

Kolinklorür içeren bazı alçak ötektik çözücülerin antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi

Selda Doğan Çalhan¹, Mahmut Ülger²

¹Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji AD, Mersin

²Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Mikrobiyoloji AD, Mersin

Öz

Amaç: Bu çalışmada kolin klorür içeren bazı alçak ötektik çözücülerin karakterizasyonlarının gerçekleştirilmesi ve antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi amaçlandı. **Yöntem:** Çalışılan dört farklı alçak ötektik çözücünün iletkenlik değerleri tespit edildi. Fourier dönüşümlü infrared spektroskopisi ve proton nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ile karakterizasyon işlemleri gerçekleştirildi. Antibakteriyel aktivite tayinininde Resazurin mikropalak yöntemi kullanıldı. **Bulgular:** Alçak ötektik çözücülerin yapıları spektroskopik yöntemler ile aydınlatıldı. Alçak ötektik çözücülerin ampisiline göre daha düşük antibakteriyel aktivite gösterdiği bulundu. **Sonuç:** Alçak ötektik çözücülerin ilaç endüstrisindeki ilgi uyandıran uygulamaları dikkate alındığında çalışmanın daha fazla sayıda alçak ötektik çözücünün fizikokimyasal, antibakteriyel ve sitotoksik özelliklerinin araştırılmasıyla genişletilebileceği sonucuna varıldı.

Anahtar Sözcükler: Alçak ötektik çözücü, kolin klorür, antibakteriyel aktivite

Determination of antibacterial activity for some deep eutectic solvents based on choline chloride

Abstract

Aim: The aim of this study was to determine the characterization and antibacterial activity of some deep eutectic solvents based on choline chloride. **Methods:** The conductivity values of the four different deep eutectic solutions were determined. Fourier transform infrared spectroscopy and proton nuclear magnetic resonance spectroscopy were used for characterization. Resazurin microplate method was used to determine the antibacterial activity. **Results:** The structures of the deep eutectic solvents were clarified with spectroscopic methods. Deep eutectic solvents showed lower antibacterial activity than ampicillin. **Conclusion:** Considering the applications of deep eutectic solvents in the pharmaceutical industry, it was concluded that the study could be extended the determination of physicochemical, antibacterial and cytotoxic properties of a larger number of deep eutectic solvents.

Keywords: Deep eutectic solvents, choline chloride, antibacterial activity

Yazının geliş tarihi:16.03.2018

Yazının kabul tarihi:14.05.2018

Sorumlu yazar: Selda Doğan Çalhan, Mersin Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Biyoteknoloji Ana Bilim Dalı, Mersin, Tlf: 0 324 3412815-12139, E posta: seldadgn@gmail.com

Giriş

Yeşil kimyanın önemle üzerinde durduğu konu başlıklarından birisi, geleneksel olarak kullanılan ve toksik etkileri bilinen çözücü sistemlerinin yerine çevre dostu ve birçok kimyasal proste görev alabilecek yeni nesil çözücü alternatifleri geliştirmektir. Bu bağlamda geçtiğimiz 20 yıl içerisinde iyonik sıvılar kolay alev almaması ve tekrar kullanılabilir olması gibi yeşil özellikleri nedeniyle tercih nedeni olmuşlardır. Ancak, özellikle imidazol ve piridin içeren iyonik sıvıların, geleneksel ve yaygın olarak kullanılan organik çözücülerden 5-20 kat daha fazla maliyetli olması ve zayıf biyodegradasyon göstermeleri nedeniyle beklentileri karşılayamamıştır.¹ İyonik sıvılara alternatif olarak geliştirilen Alçak Ötektik Çözücüler

(DESs) ilk olarak Abbott ve arkadaşları² tarafından geliştirilmiş ve rapor edilmiştir. İlk DES hazırlanışı ile ilgili Abbott ve ark.² 2003 yılında yaptıkları çalışmada herhangi bir detaya yer vermemekle birlikte 2004 yılında yaptıkları çalışmada⁴ DES hazırlarken kuaterner amonyum tuzu olarak kolin klorür, hidrojen bağı donörü olarak çeşitli karboksilik asit türevlerini kullandıklarını bildirmişlerdir. Yapılan bu çalışmada öncelikle kolin klorür etanol içerisinde yeniden kristallendirilip, süzülüp kurutulmuştur. Karboksilik asit türevleri ise kullanımdan önce vakumda kurutulmuştur. Daha sonra belirli stokiometrik oranlarda alınan iki bileşen homojen ve renksiz karışım haline gelinceye kadar 100 °C'ye ısıtılmıştır³. Aynı grup 2007 yılında yine aynı yöntemle DES hazırlamak için Tablo 1'de belirtilen dört farklı kombinasyonu önermişlerdir.⁴

Tablo 1. DES hazırlamak için önerilen dört farklı kombinasyon

Seçenek	Örnek
1. Metal Tuzu+Organik Tuz	ZnCl ₂ +Kolin klorür
2. Organik Tuz+Hidrojen Bağ Donörü	Kolin klorür+Üre
3. Metal Hidrat Tuzu+Organik Tuz	CoCl ₂ ·6H ₂ O+Kolin klorür
4. Metal Hidrat Tuzu+ Hidrojen Bağ Donörü	ZnCl ₂ +Üre

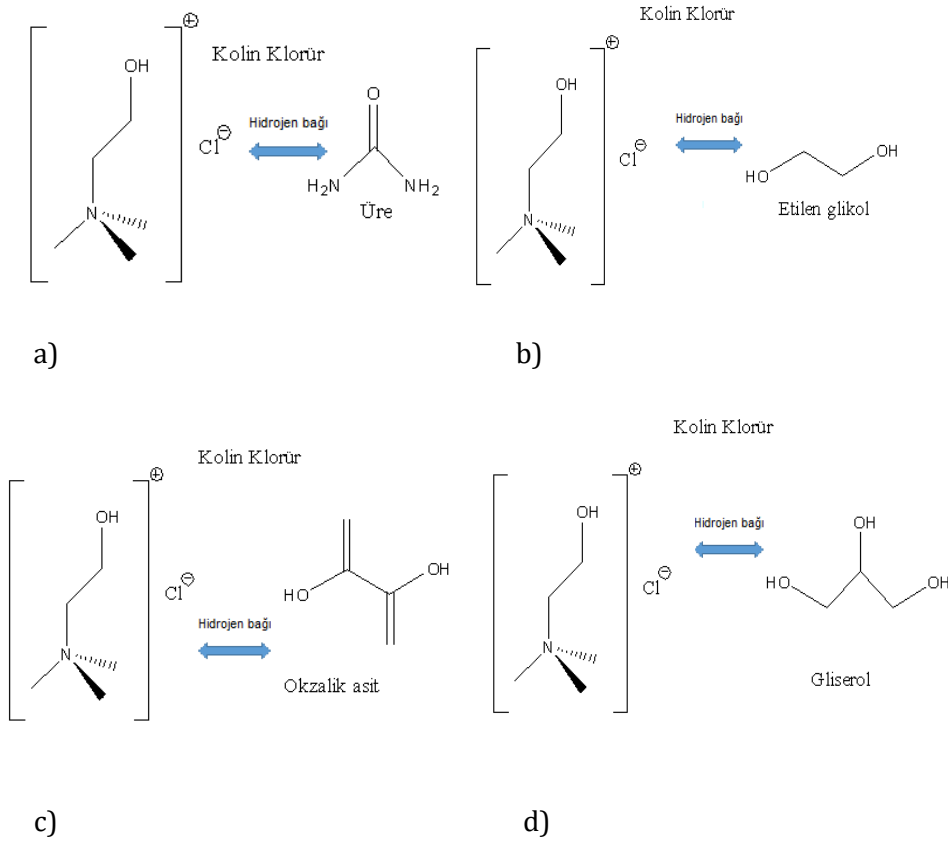
Bunlar içerisinde ikinci alternatif günümüzde de en yaygın şekilde hazırlanan DES kombinasyonu olarak kabul edilmektedir.⁴

Çalışmada kuaterner amonyum tuzu olarak, B vitaminlerine olan yapısal benzerliğiyle ve non toksik olması nedeniyle kullanılan kolin klorürün, üre, etilen glikol, okzalik asit ve gliserol gibi farklı hidrojen bağı donörüyle (HBD) hidrojen bağı ve elektrostatik çekim temelindeki olası etkileşimleri Şekil 1a-d'de şematize edilmiştir.

Bu çözücü sistemlerinin erime noktaları kendisini oluşturan bileşenlerin erime noktalarından çok daha düşüktür. Bunun yanında yüksek iletkenlik, viskozite ve yüzey gerilimi DES'lerin sahip oldukları diğer önemli özelliklerdir. Üstelik DES'ler

diğer çözücülere göre daha düşük buhar basınçlarına sahiptir. Ayrıca yüksek polariteleri nedeniyle çok iyi birer çözücüdürler. Bunun yanında, düşük toksisiteye sahip olmaları nedeniyle çevre dostu olarak tanımlanırlar. Ayrıca biyolojik olarak çözünme yeteneğine sahiptirler ve biyo uyumludurlar.⁵

Alçak ötektik çözücüler, başta sentez ve elektrokimyasal prosesler olmak üzere birçok farklı alanda kendine uygulama alanı bulmaktadır.⁶ Ayrıca çok farklı kombinasyonlar şeklinde hazırlanabilen DES'lerin çeşitli fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi, antibakteriyel aktivitelerinin tespiti DES'lerin özelliklerinin belirlenmesine yönelik çalışmalar olarak nitelendirilmektedir (Şekil 2).



Şekil 1. Kolin klorürün hidrojen bağ donörleriyle olası etkileşiminin şematik gösterimi

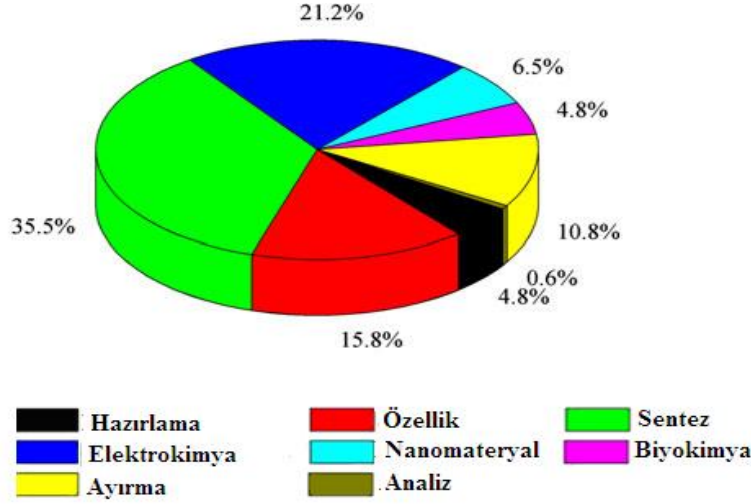
Alçak ötektik çözücü sistemlerinin çok farklı alanlarda kendine kullanım alanı bulması, sahip olduğu avantajları nedeniyle. Bunlar;

- Yüksek saflıkta ve kolay bir şekilde hazırlanabiliyor olması,
- Düşük maliyetle üretilebiliyor olması,
- Yüksek biyodegradasyon ve düşük toksisite göstermeleri nedeniyle çevre dostu olması,
- Farklı kombinasyonlarda DES'lerin hazırlanabiliyor olması.⁷

Seçilen çeşitli hidrojen bağ donörü ve akseptörü ile ve kullanılan farklı stokiometrik oranlarla farklı ve çok sayıda DES'in dizayn edilmesi elde edilen bu çözücü sistemlerinin tüm karakterizasyon işlemlerinin ve antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesini de aynı zamanda bir mecburiyet haline getirmiştir.

Bunun yanında DES'lerin, çözünürlük problemi yaşayan bazı ilaçların çözünürlüğünü suya oranla ciddi bir şekilde arttırdığına yönelik çalışmalar özellikle prelinik çalışmalar için umut vericidir.⁸ Ayrıca kolin klorür içeren bazı DES'lerin ilaçların hızlı absorpsiyonu için umut veren yeni oral ilaç taşıyıcı adayları oldukları yönünde çalışmalar vardır.⁹ Abbott ve ark.¹⁰ son yıllarda yaptıkları bir çalışmada çok sayıda farmasötik ajanın DES'ler kullanarak sıvı formlarının formüle edilebileceği ve etkili ilaç taşıyıcı sistemler olarak kullanılabileceğini göstermişlerdir.

Bu noktadan hareketle bu çalışmada kolin klorür içeren dört farklı DES hazırlanarak, Fourier Dönüşümlü İnfrared (FTIR) Spektrometresi ve proton Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Spektrometresi ile karakterizasyon işlemlerinin gerçekleştirilmesi ve antibakteriyel aktivitelerinin belirlenmesi amaçlandı.

Şekil 2. DES'lerin kullanım alanları⁶

Yöntem

Alçak ötektik çözücülerin hazırlanmasında kolin klorür (C₅H₁₄ClNO, %99, Acros Organics), üre (CH₄N₂O, %99.5, Merck), etilen glikol (C₂H₆O₂, %99.5, Merck), gliserol (C₃H₈O₃, FisherChemical) ve okzalik asit (H₂C₂O₄, %98, Sigma) kullanıldı. Aktivite çalışmasında Mueller-Hintonbroth (Sigma 70192) besiyeri, rezazurin (Sigma R7017), 0.22 µm'lik membran filtre (Ministar 16534-K, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Goettingen, Germany) ve yapışkan plastik film (Thermo Fisher Scientific Micro Amp® Optical Adhesive Film, 4360954) kullanıldı. Antibakteriyel aktivite tayininde Gram pozitif olarak Staphylococcus aureus (ATCC 25925) ve Bacillus subtilis (ATCC 6633); Gram negatif olarak Aeromonas hydrophila (ATCC 95080), Escherichia coli (ATCC 25923) ve Acinetobacter baumannii (ATCC 02026) standart bakteri suşları kullanıldı. Bu

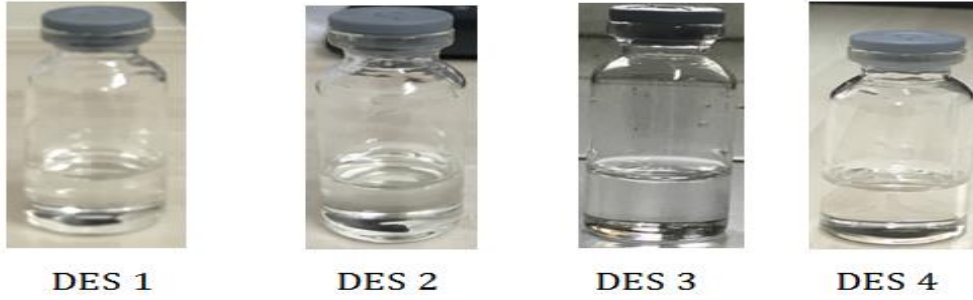
standart suşlar Refik Saydam Hıfzısıhha Enstitüsü'nden temin edildi. Deneysel çalışmalar boyunca ihtiyaç duyulan 18.2 mΩ distile su Millipore, Milli-Q A-10 marka saf su cihazından temin edildi. Çalışmada kullanılan DES'lerin elektriksel iletkenlikleri Thermo Scientific Orion 5 Star marka iletkenlik ölçer ile tayin edildi. Hazırlanan DES'lerin FTIR spektrumları Perkin ElmerFourier Dönüşümlü İnfrared Spektrometresi ile NMR spektrumları ise Bruker Ultrashield Plus Biospin GmbH proton Nükleer Manyetik Rezonans Spektrometresi ile alındı ve karakterizasyonları gerçekleştirildi.

Alçak ötektik çözücülerin hazırlanması

Çalışmada kullanılan dört farklı DES Tablo 2'de verilen bilgiler doğrultusunda Abbott ve ark. kullandıkları yöntem ile hazırlandı.³ Bütün DES'ler şeffaf, viskoz şekilde elde edildi (Şekil 3) ve iletkenlik değerleri tespit edildi.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan DES'ler

DES	Organik Tuz	HBD	Mol oranı	Kısaltma Adı
Kolin klorür-Üre	Kolin klorür	Üre	1:2	DES 1
Kolin klorür- Etilen glikol	Kolin klorür	Etilen glikol	1:2	DES 2
Kolin klorür-Okzalik asit	Kolin klorür	Okzalik asit	1:1	DES 3
Kolin klorür-Gliserol	Kolin klorür	Gliserol	1:2	DES 4



Şekil 3. Hazırlanan dört farklı DES'in görüntüsü

Resazurin mikropalak yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini

Antibakteriyel aktivitelerin belirlenmesinde resazurin mikropalak yöntemi (resazurin microtitreassay-REMA) kullanıldı.¹¹ Antibakteriyel aktivitesi araştırılacak olan DES'ler (Tablo 2) distile suda çözüldü ve konsantrasyonları 1 mg/ml'ye ayarlandı. Mikroplağın ilgili kuyularına besiyerinden 100 µl konuldu. Mikroplağın birinci kuyularına test edilecek DES'den 100 µl konuldu. Bu kuyudan yine 100 µl alınarak ikinci kuyudan itibaren seri dilüsyon yapıldı ve son kuyudan 100 µl atık kutusuna atıldı. Böylece test edilecek DES konsantrasyonları 500-0.24 µg/ml'ye ayarlandı. Çalışmada standart ilaç olarak ampisilin kullanıldı ve standart ilacın dilüsyonu da aynı şekilde yapıldı. Standart bakteri suşlarından 0.5 McFarland yoğunluğunda bakteri süspansiyonu hazırlandı. Bu süspansiyon daha sonra steril distile su ile 1/20 oranında dilüe edildi. Bu süspansiyondan ilgili kuyulara 10 µl ilave edildi. Böylece kuyulardaki son bakteri yoğunluğu 5x10⁵ CFU/ml'ye ayarlandı.¹² Resazurin çalışma solüsyonu %0.01 (w/v) oranında distile suda hazırlandı ve 0.22 µm'lik membran filtreden geçirilerek steril edildi. Çalışılan kuyulara steril edilen resazurinden 10 µl ilave edildi. Plaklardaki buharlaşmayı önlemek için plaklar yapışkan plastik film ile kapatıldı. Antibakteriyel aktivite belirlenmesinde dört set kontrol ile çalışıldı. Birincisi ampisilin içeren ilaç kontrolü, ikincisi besiyeri ve bakteri süspansiyonu içeren pozitif kontrol, üçüncüsü antibakteriyel aktivitesi araştırılan madde ve besiyeri içeren kontrol,

dördüncüsü sadece besiyeri içeren kontrol. Daha sonra plaklar 37°C'de 24 saat inkübe edildi. Süre sonunda plaklardaki renk değişimi göz ile değerlendirildi. Resazurinin maviden pembe veya renksiz hale dönmesi pozitif yani bakteriyel üreme olarak değerlendirildi. Minimum inhibisyon konsantrasyonu (MİK) değeri resazurinin maviden pembeye veya renksiz hale dönmesini engelleyen en düşük konsantrasyon olarak belirlendi. Bütün antibakteriyel aktivite tayin işlemleri üç kez tekrar edildi.

Bulgular

Alçak ötektik çözücülerin karakterizasyonu

Şeffaf ve viskoz bir şekilde elde edilen DES'lerin iletkenlik değerleri (25 °C) üç ölçümün ortalaması şeklinde DES 1, DES 2, DES 3 ve DES 4 için sırasıyla 0.68; 9.71; 0.12; 1.33 mS cm⁻¹ olarak belirlendi. Hazırlanan DES'lerin karakterizasyonu amacıyla alınan FTIR spektrumları değerlendirildiğinde, DES 1'de üreye ait karakteristik N-H gerilme titreşimi 3100-3500 cm⁻¹, C=O 1630-1680 cm⁻¹ aralığında, kolin klorüre ait karakteristik OH gerilme titreşimi 3200-3600 cm⁻¹, CH eğilme titreşimi 1430-1470 cm⁻¹, C-N+simetrik gerilme titreşimi 830-870 cm⁻¹ aralığında görülmektedir. Kolin klorüre ait olan karakteristik pikler diğer tüm DES spektrumların da mevcut olduğu görüldü. Sırasıyla etilen glikol, okzalik asit ve gliserol için karakteristik OH gerilme titreşimi 3200-3600 cm⁻¹ aralığında DES 2, DES 3 ve DES 4 spektrumlarında bulunmaktadır. Bunun

yanında etilen glikole ait C-O-H piki 1200-1250 cm^{-1} aralığında, okzalik asite ait C=O piki 1700-1730 cm^{-1} aralığında, gliserole ait C-C piki 1500-2000 cm^{-1} aralığında, görülmektedir. Karakterizasyon amacıyla alınan ^1H NMR (D_2O) spektrumları değerlendirildiğinde ise, bütün DES'ler için kolin klorüre ait karakteristik pikler yaklaşık δ (ppm) 3.2 (s, 9H), 3.5 (m, 2H), 4 (m, 2H) olarak tespit edildi. Diğer karakteristik pikler üre δ (ppm) 4.7 (m, 4H), etilen glikole δ (ppm) 3.6 (m, 4H), 4.6(m, 2H), gliserole δ (ppm) 4.48 (m, 3H), 3.44 (m, H), 3.55 (m, H) ve 3.7 (m, H) olarak belirlendi.

Resazurin mikropalak yöntemi ile antibakteriyel aktivite tayini ile elde edilen sonuçlar Tablo 3'de özetlenmiştir. Bu sonuçlara göre DES 1, DES 2 ve DES 4 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25925), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Aeromonas hydrophila* (ATCC 95080), *Escherichia coli* (ATCC 25923) ve *Acinetobacter baumannii* (ATCC 02026) için 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 'nin üzerinde bir antibakteriyel aktivite göstermiştir. DES 3 ise *Acinetobacter baumannii* (ATCC 02026) için 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de, *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) için ise 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de antibakteriyel aktivite göstermiştir.

Antibakteriyel aktivite sonuçları

Tablo 3. DES ve ampisilinin gösterdiği antibakteriyel aktivite sonuçları

	DES1 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	DES2 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	DES3 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	DES4 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Ampisilin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25925)	>500	>500	>500	>500	31.25
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25923)	>500	>500	>500	>500	15.62
<i>Acinetobacter baumannii</i> (ATCC 02026)	>500	>500	500	>500	125
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	>500	>500	250	>500	0.9
<i>Aeromonas hydrophila</i> (ATCC 95080)	>500	>500	>500	>500	31.25

Tartışma

Çalışmamızda karakterizasyonu gerçekleştirilen DES'lerin FTIR spektrumları değerlendirildiğinde kolin klorüre ait karakteristik OH ve C-N+ gerilme titreşimi sırasıyla 3200-3600 cm^{-1} , 830-870 cm^{-1} aralığında olup bütün DES'ler için ortaktır. Etilen glikol, okzalik asit ve gliserole ait C-O-H, C=O, C-C pikleri sırasıyla 1200-1250 cm^{-1} , 1700-1730 cm^{-1} , 1500-2000 cm^{-1} aralığındadır. Proton NMR (D_2O) spektrumları incelendiğinde ise, bütün DES'ler için kolin klorüre ait karakteristik

pikler yaklaşık δ (ppm) 3.2 (s, 9H), 3.5 (m, 2H), 4 (m, 2H) olarak tespit edildi. Diğer karakteristik pikler üre δ (ppm) 4.7 (m, 4H), etilen glikole δ (ppm) 3.6 (m, 4H), 4.6(m, 2H), gliserole δ (ppm) 4.48 (m, 3H), 3.44 (m, H), 3.55 (m, H) ve 3.7 (m, H) olarak belirlendi. Spektroskopik yöntemlerle elde edilen ve karakterizasyonu sağlayan tüm sonuçlar literatürle^{4,13,14} uyum içerisindedir. Öte yandan antibakteriyel aktivite çalışmasının sonucunda elde ettiğimiz bulgular doğrultusunda DES'lerin ampisiline göre düşük antibakteriyel aktivite göstermesine rağmen alçak ötektik çözücülerin

konsantrasyonları arttıkça antibakteriyel aktivitenin arttığı sonucuna varılmıştır. Bu sonuç literatürü⁷ doğrulamaktadır. In vitro olarak değerlendirdiğimiz çalışmamızda DES'lerin antibakteriyel aktivite gösterdiği konsantrasyon (> 500 µg/ml, 250 µg/ml) değerleri in vivo koşullarda hücre için toksik olabileceği, kolin klorür dışında fosfonyum tuzlarıyla da çok sayıda ve farklı kombinasyonda DES'in sentezlenebiliyor olması nedeniyle çalışmanın daha fazla sayıda DES'in antibakteriyel aktivitelerinin yanı sıra toksik etkilerinin araştırılması gerekliliğini de beraber getirmiştir.

Sonuç

Klasik çözücüler ve iyonik sıvılarla karşılaştırıldığında DES'ler, yüksek polariteleri nedeniyle iyi birer çözücü olmaları, çevre dostu olmaları, düşük maliyetle ve kolay hazırlanabiliyor olmaları ve biyouyumlulukları nedeniyle son yıllarda yoğun şekilde araştırılan konu başlıklardan birisi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bu yeni nesil çözücüler başta organik ve nanomateryal sentezi olmak üzere elektrokimyasal proseslerde, ayırma ve ekstraksiyon gibi farklı alanlarda kendine uygulama alanı bulmuştur. Son yıllarda özellikle ilaç etken madde sentezi ve çözünürlük problemi yaşayan ilaçların çözünürlüğünün artırılması amacıyla ve ilaç taşıyıcı sistemlerinin bir parçası olarak kullanılabileceğine dair çalışmalar söz konusudur. Bu noktadan hareketle tasarlanan çalışmamızda kolin klorür ile hazırlanan dört farklı DES'in iletkenlikleri tayin edildi, infrared ve proton nükleer manyetik rezonans spektroskopisi ile karakterizasyonları yapıldı ve antibakteriyel aktiviteleri araştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre DES'lerin antibakteriyel aktiviteleri konsantrasyonları arttıkça artmasına rağmen, ampiciline göre düşük antibakteriyel etkinliğe sahip olduğu bulundu. Çok sayıda ve çeşitte hazırlanabilen DES'lerin diğer endüstrilere ek olarak ilaç endüstrisindeki ilgi çekici uygulamaları da dikkate alındığında daha fazla sayıda DES'in fizikokimyasal, antibakteriyel ve toksik özelliklerinin araştırılmasıyla çalışmanın genişletebileceği sonucuna varıldı.

Kaynaklar

1. Radošević K, Bubalo MC, Srček VG, Grgas D, Dragičević TL, Redovniković I R. Evaluation of toxicity and biodegradability of choline chloride based deep eutectic solvents. *Ecotoxicol Environ Saf* 2015;112:46–53.
2. Abbott AP, Capper G, Davies DL, Rasheed Raymond K, Tambyrajah V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem. Commun* 2003;70–71.
3. Abbott AP, Boothby D, Capper G, Davies DL, Rasheed RK. Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: Versatile alternatives to ionic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* 2004;126:9142-9147.
4. Abbott AP, Capper G, McKenzie KJ, Ryder KS. Electrodeposition of zinc-tin alloys from deep eutectic solvents based on choline chloride. *J. Electroanal. Chem* 2007;599:288–294.
5. Abo-Hamad A, Hayyan M, AlSaadi MA, Hashim MA. Potential applications of deep eutectic solvents in nanotechnology. *Chem. Eng. J.* 2015;273:551–567.
6. Tang B, Row KH. Recent developments in deep eutectic solvents in chemical sciences. *Monatsh chem* 2013;(144):1427–1454.
7. Wena Q, Chen J X, Tang YL, Wang J, Yang Z. Assessing the toxicity and biodegradability of deep eutectic solvents. *Chemosphere* 2015;132:63–69.
8. Morrison HG, Sunb CC, Neervannan S. Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles. *Int. J. Pharm.* 2009;378:136–139.
9. Chen J, Wang Q, Liu M, Zhang L. The effect of deep eutectic solvent on the pharmacokinetics of salvianolic acid B in rats and its acute toxicity test. *J. Chromatogr. B* 2017;1063:60–66.
10. Abbott AP, Ahmed EI, Prasad K, Qader IB, Ryder KS. Liquid pharmaceuticals formulation by eutectic formation. *Fluid phase equilib.* 2014;448:2-8.
11. Gahlaut A, Chhillar AK. Evaluation of antibacterial potential of plant extracts using

resazurin based microtiter dilution assay. *Int j pharm pharm sci.* 2013;5(2):372-376.

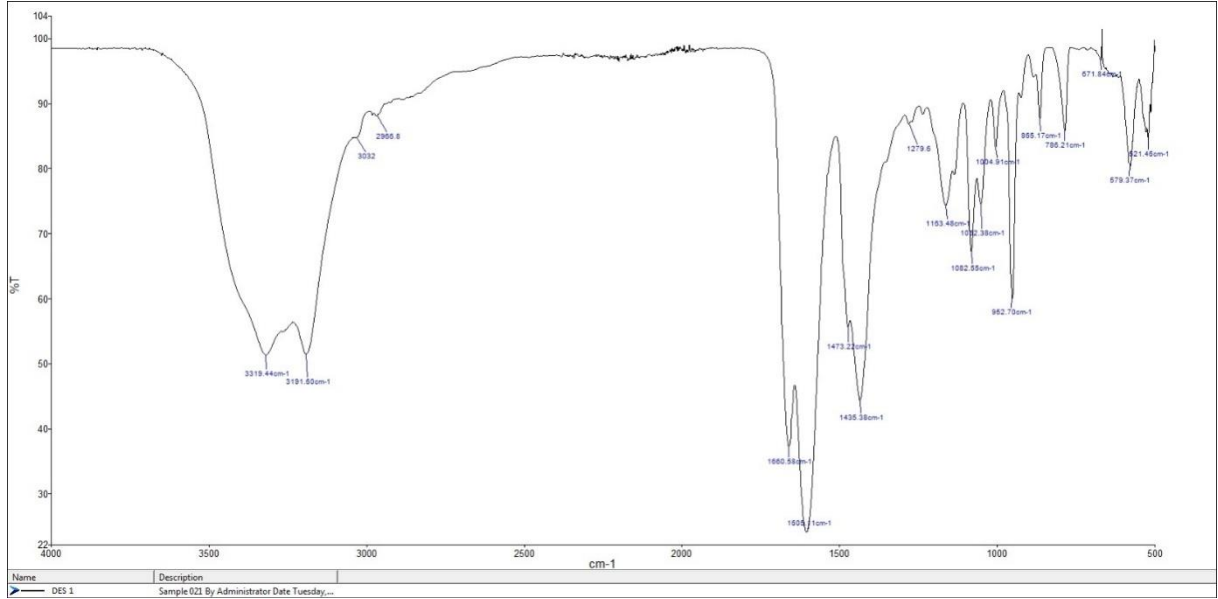
12. CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved standard-Ninth edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

13. Hayyan M, Abo-Hamad A, AlSaadi MA, Hashim MA. Functionalization of graphene

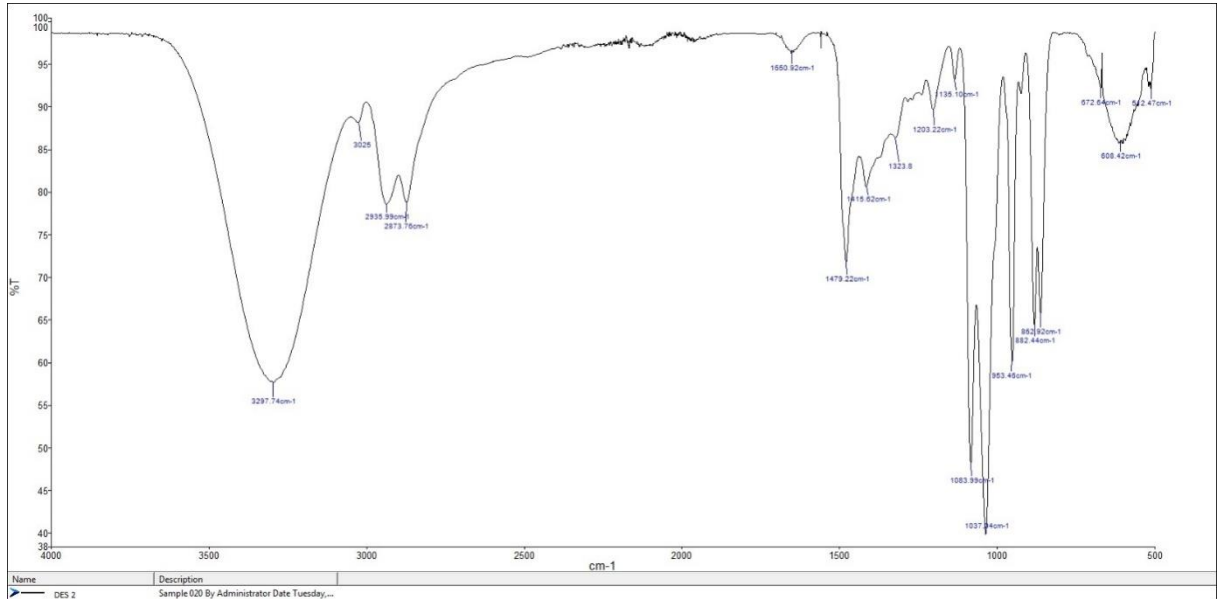
using deep eutectic solvents. *Nanoscale res lett.* 2015;10(324):2-26.

14. Indran VP, Zuhaimi NAS, Deraman MA, Maniam GP, Yusoff MM, Hinc TYY, Rahim MH. An accelerated route of glycerol carbonate formation from glycerol using waste boiler ash as catalyst. *Rsc Adv.* 2014,4:25257-25267.

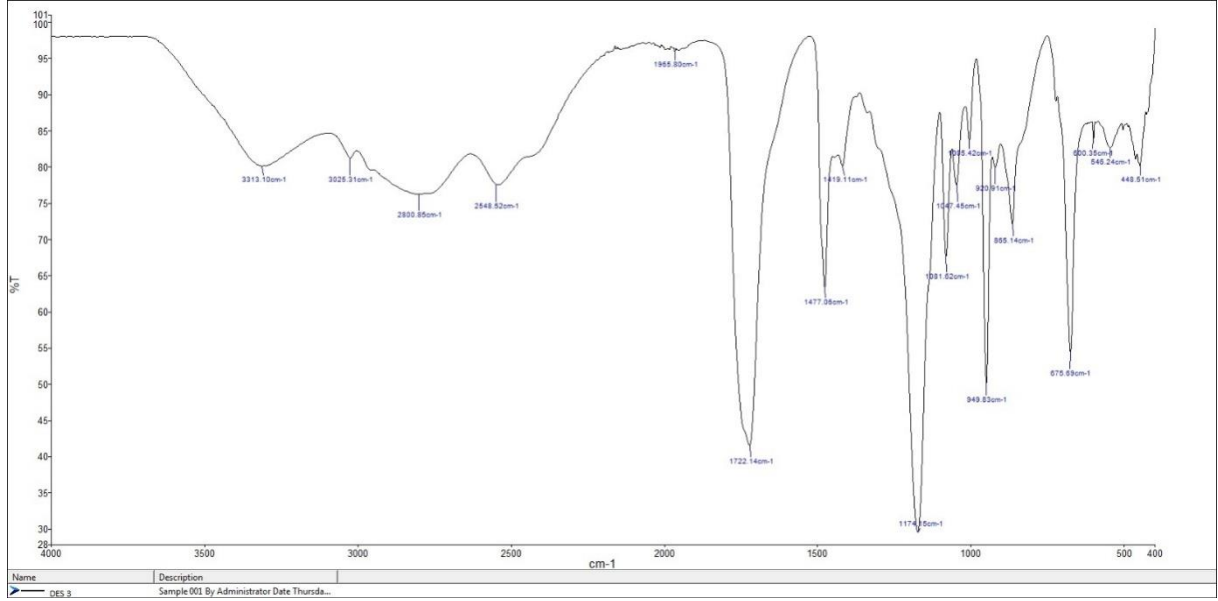
Ekler: Alçak ötektik çözücülerin FTIR ve ¹H NMR (D₂O) spektrumları



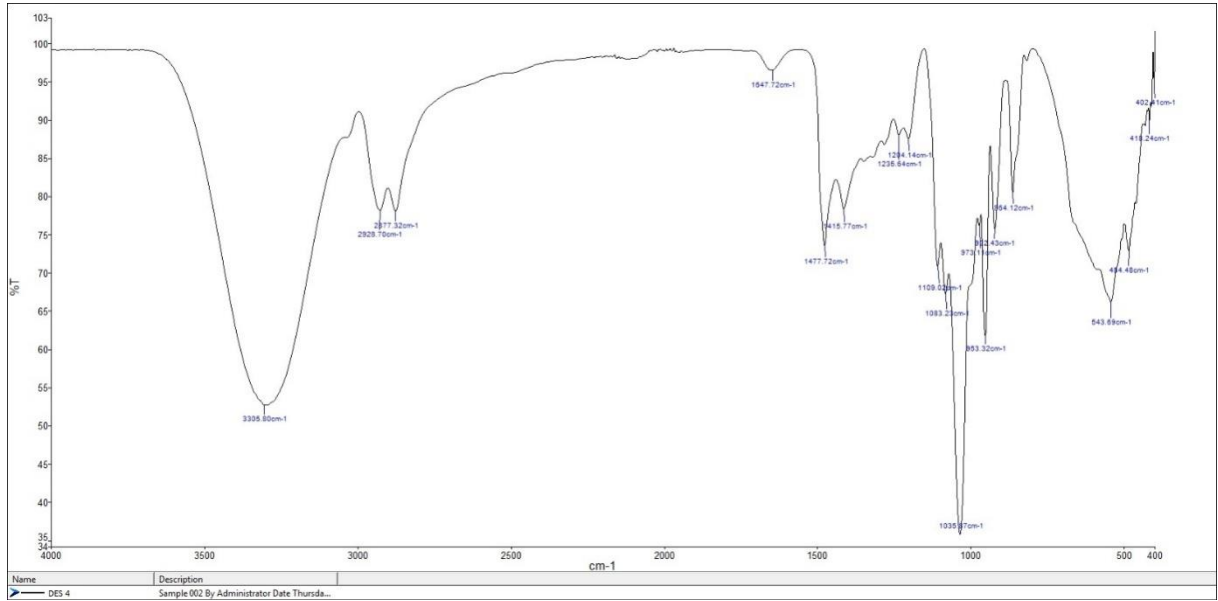
Ek 1. DES 1' in FTIR spektrumu



Ek 2. DES 2' nin FTIR spektrumu

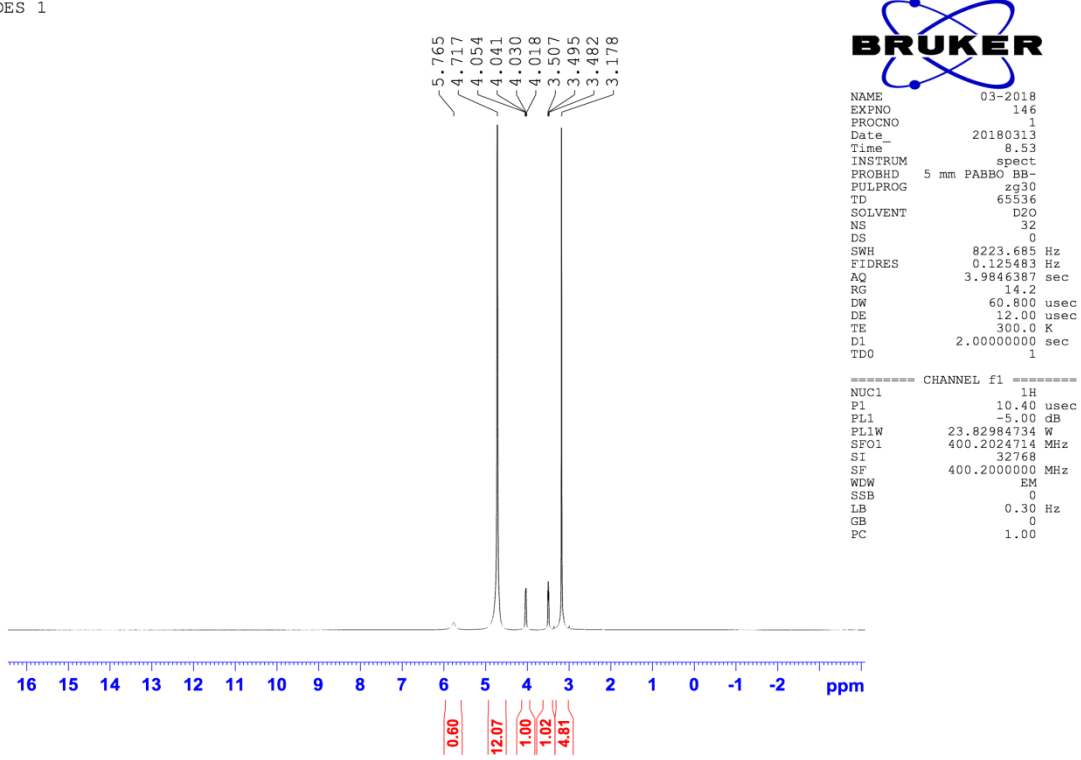


Ek 3. DES 3' ün FTIR spektrumu



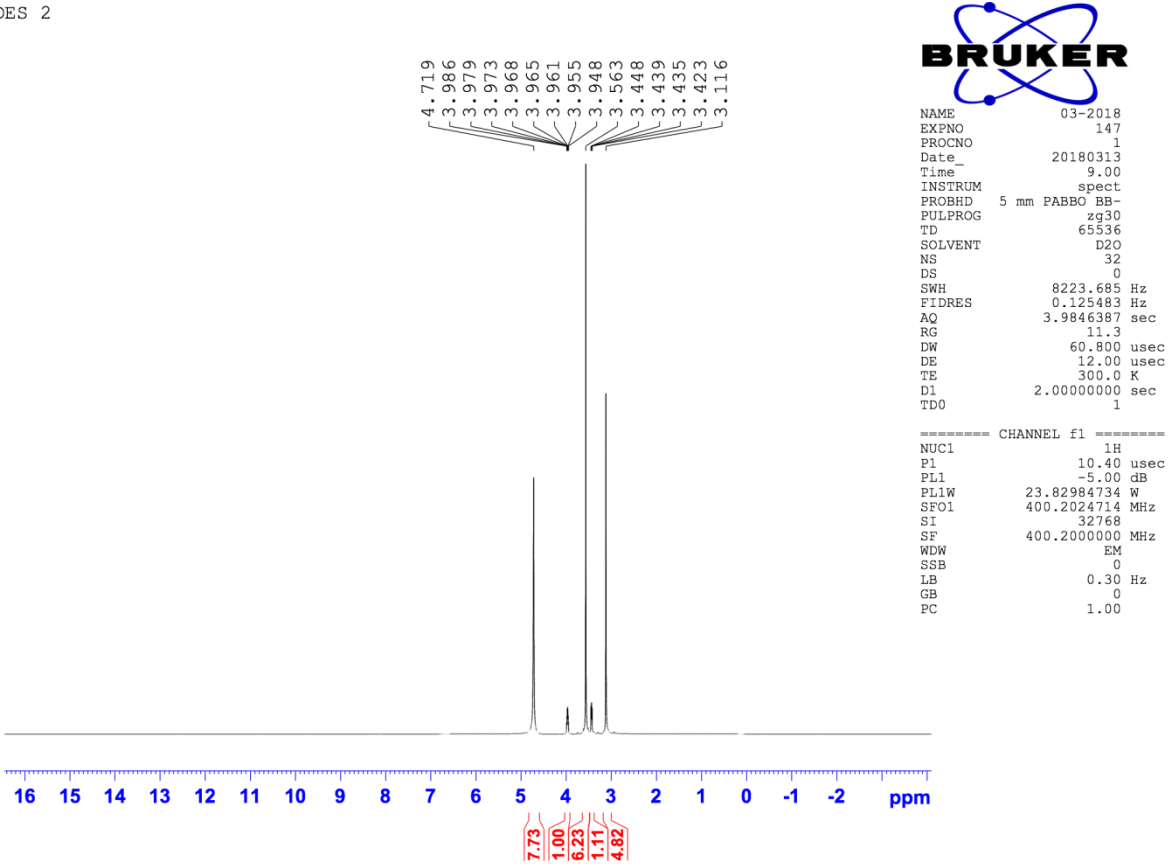
Ek 4. DES 4' ün FTIR spektrumu

DES 1



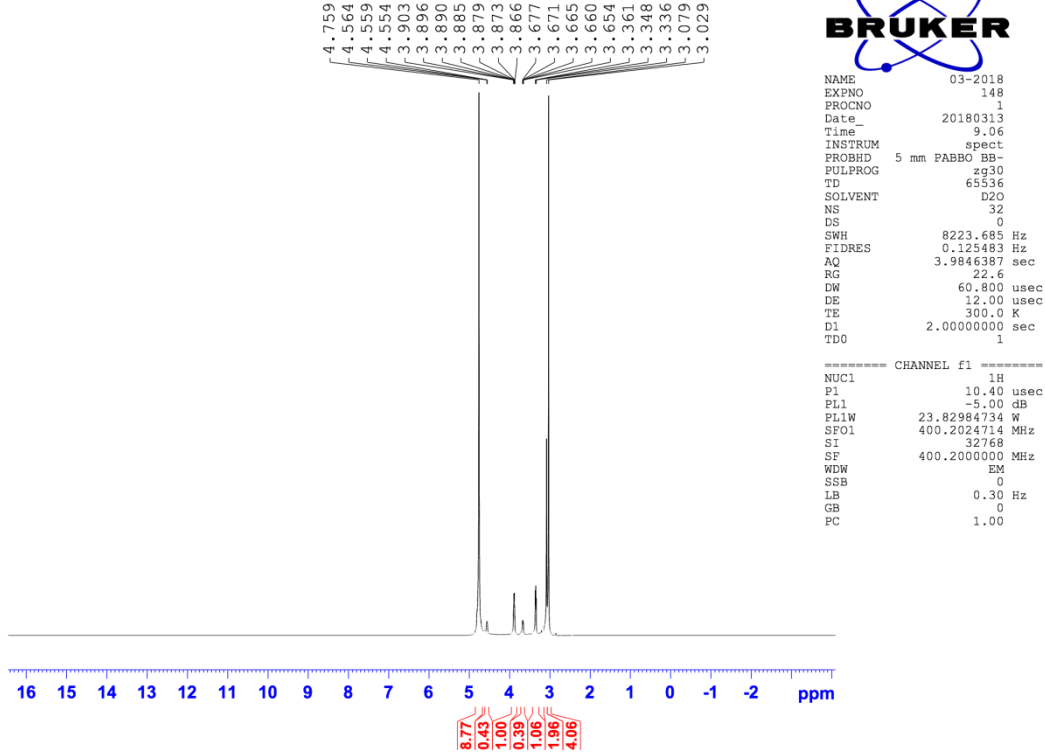
Ek 5. DES 1' in 1H NMR (D2O) spektrumu

DES 2



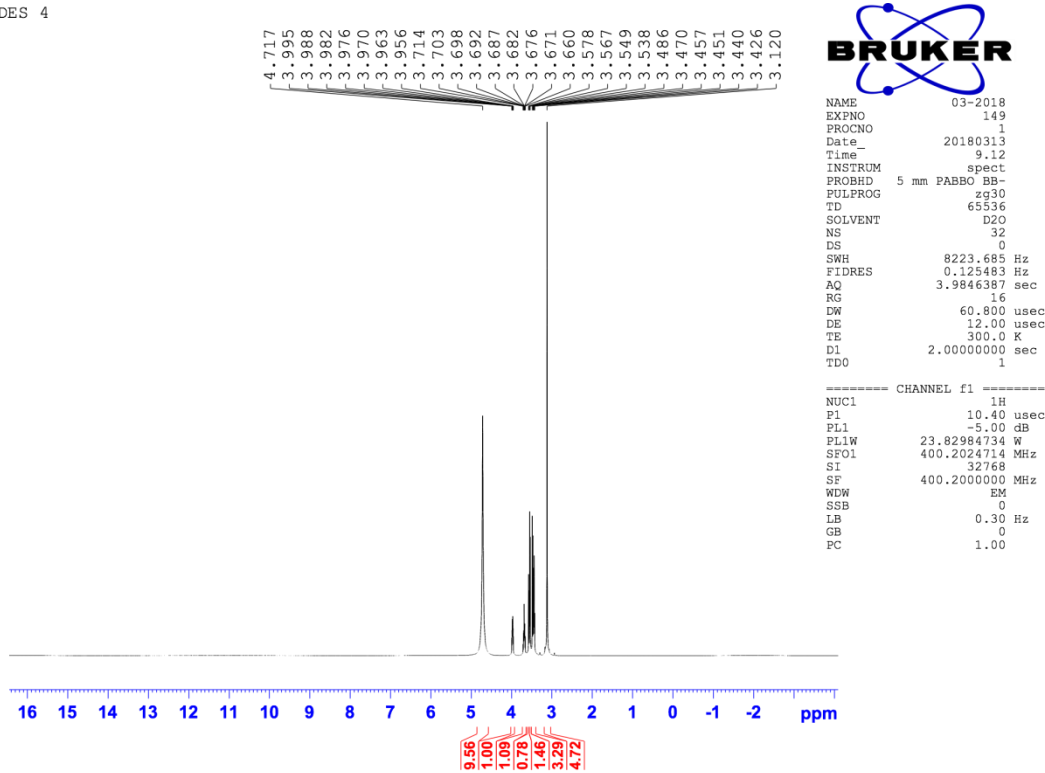
Ek 6. DES 2' nin 1H NMR (D2O) spektrumu

DES 3



Ek 7. DES 3' ün 1H NMR (D2O) spektrumu

DES 4



Ek 8. DES 4' ün 1H NMR (D2O) spektrumu