

K.K.T.C.
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI BENZOKSAZOLON TÜREVLERİNİN ASİTLİK SABİTLERİNİN
(pK_a) ULTRAVİYOLE SPEKTROSKOPİSİ, POTANSİYOMETRİ VE
KAPİLER ELEKTROFOREZ TEKNİKLERİ İLE BELİRLENMESİ

Mahmure BÜYÜKAĞA

Analitik Kimya Programı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

LEFKOŞA
2010

K.K.T.C.
YAKIN DOĞU ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI BENZOKSAZOLON TÜREVLERİNİN ASİTLİK SABİTLERİNİN
(pK_a) ULTRAVİYOLE SPEKTROSKOPİSİ, POTANSİYOMETRİ VE
KAPİLER ELEKTROFOREZ TEKNİKLERİ İLE BELİRLENMESİ

Mahmure BÜYÜKAĞA

Analitik Kimya Programı
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI
Yrd. Doç. Dr. Hayati ÇELİK

LEFKOŞA
2010

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne;

Bu çalışma, jürimiz tarafından Analitik Kimya Programında Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Sedef KIR
Yakın Doğu Üniversitesi

Danışman: Yrd. Doç. Dr. Hayati ÇELİK
Yakın Doğu Üniversitesi

Üye: Yrd. Doç. Dr. Banu KEŞANLI
Yakın Doğu Üniversitesi

ONAY:

Bu tez, Yakın Doğu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim - Öğretim ve Sınav Yönetmeliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. İhsan ÇALIŞ
Enstitü Müdürü

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarımın her aşamasında bana yol gösteren, bilgi ve deneyimlerini, destek ve katkılarını hiçbir zaman esirgemeyen, çalışmalarım için her türlü imkanı sağlayan, değerli hocam, tez danışmanım Sayın Yrd. Doç. Dr. Hayati ÇELİK'e yardımlarından dolayı saygılarımı ve en içten teşekkürlerimi sunarım.

Engin bilgi ve tecrübeleri ile tez çalışmalarına katkı sağlayan değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Sedef KIR ve Sayın Prof. Dr. Erhan PALASKA'ya yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın deneysel bölümündeki kapiler elektroforez analizlerindeki yardımlarından dolayı Sayın Arş. Gör. Mustafa ÇELEBİER'e ve katkılarını sağlayan Hacettepe Üniversitesi'ne teşekkür ederim.

Çalışmalarımda desteğini esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Prof. Dr. Hakkı ERDOĞAN'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Dudu ÖZKUM'a ve Sayın Yrd. Doç. Dr. Banu KEŞANLI'ya teşekkürlerimi ederim.

Tez süresince her zaman yanımda olan arkadaşlarıma ve hayatım boyunca her türlü yardımları ile bugünlere gelmemi sağlayan en büyük destekçim kıymetli aileme teşekkürlerimi sunarım.

ÖZET

Büyükağa, M. Bazı Benzoksazolon Türevlerinin Asitlik Sabitlerinin (pK_a) Ultraviyole Spektroskopisi, Potansiyometri ve Kapiler Elektroforez Teknikleri ile Belirlenmesi. Yakın Doğu Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Analitik Kimya Programı, Yüksek Lisans Tezi, Lefkoşa, 2010.

22 tane 2(3H)-benzoksazolon ve türevleri bu çalışma kapsamından incelenmiştir. Bunlardan 17 adet benzoksazolon türevinin asitlik sabiti (pK_a) değerleri UV- GB spektroskopisi ile bulunarak tespit edilmiştir ve sonuçların doğruluğu potansiyometri ve kapiler elektroforez teknikleri ile kontrol edilmiştir. Bileşik 3, 4 ve 21 için bu maddelerin sahip oldukları pK_a değerlerinin alt limit değerleri bulunmuştur. Bileşik 14 ve 20 ile her üç teknik ile yapılan çalışmalar sonucunda pK_a değeri elde edilememiştir. Elektron çekici gruplar çalışılan bazı 2(3H)-benzoksazolon türevlerinin pK_a değerlerini elektron dağılımını değiştirmesinden dolayı daha asidik karakter kazandırmış ve analjezik etkisinin artmasına sebep olduğu sonucuna varılmıştır. Dolayısıyla, asitlik sabitinin bilinmesinin, ilgili bileşikler ile farmakolojik etkileri arasındaki kimyasal etkileşimin anlaşılması açısından oldukça önemli bir parametre olduğu gösterilmiştir. Asitlik sabiti (K_a) ve bileşiğin yapısı arasındaki ilişki ile yeni ilaç sentez çalışmalarında ve bu maddelerin biyofarmasötik özelliklerinin açıklanmasındaki önemi açıklanmıştır.

Anahtar Kelimeler: 2(3H)-benzoksazolon, asitlik sabiti, UV-GB spektroskopisi, potansiyometri, kapiler elektroforez, tampon çözelti, karbonil bileşikler.

ABSTRACT

Büyükağa M. Spectrophotometric, Potentiometric, and Capillary Electrophoretic Acid Dissociation Constant Values of Some Benzoxazolinone Derivatives in Buffered Solution. Near East University, Institute of Health Sciences Analytical Chemistry Programme, Master's Thesis, Nicosia, 2010.

22 benzoxazolinone derivatives have been studied. Acid dissociation constant (pK_a) values of 17 benzoxazolinone derivatives have been found by using UV-Vis spectroscopy, and the results have been verified by using potentiometry and capillary electrophoresis. For Compound 3, 4, and 21, the minimum acid dissociation constant values have been reported. pK_a of the compound 14 and 20 have not been found by using all of these three techniques. Electron withdrawing groups are decreasing pK_a of the compounds by changing electron distributions and increasing the analgesic activities. Therefore, the knowledge of acidity constant is a key parameter for understanding the chemical interactions between the compound of interest and its pharmacological target. Relationship between acidity constant, K_a , and structure may prove useful in drug design studies and in explaining the biopharmaceutical properties of substances.

Key Words: 2(3H)-benzoxazolinone, dissociation constant, UV-VIS spectroscopy, potentiometry, capillary electrophoresis, buffer solution, carbonyl compounds.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	4
2.1. Benzoksazolon Genel Yapısı	4
2.2. Sentez Yöntemleri	4
2.3. Kimyasal Özellikler	4
3. TEORİK KISIM	7
3.1. Asit-Baz Kimyası	7
3.2. İyonizasyon Sabiti Tayin Yöntemleri	10
3.2.1. Ultraviyole (Mor Ötesi)- Görünür Bölge (UV-GB) Spektroskopi Yöntemi	11
3.2.2. Potansiyometrik Yöntem	16
3.2.3. Kapiler Elektroforez (CE)	18
3.2.3.1. Kapiler Elektroforez Ayırma İlkeleri	23
3.2.3.2. Kapiler Elektroforez Türleri	31
4. GEREÇ VE YÖNTEM	36
4.1. Kimyasal Bileşikler	36
4.1.1. Analizi Yapılan Benzoksazolon Türevleri	36
4.1.2. Analizde Kullanılan Kimyasallar	39
4.2. Kullanılan Ekipmanlar	40
4.3. Tampon Çözeltiler	40
4.4. Yöntemler	41
4.4.1. Ultraviyole (Mor Ötesi)-Görünür Bölge (UV-GB) Spektroskopi Yöntemi	41
4.4.2. Potansiyometrik Yöntem	42
4.4.3. Kapiler Zon Elektroforez Yöntemi	42
5. BULGULAR	44
6. TARTIŞMA	63
7. SONUÇ VE ÖNERİLER	65
KAYNAKLAR	67
EKLER	
EK 1: İkiden Çok Grup Olduğunda Varyansların Homojenlik Testi	
EK 2: Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek Testi	
TEZDEN YAPILAN SÖZLÜ SUNUMLAR	

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Absorbans
a	İyon Aktivitesi
α	Seçicilik
AO	Atom Orbitali
<i>b</i>	Işın Yolu
C	Konsantrasyon
CE	Kapiler Elektroforez
CZE	Kapiler Zon Elektroforez
CGE	Kapiler Jel Elektroforez
CIEF	Kapiler İzoelektrik Odaklama
CITP	Kapiler İzotakoforez
COX	Siklooksijenaz Enzimi
δ	Difüzyon Tabakası Kalınlığı
DMF	Dimetilformamit
E	Elektriksel Alan
e	Yüzey Alana Düşen Yük
ϵ	Dielektrik Sabiti
f	Aktivite Katsayısı
q	Yük
GB	Görünür Bölge
I	İyonik Şiddet
K _a	Asitlik Sabiti
l	Uzunluk
MEKC	Miseller Elektrokinetik Kapiler Kromatografi
MO	Molekül Orbital
μ	Hareketlilik
η	Viskozite
N	Tabaka Sayısı

π	Pi orbitali
P	Güç
PG	Prostaglandin
PGI ₂	Prostasiklin
PPA	Polifosforik Asit
R	Numune Yarıçapı
R _s	Ayırıcılık
σ	Sigma Orbitali
t	Zaman
T	Geçirgenlik
UV	Ultraviyole
V	Voltaj
v	Hız
w	Pik Genişliği
Z	Yük
ξ	Zeta Potansiyeli

ŞEKİLLER

	Sayfa
1.1. 2(3H)-benzoksazolon yapısı ve numaralandırılması.	2
3.1. Elektronik geçiş türleri.	13
3.2. Bir maddenin farklı pH değerlerindeki spektrumları ve bu spektrumlardan pH'ın konsantrasyona karşı grafiğinin oluşturulması.	15
3.3. Kapiler elektroforez cihazının şematik gösterimi.	19
3.4. Kapiler elektroforezde enjeksiyon sistemleri: a, b, c) Hidrodinamik enjeksiyon, d) Elektrokinetik enjeksiyon.	20
3.5. Eritilmiş silika kapilerin boyuna kesiti.	22
3.6. Kapiler içinde elektroozmotik akışın gösterimi.	24
3.7. Voltaja karşı akım (Ohm yasası) grafiği.	26
3.8. Elektroforetik ve elektrozmotik hızların göç zamanı üzerine etkisi. (EOF: elektroozmotik akış, μ_{EP} : elektroforetik hareketlilik, $\mu_{göz}$: gözlenen hareketlilik, t : zaman).	29
3.9. Kapiler zon elektroforezde numune zonlarının ayırımı.	32
3.10. Kapiler zon elektroforezde ayırım.	32

- 5.1.** 2(3H)-benzoksazolon halkasının prontonlanma denge reaksiyonu. 44
- 5.2.** 5×10^{-5} M 2(3H)-benzoksazolon (Bileşik 1)'in değişik pH değerlerinde elde edilen absorbans-dalga boyu grafiği. pH değerleri : a.7.69, b.8.62, c.8.83, d.9.19, e. 9.41, ve f.9.87. 47
- 5.3.** 5×10^{-5} M 2(3H)-benzoksazolon (Bileşik 1)'in değişik pH değerlerindeki 238nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerlerinin pH'a karşı grafiği. pH değerleri : a.7.69, b.8.62, c.8.83, d.9.19, e. 9.41, ve f.9.87 48
- 5.4.** 2(3H)-benzoksazolon (Bileşik 1)'in potansiyometrik yöntem ile pH'ın eklenen bazın (KOH) hacmine karşı çizilen grafiği. 50
- 5.5.** 2(3H)-benzoksazolon (Bileşik 1)'in değişik pH değerlerindeki elektroforetik hareketlilik grafiği. pH değerleri : a.5.65, b.6.03, c.6.42, d.6.81, e.7.21, f.7.63, g.8.02, h.8.18, i.8.61, j.8.96, k.9.12, l.9.69, ve m.10,30. 51
- 5.6.** Bileşik 2 (5-Cl-2(3H)-benzoksazolon)'un değişik pH değerlerinde elde edilen absorbans-dalga boyu grafiği. pH değerleri : a.6.18, b.6.74, c.7.69, d.8.23, e.8.62, f.8.83, g.9.19, h.9.41, ve i.9.75. 53
- 5.7.** 5×10^{-5} M 5-Klor-2(3H)-benzoksazolon (Bileşik 2)'nin 246 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerlerinin pH'a karşı grafiği. pH değerleri : a.6.18, b.6.74, c.7.69, d.8.23, e.8.62, f.8.83, g.9.19, h.9.41, ve i.9.75. 54

- 5.8.** 5-Klor-2(3H)-benzoksazolon (Bileşik 2)'nin değişik pH değerlerindeki elektroforetik hareketlilik grafiği.
pH değerleri : a.6.03, b.6.42, c.6.81, d.7.21, e.7.63, f.8.02, g.8.18, h.8.61, i.8.96, j.9.12, k.9.69, ve l.10.50. 55
- 5.9.** 2(3-Metil)-benzoksazolon (Bileşik 3)'un değişik pH değerlerinde elde edilen absorbans-dalga boyu grafiği.
pH değerleri : 2.10, 6.18, 7.25, 8.10, 9.41. 56
- 5.10.** 5-(2,6-Diflorobenzofenon)-2(3H)-benzoksazolon (Bileşik 11)'in değişik pH değerlerinde elde edilen absorbans-dalga boyu grafiği. pH değerleri : a.5.60, b.6.30, c.6.60, d.7.20, e.7.80, f.8.35, ve g.8.60. 59
- 5.11.** 5×10^{-5} M 5-(2,6-Diflorobenzofenon)-2(3H)-benzoksazolon (Bileşik 11)'in 344 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerlerinin pH'a karşı grafiği. pH değerleri: a.5.60, b.6.30, c.6.60, d.7.20, e.7.80, f.8.35, ve g.8.60. 60

TABLÖLAR

	Sayfa
5.1. Bileşik 1'in pK_a değerleri	44
5.2. 2(3H)-benzoksazon türevlerinin pK_a değerlerinin UV-GB spektroskopisi, potansiyometri ve kapiler zon elektroforez (CZE) ile tayini	45
5.3. Bileşik 11, 12 ve 13'ün asitlik sabiti (pK_a) değerleri ile analjezik aktiviteleri	58

1. GİRİŞ VE AMAÇ

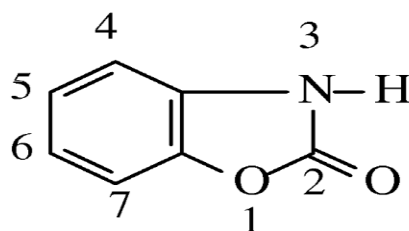
İki ana grupta toplanan analjeziklerden narkotik olmayanların, ilaç bağımlılığı yapmamaları, anti-inflamatuvar etkilerinin bulunması ve terapötik etkilerine karşı tolerans oluşmaması nedeniyle terapötik önemi artmaktadır. Günümüzde yaygın olarak kullanılmakta olan streoid olmayan anti-inflamatuvar ilaçlar (narkotik olmayan analjezikler), hipnotik etkiye sahip olduklarının açıklanmasıyla konu üzerine çalışmalar yoğunlaşmış ve benzoksazolon ana yapısına sahip türevlerinin ilaç kimyasındaki önemini her geçen gün artırmıştır.

Streoid olmayan anti-inflamatuvar ilaçlar, seçici olmayan siklooksijenaz enzim inhibisyonu yapmaktadırlar. Siklooksijenaz enzimleri hücre içerisinde araşidonik asitten prostasiklin (PGI₂) ve prostaglandin (PG)'lerin oluşumunda görevli enzimlerdir. İyi bilinen iki izoformu (COX-1 ve COX-2) bulunmaktadır. COX-1, vücut hücrelerinin çoğunda olup gastrik mukozanın korunmasında önemli rol oynamaktadır. COX-2 ise çoğu hücrede normalde düşük seviyelerde bulunurken, inflamasyon ile pek çok hücrede miktarı hızla artmaktadır (*Dannhardt ve Kiefer, 2001*). Son yıllardaki araştırmalarda bir üçüncü siklooksijenaz izoformunun (COX-3) da bulunduğu ileri sürülmüş ancak işlevi üzerinde kesin sonuçlar henüz bildirilmemiştir (*Botting, 2003*). Bu ilaçlar özellikle yaşlı hastalarda romatoid artrit, osteortritin akut ve kronik ağrılarında, eklem dokusu rahatsızlıkları, gut ve kas incinmelerinde de etkili olarak tedavi amaçlı kullanılmaktadır. Sık kullanımı ile seçici olmayan COX inhibitörlerinin önemli bir yan etkisi gastrik ülser oluşumudur. Aynı zamanda milenyum ilaçları olarak anılan COX-2 inhibitörlerinin çok miktarda tüketilmesinin kardiyovasküler hastalıklarda ciddi artışa yol açtığı da saptanmıştır (*Schnitzer, 2001*). Analjezik anti-inflamatuvar bileşik araştırma-geliştirme çalışmaları yoğun bir şekilde devam etmektedir.

2(3H)-benzoksazolon türevleri üzerine çalışmalar ilk olarak o-hidroksi fenilüretandan 2(3H)-benzoksazolon sentezinin yapılmasıyla başlamıştır (Groenvik, 1876). Takip eden yıllarda uzunca bir süre benzoksazolonlar üzerinde sadece kimyasal çalışmalar yapılmıştır. Bu bileşikler üzerinde yapılan yapısal değişiklikler ile

sentezlenmiş olan yeni benzoksazolon türevlerinin kimyasal ve biyolojik özellikleri incelenmiş ve türevlerinin hipnotik (*Erdoğan, 1988; Lespagnol ve diğerleri, 1941; Lespagnol ve Cannesson, 1945; Palaska ve diğerleri, 1995*), analjezik (*Nakena ve diğerleri, 1990*), antifungal (*Czerwinska ve diğerleri, 1967; Tacquet ve diğerleri, 1971; Toyoshima ve Morishita, 1968; Virtanen ve Hietala, 1955*), antiromatizmal (*Aries, 1970*), kas gevşetici (*Lespagnol ve diğerleri, 1961; Sam ve diğerleri, 1958; Sam ve Plampin, 1964*) ve antibakteriyel (*Bonte ve diğerleri, 1974; Lespagnol ve diğerleri, 1953; Noda, 1956; Rajendra ve Nobles, 1968; Tacquet ve diğerleri, 1971; Virtanen ve diğerleri, 1956*) etkiye sahip oldukları gözlenmiştir.

2(3H)-benzoksazolon türevlerinde yapısal değişiklikler daha çok molekülün 3, 5 ve 6 numaralı konumlarında yapılmıştır (Şekil 1.1). Yapılan bu değişikliklerle sentezlenmiş olan benzoksazolon türevlerinin farmakolojik özelliklerinin incelenmesi neticesinde analjezik etkisinin de olduğu bulunmuştur (*Aries, 1970; Bonte ve diğerleri, 1974; Cazin ve diğerleri, 1978; Close ve diğerleri, 1949; Erol ve diğerleri, 1990; Lespagnol ve diğerleri, 1944; Lespagnol ve diğerleri, 1953; Lespagnol ve diğerleri, 1967; Lespagnol ve diğerleri, 1976; Mercier ve Etzensperger, 1954; Renard ve diğerleri, 1980*). 6-açıl-2(3H)-benzoksazolon türevlerinde (6-benzoil ve 3-metil-6-asetil-2(3H)-benzoksazolon) gözlenen analjezik etkisinin, ana yapı ve aspirinin analjezik etkisinden daha yüksek olduğu saptanmıştır (*Lespagnol ve diğerleri, 1976*).



Şekil 1.1. 2(3H)-benzoksazolon yapısı ve numaralandırılması.

Araştırmacılar 2(3H)-benzoksazolon ve türevlerinin antifungal ve antibakteriyel etkilerini ilk defa buğdaygil bitkilerinden elde ettikleri 2-benzoksazolon ve özellikle 6-metoksi-2-benzoksazolon üzerinden çalışmış ve bu bileşiklerin çok düşük konsantrasyonlarda *Esherichia coli* ve *Staphylococcus aureus* gibi bakterilere; ayrıca *penicillium* ve *aspergillus* gibi mantarlara karşı etkili olduklarını belirtmişlerdir (*Virtanen ve diğerleri*, 1956).

2(3H)-benzoksazolon bileşiklerinin kas gevşetici etkisi ise, ürikozürük ve kas gevşetici etkilere sahip olan 2-amino-5-klorobenzoksazol'un metabolitlerinin incelenmesi sonucu ortaya çıkmıştır (*Lespagnol ve diğerleri*, 1961; *Sam ve Plampin*, 1964). Bu ilacın amin grubunun, vücutta oksidatif olarak koparıldığı ve 5-kloro-2(3H)-benzoksazolon yapısına dönüştüğü gözlenmiştir.

Asitlik sabitlerinin bilinmesi, ilgili bileşikler ile farmakolojik etkileri arasındaki kimyasal etkileşimin anlaşılması açısından oldukça önemli bir parametredir. Asitlik sabiti (K_a) ile bileşiğin yapısı arasındaki ilişkiden yeni ilaç sentez çalışmalarında ve bu maddelerin biyofarmasötik özelliklerinin açıklanmasında yararlanılmaktadır. Birçok biyolojik aktif molekül, fizyolojik pH'ta kısmen ya da tamamen iyonlaşabilmekte ve iyonlaşabilen grupların varlığının biyolojik aktiflik ve/veya çözünabilirlik açısından oldukça önemli olduğu bilinmektedir. Bu durum, ortaya çıkan yeni moleküllerin asitlik sabitlerinin (K_a) değerlerin bulunmasında doğru tekniklerin kullanılmasını gerektirmektedir.

Bu çalışmadaki temel amaç 2(3H)-benzoksazolon ve onun türevlerinin K_a değerlerinin spektrofotometri yöntemi ile belirlenmesidir. Bu teknik ile elde edilen asitlik sabitlerinin, potansiyometri ve kapiler zon elektroforez yöntemleri ile doğruluğunun teyit edilmesi hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Benzoksazolon Genel Yapısı

2(3H)-benzoksazolon bileşiği, benzen ve 2-oksazolon halkalarından oluşmaktadır. Molekülün klasik numaralandırılması Şekil 1.1’de gösterilmektedir.

2.2.Sentez Yöntemleri

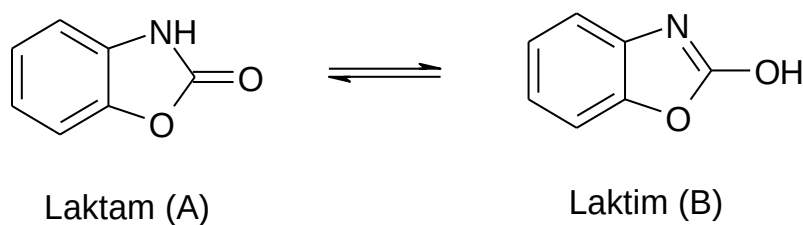
2(3H)-benzoksazolon, ilk kez 1876 yılında Groenvik tarafından, etil-N-(o-hidroksifenil) üretanın kuru distilasyonu ile elde edilmiştir (Groenvik, 1876). Takiben, çeşitli araştırmacılar 2(3H)-benzoksazolonu o-hidroksifenilüretan ile sodyum hidroksit, metalik sodyum veya sodyum etoksit gibi reaktifleri deneyerek değişik verimlerle sentezlemişlerdir (Harsanyi ve Toffler, 1965; Kalckhoff, 1883).

2(3H)-benzoksazolonların hazırlanmasında en sık kullanılan iki yöntem, o-aminofenolün üre veya fosgen ile reaksiyona sokulmasıdır. 2(3H)-benzoksazolonun daha saf ve yüksek verimle elde edilebilmesi için günümüze kadar süren kapsamlı araştırmalar yapılmıştır. Sonraki yıllarda reaksiyon süresi ve ısı gibi reaksiyon koşulları ayarlanarak verim %35’ten %76-96’a kadar yükseltilmiştir (Close ve diğerleri, 1949; Heise ve Mees, 1973; Macdonald ve Chechak, 1945). Yapılan çalışmalarda 2(3H)-benzoksazolonların hazırlanmasında o-nitrofenol, salisilik asit türevlerinden de hareket edilmiştir. Verimin artırılması için değişik sentez yöntemleri geliştirilmiştir (Chen ve Fengping, 1998; Faddeeva ve Baskokov, 1972; Maleski ve diğerleri, 1991; Sam ve Valentine, 1969; Yamahara ve Takamatsu, 1973).

2.3.Kimyasal Özellikler

2(3H)-benzoksazolon, oksijen ve azot atomu içeren beş üyeli 2-oksazolon halkası ile benzenin kaynaşmasından oluşmuş heterosiklik bir halkadır. 139-140 °C’de eriyen beyaz renkli bir bileşik olup sulu çözeltilerinde pH < 5’te noniyonize, pH > 11.5’da iyonize halde bulunduğu bildirilmiştir.

2(3H)-benzoksazolonlar üzerinde yapılan çalışmalarda, üç numaralı konumda süstituent içermeyen türevlerin azot atomundaki serbest hidrojenden dolayı **laktam-laktim** dengesinde bulunduğu bildirilmektedir. Yapılan ilk araştırmalarda, 2(3H)-benzoksazolonların, 2-benzoksazolon (**A**) ve 2-hidroksibenzoksazol (**B**) olmak üzere iki tautomerik yapıda bulunabileceği öne sürölmüştür (*Seidel*, 1890).



Takip edilen çalışmalarda ise, 2-benzoksazolon'un laktam ve laktim formunu saptamak için halkanın değişik türevleri, diazometanla reaksiyona sokulmuş ve sadece N-metil türevlerinin olduğu belirtilmiştir (*Zinner ve Herbig*, 1955).

2(3H)-benzoksazolon molekülünün klasik elektrofilik süstitüsyon reaktiflerine karşı özel bir ilgi gösterdiği ve yönlendirici etkinin halka içi azot tarafından belirlendiği, bunun sonucu olarak da süstitüsyonun öncelikle altı numaralı konumdan daha ileri aşamalarda ise dört numaralı konumdan yürüdüğu bildirilmiştir.

6-Açıl-2-benzoksazolonların hazırlanması için üç yöntem bildirilmiştir. Bu yöntemlerden birincisinde çözücü ve katalizör olarak polifosforik asit (PPA), reaktif olarak da karboksilli asitler kullanılmıştır (*Bonte ve diğerleri*, 1974; *Renard ve diğerleri*, 1980). İkinci yöntemde ise alüminyum triklorür (AlCl_3)- dimetilformamit (DMF) varlığında asit halojenür veya anhidritler (*Friedel Crafts* reaksiyonu) kullanılmıştır (*Yous ve diğerleri*, 1994; *Aichaoui ve diğerleri*, 1991). 6-Açıl-2-benzoksazolonların hazırlanmasında alternatif bir yol da *Chattaway* çevrilmesinin 2-benzoksazolonlara uygulanması ile oluşmuştur. Asit anhidritleri veya açıl halojenürlerin, 2-benzoksazolon

ile piridin içindeki reaksiyonu ile 3-açıl-2-benzoksazolonlar hazırlanmış, bunların da PPA içinde 110-130 °C'de 1.5-3.5 saat ısıtılması sonucu açıl göçü ile 6-açıl-2-benzoksazolon türevlerine ulaşılmıştır (*Cotelle ve diğerleri*, 1989). Farklı araştırmacılar benzer reaksiyonu, N-açıl türevlerini tetrahidrofuran (THF) içinde, trietilamin (TEA) varlığında asit anhidriti veya asit klorürleriyle tepkimeye sokarak elde etmiş, bunların da alüminyum klorür varlığında 165 °C'de üç saat ısıtılmasıyla yüksek verimle 6-açıl-2-benzoksazolonlara ulaşmışlardır (*Uçar ve diğerleri*, 1996; *Uçar ve diğerleri*, 1998).

3. TEORİK KISIM

3.1. Asit-Baz Kimyası

İyonizasyon sabiti, asit ve bazların kuvvetini ölçmek için kullanılan bir terimdir (*Albert ve Serjant, 1984*). Bu sayede tüm asitler ve bazlar ayırt edilebilmekte, farklılıkları değerlendirilebilmektedir. Ayrıca kıyas yapma ve nicel değerlendirmelere de olanak sağlamaktadır.

Organik bileşikler asidik veya bazik gruplar içerebilirler. Bu gruplar, bileşiğin kimyasal, fiziksel ve biyolojik özelliklerini tayin etmektedir. Bu gibi bileşiklerde moleküler, anyonik, katyonik türlerin birbirlerine oranı pK_a ile hesaplanabilir. Ayrıca kimyasal olarak birbirine çok benzeyen maddelerin birbirinden ayırt edilmesi de pK_a yardımı ile yapılabilmektedir.

Asit ve baz iyonizasyon tarifi, en kullanışlı olarak Bronsted-Lowry tarafından yapılmıştır. Bu tarife göre, asit proton verebilen, baz ise proton alabilen maddedir (*Petrucci ve diğerleri, 2002*). Asit iyonizasyonu ile iyonizasyon sabitleri şu şekilde ifade edilmektedir (Formül 3.1 ve 3.2).



$$K_a = \frac{\{H^+\} \{A^-\}}{\{HA\}} \quad (3.2)$$

Bazlar için ise iyonizasyon ve iyonizasyon sabiti aşağıdaki şekilde gösterilmektedir (Formül 3.3 ve 3.4).



$$K_b = \frac{\{BH^+\} \{OH^-\}}{\{B\}} \quad (3.4)$$

Kullanılan { } şeklindeki parantez işareti, her bir iyonik türün aktivitesini ifade etmektedir. Herhangi bir sıcaklık için termodinamik iyonizasyon sabiti olarak bilinen bu denklemler terimlerin aktivite türünden olmasından dolayı konsantrasyondan bağımsızdır. İyonizasyon sabitleri hesaplanırken aktivite yerine konsantrasyon daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Asitler ve bazlar için iyonizasyon sabitinin konsantrasyona göre ifade edilişi şu şekildedir (Formül 3.5 ve 3.6);

$$K_a = [H^+] [A^-] / [HA] \quad (3.5)$$

$$K_b = [BH^+] [OH^-] / [B] \quad (3.6)$$

Genel denklemleri ise aşağıda ifade edilen şekildedir (Formül 3.7 ve 3.8);

$$pK_a = pH + \log [HA] / \log [A^-] \quad (3.7)$$

$$pK_b = pOH + \log [B] / \log [BH^+] \quad (3.8)$$

Bu ifadelerdeki köşeli parantezler ise iyonik türün konsantrasyonu olarak kullanılmaktadır. Herhangi bir çözeltide çözünmüş olan maddenin iyonlarının aktivitesi ile konsantrasyon arasında $a = f \times C$ şeklinde bir bağıntı vardır (Skoog ve diğerleri, 1996). Denklemdaki a iyonun aktivitesi, C konsantrasyonu, f ise aktivite katsayısını ifade etmektedir. Yükü Z olan bir iyon için aktivite katsayısı seyreltik çözeltiler için Debye-Hückel denklemi ile verilir (Formül 3.9) (Skoog ve diğerleri, 1996).

$$-\log f = Az^2 I^{1/2} / (1 + I^{1/2}) - 0.1 z^2 I \quad (3.9)$$

Burada I, iyonik şiddet olup $I = \frac{1}{2} \sum (C \times z^2)$ ifadesi ile verilir. Denklemlerdeki A'ya *Debye-Hückel* parametresi denir. Bir değerli asit ve bazlar için iki sabit arasındaki fark

çoğunlukla küçüktür. 0.01 M ve 0.001 M'lık bir konsantrasyonda hemen hemen hiçbir fark yoktur (*Skoog ve diğerleri*, 1996). Formül 3.7'nin daha kolay bir şekilde kullanabilmek için sabitler 0.01 M'dan daha düşük olmayan çözeltilerde tayin edilmiş olmalı ve sadece aynı değerlikli iyonlar kullanılmalıdır.

Bir nötral molekülün aktivitesi, herhangi bir seyreltme nedeniyle konsantrasyonda olabilecek bir değişiklik ile önemli bir değişime uğramaz. H^+ iyonu konsantrasyonunu ölçmek yerine, H^+ iyonu aktivitesini (a, dolayısıyla pH) ölçmek daha kolay ve iyi bir yol olarak tercih edilmektedir (*Skoog ve diğerleri*, 1998).

Elektrolit olmayan maddeler, suda çözündüğü zaman suyun elektriksel iletkenliğini artırmayan maddelerdir. Çözünme miktarıyla orantılı olarak suyun donma noktasını düşürürler. Elektrolit olmayan maddelere örnek olarak benzen, eter ve kloroform verilebilmektedir. Diğer taraftan ise asitler, bazlar ve tuzlar, suda çözüldükleri zaman suyun elektriksel iletkenliğini artırır. Bu maddelere de elektrolit maddeler denilmektedir (*Berkem ve diğerleri*, 1994). Tuzlardan farklı olarak, birçok asit ve baz çözeltide tamamen iyonlaşmazlar. Kuvvetli asit ve bazlar 0-14 pH aralığında tamamen iyonlaşırlar. Fakat zayıf asit ve bazlar kısmen iyonlaşırlar (*Skoog ve diğerleri*, 1998).

İyonizasyon sabitleri yardımıyla verilen herhangi bir pH'de, bir maddenin iyonlaşmasından oluşan değişik iyon türlerinin konsantrasyonları hesaplanabilmektedir. Değişik iyon türleri değişik UV-GB spektrumuna sahip olup sadece bunun bilinmesiyle önemli spektroskopik çalışmalar yapılabilir. Verilen bir maddenin iyonik türleri kimyasal, biyolojik ve fiziksel özellikleri yönünden farklıdır. İyonizasyon sabitleri, bir maddenin en az iyonlaştığı pH aralığını tanımlayarak, azami ürünün alınabileceği en iyi koşulları göstermektedir. Bu durum hazırlık kimyası için oldukça önemlidir (*Albert ve Serjant*, 1984).

İyonizasyon sabitleri nümerik olarak küçük ve kullanışsız sayılardır. Bu bakımdan asit sabitlerinin eksi logaritmalarını (pK_a) kullanmak daha pratiktir. 25 °C'de

suyun iyonları çarpımının eksi logaritmalarının toplamı 14.00 tür. Bu durum aşağıdaki şekilde ifade edilmektedir (Formül 3.10).

$$pK_a + pK_b = 14.00 \quad (3.10)$$

Bazlar için kullanılan pK_b değerlerini pK_a cinsinden ifade edilmesi yukarıdaki denklemden gösterilen şekilde kolayca bulunabilir. Bu bakımdan pK_a değerleri asitlerin ve bazların kuvvetlerini karşılaştırmak için çok uygun bir yol olarak kullanılmaktadır (*Berkem ve diğerleri*, 1994). Bir asit ne kadar kuvvetli ise pK_a 'sı o kadar düşük, bir baz ne kadar kuvvetli ise pK_a 'sı o kadar yüksektir (*Perrin ve diğerleri*, 1981). Kimyasal reaksiyonların çoğu sulu ortamda gerçekleşmektedir. Su ve benzeri çözücüler, iyonizasyona etki etmektedir. Ayrıca iyonizasyon sabiti, sıcaklıkla da değişim göstermektedir.

3.2.İyonizasyon Sabiti Tayin Yöntemleri

İyonizasyon sabitlerinin (K_a) belirlenmesinde üç temel yöntem kullanılmaktadır. Bunlar;

1. Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopisi (UV-GB)
2. Potansiyometri
3. Kapiler Zon Elektroforez (CZE)

UV-GB spektroskopisi yöntemi, cam elektrodunun çalışma sınırlarının dışında olan çok yüksek ve çok düşük pH aralıklarında ve özellikle çok az çözünen maddelerin iyonizasyon sabitlerinin tayini için uygundur. Bu yöntem sadece UV ve görünür ışığı absorbe eden maddeler için kullanılmaktadır.

İyonizasyon sabitini tayin etmek için en uygun yöntemlerden biri olarak potansiyometrik titrasyon yöntemi kullanılmaktadır. Potansiyometrik yöntem ile bir iyonizasyon sabitinin tayini 30-40 dakika sürerken, UV spektroskopisi yöntemi genellikle

bir çalışma gününün tamamını kapsamaktadır. Potansiyometrik yöntemde numune tarafından bağlı olmayan H^+ iyonları ölçülmektedir. Spektroskopik yöntemde ise numune tarafından H^+ iyonlarının tutulduğu zamanki spektral kayma ölçülmektedir.

Kapiler zon elektroforez yöntemi ise iyonizasyon sabiti tayini için kullanılan bir diğer yöntem olup oldukça hızlı ve çok küçük hacimdeki numunelerde yüksek ayırma gücüne sahip olduğundan yaygın olarak kullanılmaktadır.

3.2.1. Ultraviyole (Mor Ötesi)- Görünür Bölge (UV-GB) Spektroskopi Yöntemi

Organik maddeler için spektroskopik analiz, absorplanan ışımının frekansının ve şiddetinin ölçülmesiyle gerçekleşmektedir. Absorpsiyon spektrumlarının elde edilmesi için kullanılan cihazlara spektrofotometre ya da spektrometre denir.

Tek veya çift ışın demetli olmak üzere iki çeşidi bulunmaktadır. Tek ışık yollu spektrofotometrelerde aynı dalga boyunda çözücüye karşı ışık yolu kapatılarak sıfır geçirgenlik ayarı ve ışık yolu açılarak %100 geçirgenlik ayarı yapılmaktadır. Aynı dalga boyunda analit içeren çözeltinin absorbansı ölçülmektedir. Çift ışık yollu cihazlarda ise her dalga boyu için ayrı ayrı 0 ve 100 ayarları yapmak yerine, monokromatörden çıkan ışık eşit şiddette iki demete bölünerek birinin ölçülecek örneğe diğerinin çözücünün bulunduğu kaba gönderilmesiyle ölçüm süresi azaltılmaktadır. Böylece örnekteki geçirgenlik değeri sürekli olarak çözücününki ile karşılaştırılmış olmaktadır.

Elektromagnetik ışıma tabi tutulan bir molekül, ışımının enerjisi molekülün elektronik enerji seviyesine eşit olduğu zaman, bu ışımaya molekül tarafından absorplanarak elektronlar bir üst elektronik enerji seviyesine çıkar. Bu nedenle UV-GB spektroskopisine molekül orbitalleri arasında elektron geçişlerini inceleyen spektroskopi dalı da denilmektedir (*Skoog ve diğerleri*, 1998).

Moleküler absorpsiyon spektroskopisi 160-780 nm dalga boyları arasındaki ışığın b ışın yoluna sahip bir hücredeki çözeltinin geçirgenliğinin (T) veya absorbansının

(A) ölçümüne dayanmaktadır. Bu absorpsiyon daha çok moleküllerdeki bağ elektronlarının uyarılmasından kaynaklanmakta, bunun sonucu olarak moleküler absorpsiyon spektroskopisi bir moleküldeki fonksiyonel grupların tanımlanmasında ve aynı zamanda fonksiyonel grupları taşıyan bileşiklerin nicel tayininde kullanılmaktadır.

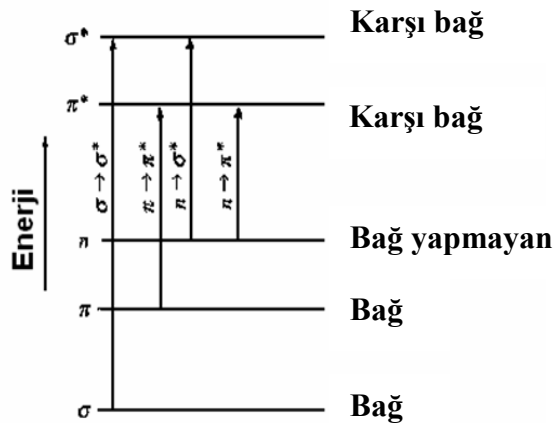
Molekül orbitalleri (MO), atom orbitallerinden (AO) oluşmaktadır. İki atom orbitalinin doğrusal bileşimi ile iki tane molekül orbitali meydana gelmektedir. Molekül orbitalleri atom orbitallerinden daha düşük enerji seviyesinde gerçekleştiğinden molekül oluşumu tercih edilerek moleküller oluşmaktadır. Enerjisi düşük olan moleküler orbital seviyesine temel hal denilmektedir.

Elektronlar bağ (elektronun enerji almadan önce bulunduğu orbital) ve karşı-bağ (enerji aldıktan sonra bir an için bulunduğu yüksek enerjili orbital) olmak üzere iki seviyede yer alabilirler.

Sigma (σ) orbitalleri; AO lerinin “uç uca” örtüşmesi, diğer bir deyişle tek lop örtüşmesi ile oluşmaktadır. Sigma orbitalinin yük yoğunluğu bağ eksenini çevresinde simetriktir. Organik moleküllerde daha çok σ - σ , p-p veya σ -p orbitalleri arasında meydana gelmektedir. Pi (π) orbitalleri ise; iki tane p AO lerinin “yan yana” örtüşmesi ile oluşmaktadır. Bu orbitaller bağ eksenini doğrultusunda düğüm düzlemine sahiptir. Yük yoğunlukları bağ ekseninin altında ve üstünde bulunur. Bağ yapmayan (n) orbitaller; s orbitali p orbitalinin iki lobu ile örtüşürse toplam örtüşme sıfır olur. Çoğu kez, bağ yapmayan orbitalin enerji seviyesi, bağ ve karşı-bağ orbitallerinin enerji düzeylerinin arasında yer almaktadır. Şekilde gösterildiği gibi (Şekil 3.1), organik moleküllerde dört çeşit elektronik geçiş gerçekleşmektedir: $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$, $\pi \rightarrow \pi^*$.

$\sigma \rightarrow \sigma^*$ geçişleri: En yüksek enerji isteyen geçişlerdir. $\lambda < 190$ nm olmalıdır. Doymuş hidrokarbonlarda görülmektedir.

$n \rightarrow \sigma^*$ geçişleri: Heteroatom içeren doymuş bileşiklerde σ elektronları ve ortaklaşmamış n elektronları bulunmaktadır. Bunlar σ^* karşı bağ orbitaline geçerler. Bu geçişe neden olan gruplar halojenler, eterler, tiyoeter, amin, hidroksit, sülfid gibi gruplardır. Bu geçişler ortaklanmamış elektron çiftleri içeren bileşiklerde (bağ yapmayan orbitalde bulunan elektronları içeren) gözlenmektedir. Absorpsiyon piklerinin çoğu 150-250 nm aralığındaki bölgede yer almaktadır.



Şekil 3.1. Elektronik geçiş türleri.

$n \rightarrow \pi^*$ ve $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişleri: $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişleri, az enerji isteyerek doymamış hidrokarbonlarda görülmektedir. Bu geçişler 200 nm civarında gerçekleşmektedir. $n \rightarrow \pi^*$ geçişleri, C=O, C=S, C=N grubu taşıyan bileşiklerde heteroatom üzerindeki serbest elektron çiftlerinin π^* orbitallere geçişiyle olmaktadır. En az enerji isteyen geçişler olup 250-300 nm civarında olur. 200-700 nm arasındaki spektral bölgede absorpsiyon yaptıklarından UV-GB spektroskopisinde en çok karşılaşılan geçişlerdir. Bu geçişlerin her ikisi de, π^* orbitallerine ilerlediğinden doymamış fonksiyonel grup içeren organik bileşiklerde gözlenmektedir. Diğer bir deyişle, bu doymamış absorplayıcı merkezler kromofor olarak adlandırılmaktadır. $n \rightarrow \pi^*$ geçişlerinin molar absorptiviteyi çoğu kez düşük iken (10-100), buna karşılık $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerine ait değerler daha yüksektir (1000-10000). Bu iki absorpsiyon tipi arasındaki diğer bir karakteristik fark

ise, çözücünün piklerin dalga boyu üzerindeki etkisidir. Molekül orbital yaklaşımında, π elektronlarının delokalizasyonu konjügasyonla artmaktadır. Böylece π^* orbitallerinin enerjisi düşerek daha az karşı-bağ karakterine sahip olmaktadır. Organik bileşiklerde 185 nm'den daha düşük dalga boylu ışınları absorplayan geçişleri incelemek zordur, çünkü vakum UV bölgesine düşmektedir.

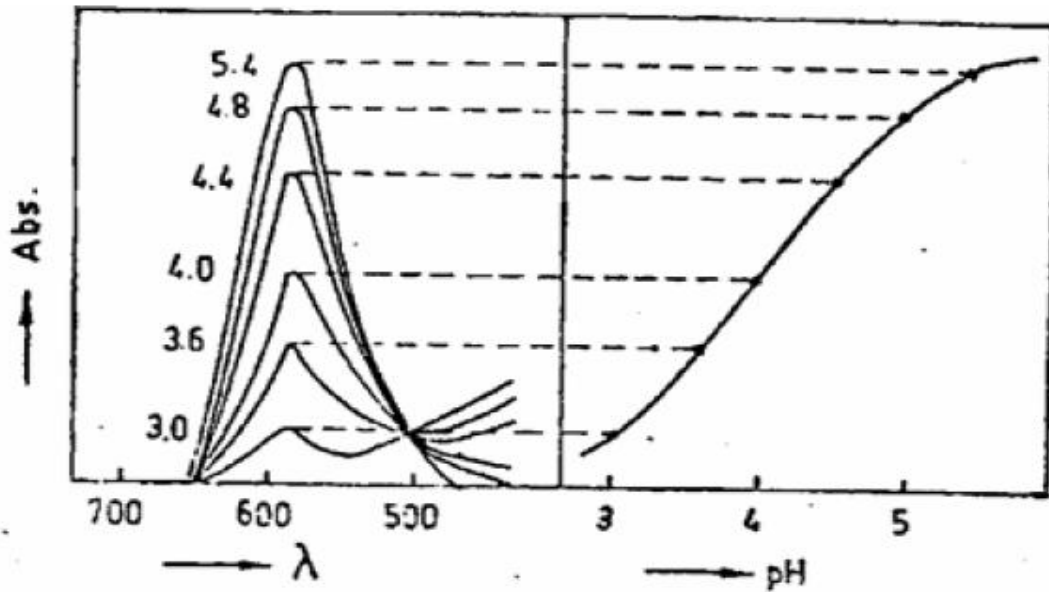
UV-GB Spektroskopisi kalitatif ve kantitatif analizlerde kullanılmaktadır. Analiz için çoğunlukla kuvarts (silika) hücreler kullanılmaktadır. Çift ışın yollu spektrofotometrelerde ölçümlerin en iyi duyarlılıkla yapılabilmesi için, bir çift hücrenin tamamen aynı olması, birinin saf çözücü, diğzerinin örnek çözeltiyle doldurarak referans ve örnek bölmelerine yerleştirilmesi gerekmektedir. Ultraviyole analizleri için kullanılacak bir çözücünün, spektrumu alınacak bileşik ile aynı bölgede absorpsiyon yapmaması gerekir. Fark spektrumunun örnek ve referans bölmeleri boş olduğu zamanki çizgiden sapması, hücrelerin uyuşmazlığına sebebiyet vermektedir. Bu bakımdan hücreler, bir kez kalibre edilmeli ve her defasında örnek için aynı hücre kullanılmalıdır. Kullanılan hücrelerin optik yüzeylerinin korunmasına çok özen gösterilmelidir. El değmemeli, silmek için mercek temizliğinde kullanılan kağıtlar kullanılmalı, kağıt mendil kullanmaktan kaçınılmalıdır. Hücrelerin doldurulması ve boşaltılması bir pipet yardımı ile yapılmalı ve hücreler hiçbir zaman içindekiler dökülerek boşaltılmamalıdır. Kullandıktan sonra hücreler su veya etanol ile çalkalanarak temizlenmelidir. Yüzeyleri çizilmiş veya kazınmış hücreler kullanılmamalıdır.

UV-GB spektroskopisi ölçümlerinde takip edilen işlemler şu şekildedir:

1. Derişimi ayarlanarak uygun bir stok çözelti hazırlanmalı ve uygun pH değeri olan tamponlar içerisinde seyreltilmeli
2. Denge konumundaki iki iyon türüne ait saf spektrum araştırılmalı
3. Tayin için uygun bir dalga boyu seçilmeli (analitik dalga boyu)
4. pK_a değerine yakın bir değer araştırılmalı
5. pK_a değerinin gerçek değeri tayin edilmeli

UV-GB Spektroskopisi yöntemiyle iyonizasyon sabitinin tayini, dengedeki türlerin oldukça farklı dalga boylarında absorpsiyon yapmaları temeline dayanmaktadır (Shumard, 1959).

Organik asit ve bazlar ortamın pH'sine bağlı olarak absorpsiyon spektrumları vermektedirler. HA bir organik asit olduğuna göre çözeltideki denge ve denge eşitliği konsantrasyon cinsinden Formül 3.5'te verilmiştir. Eşitlikte her iki tarafın eksi logaritmasının alınması durumunda oluşan denklem ise Formül 3.7 verildiği gibidir. Bu denklemde pH, [HA] ve $[A^-]$ bilinirse, pK_a yani K_a değeri hesaplanabilmektedir. Ancak, bu hesaplama üç bilinmeyeni ayrı ayrı tayin etmeden de yapılabilir. Formül 3.7'de verilen denklemde $[HA] = [A^-]$ olduğunda, $pK_a = pH$ olmaktadır. Buna bağlı olarak absorpsiyonun pH ile değişmesinden yararlanılarak asitlik sabitinin değeri (K_a) bulunabilmektedir (Skoog ve diğerleri, 1998). Herhangi bir bileşiğin pH'ye bağlı oluşturduğu spektrumlar elde edilerek, bu spektrumlar yardımı ile pH-absorpsiyon grafiği çizilebilmektedir (Şekil 3.2).



Şekil 3.2. Bir maddenin farklı pH değerlerindeki spektrumları ve bu spektrumlardan pH'ın konsantrasyona karşı grafiğinin oluşturulması.

Şekil 3.2’de verilen pH-absorpsiyon grafiği sigmoid dalgası biçiminde (S şeklinde) olup bu grafiğin orta noktasında $[HA] = [A^-]$ dir. Orta noktayı bulabilmek için grafiğin en düşük ve en yüksek absorpsiyonlarının belirlenmesi gerekmektedir. Bu nokta pH ile absorpsiyonun artık değişmemesinden anlaşılabilmektedir. Orta noktadan pH eksenine bir paralel çizilir ve bu doğrunun sigmoid eğrisini kestiği noktadan pH eksenine bir dikme indirilir. Dikmenin pH ekseninde gösterdiği değer pK_a 'ya eşit olur. Çünkü absorpsiyonun yarısında $[HA] = [A^-]$ dır ve $\log [HA] / [A^-] = 0$ olur (Skoog ve diğerleri, 1998).

Spektrofotometrik yöntemle pK_a tayininde uygulanan bir başka yöntemde ise seçilen bir dalga boyundaki $\log[(A-A_{\min})/(A_{\max}-A)]$ değerleri karşılık gelen pH değerlerine karşı grafiğe geçirilir ve bu grafikten elde edilen eğrinin apsis eksenini kestiği yer ile direkt olarak pK_a değeri elde edilir (Helmy, 1997).

3.2.2.Potansiyometrik Yöntem

Potansiyometri, karşılaştırma elektrodu (örneğin cam elektrot) ile uygun bir referans elektrottan (örneğin hidrojen veya Ag/AgCl elektrodu) oluşan elektrokimyasal hücreden akım geçmezken (yüksek direnç varlığında) potansiyel ölçümüne dayanarak çözeltideki elektrokimyasal değişim hakkında bilgi verir. Potansiyometrik titrasyon ise reaktifin her ilavesinden sonra potansiyel veya pH ölçülmesi üzerine kurulan bir sistemdir. Çalışma ortamına bağlı olarak çeşitli şekillerde yapılmaktadır. Tamamen sulu bir ortamda çalışılacak ise her reaktif ilavesinden sonra pH veya oluşturulan bir pilin potansiyeli ölçülmektedir. Çalışma ortamının su içermediği veya çok az su içerdiği durumlarda ise sadece potansiyel farkın ölçülmesi tavsiye edilmektedir. Çünkü susuz ortamlarda, özellikle alkali bölgede pH ölçümleri hatalı sonuç vermektedir.

Potansiyometrik titrasyonlarda prensip olarak mekanik bir karıştırıcı ile iyice karıştırılan çözeltiye reaktif, dönüm noktasından önce fazla fazla ilave edilir ve dönüm noktasına doğru reaktif ilavesi azaltılır. Dönüm noktasına yaklaşıldığı, her reaktif ilavesinden sonra ölçülen potansiyel veya pH'daki değişme miktarından anlaşılabılır.

Dönüm noktasını kesin olarak bulabilmek için titrasyona dönüm noktasının ötesinde de bir süre devam edilmelidir. Reaktif özellikle dönüm noktası yakınında azar azar ilave edilir ve ölçümler bir kaç defa tekrarlanmalıdır. Reaktifin her ilavesinden sonra ölçülen potansiyel farkları veya pH değerleri ilave edilen reaktifin mL değerlerine karşı grafiği çizilirse S şeklinde bir titrasyon eğrisi elde edilir. Bu grafikten de analiz edilen maddenin pK_a veya pK_b değeri belirlenir.

Cam elektrot, bir ortamda bulunan hidrojen iyonu konsantrasyonunu tayin etmek için kullanılan elektrotlardan biridir. Hidrojen iyonu aktivitesi ve pH, en iyi cam elektrot ile tayin edilebilmektedir. Birçok avantajı bu elektrodun kullanışlı oluşunu sağlamaktadır. Cam elektrotlar kolaylıkla temin edilebilir ve uzun süre kullanılabilirler. Böyle bir elektrotla kuvvetli yükseltgenler , kuvvetli indirgenler, gazlar (H_2S , AsH_3 gibi) ve proteinlerin pH'sı ölçülebilmektedir. Hatta jel halinde bulunan ortamın bile pH'si bu metod ile ölçülebilir. Son zamanlarda geliştirilen mikro cam elektrotlarla ise damla mertebesindeki bir çözeltinin pH'sını ölçmek mümkündür.

Cam elektrot kullanılmasında dikkat edilmesi gereken başlıca noktalar şunlardır:

1. Cam elektrodun çözeltiliye daldırılıp ölçüm yapılan kısmına elle dokunulmamalıdır. Elektrot pisetten fişkırtılan saf suyla yıkanmalıdır.
2. Cam elektrot derişik sülfürik, nitrik asit ve derişik alkalilere daldırılmamalıdır. Ayrıca mutlak alkoller ve su çekici maddelerden de sakınılmalıdır.
3. Cam elektrot pH 12'nin üstünde olan çözeltilere daldırılmamalıdır.
4. Konsantrasyonu 0,1 M üstünde olan asit çözeltilerinin pH'si ölçülmez. Çünkü olduğundan daha fazla çıkar (Asidik hata).
5. pH metre tampon çözeltilere karşı sık sık ayarlandığından, tampon çözeltinin çok iyi korunması gerekir.
6. Nötrale yakın çözeltilerin pH'sinin ölçülmesinde de dikkatli olmak gerekir. Çünkü, böyle çözeltilerde denge oldukça geç kurulur.
7. Cam elektrot uzun süre açıkta bırakılıp kurutulmamalıdır. Kurumuş bir elektrot kullanılmadan önce uzunca bir süre saf suya daldırılmalı ve su zaman zaman

değiştirilmelidir. Elektrot kullanılmadığı zamanlarda 3 M KCl ortamında muhafaza edilmelidir (*Skoog ve diğerleri*, 1998).

Asit-baz tepkimelerinde kullanılan iyon seçici elektrot, cam elektrottur. Nötralleşme titrasyonlarda eşdeğerlik noktasında pH değerinde birden bire büyük bir değişme olur. Asidin veya bazın kuvveti azaldıkça yani pK_a veya pK_b değerleri arttıkça dönüm noktasında gözlenen pH değişmesinin büyüklüğü ve keskinliği azalır. Aynı durum, kullanılan titrant derişiminin azaldığı zaman ve zayıf bir asidin kuvvetli bir baz yerine zayıf bir bazla titre edildiğinde de gözlenir. Nötralleşme titrasyonlarında kuvvetli asitler için derişim 3×10^{-4} M ve daha büyük, zayıf asitler için ise derişim ile asitlik sabiti çarpımı 10^{-7} ve daha büyük olduğu zaman analiz yapılabilir.

Titrasyon eğrisi üzerinde dönüm noktasının (eş değerklik) bulunabilmesi için şu yollar takip edilir:

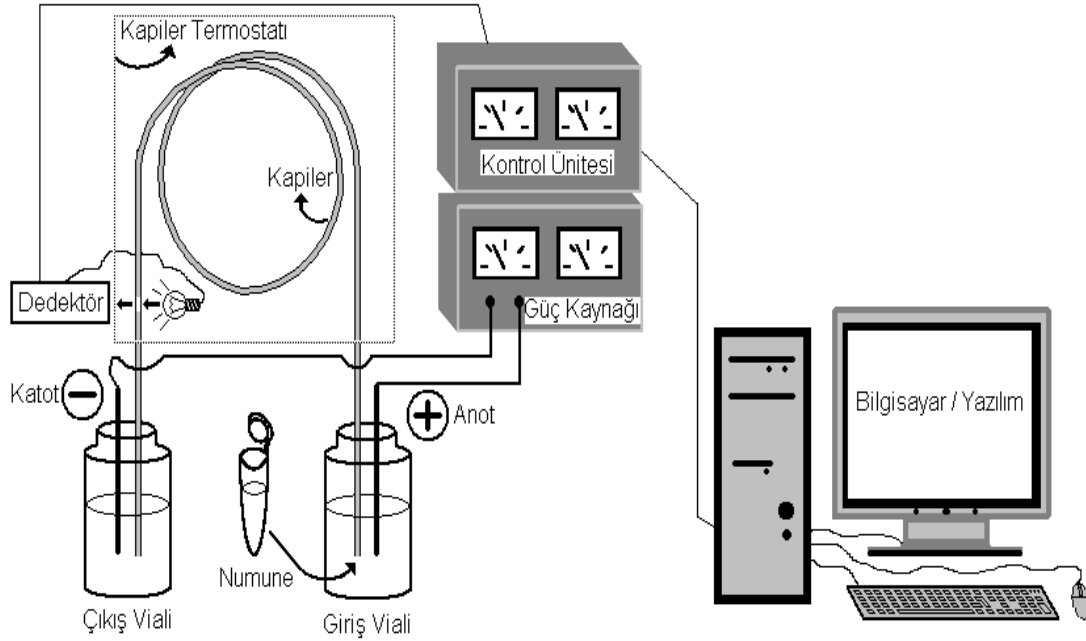
1. Deneyssel noktalara göre en yakın eğri çizilir.
2. Eğrinin en dik teğeti çizilir.
3. Teğetin başlangıç ve son noktalarının ordinatları çizilir.
4. İki ordinatın orta noktasından son noktasının ordinatı çizilir. Son ordinatın eğriyi kestiği nokta dönüm noktasıdır.

3.2.3.Kapiler Elektroforez (CE)

Bir kapiler elektroforez sistemi (CE); yüksek voltaj güç kaynağı, giriş ve çıkış vialleri, kapiler, dedektör ve integratör veya bilgisayardan oluşmaktadır. Birçok sistemde kapilerdeki ısınmayı soğutmak ve kapiler sıcaklığını kontrol etmek için termostat bulunmaktadır. Şekil 3.3' de bir CE sisteminin şematik gösterimi verilmiştir.

Bir CE analizinin temel adımları; kapilerin ön yıkaması, kapiler ile giriş ve çıkış viallerinin çalışma tamponu ile doldurulması, kapilerin tampon ile şartlandırılması, numunenin kapilere enjeksiyonu ve elektriksel alan uygulanmasını içermektedir. Numunenin içerisindeki maddeler kapiler içinde göç etmektedir. Dedektörden geçerken

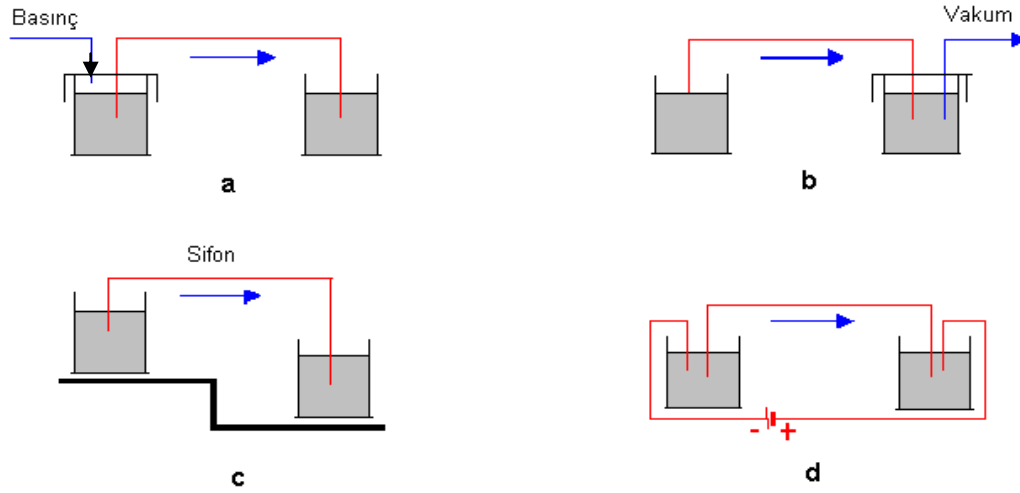
gözlemlenmekte, veriler integratör veya bilgisayara gönderilmektedir. Veriler, dedektör cevabının zamana karşı grafiği olan elektroferogramlar şeklinde elde edilmektedir.



Şekil 3.3. Kapiler elektroforez cihazının şematik gösterimi.

Kapiler içine numune enjeksiyonu hidrodinamik veya elektrokinetik olarak yapılmaktadır. Hidrodinamik enjeksiyon, en çok kullanılan enjeksiyon yöntemi olup üç şekilde yapılabilmektedir. Bunlardan birincisi, kapilerin giriş tarafına konulan numune vialine basınç uygulanmasıdır. Genelde 50 mbar civarında 1 ile 5 saniye arası basınç uygulanır. Ardından numune vialisi çıkarılıp çalışma tamponu vialisi takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir. Hidrodinamik enjeksiyonun ikinci yolu, numune vialisi kapilerin giriş kısmındayken, çıkış kısmındaki tampon vialine vakum uygulanmasıdır. Uygulanan vakumla istenen miktardaki numune kapilere girince vakum kesilir, numune vialisi çıkarılıp çalışma tamponu vialisi takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir. Üçüncü hidrodinamik enjeksiyon yönteminde, sifon etkisinden yararlanılır. Kapilerin

giriş kısmına takılan numune vialı, çıkıştaki tampon vialinden daha yükseğe yerleştirilir. Yerçekiminin etkisiyle, numune kapilerin içine girer. Ardından numune vialı çıkarılıp çalışma tamponu vialı takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir (Şekil 3.4. a,b,c).



Şekil 3.4. Kapiler elektroforezde enjeksiyon sistemleri: a, b, c) Hidrodinamik enjeksiyon, d) Elektrokinetik enjeksiyon.

Elektrokinetik enjeksiyonda kapilerin giriş kısmına numune vialı yerleştirildikten sonra, numune vialiyile çıkış kısmındaki çalışma tamponu vialı arasına voltaj uygulanır. Oluşan elektrik alanının etkisiyle numunedeki iyonlar kapiler içine göç etmeye başlar. Bu voltajın uygulanmasından sonra numune vialı çıkarılıp tampon vialı takılır ve voltaj uygulanarak analize devam edilir (Şekil 3.4. d).

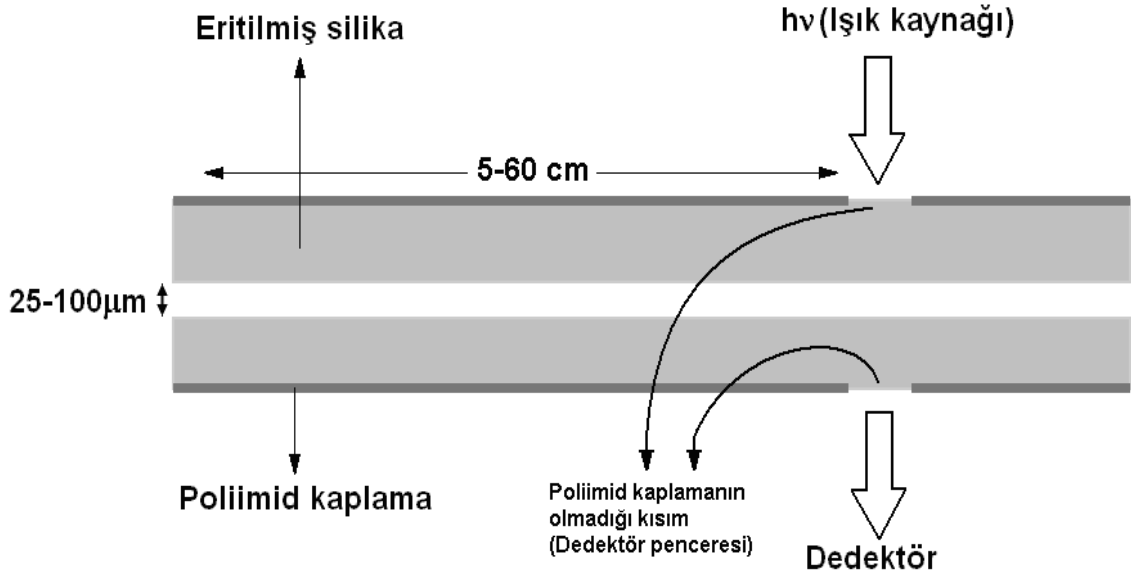
Kapiler elektroforezde kullanılacak kapilerin türü ve boyutları, uygulanacak yöntem, analiz edilecek numune, istenen ayırıcılık ve uygun analiz süresine göre

seçilmektedir. Kapilerden beklenen, kısa analiz süresinde yeterli ayırımı sağlayabilmesidir. Kapilerin üretildiği materyalin elektrik iletkenliğinin olmaması, kimyasal olarak inert olması ve dedektörle uyumlu olması (örneğin UV dedektör için kapilerin ışınları absorplamaması) gerekmektedir.

Eritilmiş silika günümüzde en sık kullanılan kapiler materyalidir. Kolay kırıldığı için dış kısmı poliimid ile kaplanıp sağlamlaştırılmıştır. UV dedektör kullanılacaksa, ışık yolunu kapatmaması için poliimid kaplama bu bölgeden kaldırılır (Şekil 3.5).

Pyreks kapiler, eritilmiş silika kapilere göre daha sağlam olması ve dedektör penceresi açmaya gerek göstermemesine rağmen 280 nm'nin altında çalışılmama sakıncasına sahiptir. Teflon kapilerde homojen iç çap elde edilemez ve ısı iletkenliği düşük olduğundan yüksek voltaj uygulanamaz. Bu nedenlerden dolayı eritilmiş silika, pyreks ve teflondan daha sık kullanılan bir kapiler materyalidir. Genelde iç çapı 25-100 μm olan eritilmiş silika kapiler kullanılmaktadır. Büyük çaplı kapilerde yüksek ısı açığa çıkmakta ve kapilerin iç duvarıyla merkezi arasındaki ısı farkı çok büyük olmaktadır. Küçük çaplı kapiler kullanılması ile UV-GB absorbans veya floresans gibi dedektörlerde ışık yolunun küçülmesinden dolayı absorbans düşmekte ve pik yüksekliği azalmaktadır. Ayrıca çok küçük çaplı kapilerin partiküllerle tıkanma olasılığı oldukça yüksektir.

Kapilerin tekrarlanabilir sonuçlar vermesi için ilk kullanımda ve her analizden önce şartlandırma işleminin uygulanması gerekmektedir. Silika yüzeyinin durumu, CE'de parçacıkların hızlarına etki eden iki kuvvetten biri olan elektroozmotik akış (EOF) üzerinde etkilidir. Şartlandırmayla kapilerin iç çeperindeki silanol gruplarının iyonlaşma oranı, dolayısıyla EOF, her analizde aynı olur. Kapiler yeni ise 1 N NaOH, takiben 0.1 N NaOH, su ve en son olarak da çalışma tamponu geçirilerek şartlandırılır. Ayrıca her analizden önce 0.1 N NaOH, su ve çalışma tamponu geçirilerek kapilerin mümkün olduğunca aynı şartlanması sağlanır. Çalışma bitiminde su geçirilmelidir. Eğer birkaç gün çalışma yapılmayacaksa kapiler içinde mikroorganizma üreyeceği göz önünde bulundurularak hava çekilerek kurutulmuş olarak bırakılması yararlı olur.



Şekil 3.5. Eritilmiş silika kapilerin boyuna kesiti.

CE’de tekrarlanabilir sonuçlar almak için kapiler sıcaklığının kontrolü önemlidir. Sıcaklığın değişmesiyle etkinlik, göç zamanı, enjeksiyon hacmi ve dedektör cevabı değişir. Ayrıca numune bozunmasına da neden olabilir. Kapiler sıcaklığının kontrolü, kapilerin içinde bulunduğu kasetin içine, istenen sıcaklığa termostatl sistem ile ayarlanmış havanın fan ile üflenmesiyle sağlanır.

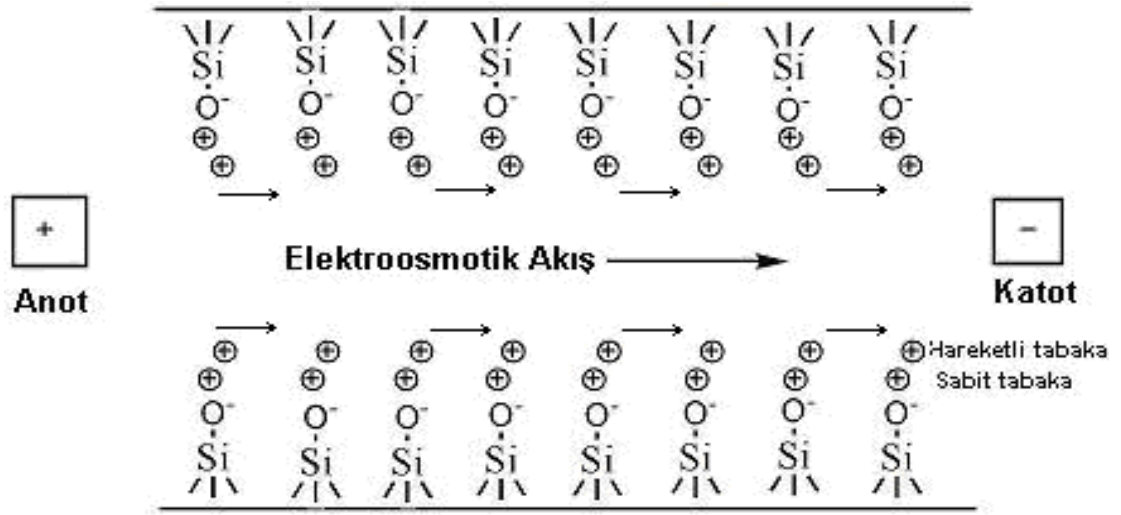
Yüksek voltaj güç kaynağının amacı elektroforez için gerekli olan voltajı, akımı veya gücü sağlamaktır. Çoğu CE ayırımı sabit voltajda gerçekleştirilse de, güç kaynağı sabit akım ve sabit güç uygulayabilme özelliğine de sahip olmalıdır. Voltaj 30 kV’a kadar, akım 300 μ A’e kadar ve güç 6 W’a kadar uygulanabilir. Ayrıca gerektiği durumlarda uygulanan elektrik alanın yönü (giriş vialı katot, çıkış vialı anot) değiştirilebilir.

CE’de en çok kullanılan dedektörler UV-GB absorbands (direkt ve indirekt), floresans (direkt ve indirekt), lazerle indüklenmiş floresans, kütle spektrometrisi, iletkenlik, amperometri (direkt ve indirekt), radyometrik ve kırılma indisi

dedektörleridir. Absorbans dedektörleri CE'ye uygulanabilirlikleri nedeniyle yaygın olarak kullanılırlar. Gözlenebilme sınırı genellikle 10^{-5} - 10^{-7} M aralığındadır. Tek bir dalga boyunda veya dizi diyot dedektör kullanılarak bir çok dalga boyunda absorbans alınabilir. Absorbans dedektörlerinde kapilerin kendisi dedektör hücresi olarak görev yapar. Bunun için erimiş silika kapilerin dış kısmındaki poliimid koruyucu kaplamanın bir kısmı yakma, çözme ve kazıma ile uzaklaştırılır. Ancak, bu durumda ışın yolunun uzunluğu kapiler iç çapından (50 ile 100 μm) fazla olamaz ve bu da derişim cinsinden gözlenebilme sınırını kısıtlar. Işın yolunun arttırılması için “z” veya baloncuk şeklinde dedektör hücresine sahip kapilerler kullanılarak duyarlılık arttırılabilir.

3.2.3.1.Kapiler Elektroforez Ayırma İlkeleri

Kapiler elektroforezde, uygulanan elektriksel alan etkisi altında genellikle çalışma tamponu da kapiler boyunca hareket eder. Bu olay elektroozmotik akış (EOF) olarak adlandırılır. Eritilmiş silika kapilerin iç yüzeyi silanol grupları (SiOH) ile kaplıdır ve pH 3.0'ün üzerinde SiO^- ya iyonize olurlar. Bu, kapilerin NaOH veya KOH ile muamele edilmesi ile sağlanır. Elektroozmotik akışın nedeni, kapilerin iç çeperinde çalışma tamponu ile SiO^- grupları arasında elektriksel çift tabaka oluşmasıdır. Çalışma tamponundaki pozitif yüklü iyonlar, kapiler çeperine yaklaşırlar. Çepere çok yakın olan pozitif yüklü iyonlar hareketsizdir. Ancak çeperden uzaklaştıkça, çeperle pozitif yüklü iyonlar arasındaki elektrostatik çekim zayıflar, kapilere uygulanan elektriksel alanın iyonlar üzerindeki kuvveti baskın gelir ve bu pozitif yüklü iyonlar topluca negatif yüklü elektroda (katot) doğru göç ederler. Bu toplu göç, kapiler içindeki tamponun katoda doğru akmasına neden olur. Bu akışa EOF denir (Şekil 3.6).



Şekil 3.6. Kapiler içinde elektroosmotik akışın gösterimi.

Elektroosmotik akış hızı (v_{EOF}), Formül 3.11'e göre açıklanmaktadır.

$$v_{EOF} = E \cdot \mu_{EOF} \quad (3.11)$$

Bu formülde, v_{EOF} : Elektroosmotik akış hızı (cm sn^{-1}), E : Elektriksel alan (V cm^{-1}), μ_{EOF} : Elektroosmotik hareketlilik ($\text{cm}^2 \text{V}^{-1} \text{sn}^{-1}$), ifade etmektedir.

Kapiler çeperine yakın olan hareketsiz tabaka ile merkeze yakın olan hareketli tabakanın meydana getirdiği çift tabaka arasında oluşan potansiyele zeta potansiyeli (ξ) adı verilir ve Formül 3.12 ile gösterilir.

$$\xi = 4 \pi \delta e / \varepsilon \quad (3.12)$$

δ : Difüzyon tabakası kalınlığı, e : Yüzey alana düşen yük, ε : Tamponun dielektrik sabiti'ni ifade etmektedir.

Elektroozmotik akış hızı (v_{EOF}) Formül 3.13 ile gösterilebilir.

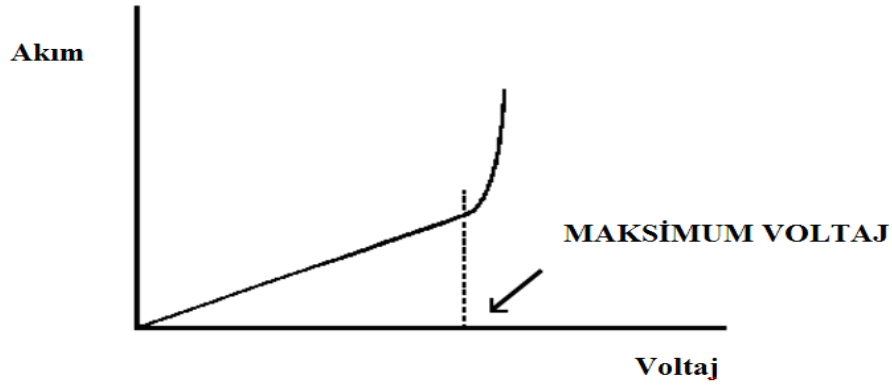
$$v_{EOF} = \varepsilon \xi E / 4 \pi \eta \quad (3.13)$$

η : Tamponun viskozitesi ifade eder.

Elektriksel alan (voltaj/uzunluk) voltaja bağlı olduğundan, EOF voltajla kolayca kontrol edilebilir (Formül 3.11). Artan voltaj ile EOF artar ve göç zamanı azalır. Ayrıca voltajın artması yüksek etkinliği de sağlar. Ancak yüksek voltaj ve bunun sonucu olan yüksek akım kapillerin ısınmasına (Joule ısınması) da neden olur (Formül 3.14).

$$P = V I \quad (3.14)$$

Formülde, P: Güç, V: Voltaj, I : Akım'ı ifade etmektedir. Eğer kapilerdeki ısınma çabuk soğutulamazsa, sıcaklık kapiler içinde artar ve bu artış da pik genişlemesine, tekrarlanamayan göç zamanına, numune bozunması ya da içeriğinin değişmesine veya tampon kaynamasına yol açarak elektriksel iletkenliğin önlenmesine neden olabilir. Bu nedenle çalışmalarda dar pik ve kısa analiz süresi için gerekli olan yükseklikteki voltaj (maksimum voltaj) seçilmelidir. Uygulanabilecek maksimum voltaj, voltaja karşı akım grafiğinden (Ohm yasası grafiği) belirlenebilir (Şekil 3.7). Bu grafikte voltaj yerine elektriksel alan da kullanılabilir. Grafikte doğrusallık bozulmadan önceki son voltaj, maksimum voltaj değerini verir. Maksimum voltaj tampon bileşimine, pH'sına ve derişimine, ayrıca kapiler iç çapı ve uzunluğuna bağlıdır.



Şekil 3.7. Voltaja karşı akım (Ohm yasası) grafiği.

EOF üzerinde önemli etkisi olan diğer bir parametre de tampon pH'ıdır. pH'ın artmasıyla EOF artar, çünkü yüksek pH'larda kapiler iç duvarında SiOH'ın SiO⁻'ya iyonizasyonu yüksek miktardadır. Formül 3.12'den görüldüğü gibi, kapiler duvarının yüzey yükünde artış zeta potansiyelinin artmasına neden olur. Dolayısıyla, pH'ın artması daha fazla yüklü SiO⁻ gruba, bu da yüksek zeta potansiyeline ve sonuçta da elektroozmotik akış hızının artmasına neden olur (Formül 3.13).

Tamponun iyonik gücünde veya derişiminde artış, zeta potansiyelini düşüreceğinden EOF'yi azaltır. Düşük tampon derişimi kısa analiz süresi verir, ancak çok düşük tampon derişiminden kaçınılmalıdır. Eğer tampon derişimi numune derişiminden fazla değilse, numune ve tampon arasında elektriksel alanda bozukluğa neden olan iletkenlikte farklılıklar olabilir. Bu bozulma pik genişlemesine ya da pik kuyruklanmasına neden olur. Genel kural olarak, çalışma tamponunun derişimi numune derişiminin en az 100 katı olmalıdır.

Sıcaklıkta artış tampon viskozitesinin azalmasına, dolayısıyla da EOF'nin artmasına neden olur. Sıcaklık sürekli kontrol altında tutulmalıdır. Çünkü sıcaklıkta artış numune bozulmasına, zon genişlemesine, tampon kaynamasına ve tekrarlanamayan analiz süresine neden olabilir.

Tampona organik çözücü eklenmesi viskozite, dielektrik sabiti ve zeta potansiyeli üzerinde etkili olabilmektedir. Organik çözücünün etkisi, eklenen çözücünün cinsine ve miktarına göre değişir. Suyu % 0-50 arasında metanol eklenmesi çözeltinin viskozitesinin artmasına neden olur. % 50'den fazla metanol ilavesinde ise viskozite azalır. Buna karşılık % 100'e kadar asetonitril eklenmesinde çözelti viskozitesi azalır.

EOF, kapiler yüzeyinin silanol gruplarının iyonlaşmasını önleyen bir materyalle (poliakrilamid veya metilselüloz) kaplanması ile azaltılabilir veya önlenir. Ayrıca EOF ters faz polarite uygulanarak veya tampona değişik maddeler eklenerek ters çevrilebilir.

EOF'yi ölçmenin en kolay yolu, yüksüz bir bileşiğin sisteme enjekte edilmesidir. Bunun için çalışma tamponu pH'ında yüksüz olan ve çözünebilen, kullanılan dedektörle tanımlanabilen, saf, kapiler duvarı ile etkileşmeyen bir bileşik (metanol, mesitil oksit, formamid, fenol gibi) seçilmelidir.

Elektriksel alan altında tampon içindeki elektriksel yüklü maddeler elektroforetik hızla hareket ederler. Elektroforetik hız (v_{EP}) Formül 3.15'e göre hesaplanır.

$$v_{EP} = E \mu_{EP} \quad (3.15)$$

Formülde; v_{EP} : Elektroforetik hız, ve μ_{EP} : Elektroforetik hareketliliği ifade etmektedir. Maddeler kapiler boyunca farklı hızlarda hareket ettiklerinden ayırım gerçekleşir. Elektroforetik hareketlilik Formül 3.16'ya göre verilir.

$$\mu_{EP} = q / 6 \pi \eta r \quad (3.16)$$

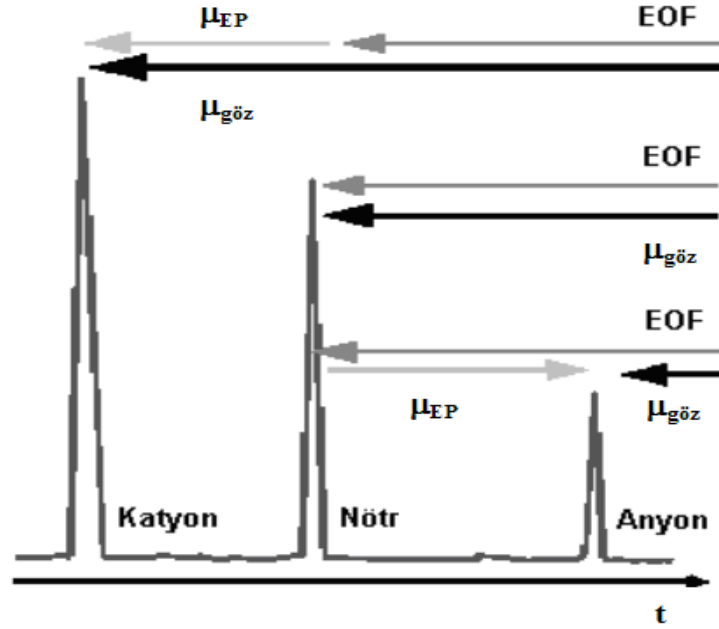
Yukarıdaki formülde; q : İyonize maddenin yükü, ve r : Numune yarıçapı sembolize etmektedir.

Kapiler içinde küçük ve çok yüklü moleküller hızlı, büyük ve az yüklü moleküller ise yavaş hareket ederler. Nötral moleküllerin yükleri sıfır olduğu için elektroforetik hareketlilikleri sıfırdır. Tampon viskozitesinde artış EOF'yi olduğu gibi elektroforetik hareketliliği de azaltır.

Maddelerin hızı elektroforetik hızı ve elektroozmotik akış hızına bağlıdır. Gözlenen elektroforetik hız ($v_{göz}$) Formül 3.17'ye göre verilir.

$$v_{göz} = v_{EP} + v_{EOF} \quad (3.17)$$

Kapilerin dedektör kısmının negatif yüklü ve EOF'nin dedektöre doğru olduğu "normal" CE'de, anyonların gözlenen hızları, EOF'nin ters yönünde elektroforetik hareketliliğe sahip olduklarından elektroozmotik hızdan düşüktür ($v_{göz \text{ anyon}} < v_{EOF}$). Katyonlarda ise gözlenen hız elektroozmotik hızdan büyüktür ($v_{göz \text{ katyon}} > v_{EOF}$). Çünkü EOF ile aynı yönde hareketliliğe sahiptirler. Nötraller ise kapiler içinde yalnızca EOF ile hareket ederler ve bundan dolayı gözlenen hız EOF'ye eşittir ($v_{göz \text{ nötral}} = v_{EOF}$) (Şekil 3.8).



Şekil 3.8. Elektroforetik ve elektrozmotik hızların göç zamanı üzerine etkisi: (EOF: elektroozmotik akış, μ_{EP} : elektroforetik hareketlilik, $\mu_{göz}$: gözlenen hareketlilik, t : zaman).

Gözlenen elektroforetik hız ($v_{göz}$) Formül 3.18'e göre hesaplanır.

$$v_{göz} = \ell / t_m \quad (3.18)$$

Formüldeki; ℓ : Etkin kapiler uzunluğu (Numunenin kapiler içersinde girdiği noktadan dedektöre kadar olan uzunluk), ve t_m : Maddenin göç zamanını göstermektedir. Elektroforetik ayırım parametreleri zaman, etkinlik, seçicilik ve ayırıcılıktır. Maddelerin etkin kapiler uzunluğundaki göç zamanı (t_m) Formül 3.19'a göre hesaplanmaktadır.

$$t_m = \ell / (\mu_{EP} + \mu_{EOF}) V \quad (3.19)$$

Formül 3.19'dan görüldüğü gibi, yüksek voltaj, kısa kapiler ve yüksek EOF ile kısa analiz süresi elde edilmektedir. Etkinlik, teorik tabaka sayısı (N) ile belirlenir ve göç zamanı ile pik genişliğinin ölçülmesi ile hesaplanabilir (Formül 3.20).

$$N = 16 (t_m / w)^2 \quad (3.20)$$

Formüldeki w, zemin çizgisindeki pik genişliğini ifade etmektedir. Formül 3.20'ye göre dar pik ve uzun analiz süresi ile yüksek etkinlik elde edilmektedir. Seçicilik (α), komşu iki pikin dedektörden geçerken birbirlerine olan uzaklıklarını göstermektedir (Formül 3.21).

$$\alpha = (t_2 - t_0) / (t_1 - t_0) \quad (3.21)$$

t_1 : Önce gelen maddenin göç zamanı, t_2 : Sonra gelen maddenin göç zamanı, t_0 : Sadece elektroozmotik akış ile sürüklenen maddenin göç zamanı göstermektedir. Seçicilikte değişikliğin en etkili yolu tampon pH'ında değişiklik yapmaktır. En önemli ayırım parametresi olan ayırıcılık (R_s) elektroferogramlardan Formül 3.22 ile hesaplanabilir.

$$R_s = 2 (t_2 - t_1) / (w_1 + w_2) \quad (3.22)$$

Formüldeki w_1 ve w_2 : Komşu piklerin zemin çizgisindeki pik genişliği ifade etmektedir. Ayırıcılık, uygulanan voltaj arttırılarak, çalışma tamponunun pH'ı ve bileşimi değiştirilerek, kapiler uzunluğu arttırılarak ve EOF optimize edilerek arttırılabilir.

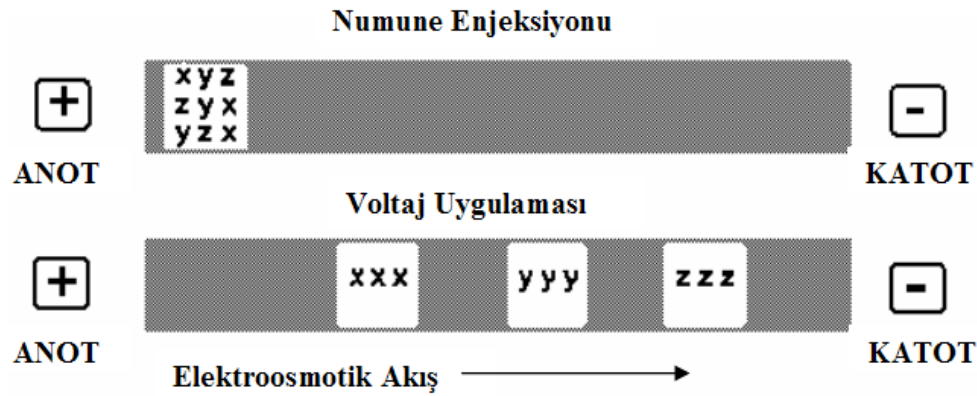
3.2.3.2.Kapiler Elektroforez Türleri

Kapiler elektroforez türleri aşağıdaki gibi sınıflandırılabilir;

- 1) Kapiler zon elektroforez (CZE)
- 2) Miseller elektrokinetik kapiler kromatografi (MEKC)
- 3) Kapiler jel elektroforez (CGE)
- 4) Kapiler izoelektrik odaklama (CIEF)
- 5) Kapiler izotakofrez (CITP)

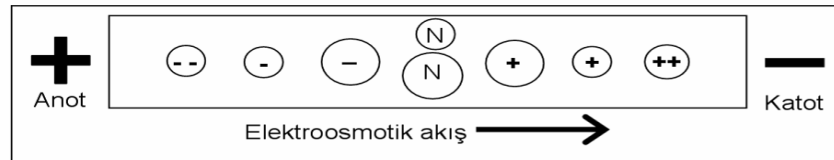
Bu tez çalışmasında analizler kapiler zon elektroforez yöntemi ile gerçekleştirildiğinden sadece bu yöntem incelenecektir. Kapiler Zon Elektroforez (CZE), yaygın olarak kullanılan bir elektroforetik yöntemdir. CZE'de ayırım, içi tampon çözelti ile dolu kapiler boruda gerçekleşir. Kapilerin uçları aynı tampon çözeltiyi içeren giriş ve çıkış viallerine daldırılmıştır. Bu tampon çözeltiye çalışma tamponu denir. Her iki vialle daldırılan elektrotlar ise dış güç kaynağına bağlıdır. Tampon ile dolu kapilere numune enjekte edilip voltaj uygulanırsa parçacıklar kapiler boyunca zonlar halinde hareket ederler (Şekil 3.9).

CZE'de parçacıkların hızlarına elektroforetik ve elektroozmotik iki kuvvet etki eder. Katyonlar negatif yüklü elektroda (katot) doğru, anyonlar pozitif yüklü elektroda (anot) doğru göç ederler. İyonların elektroforetik göç hızları, yük/büyüklik (yük/çap) oranlarına bağlıdır. Aynı yüklü iyonlardan küçük olan büyük olanına göre, büyüklüğü aynı olanlardan ise yükü daha fazla olan daha hızlı hareket eder. Ayrıca elektriksel alan altında, kapiler içinde elektroozmoz ile hareket de söz konusudur. EOF, parçacıkları anottan katota doğru hareket ettirir.



Şekil 3.9. Kapiler zon elektroforezde numune zonlarının ayırımı.

Elektroozmotik ve elektroforetik etkiler sonucunda CZE’de elüsyon sırası katyon, nötral ve anyon şeklinde oluşur. İyonlar yük/büyükölük oranlarına göre ayrıldıklarından nötral bileşikler birbirlerinden ayrılamazlar (Şekil 3.10).



Şekil.3.10. Kapiler zon elektroforezde ayırım.

CZE, bir tamponda çözünebilen hemen hemen her iyonize bileşiğin ayırımında kullanılabilir. Küçük inorganik anyonlar ve katyonlar, büyük biyomoleküller, ayrıca suda çözünmeyen bileşikler de susuz tamponlar kullanılarak CZE ile ayrılabilirler. Kapiler içersindeki bir maddenin dedektöre ulaşma zamanı o maddenin göç süresi (migration time) olarak tanımlanır. Maddeye ait göç süresi (t_m), Formöl 3.18 ($v_{göz} = \ell / t_m$)’e göre maddenin kapiler içersindeki hızıyla ($v_{göz}$) ve kapilerin etkin uzunluğuyla (ℓ):

dedektöre kadar olan uzunluk) doğrudan alakalıdır. Maddenin kapiler içersindeki hızı Formül 3.17 ($v_{göz} = v_{EP} + v_{EOF}$)' e göre elektroforetik hıza ve elektroozmotik akış hızına bağlıdır.

Zayıf bir asit için (HA), asitlik sabiti şu şekilde ifade edilebilir;



$$K_a = \frac{f_{A^-} [A^-] (H_3O^+)}{[HA]}$$

f_{A^-} : A^- iyonu için aktiflik sabiti ve (H_3O^+) : H_3O^+ iyonu aktivitesi göstermektedir. *Debye-Hückel* eşitliğine göre $\log f_{A^-}$ Formül 3.9'daki gibi ifade edilebilir. Dolayısıyla iyonik şiddeti aynı olan çözeltiler için f_{A^-} sabit olacaktır. İyonik şiddeti 0.02 M olan bir dizi çözelti farklı pH değerleri için uygun seyreltme oranlarıyla hazırlanabilir.

Zayıf asit türleri için pH bazik değerlere kaydıkça $pK_a = pH - \log [A^-] / [HA]$ eşitliğine göre $[A^-] / [HA]$ değeri büyür. Dolayısıyla pH arttıkça HA derişimi A^- derişimi yanında ihmal edilecek kadar küçük değerlerde kalır. Bu durumda HA' nın hemen hemen tamamının iyonlaşarak A^- 'ye dönüştüğü kabul edilebilir.

Kapiler zon elektroforez yönteminde zayıf asit türündeki madde için elektroforetik hareketlilik A^- türünün oranı arttıkça maksimum, HA türünün oranı arttıkça ise minimum değerlere ulaşır; çünkü Formül 3.16 ($\mu_{EP} = q / 6 \pi \eta r$)' ya göre elektroforetik hareketlilik, maddenin yükü ile doğrudan alakalıdır. Zayıf asit yapısında olan maddeler için herhangi bir pH daki elektroforetik hareketlilik (μ_{EP}), HA' nın iyonlaşma yüzdesi ile ilişkilidir (Formül 3.23).

$$\mu_{EP} = (\%A^-) \mu_{A^-} \quad (3.23)$$

Bu eşitlik açılırsa aşağıda verildiği hale (Formül 3.24) dönüşür ve K_a ile ilişkilendirilebilir (Formül 3.25).

$$\mu_{EP} = \frac{[A^-]}{[HA] + [A^-]} \mu_{A^-} \quad (3.24)$$

$$\mu_{EP} = \frac{K_a}{f_{A^-}(H_3O^+) + K_a} \mu_{A^-} \quad (3.25)$$

Eşitlik 3.24 ve 3.25' e göre pH değerine karşı μ_{EP} grafiği çizildiğinde sigmoidal bir eğri elde edilir. Bu eğrinin dönüm noktası değerinde $pH = pK_a$ ' dır; çünkü $pH = pK_a$ iken $[HA] = [A^-]$ ve $\mu_{EP} = \frac{1}{2} \mu_{A^-}$ ' dır.

Bazik pH değerlerinde iyonlaşmayan bir nötr marker kullanılırsa; iyonik şiddetin, sıcaklığın ve elektrik alanın sabit kaldığı bir ortamda farklı pH değerleri için elektroozmotik akış hızına ait göç zamanı (t_0), nötr markerin göç zamanı (t_m)'na eşit olacaktır.

Formül 3.17' ye göre $v_{göz} = v_{EP} + v_{EOF}$ ise ve Formül 3.11 ve 3.15 e göre $v_{EOF} = E \mu_{EOF}$ ve $v_{EP} = E \mu_{EP}$ ise ve $E = V/L$ olduğuna göre Formül 3.26' a göre elektroforetik hareketlilik ($\mu_{EP} : cm^2 V^{-1} sn^{-1}$) şu şekilde ifade edilebilir;

$$\mu_{EP} = (L.\ell) / V . (1/t_m - 1/t_0) \quad (3.26)$$

Formüldeki; L : Kapilerin toplam uzunluğu, V : Uygulama voltajı, t_m : maddeye ait göç zamanı, ve t_0 : EOF' ye ait göç zamanı ifade etmektedir.

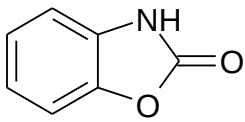
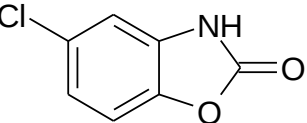
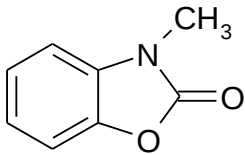
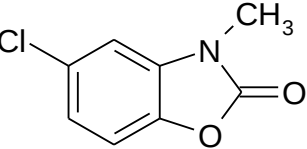
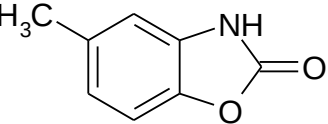
4. GEREÇ VE YÖNTEM

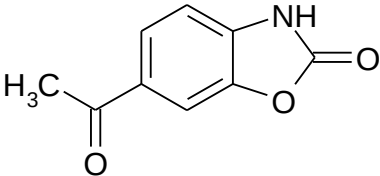
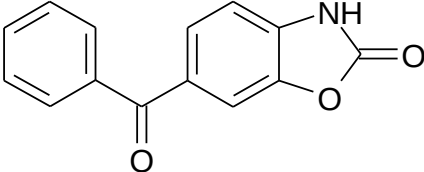
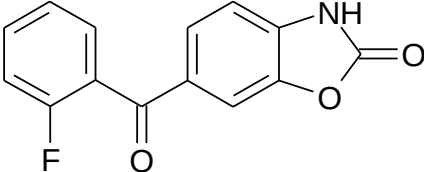
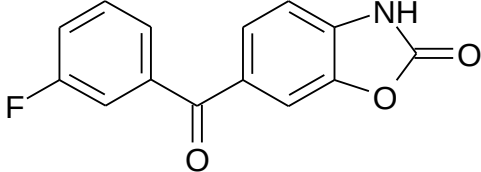
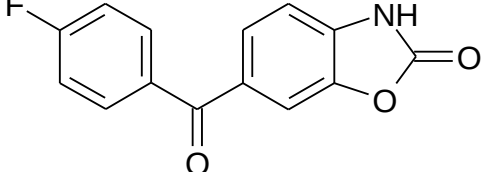
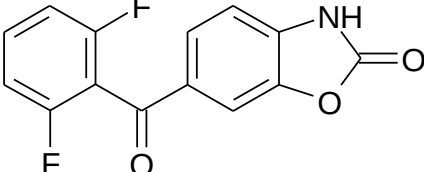
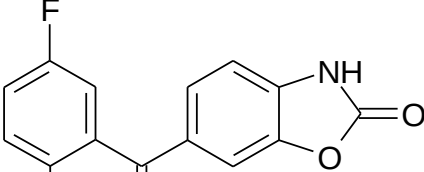
4.1. Kimyasal Bileşikler

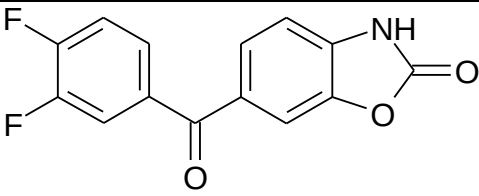
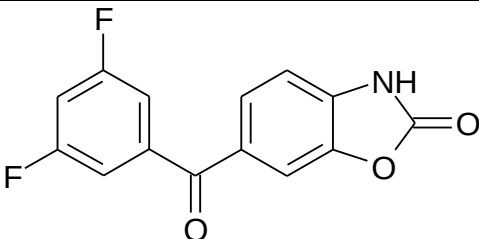
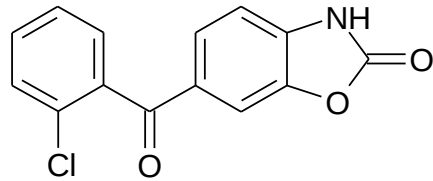
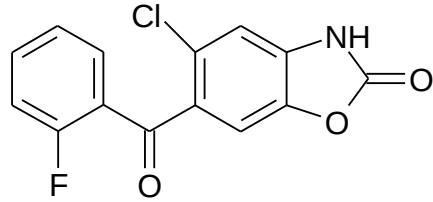
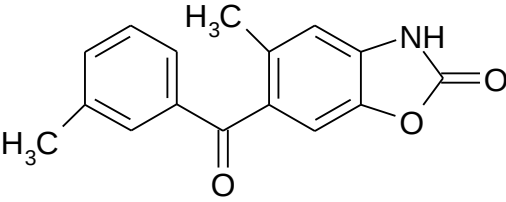
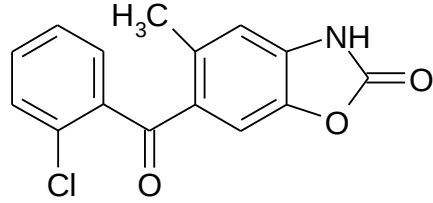
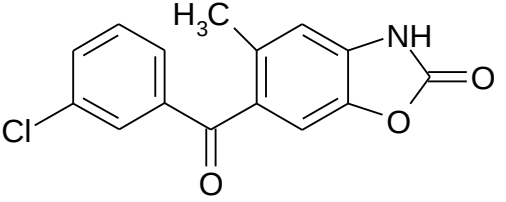
Çalışmalarda kullanılan bütün kimyasal maddeler analitik saflıktadır (*Koksal ve diğerleri, 2005; Koksal ve diğerleri, 2008; Gokhan ve diğerleri, 1999*). Tüm kimyasal maddeler herhangi bir ekstra saflaştırma işlemine tabi tutulmadan kullanılmıştır.

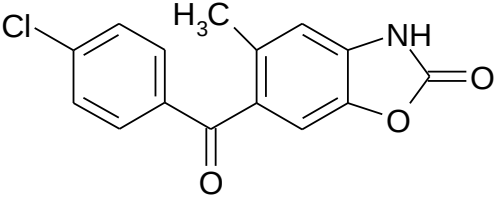
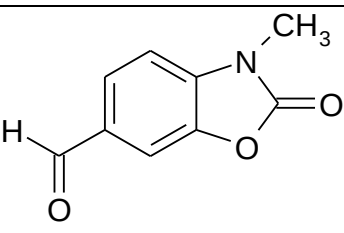
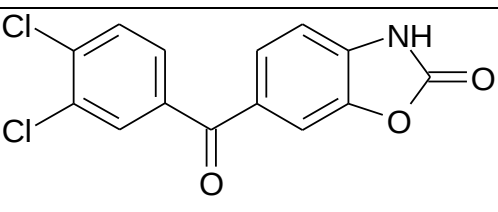
4.1.1. Analizi Yapılan Benzoksazolon Türevleri

Üç değişik yöntem ile asitlik sabitlerinin belirlenmesinde çalışılan 2(3H)-benzoksazolon türevlerinin açık formülleri aşağıda gösterildiği gibidir.

Bileşik No	Açık Formülü
01	
02	
03	
04	
05	

06	 <chem>CC(=O)c1ccc2c(c1)oc(=O)[nH]2</chem>
07	 <chem>O=C1OC(=O)c2ccc(cc2C(=O)c3ccccc3)N1</chem>
08	 <chem>Fc1ccccc1C(=O)c2ccc3c(c2)oc(=O)[nH]3</chem>
09	 <chem>Fc1ccc(cc1)C(=O)c2ccc3c(c2)oc(=O)[nH]3</chem>
10	 <chem>Fc1cccc(c1)C(=O)c2ccc3c(c2)oc(=O)[nH]3</chem>
11	 <chem>Fc1cc(F)c(cc1)C(=O)c2ccc3c(c2)oc(=O)[nH]3</chem>
12	 <chem>Fc1cc(F)cc(c1)C(=O)c2ccc3c(c2)oc(=O)[nH]3</chem>

13	
14	
15	
16	
17	
18	
19	

20	
21	
22	

4.1.2. Analizde Kullanılan Kimyasallar

• Asetonitril	CH ₃ CN	SIGMA-ALDRICH
• Metanol	CH ₃ OH	SIGMA-ALDRICH
• Asetik asit	CH ₃ COOH	SIGMA-ALDRICH
• Sodyum asetat	CH ₃ COONa	RIEDEL
• Amonyum klorür	NH ₄ Cl	RIEDEL
• Amonyak	NH ₃	RIEDEL
• Fosforik asit	H ₃ PO ₄	RIEDEL
• Disodyum hidrojenfosfat	Na ₂ HPO ₄	RIEDEL
• Sodyum dihidrojenfosfat	NaH ₂ PO ₄	RIEDEL
• Borik asit	H ₃ BO ₃	SIGMA-ALDRICH
• Sodyum klorür	NaCl	SIGMA-ALDRICH
• Potasyum hidroksit	KOH	SIGMA-ALDRICH

• Sodyum hidroksit	NaOH	SIGMA-ALDRICH
• Potasyum klorür	KCl	SIGMA-ALDRICH
• Hidroklorik asit	HCl	RIEDEL

4.2.Kullanılan Ekipmanlar

- Shimadzu UVmini-1240 UV-GB Spektrofotometre
- Heidolph MR Hei-Standard magnetik karıştırıcı ve ısıtıcı
- Mettler Toledo AB204-S/Fact klasik terazi(0.1mg)
- Metler Toledo XS205/Dual hassas terazi (0.01mg-0.001mg)
- Eppendorf mikropipet (10-100 μ L)
- Hellma kuvarz hücre
- Metler Toledo- Seven Easy pH-metre
- Bandelin Sonorex Digitec ultrasonik banyo
- Agilent 3D CE Kapiler Elektroforez (Waldbronn, Germany)

4.3.Tampon Çözeltiler

pH 1.5-3.5 aralığında Fosforik asit- Sodyum dihidrojen fosfat tamponu, molariteler ayarlanarak uygun oranlarda gereken pH'larda hazırlanarak kullanıldı. Örneğin; pH=2.10 Fosfat tamponunun hazırlanabilmesi için gerekli olan asit ve tuz miktarları, 0.1 M H_3PO_4 ve 0.1 M NaH_2PO_4 ile ayarlanarak hazırlanmıştır.

pH 3.7-5.7 aralığında Asetik asit-Sodyum Asetat tampon çözeltisi kullanıldı. Asit ile konjüge bazın molariteri ayarlanarak gereken pH'larda asetat tampon çözeltileri hazırlandı. Örneğin; pH=4.7 Asetik asit- Sodyum Asetat tamponunun hazırlanabilmesi için 0.1 M CH_3COONa ile 0.1 M CH_3COOH ayarlanarak hazırlanmıştır.

pH 5.8-7.8 aralığında Fosfat tampon çözeltisi kullanıldı. Uygun molaritelerde Disodyum hidrojenfosfat ile Sodyum dihidrojenfosfat oranları karıştırılarak, gereken

pH'lardaki fosfat tampon çözeltileri hazırlandı. Örneğin; pH=5.8 Fosfat tamponu, 0.1 M NaH_2PO_4 ile 0.01 M $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ayarlanarak hazırlanmıştır.

pH 8.3-10.3 aralığında Borik Asit-Sodyum Hidroksit tampon çözeltileri kullanıldı. Uygun molaritelerde Borik asit ve Sodyum hidroksit oranları karıştırılarak gereken pH'larda tampon çözeltiler hazırlandı. Örneğin; pH=9.3 Borik asit tamponu için 0.2 M H_3BO_3 ile 0.1 M NaOH ayarlanarak hazırlanır.

pH 8.30-10.30 aralığında Amonyak tamponu kullanıldı. Uygun molaritelerde Amonyak-Amonyum klorür oranları karıştırılarak, gereken pH'larda tampon çözeltiler hazırlandı. Örneğin; pH=9.3 Amonyak tamponu, 0.1 M NH_3 ile 0.1 M NH_4Cl ayarlanarak hazırlanır.

pH 10.5-12.5 aralığında Disodyum hidrojenfosfat-Sodyum hidroksit tampon çözeltisi kullanıldı. Uygun oranlarda molariteler ayarlanarak, gereken pH'lara ait Disodyum hidrojenfosfat-Sodyum hidroksit tampon çözeltisi hazırlandı.

4.4.Yöntemler

4.4.1. Ultraviyole (Mor Ötesi)- Görünür Bölge (UV-GB) Spektroskopi Yöntemi

Ultraviyole-Görünür Bölge Spektroskopi (UV-GB) yöntemi ile asitlik sabitlerinin belirlenmesinde UVmini-1240 model Shimadzu üretici firmasına ait UV-GB Spektrofotometre cihazı kullanılmıştır. Yapılan spektrofotometrik ölçümlerde benzoksazolon türevlerine ait 5 mL' lik balon jojeler içerisine 0.01 M olacak şekilde hazırlanan maddeler AB204-S/FACT ve XS205 seri numaralı METTLER-TOLEDO markalı classic plus-excellence tartı cihazlarında tartılmış ve asetonitril içerisinde çözülmüştür. Daha sonra son konsantrasyon 5×10^{-5} M olarak, hacim seçilen tampon çözelti ile 10 mL'ye tamamlanmıştır (Tampon çözeltileri CO_2 adsorplanmasını engellemek için ağzı kapalı kaplarda muhafaza edilmiş saf su kullanılmıştır.). Cihazın ısınması beklendikten sonra, Hellma üretici firmalı 10 mm'lik küvetler içerisine ilk

olarak tampon çözelti doldurulmuş ve kör numune olarak oda sıcaklığında (25 °C) ölçüme bırakılmıştır. Ardına hazırlanan 2(3H)-benzoksazon türevlerine ait numuneler ölçüm için küvete doldurularak işleme bırakılmıştır. Her numuneye ait ölçümler sonrası elde edilen absorbans-dalga boyu değerleri bilgisayara transfer edilerek grafikleri oluşturulmuştur.

Tüm pH değerleri üzerinden en uygun dalga boyu aralığı seçilerek, o dalga boyuna ait absorbans-pH grafikleri oluşturulmuştur. Her bir bileşiğe ait pK_a değeri, birbirinden bağımsız üç farklı deney ile 190-400 nm dalga boyu aralığında elde edilen bu spektrumlar ile belirlenmiştir.

4.4.2. Potansiyometrik Yöntem

Potansiyometrik yöntemle asitlik sabitlerinin belirlenmesinde Mettler Toledo üretim firmalı Seven Easy tipi pH-metre kullanılmıştır. pH-metrenin kalibrasyonu standart pH 4.00 ve pH 7.00 tamponları kullanılarak yapılmıştır. Titrimetrik analizde Isolab marka büret ve Heidolph marka MR Hei-Standart temas kısmı teflon karıştırıcı kullanılmıştır. 0.1 mL 1 M hidroklorik asit (HCl), 8.9 mL H₂O (CO₂ adsorplanmasını engellemek için ağzı kapalı kaplarda muhafaza edilmiştir.), 0.154 M potasyum klorür ve 1 mL asetonitril içerisinde çözünmüş madde karışımı 25 mL'lik beher içerisinde hazırlanarak, oda sıcaklığında magnetik karıştırıcı yardımıyla karıştırılmıştır. Suda çözünürlüğü az olan bazı 2(3H)-benzoksazon türevlerinde asetonitril miktarı arttırılmıştır. 0.5 M Potasyum hidroksit (KOH) ile yapılan titrasyonlar sonucunda harcanan hacimlere karşı gelen pH değerleri kaydedilerek grafik oluşturulmuş ve pK_a değerleri saptanmıştır.

4.4.3. Kapiler Zon Elektroforez Yöntemi

Kapiler zon elektroforez ile asitlik sabitlerinin belirlenmesinde Agilent 3D markalı cihaz ile çalışılmıştır. Fotodiyot dedektörü kullanılarak 210 nm dalga boyunda analiz yapılmıştır. Eritilmiş silikadan yapılmış kapiler (iç çapı 50.0 mikron, toplam

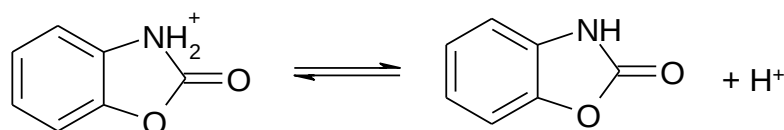
uzunluğu 48.5 cm, efektif uzunluğu 40.0 cm) sıcaklığı 25 °C iken, 20 kV sabit voltaj uygulanarak en iyi ayırım piki elde edilmeye çalışılmıştır.

Her örnek maddeden 10 mg alınarak metanol ile 10 mL'ye seyreltilmiştir ve stok çözeltiler hazırlanmıştır. Analiz edilecek örnek çözelti için ise, stok çözeltiden alınan 100 µL, 100 µL tampon çözelti ve 800 µL distile su ile karıştırılmıştır. Ayrıca nötr marker olarak (N-CH₃)-2(3H)-benzoksazon (Bileşik 3) ilave edilmiştir.

Vial içerisine doldurulan örnek çözelti cihaza enjekte edilir. Her ölçüm öncesi kılcal 0.01 N NaOH ile 2 dakika yıkanır. Daha sonra kılcal, su ile 2 dakika ve tampon çözeltiyle 4 dakika durulanmaktadır. Yapılan yıkama işlemlerinin ardından, hidrodinamik enjeksiyon ile 50 mbar basınç ve enjeksiyon sonrası 20 kV voltaj uygulanmaktadır. Her numune için 3 kez tekrarlanan bileşik enjeksiyonu ve işlemin tamamlanma aşamaları sinyal penceresinde takip edilerek izlenebilmektedir. Çözünenlerin elektroforetik hareketliliklerine bağlı olarak gerçekleşen ve kapiler içerisinde elektroforetik tampon içinde çözünmüş iyonik türlerin farklı hızlarla göç etmelerine dayanarak gerçekleşen ayırma işleminin sonucunda oluşan pikler kaydedilmiştir. pH ile gözlenen elektroforetik hareketlilik grafiğe geçirilmiş ve pK_a değerleri saptanmıştır.

5. BULGULAR

2(3H)-benzoksazolon ana yapısının (Bileşik 1) asitlik sabiti (pK_a) UV-GB spektroskopisi, potansiyometri ve kapiler elektroforez ile tayin edilmiştir (Foulon ve diğerleri, 2007). Bileşik 1 ile yaptığımız çalışmalar neticesinde, bu maddenin asitlik sabitini (pK_a) UV-GB spektroskopisi ile 9.01, potansiyometrik yöntem ile 8.98 ve kapiler zon elektroforez yöntemi ile 8.97 olduğu tespit edilmiştir. Literatürde yer alan bu çalışmada Bileşik 1 için elde edilen pK_a değerleri Tablo 5.1’de verilmiştir. Ayrıca literatürdeki diğer bir çalışmada, aynı madde için pK_a değeri 8.7 olduğu tespit edilmiştir (Poupaert ve Carato, 2005). Protonlanmanın benzoksazolon halkası üzerindeki azot atomunun üzerinde olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.1).



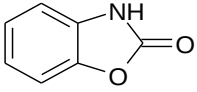
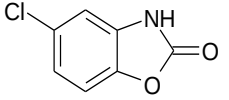
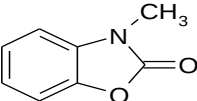
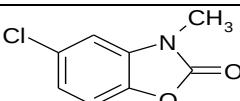
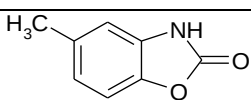
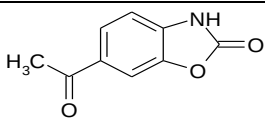
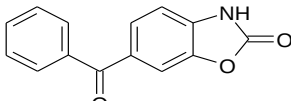
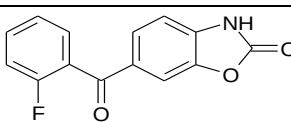
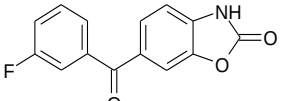
Şekil 5.1. 2(3H)-benzoksazolon halkasının protonlanma denge reaksiyonu.

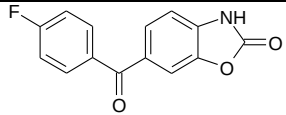
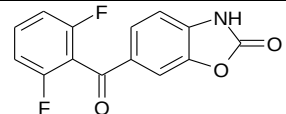
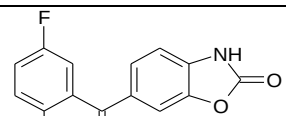
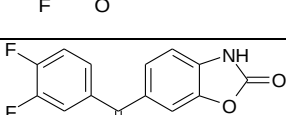
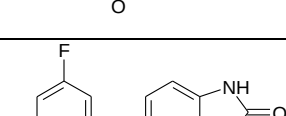
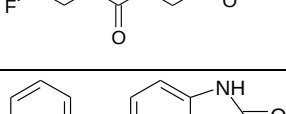
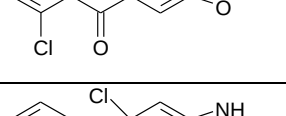
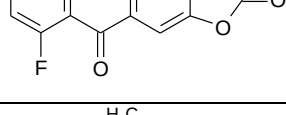
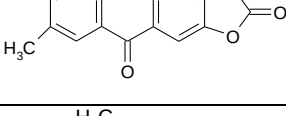
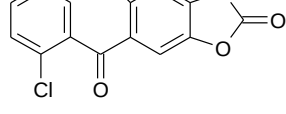
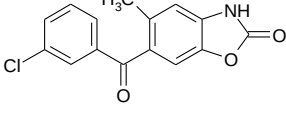
Tablo 5.1. Bileşik 1’in pK_a değerleri.

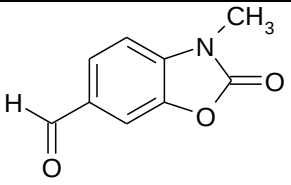
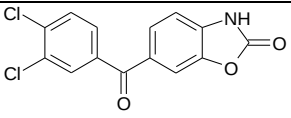
UV-GB	Potansiyometri	Kapiler Elektroforez	Kaynak
8.96±0.09	8.95±0.04	9.18±0.06	Foulon ve diğerleri, 2007

Bu çalışmalar sonucunda elde edilen verilerin birbirleri arasındaki benzerlik ile literatürde verilmiş olan değerlere olan anlamlılıkları araştırılmış (Ek 1’e bakınız), 2(3H)-benzoksazolon türevleri üzerinde bu üç yöntem ile asitlik denge sabitlerinin belirlenmesi çalışmalarına devam edilmiş ve elde edilen asitlik sabit (pK_a) değerleri Tablo 5.2 verilmiştir.

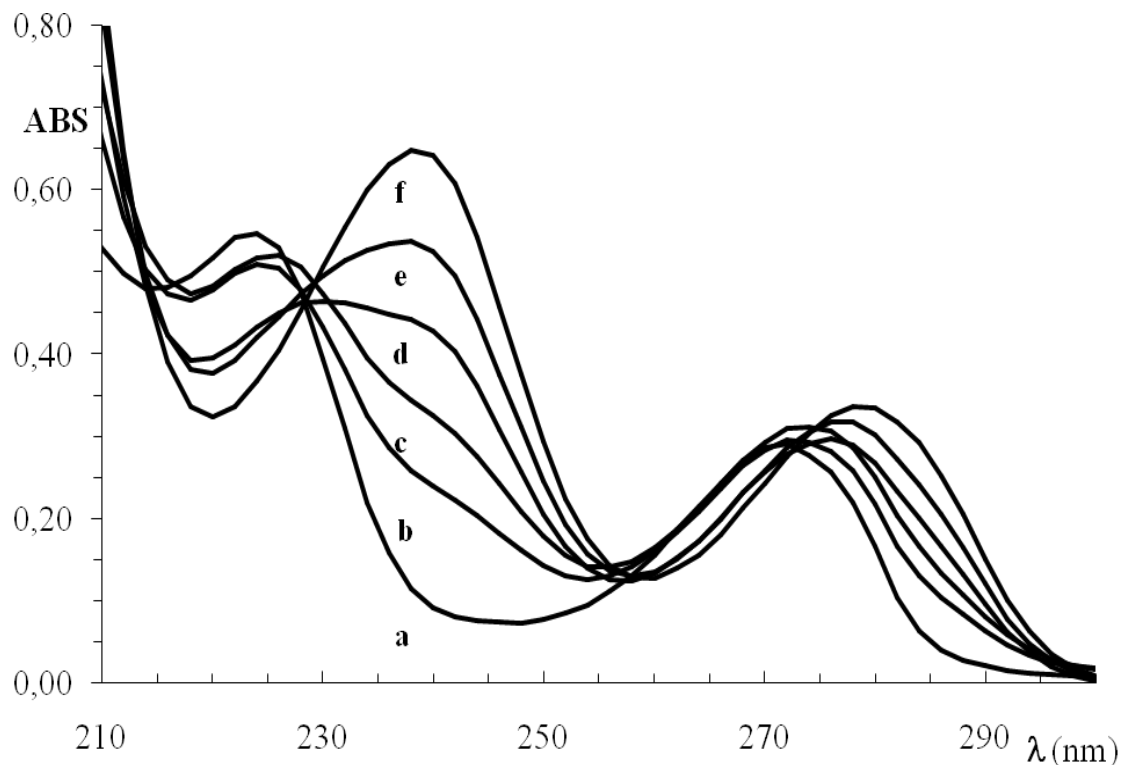
Tablo 5.2. 2(3H)-benzoksazolon türevlerinin pK_a değerlerinin UV-GB spektroskopisi, potansiyometri ve kapiler zon elektroforez (CZE) ile tayini.

Bileşik No	Bileşik Açık Formülü	UV-GB	Potansiyometri	CZE
1		9.01±0.06	8.98±0.05	8.97±0.04
2		8.26±0.05	-	8.25±0.06
3		< 2.10	-	Marker
4		< 1.83	-	-
5		8.92±0.05	8.97±0.08	8.82±0.04
6		7.86±0.04	7.78±0.09	-
7		7.70±0.07	7.81±0.07	-
8		7.40±0.06	7.32±0.07	-
9		7.65±0.06	7.61±0.08	-

10		7.70±0.05	-	7.40±0.07
11		7.35±0.08	-	7.23±0.04
12		7.45±0.06	7.36±0.04	-
13		7.61±0.05	7.54±0.06	-
14		-	-	-
15		7.35±0.03	7.29±0.07	7.23±0.03
16		7.15±0.06	-	-
17		8.15±0.05	8.11±0.05	-
18		7.67±0.04	-	-
19		8.10±0.05	-	-
20		-	-	-

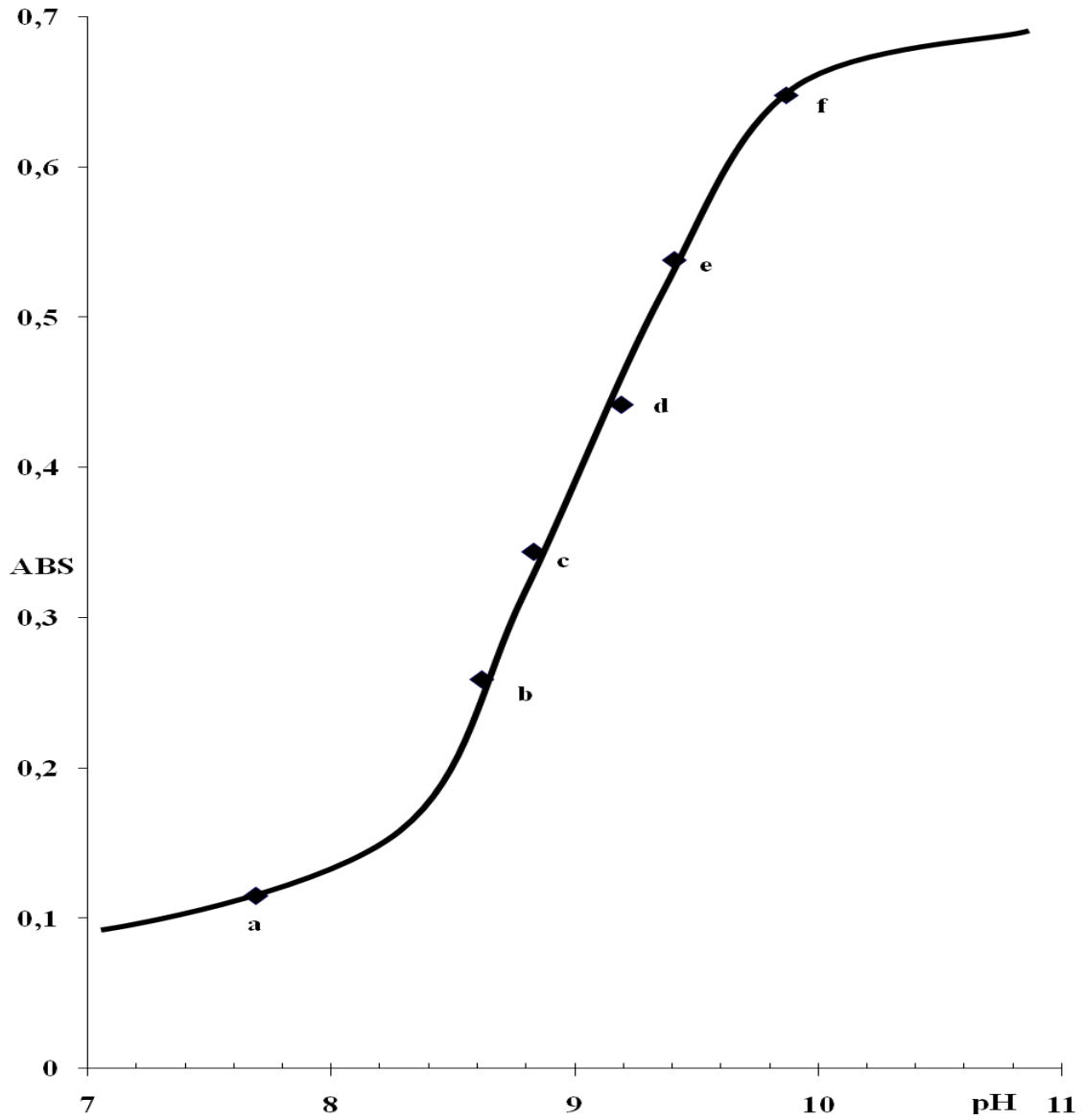
21		< 2.10	-	-
22		8.30±0.05	-	-

Bileşik 1 için elde edilen absorpsiyon spektrumu Şekil 5.2’de verilmiştir. Asidik ortamda ($\text{pH} > 3$) iki tane absorpsiyon bandı 224 nm ve 270 nm gözlenmiş iken, alkali ortamda ise bu değerlerinin 271 nm ve 279 nm bandına kaydığı gözlenmiştir. Spektrumda dört tane izobestik nokta gözlenmiş olması Bileşik 1 maddesinin yalnızca bir tane asit-baz denge reaksiyonu (Şekil 5.1) verdiğini göstermektedir.



Şekil 5.2. 5×10^{-5} M 2(3H)-benzoksazolon (Bileşik 1)’in değişik pH değerlerinde elde edilen absorbans-dalga boyu grafiği. pH değerleri : a.7.69, b. 8.62, c.8.83, d.9.19, e. 9.41, ve f.9.87.

Bileşik 1'in değişik pH değerlerinde elde edilen absorbans değerlerinin seçilen dalga boylarındaki (238 nm) absorbans verilerinin pH'a karşı çizilen grafiği Şekil 5.3'te verilmiştir.



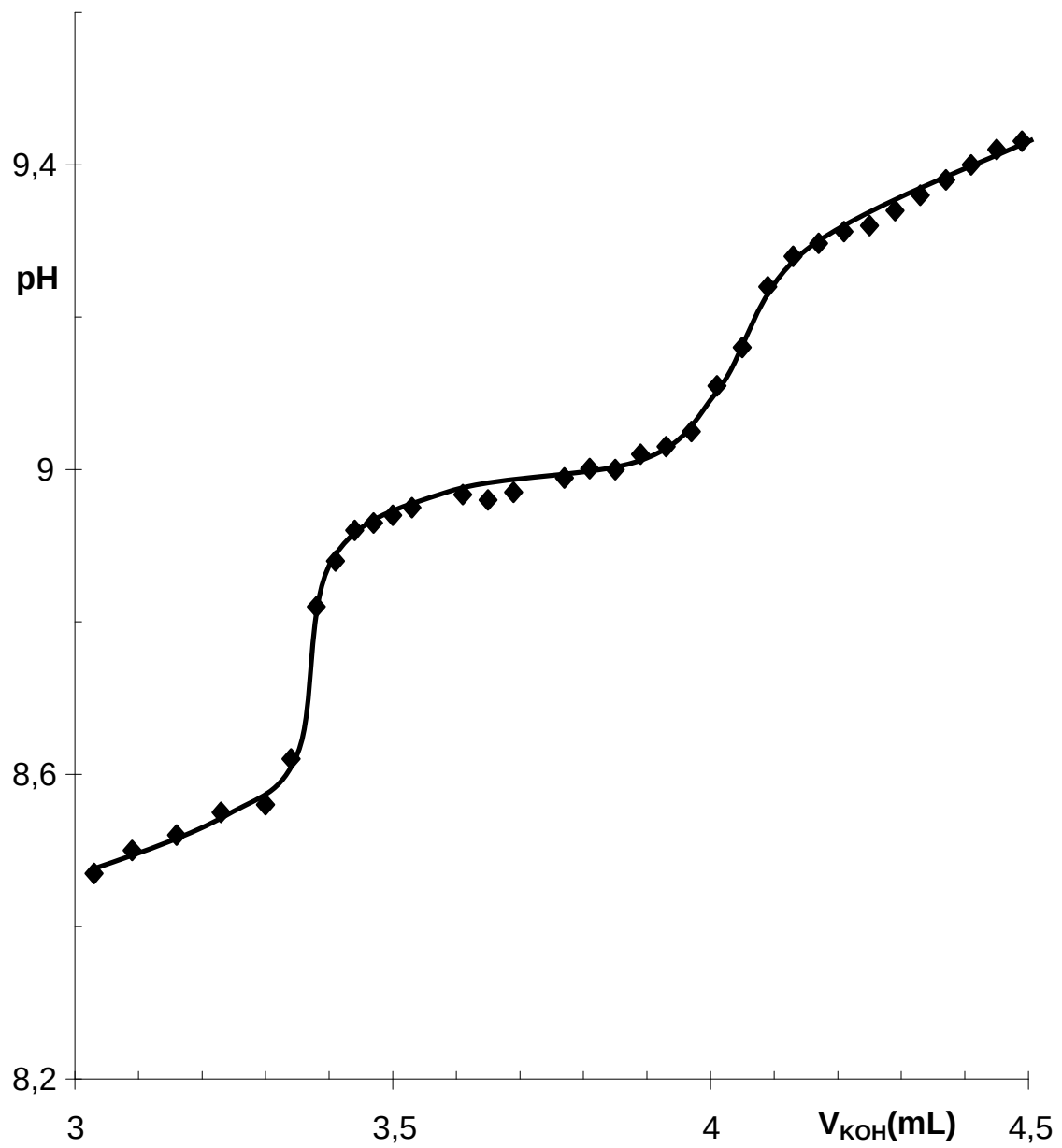
Şekil 5.3. 5×10^{-5} M 2(3H)-benzoksazolon (Bileşik 1)'in değişik pH değerlerindeki 238 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerlerinin pH'a karşı grafiği. pH değerleri: a.7.69, b.8.62, c.8.83, d.9.19, e.9.41, ve f.9.87.

Elde edilen absorbans-pH grafiği S şeklindedir ve bu eğrinin orta noktasından Bileşik 1'in pK_a değerinin 9.01 olduğu tespit edilmiştir. Elde edilen pK_a değeri üç kez tekrarlanmıştır. Ayrıca değişik dalga boylarında da benzer grafiklerden aynı ve/veya benzer pK_a değeri elde edilmiştir.

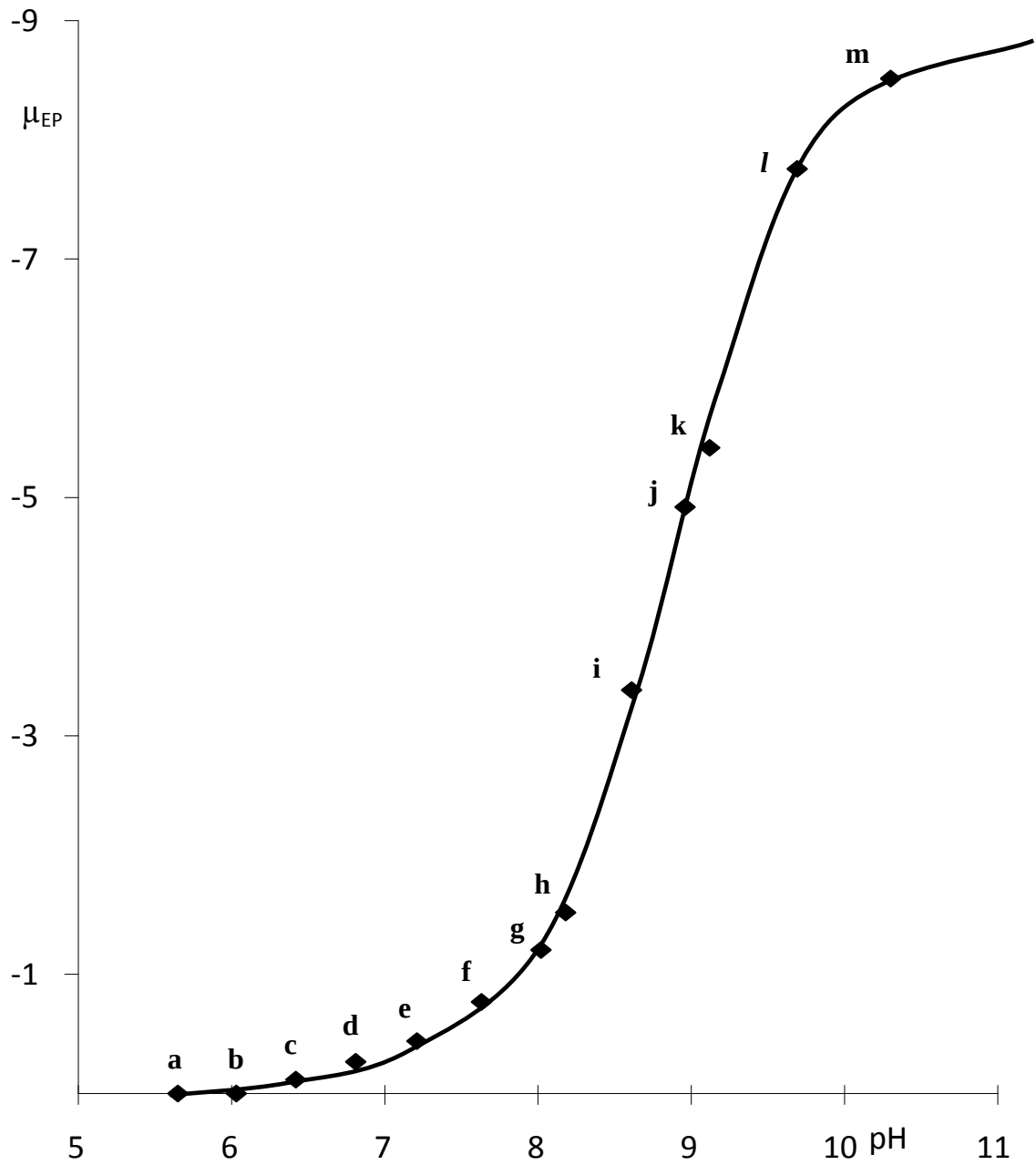
UV-GB spektroskopisi ile elde edilen Bileşik 1 maddesinin pK_a değerinin doğruluğunu kontrol etmek için potansiyometri ve kapiler zon elektroforez yöntemlerinden yararlanılmıştır.

Yapılan potansiyometrik deneylerde, çözeltinin iyonik gücü 0.154 M olacak şekilde potasyum klorür ile sabitlenmiştir. Ancak potansiyometrik ölçümlerde kullanılan konsantrasyon, UV-GB spektrofotometrisinde kullanılan konsantrasyondan ölçüm değerlerinin okunabilmesi için daha yüksek yapılmıştır. Çalışılan maddelerin çözünürlükleri yüksek konsantrasyonlarda azalmasından dolayısıyla sadece bazı benzoksazon türevlerinin pK_a değeri bu yöntem ile elde edilmiştir. Bu yöntem ile elde edilen çözeltinin asitliği (pH)–eklenen bazın hacmi grafiği Şekil 5.4'te verilmiştir. Yapılan çalışmalar sonucunda elde edilen eğrinin orta noktasından Bileşik 1'in pK_a değeri 8.98 olarak tespit edilmiştir. Potansiyometrik yöntem ile elde edilen pK_a değeri ile UV-GB spektroskopisi ile elde edilen değer arasındaki benzerlik olduğu gibi literatürde verilen sonuçlar ile örtüşmektedir (*Foulon ve diğerleri*, 2007). Bu yöntemle elde edilen deneysel veriler üç kez tekrarlanarak elde edilen pK_a değeri Tablo 5.2'de verilmiştir.

Üçüncü teknik olarak kullanılan kapiler zon elektroforez (CZE) ile Bileşik 1'in pK_a değeri ($pK_a=8.97$) tayin edilmiştir. Tampon çözelti içerisindeki Bileşik 1 ile nötr marker (Bileşik 3) kapilerden geçirilerek elektroforetik hareketliliklerine bağlı olarak tampon içinde çözünmüş iyonik türlerin farklı hızlarla göç etmelerine dayanarak gerçekleşen ayırma işleminin sonucunda oluşan pikler 3 defa tekrar edilerek kaydedilmiştir. Çözünenlerin pH ile gözlenen elektroforetik hareketlilik değeri grafiğe (Şekil 5.5) geçirilerek ve pK_a değeri saptanmıştır.



Şekil 5.4. 2(3H)-benzoksazonon (Bileşik 1)'in potansiyometrik yöntem ile pH'ın eklenen bazın (KOH) hacmine karşı çizilen grafiği.



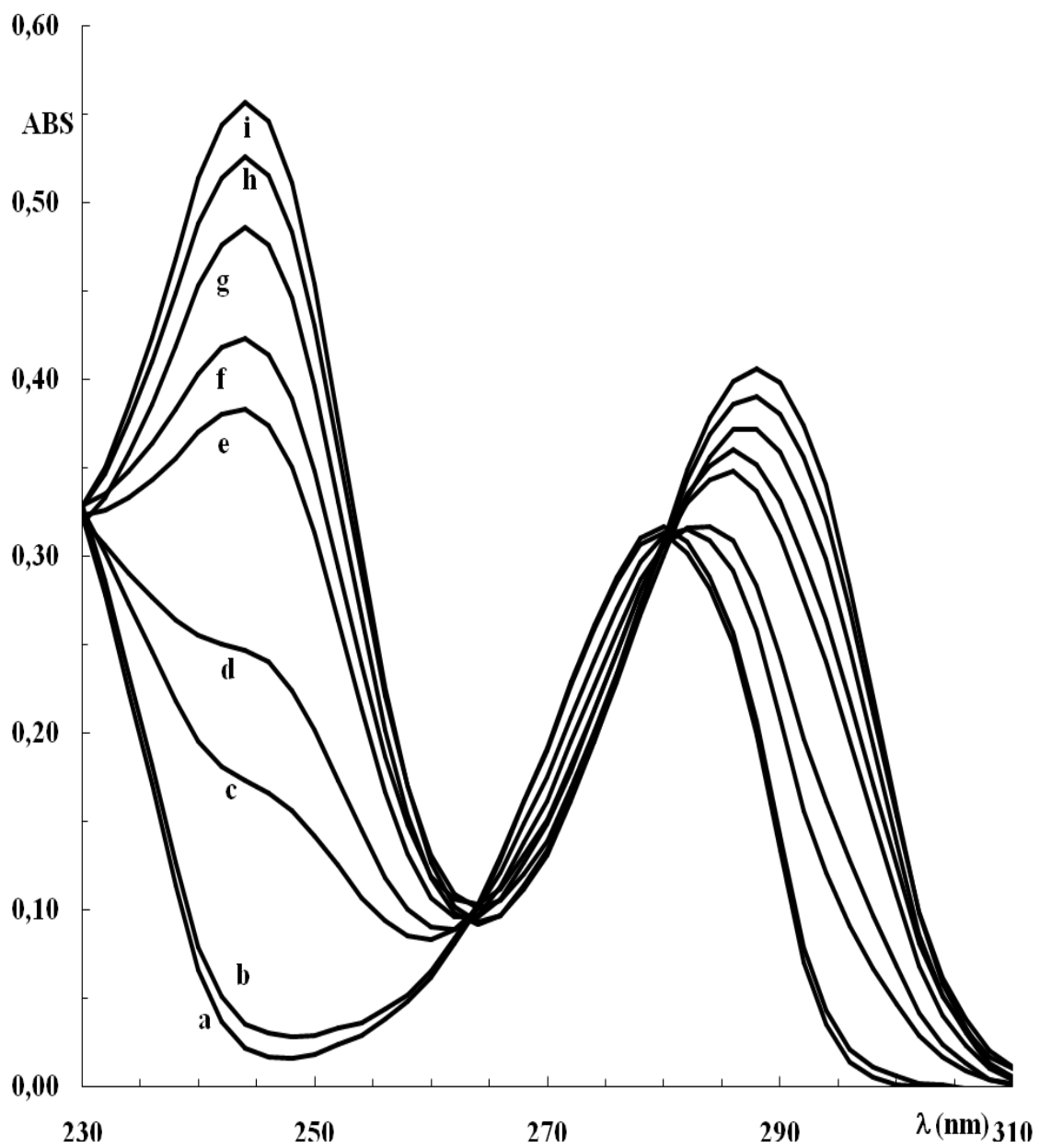
Şekil 5.5. 2(3H)-benzoksazon (Bileşik 1)'in değişik pH değerlerindeki elektroforetik hareketlilik grafiği. pH değerleri :a.5,65, b.6,03, c.6,42, d.6,81, e.7,21, f.7,63, g.8,02, h.8,18, i.8,61, j.8,96, k.9,12, l.9,69, ve m.10,30.

2(3H)-benzoksazolon ana yapısının (Bileşik 1) asitlik sabitinin, kullanılan üç değişik deneysel çalışmalar ile literatürde verilen değerler arasında anlamlılık olduğu saptanmış (Ek 1'e bakınız) ve yapı-asitlik sabiti (pK_a) arasındaki ilişkiyi anlamak için benzer yapıdaki 2(3H)-benzoksazolon türevleri üzerine çalışmalar yoğunlaştırılmıştır.

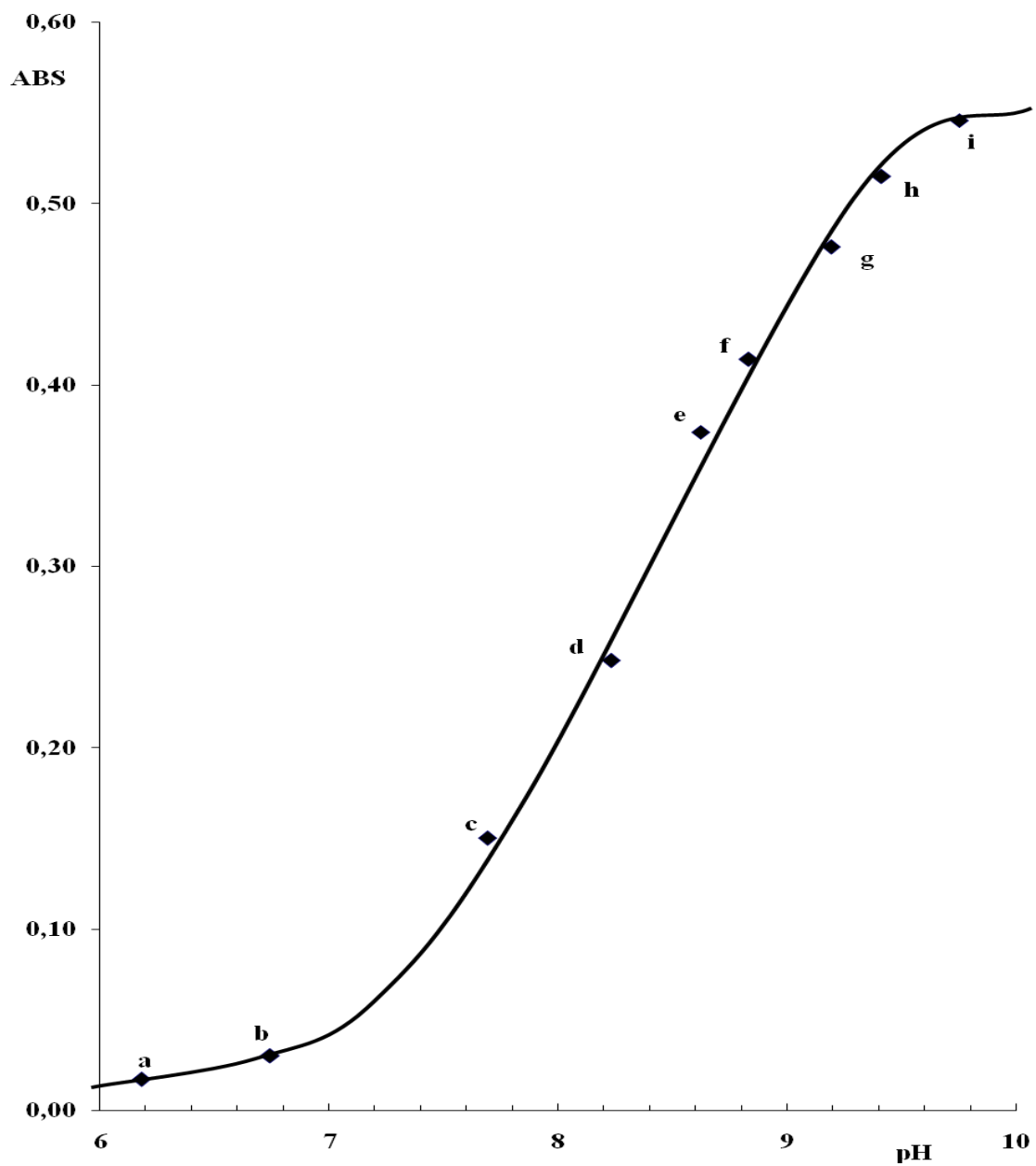
Bileşik 2 (5-Klor-2(3H)-benzoksazolon) kas gevşetici olarak kullanılan bir ilaçtır. Bu maddenin tampon çözelti içindeki asitlik sabitini (pK_a) bulmak için UV-GB spektroskopisi ile kapiler zon elektroforez kullanılmıştır. Potansiyometri yöntemi ile pK_a tayini, Bileşik 2'nin tampon çözelti içindeki çözünürlüğünün az olması nedeni ile tespit edilememiştir.

Bileşik 2 için elde edilen absorpsiyon spektrumu Şekil 5.6'da verilmiştir. 230 nm, 262 nm, ve 280 nm dalga boylarındaki izobestik noktaları yalnızca bir tane asit-baz dengesini göstermektedir. Absorbans değerlerinin ortamın asitlik değeri ile azalması sonucu her bir dalga boyundaki artış veya azalış, ortamdaki maddenin protonlanmış formdan nötral forma geçişini işaret etmektedir.

Bileşik 2'nin 246 nm sabit dalga boyunda elde edilen absorbans verilerinin, farklı tampon çözeltilerdeki pH değerlerine karşı çizilen grafiği Şekil 5.7'de verilmiştir. Elde edilen eğri S şeklindedir ve bu eğrinin orta noktasından Bileşik 2'nin pK_a değerinin 8.26 olduğu tespit edilmiştir. Şekil 5.7'de görüldüğü gibi deneysel veriler ile kuramsal eğri arasındaki benzerlik deney sonuçları ile teorik değerler arasındaki uyumu göstermektedir. pK_a değerleri diğer bazı dalga boylarında da hesaplanmış ve benzer sonuçlar elde edilmiştir. Asitlik sabitinin eldesi için aynı deneme en az üç defa tekrar edilerek ortalama pK_a değeri tespit edilmiştir (Tablo 5.2).

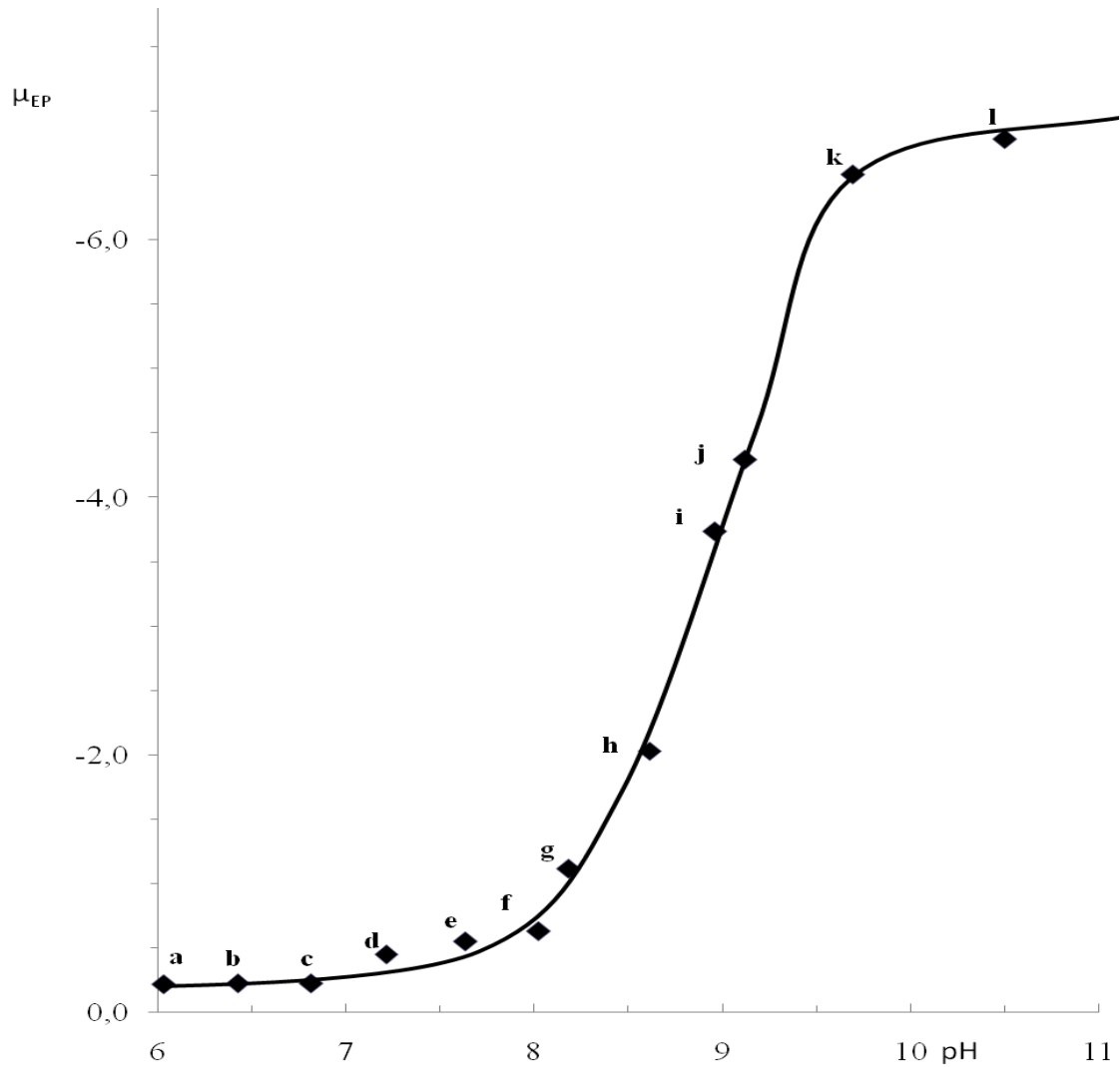


Şekil 5.6. Bileşik 2 (5-Cl-2(3H)-benzoksazon)’un değişik pH değerlerinde elde edilen absorbans-dalga boyu grafiği. pH değerleri : a.6.18, b.6.74, c.7.69, d.8.23, e.8.62, f.8.83, g.9.19, h.9.41, ve i.9.75.



Şekil 5.7. 5×10^{-5} M 5-Klor-2(3H)-benzoksazon (Bileşik 2)'nin 246 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerlerinin pH'a karşı grafiği. pH değerleri : a.6.18, b.6.74, c.7.69, d.8.23, e.8.62, f.8.83, g.9.19, h.9.41, ve i.9.75.

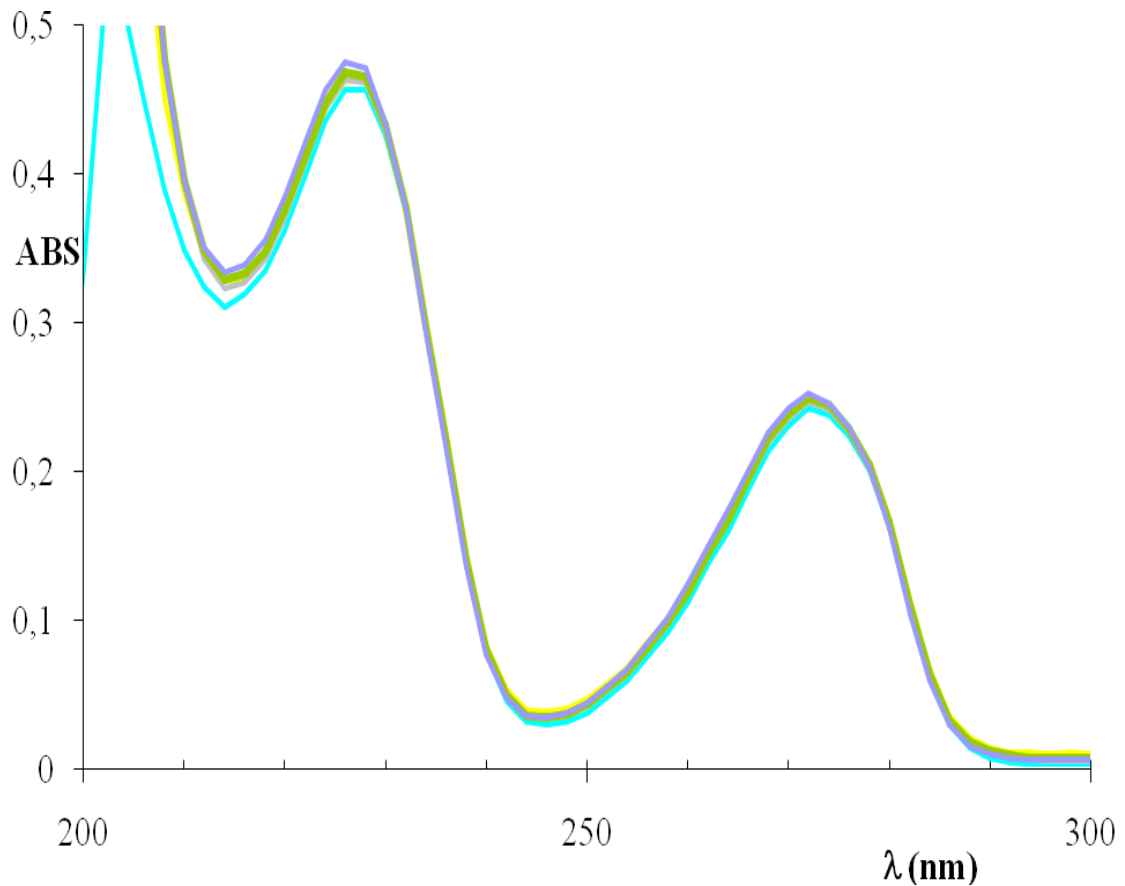
Kapiler zon elektroforez yöntemi ile Bileşik 2'nin asitlik sabitinin tayin edilebilmesi için, farklı pH değerlerinde hazırlanmış tampon çözeltilerden geçirilen Bileşik 2 ile nötr markerin (Bileşik 3) vermiş oldukları elektroforetik piklerden faydalanılmıştır. pH ile gözlenen elektroforetik hareketlilik grafiğe (Şekil 5.8) geçirilerek pK_a değerleri saptanmıştır.



Şekil 5.8. 5-Klor-2(3H)-benzoksazon (Bileşik 2)'nin değişik pH değerlerindeki elektroforetik hareketlilik grafiği. pH değerleri : a.6.03, b.6.42, c.6.81, d.7.21, e.7.63, f.8.02, g.8.18, h.8.61, i.8.96, j.9.12, k.9.69, ve l.10.50.

Azot üzerinde metil grubu içeren Bileşik 3 ve Bileşik 4 için yapılan çalışmalarda, çalışılan tampon çözelti pH aralığında (1.83-13.0) bileşiklerin asitlik sabitleri tespit edilememiştir. Ancak bu maddelerin asitlik sabitlerinin çalışılan en düşük pH değerinden daha düşük bir pK_a değerlerine sahip olduğu öngörülebilir. Elde edilen en düşük asitlik sabitleri Tablo 5.2 de verilmiştir.

Bileşik 3'ün absorbans-dalga boyu grafiği Şekil 5.9'da verilmiştir. Tampon çözeltilerin asiditesinin azaltılmasına rağmen (pH 2.10'dan 9.41'e) okunan absorbans-dalga boyu spektrumunda herhangi bir değişim gözlenmemiştir.



Şekil 5.9. 2-(3-Metil)-benzoksazolon (Bileşik 3)'ün değişik pH değerlerinde elde edilen absorbans-dalga boyu grafiği. pH değerleri: 2.10, 6.18, 7.25, 8.10 ve 9.41.

Bileşik 3 ve Bileşik 4 için zaman içerisinde absorbans değerlerinde herhangi bir değişim olup olmadığı araştırıldı ve çeşitli zaman aralıkları ile toplanan absorbans-dalga boyu spektrumunda herhangi bir farklılık gözlenmediği gibi farklı günlerde hazırlanan çözeltilerde de absorbansın zamandan bağımsız olduğu tespit edilmiştir. Özellikle Bileşik 3'ün asitlik sabitinin düşük olması, kapiler zon elektroforez deneylerinde bu maddenin nötr marker olarak kullanılmasını sağlamıştır.

Çalışmamızın ana yapı iskeletini oluşturan beş maddelik grubun son üyesi olan 5-metil-2(3H)-benzoksazolonun (Bileşik 5) ilk iki bileşikte kullanılan aynı teknikler ile asitlik sabiti bulunmuştur. Bileşik 5'in 5-Cl-2(3H)-benzoksazolon'dan (Bileşik 2) farklı olarak potansiyometrik ölçümlerde çözünürlüğünün daha iyi olmasından dolayı asitlik sabiti, pK_a değeri, tespit edilmiştir. UV-GB spektroskopisi, potansiyometrik ve kapiler zon elektroforez yöntemleri ile elde edilen asitlik sabitleri Tablo 5.2 de verilmiştir.

Ana yapıyı oluşturan bu beş maddeden üç tanesinin pK_a değeri bulunmuş ve 2 tanesinin en düşük pK_a değeri Tablo 5.2 de verilmiştir. Bu seriden ilk farklılık elektron çeken grubun (Klor) 2(3H)-benzoksazolon ana yapısı üzerindeki 5 konumunda olması (Bileşik 2) elektronik dağılımda etki göstererek, hidrojen ile kıyaslandığında benzoksazolon halkasına elektron verici etki yapan metil'in halkanın 5 numaralı konumunda (Bileşik 5) olmasına göre asitliği arttırdığı gözlenmiştir.

Sistematik çalışmalarımıza 2(3H)-benzoksazolon ana yapısı üzerinde 6 numaralı konuma karbonil grubu içeren 6-benzoil bileşikler ile devam edildi. Bileşik 6 ve Bileşik 7'nin asitlik sabiti tespit edilmiştir. Her iki bileşiği ve 2(3H)-benzoksazolon karşılaştırdığımızda karbonil grubunun varlığının bu maddelerinin asiditesini arttırdığı gözlenmiştir. Ayrıca Bileşik 7 için verilen literatür değeri ($pK_a=7.76\pm0.03$) ile çalışmalarımız neticesinde elde edilen pK_a değerleri birbirleri ile uyumlu ve anlamlıdır (Bkz.Ek 2) (Foulon ve diğerleri, 2007).

Bundan sonra çalıştığımız maddeler (Bileşik 8, 9, ve 10) Bileşik 7 üzerine flor atomunun benzen halkası üzerindeki konumlarının farklılandırılmış şekilleridir. Orto,

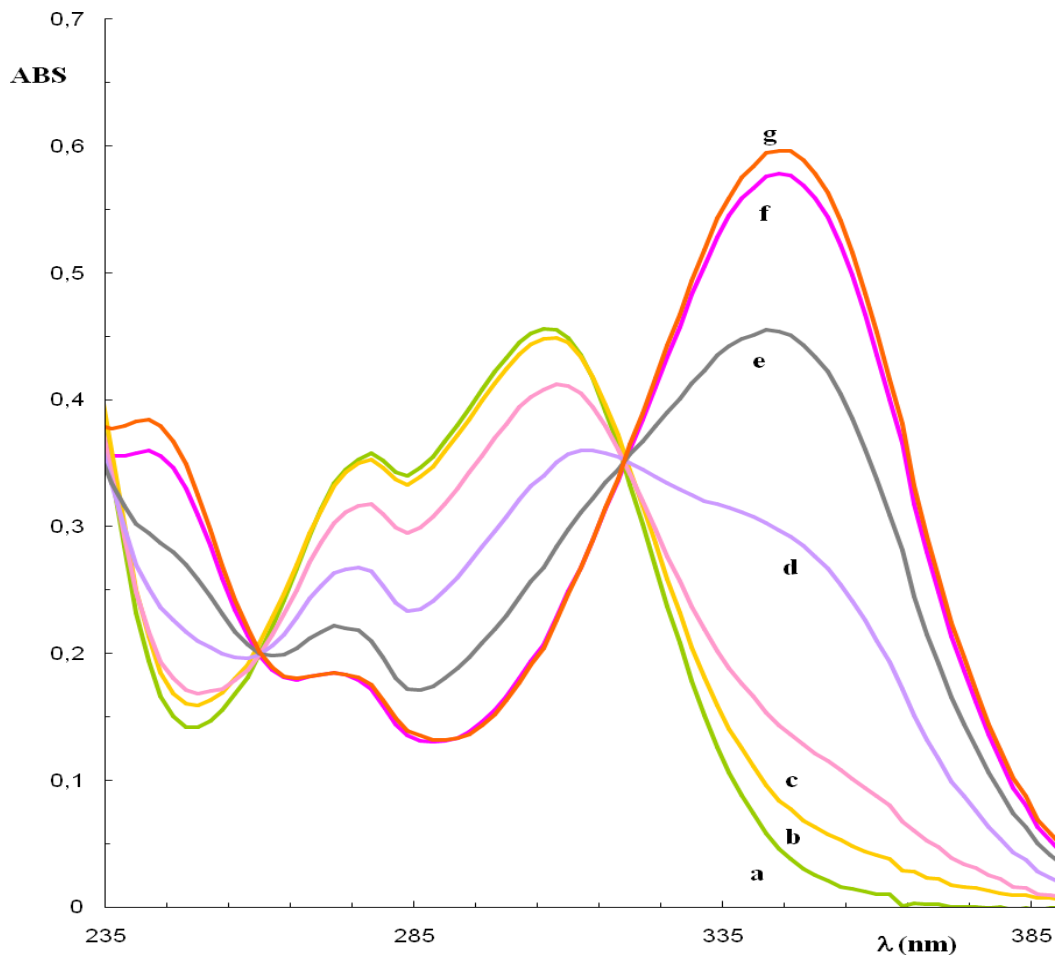
meta, ve para konumlarındaki flor atomunun varlığı orto pozisyonunda para pozisyonuna doğru asitliği azaltacak yönde etki göstermekte olduğu bulunmuştur.

Tek flor atomunun 6-benzoil üzerindeki etkisi incelendikten sonra, 6-benzoil üzerine değişik pozisyonlarda 2 tane flor atomu olduğu bileşiklerin de asitlik sabitleri bulunmuştur (Bileşik 11, 12, 13, ve 14). Bu maddelerden Bileşik 14'ün asetonitril çözücüsünde çözülmediği gözlenmiştir. Deneysel veriler arasında çözücü değişikliği nedeni ile yeni bir değişken ilave edilmemesi adına başka bir organik çözücü kullanılarak pK_a tayini yapılmamıştır. Diğer bileşikler için yapılan deneyler sonucunda elde edilen asitlik sabitleri Tablo 5.2 de verilmiştir. Veriler incelendiğinde 6-benzoil üzerinde 2 ve 6 pozisyonlarında flor içeren bileşiğin pK_a değerinin; 2,5 ve 3,4 konumunda flor bulunan bileşiklerden (Bileşik 12 ve 13) daha asidik olduğu görülmüştür (Tablo 5.2). UV-GB spektroskopisi ile elde edilen Bileşik 11'in asitlik sabiti ve değişik pH değerlerinden elde edilen absorbans-dalga boyu spektrumu Şekil 5.10'da verilmiştir. Aynı maddenin 344 nm dalga boyunda değişik tampon çözeltiğinde elde edilen absorbans-pH grafiği ise Şekil 5.11 de verilmiştir. Benzer yaklaşım, diğer bileşiklerin pK_a tayinlerinde kullanılmıştır (Tablo 5.2). Ayrıca yapı-aktivite (Analjezik) ilişkisine maddenin pK_a değerinin etkisi olduğu öngörülmektedir. Tablo 5.3 de görüleceği üzere, asitlik sabiti (pK_a) arttıkça (asidite azaldıkça) analjezik aktivitede azalma meydana gelmiştir (Gökhan ve diğerleri, 1999). Bu sonuç asitliğin yapı-aktivite arasındaki ilişkinin açıklanmasında kullanılabileğini göstermektedir.

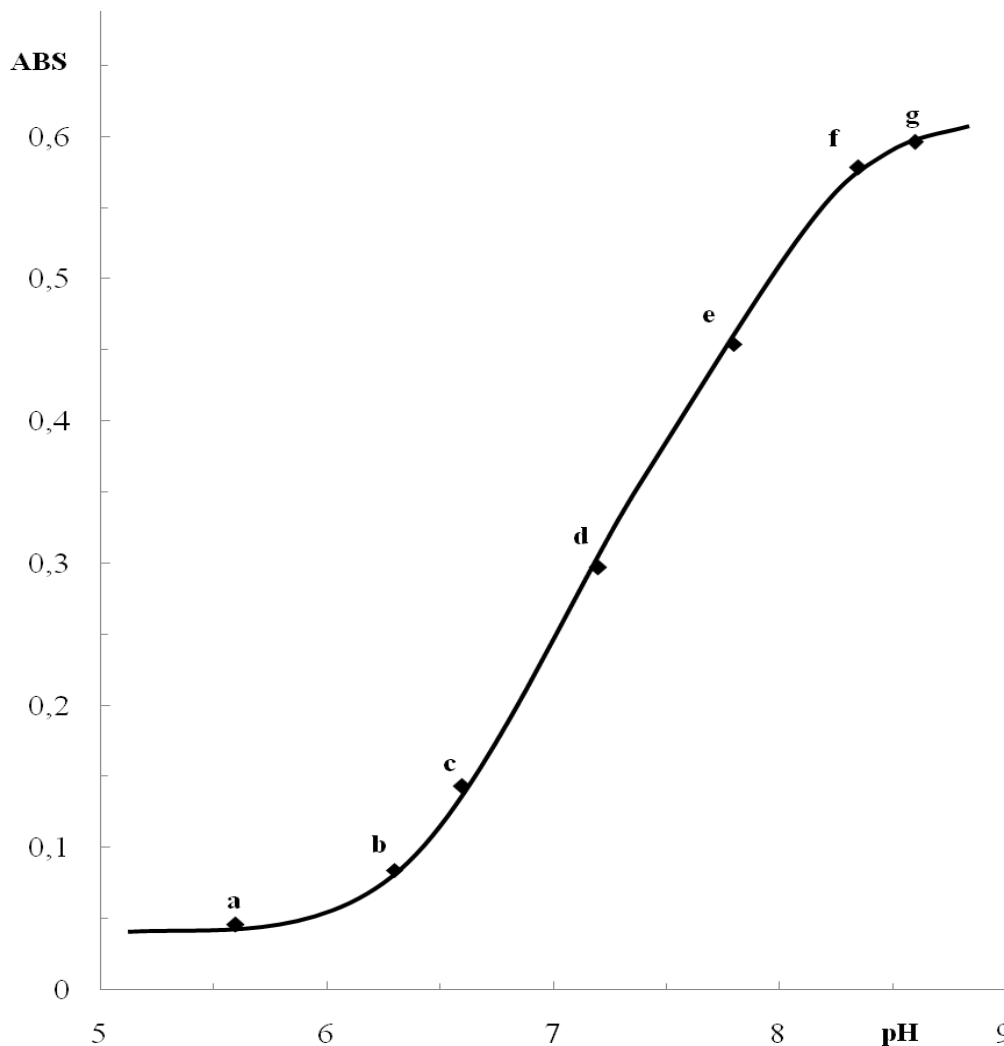
Tablo 5.3. Bileşik 11,12 ve 13'ün asitlik sabiti (pK_a) değerleri ile analjezik aktiviteleri.

#	pK_a	% Analjezik Aktivite
11	7.35±0.08	53.26
12	7.45±0.06	76.07
13	7.61±0.05	19.86
Aspirin		45.24

Bileşik 7'nin 6-benzoil üzerindeki 2 numaralı konumdaki hidrojen atomu yerine, Bileşik 8'de flor ile yer değiştirildiğinde, asitlik sabitinin arttığı gözlenmişti. Benzer şekilde; 2 numaralı konuma klor atomu konulduğunda (Bileşik 15), maddenin asitlik sabiti hidrojenen daha elektronegatif bir atom olan klor tarafından artmıştır (Tablo 5.2). Ayrıca Bileşik 15'in tespit edilen asitlik sabiti değerleri (UV-GB spektroskopisi, potansiyometri ve kapiler zon elektroforez) ile literatürde verilen değerlerin uyum içinde olduğu görülmüştür (Bkz.Ek 1) (*Foulon ve diğerleri*, 2007).



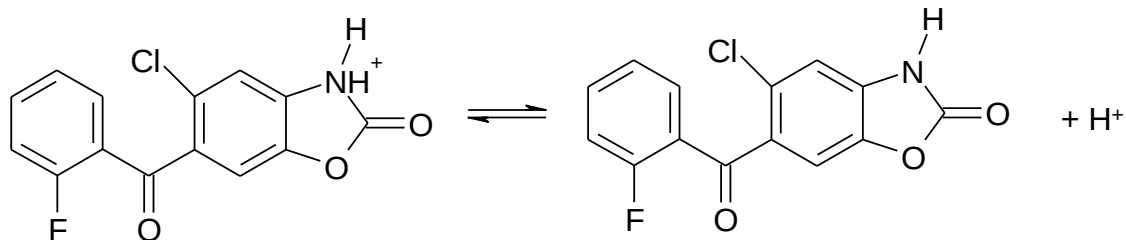
Şekil 5.10. 5-(2,6-Diflorobenzofenon)-2(3H)-benzoksazolon (Bileşik 11)'in değişik pH değerlerinde elde edilen absorbans-dalga boyu grafiği. pH değerleri : a.5.60,b. 6.30, c.6.60, d.7.20, e.7.80, f.8.35, ve g.8.60.



Şekil 5.11. 5×10^{-5} M 5-(2,6-Diflorobenzofenon)-2(3H)-benzoksazolon (Bileşik 11)'in 344 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değerlerinin pH'a karşı grafiği. pH değerleri: a.5.60, b.6.30, c.6.60, d.7.20, e.7.80, f.8.35, ve g.8.60.

Bileşik 2 (5-Klor-2(3H)-benzoksazolon) türevi olan Bileşik 16 için yapılan çalışmada asitlik sabitinin, hem 2(3H)-benzoksazolon'dan hem de 5-klor-2(3H)-benzoksazolon'dan daha asidik karakter taşıdığı tespit edilmiştir (Tablo 5.2). 6-benzoil'in orto pozisyonunda bulunan flor atomunun elektron çeken bir grup olmasından dolayı ana yapıdaki azot atomu üzerinde gerçekleşen protonlanma reaksiyonunda

hidrojeni daha zor verdiği dolayısıyla elektronların azot atomu üzerinde daha fazla kaldığı ön görülmektedir.



2(3H)-benzoksazolonun 5. konumunda metil süstitüentli türevi olan Bileşik 5 ile, bu bileşiğin 6-benzoil türevlerinden biri olan Bileşik 17 ile karşılaştırılmasında, Bileşik 17'nin asitlik sabiti değerin (pK_a) 5-metil-2(3H)-benzoksazolon'a göre azaldığı, yani asiditenin arttığı gözlenmektedir.

Çalışmamızın son aşamasında 5-metil-2(3H)-benzoksazolon (Bileşik 5)'un 6 konumunda klor atomunun orto, meta, ve para konumunda olduğu 6-benzoil türevleri üzerinde çalışılmıştır. Elde edilen veriler ışığında orto (Bileşik 18) ile meta (Bileşik 19) asitlik sabitin (pK_a) Bileşik 5'ten daha düşük olduğu gözlenmiştir (Tablo 5.2). 6-benzoil üzerindeki klor atomunun, ana yapıdaki 5 pozisyonunda metil grubu içermeyen Bileşik 7'den daha asidik olduğu gözlenmiştir. Beklendiği gibi (orta ve para süstitüentler elektronların delokalize etmelerinden dolayı) yapı üzerindeki orto-klor bileşiği (Bileşik 18), meta pozisyonunda klor içeren Bileşik 19'dan daha düşük pK_a değerine sahip olduğu gösterilmiştir. Ancak Bileşik 20 ile yapılan deneyler neticesinde absorbands değerlerinin, çalışılan tüm tampon çözeltiler ile zamana bağlı olduğu gözlenmiş ve dolayısıyla asitlik sabiti değeri tespit edilememiştir. Orto ve meta türevlerinin aynı tampon çözeltilerinde absorbandsları zamandan bağımsız olduğu gözlenmiştir. Bileşik 21 için asitlik sabitin tespit edilememesinin sebebi, Bileşik 3 ve 4'te olduğu gibi azot üzerinde metil grubu içermesidir. Ayrıca elde edilen absorbands-dalga boyu spektrumlarının, çalışılan pH aralığında zamana bağlı olarak değiştiği gözlenmiştir ve bundan dolayı asitlik sabiti verilememiştir.

Son olarak bu çalışma kapsamında Bileşik 22 ile çalışılmıştır. Bu bileşik için elde edilen pK_a değeri ile aynı konumda flor atomları içeren Bileşik 13 karşılaştırıldığında, Bileşik 13'ün Bileşik 22'den daha asidik olduğu görülmüştür. Bu sonuç daha elektronegatif olan flor atomunun ana yapıdan daha kuvvetli elektron çekmesi sonucunda azot atomu üzerinde oluşturduğu kısmi pozitif yükün daha kararsız olduğunu gösterdiği düşünülmektedir.

6. TARTIŞMA

2(3H)-benzoksazolon ve türevleri ilgili olarak yapmış olduğumuz çalışmalar neticesinde bulunan değerler literatürdeki değerler ile karşılaştırılmıştır. Literatürde UV-GB spektroskopisi, potansiyometri ve kapiler zon elektroforez teknikleri ile Bileşik 1 için yapılan çalışmada, protonlanmanın 2(3H)-benzoksazolon halkası üzerindeki azot atomundan kaynaklandığı rapor edilmiştir. Yapmış olduğumuz bu çalışmada, Bileşik 3, 4 ve 21 için asitlik sabitlerinin tespit edilememiş olmasından dolayı protonlanmanın benzoksazolon ana yapısındaki azot atomu üzerinde olduğu ispatlanmıştır. Buna bağlı olarak, yapısal değişikliklerin daha çok halkanın 3, 5 ve 6 konumlarında yapıldığı ana yapı ve türevleri üzerinde çalışmalar devam edilmiş, 6-benzoil'in ana yapıdan daha aktif olduğu, 5. konuma klor sübstitüentli grubun ilavesiyle analjezik etkinin sübstitüent içermeyen ana yapının analjezik etkisinden daha yüksek olduğu saptanmıştır.

Bu bilgilerden yola çıkılarak 2(3H)-benzoksazolon ve türevleri üzerinde yapmış olduğumuz çalışmalarla ilgili, iyonlaşabilen grupların varlığının, biyolojik aktiflik ve çözünübilirlik ile ilgili bilgi sağladığı görülmektedir. Buna bağlı olarak, üç farklı yöntem ile sürdürülen iyonizasyon sabiti tayin yöntemlerimizde, 22 adet maddeden, yalnızca 17 tanesi ile ilgili veri toplanmıştır. Her üç yöntem ile bulguların elde edildiği Bileşik 1, Bileşik 5 ve Bileşik 15'e ait verilerin karşılaştırılmasında Varyansların Homojenlik Testi kullanıldı. İstatistiksel değerlendirmeler sonucunda, Varyansların Homojenlik Hipotezi, EK 1'de gösterildiği şekilde, $p > 0.05$ değerleri ile istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Sadece iki yöntem sonuçlarının olduğu Bileşik 2, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 ve 17 'e ait gruplara ait verilerin istatistik analizi ise Wilcoxon Eşleştirilmiş İkili Örnek Testi kullanılarak karşılaştırılmıştır. EK 2'de gösterildiği şekilde, $p = 0.05$ değeri elde edilerek, istatistiksel olarak iki eş arasında anlamlı bir fark olmadığı ortaya çıkmıştır.

2(3H)-benzoksazolon yapısındaki azot atomu üzerinde metil grubu içeren bileşik türevlerinde asitlik sabiti değerlerine üç yöntem ile ulaşamamış olması protonlanmanın yeri üzerindeki şüpheyi kaldırmış ve protonlanmanın sadece ana yapıdaki azot atomu üzerinde olduğu görülmüştür. UV-GB spektroskopisinde, değişik pH aralıklarında

tampon çözeltiler kullanılmasına rağmen azot üzerinde metil grubu olduğunda protonlanma gözlenemedi ve bu maddelerin pK_a değerlerinin 2 den küçük olduğu bulunmuştur. Bu bilgilere dayanarak, Bileşik 3, 4 ve 21’de asitlik sabiti değerlerinin saptanamaması Şekil 5.1’de verilen mekanizmanın doğruluğunu kanıtlamaktadır.

Yapılan sistematik çalışmalar sonucunda, UV-GB spektroskopisi yöntemi ile ilgili olarak, yüksek duyarlılığa sahip (10^{-6} M’a kadar değişen) olması, iyi bir doğruluk elde edilebilmesi, veri toplamasının oldukça kolay ve elverişli olması açısından pK_a tayini için seçilebilecek yöntemlerden en avantajlısı olduğu söylenebilir. İyi bir doğruluk elde edilebilmesi için hata payı aza indirilmeli, seçilecek pH aralıklarına en uygun tampon çözeltiler sık aralıklarda özellikle protonlanma dengesinin değiştiği aralıkta kullanılmalıdır. Potansiyometrik titrasyon tekniğinde ise eklenen baz (KOH) hacmi dikkatlice gözlenmeli, azar azar ilave edilerek pH aralıkları sık kaydedilmelidir. Yapılan çalışmada potansiyometri yöntemiyle sonuç elde edilemeyen maddeler, asetonitril içerisinde belirtilen hacimlerde çözünmemektedir. Çözücü miktarının artırılması durumunda maddeler çözünürlükleri artacak, fakat organik çözücü-su oranındaki değiştirilmesi sonuçlar arasındaki karşılaştırmayı imkansız hale getireceğinden bu çalışma kapsamında çözücü miktarını arttırmamıştır. Ayrıca asetonitril haricinde organik çözücü polarite farkı oluşmaması için bu çalışmada kullanılmamıştır. Son olarak ise kapiler zon elektroforez tekniği, çok küçük hacimdeki numunelerde yüksek ayırma gücüne sahip olması açısından oldukça önem sağlamaktadır. Fakat yapmış olduğumuz çalışmada kapiler elektroforez cihazının çalışma süresinin her madde için uzun zaman almasından dolayı, diğer tekniklere göre daha uzun zamanda sonuç elde edilmesi bir dezavantaj olarak görülmüştür.

7. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışma kapsamında 22 tane 2(3H)-benzoksazolon ve türevleri üzerinde çalışılarak asitlik sabitleri (pK_a) bulunması hedeflenmiştir. 17 tane 2(3H)-benzoksazolon türevlerinin asitlik sabiti UV-GB spektroskopisi ile tespit edilmiş olup, bu sonuçların doğrulukları potansiyometri ve kapiler elektroforez yöntemleri ile elde edilebilen bazı 2(3H)-benzoksazolon türevlerinin asitlik sabitleri ile karşılaştırılmıştır. Deneysel sonuçlar ışığında her üç yöntem ile elde edilen veriler rapor edilmiştir. Ayrıca 3 tane 2(3H)-benzoksazolon türevinin asitlik sabitlerinin minimum değerleri verilmiştir. Bunların haricinde 2 tane 2(3H)-benzoksazolon türevinin neden pK_a değerine ulaşamadığı açıklanmıştır. Elde edilen verilerden yola çıkarak benzoksazolon ana yapısı üzerinde veya 6-benzoil türevleri üzerindeki elektron çeken grupların, yapıya elektron verici gruplara göre, daha asidik karakterde olduğu gözlenmiştir. Bu noktadan hareketle 5-Klor-2(3H)-benzoksazolon'a göre daha asidik özelliğe sahip Bileşik 15 gibi maddelerin neden daha fazla analjezik aktiflik gösterdiği konusunda yapı-aktivite ilişkisi kurulabileceği sonucuna varılmıştır. Asiditeyi etkileyen grup ister ana yapı üzerinde olsun isterse 6 konumundaki açıl grubu üzerinde olsun elektronların delokalize olmalarına etki etmelerinden dolayı (özellikle elektron çeken grupların) analjezik aktifliğini arttırmış olabileceği düşünülmektedir.

Çalışılan maddelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerle ilgili bilgileri, ilaç aktifliği gösterebilen maddelerin akuatik, karasal ve atmosferik ortamda bulunup bulunamayacağı hakkında bilgi verebilir. Birçok ilaç aktifliği gösterebilen maddelerin asidik ve/veya bazik karakter göstermesinden dolayı, bunların iyonlaşma dereceleri bulundukları ortamın hem pH değeri hem de asitlik sabiti ile saptanabilir. Bu farklı kimyasal yapılar (katyon, anyon veya nötral form) genellikle çok geniş ve farklı özelliklere (sudaki çözünürlükleri, buharlaşabilirlikleri, UV absorpsiyonları, ve kimyasal oksidantlara karşı reaktiflikleri) sahiptirler. İyonize olmuş formları suda iyi çözünürken, nötral formları daha fazla lipofilik olup daha yüksek membran geçirgenliğine sahiptir. Asitlik sabitlerinden, özellikle nötral pH aralığında hangi ana farmasötik formun ortamda bulunacağı önceden öngörülebilir. Dolayısıyla, farmasötik olarak önemli

maddelerin asitlik sabitlerinin bilinmesi önemli bir veridir. Ayrıca ilaç moleküllerinin asit-baz özelliği yeni ilaçların geliştirilmesinde anahtar parametrelerden biridir; çünkü bu özellik çözünürlüğü, absorpsiyonu, dağılımı ve eliminasyonu kontrol etmektedir. Özellikle ilaç adayı bir molekülün vücut içerisinde taşınması sırasında hücre içindeki ve arasındaki geçişler, fizikokimyasal parametrelerin, özellikle pK_a değerlerinin bir fonksiyonudur.

Yapılmış olan bu çalışmada analjezik, anti-inflamatuvar, antifungal ve kas gevşetici gibi pek çok etkiye sahip olan 2(3H)-benzoksazon türevlerinin asitlik sabitleri bulunmuştur. Bu bulguların bilinmesi, hedef madde ile ilaç arasındaki kimyasal etkileşimin iyi anlaşılması açısından önemli bir parametredir. Aynı zamanda yeni ilaç moleküllerinin oluşturulması ve genel özelliklerinin belirlenmesinde de kullanışlıdır. Dolayısıyla, etkili ilaçların geliştirilmesi ve ilaçların etki mekanizmalarının aydınlatılmasında asitlik sabiti anahtar parametre olarak önem taşımaktadır. Ultraviyole spektroskopisi, potansiyometri ve kapiler elektroforez olmak üzere kullanılan üç farklı teknik ile elde edilen pK_a değerleri birbirleri ile karşılaştırılmıştır. Hidrojen iyon konsantrasyonları ve iyonik yük değerleri her pH değeri için sabit tutularak yapılan çalışmalarda, her maddenin tekrarlanabilirlikleri test edilerek hata payı en aza indirilmeye çalışılmıştır.

Bu çalışmada gösterilmeye çalışıldığı gibi fizikokimyasal özelliklerin bilinmesi, yeni moleküllerin modellenilmesi aşamasından başlamak üzere, yeni ilaç moleküllerin sentezlenmesi ve bunlarda aktivitenin olup olamayacağı fikrinin önceden öngörülebilmesi açısından oldukça önemlidir. Asitlik sabitinin önemli parametrelerden biri olmasından dolayı, 2(3H)-benzoksazon ve türevlerinin asitlik sabitleri tayin edilmiştir. Yan etkisi ve üretim maliyeti daha az olması nedeniyle, yeni ilaç moleküllerinin sentezlenmesine neden olacağından ve özellikle analjezik, anti-inflamatuvar, antifungal ve kas gevşetici gibi pek çok etkiye sahip olması nedeniyle 2(3H)-benzoksazon türevlerinin asitlik sabitlerinin tespit edilmesinin oldukça önemli olduğu düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

Aichaoui, H., Poupaert, J.H., Lesieur, D., Henichart, J.P. (1991). Regioselectivity in the C-Acylation of 2(3H)-Benzoxazolones, *Tetrahedron*, 47(33), 6649.

Albert, A., Serjant, E.P. (1984). The Determination of Ionization Constants, Third Edition, Chapman and Hall.

Aries, R. (1970). 3-Acylbenzoxazolinone Derivatives Having Antiinflammatory, Anthirhaumatic, Analgesic, Antipyretic; and Muscular Relaxative Properties, *Fr. Pat.* 1, 593, 066.

Berkem, A.R., Baykut, S., Berkem, M. L. (1994). *Fizikokimya. Cilt 2*, 673. İst. Üniv. Yay. No:3628.

Bonte, J.P, Lesieur, D., Lespagnol, C., Cazin, M. (1974). Acyl-6 benzoxazolinones, *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.* 9 (5), 491.

Botting, R. (2003). COX-1 and COX-3 Inhibitors, *Thrombosis Research*, 110, 269-272.

Cazin, J.C., Cazin, M., Brunet, C. (1978). Proprietes Antihistaminiques du Chlorhydrate de (piperidino-3'propanoyl)-6-methyl-3 benzoxazolinone, *Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther.*, 13(3), 223.

Chen, B., Fengping, L. (1998). Synthesis of Benzoxazolone, *Jingxi Huagong*, 15(1), 43, 1998. *Ref. C. A.*, 128, 243981m.

Close, W.J., Tiffany, B. D., Spielman, M. A. (1949). The Analgesic Activity of Some Benzoxazolone Derivatives, *J. Am. Chem. Soc.*, 71, 1265.

Cotelle, N., Cotelle, P., Lesieur, D. (1989). Acylation of 2,3-Dihydrobenzoxazol-2-one in Two-Steps Method Involving an Acyl Migration, *Synth. Comm.*, 19(18), 3259.

Czerwinska, E., Stefaniak, H., Ziolkowska, A., Komalik, R., Plenkiewicz, J., Eckstein, Z. (1967). Fungicidal activity of N-trichlormethylthio derivatives of cyclic carbamates, *Bull. Acad. Pol. Sci., Ser. Sci. Chim.* 15 (10), 473.

Dannhardt, G., Kiefer, W. (2001). Cyclooxygenase Inhibitors-current Status and Future Prospects, *Eur. J. Med. Chem.*, 36, 109-126.

Erdoğan, H. (1988). Benzoksazolinonların Mannich Bazlarının Analjezik Etkileri Üzerinde Çalışmalar, *FABAD Farm. Bil. Der.*, 13, 319.

Erol, D. D., Sunal, R., Duru, S. (1990). Synthesis and Screening of Analgesic and Anti-inflammatory Activity of 6-Acyl-3-(4-substituted benzoylmethyl)-2(3H)benzoxazolones, *Arzneim. Forsch./ Drug Res.*, 40(4), 478.

Faddeeva, M.I., Baskokov, Y. A. (1972). Herbicidal Derivatives of Hydroxylamine, XXV. New Method of Synthesis of Benzoxazolinones, *Khim. Geterosikl. Soedin*, Sb. 2, Kislordsoderzhashchie Geterotsikly, m318, 1970, Ref. C. A. 76, 140611u.

Foulon, C., Duhal, N., Lacroix-Callens, B., Vaccher, C., Bonte, J.P., Goossens, J.F. (2007). Determination of pKa values of benzoxa-, benzothio-, and benzoselenazolinone derivatives by capillary electrophoresis. Comparison with potentiometric titration and spectrometric data, *Euro. J. Pharm. Sci.*, 31, 165.

Gokhan, N., Erdogan H., Durlu, N.T., Demirdamar, R. (1999). Analgesic activity of acylated 2-benzoxazolinone derivatives, *Il Farmaco.*, 54, 112-115.

Groenvik, E. (1876). 2-Oxo-benzoxazolin, Benzoxazon, 2.Oxy-benzoxazol, *Bull. Soc. Chim. France* 25(2), 178.

Harsanyi, K., Toffler, F. (1965). Cyclization of N-(o-Hydroxyphenyl) Urethans with Alkaline Catalysts to Benzoxazol-2-ones, *Ann. Chim.*, 54(11), 1066, 1964. *Ref. C. A.*, 62, 1179g.

Heise, H., Mees, B. (1973). Benzoxazolones and Benzothiazolones, *Ger. Offen.*, 2, 131, 366 (Cl. C07d), 1973. *Ref. C. A.*, 78, 124576x.

Helmy, A.M. A. J. (1997). *Elektroanal. Chem.*, 420,259.

Kalckhoff, F. A. (1883). Zur Kenntniss der Amidophenole, *Chem. Ber.*, 16,1825.

Koksal, M., Gokhan, N., Kupeli, E., Yesilada, E., Erdogan, H. (2005). Synthesis, Analgesic and Antiinflammatory Properties of Certain 5-/6-Acyl-3-(4-substituted-1-piperazinylmethyl)-2-benzoxazolinones Derivatives, *Arch. Pharm. Chem. Life. Sci.*, 338, 117.

Koksal, M., Kelekci, N. G., Mercanoglu, G. O., Erdogan, H. (2008). Synthesis and Evaluation of Analgesic, Anti-Inflammatory and Antioxidant Activities of New 6-Acyl-3-Alkyl-5-Methyl-2(3H)-Benzoxazolinones, *Arzneimittel-Forschung (Drug Research)* 58(8), 398.

Lespagnol, A., Cannesson, M. L. (1945). Hypnotic Effect of Benzoxazolone Substitutes, *Bull. Soc. Chim.*, 12, 386.

Lespagnol, A., Durbet, M., Mongy, G. (1941). Sur le Pouvoir Hypnotique de la Benzoxazolone, *Comp. Rend. Soc. Biol.* 135, 1255.

Lespagnol, A., Mercier, J., Lespagnol, C. (1944). Etude de la benzoxazolinone et de certains de ses derives, *Comp. Rend. Soc. Biol. Lille*, 138, 529.

Lespagnol, A., Warembourg, H., Lespagnol, C., Butaeye, P. (1961). Considerations relatives a la benzoxazolone, *Lille Medical* 6 (8).

Lespagnol, A., Vincent, M., Lespagnol, C. (1953). Etude de la benzoxazolone et de certains de ses derives, Bull. Soc. Pharm. Lille 35 (1).

Lespagnol, C., Cazin, M., Cazin, J.C., Lesieur, D., Dupont, C. (1967). Analgesic Activity of Benzoxazolinone Derivatives, Chem. Ther. 2(5), 347.

Lespagnol, C., Lesieur, D., Cazin, J.C., Cazin, M., Brunet, C. (1976). Etude chimique et Pharmacodynamique de β -Amino-cetones de Structure Benzoxazolinonique, Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther., 11(1), 33.

Macdonald, S.F., Chechak, A.J. (1945.). A Note on The Preparation of Benzoxazolone and 2,8-dihydroxynaphth [1,2] oxazole, Can. J. Research, 26B, 432, 1948. Ref. C. A. 42, 6807d.

Maleski, R.J., Osborne, C. E., Cline, S. M. (1991). A Simple Synthesis of 2(3H)-Benzoxazolones Using Phenyl Chloroformate, J. Heterocyclic Chem., 28(8), 1937.

Mercier, F., Etzensperger, P. (1954). Potentialisation par la Sparteine de l'Activite Analgesique Experimentale, Comp. Rend. Soc. Biol., 148, 1431.

Nakena, M., Kokura, T., Ho, F. (1990). Preparation of Benzoxazolinones as Antiallergy and Antiinflammatory Agents, Eur. Patent 360.566 (Cl.C07D263/58), 28 Mar, 1990. Ref. C. A., 113, 132163s.

Noda, T. (1956). Fundamental studies on chemotherapy of tuberculosis catalase inhibitory effect of amino-phenol and its derivatives, Jap. J., Tuberculosis, 4 (1), 11.

Palaska, E., Ünlü, S., Özkanlı, F., Pilli, G., Erdoğan, H., Şafak, C., Demirdamar, R., Gümüşel, B. (1995). 3-Substituted Piperazinomethyl Benzoxazolinones: Analgesic and Antiinflammatory Compounds Inhibiting Prostaglandin E2, Arzneim. Forsch./Drug Res., 45 (1), 693.

Perrin, D.D., Dempsey, B., Serjeant, E.P. (1981). pKa Prediction for Organic Acids and Bases, Chapman and Hall.

Petrucci, R.H., Harwood, W.S., Herring, F.G., Genel Kimya 1-2, İlkeler ve Modern Uygulamalar (Uyar, T., Aksoy, S., Çev.). Ankara: Palme Yayıncılık (2002).

Poupaert, J.H., Carato, E. (2005). 2(3H)-benzoxazolone and bioisosters as “privileged scaffold” in the design of pharmacological probes, Curr. Med. Chem., 12, 877.

Rajendra, S.V., Nobles, W.L. (1968). Synthesis and antibacterial activity of certain 3-substituted benzoxazolinones, J. Pharm. Sci. 57 (1), 39.

Renard, P., Lesieur, D., Lespagnol, C., Cazin, M., Brunet, C., Cazin, J.C. (1980). 6-acylbenzoxazolinones and 6-Acyl-2-oxo-3-benzoxazolinyl Alconic acids. Chemical and Pharmacological Study, Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther., 5(5), 453.

Sam, J., Plampin, J.N. (1964). Benzoxazoles, Potent skeletal muscle relaxants, J. Pharm. Sci. 53 (5), 538.

Sam, J., Plampin, J.N., Pods, G.I. (1958). Methylated 2-amino-5-kloro-benzoxazoles, J. Org. Chem. 23, 1500.

Sam, J., Valentine, J. L. (1969). Preparation and Properties of Benzoxazolinones, J. Pharm. Sci., 58(9), 1043.

Schnitzer, T.J. (2001). Cyclooxygenase-2-specific Inhibitors, Are They Safe?, The American Journal of Medicine, 110 (1), 46-49.

Seidel, P. (1890). Ueber die Benzoxazolones, J. Pr. Chem., 42(2), 455.

Shumard, R., S. (1959). : "Antiseptic Soap Composition", U. S., 2, 795, 554, (1957), Ref. CA.,13116e.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., Enstrümental Analiz İlkeleri (Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H., Çev.). Ankara: Bilim Yayıncılık (1998).

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Analitik Kimya Temelleri (Kılıç, E., Köseoğlu, F., Çev.). Ankara: Bilim Yayıncılık (1996).

Toyoshima, A., Morishita, C. (1968). Fungicidal and bactericidal benzoxazolinones, Jap. Pat. 6, 823, 624.

Tacquet, A., Lespangol, C., Beerens, H., Lesieur, D., Devulder, B. (1971). Antimicrobial activity of benzoxazolinones derivatives, Ann. Int. Pasteur Lille 22, 189.

Uçar, H., Van Derpoorten, K., Kanyonyo, M., Isa, M., Lambert, D., Lesieur, D., Poupaert, J. (1996). Synthesis of 6-Benzoyl-2(3H)-benzoxazolone and 6-Benzoyl-2(3H)-benzothiazolones, Bull. Soc. Chim. Belg., 105(12), 773-776.

Uçar, H., Derpoorten, K.V., Depovere, P., Lesieur, D., Isa, M., Masereel, B., Delarge, J., Poupaert, J.H. (1998). Fries Like Rearrangement, a Novel And Efficient Method for Synthesis of 6-Acyl-2(3H)-benzoxazolones and 6-Acyl-2(3H)-benzothiazolones, Tetrahedron, 54, 1763-1772.

Virtanen, A.I., Hietala, P.K. (1955). An antifungi factor in iye seedlings, Suomen Kemistil. 28B (11), 165.

Virtanen, A. I., Hietala, P.K., Wahlroos, O. (1956). An Antifungal Factor in Maize and Wheat Plants, Suomen Kemistil. 29 B, 143, (7-8) 171.

Yamahara, T., Takamatsu, H. (1973). Benzoxazolinones, Jpn. Kokai 73 34,875 (Cl.16 E34). 22 May 1973. Ref: C. A. 79, 66345d.

Yous, S., Poupaert, J. H., Lesieur, I., Depreux, P., Lesieur, D. (1994). AlCl_3 -DMF Reagent in the Friedel-Crafts Reaction. Application to the Acylation Reaction of 2(3H)-Benzothiazolones, *J. Org. Chem.*, 59, 1574.

Zinner, H., Herbig, H. (1955). Benzazoles. I. The Lactam-Lactim Tautomerism of Benzoxazolinone, *Chem. Ber.*, 88, 693-697.

EKLER**EK 1**

**İKİDEN ÇOK GRUP OLDUĞUNDA VARYANSLARIN HOMOJENLİK TESTİ
(BARTLETT TESTİ)**

Gruplardaki Denek Sayıları Eşit Olduğunda Test İşlemleri:

BİLEŞİK	UV	POT.	CZE
1.	9.01	8.98	8.97
5.	8.92	8.97	8.82
15.	7.35	7.29	7.23
$\sum X_j$	25.28	25.24	25.02
$\sum X_j^2$	214.77	214.24	210.52
N_j	3	3	3

Yöntem	S_j^2	$\ln S_j^2$	n_j
UV	0.87	-0.139	3
POT.	0.94	-0.06	3
CZE	0.93	-0.07	3
TOPLAM	2.74	-0.269	

Serbestlik Derecesi : 2

$\alpha = 0.05$ düzeyinde ve 2 serbestlik derecesindeki tablo χ^2 (ki-kare) değeri 5.991'dir.

Bulunan χ^2 değeri = -0.002

(H_0 = varyanslar homojendir)

H_0 hipotezi kabul edilir.

KARAR : $\chi^2 = -0.002$, $p > 0.05$

EK 2**WILCOXON EŞLEŞTİRİLMİŞ İKİ ÖRNEK TESTİ**

BİLEŞİK	UV	POT.	CZE	FARK	SIRA NO	İŞARETLİ SIRA NO
2.	8.26	-	8.25	0.01	1	1
6.	7.86	7.78	-	0.08	5.5	5.5
7.	7.70	7.81	-	-0.11	8	-8
8.	7.40	7.32	-	0.08	5.5	5.5
9.	7.65	7.61	-	0.04	2.5	2.5
10.	7.70	-	7.40	0.3	10	10
11.	7.35	-	7.23	0.12	9	9
12.	7.45	7.36	-	0.09	7	7
13.	7.61	7.54	-	0.07	4	4
17.	8.15	8.11	-	0.04	2.5	2.5

Fark: 0.01 0.04 0.04 0.07 0.08 0.08 0.09 0.11 0.12 0.3

Sıra No: 1 2.5 2.5 4 5.5 5.5 7 8 9 10

T=8

$\alpha=0.05$ düzeyinde ve n=10'daki tablo T değeri=8

(H_0 =iki eş arasında anlamlı fark yoktur.)

Yanılma olasılığı $\alpha=0.05$

H_0 hipotezi kabul edilir.

KARAR: T=8, p=0.05

TEZDEN YAPILAN SÖZLÜ SUNUMLAR

Hayati Celik, Seniha Arsal, **Mahmure Büyükağa**, Melek Sirin Baymak, Meriç Köksal, Erhan Palaska "Determination of acid dissociation constant values of some benzoxazolinone derivatives" (Abstract # OP-12) 9th International Symposium on Pharmaceutical Sciences (ISOPS-9) in Ankara, Turkey, June 23-26, **2009**.

Hayati Celik, **Mahmure Büyükağa**, Meriç Köksal, Nesrin Gokhan Kelekçi, Melek Sirin Baymak, ‘Spectrophotometric, Potentiometric and Capillary Electrophoresis Acid Dissociation Constant Values of Some Benzoxazolinone Derivatives in Buffered Solution’, (OP-40) 4th International Meeting on Medicinal and Pharmaceutical Chemistry and 6th International Symposium on Pharmaceutical Chemistry Joint Meeting in Ankara, Turkey, September 30 – October 2, **2010**.