatografisine (LC) göre etkinliğin yüksek olması en önemli avantajdır. CEC ve LC' de Van Deemter grafikleri de birbiriyle farklılık göstermektedir. Çünkü, kapiler elektrokromatografide girdap oluşumu ve kanallar arasındaki akış farklılığı çok daha azdır. Ayrıca, sıvı kromatografide sabit fazı oluşturan partiküller akışı engellerken, kapiler elektrokromatografide elektro ozmotik akış partiküllerin yüzeyinde meydana geldiği için engellemezler. CEC

sistemlerinde kolon boyunca basınç düşüşünün olmaması ve LC sistemlerine göre kullanılan partikül boyutlarının da küçük olmasından dolayı daha uzun kolonları kullanmak mümkün olmaktadır. Kapiler elektrokromatografide kullanılan hareketli fazlar, akımı sürdürebilen elektrolitleri içerirler. Ayrıca hareketli fazda kullanılan organik modifiye edicilerin miktarı da sıvı kromatografisi ile karşılaştırıldığında daha fazladır.

Kapiler elektrokromatografide kullanılan detektörlerden birisi fotometrik detektörlerdir. Bu dedektör tipi uygulanma açısından ve basit oluşundan dolayı avantajlıdır. Ancak analit yapısının tayininde kullanılamamaktadır. CEC sisteminde bu tip dedektörler kullanıldığında HPLC sistemlerine göre 100 kat daha az duyarlıdır. CEC sistemlerinde dolaylı yollardan fotometrik dedektörler kullanılır. Bunlar; UV, floresans ve kütle detektörleridir. Mikromolar düzeylerdeki tayinlerde floresans tayin, UV tayinine göre 1-4 kat daha fazla duyarlıdır. Lazerle uyarılmış floresans dedektörler mikromolar düzeyindeki tayin limitini 10^{-16} M' a kadar indirebilmektedir [68].

Kapiler elektrokromatografi dolgulu kolon ve misel elektrokinetik kapiler kromatografi olmak üzere iki teknikten oluşmaktadır. Söz konusu olan bu tekniklerden misel elektrokinetik kapiler kromatografi daha çok çalışma alanı bulmuştur [10].

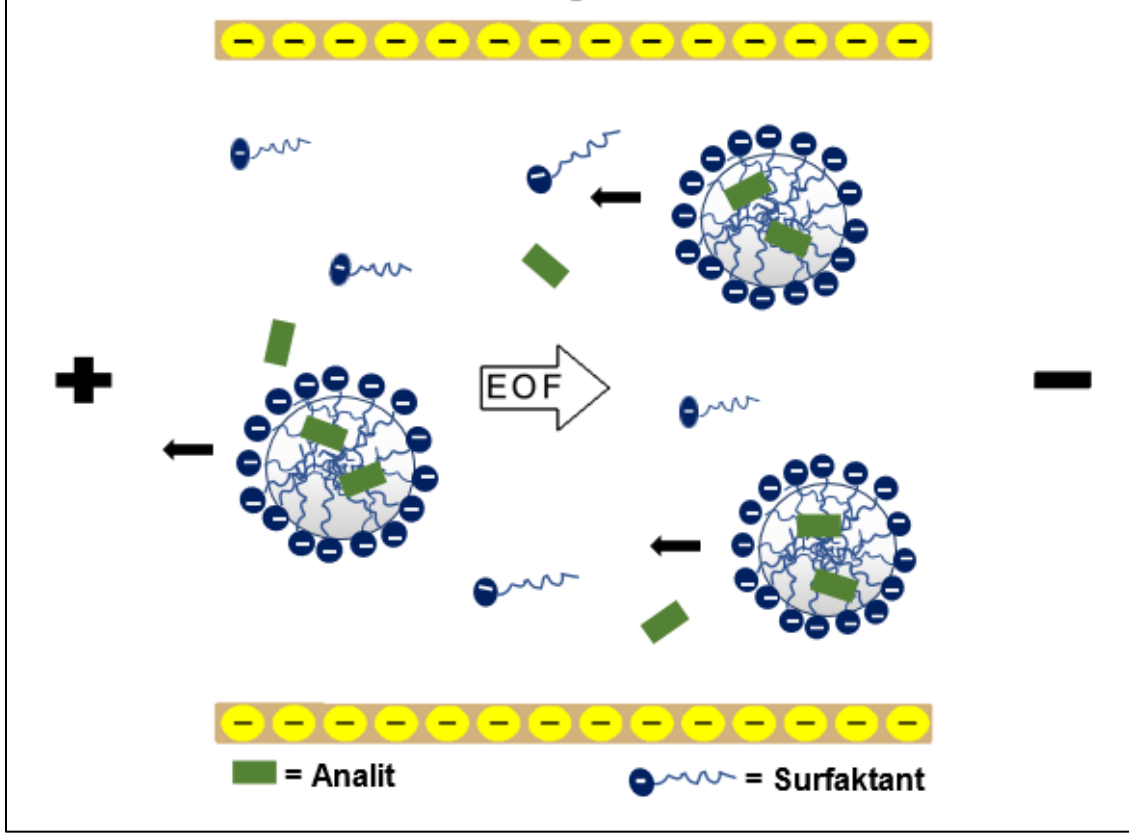
2.4.1.1. Misel Elektrokinetik Kapiler Kromatografi

Misel elektrokinetik kapiler kromatografi (MECC) yalancı sabit bir faz ve hareketli bir fazdan oluşan kapiler elektroforez yöntemlerinden biridir. İlk olarak 1984 yılında Terabe tarafından tanıtılmıştır [15, 69]. Bu yöntem yüklü taneciklerin yanı sıra yüksüz taneciklerinde ayrılmasına imkan vermektedir.

Fenoller [15], klorlanmış fenoller [70, 71], amino asitler [72], nükleozidler ve oligonükleotitler [73], nükleik asitler [74], vitaminler [75, 76], antibiyotikler [77], kiral bileşikler [78, 79], izotopik sübstitüentler [80], peptitler [81, 82], barbitüratlar [82] gibi çok çeşitli molekül tipleri MECC sistemi için uygundur.

MECC sisteminin ayırım mekanizması Şekil 2.15' de şematik olarak gösterilmiştir. İçi silika ile kaplı kapiler kolon kiritik misel derişiminin üzerinde misellerin oluşturduğu iyonik bir yüzey aktif madde çözeltisi ile doldurulur. Örneğin; sodyum

dodesil sülfat gibi iyonik bir yüzey aktif madde kullanıldığında miseller anota doğru hareket eder. Kapiler kolonun negatif yükünden dolayı elektro ozmotik akış ise anottan katota doğrudur.



Şekil 2.15. MECC sisteminde ayrımın şematik olarak gösterimi.

EOF nötr veya bazik koşullardaki misellerin elektroforetik göçünden daha büyüktür. Bu nedenle anyonik SDS misel geciktirilmiş bir süreyle katota doğru göç eder. pH 5.0' in altında asidik bir çözelti kullanıldığı zaman ise EOF, SDS misellerin elektroforetik hızından küçük olur ve misel anoda doğru göç eder [83].

Miseller polar olmayan hidrokarbon kısmın içerisinde adsorplayarak ikinci bir faz oluşturmaktadır. Bu şekilde apolar türler çözelti içinde çözünür hale gelmiş olur. Burada miseller kolonda çok yavaş hareket eden bir sabit faz olarak düşünülebilir. Misellerin bulunduğu kapiler elektrokromatografi de HPLC' ye göre verim daha iyidir. MECC' de ikinci fazı değiştirmek kolaydır. Sadece misel bileşenin değiştirilmesi yeterli olmaktadır [10].

2.4.1.1.1. Alıkonma Faktörü

Geleneksel kromatografi de olduğu gibi alıkonma faktörü k olarak tanımlanır;

$$k = (n_{mc} / n_{aq}) \quad (2.2)$$

Burada n_{mc} , misellerin içine katılmış analit miktarı ve n_{aq} da sulu çözeltinin etrafını saran analit miktarıdır. Bu durumda alıkonma faktörü ve göç zamanı arasındaki ilişki şu şekilde ifade edilebilir:

$$k = (t_R - t_0) / [t_0 (1 - t_R / t_{mc})] \quad (2.3)$$

Şu şekilde tekrar yazılabilir:

$$t_R = [(1+k) / 1 + (t_0/t_{mc}) k] \quad (2.4)$$

Eğer analit misel içine katılmazsa veya miselle etkileşime girmez ise, bu tür çözünenlerin göç zamanı t_0 ' a eşittir. Dolayısıyla $k=0$ dır.

Diğer bir yandan analit misellerin tamamıyla etkileşirse göç zamanı t_R olur ve k sonsuz büyüklükte olur. Bu nedenle göç zamanı t_0 ve t_{mc} arasında sınırlıdır.

t_{mc} sonsuz olduğunda veya misellerin kapiler kolondan çıkmadığı durumlarda, elektro ozmotik hızın mutlak değeriyle zıt yönde hareket eden misellerin elektroforetik hızı aynı olur ve Eşitlik 2.5 meydana gelir:

$$t_R = (1+k)t_0 \quad (2.5)$$

Bu durum geleneksel kromatografiyle aynıdır, yani göç zamanı parametresi sonsuza eşittir. t_0 sonsuza ulaştığında veya elektro ozmotik akış tamamen durdurulduğunda oluşan eşitlik aşağıdaki gibidir:

$$t_R = (1 + 1/k)t_{mc} \quad (2.6)$$

Bu durumda sulu faz kapiler kolondan asla dışarı çıkamaz. Sadece miseller sulu faz boyunca anoda doğru göç eder.

2.4.1.1.2. Ayırıcılık

MECC' de ayırıcılık Eşitlik 2.7' de ki gibi hesaplanabilir.

$$R_s = (N^{1/2} / 4) \times [(\alpha - 1) / \alpha] \times [k_2 / (1 + K_2)] \times [1 - (t_0/t_{mc})] / [1 + (t_0/t_{mc})k_1] \quad (2.7)$$

Burada N teorik plaka sayısını verir. k_1 ve k_2 sırasıyla analit 1 ve 2 nin alıkonma faktörleridir. k_2/k_1 ' de ayırma faktörü olan α ' ya eşittir.

Plaka sayısının karekökünün artışıyla ayırıcılık orantılı bir şekilde artmaktadır. Genellikle çoğu analit için plaka sayısı ortalama 10.0000-20.0000 arasındadır. Normalde, fazla joule ısınması olmadıkça yüksek voltaj uygulandığında, teorik plaka sayısı da o kadar yüksek olur. Çünkü misellerin difüzyon katsayısı düşük olduğundan, çözünenlerin sahip olduğu yüksek alıkonma faktörleri yüksek plaka numaralarını verir [83].

Bu sistemler için ayırıcılık farklı eşitlikler kullanılarak da hesaplanabilmektedir.

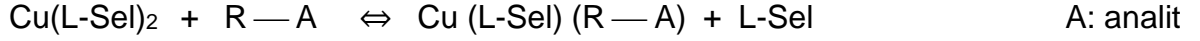
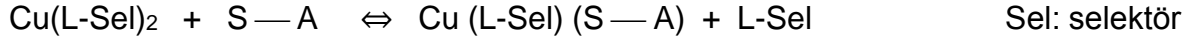
2.4.2. Ligand Değişim Kapiler Elektroforez (LECE)

Kromatografik yöntemlerin alt dallarından biri olan ligand değişim kromatografisi (LEC) kiraliteye göre ayırım sağlamaktadır. Bu yöntem ilk kez F.G. Helfferich tarafından ortaya atılmıştır [84].

Kiral tanıma, bir kiral seçici ligand ve analit ligandı arasındaki üçlü karışık metal komplekslerinin oluşumuna dayanır [85]. Burada kompleks oluşturan iyon; iyonik, kovalent ya da koordinasyon bağlarıyla kararlı faza bağlanmıştır. Bu bağlanmadan sonra bazı koordinasyon uçları serbest kalmaktadır. Bu durumda ligandlar koordine bağ yapan metal ile birleşebilir. Bu yapıya sahip ligand değiştiriciler, ayrılması zor veya mümkün olmayan amino asit veya benzer organik yapıların ayrılmasında kullanılır [86].

Kiral ligand değişim kromatografisi (LEC) Davankov ve Rogozhin tarafından 1970 yılının başlarında tanıtılmıştır [17]. Bu orijinal LEC fazları klorometilat polistirene bağlı L-prolin (L-Pro) kalıntılarına dayandırılmıştır. Kompleksleştirici ajan olarak Cu(II) ve diğer metal iyonlarının kullanımıyla, amino asit enantiyomerleri olağanüstü bir ayırma faktörüyle ayrılmıştır. Ligand değişim (LE) ayırma mekanizması analit ve

kiral selektör ligandı arasında diastomerik üçlü maddenin oluşumuna dayanır. Ayırım iki karışık kompleksin analit enantiyomerleriyle karmaşık stabilite sabitlerinin farkından kaynaklanmaktadır. Devam eden denge aşağıdaki gibi açıklanır [87]:



Ligand değişim kapiler elektroforez yöntemiyle yapılan bazı çalışmalarda kullanılan selektör ligandlar, metal iyonu ve ayrılan analitler Çizelge 2.4' de verilmiştir.

Kiral LE prensibi, CE' de elektrolite katkı maddesi olarak kiral selektör-metal kompleksi kullanımıyla olur. İlk olarak CE' de bu tekniğin uygulanması Zare'nin grubu [18] tarafından dns- amino asitlerin kiral ayırımı için L-histidin-Cu(II) ve aspartam-Cu(II) komplekslerinin kiral selektör olarak kullanımıyla bildirilmiştir [88]. Yazarlar, sodyum tetradesil sülfat (STS) gibi misel oluşturan yüzey aktif madde eklendiğinde ayırımın iyileştiğini gözlemlemişlerdir. Cu(II) yerine Co(II) kullanımıyla enantiyo seçiciliğin kaybolduğunu da göstermişlerdir.

Siklodekstrinler de kapiler elektroforez sisteminde kiral ilaçların ve diğer bileşiklerin enantiyomerik ayırımı için başarılı bir şekilde kullanılır. Siklodekstrin basit moleküler geometri terimlerinde kesik silindirik bir koni olarak tanımlanan siklik bir oligosakkarittir. Hidrofilik bir dış yüzeye ve hidrofobik bir iç kaviteye sahiptir [89]. Ayrıca siklodekstrinin modifiye olmuş haliyle de bazı amino asit türlerinin misel elektrokinetik kapiler kromatografi yöntemiyle ayrıldığı çalışmalar mevcuttur [90].

Çizelge 2.4. Ligand değişim kapiler elektroforez yöntemiyle yapılan bazı çalışmalarda kullanılan selektör ligandlar, metal iyonu ve ayrılan analitler.

| Selektör Ligand | Metal İyonu | Ayrılan Analitler | Referanslar |
|--|-------------|---------------------------------------|-------------|
| L-lizin | Cu(II) | Amino asiter | [91] |
| N-(2-hidroksioktil)-L-4- hidroksipirolin)HO-L-hpro | Cu(II) | Sempatomimetik ilaçlar | [92] |
| L-Histidin | Cu(II) | Amino asitler | [93] |
| L-Arjinin | Cu(II) | Dns-amino asitler | [94] |
| Aspartam | Cu(II) | Dns-amino asitler Hidroksi asitler | [88, 95-97] |
| N,N-didesil-L-Alanin | Cu(II) | Dns-amino asitler | [98, 99] |
| L-Histidin | Cu(II) | Dns-amino asitler | [18] |
| L-İzolösin | Cu(II) | Amino asitler | [100] |
| N-(2-hidroksioktil)-L-4- hidroksipirolin | Cu(II) | Amino asitler | [101, 102] |

3. Materyal ve Yöntem

Tez kapsamında yapılmış olan deneysel çalışmalar aşağıda maddeler halinde özetlenmiştir;

- L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksinin hazırlanması için uygun amino asit-metal oranının belirlenmesi, kompleksin oluşturulması ve karakterizasyonu,
- Kritik misel derişiminin akım yoğunluğu ölçüm yöntemiyle belirlenmesi,
- Farklı derişimlerde SDS ve SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin hazırlanması ve karakterizasyonu,
- Kapiler kolon yüzeyinde silanol gruplarının oluşturularak kolonun aktivasyonunun sağlanması ve enantiyometrik ayırım için uygun hale getirilmesi,
- Enantiyometrik ayırma; akımın, basıncın, organik çözücünün, farklı SDS derişiminin, ampisilin enantiyomerlerinin farklı mol oranlarının ve farklı tampon çözelti pH'ının etkisini incelemek üzere ayırım koşullarının belirlenmesi,
- D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımı için kullanılan elektrolit çözeltisinin tekrar kullanılabilirlik çalışmalarının yapılması,
- Piyasada satılan Alfasilin antibiyotiğinin SDS bazlı SDS-L-Lys-Cu⁺² miseller ile kinetik analizinin yapılması.

3.1. Kromatografik Analiz Sistemleri

Enantiyomerik ayırım için analizler CEC sistemi (Prince CEC-760, Hollanda) ile yapılmıştır. Diyot array dedektör (DAD), UV lamba ve elektriksel güç sağlayıcısı içeren cihaz Şekil 3.1' de görülmektedir. Ayrıca analizler için uzun kapiler mod sistemi kullanılarak metodlar uygulanmış ve bu yöntem analiz yöntemi olarak seçilmiştir.



Şekil 3.1. Kapiler Elektrokromatografi sisteminde kullanılan Prince CEC-760 cihazı.

3.2. Kimyasal Malzemeler ve Materyal

Tez çalışmaları, Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı Laboratuvarı' nda yürütülmüştür. D-Ampisilin (D-Amp) Sigma Aldrich, L-Ampisilin (L-Amp) ise Molcan firmasından temin edilmiştir. L-Lizin monohidroklorür (L-Lys), sodyum dodesil sülfat (SDS), bakır sülfat pentahidrat ($\text{Cu}(\text{SO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), asetonitril (ACN), potasyum dihidrojen fosfat (KH_2PO_4), sodyum hidroksit (NaOH), asetik asit (CH_3COOH) ve analitik saflığa sahip olan diğer kimyasallar Merck' den alınmıştır. Deneysel boyunca kullanılmış olan cam malzemeler, 4.0 M nitrikasit çözeltisi ile yıkandıktan sonra kullanılmıştır.

Enantiyometrik ayrımlar için kullanılan kapiler kolonlar (Polymicro Technologies Capillary Tubing) Molex firmasından satın alınma yoluyla temin edilmiştir.

Deneysel olarak kullanılan su, yüksek akışlı selüloz asetat membran (Barnstead D2731) ile ters ozmoz Barnstead (Dubuque, IA) ROpure LP® birimi ve ardından Barnstead D3804 NANOpure® organik/kolloid uzaklaştırma birimi ve iyon değiştirici dolgu kolon sistemi kullanılarak saflaştırılmıştır. Elde edilen saf suyun (deiyonize su) direnci 18 M Ω /cm' dir.

3.3. UV-VIS Spektroskopi Yöntemi ile Ligand:Metal iyon (L-Lys:Cu²⁺) Oranının Belirlenmesi

Ultraviyole ve görünür bölge (UV-Vis) spektrumu, L-Lizin ligandı ve Cu²⁺ metal iyonunun %70 ACN ve %30 KH₂PO₄ içeren çözeltide oluşturduğu kompleksin mol oranı optimizasyonu için, oluşturulan kompleksin $\lambda=190-800$ nm dalga boyu aralığında SHIMADZU UV-1601 spektrofotometre cihazı kullanılarak taranmasıyla elde edildi. Kullanılan cihaz Şekil 3.2' de görülmektedir. Optimum amino asit-metal oranının belirlenmesi için alınan mol oranları ise Çizelge 3.1' de görülmektedir.



Şekil 3.2. UV-VIS spektrofotometre cihazı (SHIMADZU UV-1601).

Çizelge 3.1. L-Lys:Cu²⁺ kompleksinin hazırlanmasında kullanılan mol oranları.

| Oran (L-Lys:Cu ²⁺) | L-Lys miktarı (mmol) | Cu ²⁺ miktarı (mmol) |
|--------------------------------|----------------------|---------------------------------|
| 1:1 | 0.1 | 0.1 |
| 2:1 | 0.2 | 0.1 |
| 3:1 | 0.3 | 0.1 |

3.4. L-Lys-Cu²⁺ Amino Asit-Metal Kompleksinin Hazırlanması

Bakır iyonu (Cu²⁺) ve L-Lys amino asidinin oluşturduğu L-Lys:Cu²⁺ kompleksi pH 10.' da hazırlanmıştır. Kuvvetli baz eşliğinde (NaOH) amino asidin deprotonasyonu sağlanmış, CuL₂·nH₂O kompleksi ligand olarak L-Lys' nin kullanılmasıyla

gerçekleştirilmiştir. Kompleks literatüre uyumlu olarak şu şekilde hazırlanmıştır [103]. 2 mmol L-Lizin amino asidi 5 mL deiyonize suda ısıtılarak çözülmüştür. Amino asidin deprotonizasyonu için 0.33 mL %30 luk NaOH çözeltisi amino asit çözeltisine eklenmiştir. 1 mmol metal tuzu $\text{Cu}(\text{SO}_4) \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ içeren 2 mL çözelti deprotone olmuş amino asit çözeltisine eklenmiştir. Çözeltide oluşan mavi renkli kompleks Şekil 3.3' de görülmektedir. Sonrasında kompleksteki NaOH' ın fazlasını uzaklaştırmak için kompleks süzölmüş ve liyafilizatörde çözücüsü uzaklaştırılmıştır. Sonrasında su ile yıkanarak vakum etüvünde 24 saat kurutulmuştur.



Şekil 3.3. Amino asit-metal kompleksinin oluşmasıyla meydana gelen renk oluşumu.

3.5. L-Lys ve L-Lys- Cu^{+2} Kompleksinin Karakterizasyonu

3.5.1. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi

L-Lys ve hazırlanan L-Lys- Cu^{+2} kompleksinin yapısı Fourier dönüşümlü infrared spektrofotometresi-zayıflatılmış toplam yansıma (FTIR-ATR) (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) kullanılarak çekilmiştir. Örneklerin FTIR-ATR spektrumlarının elde edilmesi için 2.0 mg örnek, 98.0 mg KBr ile karıştırılarak havanda dövülmüş ve hidrolik preste 600 kg/cm^2 basınçta yaklaşık olarak 10 dakika bekletilerek ince bir tablet haline getirilmiştir. Hazırlanmış olan tabletlerin $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ dalga sayısı aralığında FTIR-ATR spektrumu alınmıştır.

3.5. Akım Yoğunluğu Yöntemiyle Kritik Misel Derişiminin Belirlenmesi

Kapiler elektrokromatografi sistemi (CEC prince 760) kullanılarak kritik misel derişimi (CMC) akım yoğunluğu sistemi yöntemi ile bulunmuştur. CMC' yi belirlemek üzere 2.0, 3.0, 5.0, 8.0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 mM derişime sahip sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltileri, 10 mM amonyum asetat tamponu ile 20 mL

olarak hazırlanmıştır. Çözeltilerin hazırlanması, SDS eklendikten sonra 10 dk manyetik karıştırıcıda karıştırılması şeklinde gerçekleştirilmiştir. Ardından çözeltide oluşan misellerin boyutlarının eşit olması için ise homojenizatör ile düşük rpm hızında (6000 rpm) 10 dk boyunca homojenize edilmesi sağlanmıştır. Tüm çözeltiler kullanımdan önce sonikatör ile dispers edilmiştir. Amino asit-metal kompleksiyle birlikte kullanımı için de aynı çözeltilerden ikişer tane hazırlanmıştır.

SDS bazlı çözeltilere 10 mM derişimde olacak şekilde L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi eklenerek SDS-L-Lys-Cu⁺² misel kompleks çözeltilerinin kritik misel derişimi bulunmuştur. SDS çözeltilerine amino asit-metal kompleksi eklenmesiyle çözeltiler önce manyetik karıştırıcıda 10 dk karıştırılmış ve sonrasında ise düşük rpm hızında (6000 rpm) 10 dk süre ile homojenize edilmiştir.

Hazırlanan çözeltilerden 3' er mL giriş ve çıkış tamponlarına alınarak sırasıyla 10 kV elektrik alan uygulanmıştır. Derişime karşı çizilen akım (μ A) grafiğinden SDS ve SDS-L-Lys-Cu⁺² içeren çözeltilerin kritik misel derişimi bulunmuştur.

3.6. Farklı Derişimlerde SDS Misel ve SDS-L-Lys-Cu⁺² Misel Kompleks Çözeltilerinin Hazırlanması

Kritik misel derişimini hesaplamak için hazırlanan 10, 25 ve 50 mM derişiminde SDS içeren çözeltiler karakterizasyon çalışmaları için seçilmiş ve farklı karakterizasyon yöntemlerinde kullanılmışlardır.

SDS bazlı çözeltilerin zeta potansiyellerini hesaplamak için, kritik misel derişimini belirlemede kullanılan çözeltiler ile birlikte 55, 60, 65 ve 70 mM SDS derişimindeki çözeltiler hazırlanarak kullanılmıştır.

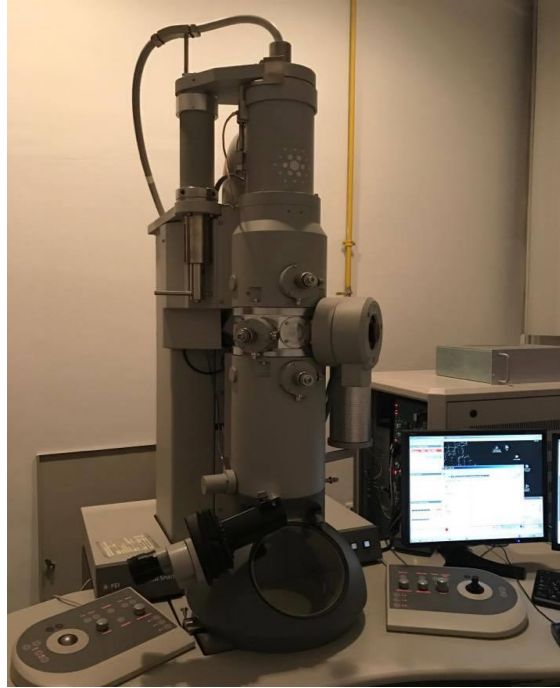
Kritik misel derişimini belirlemede kullanılan 10, 25 ve 50 mM SDS derişimindeki ve 10 mM L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi içeren çözeltiler karakterizasyon için seçilmiş ve farklı karakterizasyon çalışmalarında kullanılmışlardır. Hazırlanan SDS-L-Lys-Cu⁺² misel kompleks çözeltileri kullanılmadan önce sonikatör ile dispers edilmiştir.

3.7. SDS Misellerinin ve SDS L-Lys-Cu²⁺ Misel Komplekslerinin Karakterizasyon Çalışmaları

Hazırlanan SDS misellerinin ve SDS-L-Lys-Cu²⁺ misel komplekslerinin karakterizasyon çalışmaları yüksek kontrastlı geçirimli elektron mikroskobu (CTEM) ve zeta boyut ve potansiyel analizörü kullanılarak yapılmıştır. Ayrıca SDS-L-Lys-Cu²⁺ misel komplekslerinin parçacık boyutu dağılımları dinamik ışık saçılım spektrometresi kullanılarak doğrulanmıştır.

3.7.1. Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskobu (CTEM)

Hazırlanan SDS misellerinin ve SDS-L-Lys-Cu²⁺ misel komplekslerinin mikroyapısal morfolojik karakterizasyonlarını yapabilmek için görüntüler Lantan hekzaborür (LaB₆) elektron tabancasına sahip, 20-120 kV aralığından hızlandırıcı voltaj ile çalışabilen FEI marka Tecnai G² Spirit Biotwin model yüksek kontrastlı geçirimli elektron mikroskobu (CTEM) ile alınmıştır. Özel lens konfigürasyonuna sahip düşük kontrast veren numunelerde maksimum kontrast elde etmek için tasarlanmış olan cihaz Şekil 3.4' de görülmektedir.



Şekil 3.4. Hazırlanan SDS misellerinin ve SDS-L-Lys-Cu²⁺ misel komplekslerinin mikroyapısal morfolojik karakterizasyonlarını yapabilmeye kullanılan yüksek kontrastlı geçirimli elektron mikroskobu (CTEM).

3.7.2. Zeta Boyut ve Potansiyel Analizleri

Hazırlanan misellerin boyut ve potansiyel analizleri Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) ile yapılmıştır. Analizde deiyonize suyun yoğunluğu; 0.88 mPa.s ve refraktif indeks; 1.461 olarak kullanılmıştır.

Zeta boyut analizi için; hazırlanmış olan misel çözeltilerinin 3 mL' si hücreye alınarak, analizörün örnek haznesine yerleştirilmiş ve ışık saçılmaları 90° lik bir geliş açısıyla oda sıcaklığında tayin edilmiştir. Işık saçılma sinyalleri kullanılarak partikül sayısı hesaplanmıştır. Her bir ölçüm üç kez tekrarlı olarak gerçekleştirilmiştir.

Zeta potansiyel analizi için ise; hazırlanmış olan SDS ve SDS-L-Lys-Cu²⁺ misel çözeltilerinden enjektör ile alınarak potansiyel ölçümü yapabilecek olan elektrotların olduğu zeta potansiyel ölçüm hücresine koyulmuştur. Daha sonra hücre, analizörün örnek haznesine yerleştirilmiştir. Şekil 3.5' de ölçümlerde kullanılan zeta boyut ve potansiyel analizörü görülmektedir.



Şekil 3.5. SDS miselleri ve SDS-L-Lys-Cu²⁺ misel komplekslerinin ortalama partikül boyutunun ölçümünde kullanılan zeta boyut ve potansiyel analizörü.

3.7.3. Dinamik Işık Saçılım Spektroskopisi (DLS)

SDS-L-Lys-Cu²⁺ misel komplekslerinin ortalama partikül boyutunun ölçümünde kullanılan dinamik ışık saçılımı spektrometresi (Malvern CGS-3 markalı) ile zeta boyut ölçümleri kontrol edilmiştir. Cihaz ALV/CGS-3 kompakt ganyometre sistemine sahiptir. Kompakt ganyometre sistemi Helyum-Neon lazer ışık kaynağı ve buna bağlı olan fiber optik dedektörünü içermektedir. Cihazın teknik özellikleri; molekül

ağırlığı aralığı: 10^2 - 10^{12} Dalton, gonyometre açısı aralığı: 15° - 150° ve sıcaklık aralığı 25°C - 60°C ' dir.

3.8. D,L Ampisilinin Enantiyometrik Ayırımında Kullanılan Kapiler Kolonun Hazırlanması ve Enjeksiyon Koşulları

100 μm iç çaplı (I.D 100 μm) 362 μm dış çaplı (O.D 362 μm) olan ve 42 cm etkin uzunluğa sahip 50 cm uzunluğundaki kapiler kolon ilk kullanımda 1.0 M NaOH çözeltisi ile 10 dk. ve deiyonize su ile 10 dk. boyunca muamele edilerek kolon yüzeyleri silanol gruplarına dönüştürülmüş ve kolonun aktivasyonu sağlanmıştır. Gün başlarında 1.0 M NaOH çözeltisi 5.0 dk, saf su 5.0 dk. ve tampon çözelti 5.0 dk. boyunca kolondan geçirilerek sırasıyla kolonun aktivasyonu ve dengelenmesi sağlanmıştır. Enjeksiyon aralarında ise sırasıyla, deiyonize su 2.0 dk, 0.1 M HNO_3 2.0 dk, deiyonize su 2.0 dk, 0.1 M NaOH 2.0 dk, deiyonize su 2.0 dk [91] ve tampon çözelti ise 2.0 dk boyunca kolondan geçirilmiştir.

Örnek alımı enjeksiyonları hidrodinamik olarak 0.5 psi (34 mbar) basınçta 5 saniye olarak yapılmıştır. Enantiyometrik ayırımlar için ise 254 nm' de farklı akım ve basınçlar kullanılarak optimum akım ve basınç belirlenmiştir.

3.9. Enantiyometrik Ayırım için Analiz Koşulları

Yapılan tüm enantiyomerik ayırım işlemlerinde kullanılan tampon çözeltilerin pH ayarlaması 1.0 M amonyak ve 1.0 M asetik asit kullanılarak yapılmış ve tüm analizlerde tampon çözeltiler kullanılmadan önce 0.45 μm gözenek boyutuna sahip filtre ile süzölmüştür [91].

3.9.1. Ayırma Tampon Çözelti pH' ının Etkisini İnceleme

Farklı pH' larda hazırlanmış olan 25 mM SDS derişimi ve 10 mM L-Lys- Cu^{+2} amino asit-metal kompleksinden oluşan misel kompleks çözeltisiyle ayırma pH' ın etkisi incelenmiştir. Bu etkiyi araştırmak üzere kullanılan çözeltiler Çizelge 3.2' de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. pH etkisini gözlemlemek için kullanılan elektrolit (tampon) çözeltilerin bileşimi.

| Elektrolit görevi gören tampon çözelti içeriğinin farklı pH' lardaki bileşimleri | | | |
|--|-------------------------------|--------------------------|-----|
| SDS (mM) | L-Lizin-Cu ⁺² (mM) | NH ₄ OAc (mM) | pH |
| 25 | 10 | 10 | 7.0 |
| 25 | 10 | 10 | 8.0 |
| 25 | 10 | 10 | 9.0 |

3.9.2. Ayrıma SDS Derişiminin Etkisini İnceleme

SDS ve L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksinin etkileştirilmesi sonucu oluşan SDS-L-Lys-Cu⁺² misel kompleks çözeltileriyle enantiyometrik ayrıma farklı SDS derişimlerinin etkisi incelenmiştir. Elektrolit görevi gören tampon çözelti içeriğinin farklı SDS derişimlerindeki bileşimi Çizelge 3.3' de görülmektedir.

Çizelge 3.3. SDS derişiminin etkisini gözlemlemek için kullanılan elektrolit (tampon) çözeltilerin bileşimi

| Elektrolit görevi gören tampon çözelti içeriğinin farklı SDS derişimlerinde ki bileşimleri | | | |
|--|-------------------------------|-------------------------|-----|
| SDS (mM) | L-Lizin-Cu ⁺² (mM) | NH ₄ OAc(mM) | pH |
| 5.0 | 10 | 10 | 9.0 |
| 10 | 10 | 10 | 9.0 |
| 25 | 10 | 10 | 9.0 |
| 50 | 10 | 10 | 9.0 |

3.9.3. Ayrıma Uygulanan Elektrik Alanının Etkisini İnceleme

Enantiyomerik ayrıma uygulanan elektrik alanının etkisini belirlemek için 25 mM SDS, 10 mM L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi ve 10 mM NH₄OAc ile hazırlanmış olan tampon çözeltiliye 100 mbar basınçta sırasıyla 5, 10 ve 15 kV voltaj uygulanmış ve uygulanan elektrik alanı sonucu oluşan akımın ayrıma etkisi incelenmiştir.

3.9.4. Ayrıma Basıncın Etkisini İnceleme

Enantiyometrik ayrıma uygulanan basıncın etkisini incelemek üzere 25 mM SDS, 10 mM L-Lys-Cu⁺² amino asit- metal kompleksi ve 10 mM NH₄OAc karışımından oluşan misel komplekslerinin bulunduğu tampon çözeltilere 10 kV akımda sırasıyla 0, 50 ve 100 mbar basınç uygulanmıştır.

3.9.5. Ayrıma Organik Çözücünün Etkisini İnceleme

Enantiyometrik ayrıma organik çözücü derişiminin etkisini gözlemlemek üzere SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin bulunduğu çözeltilere farklı miktarlarda ACN eklenmiştir. Bu etkiyi araştırmak üzere kullanılan miktarlar Çizelge 3.4' de verilmiştir.

Çizelge 3.4. Organik çözücü etkisini gözlemlemek için kullanılan elektrolit (tampon) çözeltilerin bileşimleri.

| Elektrolit görevi gören tampon çözelti içeriğinin farklı organik çözücü oranlarındaki bileşimleri | | | | |
|---|-------------------------------|-------------------------|-----|--------------------|
| SDS (mM) | L-Lizin-Cu ⁺² (mM) | NH ₄ OAc(mM) | pH | Organik Çözücü (%) |
| 25 | 10 | 10 | 9.0 | 0 |
| 25 | 10 | 10 | 9.0 | 15 |
| 25 | 10 | 10 | 9.0 | 30 |

3.9.6. D-Ampisilin ve L-Ampisilin Oranlarının Ayrıma Etkisini İnceleme

Enantiyometrik ayrımlarda D-Ampisilin ve L-Ampisilinden (1:1) oluşan örneklerin derişimi mg/mL olarak kullanılmıştır. İki enantiyomerin oranlarının değiştirilmesiyle enantiyometrik ayırım incelenmiştir. Kullanılan oranlar D-Amp:L-Amp 1:1, 2:1 ve 3:1 dir.

3.9.7. Enantiyomer Türünün Tespit Edilmesi

Enantiyometrik ayrımlarda enantiyomer türünün tespit edilmesine yönelik yapılan analizlerde 25 mM SDS, 10 mM L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi bulunan 10 mM NH₄OAc çözeltisi kullanılmış ve sisteme 1 mg/mL derişimine sahip D-Ampisilin örneği verilerek analiz gerçekleştirilmiştir.

3.9.8. Tekrar Kullanılabilirliğin İncelenmesi

Enantiyometrik ayrımların tekrarlanabilirlik çalışmaları için 25 mM SDS, 10 mM L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi, 10 mM NH₄OAc den oluşan tampon çözeltisi ile D,L Amp örneğinin 10 kV' da 100 mbar basınçtaki ayrımları 4 kez tekrarlanmıştır.

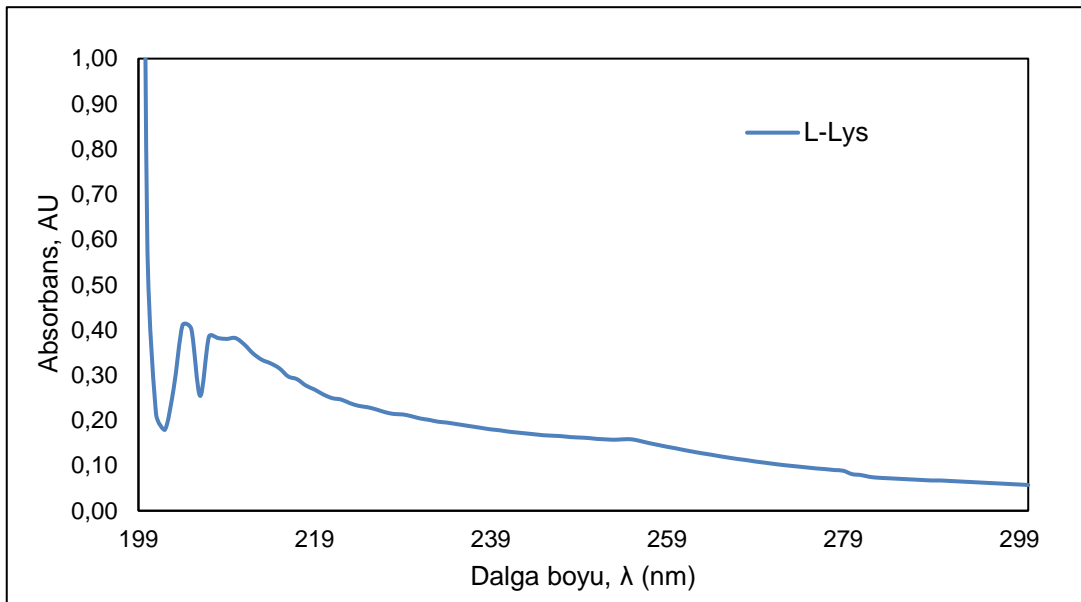
3.9.9. Gerçek Örnekten Analizler

Piyasada satılan Alfasilin antibiyotiğinin enantiyomerik saflığının kontrolü için bir kapsülü havanda ezilmiş ve içerisine 10 mL NH₄OAc eklenerek karıştırılmıştır. Sonrasında özelti 100 kat seyreltilerek analizlerde örneğ olarak kullanılmıştır.

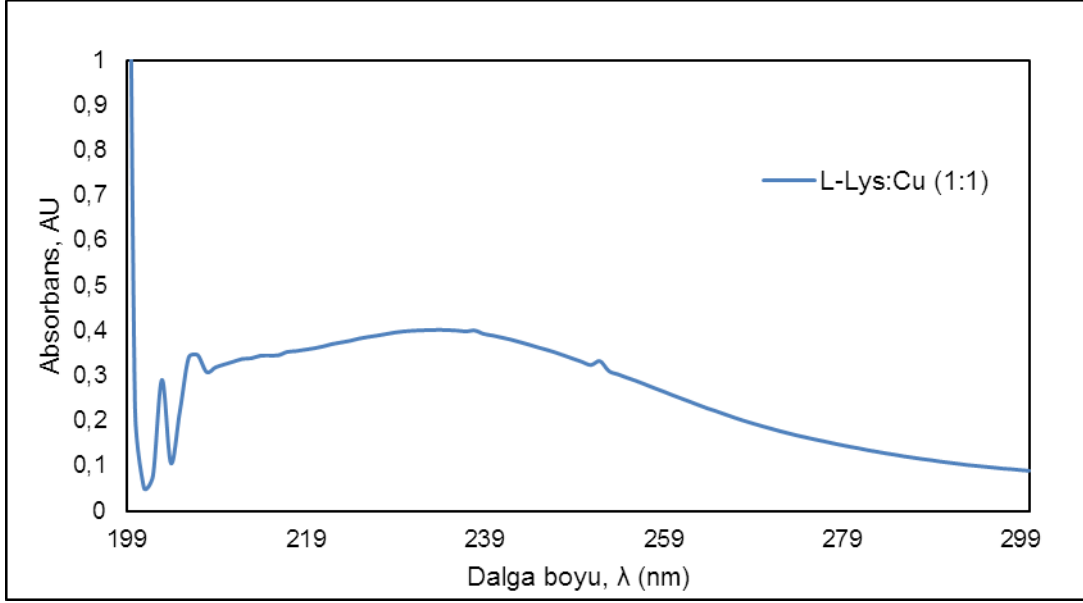
4. BULGULAR

4.1. L-Lys-Cu²⁺ Amino asit-Metal Kompleks Oranının Belirlenmesi ve Optimizasyonunun Yapılması

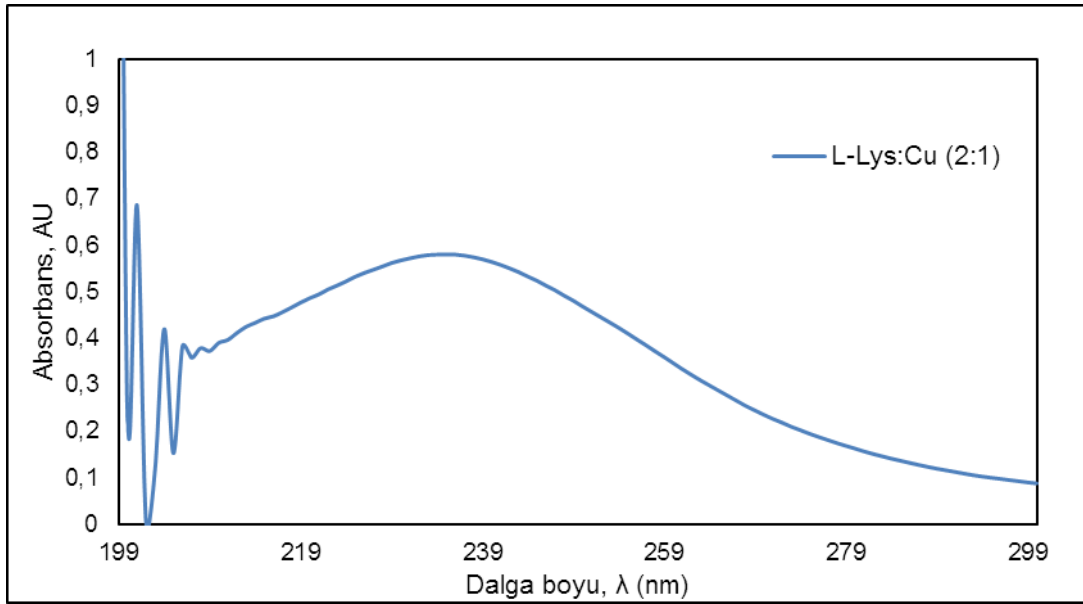
Cu²⁺ metal iyonunun amino asitlere bağlanarak kompleks oluşturduğu bilinmektedir. Bu amaçla amino asit-metal kompleks optimizasyonu için L-Lys amino asidi ve Cu²⁺ iyonunun organik faz içeren sulu çözeltide (%30 ACN, %70 K₂HPO₄) 1:1; 2:1 ve 3:1 mol oranlarında [Cu(L)₂] kompleksi oluşturuldu. Cu(SO₄)₂.5H₂O bakır tuzu metal iyon kaynağı olarak kullanılırken, L-Lys amino asidi ise ligand olarak kullanıldı. Şekil 4.1 L-Lys amino asidine ait UV-VIS spektrumunu gösterirken, Şekil 4.2, 4.3 ve 4.4 farklı lizin oranlarında elde edilen UV-VIS spektrumlarını göstermektedir. Şekil 4.5' de ise L-Lys ve L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksinin UV-VIS spektrumları birlikte gösterilmiştir. UV spektrumlarında 237 nm' de oluşan sinyal C=O bağındaki Cu²⁺ iyonu ile koordinasyon sonucu olan eşleşmemiş elektronlara ait n-π* geçişlerine aittir [104]. Şekil 4.5' de görüldüğü üzere 2:1 L-Lys:Cu²⁺ oranından sonra kayda değer bir sinyal değişikliği olmadığı için bu oran maksimum L-Lys:Cu²⁺ oranı olarak tespit edilmiş ve sonraki çalışmalar için bu oran kullanılmıştır.



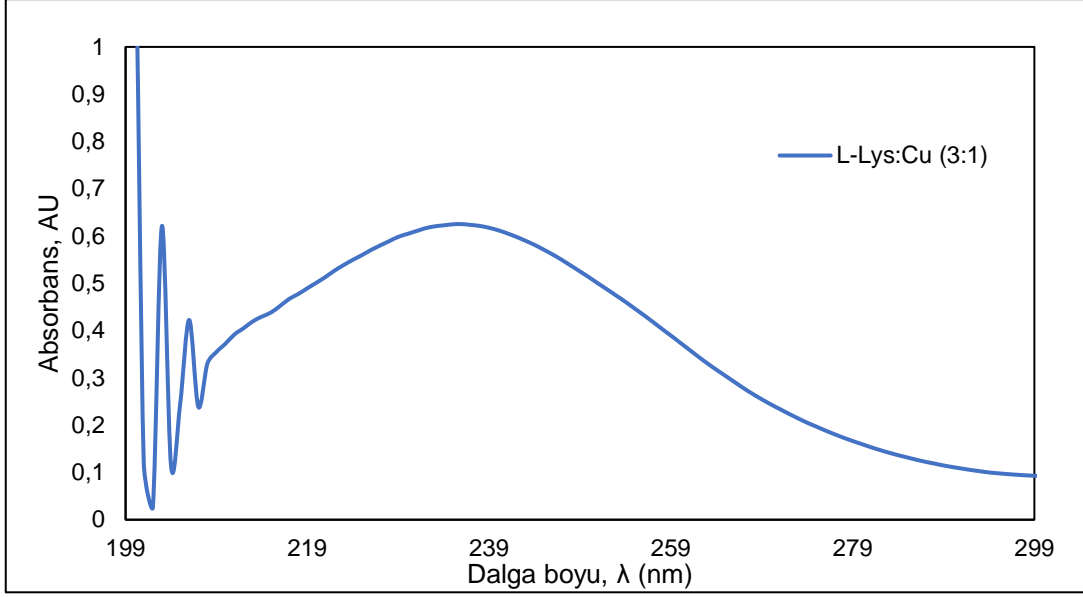
Şekil 4.1. L-Lys amino asidinin spektrofotometrik ölçümü.



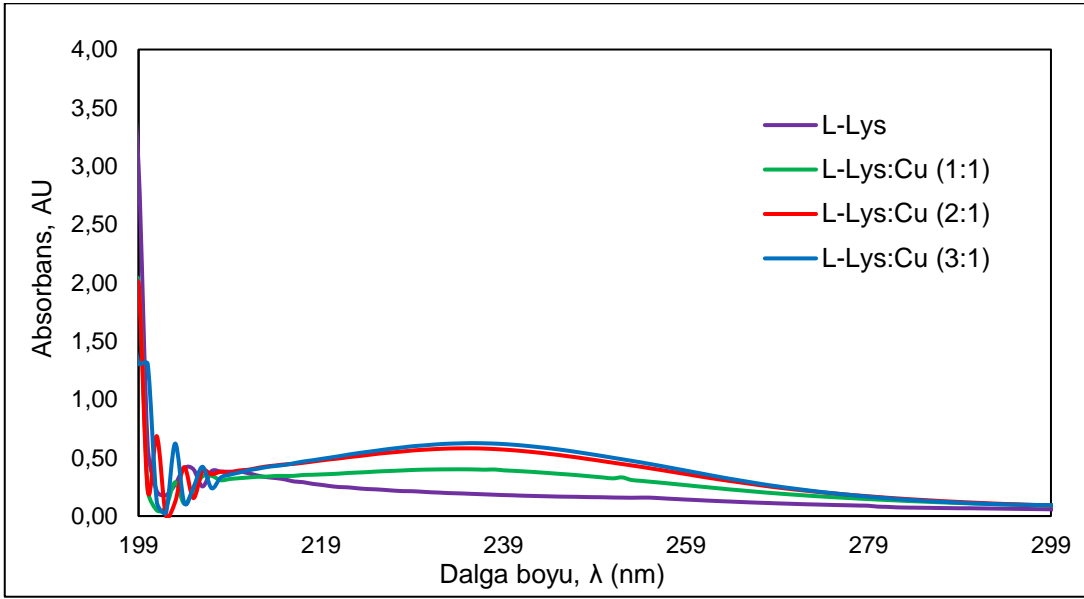
Şekil 4.2. L-Lys:Cu²⁺ amino asit-metal kompleksinin 1:1 mmol oranındaki spektrofotometrik ölçümü.



Şekil 4.3. L-Lys:Cu²⁺ amino asit-metal kompleksinin 2:1 mmol oranındaki spektrofotometrik ölçümü



Şekil 4.4. L-Lys:Cu⁺² amino asit-metal kompleksinin 3:1 mmol oranındaki spektrofotometrik ölçümü

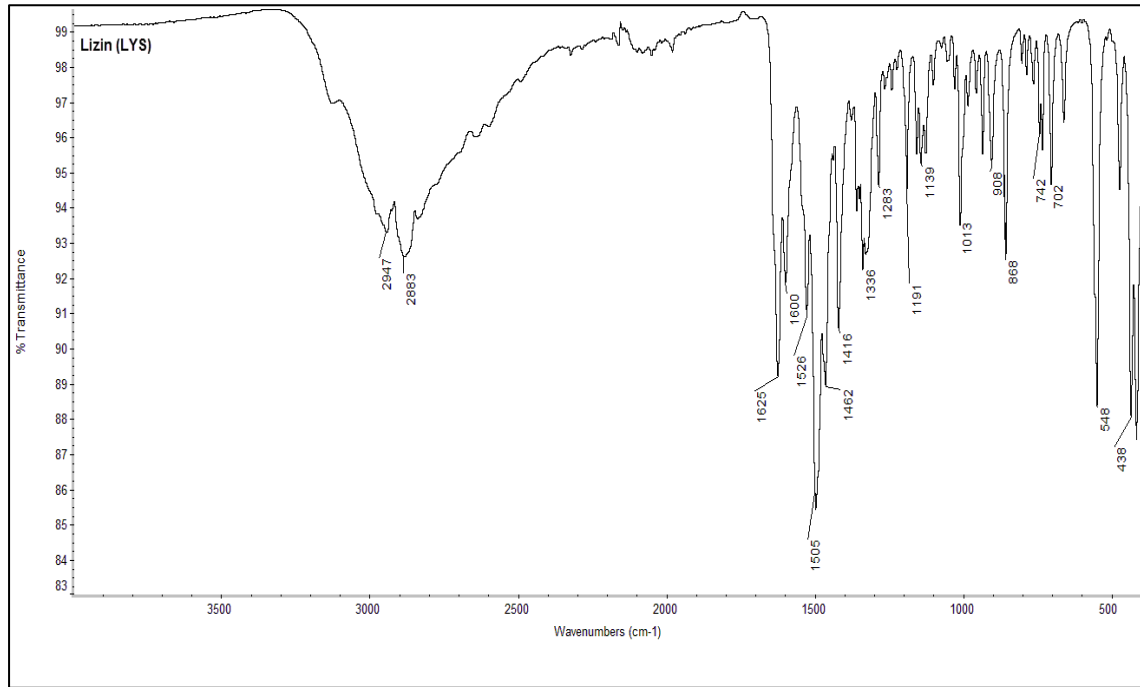


Şekil 4.5. L-Lys ve L-Lys:Cu⁺² amino asit-metal kompleksinin 1:1; 2:1 ve 3:1 mmol oranındaki spektrofotometrik ölçümü.

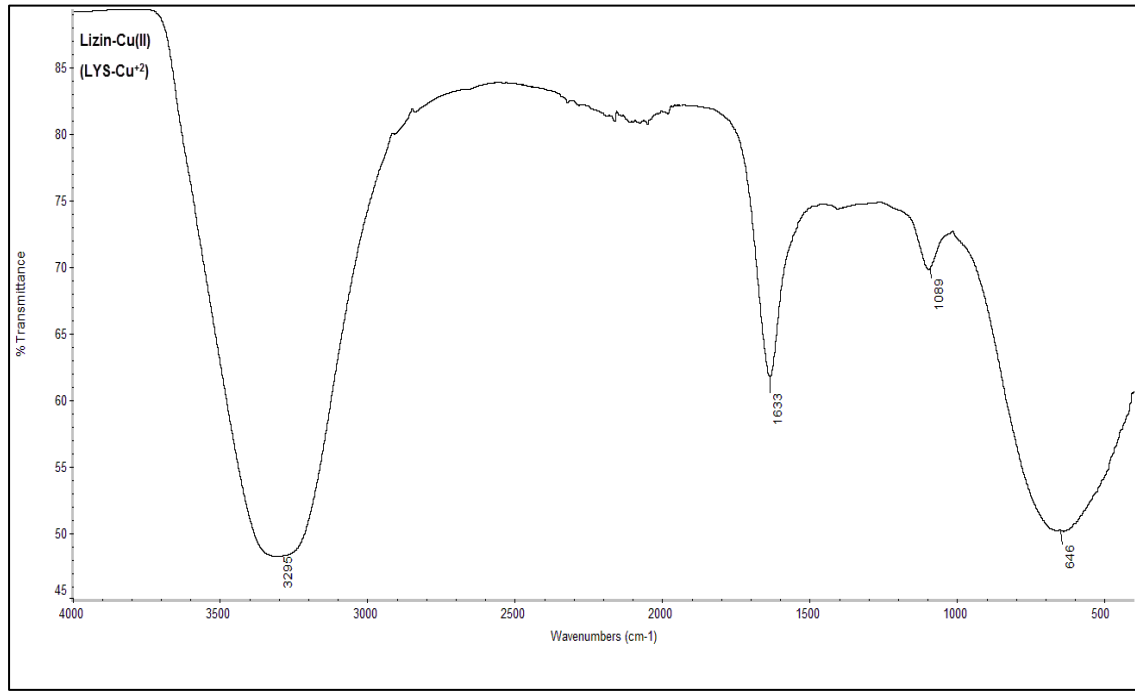
4.2. L-Lys ve L-Lys-Cu⁺² Amino asit-Metal Kompleksinin Karakterizasyonu

4.2.1. FTIR-ATR Spektrofotometre Analizi

L-Lys ve L-Lys' nin Cu⁺² iyonu ile koordinasyonu sonucu oluşan L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksinin karakterizasyonu FTIR-ATR spektrofotometresi (Thermo Fisher Scientific, Nicolet iS10, Waltham, MA, ABD) ile yapılmıştır. Numuneler, cihazın örnek haznesine yerleştirilmiş ve 400-4000 cm⁻¹ dalga sayısı aralığında yüzeyde gerçekleşen toplam geçirim miktarı hesaplanmıştır. L-Lys aminoasidinin FTIR-ATR spektrumu Şekil 4.6' da verilirken, L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksinin FTIR-ATR spektrumu da Şekil 4.7' de verilmiştir.

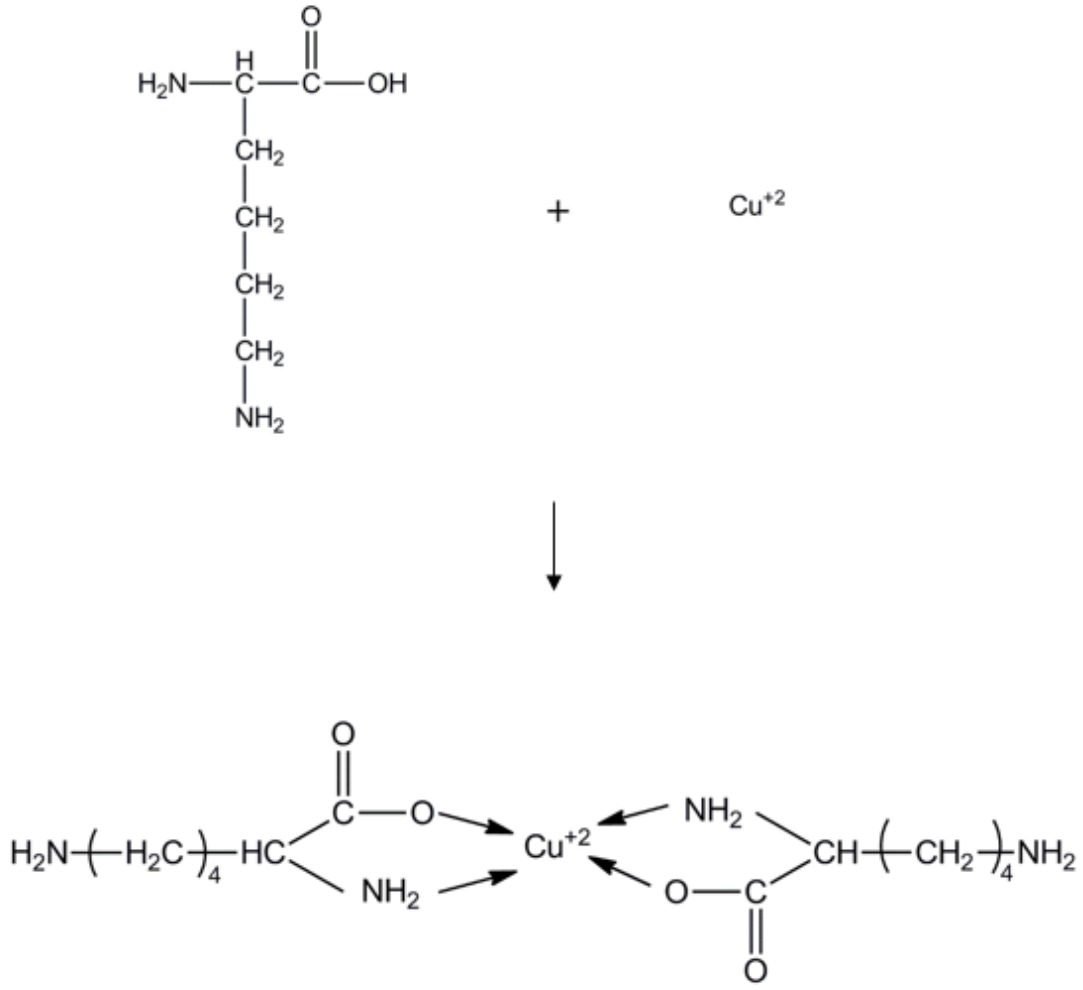


Şekil 4.6. L-Lys amino asidine ait FTIR-ATR spektrumu.



Şekil 4.7. L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksine ait FTIR-ATR spektrumu.

Amino asitler sulu çözeltilerinde ve katı hallerinde zwitter iyon olarak davrandıklarından, amino asitlerin IR spektrumu νNH_3 ve $\nu\text{C=O}$ bölgeleri için belirgin sinyaller vermektedir. Şekil 4.6' da görüldüğü üzere L-Lys amino asidi için 2947 cm^{-1} deki band $-\text{N-H}$ gerilme bandına aitken 1625 cm^{-1} deki band $-\text{COOH}$ grubundaki karbonil $\nu(\text{C=O})$ gerilme bandına aittir. Şekil 4.7' de ise L-Lys-Cu⁺² kompleksi oluşurken Cu⁺², L-Lys amino asidine koordine olduğundan karbonil grubuna ait $\nu(\text{C=O})$ 1625 cm^{-1} deki band 1633 cm^{-1} e kaymıştır. Ayrıca 2947 cm^{-1} deki bandın 3295 cm^{-1} e kayması L-Lys-Cu⁺² metal-ligand koordinasyonunun oluştuğunu göstermektedir. L-Lys amino asidi ve Cu⁺² metale ait metal- ligand koordinasyonu Şekil 4.8' de görülmektedir [105].



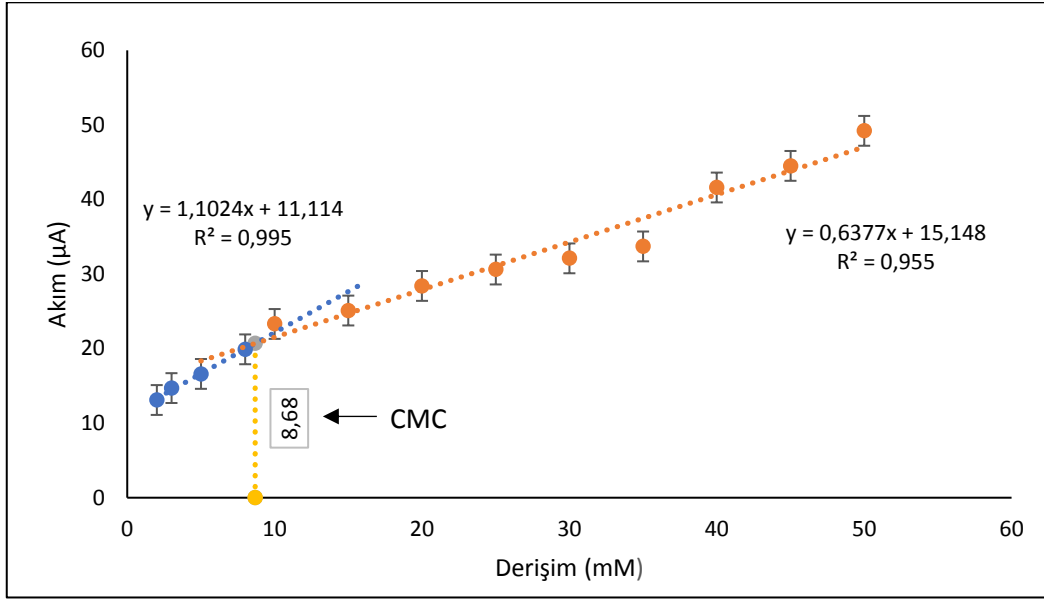
Şekil 4.8. L-Lys- Cu^{2+} amino asit-metal koordinasyonu.

4.3. Kritik Misel Derişiminin Belirlenmesi

Kritik misel derişimini belirlemek için 10 mM NH_4OAc ortamında farklı SDS derişimlerinde hazırlanmış olan çözeltilere sırasıyla 10 kV elektrik alan uygulanması sonucunda oluşan akım, μA olarak alınmış ve kritik misel derişimi belirlenmiştir.

2.0, 3.0, 5.0 ve 8.0 mM SDS derişimine sahip çözeltilerin uygulanan elektrik alanına cevap olarak verdiği akım değerleri birbirine yakınken, derişimin 10 mM' a çıkmasıyla uygulanan elektrik alanı sonrası oluşan akım değerinde ani bir artışa geçilmiştir. Ani derişimin olduğu noktanın altındaki derişimlerde ve bu noktanın üzerindeki derişimlerdeki derişimler için doğrular oluşturulmuş ve bu doğruların eğim ve kesişim noktaları belirlenmiştir. Bu iki doğrunun kesim noktası olan 8.68 mM SDS derişimi kritik misel derişimi olarak tespit edilmiştir. Şekil 4.9' da farklı

derişimlerde hazırlanan SDS çözeltilerine ait derişime (mM) karşı-akım (μM) grafiğinden elde edilen kritik misel derişimi değeri görülmektedir.



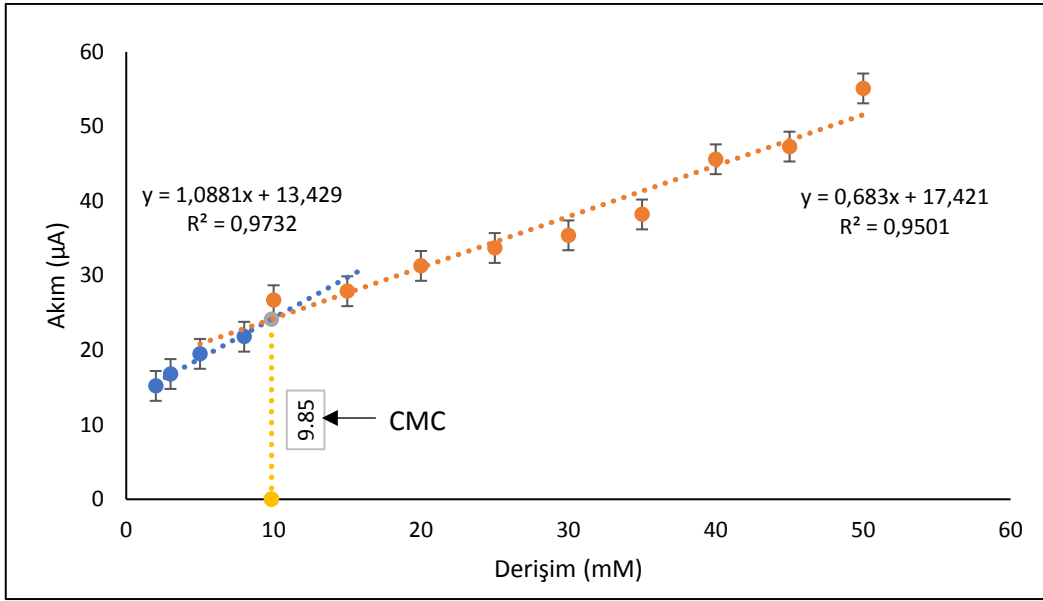
Şekil 4.9. Farklı derişimlerde hazırlanan SDS çözeltilerine ait akım grafiğı ve kritik misel derişimi.

Farklı derişimlerde hazırlanan SDS çözeltilerinin içerisinde 10 mM derişimde olacak şekilde eklenen L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksinin kritik misel derişimine etkisi incelenmiştir. Kritik misel derişimini belirlemek için 10 mM NH₄OAc ortamında farklı SDS derişiminde hazırlanmış SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin bulunduğu çözeltilere sırasıyla 10 kV elektrik alan uygulanması sonucunda oluşan akım, μA olarak alınmış ve SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin bulunduğu çözeltinin kritik misel derişimi belirlenmiştir.

Sadece SDS' lerin bulunduğu çözeltide olduğu gibi L-Lys-Cu⁺² kompleksinin bulunduğu çözeltilerde de 2.0, 3.0, 5.0 ve 8.0 mM SDS derişimine sahip SDS-L-Lys-Cu⁺² misel kompleks çözeltilerinin uygulanan elektrik alanına cevap olarak verdiği akım değerleri birbirine yakın olarak elde edilmiştir. Derişimin 10 mM' a çıkmasıyla uygulanan elektrik alanı sonrası oluşan akım değerinde ani bir artışa geçilmiştir. Ani değişimin olduğu noktanın altındaki derişimlerde ve bu noktanın üzerindeki derişimlerdeki değişimler için doğrular oluşturulmuş ve bu doğruların eğim ve

kesişim noktaları SDS-L-Lys-Cu⁺² çözeltisi için de belirlenmiştir. Bu iki doğrunun kesim noktasından CMC 9.85 mM olarak bulunmuştur.

Yapılan analizle SDS bazlı çözeltilere eklenen amino asit-metal kompleksiyle kritik misel derişiminin 8.68 mM' dan 9.85 mM' a çıktığı belirlenmiştir. Şekil 4.10' da farklı derişimde hazırlanan SDS-L-Lys-Cu⁺² misel kompleksi içeren çözeltilere ait derişime (mM) karşı-akım (µA) grafiğinden elde edilen kritik misel derişimi değeri görülmektedir.



Şekil 4.10. Farklı derişimlerde hazırlanan SDS-L-Lys-Cu⁺² misel kompleksi içeren çözeltilere ait akım grafiği ve kritik misel derişimi.

4.4. Farklı Derişimlerde Hazırlanan SDS Misellerinin ve SDS-L-Lys-Cu⁺² Misel Komplekslerinin Karakterizasyonu

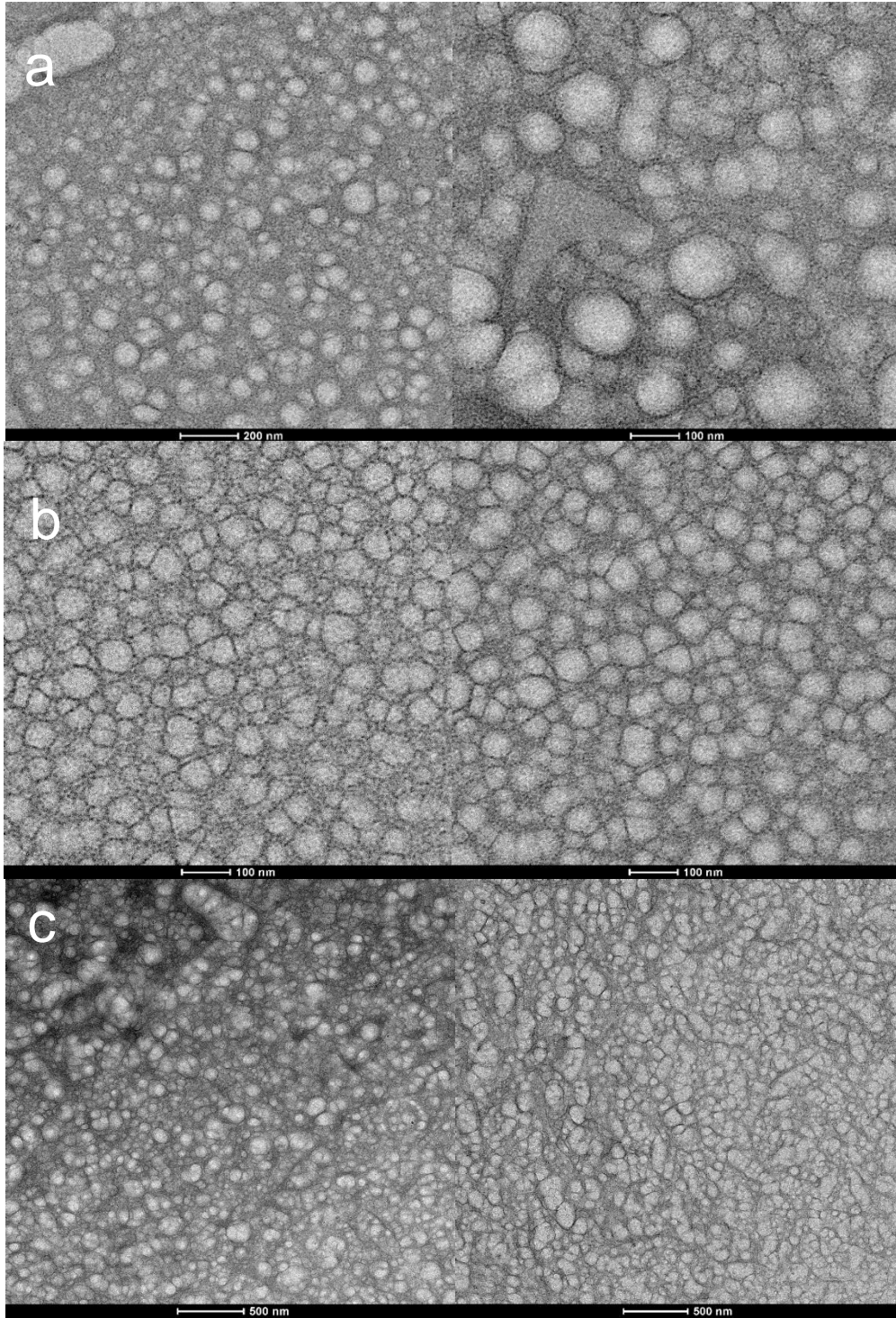
Hazırlanan 10, 25 ve 50 mM derişime sahip çözeltilerdeki SDS miselleri ve SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin mikroyapısal morfolojik karakterizasyonları yüksek kontrastlı geçirimli elektron mikroskobu (CTEM) ile gerçekleştirilirken, ortalama boyut dağılımı ve partiküllerin potansiyelleri zeta boyut ve potansiyel analizörü ile ölçülmüştür. Bunların yanı sıra SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin zeta boyut ölçümlerini doğrulamak amacıyla daha hassas ölçümler yapabilen dinamik ışık saçılımı spektrometresi kullanılarak ekstra boyut analizi yapılmıştır.

4.4.1. Yüksek Kontrastlı Geçirimli Elektron Mikroskopisi Analizi

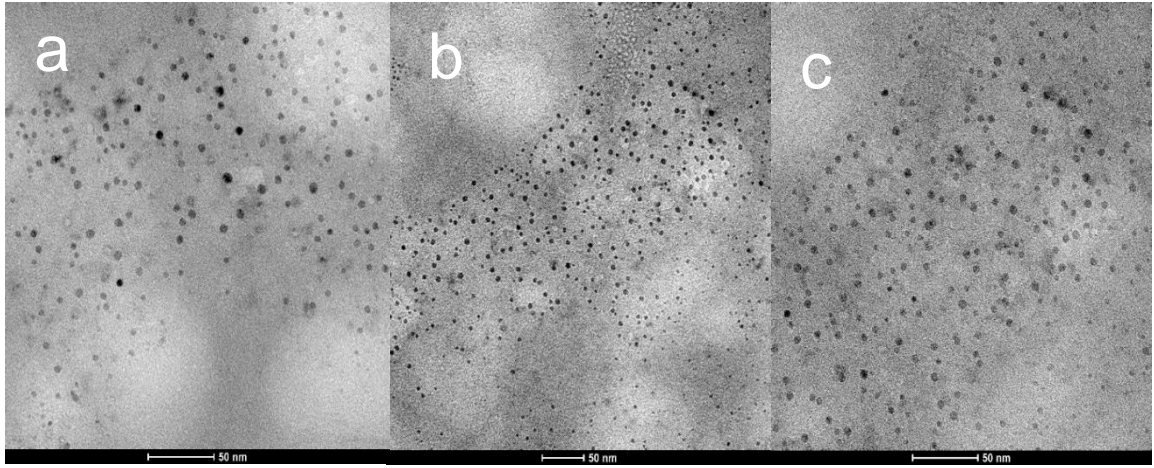
10, 25, 50 mM SDS ve 10 mM NH₄OAc' den oluşan çözeltide meydana gelen misellerin ve 10 mM derişime sahip olacak şekilde L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksinin eklenmesiyle oluşan SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin mikroyapısal morfolojik karakterizasyonları FEI marka Tecnai G² Spirit Biotwin model yüksek kontrastlı geçirimli elektron mikroskobu (CTEM) ile görüntülenmiştir. Şekil 4.11' de üç farklı derişimde hazırlanan çözeltilerde oluşan SDS misellerinin boyutları görüntülenirken, Şekil 4.12' de üç farklı derişimde hazırlanmış olan çözeltilerdeki SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin boyutları görüntülenmiştir.

SDS derişiminin farklılaşmasının SDS misellerinin ve SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin boyutuna etkisi incelenmiştir. Kritik misel derişimi üzerinde hazırlanan 10, 25 ve 50 mM derişime sahip SDS çözeltilerinin oluşturduğu misellerin boyutları sırasıyla, 60-70 nm, 40-50 nm ve 80-90 nm aralığındadır.

10 mM derişime sahip çözelti kritik misel derişiminin hemen üzerindedir. Bu nedenle diğer çözeltilerdeki misel oluşumlarına göre daha seyrek agregat oluşumu gözlenmiştir. Derişimin 25 mM' a çıkarılmasıyla miseller birbirini sahip oldukları negatif yüklerinden dolayı iterek küçülmüş ve daha sık misel oluşumu gözlenmiştir. Ancak derişimin 50 mM' a çekilmesiyle miseller iç içe geçmiş ve büyük küresel agregat oluşumları başlamıştır. Bu sebeple 50 mM çözeltide oluşan miseller en büyük hacimsel boyuta sahiptir.



Şekil 4.11. Hazırlanan misellerin CTEM görüntüleri. a) SDS derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0 b) SDS derişimi: 25 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0 c) SDS derişimi: 50 mM, Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0



Şekil 4.12. SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin CTEM görüntüleri. **a)** SDS derişimi: 10 mM; L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0 **b)** SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0 **c)** SDS derişimi: 50 mM; L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0.

10, 25 ve 50 mM SDS derişimine sahip SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin CTEM görüntülerinden L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksinin misellerin içersine girdiği anlaşılmaktadır. Kompleksin oluşan misel yapılarının içersine girmesiyle, misel boyutlarının oldukça küçüldüğü tespit edilmiştir. Derişimin artmasıyla boyutlar küçülmüş, ancak belirli bir derişimden sonra artmaya başlamıştır. Kompleksin farklı derişimlerde misellerin içine girmesiyle meydana gelen boyuttaki küçülmelerin, L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksinin bulunmadığı farklı derişimlerdeki misel çözeltilerinin boyutlarındaki değişimle doğru orantılı bir şekilde değiştii bulgusuna ulaşılmıştır.

4.4.2. Zeta Boyut ve Potansiyel Analizleri

Zeta boyut ve potansiyel analizörü, kolloidal çözeltilerde partiküllerin boyutunu, zeta potansiyelini ve molekül ağırlığını bulmak için kullanılan cihazdır. Seramik ve ilaç sektöründe çok önemli bir yer tutan kolloidlerin kararlılığı, partiküller arasındaki itme ve çekme kuvvetini belirleyen zeta potansiyeli ile yakından ilgilidir. Zeta boyut ve potansiyel analizörü, belirli bir potansiyel altında hareketi sağlanan tanelerin hızını belirleyerek zeta potansiyelini hesaplamaktadır.

10 mM NH₄OAc ortamında hazırlanan, 10, 25 ve 50 mM SDS miselleri ve 10 mM derişimde olacak şekilde SDS çözeltilerine eklenen L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksinden oluşan SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin zeta boyut ve potansiyel analizleri Nano Zetasizer (NanoS, Malvern Instruments, Londra, İngiltere) ile yapılmıştır. Zeta boyut analizleri sayıca hesaplanmış aynı zamanda polidispersite indeksleri bulunmuştur. Deneyler her bir örnek için 3 kez tekrarlanmıştır. Çizelge 4.1' de misellerin ve misel komplekslerinin sayıca ortalama boyutları ve polidispersite indeksleri görölmektedir.

Çizelge 4.1. Hazırlanan SDS misel ve SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin sayıca ortalama boyutları ve polidispersite indeksleri.

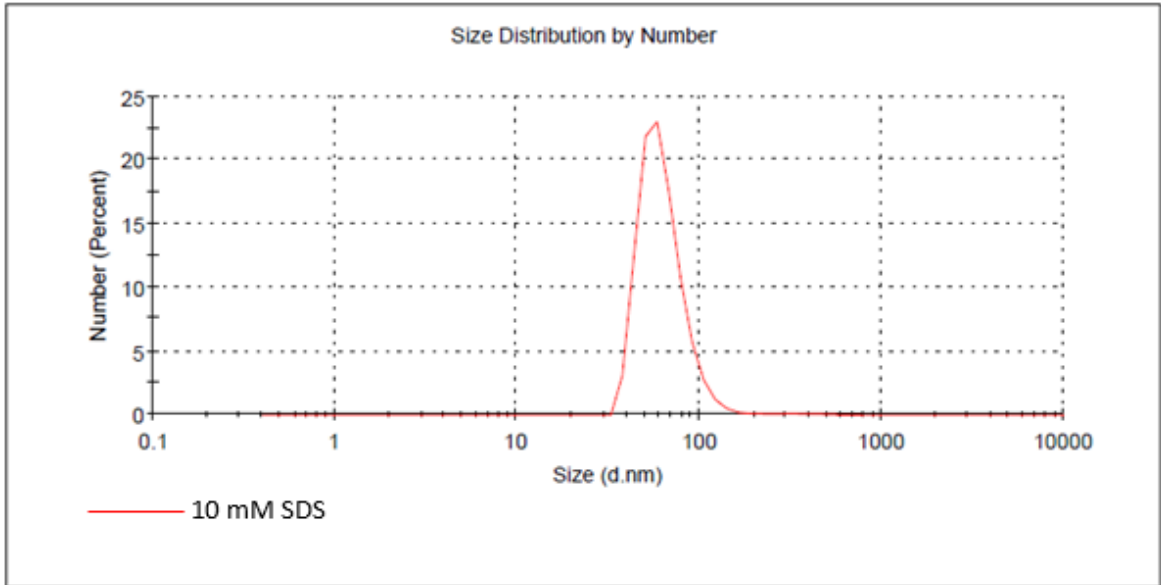
| Çözelti | Sayıca ortalama boyut | Polidispersite indeksleri |
|----------------------------------|-----------------------|---------------------------|
| 10 mM SDS | 63.45 nm | 0.587 |
| 25 mM SDS | 51.84 nm | 0.481 |
| 50 mM SDS | 90.90 nm | 0.483 |
| 10 mM SDS-L-Lys-Cu ⁺² | 9.394 nm | 0.309 |
| 25 mM SDS-L-Lys-Cu ⁺² | 8.818 nm | 0.227 |
| 50 mM SDS-L-Lys-Cu ⁺² | 9.988 nm | 0.235 |

Kritik misel derişiminin hemen üzerinde hazırlanan 10 mM SDS derişimine sahip çözeltide oluşan misellerin ortalama boyutları 63.45 nm' dir. Çözeltinin SDS derişiminin 25 mM' a çıkmasıyla sayıca ortalama boyut daha da azalmıştır. Ancak belirli bir derişimden sonra miseller birbirinin içerisine girmeye başlamış ve büyük agregat oluşumundan dolayı boyutları artmıştır. 10, 25 ve 50 mM SDS derişiminde oluşan misellerin sayıca boyut dağılımı sırasıyla Şekil 4.13, 4.14 ve 4.15' de görölmektedir.

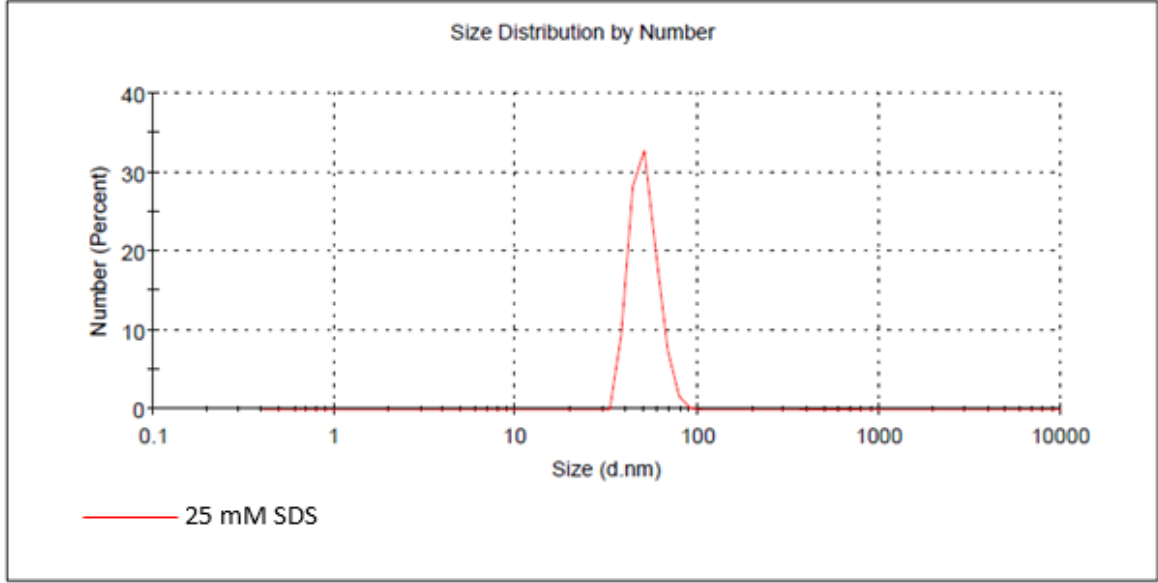
SDS derişiminin kritik misel derişimi üzerine çıkarılmasıyla, artan derişimle misellerin küçölmeye başlaması ve büyük agregat oluşumundan sonra boyutlarının

tekrar büyüme başlamasındakine benzer durum, SDS-L-Lys-Cu²⁺ misel komplekslerinde de görülmektedir. 10 mM SDS derişimden 25 mM SDS derişimine çıkılmasıyla hazırlanan misel komplekslerinde ki boyutlar küçülmeye başlamıştır. Son olarak da 50 mM SDS derişiminde tekrar artış görülmüştür. SDS-L-Lys-Cu²⁺ misel komplekslerinin sayıca boyut dağılımları Şekil 4.16, 4.17 ve 4.18' de görülmektedir.

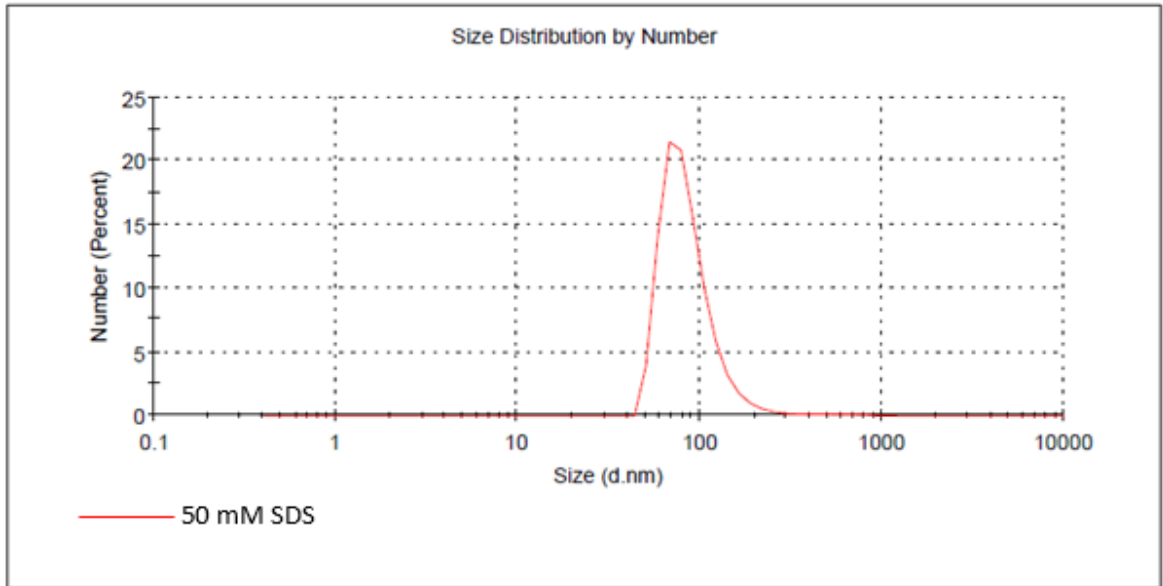
Ölçülen polidispersite indeksleri de hazırlanan çözeltilerin homojenliği hakkında bilgi vermektedir. Amino asit-metal kompleksinin SDS miselleriyle etkileşmesi ile misel yapısında boyut küçülmesinin meydana gelmesinden dolayı, sadece SDS çözeltilerinden oluşan misellere göre polidispersite indeksleri küçülmüş yani daha homojen bir çözelti ortamı elde edilmiştir. Polidispersite indeksi en küçük değere sahip olan 25 mM SDS' den hazırlanmış misel çözeltisine derişimi 10 mM olacak şekilde L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksinin eklenmesiyle oluşan misel komplekslerinin polidispersite indeksi en küçüktür. Yani en homojen ortam bu SDS derişiminde elde edilmiştir. Yapılan kinetik analizlerde de ayırımın en iyi gerçekleştiği çözelti derişiminin 25 mM SDS derişimine sahip amino asit-metal kompleksini içeren çözelti olduğu belirlenmiştir.



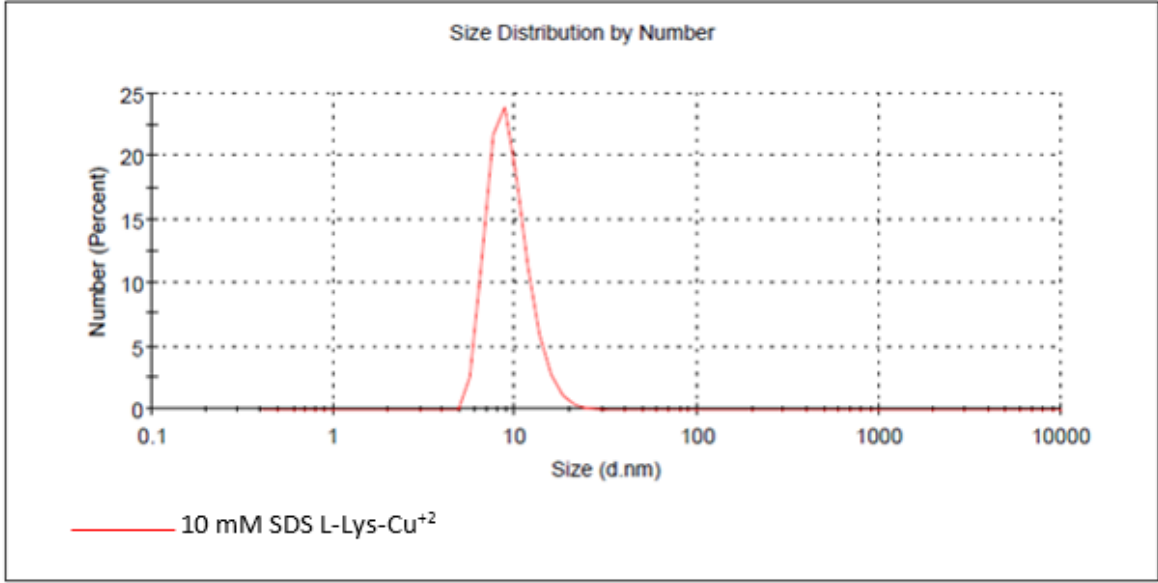
Şekil 4.13. SDS misellerinin sayıca ortalama boyut dağılım grafiği. SDS derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0.



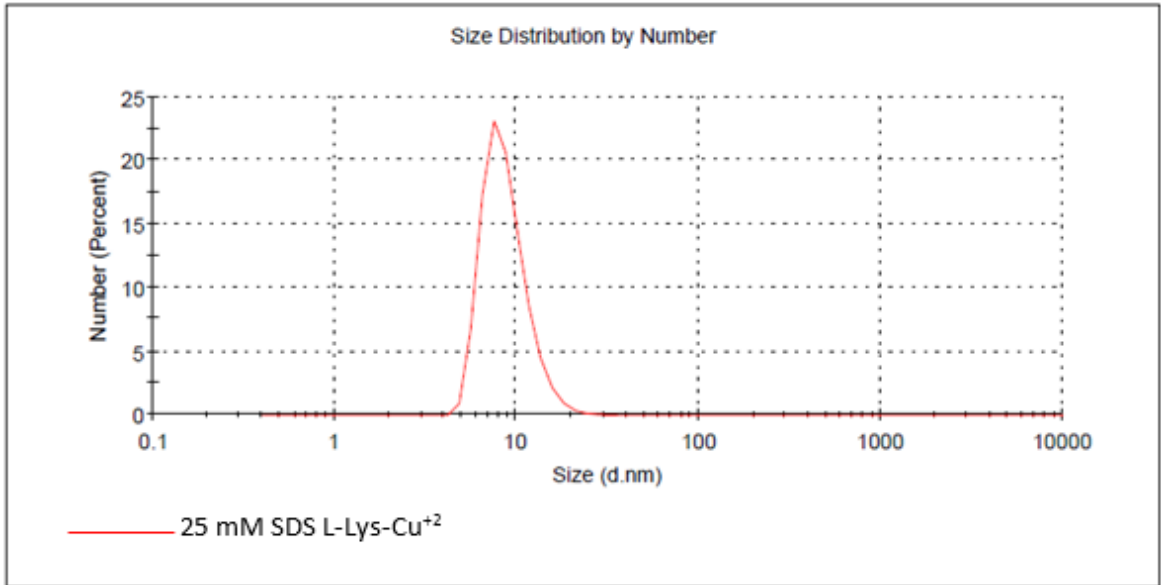
Şekil 4.14. SDS misellerinin sayıca ortalama boyut dağılım grafiği. SDS derişimi: 25 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0.



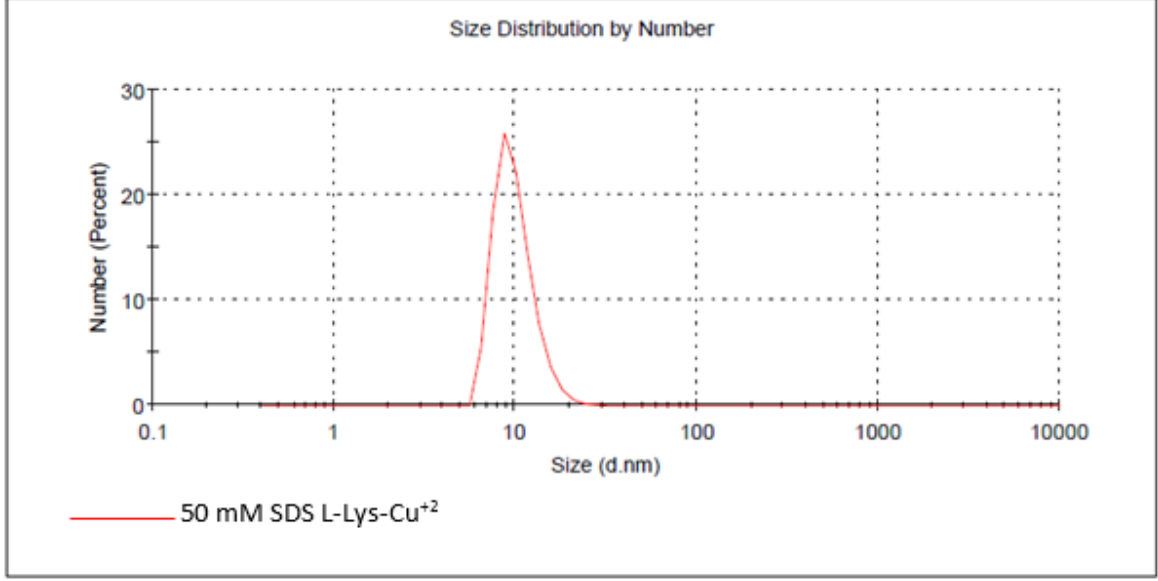
Şekil 4.15. SDS misellerinin sayıca ortalama boyut dağılım grafiği. SDS derişimi: 50 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0.



Şekil 4.16. SDS-L-Lys-Cu²⁺ misel komplekslerinin sayıca ortalama boyut dağılım grafiği. SDS derişimi: 10 mM; L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0.



Şekil 4.17. SDS-L-Lys-Cu²⁺ misel komplekslerinin sayıca ortalama boyut dağılım grafiği. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0.



Şekil 4.18. SDS-L-Lys-Cu²⁺ misel komplekslerinin sayıca ortalama boyut dağılım grafiği. SDS derişimi: 50 mM; L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0.

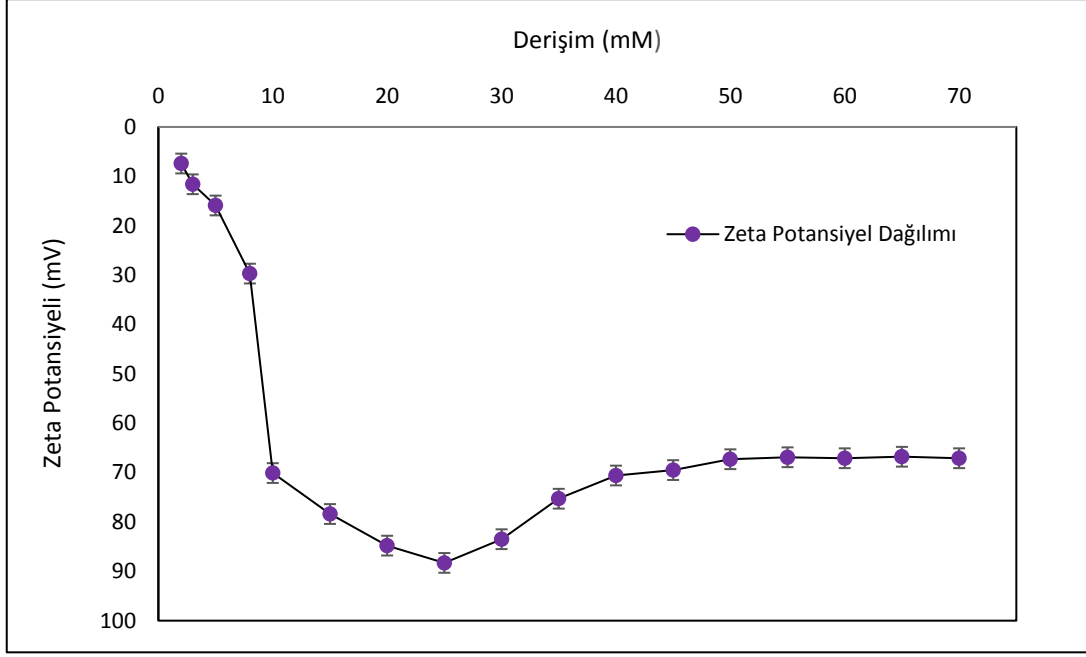
CTEM ile çekilen görüntülerden elde edilen misellerin ve misel komplekslerinin boyut büyüklükleri ile zeta boyut analizinden elde edilen ortalama büyüklükler birbirine yakın değerlerdir. CTEM analizleri kuru ortamda, zeta analizleri ise sulu ortamda gerçekleştirildiği için birbirinden biraz farklı değerler elde edilmiştir. CTEM görüntüleri kuru ortamda alındığından dolayı zeta boyut analizörünün verdiği sonuçlara göre misellerin boyutu daha küçük olarak elde edilmiştir.

Farklı derişimlerdeki SDS' ler ile hazırlanan misel çözeltilerinin zeta potansiyel ölçümleri yapılmıştır. SDS bazlı çözeltilere ait zeta potansiyelleri Çizelge 4.2' de görülürken, bu ölçümler sonucu elde edilen zeta potansiyel grafiği Şekil 4.19' da görülmektedir. Zeta potansiyel ölçümlerine bakıldığında en negatif zeta potansiyelinin 25 mM SDS derişimine sahip çözelti olduğu görülür.

Çizelge 4.2. Farklı derişimlerde hazırlanan SDS çözeltilerinin zeta potansiyelleri.

| SDS (mM) | Zeta Potansiyel (mV) |
|----------|----------------------|
| 2.0 | -7.4 |
| 3.0 | -11.6 |
| 5.0 | -15.9 |
| 8.0 | -29.7 |
| 10 | -70.1 |
| 15 | -78.4 |
| 20 | -84.8 |
| 25 | -88.3 |
| 30 | -83.5 |
| 35 | -75.3 |
| 40 | -70.6 |
| 45 | -69.5 |
| 50 | -67.3 |
| 55 | -66.9 |
| 60 | -67.1 |
| 65 | -66.8 |
| 70 | -67.1 |

Farklı derişimlere sahip SDS çözeltilerinin zeta potansiyel ölçümleri değerlendirildiğinde; çözeltide SDS derişiminin 8.0 mM' dan 10 mM' a çıkmasıyla zeta potansiyeli ani bir artış göstermiştir. Bunun sebebi 8.68 mM SDS derişiminde misellerin oluşmaya başlamasıdır.



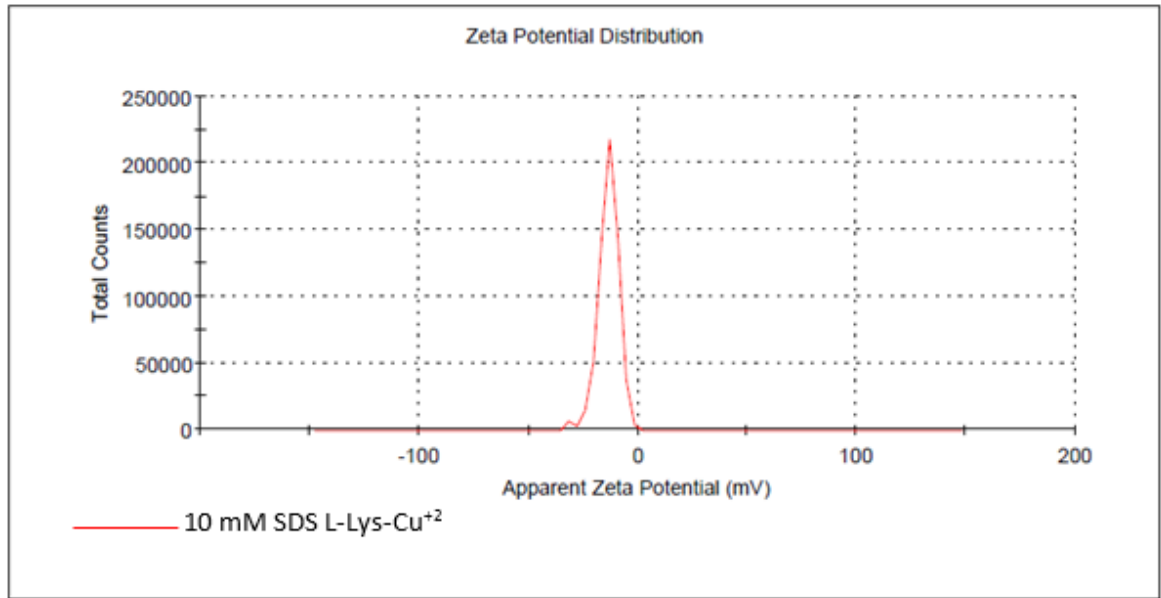
Şekil 4.19. Farklı derişimlerde hazırlanan SDS çözeltilerinin zeta potansiyel ölçüm grafiği. SDS derişimi: 2.0, 3.0, 5.0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0.

10, 25 ve 50 mM SDS içeren çözeltiler ile hazırlanan SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin zeta potansiyel ölçümleri de gerçekleştirilmiştir. Artan SDS derişimiyle SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin zeta potansiyelleri sırasıyla -13.4, -20 ve -12.9 mV olarak bulunmuştur. SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin zeta potansiyelleri Şekil 4.20, 4.21 ve 4.22' de gösterilmiştir.

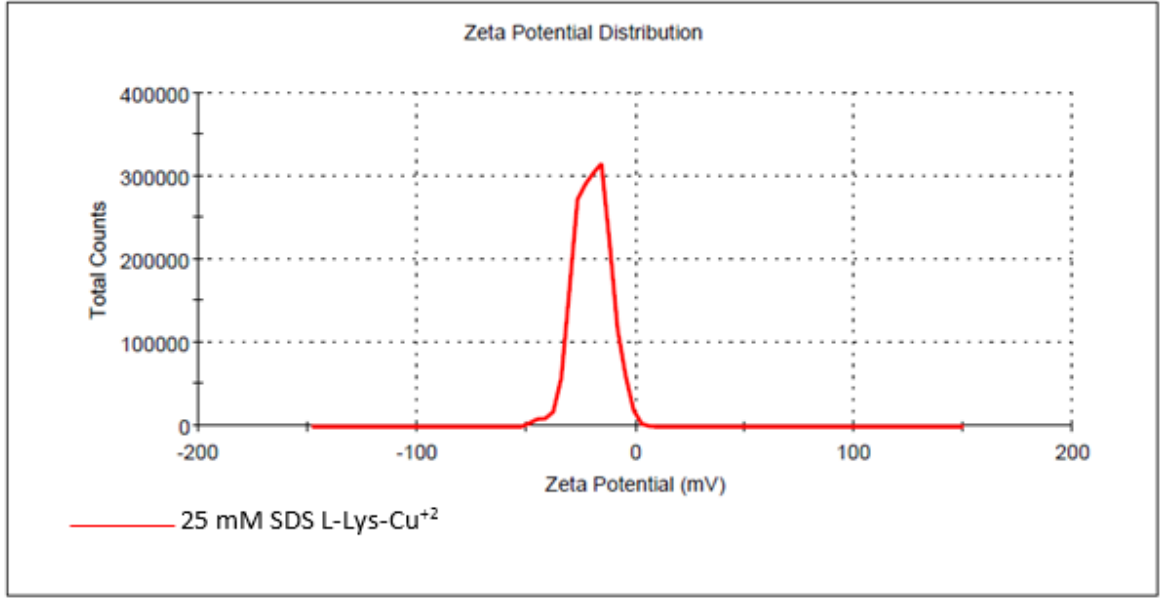
Sadece SDS ile hazırlanan misel çözeltilerinin zeta potansiyelleri oldukça negatiftir. Ancak ortama göreceli pozitif yüklere sahip olan L-Lys-Cu⁺² kompleksi girdiğinde ortamda mevcut bulunan misellerin zeta potansiyellerindeki negatiflik azalmıştır. Kritik misel derişiminin hemen üzerinde hazırlanan 10 mM SDS derişimine sahip misel kompleks çözeltisinin zeta potansiyeli -13.4 mV değere sahiptir.

Ortamda SDS derişimin artmasıyla negatif yükler artmıştır. Aynı miktarda L-Lys-Cu⁺² kompleksi eklendiği zaman zeta potansiyel değeri 25 mM çözelti için daha yüksek (negatif) elde edilmiştir. Ortamda SDS miktarı arttığından her bir misele daha az amino asit-metal kompleksi düştüğünden dolayı zeta potansiyeli 10 mM SDS' in bulunduğu misel kompleksine göre daha düşük bir değere sahip olmuştur. Ancak çözeltideki SDS derişiminin 50 mM' a çıkmasıyla çözeltide çok sayıda misel

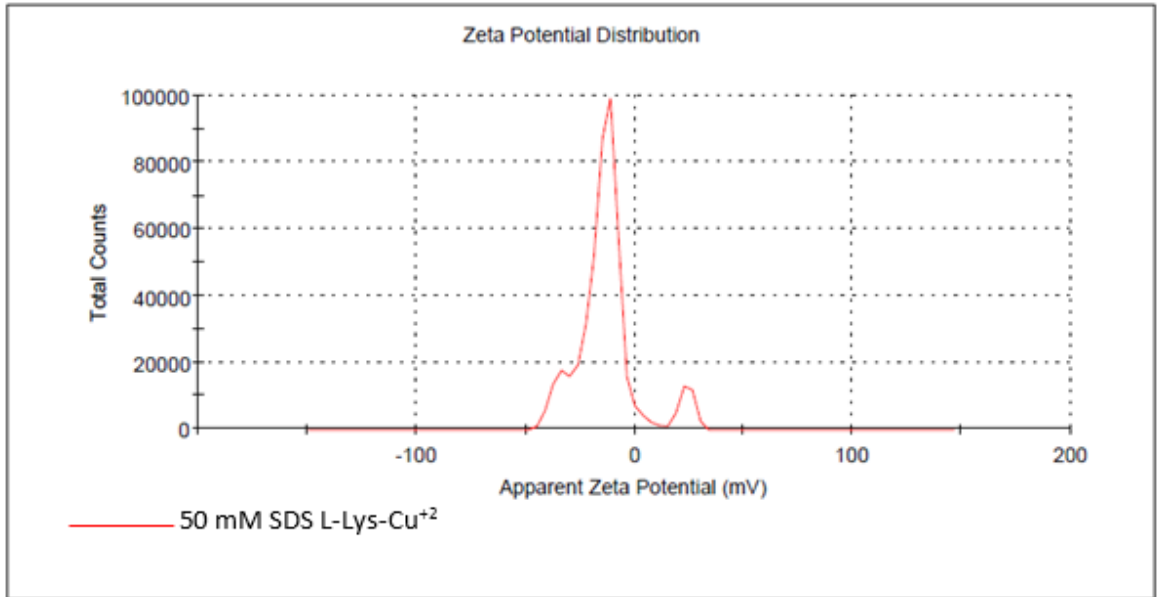
oluşmuş, oluşan misellerin birçoğu büyük agregat oluşumuna yol açmıştır. Bu sebeple zeta potansiyeli beklendiği şekilde negatif olarak artmamıştır. Bu ortama göreceli pozitif yüke sahip amino asit-metal kompleksinin eklenmesiyle, kompleksin bir kısmı misellerin içine dağılmış, büyük bir kısmı büyük agregatların oluşmasından dolayı ilk temas ettiği yerdeki misellerin içine dolmuş ve misellerin bir kısmına ulaşamadıklarından dolayı misellerin bir kısmı boş bir şekilde kalmıştır. Bu durumdan dolayı SDS derişimi 50 mM olan çözeltide 3 farklı zeta potansiyeli oluşmuştur. Bu 3 farklı zeta potansiyelinin ortalaması da -12.9 mV olarak bulunmuştur.



Şekil 4.20. SDS-L-Lys-Cu²⁺ misel komplekslerinin zeta potansiyeli. SDS derişimi: 10 mM; L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0.



Şekil 4.21. SDS-L-Lys-Cu²⁺ misel komplekslerinin zeta potansiyeli. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0.



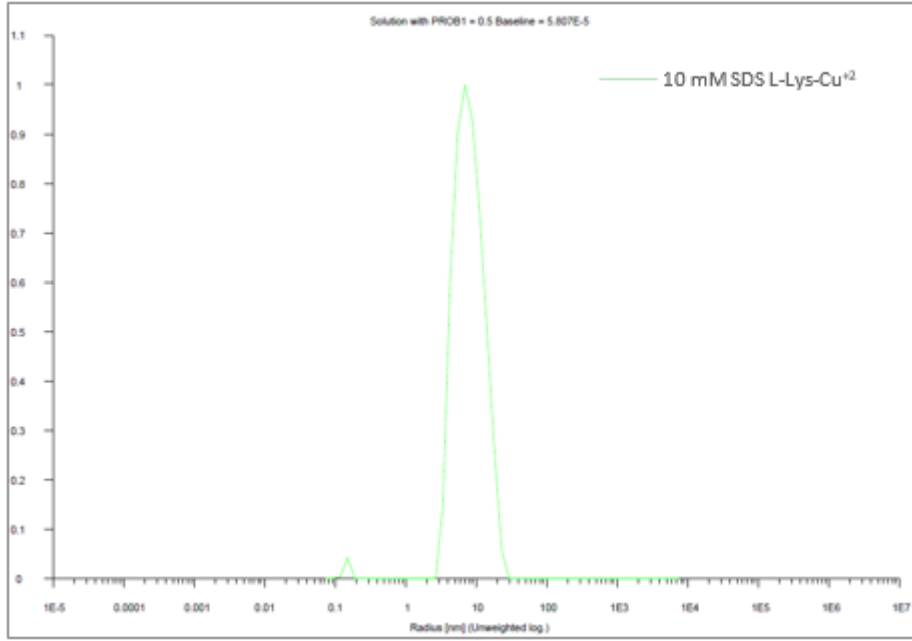
Şekil 4.22. SDS-L-Lys-Cu²⁺ misel komplekslerinin zeta potansiyeli. SDS derişimi: 50 mM; L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0.

4.4.3. Dinamik Işık Saçılımı Spektrometrik Analizi

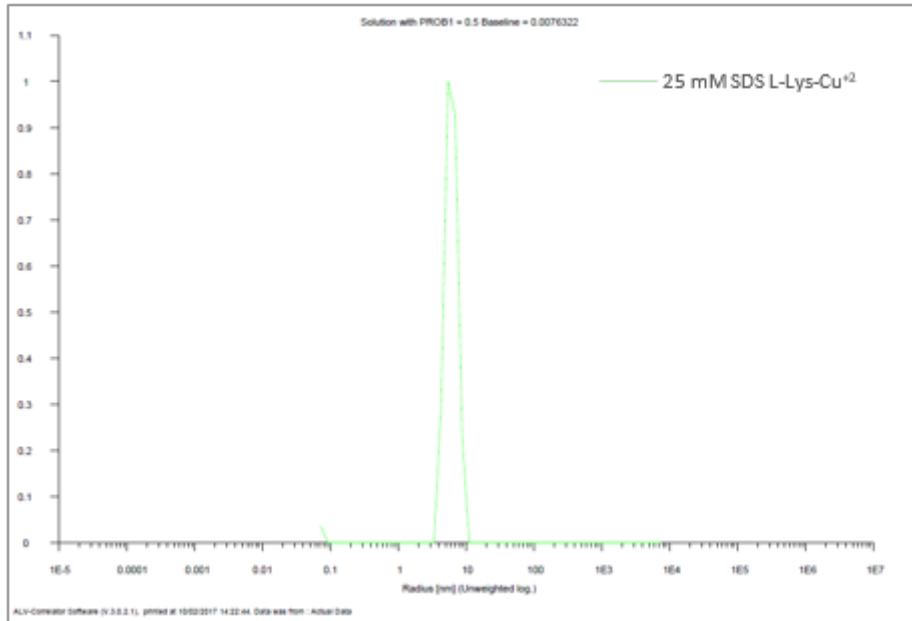
Dinamik ışık saçılımı metodu (DLS) seyreltik çözelti içerisindeki küçük parçacıklardan saçılan ışığın şiddetinin ve değişiminin ölçülmesi temeline dayanır. Saçılan ışığın şiddetindeki değişim, parçacığın hareketine buna bağlı olarak da parçacığın büyüklüğüne, ortamın vizkozitesine ve sıcaklığa bağlıdır. Kolloidal süspansiyonlar iki temel ışık saçılımı yöntemiyle karakterize edilir. Statik ışık saçılımı yöntemi polimerlerin molekül ağırlığı, dönme yarıçapı ve ikinci viral katsayı belirlenmesinde kullanılır. Dinamik ışık saçılımı yöntemi ise hidrodinamik büyüklük, difüzyon katsayısı, dağılım indeksi ve parçacık büyüklüğü dağılımının elde edilmesinde kullanılır.

10, 25 ve 50 mM SDS derişimine sahip üç farklı SDS-L-Lys-Cu⁺² misel kompleks çözeltilerinde bulunan küçük partiküllerden saçılan ışığın şiddetinin ve değişiminin ölçülmesi sonucunda parçacık büyüklüğü dağılımı elde edilmiştir. Elde edilen boyut dağılımı grafikleri Şekil 4.23, 4.24 ve 4.25' de görülmektedir. 10, 25 ve 50 mM SDS-L-Lys-Cu⁺² misel kompleksleri için elde edilen ortalama parçacık boyutları sırasıyla; 7.125, 6.707 ve 7.400 nm' dir.

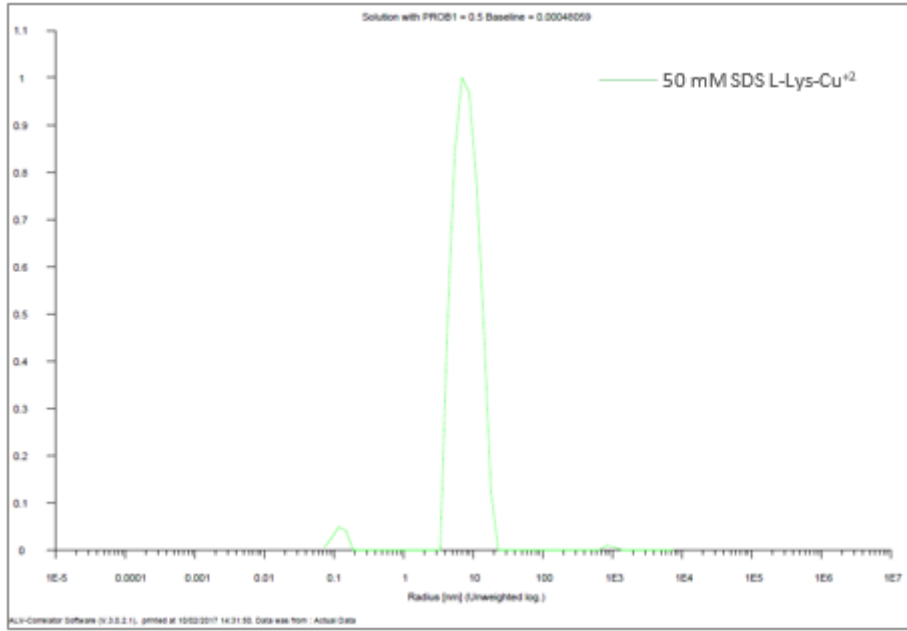
Dinamik ışık saçılımı spektrometresiyle yapılan ölçümler sonucunda elde edilen parçacık boyutlarıyla, zeta boyut analizörü ölçümleriyle elde edilen sayıca boyut dağılımı ve derişimin artmasıyla meydana gelen değişimin çok benzer olmasından dolayı zeta boyut analizi sonuçları doğrulanmıştır.



Şekil 4.23. SDS-L-Lys-Cu²⁺ misel komplekslerinin ortalama parçacık boyutu dağılım grafiği. SDS derişimi: 10 mM; L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0.



Şekil 4.24. SDS-L-Lys-Cu²⁺ misel komplekslerinin ortalama parçacık boyutu dağılım grafiği. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0.

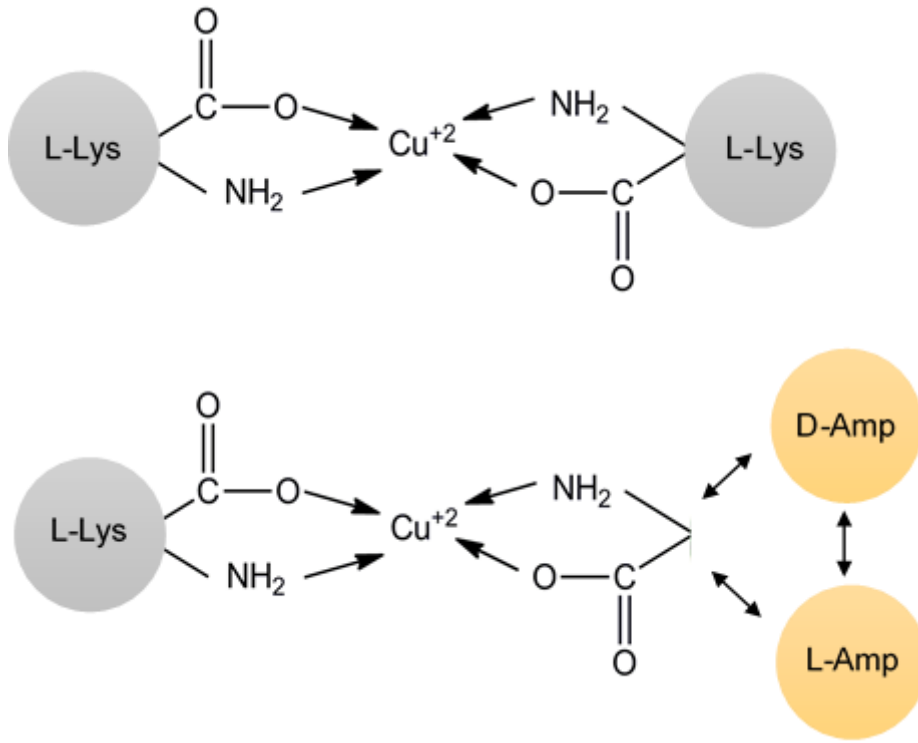


Şekil 4.25. SDS-L-Lys-Cu²⁺ misel komplekslerinin ortalama parçacık boyut dağılım grafiği. SDS derişimi: 50 mM; L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0.

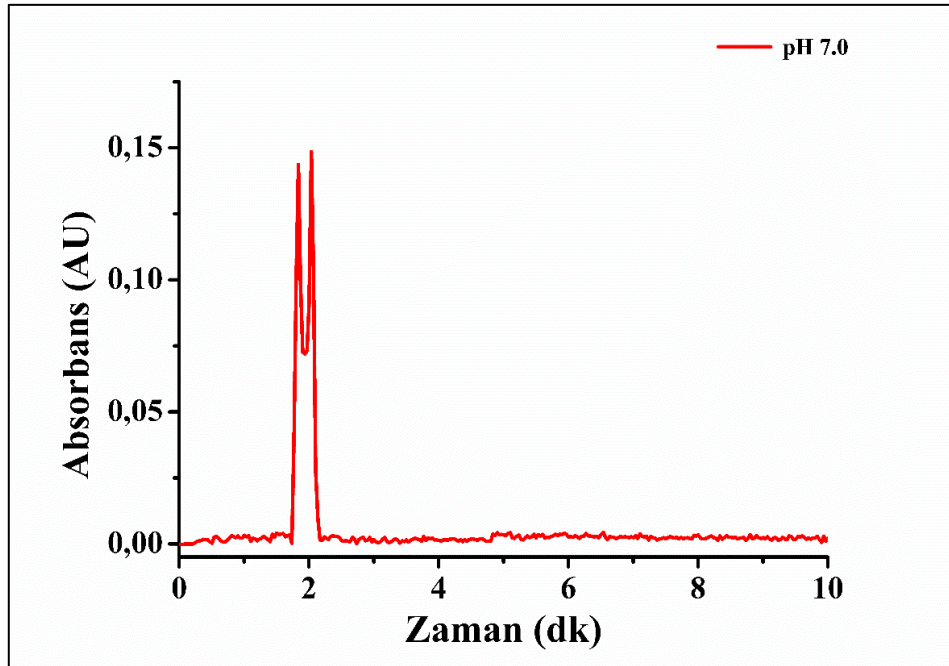
4.5. Kinetik Analizler

4.5.1. Ayrıma Tampon pH' ının Etkisi

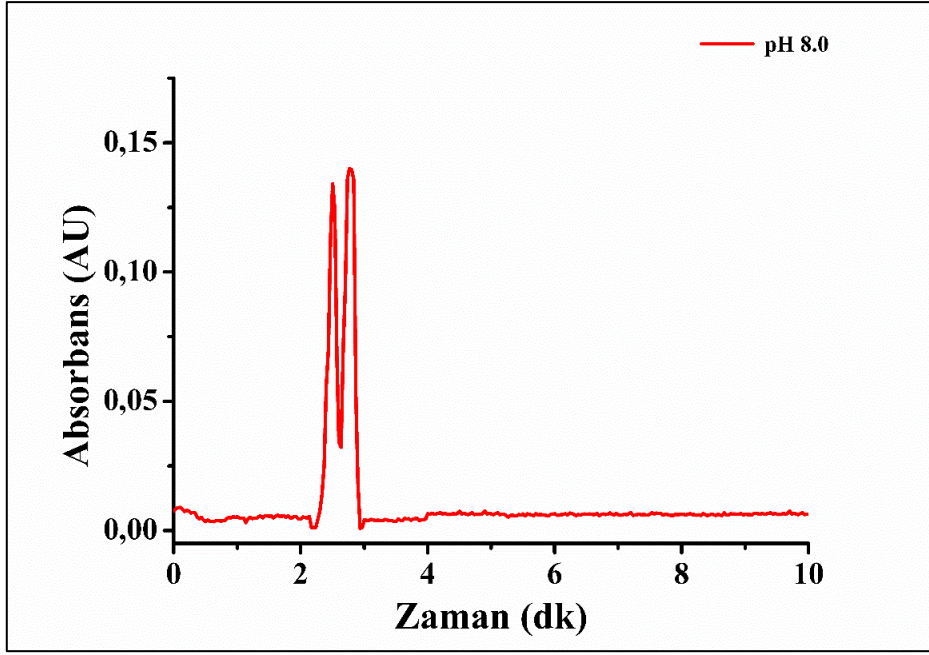
Yüzey gerilimini azaltıcı maddeler ile birlikte pH kontrolüde iyonlaşabilen maddelerin çözünürlüğünü etkileyen parametrelerden biridir [106]. pH' ın etkisini incelemek için pH 7.0, 8.0 ve 9.0' da kinetik çalışmalar yürütülmüştür. Elde edilen en iyi ayrımın pH 9.0' da olduğu gözlenmiştir. pH 9.0' da Cu(L-Ligand)₂ kompleksi ile ligand değişimi sırasında Ampisilinin D- ve L- formunun yarışmalı olarak bağlanmasıyla anlık olarak oluşan Cu(L-Ligand-D-Amp) ve Cu(L-Ligand-L-Amp) yapılarının arasında yük denliği olduğu için ligand değişimi başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir. pH 9.0' da oluşan kiral ligand değişim mekanizması Şekil 4.26' da görüldüğü gibidir. pH 7.0 ve pH 8.0' de etkin bir ayırım sağlanamamıştır. pH 7.0, pH 8.0 ve pH 9.0 da ki söz konusu ayrımlar Şekil 4.27, 4.28 ve 4.29' da görülürken, Şekil 4.30' da pH ayrımları birlikte görülmektedir.



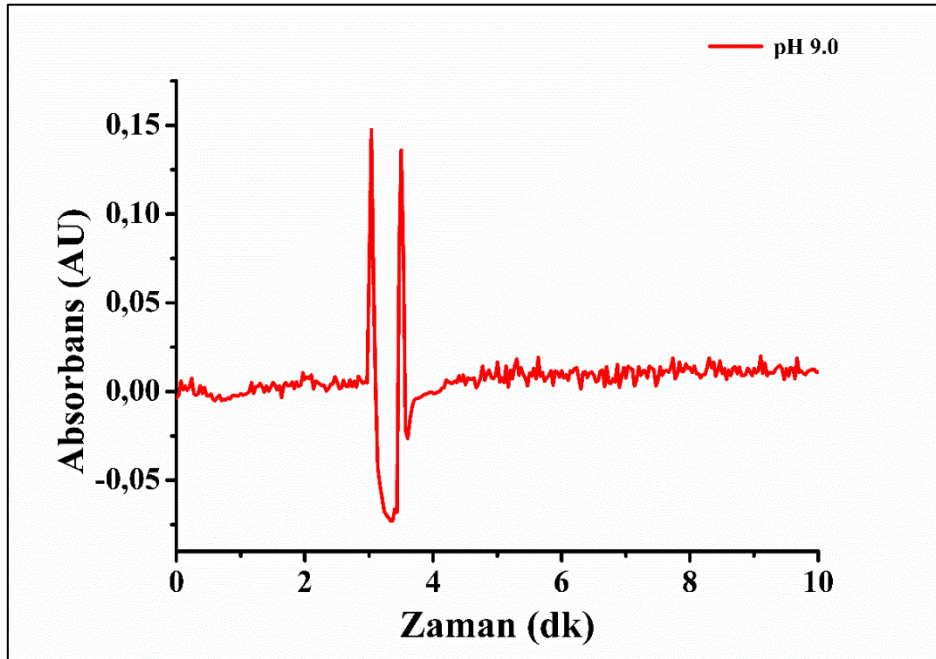
Şekil 4.26. Misel ortamında kiral ligand değişim etkileşimleri.



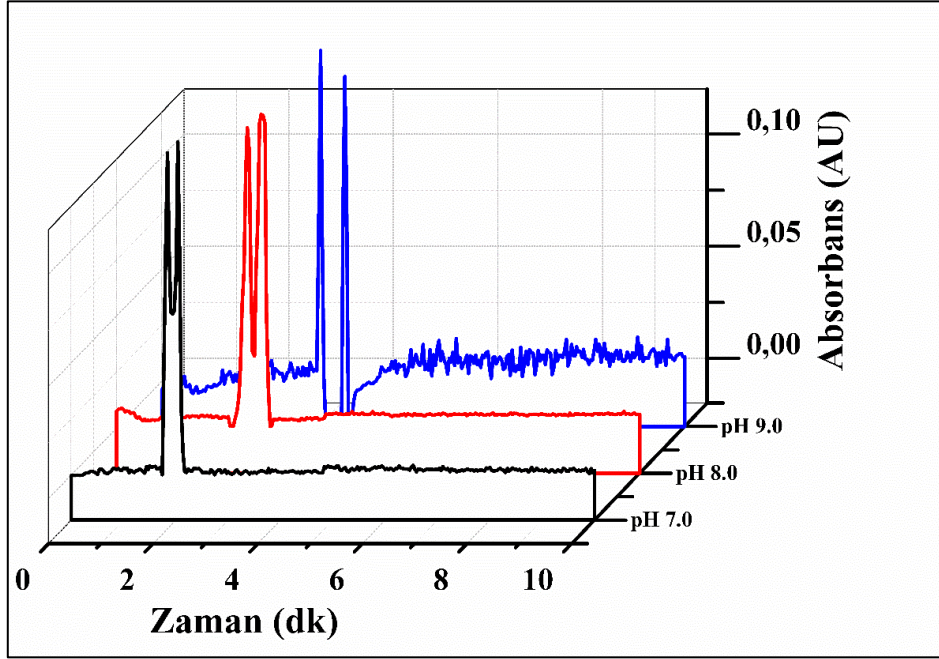
Şekil 4.27. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına çözelti pH' ının etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys- Cu^{2+} amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH_4OAc , pH 7.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar.



Şekil 4.28. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına çözelti pH' ının etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 8,0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar.



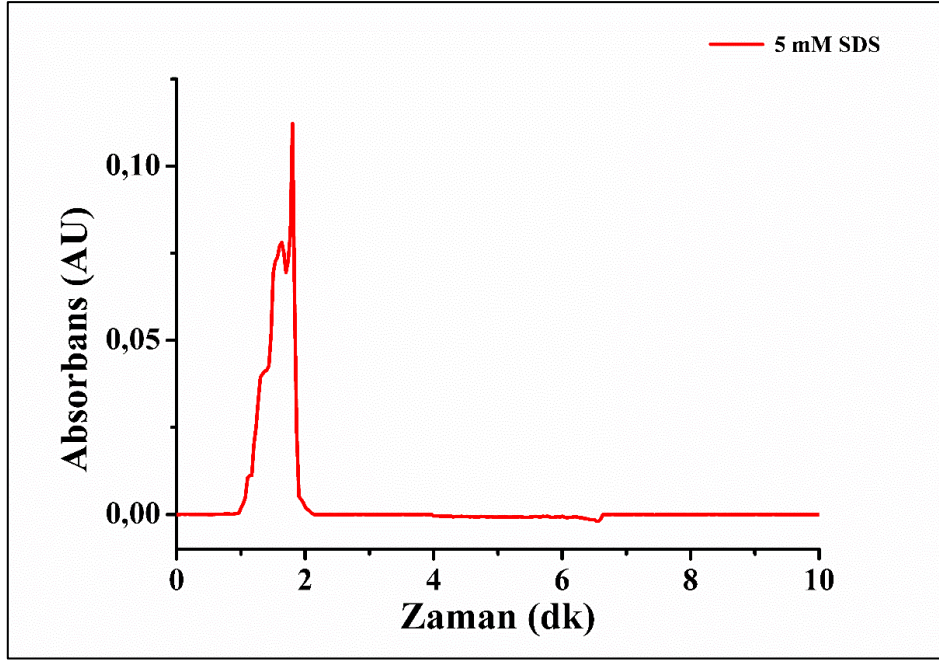
Şekil 4.29. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına çözelti pH' ının etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9,0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar.



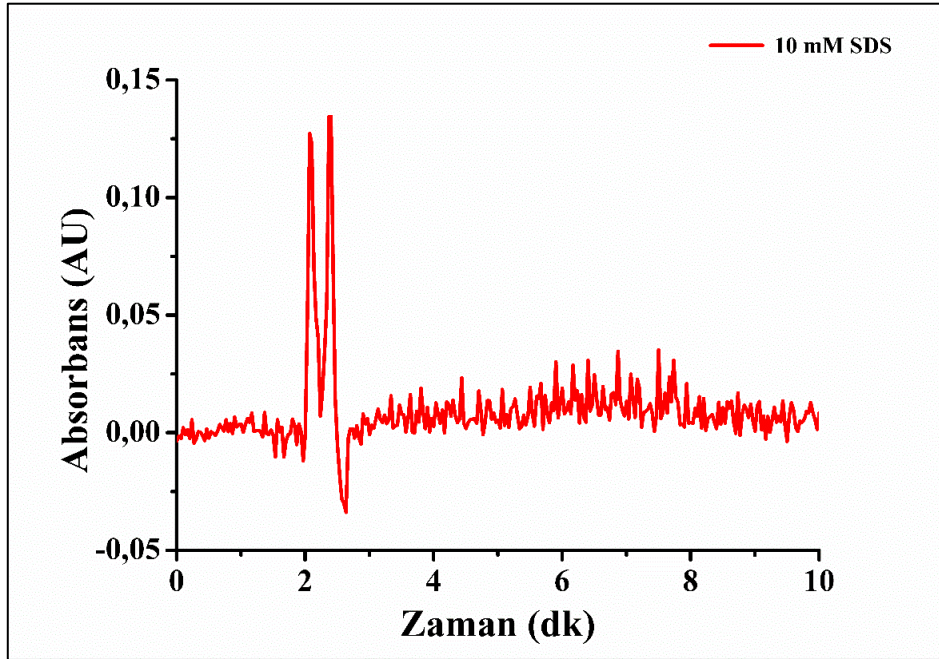
Şekil 4.30. Çözelti pH' ının D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına etkisini farklı pH değerleri için gösteren elektroferogramların çakıştırılmış hali.

4.5.2. Ayrıma SDS Derişiminin Etkisi

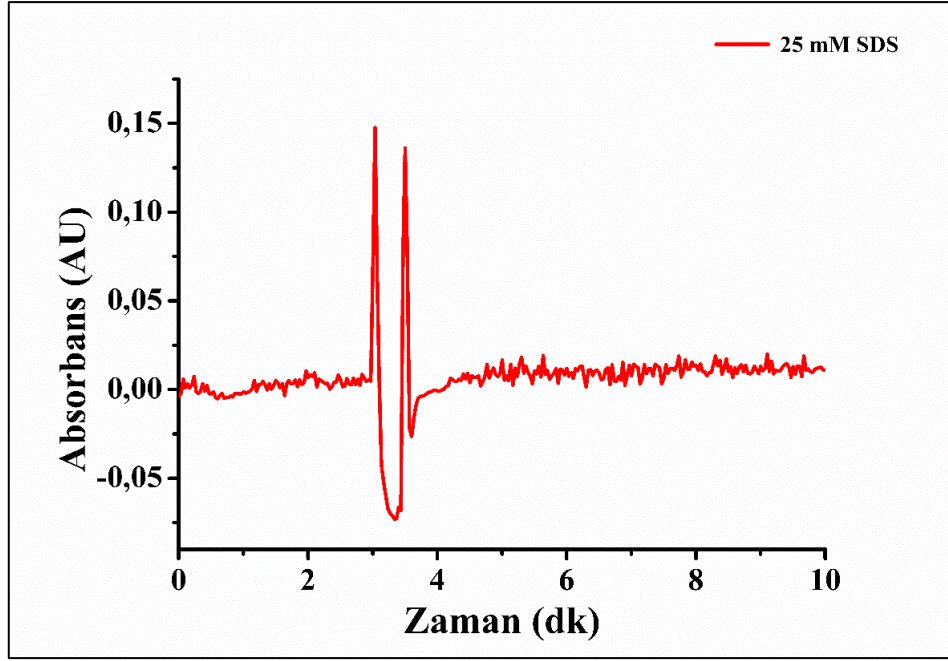
Sodyum dodesil sülfat (SDS) yüzey aktif maddeler suda çözüldüklerinde yüzeyinde iyonik grupların, çekirdeğinde ise hidrofobik merkezin olduğu miselleri oluştururlar. Bu çalışmada farklı SDS derişimlerinde meydana gelen misel oluşumlarının D,L Ampisilin enantiyomerlerinin ayırımına etkisi incelenmiştir. Bunun için 5.0, 10, 25 ve 50 mM SDS, 10 mM amino asit-metal kompleksi ve 10 mM NH_4OAc içeren tampon çözeltileri (pH 9.0 da) D,L Amp ayırımı için ayrı ayrı denenmiştir. 5.0 mM SDS derişimine sahip çözelti kritik misel derişiminin altında olduğu için herhangi bir ayırım görülmemiştir. Analizin ilk dakikasında her iki enantiyomer yığın şeklinde birlikte gelmiştir. 10 mM SDS derişimine sahip çözeltilerde oluşan miseller yeterli ayırımı sağlayamamıştır. 50 mM SDS derişimine sahip çözelti ortamında da büyük agregatların oluşması enantiyomerlerin etkin ayırımını engellemiştir. Yapılan deneyler sonucunda etkin ayırımın 25 mM SDS derişimine sahip elektrolit (tampon) çözeltilerinde olduğu görülmüştür. Farklı SDS derişimleri kullanılarak misel çözeltilerinin D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımında kullanıldığını gösteren elektroferogramlar Şekil 4.31, 4.32, 4.33 ve 4.34' de görülürken, Şekil 4.35' de ise piklerin çakıştırılmış hali görülmektedir.



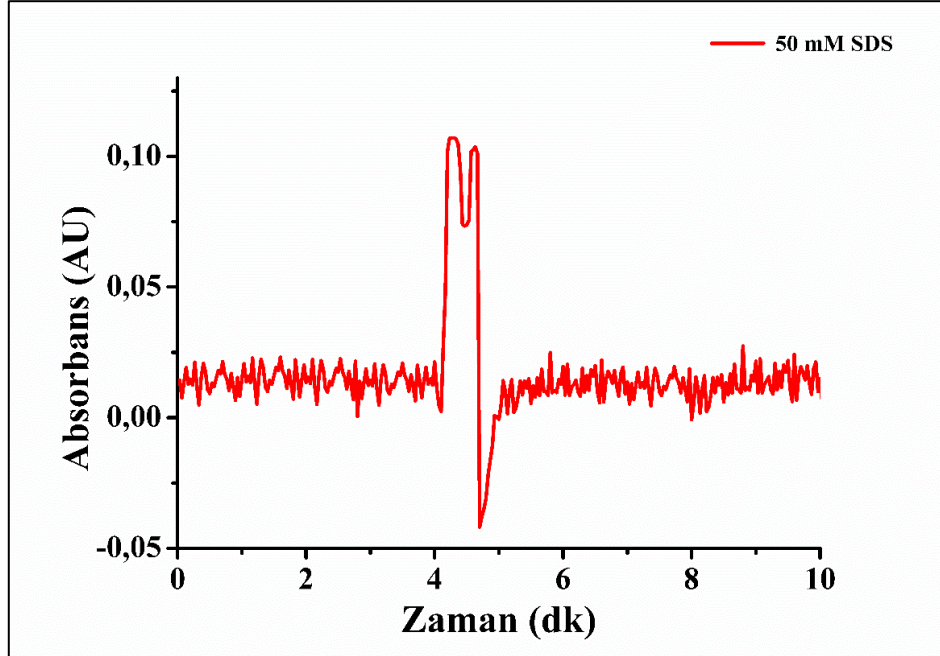
Şekil 4.31. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına SDS derişiminin etkisi. SDS derişimi: 5.0 mM; L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar.



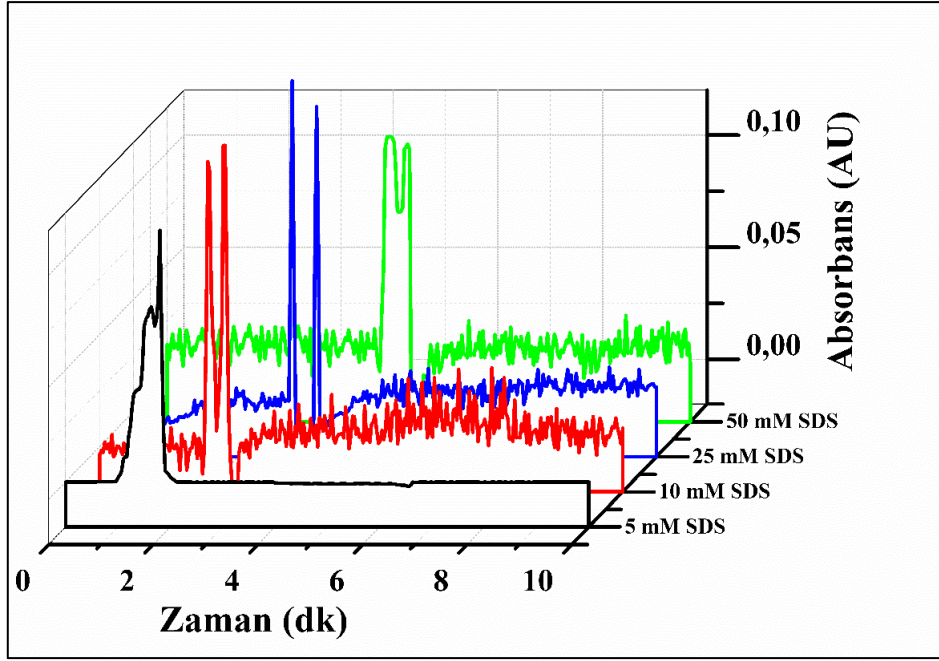
Şekil 4.32. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına SDS derişiminin etkisi. SDS derişimi: 10 mM; L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar.



Şekil 4.33. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına SDS derişiminin etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar.



Şekil 4.34. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına SDS derişiminin etkisi. SDS derişimi: 50 mM; L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar.



Şekil 4.35. SDS derişiminin D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına etkisini farklı SDS değerleri için gösteren elektroferogramların çakıştırılmış hali.

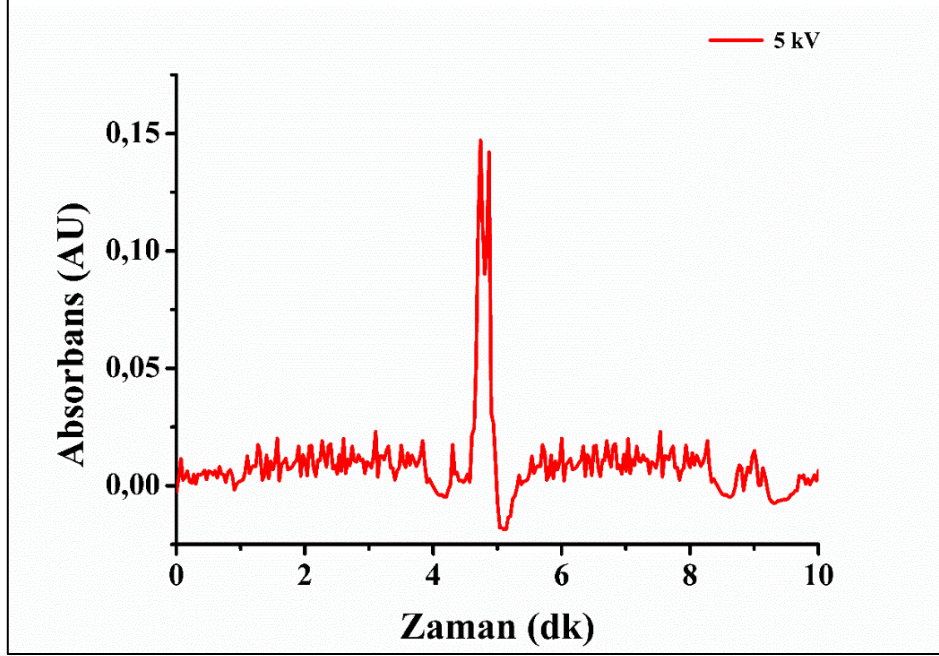
Anyonik yüzey aktif madde olan SDS' in artan miktarlarıyla ampisilin enantiyomerlerinin alıkona süresi de artmıştır. Bunun sebebi artan SDS derişimiyle oluşan misel etkileşiminden kaynaklanmaktadır.

4.5.3. Ayrım Elektrik Alanın Etkisi

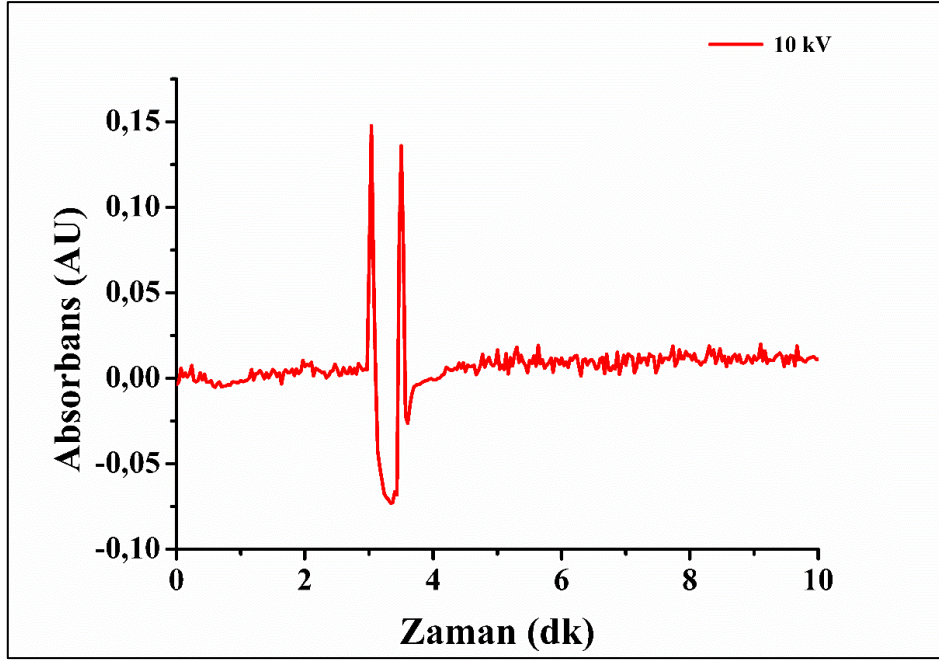
Hazırlanmış olan 25 mM SDS, 10 mM L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi ve 10 mM NH₄OAc elektrolit bileşimine sahip ozelti ile ampisilin enantiyomerlerinin ayırımında elektrik alanın etkisi incelenmiştir. Ayrım için farklı şiddetlerde (5, 10, 15 kV) elektrik alanı voltaj olarak uygulanmıştır. Ayrımın en iyi 10 kV voltajda oluşan elektrik alanı ortamında olduğu saptanmıştır. şekil 4.36, 4.37 ve 4.38' de sırasıyla 5,10 ve 15 kV için enantiyomerlerin ayırımı grlmken, şekil 4.39' da ise uygulanan tüm elektrik alanı uygulamalarının çakışmış şekli görülmektedir.

5 kV olarak uygulanan elektrik alan enantiyomerik ayırımaya yeterli EOF oluşturamadığından D- ve L-enantiyomerleri birbirinden ayrılamamıştır. Elektrik alanının 10 kV' a çıkarılmasıyla ise enantiyomerlerin ayırımı başarılı bir şekilde gerçekleştirilmiştir. Uygulanan elektrik alanının 15 kV' a çıkarılmasıyla D- ve L-enantiyomerleri birbirinden yine ayrılmıştır. CE sistemlerindeki en büyük sorun Joule ısınmasıdır. Kolonda SDS gibi yüklü yalancı bir sabit faz kullanılması

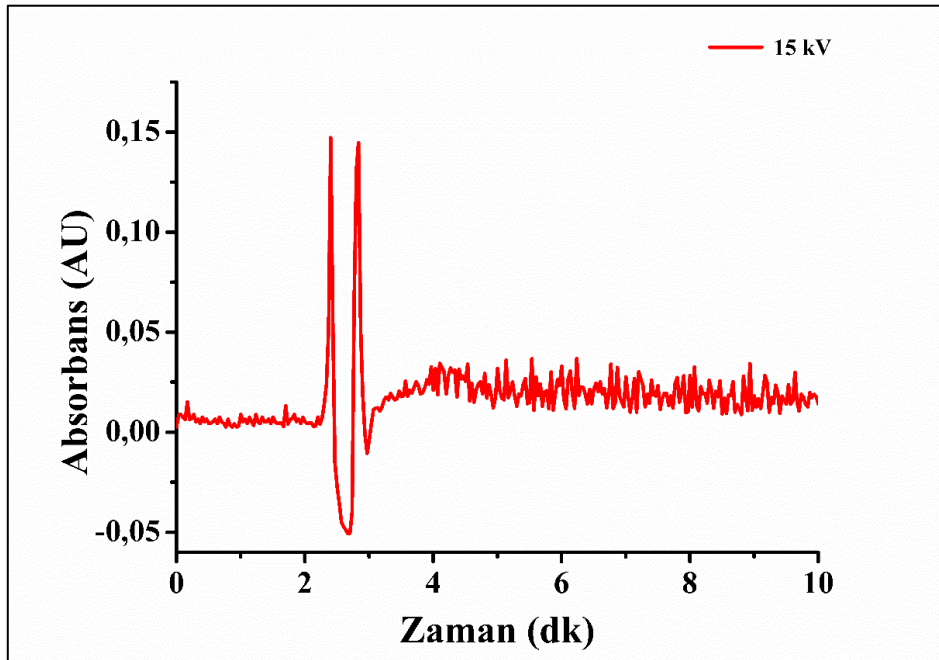
uygulanan elektrik alanı sonucunda fazla akım oluşmasına sebep olur. Bu da joule ısınmasına yol açar. Bu sebeple çalışmalar 10 kV' da yürütülmüş ve daha yüksek elektrik alan değerleri kullanılmamıştır.



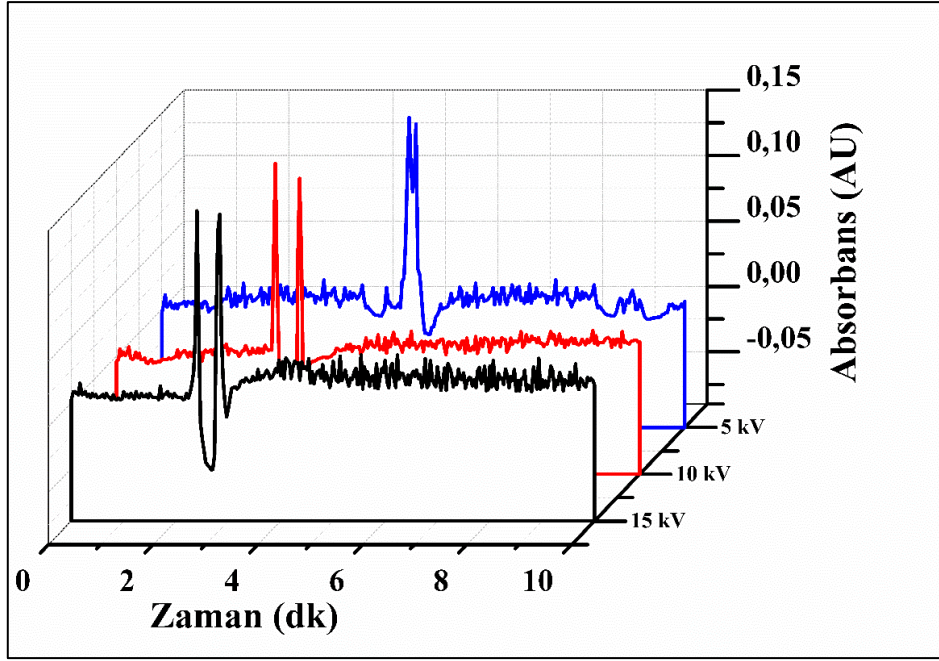
Şekil 4.36. D,L Ampisilin enantiyomerik ayırımına elektrik alanın etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 5 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar.



Şekil 4.37. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına elektrik alanın etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9,0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar.



Şekil 4.38. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına elektrik alanın etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9,0; Uygulanan elektrik alanı: 15 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar.

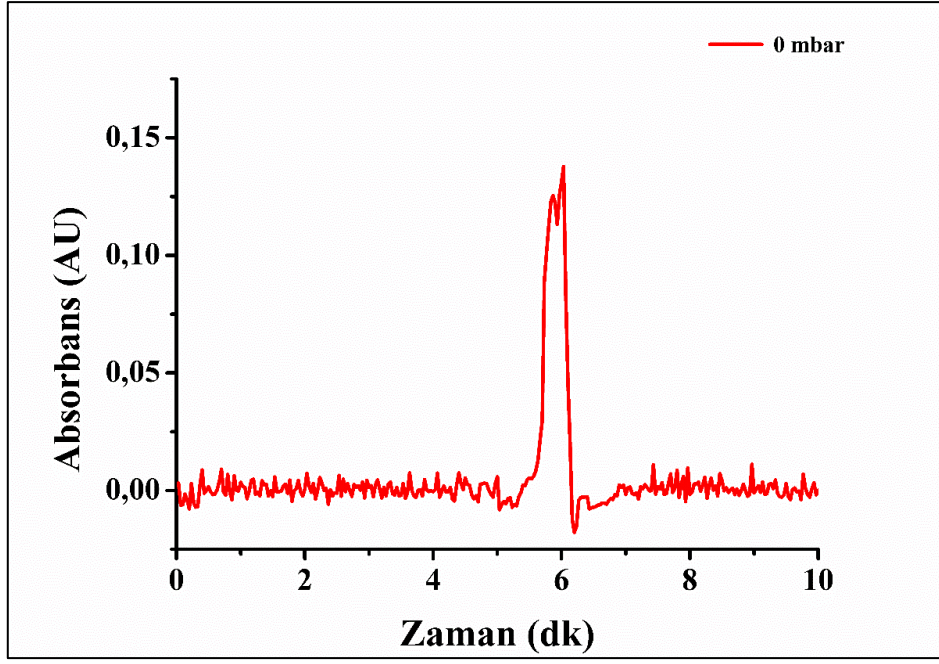


Şekil 4.39. Uygulanan elektrik alanının D,L Ampisilin enantiyomerik ayrımına etkisini farklı voltaj değerleri için gösteren elektroferogramların çakıştırılmış hali.

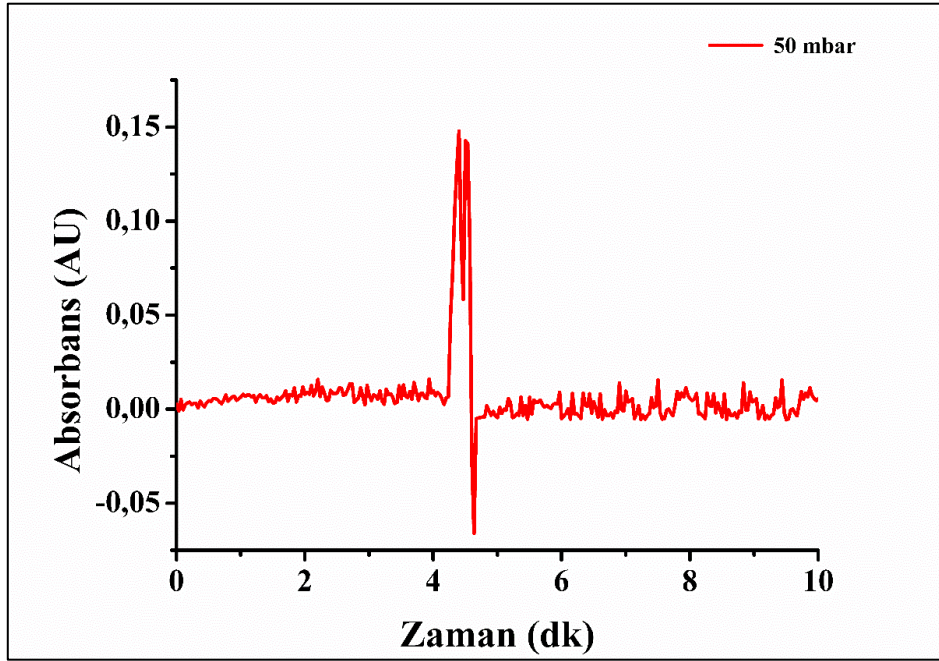
4.5.4. Ayrıma Basıncın Etkisi

Ampisilin enantiyomerlerinin kiral olarak ayrımında basıncın etkisi incelenmiştir. 25 mM SDS, 10 mM amino asit-metal kompleksi ve 10 mM NH₄OAc derişimindeki tamponla yapılan denemelerde sisteme sırasıyla 0, 50 ve 100 mbar basınç uygulanmıştır. En iyi ayrımlar 100 mbar basıncın uygulandığı ortamda elde edilmiştir. Şekil 4.40, 4.41 ve 4.42' de sırasıyla 0, 50 ve 100 mbar basınç uygulanmasıyla enantiyomerlerin ayrımı gösterilirken, Şekil 4.43' de farklı basınç uygulamalarının çakışmış hali görülmektedir.

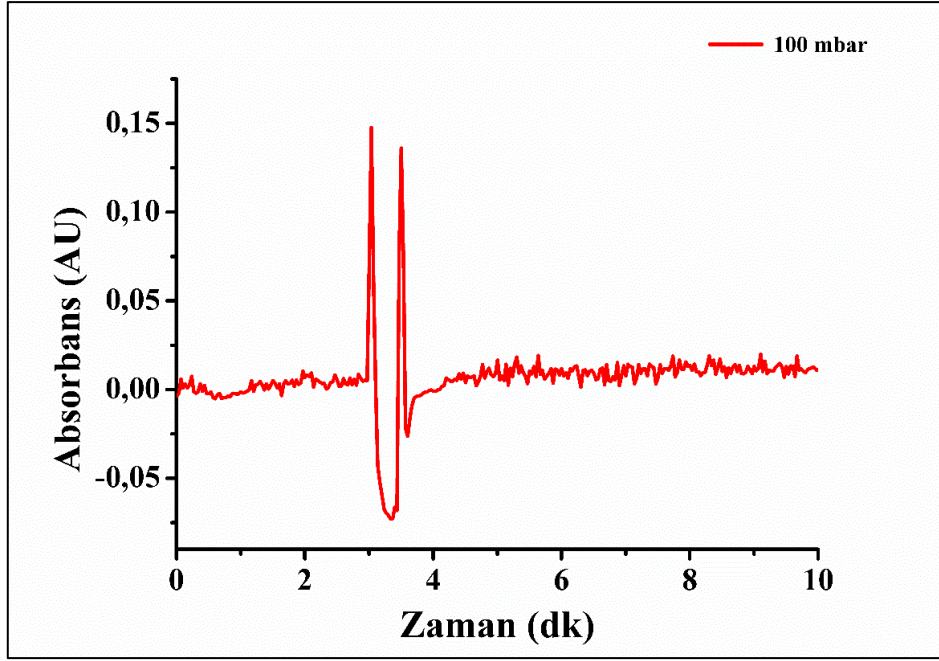
Kolon sistemine sadece elektrik alan uygulanmasıyla D,L Ampisilin enantiyomerlerinde herhangi bir ayrım görülmemiştir. Sisteme 50 mbar basınç uygulandığında ise akış artmış ve D,L Ampisilin enantiyomerlerinin kolon içerisinde alıkonma zamanları azalmış ancak yeteri kadar ayrım yine sağlanamamıştır. Kolona 100 mbar basınç uygulanması ile de D,L Ampisilin enantiyomerlerinin alıkonma süresi daha da azalmış ve etkin bir şekilde birbirinden ayrılmışlardır. Basınç uygulamalarında misellerin yapılarının anlık olarak bozulabileceği düşünüldüğünden çalışmalar en fazla 100 mbar basınç ile sınırlandırılmıştır.



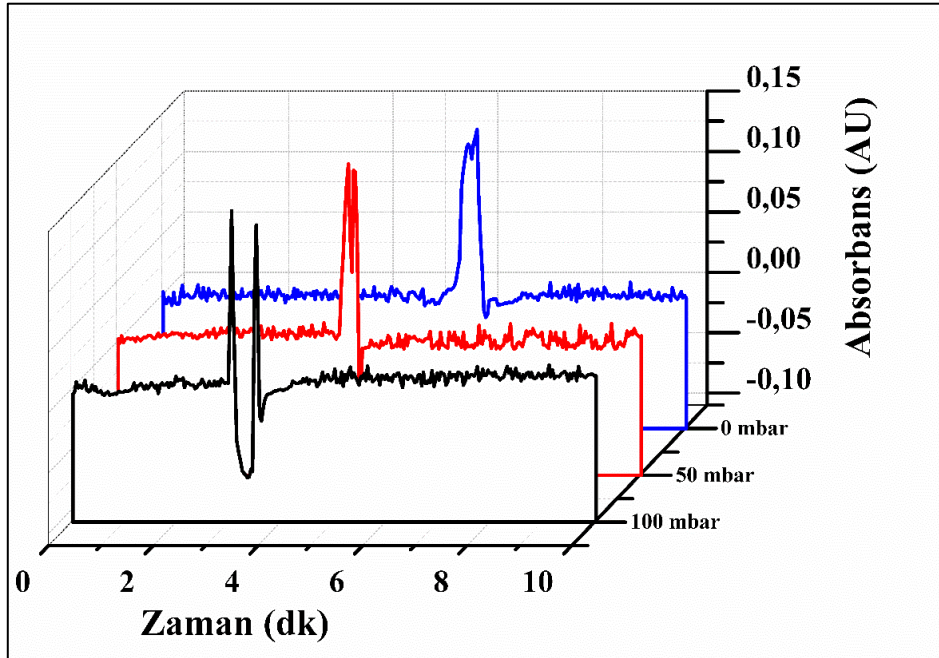
Şekil 4.40. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayrımına basıncın etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 0 mbar.



Şekil 4.41. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayrımına basıncın etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 50 mbar.



Şekil 4.42. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına basıncın etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar.



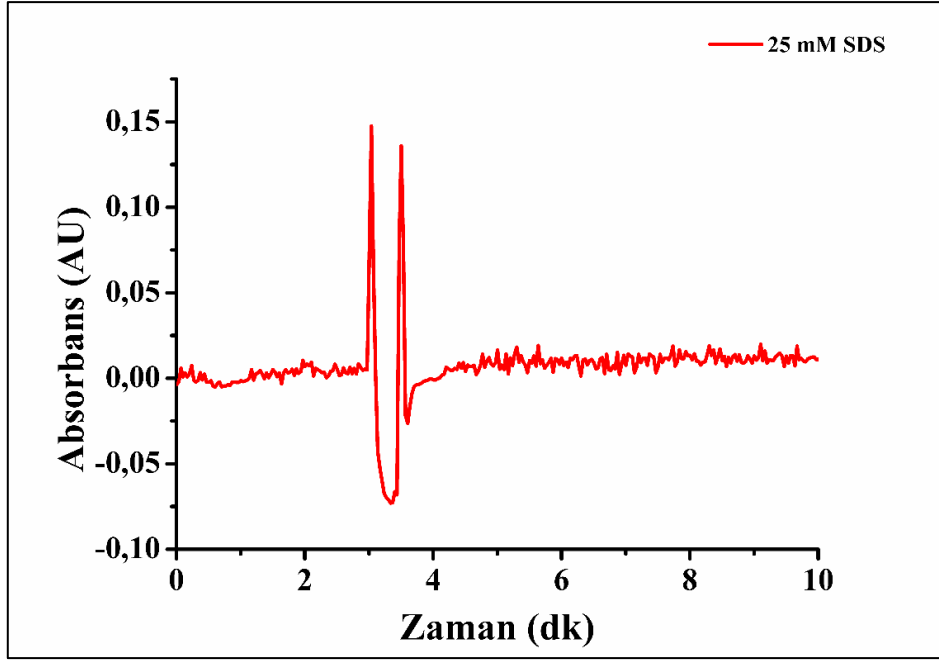
Şekil 4.43. Uygulanan farklı basınç değerlerinin D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına etkisini gösteren elektroferogramların çakıştırılmış hali.

4.5.5. Ayrıma Organik Çözücünün Etkisi

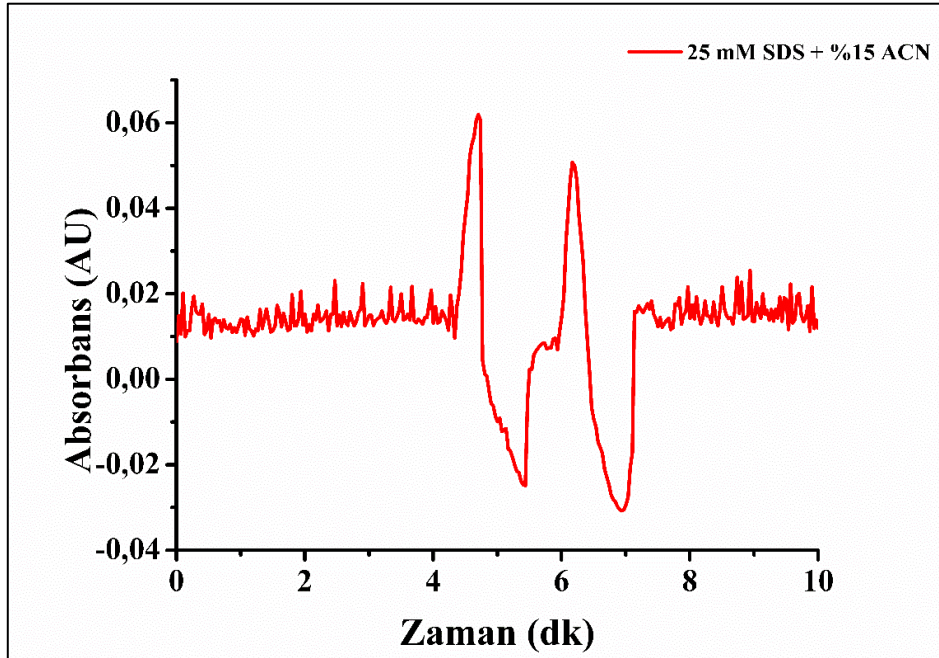
Su ile karışabilen organik çözücüler (kısa zincirli alkoller, asetonitril gibi) yüzey aktif maddelerin kritik misel derişimini arttırır ve yeterince yüksek derişimlerde ise misel oluşumunu engeller [107-110].

Misellerin kararsızlığı normal kompozisyon varyasyon aralığını < % 25 (v / v) organik çözücü ile sınırlandırır. Seçicilikteki değişiklikler organik çözücülerin elektrolit çözeltisinin karakteristik solvofobik özelliklerini değiştirmesinden kaynaklanabilmektedir.

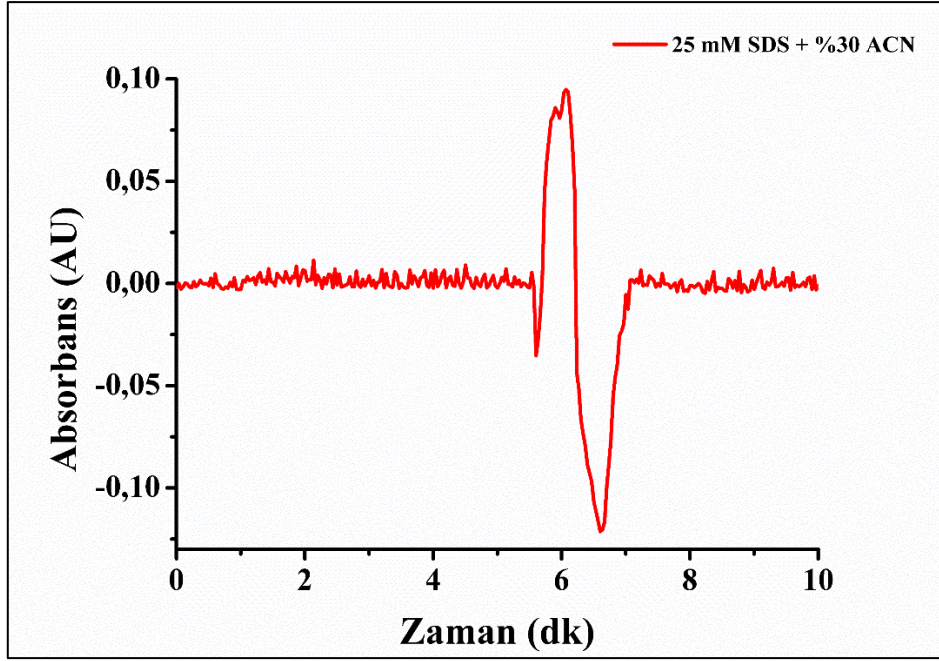
ACN miktarının artmasıyla EOF azalır. Bu nedenle ayrımı gerçekleşen türler daha fazla alıkonmaya uğrar. Ayrımı gerçekleştiren tampon çözelti içerisine hacimsel olarak %15 olacak şekilde ACN eklenmesiyle EOF azaldığından enantiyomerlerin alıkonma süreleri artmıştır. Tampon çözeltinin solvofobik özelliği değiştirdiğinden dolayı pikler yayvan bir şekilde gelmeye başlamıştır. ACN miktarının hacimsel olarak %30' a çıkarılması ile de EOF oldukça azalmış ve türlerin alıkonmaları artmıştır. Bunun yanı sıra ACN miktarının %30' a çıkarılmasıyla misel yapıları da bozulmuştur. Bu durumda kolon içerisinde bulunan tamponda herhangi bir sabit faz bulunmadığından enantiyomerler birbirinden ayrılmamıştır. Farklı organik çözücü oranlarının D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına etkisi Şekil 4.44, 4.45 ve 4.46' da gösterilirken, Şekil 4.4' de ise D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımında farklı ACN hacim değerleri için elde edilen elektroferogramların çakıştırılmış hali görülmektedir.



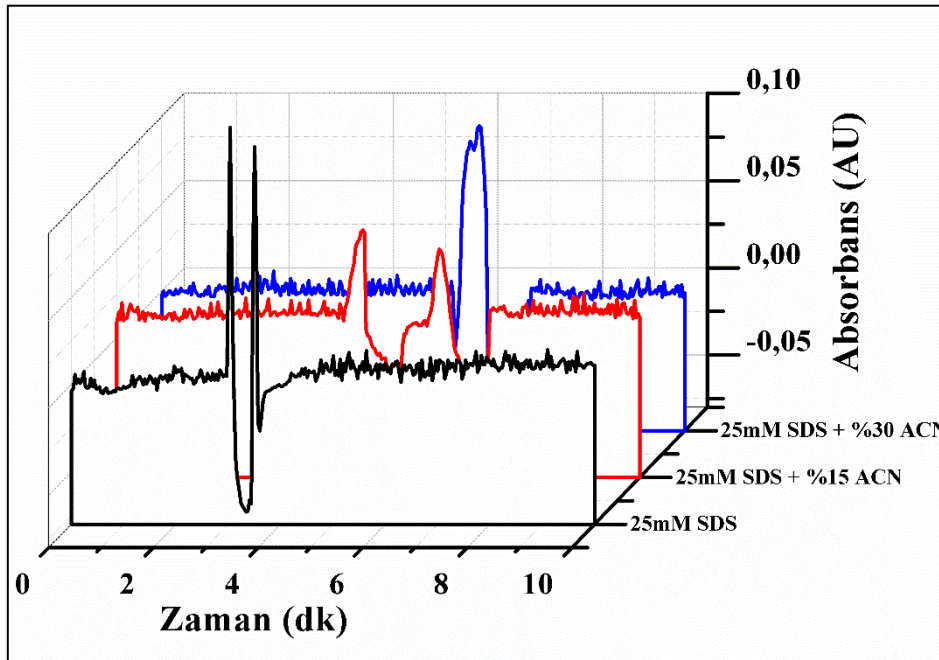
Şekil 4.44. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına organik çözücü oranının etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar; Organik çözücü ACN oranı: %0.0.



Şekil 4.45. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına organik çözücü oranının etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar; Organik çözücü ACN oranı: %15.0.



Şekil 4.46. D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına organik çözücü oranının etkisi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar; Organik çözücü ACN oranı: %30.0.

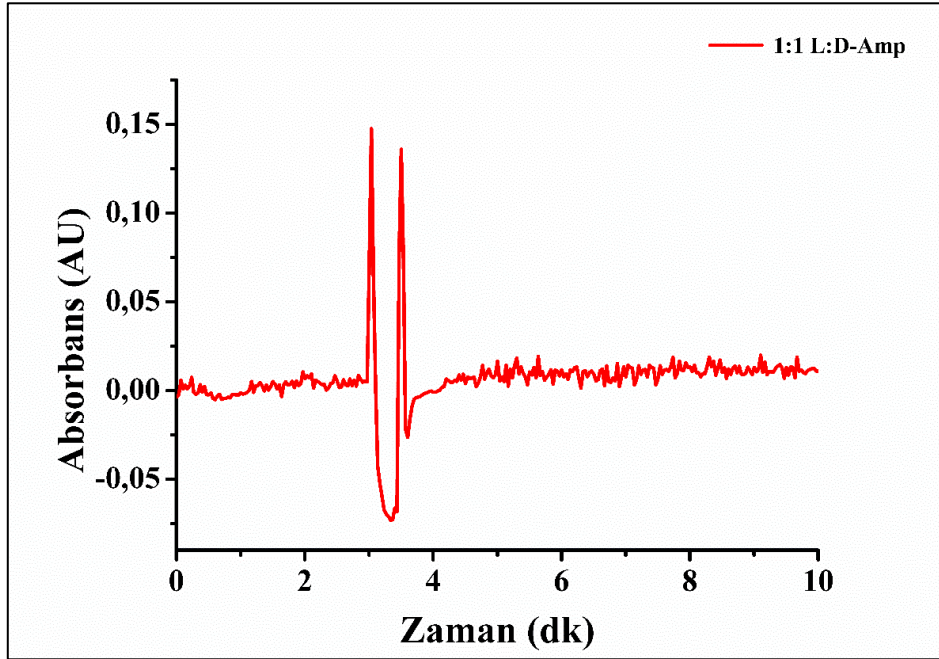


Şekil 4.47. Organik çözücü oranının D,L Ampisilinin enantiyomerik ayırımına etkisini farklı ACN hacim değerleri için gösteren elektroferogramların çakıştırılmış hali.

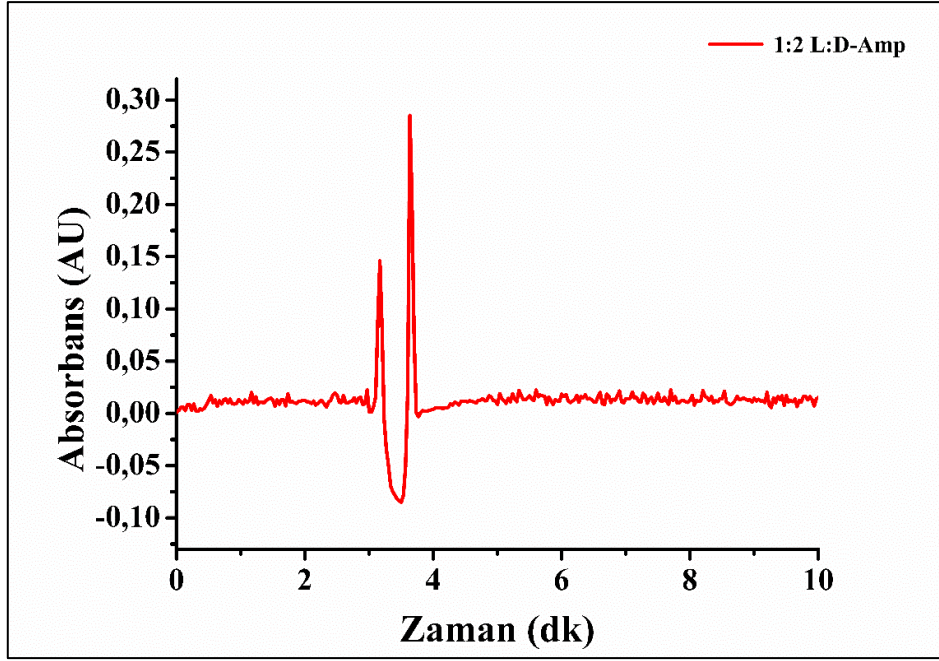
4.5.6. D-Ampisilin ve L-Ampisilin Oranının Değişiminin İncelenmesi

D,L Ampisilin oranları değiştirilerek optimize edilen koşullarda enantiyomerlerin ayrımı incelenmiştir. L-Ampisilin oranı sabit tutularak yapılan incelemelerde D-Ampisilin örnek miktarı öncelikle L-Ampisilinle aynı alınmış, sonraki incelemelerde ise derişimi L-Ampisiline göre iki kat ve üç kat artırılarak analizler yapılmıştır.

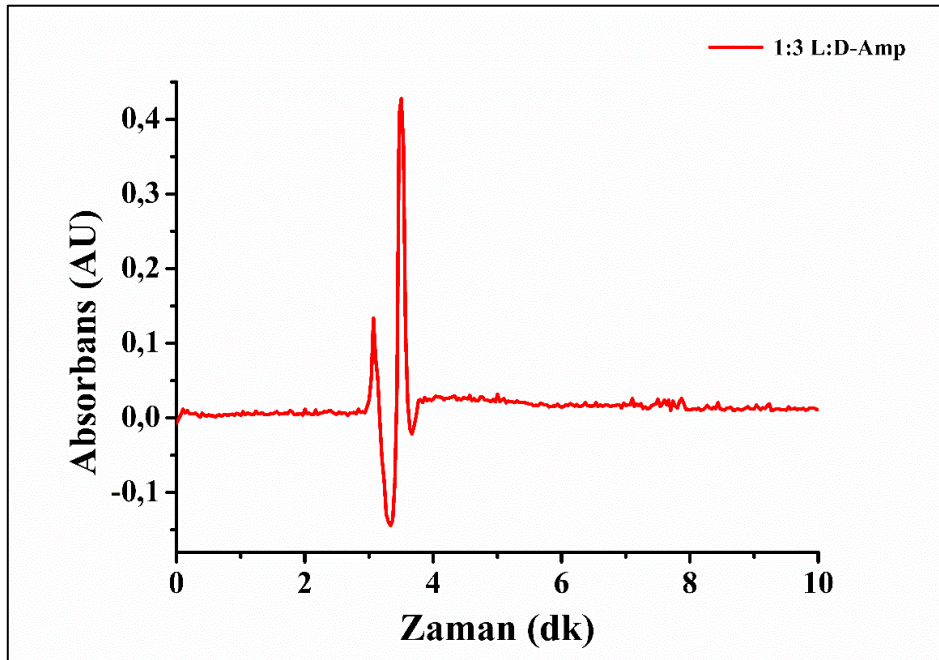
Misellerin hidrofobik kısmıyla L-Lys amino asidinin uzun zincirli $-(CH_2)_4$ grubu hidrofobik-hidrofobik, amino asidin amino grubu ve Cu^{+2} iyonlarıyla da elektrostatik etkileşim içerisindedir. Bu sebeple $Cu(II)$ anyon gibi göç etmektedir [91]. D-enantiyomerinin artan derişimleriyle ikinci sinyalin artması, bu ortamda meydana gelen kiral ayrımlarda D-enantiyomerinin $Cu(L-Ligand)_2$ kompleksiyle ligand değişimi sırasında anlık olarak oluşturduğu $Cu(L-Ligand-D-Amp)$ ' nin, L-enantiyomerinin anlık olarak oluşturduğu $Cu(L-Ligand-L-Amp)$ ' den daha kararlı bir kompleks oluşturduğu görülmektedir. Şekil 4.48, 4.49 ve 4.50 D,L Ampisilin oranının değişim etkisinin enantiyomerik ayrımında incelenmesini gösterirken, Şekil 4.51 ise D,L Ampisilin oranının değişim etkisinin enantiyomerik ayrımında incelenmesini farklı D:L oranları için gösteren elektroferogramların karşılaştırılmış halini göstermektedir.



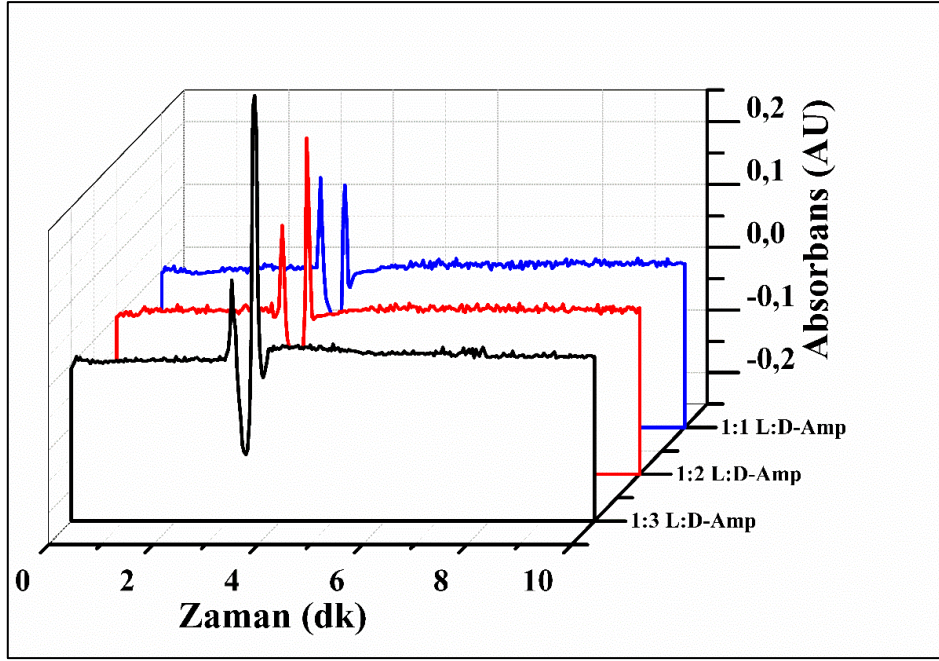
Şekil 4.48. D,L Ampisilin oranının değişim etkisinin enantiyomerik ayrımında incelenmesi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys- Cu^{+2} amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH_4OAc , pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar; D,L Amp oranı: 1:1 D:L.



Şekil 4.49. D,L Ampisilin oranının değişim etkisinin enantiyomerik ayırma da incelenmesi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar; D,L Amp oranı: 2:1 D:L.



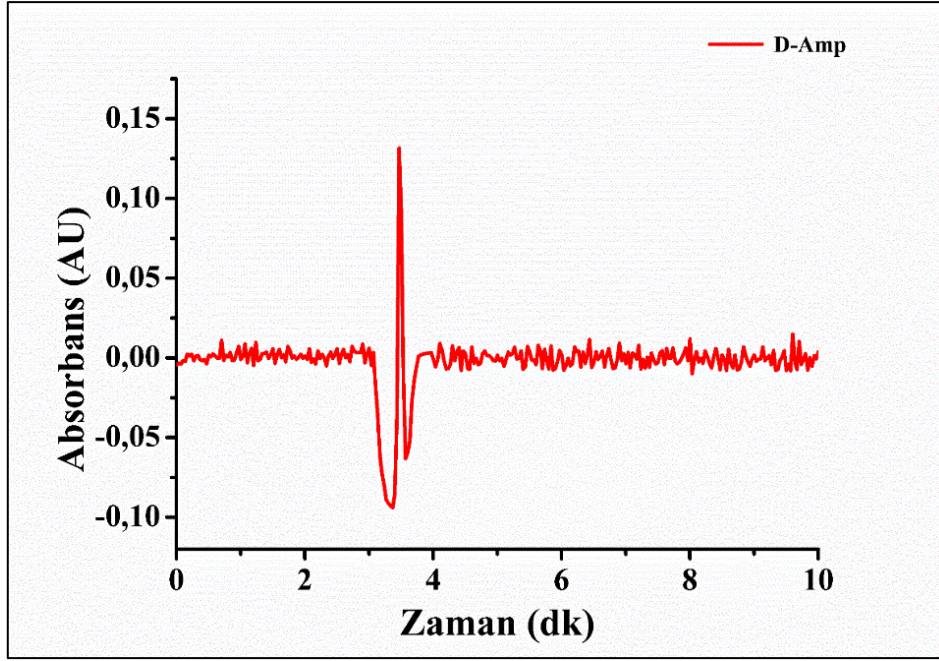
Şekil 4.50. D,L Ampisilin oranının değişim etkisinin enantiyomerik ayırma da incelenmesi. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu²⁺ amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar; D,L Amp oranı: 3:1 D:L.



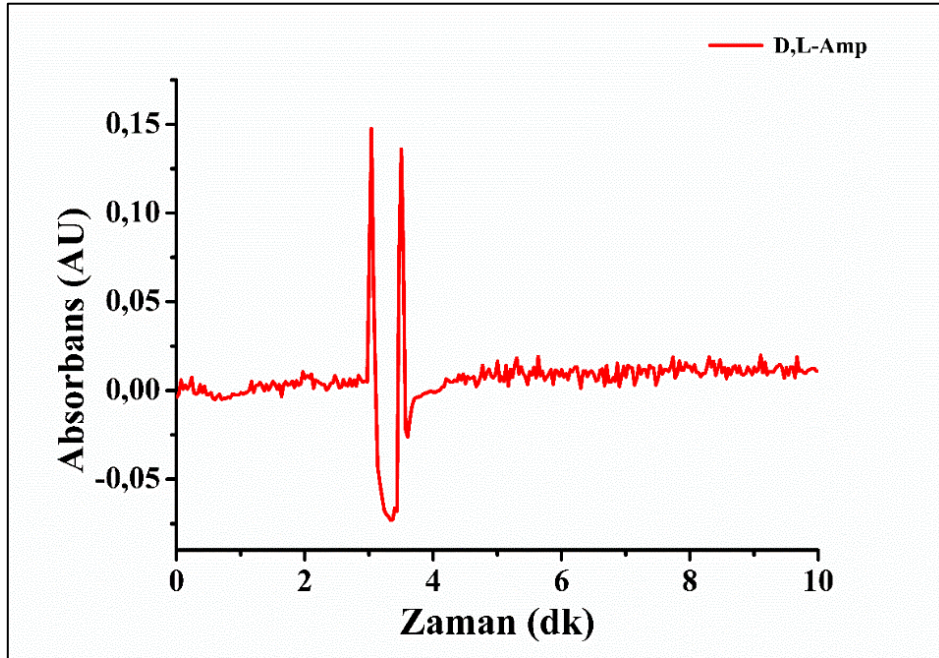
Şekil 4.51. D,L Ampisilin oranının değişim etkisinin enantiyomerik ayırma incelenmesini farklı D:L oranları için gösteren elektroferogramların çakıştırılmış hali.

4.5.7. D-Enantiyomeri ile Kinetik Analiz

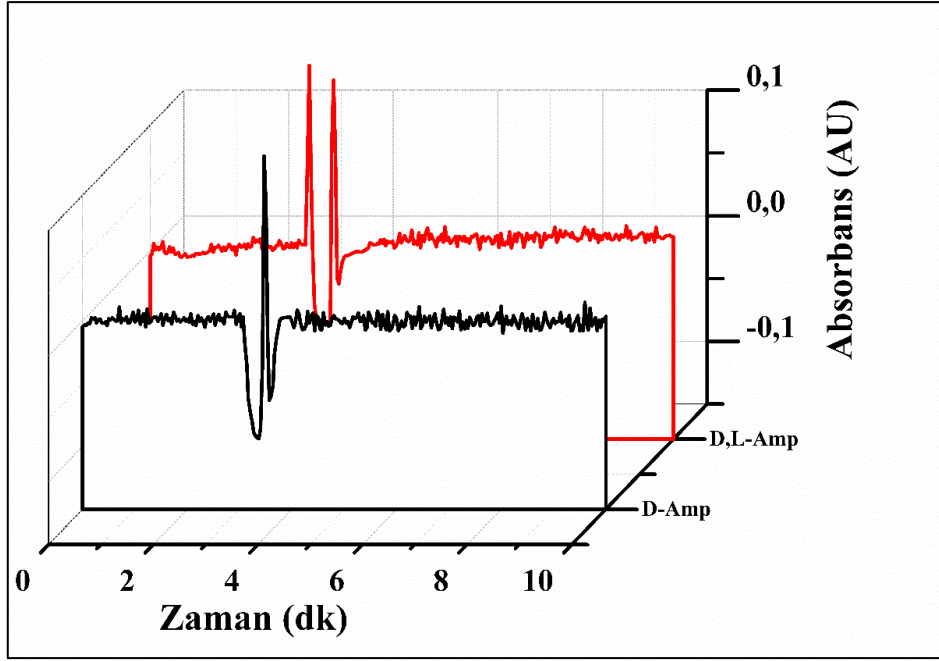
Enantiyomerlerin rasemik karışımlara göre daha etken aynı zamanda çok az ya da hiç yan etkisi bulunmamasından dolayı enantiyomerik saf bileşiklerden oluşan ilaçlara her geçen gün ilgi artmaktadır. Bu sebeple tek izomerlerin geliştirilmesi ve yenilenmesi için farmasötik alanda büyük bir uğraş verilmektedir. Bu amaçla ampisilin örneğinin optimize edilen koşullarda tek bir enantiyomer türü tespiti ve D,L Ampisilin enantiyomer karışımindan oluşan iki tür enantiyomerin tespiti yapılmıştır. Şekil 4.52 ve 4.53 sırasıyla tek bir enantiyomer ve iki tür enantiyomere ait sinyalleri verirken, Şekil 4.54 bu iki analizin çakışmış halini göstermektedir. Elde edilen sonuçlar; analiz sırasında örnek olarak tek bir enantiyomer kullanımında tek bir sinyal, iki tür enantiyomer kullanımında ise iki sinyal alındığı göstermektedir.



Şekil 4.52. Tek tür enantiyomer tipinin tespiti. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9,0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar; Örnek: D-Amp.



Şekil 4.53. İki tür enantiyomer tipinin tespiti. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9,0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar; Örnek; D,L Amp.

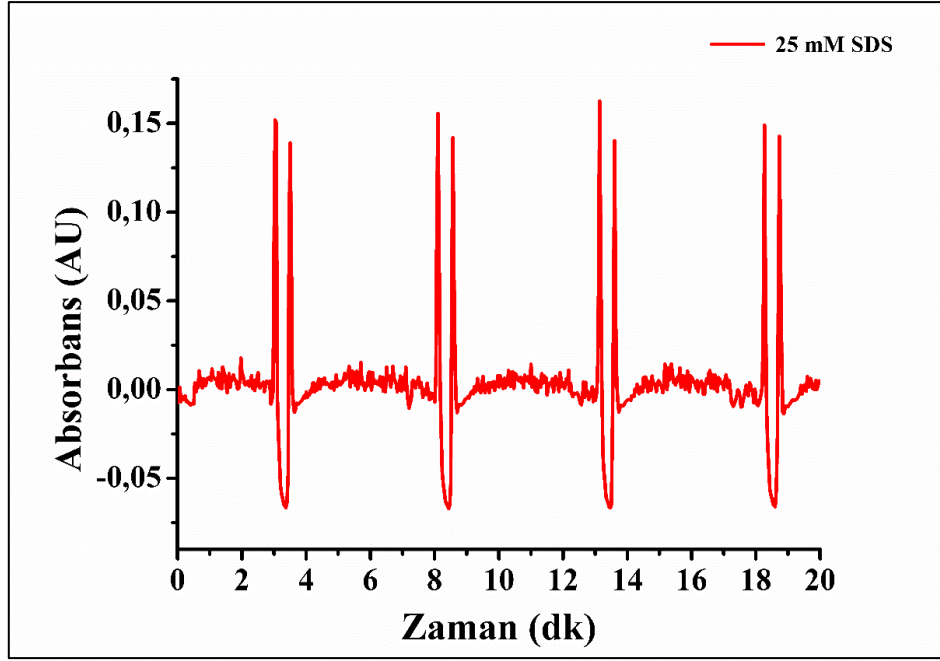


Şekil 4.54. Tek tür ve iki tür enantiyomer tipinin tespiti için gösterilen elektroferogramların çakıştırılmış hali.

4.5.8. Tekrar Kullanılabilirlik Çalışmaları

SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin bulunduğu çözelti ile optimize edilen koşullarda D,L Ampisilinin enantiyomerik ayrımı için tekrar kullanılabilirlik çalışmaları yapılmıştır. CEC sistemine D,L Amp örnekleri tekrarlı (4 kez) bir şekilde enjekte edilmiştir. Söz konusu ayrımları gösteren elektroferogram Şekil 4.55’ de görülmektedir.

CEC sistemine tekrarlı olarak enjekte edilen her bir D,L Amp sinyallerinin alıkonma zamanları, pik genişlikleri ve seçicilik faktörleri birbiriyle uyumluluk göstermektedir. Bu bulgular Bölüm 4.6’ daki kromatografik ayırma gücü hesaplamalarıyla elde edilmiştir.

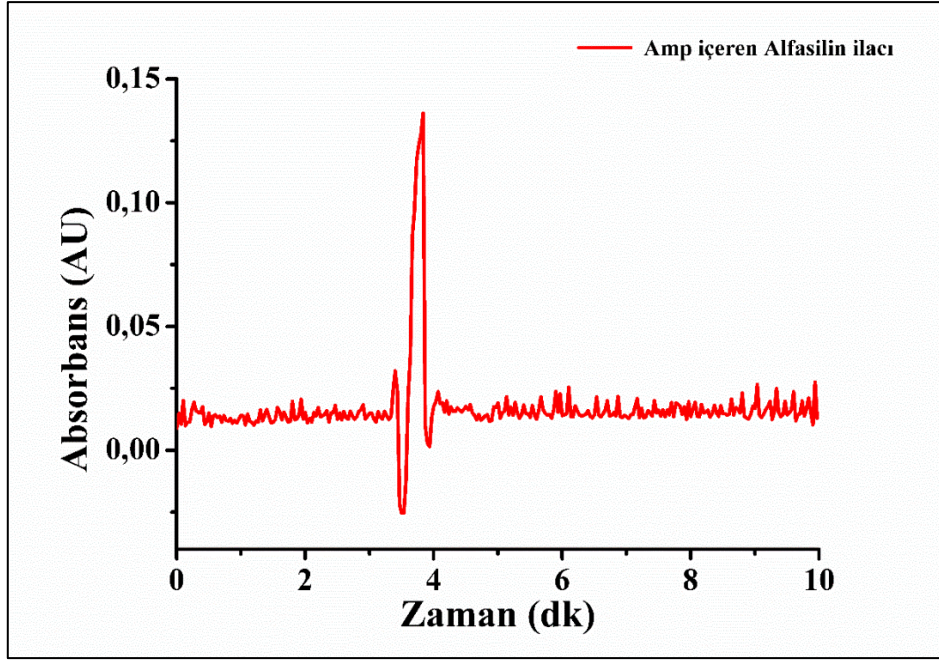


Şekil 4.55. D,L Ampisilin enantiyomerik ayrımı için kullanılan SDS bazlı misel çözeltilerinin tekrar kullanılabilirliğini gösteren elektroferogram. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar; dört tekralı ölçüm.

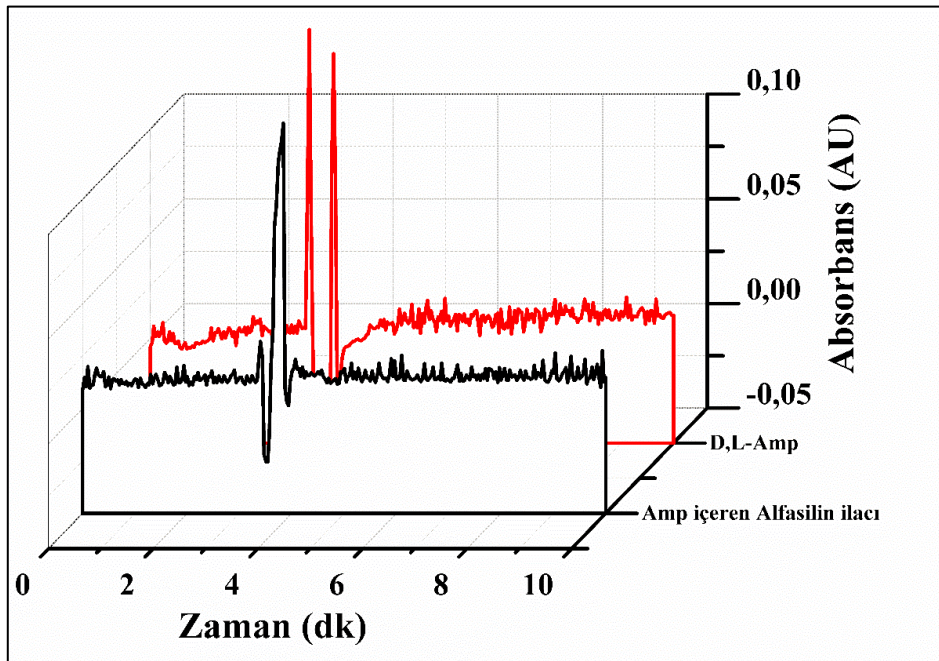
4.5.9. Gerçek Örnekten (Alfasilin Antibiyotiği) Analizler

Enantiyomerikçe saf bileşiklerin elde edilmesi ilaç endüstrisi için oldukça önem arz etmektedir. Ancak piyasada satılan ilaçların birçoğu rasemat veya diastomer olarak pazarlanmaktadır. Bu amaçla optimize edilen koşullarda SDS bazlı misel kompleks çözeltisiyle piyasada satılan ampisilin etken maddesi içeren Alfasilin örneği CEC sistemine enjekte edilmiştir. Bu ilaca ait elektroferogram Şekil 4.56' da görülürken, Şekil 4.57' de ise bu örnek ile deneylerde kullanılan 1:1 D,L Amp içeren örneklere ait elektroferogramlar birlikte görölmektedir.

İki farklı örneğe ait elektroferogramlara bakıldığında Alfasilin antibiyotiğinde bulunan D-enantiyomerine ait sinyal, D,L Ampisilin örneğinde bulunan D-enantiyomerine ait sinyale benzemektedir. Aynı zamanda bu örneğe ait elektroferogramda çok az bir miktarda L-enantiyomerine rastlanmıştır.



Şekil 4.56. Alfasilin antibiyotik örneğinin enantiyomerik saflığının SDS bazlı misel uygulanarak tespit edilmesini gösteren elektroferogram. SDS derişimi: 25 mM; L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi derişimi: 10 mM; Tampon çözelti derişimi: 10 mM NH₄OAc, pH 9.0; Uygulanan elektrik alanı: 10 kV; Uygulanan basınç: 100 mbar; Örnek: Amp içeren Alfasilin ilacı.



Şekil 4.57. Alfasilin antibiyotik örneğinin enantiyomerik saflığının SDS bazlı misel uygulanarak tespit edilmesini gösteren elektroferogram ile 1:1 oranında D,L Ampisilinin enantiyomerik ayrımı gösteren elektroferogramın karşılaştırılmış hali.

4.6. Kromatografik Ayrım Gücü Hesaplamaları

SDS bazlı misel çözeltileriyle, D,L Amp bileşiğinin enantiyomerik ayrımı için yapılan tüm çalışmalar sonucunda elde edilen elektroferogramlardan yola çıkılarak enantiyomerlerin alıkonma zamanlarıyla ayırıcılık (R_s) ve seçicilik faktörleri (α) Eşitlik 4.1 ve 4.2 kullanılarak hesaplanmıştır [111].

$$R_s = (t_D - t_L) / (w_{1,2D} + w_{1,2L}) \quad (4.1)$$

$$\alpha = (t_D / t_L) \quad (4.2)$$

Bu denklemlerdeki t_D ve t_L D- ve L-enantiyomerleri için alıkonma zamanlarını gösterirken $w_{1,2D}$ ve $w_{1,2L}$ ise D- ve L-enantiyomerlerinin maksimum pik yüksekliğinin orta noktasındaki pik genişliklerini göstermektedir. Tüm enantiyomerik ayrımlar için elde edilen R_s ve k değerleri Çizelge.4.3' de görülmektedir.

Enantiyomerik ayırım için farklı pH koşullarında yapılan ayırım işlemlerinde pH 7.0 ve 8.0 de etkin bir ayırım görülmediğinden R_s değerleri hesaplanmamıştır. pH 9.0' da ise enantiyomerik ayırım başarılı bir şekilde gerçekleşmiştir. Hesaplanan R_s değerinin 3.47 olması da bu durumu doğrulamaktadır.

Farklı elektrik alanının enantiyomerlerin ayırımına etkisi incelendiğinde, CEC sitemine uygulanan 5 kV elektrik alanda herhangi bir ayırım görülmemiştir. 10 kV elektrik alanda ise iyi bir ayırım görülmüş ve hesaplanan R_s değeri bu durumu doğrulamıştır. Elektrik alan şiddetinin 15 kV' a çıkarılmasıyla EOF hızlandığından dolayı enantiyomerlerin alıkonma süreleri azalmıştır ve R_s değeri uygulanan 10 kV elektrik alana göre daha düşük bir değer (2.59) olarak elde edilmiştir.

Enantiyomerik ayırım için 10 kV elektrik alan ile sisteme sırasıyla 0, 50 ve 100 mbar basınç uygulanmıştır. 0 ve 50 mbar' da enantiyomerler birbirinden ayrılmadığından R_s değerleri hesaplanmamıştır. 100 mbar' da ise etkin bir ayırım görülmektedir.

Farklı SDS bazlı çözeltilerde yapılan enantiyomerik ayrımlarda SDS derişiminin 5.0 mM olduğu çözeltide herhangi bir ayırım görülmemiştir. Bunun nedeni bu derişimin kritik misel derişimi altında olmasıdır. 10 mM SDS bazlı çözeltide R_s değeri 1.36 iken 25 mM SDS bazlı çözeltide ise bu değer 3.47 dir. Bu değerler birbiriyle karşılaştığında 25 mM SDS bazlı çözeltinin ayırıcılığının daha iyi olduğu görülür.

50 mM SDS derişimine sahip çözeltide büyük agregatların oluşmasından dolayı türlerin yalancı sabit fazda alıkonma süresi artmış ve birbirinden ayrılamadıklarından dolayı R_s değeri hesaplanmamıştır.

Farklı hacimlerde tampon çözeltiye eklenen organik çözücünün ayrımı kötü etkilediği yapılan deneysel sonuçlarla belirlenmiştir. R_s değeri artan ACN hacimleriyle muhtemel misel yapısının bozulması sebebiyle düşmüştür.

Aynı bileşime sahip tampon içerisinde farklı D,L Amp derişimleriyle yürütülen deneysel çalışmalarda D- ve L-enantiyomerlerinin alıkonma zamanları birbirleriyle hemen hemen aynıdır. Alıkonma zamanlarıyla hesaplanan R_s değerleri 1:1, 2:1 ve 3: 1 D:L oranlarında sırasıyla 3.47, 3.51 ve 3.25 olarak bulunmuştur.

Amp içeren Alfasilin ilacı kolon sisteminine enjekte edilmiş ve enantiyomerlerin ayrımı için hesaplanan R_s değeri 1.09 olarak elde edilmiştir. Bu değere bakıldığında ayrımın çok etkin olmadığı görülür.

Tekrar kullanılabilirlik çalışmaları için 25 mM SDS derişimine sahip çözelti elektrolit çözeltisi olarak kullanılmıştır. Dört tekrarlı ölçüm için hesaplanan R_s değerleri birbirine yakın olduğundan D,L Amp örneği için optimize edilen koşullarda hazırlanan 25 mM SDS bazlı elektrolit çözeltisinin yalancı sabit faz olarak tekrar kullanılabilir olduğu görülmektedir.

Çizelge 4.3. Farklı koşullarda gerçekleştirilmiş olan enantiyomerik ayrımlara ait t_D , t_L , R_s ve α değerleri.

| | t_D | t_L | R_s | α |
|----------------------------|-------|-------|-------|----------|
| pH | | | | |
| pH 7.0 | 2.103 | 1.903 | - | - |
| pH 8.0 | 2.770 | 2.503 | - | - |
| pH 9.0 | 3.503 | 3.037 | 3.47 | 1.153 |
| Akım | | | | |
| 5 kV | 4.870 | 4.737 | - | - |
| 10 kV | 3.503 | 3.037 | 3.47 | 1.153 |
| 15 kV | 2.837 | 2.403 | 2.59 | 1.181 |
| Basınç | | | | |
| 0 mbar | 6.033 | 5.967 | - | - |
| 50 mbar | 4.503 | 4.403 | - | - |
| 100 mbar | 3.503 | 3.037 | 3.47 | 1.153 |
| SDS (mM) | | | | |
| 5.0 mM | - | - | - | - |
| 10 mM | 2.370 | 2.103 | 1.36 | 1.126 |
| 25 mM | 3.503 | 3.037 | 3.47 | 1.153 |
| 50 mM | 4.633 | 3.433 | - | - |
| Organik Çözücü | | | | |
| %0 ACN | 3.503 | 3.037 | 3.47 | 1.153 |
| %15 ACN | 6.170 | 4.703 | 2.31 | 1.312 |
| %30 ACN | - | - | - | - |
| D,L Oranı | | | | |
| 1:1 D:L | 3.503 | 3.037 | 3.47 | 1.153 |
| 2:1 D:L | 3.637 | 3.170 | 3.51 | 1.147 |
| 3:1 D:L | 3.503 | 3.070 | 3.25 | 1.141 |
| Amp içeren Alfasilin İlacı | | | | |
| Alfasilin | 3.837 | 3.403 | 1.09 | 1.127 |
| Tekrarlanabilirlik | | | | |
| 1. Analiz | 3.503 | 3.037 | 3.47 | 1.153 |
| 2. Analiz | 8.570 | 8.103 | 3.51 | 1.058 |
| 3. Analiz | 13.60 | 13.13 | 3.47 | 1.035 |
| 4. Analiz | 18.73 | 18.27 | 3.51 | 1.026 |

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

- D,L Ampisilin enantiyomerlerinin kiral ayrımı için kullanılan L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksinden oluşan kiral selektör-metal kompleksi, amino asit olarak L-Lys' nin, merkez metal olarak Cu⁺² iyonunun UV-VIS spektrometresiyle belirlenen 2:1 mmol oranında kullanılmasıyla organik faz içeren sulu çözeltide sentezlenmiştir.
- L-Lys amino asidi ve L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksinin FTIR-ATR spektroskopisi ile yapılan karakterizasyon çalışmalarından L-Lys amino asidine ait 2947 cm⁻¹ deki –N-H gerilme bandı ve 1625 cm⁻¹ deki –COOH grubuna ait ν (C=O) gerilme bandının, kompleksleşme işleminin ardından -N-H gerilme bandının 1632 cm⁻¹ e ve ν (C=O) gerilme bandının 3295 cm⁻¹ e kayması amino asit-metal koordinasyonunun gerçekleştiğini göstermektedir.
- D,L Ampisilin enantiyomerlerinin ayrımının misel elektrokinetik kapiler kromatografi yöntemi kullanılarak gerçekleşmesi için kritik misel derişimi tespitine yönelik, derişimi 2.0, 3.0, 5.0, 8.0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 ve 50 mM olan SDS çözeltileri hazırlanmış ve CEC sistemi kullanılarak akım yoğunluğu yöntemiyle kritik misel derişimi 8.68 mM olarak tespit edilmiştir.
- Kritik misel derişimini belirlemek için kullanılan SDS bazlı çözeltilere 10 mM derişime sahip olacak şekilde amino asit-metal kompleksi eklenmesiyle hazırlanmış olan SDS-L-Lys-Cu⁺² misel kompleks çözeltilerinin CEC sistemi kullanılarak akım yoğunluğu yöntemiyle kritik misel derişimi 9.85 mM olarak tespit edilmiştir. Elde edilen sonuçlarla ortama ilave edilen L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksinin CMC' yi değiştirdiği belirlenmiştir.
- Kritik misel derişimi üzerinde olan 10, 25 ve 50 mM derişimdeki SDS çözeltileri seçilerek mikroyapısal morfolojik karakterizasyon çalışmaları yüksek kontrastlı geçirimli elektron mikroskobu (CTEM) ve zeta boyut ve potansiyel analizörü kullanılarak yapılırken, 10, 25 ve 50 mM derişime sahip bu çözeltilere L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi eklenmesiyle oluşturulan SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin karakterizasyon çalışmaları ise yüksek kontrastlı geçirimli elektron mikroskobu (CTEM), zeta boyut ve potansiyel analizörü ve dinamik ışık saçılımı (DLS) spektrometresiyle yapılmıştır.

- Anyonik yüzey aktif madde olan SDS bazlı (10, 25 ve 50 mM) çözeltilerde oluşan misellerin CTEM ile yapılan mikroyapısal morfolojik karakterizasyonları sonucunda; 10 mM SDS bazlı çözeltide oluşan misellerin boyutlarının 25 mM SDS bazlı çözeltide oluşan misellerin boyutlarından büyük olduğu, 25 mM SDS bazlı çözeltide oluşan misellerin 50 mM SDS bazlı çözeltide oluşan misellere göre daha küçük olduğu ve 50 mM SDS çözeltisinde meydana gelen misel ortamında büyük agregatlar oluştuğu belirlenmiştir. CMC' nin üzerine çıkılmasıyla oluşan misellerin boyutlarının artan derişimle küçüldüğü, derişimin giderek artmasıyla ise hacimsel olarak büyük agregatların oluşumundan dolayı misel boyutlarının büyümeye başladığı saptanmıştır.
- 10 mM NH₄OAc ortamında aynı (10 mM) L-Lys-Cu⁺² derişimine sahip 10, 25 ve 50 mM SDS içeren çözeltilerde meydana gelen SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin CTEM ile yapılan mikroyapısal morfolojik karakterizasyonları sonucunda; SDS içeren çözeltilere L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi eklenmesiyle boyutların oldukça küçüldüğü, 10 mM SDS bazlı çözeltide oluşan misel komplekslerinin boyutlarının 25 mM SDS bazlı çözeltide oluşan misel komplekslerinin boyutlarından daha büyük olduğu, 25 mM SDS bazlı çözeltide oluşan misel komplekslerinin boyutlarının 50 mM SDS bazlı çözeltide oluşan misel boyutlarından daha küçük olduğu belirlenmiştir. Kompleksin farklı derişimlerde misellerin içine girmesiyle meydana gelen boyuttaki küçülmelerin, L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksinin bulunmadığı farklı derişimlerde ki misel çözeltilerinin boyutlarındaki değişimle doğru orantılı bir şekilde değiştii sonucuna varılmıştır.
- 10, 25 ve 50 mM SDS derişimine sahip çözeltilerde meydana gelen misellerin zeta boyut ve potansiyel analizörü kullanılarak yapılan karakterizasyon çalışmaları neticesinde sayıca ortalama boyutları sırasıyla 63.45, 51.84 ve 90.90 nm; polidispersite indeksleri sırasıyla 0.587, 0.481 ve 4.83; zeta potansiyelleri ise sırasıyla -70.1, -88.3 ve -67.30 mV olarak bulunmuştur. Elde edilen bulgularla SDS' in artan derişimleriyle misellerin boyutlarının CTEM sonuçlarıyla elde edilen boyutlarla tutarlı olduğu belirlenmiştir. Polidispersite indeksi en düşük olan SDS bazlı çözeltisinde en homojen çözelti ortamına ve en negatif zeta potansiyeline sahip olan 25 mM SDS bazlı çözelti olduğu saptanmıştır. Zeta potansiyel ölçümlerine bakıldığında artan SDS derişimiyle zeta potansiyelleri

doğrusal bir şekilde değişmemektedir. Bunun nedeni belirli bir SDS derişiminden sonra büyük agregatların oluşmasıdır.

- 10, 25 ve 50 mM SDS derişimine sahip çözeltilere 10 mM olacak şekilde eklenen L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi ile elde edilen SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin zeta boyut ve potansiyel analizörü kullanılarak yapılan karakterizasyon çalışmaları neticesinde ise sayıca ortalama boyutları sırasıyla 9.394, 8.818 ve 9.988 nm; polidispersite indeksleri sırasıyla 0.309, 0.227 ve 0.235; zeta potansiyelleri sırasıyla -13.4, -20 ve -12.9 mV olarak bulunmuştur. Polidispersite indeksi en düşük olan çözeltinin 25 mM SDS derişimine sahip olan çözelti olduğu bulunmuştur. Bu nedenle en homojen çözelti ortamı 25 mM SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin bulunduğu çözelti ortamıdır. Zeta potansiyelleri ise sadece SDS çözeltilerinin bulunduğu çözeltilere göre pozitif bir artış eğilimi göstermiştir. Bunun nedeni ise ortama eklenen amino asit-metal kompleksinin göreceli olarak pozitif yükler barındırmasıdır.
- L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksinin üç farklı derişimde (10, 25 ve 50 mM) hazırlanan misellerin içine girmesiyle meydana gelen morfolojik boyutlar, polidispersite indeksleri ve zeta potansiyellerinin, amino asit-metal kompleksinin bulunmadığı üç farklı derişimde (10, 25 ve 50 mM) hazırlanan misellerin boyutlarında, polidispersite indekslerinde ve zeta potansiyellerindeki değişimle doğru orantılı bir şekilde değiştiği sonucuna varılmıştır. Doğru orantılı bir şekilde değişim görülmesinin en önemli nedeni SDS bazlı çözeltilere aynı miktarda L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi eklenmesidir.
- 10, 25 ve 50 mM SDS derişimine sahip çözeltilere 10 mM olacak şekilde eklenen L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi ile elde edilen SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin aynı zamanda dinamik ışık saçılımı spektrometresiyle çözeltilerde meydana gelen küçük partiküllerden saçılan ışığın şiddetinin ve değişiminin ölçülmesi sonucunda parçacık büyüklüğü dağılımı sırasıyla 7.125, 6.707 ve 7.400 nm olarak belirlenmiştir. Analiz sonuçları zeta boyut analizörü ve CTEM ile elde edilen sonuçlarla tutarlılık göstermiştir.
- Yapılan karakterizasyon çalışmalarıyla ayrımlar için en uygun olabilecek çözeltinin 25 mM SDS ve 10 mM L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi derişimine sahip çözeltide olabileceği kanısına varılmıştır. Bunun en önemli

sebebi en negatif zeta potansiyeline, kiral ligand değişimini sağlayabilecek amino asit-metal kompleksinin ve SDS' lerin bir arada bulunduğu bu çözeltinin sahip olmasıdır. Ayrıca en homojen misel çözeltisi bu derişimde elde edilmiştir. Yapılan enantiyomerik ayrımlarla bu çıkarım doğrulanmıştır.

- Enantiyomerik ayırım için kullanılan elektrolit çözeltisi amonyum asetatın tamponlama yaptığı amino asit-metal kompleksinin bulunduğu SDS bazlı çözeltilerdir. Elektrolit çözeltisi kiral ligand değişimini gerçekleştirebilecek kiral selektör ve yalancı sabit fazı bir arada bulundurur.
- D,L Ampisilin enantiyomerlerinin ayırımına farklı ortam pH' ının (7.0, 8.0 ve 9.0) etkisini incelemek için kinetik çalışmalar yürütülmüş ve en etkin ayırım pH 9.0' da gözlenmiştir. pH 9.0' da etkin bir ayırımın görülmesinin sebebi Cu(L-Ligand)₂ kompleksi ile ligand değişimi sırasında D,L Ampisilin enantiyomerlerinin yarışmalı olarak bağlanmasıyla anlık olarak oluşan Cu(L-Ligand-D-Amp) ve Cu(L-Ligand-L-Amp) yapılarının arasında yük denkliliği olmasından dolayıdır.
- Yüzey aktif madde olan SDS ' in 5.0, 10, 25 ve 50 mM derişiminde amino asit-metal kompleksi içeren çözeltileri ile yürütölen kinetik analizlerde CMC altında olan 5.0 mM çözeltide yalancı sabit faz olarak davranan misellerin olmamasından dolayı herhangi bir ayırım gerçekleşmemiş, çözelti de SDS derişiminin 10 mM' a çıkmasıyla enantiyomerler ayrılmaya başlamış ve derişimin 25 mM' a çıkarılmasıyla D-ve L-enantiyomerleri birbirinden tamamen ayrılmıştır. 50 mM SDS ortamında ise büyük agregat oluşumları ayırımı engellemiştir. SDS derişiminin artmasıyla alıkonma süreleri artmaya başlamıştır. Bunun sebebi enantiyomerik türlerin misellerle etkileşime girmesinden kaynaklanmaktadır.
- Enantiyomerik ayırma uygulanan elektrik alanın etkisini incelemek üzere sisteme 5, 10 ve 15 kV elektrik alan uygulanması sonucunda, en iyi ayırım 10 kV değere sahip elektrik alan altında gerçekleşmiştir. 5 kV elektrik alan yeteri kadar EOF oluşturamadığından enantiyomerik ayırım sağlayamamıştır. 15 kV' da ise ayırım olmuş fakat, 10 kV' da daha etkin bir enantiyomerik ayırım elde edilmiştir.
- CEC sistemine uygulanan basıncın enantiyomerik ayırma etkisini incelemek üzere 0, 50 ve 100 mbar basınç değerleriyle yapılan analizlerde sadece 100 mbar basıncın uygulandığı analizlerde enantiyomerik ayırım gerçekleşmiştir.

Daha yüksek basınçlara çıkılmamasının nedeni misellerin yapısının artan basınçla anlık olarak bozulmasıdır.

- Tampona farklı hacimsel oranlarda organik çözücünün eklenmesiyle ayırımı kötüleştiği yapılan kinetik analizlerle tespit edilmiştir. Hacimsel olarak %15.0 oranında ACN eklenmesiyle ayırımın etkinliği azalmış, ACN oranının %30.0' a çıkarılmasıyla ise ayırım tamamen engellenmiştir. Organik çözücü eklenmesiyle EOF' un azalması, tamponun solvofobik özelliklerinin değişmesi ve yüksek miktarlarıyla misellerin yapısını bozması bunun sebebidir.
- Enantiyomerik ayırma D-Ampisilin ve L-Ampisilin farklı oranlarının eklenmesiyle sinyallerdeki değişim oranı incelenmiştir. Artan D-Ampisilin miktarlarıyla elektroferogramda ikinci sinyalin artması, D-Ampisilin Cu(L-Ligand)₂ kompleksiyle ligand değişimi sırasında anlık olarak oluşturduğu Cu(L-Ligand-D-Amp)' nin, L-Ampisilin anlık olarak oluşturduğu Cu(L-Ligand-L-Amp)' den daha kararlı bir kompleks oluşturduğunu göstermektedir.
- Örnek olarak sadece D-Amp' nin kullanılmasıyla tek tür enantiyomer tespiti, iki tür enantiyomerin kullanımıyla iki tür enantiyomer tespiti yapılmıştır. Elektroferogramlara bakıldığında iki örnekte de ortak olarak bulunan D-enantiyomerinin alikonma zamanının hemen hemen aynı olduğu bulunmuştur.
- 25 mM SDS ve 10 mM L-Lys-Cu⁺² derişimine sahip SDS-L-Lys-Cu⁺² misel komplekslerinin bulunduğu çözelti ile tekrarlı (dört) ölçümler sonucunda, bu çözeltinin ayırmlar için tekrar kullanılabilirliği belirlenmiştir.
- Etkin madde olarak ampisilin içeren Alfasilin ilacıyla yapılan kinetik analizlerde elektroferogramda belirgin olarak D-enantiyomeri görülmüş ve çok az bir miktar L-enantiyomeri tespit edilmiştir.
- D,L Ampisilin bileşiminin enantiyomerik ayırımı için SDS bazlı misel çözeltileriyle yapılan tüm kinetik analizler için ayırıcılık (R_s) değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlardan yola çıkılarak en etkin enantiyomerik ayırım 25 mM SDS, 10 mM L-Lys-Cu⁺² amino asit-metal kompleksi içeren 10 mM NH₄OAc tampon çözeltisiyle, pH 9.0 ortamında, 10 kV elektrik alan ve 100 mbar basınç uygulanması koşullarında gerçekleştirilmiştir.

- Sonuç olarak Kapiler elektroforezin (CE) yüksek etkinliği, kısa analiz süresi, analizlerde az miktarda çözelti gerektirmesi ve ucuz olması gibi üstün özellikleri kullanılarak misel elektrokinetik yöntemiyle ligand değişim mekanizmasının bir araya getirilmesiyle ampisilin D- ve L-enantiyomerlerinin ayrımı değişik parametreler altında incelenmiş ve ayırım için optimum koşullar belirlenerek D,L Ampisilin başarılı bir şekilde birbirinden ayrılmıştır.

6. KAYNAKLAR

- [1] Schmid, M. G., Gübitz, G., Chiral separation by ligand-exchange, *Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 30(2): 127-137, **2011**.
- [2] Apan, T. Z., Effects Of Magainin And Pexiganan As New Peptide Antibiotics, *Turk Hij. Den. Biyol. Derg.*, 61(1): 37-40, **2004**.
- [3] Bush, K., Beta-lactamase inhibitors from laboratory to clinic, *Clinical microbiology reviews*, 1(1): 109-123, **1988**.
- [4] Connors, K. A., Amidon, G. L., Stella, V. J., *Chemical stability of pharmaceuticals: a handbook for pharmacists*, John Wiley & Sons, New York, **1979**.
- [5] Pekcan, E. S., *Türkiye' de Kullanılan Parenteral Ampisilin Preparatlarının Kontrolü*, Farmasötik Kimya Programı Bilim Uzmanlığı Tezi, Ankara, **1980**.
- [6] Sekhon, B. S., Enantioseparation of chiral drugs—an overview, *Int. J. Pharm. Technol. Res.*, 2: 1584-1594, **2010**.
- [7] Escuder-Gilabert, L., Martín-Biosca, Y., Medina-Hernández, M., Sagrado, S., Cyclodextrins in capillary electrophoresis: recent developments and new trends, *Journal of Chromatography A*, 1357: 2-23, **2014**.
- [8] Zhao, Y., Xu, L., Chiral Separation of d,l-p-Hydroxyphenylglycine by Ligand Exchange Micellar Electrokinetic Capillary Chromatography, *Chromatographia*, 78(9): 717-721, **2015**.
- [9] Poole, C., *Essential Guides to Method Development in Capillary Electrophoresis*, Akademik press: Wayne State University, Detroit, MI, USA, 4581-4582, **2000**.
- [10] A. Ersöz, *Aletli Analiz Kitabı*, Anadolu Üniversitesi Yayınları, Eskişehir. **2010**.
- [11] Altria, K. D., Overview of capillary electrophoresis and capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 856(1–2): 443-463, **1999**.
- [12] Muijselaar, P. G., Otsuka, K., Terabe, S., Micelles as pseudo-stationary phases in micellar electrokinetic chromatography, *Journal of Chromatography A*, 780(1): 41-61, **1997**.
- [13] Rizvi, S. A. A., Do, D. P., Saleh, A. M., Fundamentals of micellar electrokinetic chromatography (MEKC) *European Journal of Chemistry*, 2(2): 276-281, **2011**.
- [14] Riekkola, M.-L., Wiedmer, S. K., Valkó, I. E., Sirén, H., Selectivity in capillary electrophoresis in the presence of micelles, chiral selectors and

- non-aqueous media, *Journal of Chromatography A*, 792(1–2): 13-35, **1997**.
- [15] Terabe, S., Otsuka, K., Ichikawa, K., Tsuchiya, A., Ando, T., Electrokinetic separations with micellar solutions and open-tubular capillaries, *Analytical Chemistry*, 56(1): 111-113, **1984**.
- [16] Tomás-Barberán, F., Capillary electrophoresis: a new technique in the analysis of plant secondary metabolites, *Phytochemical Analysis*, 6(4): 177-192, **1995**.
- [17] Davankov, V. A., Rogozhin, S., Ligand chromatography as a novel method for the investigation of mixed complexes: stereoselective effects in α -amino acid copper (II) complexes, *Journal of Chromatography A*, 60: 280-283, **1971**.
- [18] Gassmann, E., Kuo, J., Zare, R., Electrokinetic separation of chiral compounds, *Science*, 230(4727): 813-814, **1985**.
- [19] Kemper, N., Veterinary antibiotics in the aquatic and terrestrial environment, *Ecological indicators*, 8(1): 1-13, **2008**.
- [20] Kümmerer, K., Antibiotics in the aquatic environment—a review—part I, *Chemosphere*, 75(4): 417-434, **2009**.
- [21] Davies, J., Davies, D., Origins and evolution of antibiotic resistance, *Microbiology and molecular biology reviews*, 74(3): 417-433, **2010**.
- [22] Kurt, R., Aslım, B., Beyaztlı, Y., Yüksekdağ, Z. N., Ciltten izole edilen stafilkokların antibiyotik duyarlılıkları, B-laktamaz aktiviteleri ve plazmit dna içerikleri, *Türk Hij. Den. Biyol. Derg.*, 61(1-2-3): 15-24, **2004**.
- [23] Topal, M., Şenel, G. U., Topal, E. I. A., Erdal, Ö., Antibiyotikler ve kullanım alanları/Antibiotics and usage areas, *Erciyes Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 31(3), **2015**.
- [24] Akkan, A. G., Antibiyotiklerin sınıflandırılmaları, *Pratikte Antibiyotik Kullanımı Simpozyumu*, 2-3 Mayıs, İstanbul, 53-62, **1997**.
- [25] Mali, A. D., Bathe, R., Tamboli, A., Estimation of Ampicillin trihydrate in bulk and formulation by first order derivative area under curve UV-spectrophotometric methods, *International Journal of Advances in Scientific Research*, 1(5): 239-243, **2015**.
- [26] Injac, R., Kočevár, N., Štrukelj, B., Optimized method for determination of amoxicillin, ampicillin, sulfamethoxazole, and sulfacetamide in animal feed by micellar electrokinetic capillary chromatography and comparison with high-performance liquid chromatography, *Croatica Chemica Acta*, 82(3): 685-694, **2009**.
- [27] Doyle, F., Nayler, J., Smith, H., Stove, E., Some novel acid-stable penicillins, *Nature*, 191(4793): 1091-1092, **1961**.

- [28] Austin, K., Marshall, A., Smith, H., Crystalline modifications of ampicillin, *Nature*, 208(5014): 999-1000, **1965**.
- [29] Hou, J. P., Poole, J. W., The amino acid nature of ampicillin and related penicillins, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 58(12): 1510-1515, **1969**.
- [30] Hirsch, R., Ternes, T., Haberer, K., Kratz, K.-L., Occurrence of antibiotics in the aquatic environment, *Science of the Total Environment*, 225(1): 109-118, **1999**.
- [31] Yalap, K. S., Balcioğlu, I. A., Oksitetrasiklinin ileri oksidasyon ile arıtımına su bileşenlerinin etkisi, *ITU Journal Series E: Water Pollution Control*, 18, **2008**.
- [32] Solomons T. W. G., Fryle C. B., *Organik Kimya*, 7.Baskıdan çeviri, 5. Bölüm Stereokimya: Kiral moleküller, (çev: Yıldırım Y., Okay G.), Literatür yayıncılık, 185-205, **2010**.
- [33] Smith, M. B., March, J., *March's advanced organic chemistry: reactions, mechanisms, and structure*, stereochemistry, John Wiley & Sons, 136-138, **2007**.
- [34] Morrison, T. R., Boyd, N.R., *Organic Chemistry*, 2nd Ed, Allyn and Bacon, Boston, 83-84, **1966**.
- [35] Sheldon, R., *Chirotechnology* Marcel Dekker, *New York*, **1993**.
- [36] Merta, J., Stenius, P., Interactions between cationic starch and mixed anionic surfactants, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 149(1): 367-377, **1999**.
- [37] Nielsen, A. D., Borch, K., Westh, P., Thermochemistry of the specific binding of C12 surfactants to bovine serum albumin, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*, 1479(1-2): 321-331, **2000**.
- [38] Lindman, B., Marques, E., Miguel, M., Dias, R., Melnikov, S., Khan, A. *Gel formation and association in systems of cationic surfactant vesicles and oppositely charged polymers*, **2000**.
- [39] Salager, J., *Surfactants Types and Uses FIRP Booklet# E300-A*, 2-4, **2002**.
- [40] Anderson, J. L., Pino, V., Hagberg, E. C., Sheares, V. V., Armstrong, D. W., Surfactant solvation effects and micelle formation in ionic liquids, *Chemical Communications*, (19): 2444-2445, **2003**.
- [41] Garrison, A. W., Schmitt-Kopplin, P., Avants, J. K., Analysis of the Enantiomers of Chiral Pesticides and Other Pollutants in Environmental Samples by Capillary Electrophoresis, *in Capillary Electrophoresis: Methods and Protocols*, P. Schmitt-Kopplin, Humana Press: Totowa, NJ, 157-170, **2008**.

- [42] Altria, K. D., McLean, R., Development and optimisation of a generic micellar electrokinetic capillary chromatography method to support analysis of a wide range of pharmaceuticals and excipients, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 18(4–5): 807-813, **1998**.
- [43] Elworthy, P. H., Florence, A. T., Macfarlane, C. B., Solubilization by surface-active agents and its applications in chemistry and the biological sciences, 124-145, **1968**.
- [44] Pyell, U., *Electrokinetic chromatography: theory, instrumentation and applications*, John Wiley & Sons, **2007**.
- [45] Sarıkaya, Y., *Fizikokimya*, Genişletilmiş 10. baskı, Maddenin halleri, Gazi Kitabevi, Ankara, **2011**.
- [46] Acartürk, F., Ağabeyoğlu, İ., Çelebi, N., Değim, T., Değim, Z., Doğanay, T., Takka, S., Tırnaksız, F., *Modern Farmasötik Teknoloji*, Şafak Matbaacılık, Ankara, **2007**.
- [47] Schramm, L. L., Stasiuk, E. N., Marangoni, D. G., 2 Surfactants and their applications, *Annual Reports Section" C"(Physical Chemistry)*, 99: 3-48, **2003**.
- [48] Houbart, V., Fillet, M., Advances in Low Volume Sample Analysis Using Microfluidic Separation Techniques, *Advances in Microfluidics - New Applications in Biology, Energy, and Materials Sciences*, 01, **2016**.
- [49] Zhu, L., Tu, C., Lee, H. K., On-line concentration of acidic compounds by anion-selective exhaustive injection-sweeping-micellar electrokinetic chromatography, *Analytical chemistry*, 74(22): 5820-5825, **2002**.
- [50] Kunkel, H. G., Tiselius, A., Electrophoresis of proteins on filter paper, *The Journal of general physiology*, 35(1): 89-118, **1951**.
- [51] Tagliaro, F., Deyl, Z., Mikšík, I., Ulfelder, K. J., Concepts and Principles of High Performance Capillary Electrophoresis, *HPLC in Enzymatic Analysis*, John Wiley & Sons, 41-63, **2006**.
- [52] Aşcıoğlu, F., Koluacı, T., Çetinkaya, Ü., Akyüz, F., Kapiller elektroforez teknolojisinin klinik ve adli amaçlı DNA analizlerinde kullanımı: geleneksel jel elektroforez yöntemi ile karşılaştırma, *Adli Tıp Der.*, 16(2-4): 88-93, **2002**.
- [53] Bartle, K. D., Myers, P., Theory of capillary electrochromatography, *Journal of Chromatography A*, 916(1–2): 3-23, **2001**.
- [54] Grossman, P. D., Colburn, J. C., *Capillary electrophoresis: Theory and practice*, Academic Press, 14, **2012**.
- [55] Gündüz, T., *Kromatografi ve Elektroforez*, Gazi Kitabevi, **2015**.

- [56] Settle, F. A., *Handbook of instrumental techniques for analytical chemistry*, Prentice Hall PTR, **1997**.
- [57] Knox, J. H., Grant, I. H., Miniaturisation in pressure and electroendosmotically driven liquid chromatography: Some theoretical considerations, *Chromatographia*, 24(1): 135-143, **1987**.
- [58] Gübitz, G., Schmid, M. G., Chiral separation by chromatographic and electromigration techniques, A review, *Biopharmaceutics & drug disposition*, 22(7-8): 291-336, **2001**.
- [59] Grant, I. H., Capillary electrochromatography, *Capillary Electrophoresis Guidebook: Principles, Operation, and Applications*, 197-209, **1996**.
- [60] Shepard, C. C., Tiselius, A., The chromatography of proteins. The effect of salt concentration and pH on the adsorption of proteins to silica gel, *Discussions of the Faraday Society*, 7: 275-285, **1949**.
- [61] Mould, D. L., Syngé, R. L. M., Electrokinetic ultrafiltration analysis of polysaccharides. A new approach to the chromatography of large molecules, *Analyst*, 77(921): 964-969, **1952**.
- [62] Pretorius, V., Hopkins, B. J., Schieke, J. D., Electro-osmosis, *Journal of Chromatography A*, 99: 23-30, **1974**.
- [63] Jorgenson, J. W., Lukacs, K. D., High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis, *Journal of Chromatography A*, 218: 209-216, **1981**.
- [64] Tsuda, T., Electrochromatography using high applied voltage, *Analytical Chemistry*, 59(3): 521-523, **1987**.
- [65] Cikalo, M. G., Bartle, K. D., Robson, M. M., Myers, P., Euerby, M. R., Capillary electrochromatography, tutorial review, *Analyst*, 123(7): 87-102, **1998**.
- [66] Aşır, S., Derazshamshir, A., Yılmaz, F., Denizli, A., Triazine herbicide imprinted monolithic column for capillary electrochromatography, *Electrophoresis*, 36(23): 2888-2895, **2015**.
- [67] Haddad, P., Macka, M., Capillary electrochromatography, *Encyclopedia of Analytical Science*, 1(2): 323-334, **2005**.
- [68] Enlund, A. M., Hagman, G., Isaksson, R., Westerlund, D., Capillary electrochromatography of basic compounds in pharmaceutical analysis, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 21(6): 412-427, **2002**.
- [69] Terabe, S., Otsuka, K., Ando, T., Electrokinetic chromatography with micellar solution and open-tubular capillary, *Analytical Chemistry*, 57(4): 834-841, **1985**.

- [70] Otsuka, K., Terabe, S., Ando, T., Electrokinetic chromatography with micellar solutions, *Journal of Chromatography A*, 348: 39-47, **1985**.
- [71] Otsuka, K., Terabe, S., Ando, T., Quantitation and reproducibility in electrokinetic chromatography with micellar solutions, *Journal of Chromatography A*, 396: 350-354, **1987**.
- [72] Otsuka, K., Terabe, S., Ando, T., Electrokinetic chromatography with micellar solutions, *Journal of Chromatography A*, 332: 219-226, **1985**.
- [73] Cohen, A., Terabe, S., Smith, J. A., Karger, B., High-performance capillary electrophoretic separation of bases, nucleosides, and oligonucleotides: retention manipulation via micellar solutions and metal additives, *Analytical chemistry*, 59(7): 1021-1027, **1987**.
- [74] Ho Row, K., Griest, W. H., Maskarinec, M. P., Separation of modified nucleic acid constituents by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Journal of Chromatography A*, 409: 193-203, **1987**.
- [75] Fujiwara, S., Iwase, S., Honda, S., Analysis of water-soluble vitamins by micellar electrokinetic capillary chromatography, *Journal of Chromatography A*, 447: 133-140, **1988**.
- [76] Nishi, H., Tsumagari, N., Kakimoto, T., Terabe, S., Separation of water-soluble vitamins by micellar electrokinetic chromatography, *Journal of Chromatography A*, 465(3): 331-343, **1989**.
- [77] Nishi, H., Tsumagari, N., Kakimoto, T., Terabe, S., Separation of β -lactam antibiotics by micellar electrokinetic chromatography, *Journal of Chromatography A*, 477(2): 259-270, **1989**.
- [78] Dobashi, A., Ono, T., Hara, S., Yamaguchi, J., Optical resolution of enantiomers with chiral mixed micelles by electrokinetic chromatography, *Analytical Chemistry*, 61(17): 1984-1986, **1989**.
- [79] Nishi, H., Fukuyama, T., Terabe, S., Chiral separation by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography, *Journal of Chromatography A*, 553: 503-516, **1991**.
- [80] Bushey, M. M., Jorgenson, J. W., Separation of dansylated methylamine and dansylated methyl-d3-amine by micellar electrokinetic capillary chromatography with methanol-modified mobile phase, *Analytical Chemistry*, 61(5): 491-493, **1989**.
- [81] Swedberg, S. A., Use of non-ionic and zwitterionic surfactants to enhance selectivity in high-performance capillary electrophoresis: An apparent micellar electrokinetic capillary chromatography mechanism, *Journal of Chromatography A*, 503: 449-452, **1990**.
- [82] Wainright, A., Capillary electrophoresis applied to the analysis of pharmaceutical compounds, *Journal of Microcolumn Separations*, 2(4): 166-175, **1990**.

- [83] Koji, O., Shigeru, T., Micellar electrokinetic chromatography, *Molecular Biotechnology*, 9(3): 253-271, **1998**.
- [84] Helfferich, F., Ligand exchange: a novel separation technique, *Nature*, 189: 1001-1002, **1961**.
- [85] Gübitz, G., Schmid, M. G., Chiral separation principles in chromatographic and electromigration techniques, *Molecular Biotechnology*, 32(2): 159-179, **2006**.
- [86] Pehlivan E., *Lycopodium Clavatum' dan Elde Edilen Ligand Değiştirici Reçinelerin Hazırlanması ve Sıvı Kolon Kromatografisinde Kullanılarak Nükleosid, Nükleil Asit Bazları, Aminlerin Ayrılması ve Kinetiğinin İncelenmesi*, Doktora Tezi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya, **1991**.
- [87] Martin G. Schmid, Grobuschek N., Lecnik O., Gübitz G., Chiral ligand-exchange capillary electrophoresis, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 48: 143-154, **2001**.
- [88] Gozel, P., Gassmann, E., Michelsen, H., Zare, R. N., Electrokinetic resolution of amino acid enantiomers with copper (II)-aspartame support electrolyte, *Analytical Chemistry*, 59(1): 44-49, **1987**.
- [89] Pak, C., Marriott, P. J., Carpenter, P. D., Amiet, R. G., Enantiomeric separation of propranolol and selected metabolites by using capillary electrophoresis with hydroxypropyl- β -cyclodextrin as chiral selector, *Journal of Chromatography A*, 793(2): 357-364, **1998**.
- [90] Ueda, T., Kitamura, F., Mitchell, R., Metcalf, T., Kuwana, T., Nakamoto, A., Chiral separation of naphthalene-2, 3-dicarboxaldehyde-labeled amino acid enantiomers by cyclodextrin-modified micellar electrokinetic chromatography with laser-induced fluorescence detection, *Analytical Chemistry*, 63(24): 2979-2981, **1991**.
- [91] Lu, X., Chen, Y., Guo, L., Yang, Y., Chiral separation of underivatized amino acids by ligand-exchange capillary electrophoresis using a copper (II)-L-lysine complex as selector, *Journal of Chromatography A*, 945(1): 249-255, **2002**.
- [92] Dreveny, D., Gübitz, G., Chiral separation of sympathomimetics by ligand exchange capillary electrophoresis, *Electrophoresis*, 20: 2458-2461, **1999**.
- [93] Aydoğan, C., Denizli, A., Chiral separation-based ligand exchange by open-tubular capillary electrochromatography, *Analytical Biochemistry*, 447: 55-57, **2014**.
- [94] Yuan, Z., Yang, L., Zhang, S., Enantiomeric separation of amino acids by copper (II)-L-arginine ligand exchange capillary zone electrophoresis, *Electrophoresis*, 20(9): 1842-1845, **1999**.

- [95] Soontornniyomkij, B., Scandrett, K., Pietrzyk, D., Capillary zone electrophoresis separation of amino acid enantiomers as dansylated derivatives through control of electroosmotic flow, *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 21(15): 2245-2263, **1998**.
- [96] Desiderio, C., Aturki, Z., Fanali, S., Separation of α -hydroxy acid enantiomers by high performance capillary electrophoresis using copper (II)-L-amino acid and copper (II)-aspartame complexes as chiral selectors in the background electrolyte, *Electrophoresis*, 15(1): 864-869, **1994**.
- [97] Krásenský, S., Fanali, S., Křivánková, L., Boček, P., *Highly sensitive chiral analysis in on-line combined chiral and achiral media by capillary zone electrophoresis*, *Electrophoresis*, 16(1): 968-973, **1995**.
- [98] Cohen, A., Paulus, A., Karger, B., High-performance capillary electrophoresis using open tubes and gels, *Chromatographia*, 24(1): 15-24, **1987**.
- [99] Sundin, N. G., Dowling, T. M., Grinberg, N., Bicker, G., Enantiomeric separation of dansyl amino acids using MECC with a ligand exchange mechanism, *Journal of Microcolumn Separations*, 8(5): 323-329, **1996**.
- [100] Karbaum, A., Jira, T., Chiral separation of unmodified amino acids with non-aqueous capillary electrophoresis based on the ligand-exchange principle, *Journal of Chromatography A*, 874(2): 285-292, **2000**.
- [101] Végvári, Á., Kilár, F., Schmid, M. G., Gübitz, G., Chiral separation of α -amino acids by ligand-exchange capillary electrophoresis using N-(2-hydroxy-octyl)-L-4-hydroxyproline as a selector, *Electrophoresis*, 19(12): 2109-2112, **1998**.
- [102] Schmid, M., Rinaldi, R., Dreveny, D., Gübitz, G., Enantioseparation of α -amino acids and dipeptides by ligand-exchange capillary electrophoresis of various L-4-hydroxyproline derivatives, *Journal of Chromatography A*, 846(1): 157-163, **1999**.
- [103] Tripathi, I., Kamal, A., Synthesis, Characterization of Some Complexes of Copper (II) with L-Asparagine, L-Histidine, L-Lysine, *Open Journal of Advanced Drug Delivery*, 3(1): 95-103, **2015**.
- [104] Prenesti, E., Berto, S., Daniele, P. G., Ultraviolet spectrophotometric characterization of copper (II) complexes with imidazole N-methyl derivatives of L-histidine in aqueous solution, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 59(1): 201-207, **2003**.
- [105] Marcu, A., Stanila, A., Rusu, D., Rusu, M., Cozar, O., David, L., Spectroscopic studies of copper (II) complexes with some amino acids, *Journal of optoelectronics and advanced materials*, 9(3): 741-746, **2007**.
- [106] Li, P., Tabibi, S. E., Yalkowsky, S. H., Solubilization of ionized and un-ionized flavopiridol by ethanol and polysorbate 20, *Journal of pharmaceutical sciences*, 88(5): 507-509, **1999**.

- [107] Poole, C. F., Poole, S. K., Interphase model for retention and selectivity in micellar electrokinetic chromatography, *Journal of Chromatography A*, 792(1): 89-104, **1997**.
- [108] Poole, S., Poole, C., Influence of composition on the selectivity of a mixed-micellar buffer in micellar electrokinetic chromatography, *Analytical Communications*, 34(2): 57-62, **1997**.
- [109] Sarmini, K., Kenndler, E., Influence of organic solvents on the separation selectivity in capillary electrophoresis, *Journal of Chromatography A*, 792(1): 3-11, **1997**.
- [110] Seifar, R. M., Kraak, J. C., Kok, W. T., Mechanism of Electrokinetic Separations of Hydrophobic Compounds with Sodium Dodecyl Sulfate in Acetonitrile–Water Mixtures, *Analytical Chemistry*, 69(14): 2772-2778, **1997**.
- [111] Zheng, Z. X., Lin, J. M., Qu, F., Hobo, T., Chiral separation with ligand-exchange micellar electrokinetic chromatography using a D-penicillamine-copper (II) ternary complex as chiral selector, *Electrophoresis*, 24(24): 4221-4226, **2003**.

7. ÖZGEÇMİŞ

Kimlik Bilgileri

Adı Soyadı : Duygu Sarı Aydın
Doğum Yeri : Bala / Ankara
Doğum Yılı : 1992
Medeni Hal : Evli
E-posta : duygusari92@gmail.com
Adresi : Hacettepe Üniversitesi Biyokimya Araştırma Lab 1.
06800 Beytepe, Çankaya / ANKARA

Eğitim

Lise : Özel Evrensel Fen Lisesi
Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü
Yüksek Lisans : Hacettepe Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya A.B.D.

Yabancı Dil ve Düzeyi

Deneyim Alanları

Aldığı Ödüller ve Dereceler

Tezden Üretilmiş Projeler ve Bütçesi

Tezden Üretilmiş Yayınlar

Tezden Üretilmiş Tebliğ ve/veya Poster Sunumu ile Katıldığı Toplantılar



HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZ ÇALIŞMASI ORJİNALLİK RAPORU

HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI'NA

Tarih: .../.../.....

Tez Başlığı / Konusu: Kapiler elektrokromatografi yöntemiyle D,L Ampisilin enantiyomerlerinin ayrımı

Yukarıda başlığı/konusu gösterilen tez çalışmamın a) Kapak sayfası, b) Giriş, c) Ana bölümler d) Sonuç kısımlarından oluşan toplam 98 sayfalık kısmına ilişkin, 22/05/2017 tarihinde şahsım/tez danışmanım tarafından *Turnitin* adlı intihal tespit programından aşağıda belirtilen filtrelemeler uygulanarak alınmış olan orijinallik raporuna göre, tezimin benzerlik oranı % 5 'dir.

Uygulanan filtrelemeler:

- 1- Kaynakça hariç
- 2- Alıntılar hariç/dâhil
- 3- 5 kelimedenden daha az örtüşme içeren metin kısımları hariç

Hacettepe Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Tez Çalışması Orjinallik Raporu Alınması ve Kullanılması Uygulama Esasları'nı inceledim ve bu Uygulama Esasları'nda belirtilen azami benzerlik oranlarına göre tez çalışmamın herhangi bir intihal içermediğini; aksinin tespit edileceği muhtemel durumda doğabilecek her türlü hukuki sorumluluğu kabul ettiğimi ve yukarıda vermiş olduğum bilgilerin doğru olduğunu beyan ederim.

Gereğini saygılarımla arz ederim.

24.05.17

Tarih ve İmza

Adı Soyadı: Duygu Sarı Aydın

Öğrenci No: N14228299

Anabilim Dalı: Kimya

Programı: Biyokimya

Statüsü: Y.Lisans Doktora Bütünleşik Dr.

DANIŞMAN ONAYI

UYGUNDUR.

(Prof. Dr. Adil Denizli)

