

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI SÜLFONAMİTLERİN SIVI KROMATOĞRAFI
YÖNTEMİ İLE TAYİNİ**

NURULLAH ŞANLI

Danışman: Prof. Dr. Güleren ALSANCAK

II. Danışman: Prof. Dr. Adil DENİZLİ

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİMDALI
ISPARTA – 2007**

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vi
TEŞEKKÜR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	xii
KISALTMALAR	xiii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Sülfonamitler.....	2
1.2. Sülfonamitlerin Kimyasal Yapıları.....	3
1.3. Sülfonamitlerin İyonlaşma Sabitleri	4
1.3.1. Sülfonamitlerin SPARC Programı ile Hesaplanan İyonlaşma Sabitleri.....	7
1.3.1.1. Sülfodiazinin İyonlaşma Sabitleri.....	7
1.3.1.2. Sülfotiazolün İyonlaşma Sabitleri.....	8
1.3.1.3. Sülfomerazinin İyonlaşma Sabitleri.....	9
1.3.1.4. Sülfometazinin İyonlaşma Sabitleri.....	12
1.3.1.5. Sülfomonometoksinin İyonlaşma Sabitleri.....	13
1.3.1.6. Sülfodoksinin İyonlaşma Sabitleri.....	14
1.3.1.7. Sülfometksazolün İyonlaşma Sabitleri.....	15
1.3.1.8. Sülfonamitlerin Türev Eğrileri.....	17
1.4. Etki Mekanizmaları.....	21
1.5. Farmakolojisi	22
1.6. Potansiyometrik Analiz Yöntemleri.....	23
1.6.1. Cam Elektrot.....	23
1.6.2. Potansiyometrik Titrasyon.....	24
1.7. Su-Organik Çözücü Karışımlarında pK _a Tayini.....	25
1.7.1. Potansiyometrik Yöntemle İyonlaşma Sabiti Tayini.....	25
1.7.2. Spektroskopik Yöntemler.....	26
1.7.3. Sıvı Kromatografik Yöntemler.....	28
1.7.4. Elektroforetik Yöntemler.....	28

1.8. İyonlaşma Sabitlerin Tayininde Kullanılan Bağıntılar.....	29
1.8.1. Kuvvetli Monoprotik Asitler için Gran Eşitlikleri.....	29
1.8.2. Zayıf Monoprotik Asitler için Gran Eşitlikleri.....	32
1.8.3. Gran Metodu Kullanılarak Karbonat Hatasının Hesaplanması.....	35
1.8.4. Kromatografide Horvath – Melander – Molnar Bağıntıları.....	36
1.8.5. Kromatografide Temel Kavramlar.....	40
1.8.6. Kromatografide Mobil Faz Optimizasyonu	42
1.8.7. Mobil Fazda pH Standardizasyonu.....	46
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	49
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	59
3.1. Genel Bilgi	59
3.2. Kullanılan Cihazlar.....	59
3.2.1. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi Cihazı.....	59
3.2.2. pH / İyon Metre.....	59
3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	59
3.4. Kullanılan Çözeltiler.....	61
3.4.1. Potansiyometrik Titrasyonlar.....	61
3.4.1.1. %50 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı	61
3.4.1.2. İyonik Şiddet Ayarlayıcı.....	62
3.4.1.3. Hücre Kalibrasyon Çözeltisi.....	62
3.4.1.4. Asit Çözeltisi.....	62
3.4.1.5. Baz Çözeltisi.....	62
3.4.1.6. Sülfonamidlerin Çözeltileri.....	62
3.4.2. Kromatografik Çalışmalar.....	63
3.4.2.1. Sülfonamidlerin HPLC Ayırımında Kullanılan Çözeltileri.....	63
3.4.2.2. Sülfonamid Karışımı.....	63
3.4.2.3. %25 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı, pH 4,50.....	63
3.4.2.4. %20 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı, pH 4,50.....	63
3.4.2.5. %16 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı, pH 4,50.....	64
3.4.2.6. Sülfonamidlerin pK _a Tayininde Kullanılan Çözeltileri.....	64
3.4.2.7. %50 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı.....	64
3.4.2.8. %40 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı.....	64

3.4.2.9. %30 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı.....	64
3.4.2.10. Potasyum Bromür Çözeltisi.....	65
3.4.2.11. Potasyum Hidrojen Fitalat Çözeltisi.....	65
3.5. Yöntem.....	65
3.5.1. Potansiyometrik Titrasyonlar.....	65
3.5.2. Sıvı Kromatografik Yöntemle Çalışmalar.....	66
3.5.3. LC-DAD Yöntemiyle Çalışmalar.....	67
3.5.4. Sıvı Kromatografik Ayırmanın Optimizasyonu.....	67
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	68
4.1. Potansiyometrik Yöntemle İyonlaşma Sabitlerinin Tayini.....	68
4.1.1. Sülfodiazinin % 50 (v/v) Asetonitril – Su ikili Karışımındaki Potansiyometrik Titrasyon Grafikleri.....	68
4.1.2. Sülfotiazolün % 50 (v/v) Asetonitril – Su İkili Karışımındaki Potansiyometrik Titrasyon Grafikleri.....	70
4.1.3. Sülfomerazinin % 50 (v/v) Asetonitril – Su İkili Karışımındaki Potansiyometrik Titrasyon Grafikleri.....	72
4.1.4. Sülfometazinin % 50 (v/v) Asetonitril – Su ikili Karışımındaki Potansiyometrik Titrasyon Grafikleri.....	74
4.1.5. Sülfodoksinin % 50 (v/v) Asetonitril – Su ikili Karışımındaki Potansiyometrik Titrasyon Grafikleri.....	77
4.1.6. Sülfamonometoksinin % 50 (v/v) Asetonitril – Su ikili Karışımındaki Potansiyometrik Titrasyon Grafikleri.....	79
4.1.7. Sülfometaksazolün % 50 (v/v) Asetonitril – Su ikili Karışımındaki Potansiyometrik Titrasyon Grafikler	82
4.2. LC-DAD Yöntemi.....	84
4.2.1. Sülfonamitlerin % 50 (v/v) Asetonitril – Su ikili Karışımında LC-DAD Yöntemi ile Elde Edilen Spektrumları.....	84
4.2.2. Sülfonamitlerin % 40 (v/v) Asetonitril – Su ikili Karışımında LC-DAD Yöntemi ile Elde Edilen Spektrumları.....	88
4.2.3. Sülfonamitlerin % 50 (v/v) Asetonitril – Su ikili Karışımında LC-DAD Yöntemi ile Elde Edilen Spektrumları.....	92
4.3. Sıvı Kromatografi Yöntemi.....	96

4.3.1. Sülfonamitlerin % 30 (v/v) Asetonitril – Su ikili Karışımında LC Yöntemi ile Elde Edilen t_R - pH Grafikleri.....	96
4.3.2. Sülfonamitlerin % 40 (v/v) Asetonitril – Su ikili Karışımında LC Yöntemi ile Elde Edilen t_R - pH Grafikleri.....	97
4.3.3. Sülfonamitlerin % 50 (v/v) Asetonitril – Su ikili Karışımında LC Yöntemi ile Elde Edilen t_R - pH Grafikleri.....	98
4.4. Kromatografik Ayırmanın Optimizasyonu.....	99
5. SONUÇ.....	103
5.1. Sülfonamitlerin İyonlaşma Sabitlerinin Potansiyometrik Yöntemle Tayini.....	103
5.2. Sülfonamitlerin İyonlaşma Sabitlerinin LC-DAD Yöntemiyle Tayini.....	105
5.3. Sülfonamitlerin İyonlaşma Sabitlerinin Sıvı Kromatografik Yöntemle Tayini.....	105
5.4. Sülfonamitlerin Sıvı Kromatografik Yöntemle Ayrılması.....	106
6. KAYNAKLAR.....	113
ÖZGEÇMİŞ.....	124

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI SÜLFONAMİTLERİN SIVI KROMATOĞRAFI YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

Nurullah ŞANLI

Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Jüri: Prof. Dr. Güleren ALSANCAK (Danışman)
Prof. Dr. Adil DENİZLİ
Prof. Dr. Mustafa CENGİZ
Doç. Dr. Yücel ŞAHİN
Doç.Dr. Zeynep SEYDİM
Yrd. Doç. Dr. A. Hakan AKTAŞ
Yrd. Doç. Dr. Fatma KARİPCİN

pK_a değerlerinin asetonitril – su ikili karışımlarında doğru olarak bilinmesi, bu çözücü karışımını kullanan sıvı kromatografi ve kapiler elektroforez gibi ayırma yöntemleri için çok önemlidir. Bu tezde, 7 adet sülfonamitin (sülfodiazin, sülfatiazol, sülfamerazin, sülfametazin, sülfadoksin, sülfamonometoksin sülfametaksazol) pK_a değerleri, % 50 (v/v) asetonitril - su ikili karışımında potansiyometrik, % 50- %40- %30 (v/v) asetonitril - su ikili karışımlarında sıvı kromatografik (LC) ve LC-DAD yöntemleri ile tayin edilmiştir. Deneysel olarak hesaplanan pK_a değerleri, SPARC on-line programı ile hesaplanan pK_a değerleriyle karşılaştırılmıştır. Optimum ayırma koşulu, pH ve organik modifiyer derişiminin etkisi dikkate alınarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ayırma sabitleri, Sülfonamitler, Asetonitril-su karışımları, Sıvı kromatografisi (LC), LC-DAD

2007, 125 sayfa

ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DETERMINATION OF SOME SULFONAMIDES BY LIQUID CHROMATOGRAPHIC TECHNIQUE

Nurullah ŞANLI

Süleyman Demirel University Graduate School of Applied and Natural Sciences

Department of Chemistry

Thesis Committee: Prof. Dr. Güleren ALSANCAK (Supervisor)
Prof. Dr. Adil DENİZLİ
Prof. Dr. Mustafa CENGİZ
Assoc. Prof. Yücel ŞAHİN
Assoc. Prof. Zeynep SEYDİM
Asst. Prof. A. Hakan AKTAŞ
Asst. Prof. Fatma KARİPCİN

An accurate estimation of pK_a values in acetonitrile–water binary mixtures is very important for several separation techniques such as liquid chromatography and capillary electrophoresis that use these solvent mixtures. In this study, the pK_a values of 7 sulphonamides (sulfodiazine, sulfothiazole, sulfomerazine, sulfomethazine, sulfodoxine, sulfomonomethoxine, sulfomethoxazole) have been determined in acetonitrile - water binary mixture (50% (v/v)) by potentiometry and also 30%, 40% and 50% (v/v) liquid chromatography (LC) and LC-DAD methodology. The pK_a values obtained by experimentally have been compared with the values predicted by the SPARC on-line pK_a calculator. The optimum separation condition has been predicted by using the effect of pH and organic modifier concentration.

Key Words: Dissociation constants; Sulfonamides; Acetonitrile–water mixtures; Liquid chromatography (LC), LC-DAD

2007, 125 pages

TEŞEKKÜR

Bu tez için çalışmalarımı yönlendiren, zorlukları bilgi, öneri ve tecrübesi ile aşmada yardımcı olan değerli Danışman Hocam sayın Prof. Dr. Güleren ALSANCAK'a ve laboratuvar imkânlarından ve bilgisinden yararlandığım eş danışmanım sayın Prof. Dr. Adil DENİZLİ'ye; değerli görüşleri ile yönlendiren Tez İzleme Komitesindeki hocalarım Prof. Dr. Mustafa CENGİZ ve Doç. Dr. Yücel ŞAHİN'e; deneysel çalışmalarımda yardımlarını ve desteğini esirgemeyen Yrd. Doç. Dr. Zerrin ERDEMGİL ve BİBAM müdürü sayın Prof. Dr. Rıdvan SAY'a katkılarından dolayı şükranlarımı sunarım.

0962-D-04 No'lu Doktora Tez Projesi ile çalışmamı maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi'ne teşekkür ederim.

Tez çalışmalarımda, deneysel çalışmalarda ve hayatımda bana sonuna kadar destek olan hayat arkadaşım Senem'e; bugünlere kadar gelmemi sağlayan aileme teşekkür etmeyi borç bilirim.

Nurullah ŞANLI
ISPARTA, 2007

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Prontosil ve sülfonilamitin yapısı.....	3
Şekil 1.2. Sülfonamitlerin genel yapısı.....	4
Şekil 1.3. Sülfonamit grubu bileşiklerin iyonlaşma dengeleri.....	5
Şekil 1.4. Primer, sekonder ve tersiyer sülfonamitlerin genel gösterimleri.....	5
Şekil 1.5. Sülfonamitlerin bir bazla etkileşmesinde oluşan iyonun rezonans sınır formülleri.....	6
Şekil 1.6. Protonlanmış sülfodiazinin iyonlaşma davranışı.....	7
Şekil 1.7. Sülfodiazinin pK_{a2} ile ilgili iyonlaşma aşaması.....	8
Şekil 1.8. Protonlanmış sülfotiazolün iyonlaşma davranışı.....	9
Şekil 1.9. Sülfotiazolün pK_{a2} ile ilgili iyonlaşma aşaması.....	9
Şekil 1.10. Protonlanmış sülfomerazinin iyonlaşma davranışı.....	10
Şekil 1.11. Sülfomerazinin pK_{a2} ile ilgili iyonlaşma aşaması.....	11
Şekil 1.12. Protonlanmış sülfometazinin iyonlaşma davranışı.....	12
Şekil 1.13. Sülfometazinin pK_{a2} ile ilgili iyonlaşma aşaması.....	13
Şekil 1.14. Protonlanmış sülfomonometoksinin iyonlaşma davranışı.....	13
Şekil 1.15. Sülfomonometoksinin pK_{a2} ile ilgili iyonlaşma aşaması.....	14
Şekil 1.16. Protonlanmış sülfodoksinin iyonlaşma davranışı.....	14
Şekil 1.17. Sülfodoksinin pK_{a2} ile ilgili iyonlaşma aşaması.....	15
Şekil 1.18. Protonlanmış sülfometaksazolün iyonlaşma davranışı.....	16
Şekil 1.19. Sülfometaksazolün pK_{a2} ile ilgili iyonlaşma aşaması.....	16
Şekil 1.20. Sülfodiazin için α - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi	17
Şekil 1.21. Sülfotiazol için α - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi	18
Şekil 1.22. Sülfomerazin için α - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi.....	18
Şekil 1.23. Sülfometazin için α - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi.....	19
Şekil 1.24. Sülfomonometoksin için α - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi.....	19
Şekil 1.25. Sülfodoksin için α - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi.....	20
Şekil 1.26. Sülfometaksazol için α - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi.....	20
Şekil 1.27. Sülfonamit ve PABA'nın kimyasal yapıları.....	21
Şekil 1.28. Kombine cam pH elektrodu.....	24
Şekil 1.29. Spektroskopik bir çalışmada (a) $A - \lambda/nm$ ve (b) log absorbans farkı - pH grafikleri (A' : moleküler türün absorbansı; A'' : iyonik türün absorbansı).....	27
Şekil 1.30. Zayıf asidik bileşiklerde k-pH arasındaki ilişki.....	38
Şekil 1.31. Zayıf bazik bileşiklerde k-pH arasındaki ilişki.....	39
Şekil 1.32. Amfoterik bileşiklerde k-pH arasındaki ilişki.....	39
Şekil 1.33. ET-30 molekülü; a) temel halde b) uyarılmış formda.....	44
Şekil 2.1. Türevlendirme tepkimesi.....	50
Şekil 2.2. Sülfonamitlerin elektroforetik mobilite pH ilişkileri.....	56
Şekil 2.3. Çalışılan sülfonamitlerin elektroferogramı.....	56
Şekil 2.4. Sülfokloropridazinin titrasyon eğrisi.....	57
Şekil 4.1. Sülfodiazinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki potansiyometrik titrasyon grafiği, ϕ - pH.....	69
Şekil 4.2. Sülfodiazinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki Gran grafiği, 1. eşdeğerlik öncesi.....	69

Şekil 4.3. Sülfodiazinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki PKPOT programı ile elde edilen titrasyon grafiği.....	70
Şekil 4.4. Sülfotiazolün %50 (v/v) ACN-su ortamındaki potansiyometrik titrasyon grafiği, ϕ - pH.....	71
Şekil 4.5. Sülfotiazolün %50 (v/v) ACN-su ortamındaki Gran grafiği, 1. eşdeğerlik öncesi.....	71
Şekil 4.6. Sülfotiazolün %50 (v/v) ACN-su ortamındaki PKPOT programı ile elde edilen titrasyon grafiği.....	72
Şekil 4.7. Sülfomerazinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki potansiyometrik titrasyon grafiği, ϕ - pH.....	73
Şekil 4.8. Sülfomerazinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki Gran grafiği, 1. eşdeğerlik öncesi.....	74
Şekil 4.9. Sülfomerazinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki PKPOT programı ile elde edilen titrasyon grafiği.....	74
Şekil 4.10. Sülfometazinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki potansiyometrik titrasyon grafiği, ϕ - pH	75
Şekil 4.11. Sülfometazinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki Gran grafiği, 1. eşdeğerlik öncesi.....	76
Şekil 4.12. Sülfometazinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki PKPOT programı ile elde edilen titrasyon grafiği.....	76
Şekil 4.13. Sülfodoksinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki potansiyometrik titrasyon grafiği, ϕ - pH.....	78
Şekil 4.14. Sülfodoksinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki Gran grafiği, 1. eşdeğerlik öncesi.....	78
Şekil 4.15. Sülfodoksinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki PKPOT programı ile elde edilen titrasyon grafiği.....	79
Şekil 4.16. Sülfomonometoksinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki potansiyometrik titrasyon grafiği, ϕ - pH.....	80
Şekil 4.17. Sülfomonometoksinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki Gran grafiği, 1. eşdeğerlik öncesi.....	81
Şekil 4.18. Sülfomonometoksinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki PKPOT programı ile elde edilen titrasyon grafiği.....	81
Şekil 4.19. Sülfometaksazolün %50 (v/v) ACN-su ortamındaki potansiyometrik titrasyon grafiği, ϕ - pH.....	83
Şekil 4.20. Sülfometaksazolün %50 (v/v) ACN-su ortamındaki Gran grafiği, 1. eşdeğerlik öncesi.....	83
Şekil 4.21. Sülfometaksazolün %50 (v/v) ACN-su ortamındaki PKPOT programı ile elde edilen titrasyon grafiği.....	83
Şekil 4.22. Sülfodiazinin %50 ACN-H ₂ O ortamında elde edilen DAD spektrumu.....	84
Şekil 4.23. Sülfotiazolün %50 ACN-H ₂ O ortamında elde edilen DAD spektrumu.....	85
Şekil 4.24. Sülfomerazinin %50 ACN- H ₂ O ortamında elde edilen DAD spektrumu	85
Şekil 4.25. Sülfometazinin %50 ACN-H ₂ O ortamında elde edilen DAD spektrumu.....	86
Şekil 4.26. Sülfomonometoksinin %50 ACN-H ₂ O ortamında elde edilen DAD spektrumu.....	86

Şekil 4.27. Sülfodoksinin %50 ACN-H ₂ O ortamında elde edilen DAD spektrumu.....	87
Şekil 4.28. Sülfometaksazolün %50 ACN-H ₂ O ortamında elde edilen DAD spektrumu.....	87
Şekil 4.29. Sülfodiazinin %40 ACN-H ₂ O ortamında elde edilen DAD spektrumu.....	88
Şekil 4.30. Sülfotiazolün %40 ACN-H ₂ O ortamında elde edilen DAD spektrumu.....	89
Şekil 4.31. Sülfomerazinin %40 ACN-H ₂ O ortamında elde edilen DAD spektrumu.....	89
Şekil 4.32. Sülfometazinin %40 ACN-H ₂ O ortamında elde edilen DAD spektrumu.....	90
Şekil 4.33. Sülfomonometoksinin %40 ACN-H ₂ O ortamında elde edilen DAD spektrumu.....	90
Şekil 4.34. Sülfodoksinin %40 ACN-H ₂ O ortamında elde edilen DAD spektrumu.....	91
Şekil 4.35. Sülfometaksazolün %40 ACN-H ₂ O ortamında elde edilen DAD spektrumu.....	91
Şekil 4.36. Sülfodiazinin %30 ACN-H ₂ O ortamında elde edilen DAD spektrumu.....	92
Şekil 4.37. Sülfotiazolün %30 ACN-H ₂ O ortamında elde edilen DAD spektrumu.....	93
Şekil 4.38. Sülfomerazinin %30 ACN-H ₂ O ortamında elde edilen DAD spektrumu.....	93
Şekil 4.39. Sülfometazinin %30 ACN-H ₂ O ortamında elde edilen DAD spektrumu.....	94
Şekil 4.40. Sülfomonometoksinin %30 ACN-H ₂ O ortamında elde edilen DAD spektrumu.....	94
Şekil 4.41. Sülfodoksinin %30 ACN-H ₂ O ortamında elde edilen DAD spektrumu.....	95
Şekil 4.42. Sülfometaksazolün %30 ACN-H ₂ O ortamında elde edilen DAD spektrumu.....	95
Şekil 4.43. Çalışılan sülfonamitlerin % 30 ACN-H ₂ O ortamında pH 1,7-4,5 aralığında t _R -pH ilişkisi.....	96
Şekil 4.44. Çalışılan sülfonamitlerin % 30 ACN-H ₂ O ortamında pH 4,5-9,0 aralığında t _R -pH ilişkisi.....	97
Şekil 4.45. Çalışılan sülfonamitlerin % 40 ACN-H ₂ O ortamında pH 1,7-4,6 aralığında t _R -pH ilişkisi.....	97
Şekil 4.46. Çalışılan sülfonamitlerin % 30 ACN-H ₂ O ortamında pH 5,0-9,5 aralığında t _R -pH ilişkisi.....	98
Şekil 4.47. %25(v/v) ACN-H ₂ O ortamında çalışılan sülfonamitlere ait kromatogram.....	100
Şekil 4.48. %20 (v/v) ACN-H ₂ O ortamında çalışılan sülfonamitlere ait kromatogram.....	101
Şekil 4.49. %16 (v/v) ACN-H ₂ O ortamında çalışılan sülfonamitlere ait kromatogram.....	102
Şekil 4.50. %16, %20 ve %25 (v/v) ACN-H ₂ O ortamında çalışılan sülfonamitlere ait α değerleri	102

Şekil 5.1. Sülfonamitlerin k - %ACN arasındaki ilişki.....	107
Şekil 5.2. Çalışılan sülfonamitlere ait $\log k - E_T^N$ grafiği.....	108
Şekil 5.3. $(\alpha-1)/\alpha'$ nın α ile değişimi.....	109
Şekil 5.4. $k/(1+k)$ nın k ile değişimi.....	109
Şekil 5.5. %16 (v/v) ACN-H ₂ O ortamında 1,2 mL/dakika akış hızında çalışılan sülfonamitlere ait kromatogram.....	112

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1. Sıvı kromatografide sıklıkla kullanılan çözücüler ve özellikleri.....	43
Çizelge 1.2. Asetonitril-su karışımları için solvatokromik parametreler.....	45
Çizelge 1.3. Asetonitril-su karışımında 0,05 m KHPH için pH _s değerleri.....	47
Çizelge 2.1. Sülfonamitlerin oktanol-su dağılma katsayıları ve pK _{a1,g} ve pK _{a2,g} değerleri.....	53
Çizelge 2.2. Sülfonamitlerin kapiler elektroforez yöntemiyle belirlenen pK _{a2} değerleri (Lin vd., 1997a).....	55
Çizelge 2.3. Sülfonamitlerin kapiler elektroforez yöntemiyle belirlenen pK _a değerleri (Lin vd., 1997c).....	55
Çizelge 3.1. Çalışılan sülfonamitler ve özellikleri.....	60
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	61
Çizelge 4.1. Sülfodiazinin % 50 (v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometrik titrasyon verileri.....	68
Çizelge 4.2. Sülfotiazolün % 50 (v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometrik titrasyon verileri.....	70
Çizelge 4.3. Sülfomerazinin % 50 (v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometrik titrasyon verileri.....	73
Çizelge 4.4. Sülfometazinin % 50 (v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometrik titrasyon verileri.....	75
Çizelge 4.5. Sülfodoksinin % 50 (v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometrik titrasyon verileri.....	77
Çizelge 4.6. Sülfomonometoksinin % 50 (v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometrik titrasyon verileri.....	80
Çizelge 4.7. Sülfometaksazolün % 50 (v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometrik titrasyon verileri.....	82
Çizelge 4.8. Sülfonamitlerin % 25 (v/v) ACN-H ₂ O ortamı için kromatografik verileri.....	99
Çizelge 4.9. Sülfonamitlerin % 20 (v/v) ACN-H ₂ O ortamı için kromatografik verileri.....	100
Çizelge 4.10. Sülfonamitlerin % 16 (v/v) ACN-H ₂ O ortamı için kromatografik verileri.....	101
Çizelge 5.1. Sülfodiazinin potansiyometrik yöntemle belirlenen pK _a değerleri.....	103
Çizelge 5.2. Sülfotiazolün potansiyometrik yöntemle belirlenen pK _a değerleri.....	103
Çizelge 5.3. Sülfomerazinin potansiyometrik yöntemle belirlenen pK _a değerleri.....	104
Çizelge 5.4. Sülfometazinin potansiyometrik yöntemle belirlenen pK _a değerleri.....	104
Çizelge 5.5. Sülfomonometoksinin potansiyometrik yöntemle belirlenen pK _a değerleri.....	104
Çizelge 5.6. Sülfodoksinin potansiyometrik yöntemle belirlenen pK _a değerleri.....	104
Çizelge 5.7. Sülfometaksazolün potansiyometrik yöntemle belirlenen pK _a değerleri	105
Çizelge 5.8. Sülfonamitlerin LC-DAD yöntemiyle belirlenen pK _{a1} ve pK _{a2} değerleri.....	105

Çizelge 5.9. Sülfonamidlerin LC yöntemiyle belirlenen pK_a değerleri.....	106
Çizelge 5.10. Kapasite faktörünün organik modifiyerin yüzdesi ile değişim denklemleri.....	107
Çizelge 5.11. Çalışılan sülfonamidlerde polarite parametresinin log k üzerine etkisi.....	108
Çizelge 5.12. Sülfonamidlerin çalışılan ortamlarda seçicilik ve alıkonma parametreleri	110
Çizelge 5.13. Sülfonamidlerin %16 (v/v) ACN-H ₂ O ortamı için etkinlik, seçicilik, alıkonma ve ayırma gücü verileri	111
Çizelge 5.14. Sülfonamidlerin %16 (v/v) ACN-H ₂ O ortamı için 1,2 mL/dakika hızda kromatografik verileri.....	111

KISALTMALAR DİZİNİ

HPLC Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi

RPLC Ters Faz Sıvı Kromatografisi

DAD Diode Array Dedektör

E_T^N Reichardt çözücü polarite parametresi

IUPAC “International Union of Pure and Applied Chemistry”

CE Kapiler elektroforez

ODS Oktadesilsilika

SDS Sodyumdodesil sülfat

SPARC “Performs Automated Reasoning in Chemistry”

STAR “Stability Constant by Absorbance Readings”

PABA p-aminobenzoik asit

α Bağlı derişim

ϕ Nötralizasyon kesri

PKPOT Potansiyometrik pK_a

1. GİRİŞ

Sülfonamidler, yapılarında benzen halkası, amin grubu ve sülfonamid grubu bulunduran antibakteriyel ilaçlardır. Gerek insan sağlığı ve gerekse veterinerlik uygulamalarında yaygın şekilde kullanılmaktadırlar. Hayvansal gıdalarda kalıntılarının tayini günümüzde sağlık açısından önem arz etmektedir. Bu amaçla sıvı kromatografik ve kapiler elektroforetik yöntemlerden yararlanılmaktadır. Bunların sıvı kromatografide ayrılmaları ile ilgili birçok çalışma olmakla birlikte bunların çoğu, bileşiklerin davranışlarını temel alarak değil deneme yanılma ile gerçekleştirilmiştir. Gerek sıvı kromatografide ve gerekse kapiler elektroforetik ayırmalarda günümüzde en önemli teorik yaklaşım, bu bileşiklerin iyonlaşma sabitlerini esas alan yaklaşımdır. Ayrılma için optimum pH değeri, $pK_a \pm 1,5$ aralığıdır. Bu konu ile ilgili kaynaklar incelendiğinde sülfonamid grubu antibiyotiklerin su - organik çözücü karışımlarındaki iyonlaşma sabitleri ile ilgili yeterli çalışma bulunmadığı anlaşılmaktadır.

Bu çalışmada, bazı sülfonamidlerin iyonlaşma sabitleri, su-asetonitril ikili karışımlarında potansiyometrik, HPLC, HPLC-DAD yöntemlerinden yararlanılarak tayin edilmiştir. Çalışmada seçilen sülfonamidler, sülfodiazin, sülfotiazol, sülfomerazin, sülfometazin, sülfodoksin, sülfomonometoksin ve sülfometaksazoldür.

İyonlaşma sabitlerinin tayininde potansiyometrik yöntemler, su-organik çözücü ikili karışımlarında pH standardizasyonunun yapılabilmesi sebebiyle ve bileşiklerin sıklıkla 2 iyonlaşma sabitinin tayinine imkân tanıdığı için tercih edilmiştir. HPLC ve HPLC-DAD yöntemleri ile iyonlaşma sabitlerinin tayini, günümüzde sıvı kromatografik yöntemle ayrılmaları istenen bileşiklerin ayırmalarının optimizasyonunda ilk aşamadır ve her 2 yöntem aynı anda uygulanır. Yöntemlerin avantaj ve dezavantajları tezde detayları ile verilmiştir. İyonlaşma sabitlerinin hesaplanmasında gerekli grafikler yanı sıra bu amaç için geliştirilmiş bilgisayar programlarından yararlanılmıştır. HPLC yöntemlerinde elde edilen veriler ayırmanın optimizasyonunu sağlamıştır.

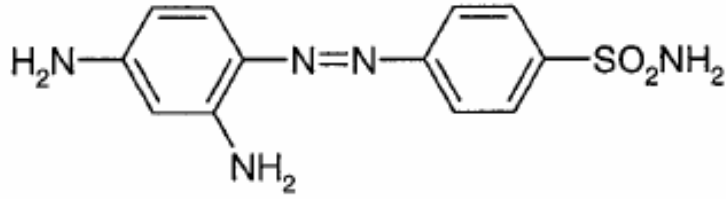
Bu çalışmada ayrıca kapasite faktörü (k) üzerinde pH etkisi incelenerek ayırma için optimum pH belirlenmiş ve $\log k - E_T^N$ parametresi arasındaki ilişki değerlendirilerek ayırma için optimum asetonitril derişimi seçilmiştir. Seçicilik (α) değerleri, bileşiklerin alıkonma davranışlarının mobil faz bileşimi ile değişiminin açıklanmasında genel bir model oluşturmak üzere kullanılmıştır.

1.1. Sülfonamitler

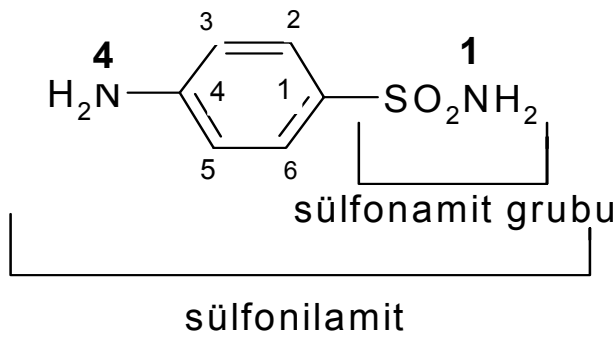
Sülfonamitler, penisilinlerin tedaviye girişine kadar bakteriyel enfeksiyonlarda sistemik kullanılabilen ilk kemoterapötik ilaçlardır. Günümüzde özellikle üriner sistem enfeksiyonlarında kullanımları süren, tedavisi ve maliyeti ucuz olan güvenilir nitelikte ilaçlardır. Ayrıca, hayvan hastalıklarının tedavisinde ve ön korunmasında sıklıkla kullanılırlar. Geniş kullanımlarından dolayı hayvan ürünlerindeki sülfonamit kalıntıları, alerjik özelliklerinden dolayı potansiyel sağlık riskleri oluşturmakta ve günümüzde kalıntı tayinlerinde ilk sırayı almaktadır.

Gerhard Domagk ve arkadaşları (Domagk, 1935) 1935 yılında prontosil ((p-(2,4-diaminofenil)azo)sülfanilamit) adlı kırmızı azo boyasının in vivo aktivitesi olduğunu belirlemiş ve kan zehirlenmesinde tedavi için denemişlerdir. Bu çalışmaları ile Domagk, 1939 yılında Nobel bilim ödülünü almıştır. Tedavinin başarılı olmasıyla sülfonamit grubu içeren prontosilinin kemoterapötik etkisi üzerine araştırmalar artmıştır. 1936 yılında prontosilin aktif metaboliti sülfonamit sentez edilmiştir. Devam eden çalışmalarda bugüne kadar 5000'den fazla sülfonamit ilacı sentezlenmiş fakat günümüzde bunlardan sadece 33 tanesi genel ilaç kullanımına sunulmuştur.

Sülfonamitler, geniş spektrumlu, bakteriyostatik etkili ilaçlardır. Gram (+) ve gram (-) mikroorganizmalara karşı aktivite gösterirler. Penisilin ve diğer antimikrobiyal ilaçların elde edilmesi ve pek çok mikroorganizmada sülfonamitlere karşı direnç gelişmesiyle enfeksiyon tedavisinde kullanımları azalmıştır. 1970'li yıllarda trimetoprim ile sülfometaksazolün kombinasyonunun (Baktrim) tedaviye girmesiyle spesifik enfeksiyonlarda yeniden kullanım alanı bulmuşlardır (Özalp, 2002) .



Prontosil (4-(2,4-Diamino-fenilazo)-benzensülfonamit)



Şekil 1.1. Prontosil ve sülfonilamitin yapısı

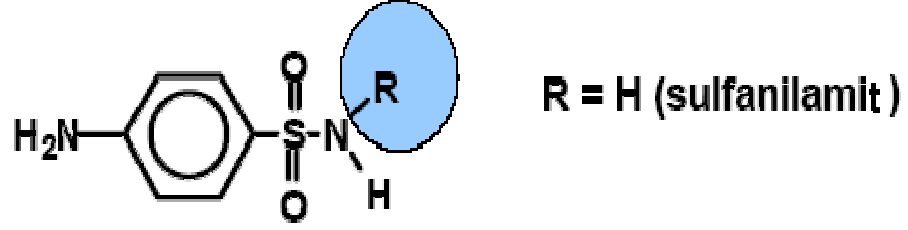
1.2. Sülfonamitlerin Kimyasal Yapıları

Sülfonamitler genellikle sarı - beyaz renkli, acı tatda, kristalize toz halindedirler. Serbest asit formları suda çözünmez, etanol ve asetonda kısmen çözünürler. Bu bileşiklerin sodyum tuzlarının sudaki çözünürlükleri fazladır. Safrada ve serumdaki çözünürlükleri iyidir (Horwitz, 1981; Doğu, 1994).

Sülfonamitler kimyasal olarak kararlı bileşiklerdir. Sülfotiazolün yarı ömrü pH 3,5 ve 80 °C' de 530 yıl olarak tahmin edilmektedir (Pawelczyk ve Zajac, 1976). Sülfonamitlerin asit-baz özellikleri, pH'a bağımlı çözünürlüğünü, antibakteriyel aktivitesini ve diğer spesifik farmakokinetik özelliklerini etkilemektedir.

Süstitüe sülfonamitler, aromatik amino grubu azotu (N⁴) ve amido grubu azotu (N¹) üzerinden süstitüsyonlarla hazırlanırlar. Bütün sülfonamitlerin antibakteriyel

aktivitesi N¹-sübstitüe türevleri olması halinde gözlenir ve bu bileşikler ilaç olarak kullanılmaktadır.



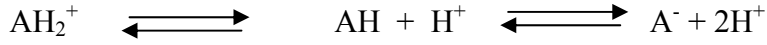
Şekil 1.2. Sülfonamidlerin genel yapısı

Bell ve Romblin (1942), sulfonamidlerin iyonlaşma sabitleri ve bakteriostatik aktivitesi arasında önemli bir ilişki olduğunu bulmuşlardır. pK_a 6 ve 7,5 arasında geçişlerin maksimum olduğunu belirtmişlerdir. İlaçların iyonik formunun nötral şekillerinden daha aktif olduğu sonucuna varmışlardır. Molekülün anyonik formda inhibitör olarak davranacağı bilinmektedir. Sülfonamidlerin yapı - aktivite ilişkileri incelendiğinde, pK_a değeri 7 civarında (fizyolojik pH) olanların optimum etkiyi gösterdikleri belirlenmiştir. pK_a değerinin düşmesi, fizyolojik pH'da anyonik formda olan ilaç miktarını ve dolayısıyla ilacın etkinliğini artırmış olur. Sülfo ilaçlarının etkin olarak kullanılabilmesi için, pK_a değerleri 5-9 arasında olmalıdır. Bu pK_a değerleri yapıda R grubunun değişmesiyle sağlanmaktadır.

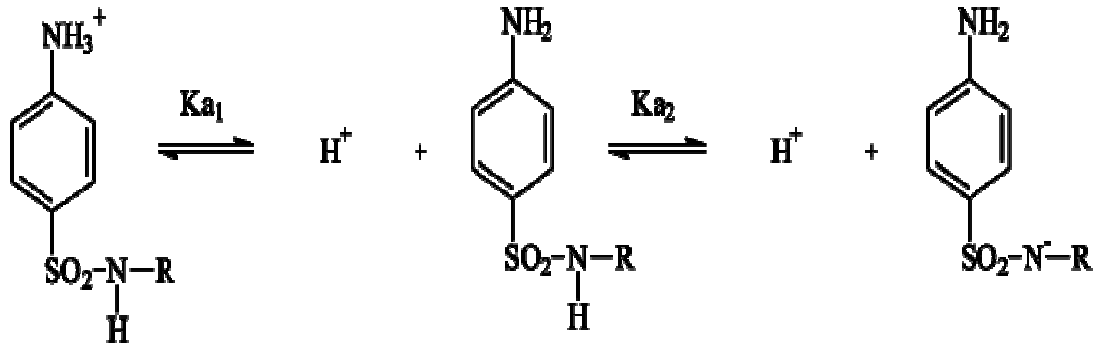
Sülfonilamid üzerinde modifikasyonlar yapıldığında amido grubu azotu üzerindeki substituentlerin iyi tolere edildiği ve ilaç aktivitesini etkilemediği görülmüştür. Bununla beraber, bu grupların antibakteriyel potansiyel üzerinde etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Bunun nedeni ise sübstituentlerin sülfonamid grubunun asitliği üzerine etkileridir. Bu etkinin değeri bileşiklerin pK_a değerlerinin ölçülmesi ile bilinebilir.

1.3. Sülfonamidlerin İyonlaşma Sabitleri

Sülfonamidler, SO₂ grubunun indüktif etkisinden dolayı amfoterik davranış gösterirler ve iyonlaşma adımları, aşağıdaki tepkimede gösterildiği gibidir (Şekil 1.3).



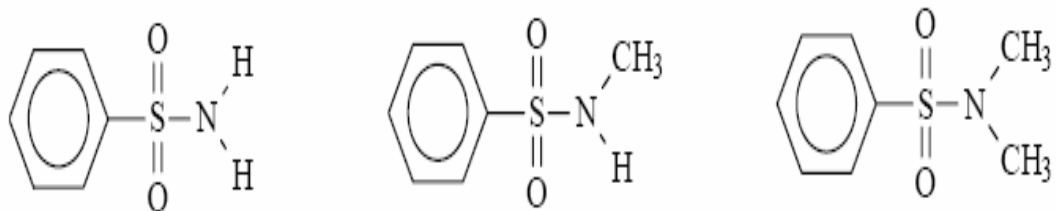
K_{a1} , aromatik aminin ($\text{H}_3\text{N}^{(+)}\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{-NH-R}$) iyonlaşması adımıyla ilgilidir. K_{a2} ise sülfonik asit ($\text{H}_2\text{N-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{-NH-R}$) grubuna aittir.



Şekil 1.3. Sülfonamit grubu bileşiklerin iyonlaşma dengeleri

Sülfonamit grubu bileşiklerin yukarıdaki şemada tanımlanan pK_{a1} ve pK_{a2} değerleri sırasıyla 2-3 ve 5-8 arasındadır (Şekil 1.3). pH 3' ten küçük olduğunda bileşik, protonlanmış formda ($\text{H}_3\text{N}^{(+)}\text{-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{-NH-R}$); pH 3-5 aralığında bileşik, nötral ($\text{H}_2\text{N-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{-NH-R}$) formunda bulunur; daha yüksek pH'larda anyonik ($\text{H}_2\text{N-C}_6\text{H}_4\text{-SO}_2\text{-N}^{(-)}\text{-R}$) formdadır. Bu grup içinde sadece sülfonilamitin pK_a değeri 10,43' tür.

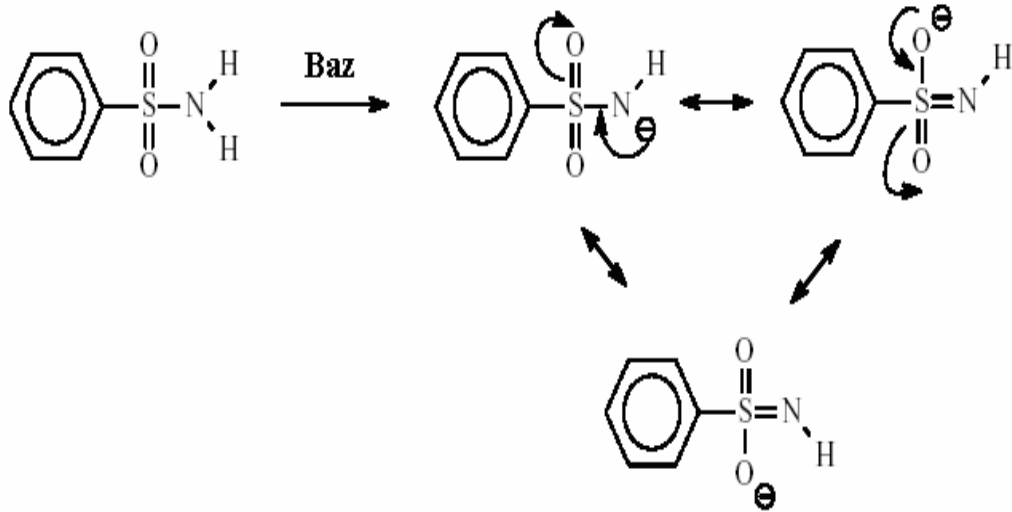
Sülfonamitler azot üzerinde R- gruplarının bulunuşuna göre primer, sekonder veya tersiyer olarak sınıflandırılırlar (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Primer, sekonder ve tersiyer sülfonamitlerin genel gösterimleri

Bu yapılardan tersiyer olanlar iyonlaşabilen protonları olmadığı için asidik özellik göstermezler.

Bilindiği gibi amitlerde karbonil grubu NH-grubu ile bağlıdır. Sülfonamidlerde ise karbonil grubu yerine SO₂ grubu bulunmaktadır. Sülfonamidler amitlerden ($pK_a > 14$) kuvvetli, karboksilik asitlerden (pK_a 3-5) zayıf olan antibakteriyallerdir. Bu grup bileşiklerin amitlerden daha asidik davranmasının nedeni oluşan konjuge bazın rezonans kararlılığını göstermesidir. Bu bileşiklerin karboksilik asitlerden daha zayıf oluşu, azot atomunun oksijenden daha az elektronegatif davranmasıyla açıklanabilir (Şekil 1.5).

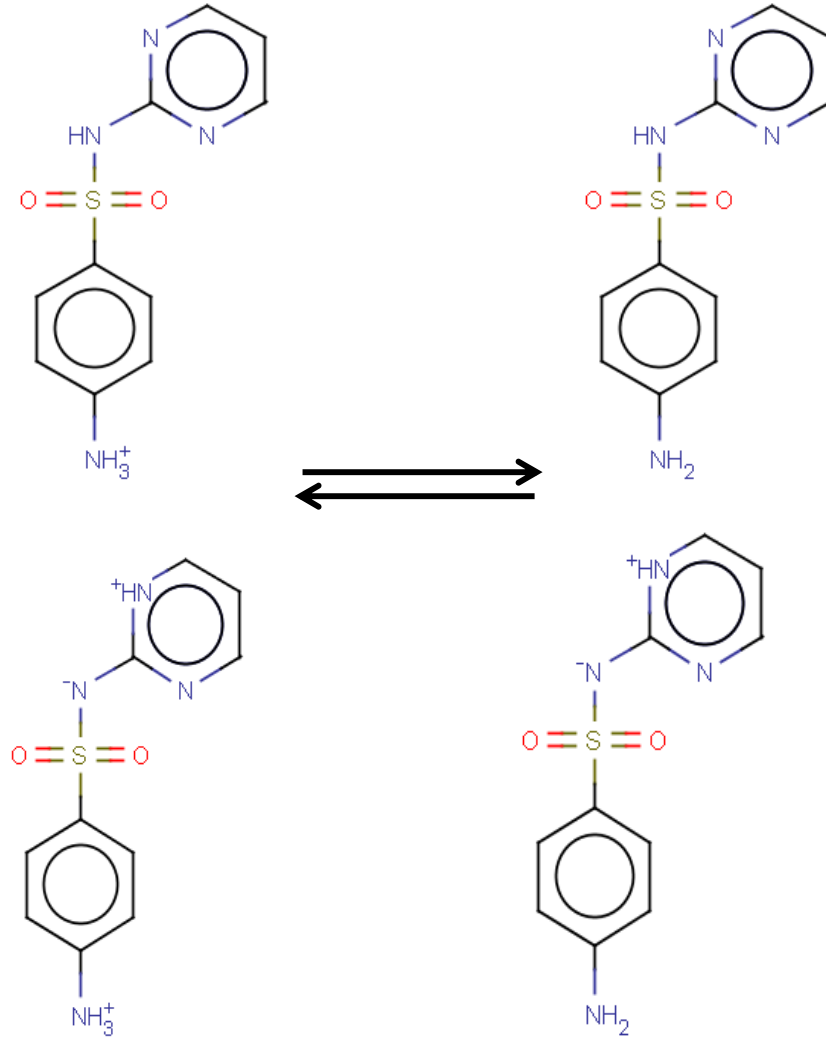


Şekil 1.5. Sülfonamidlerin bir bazla etkileşmesinde oluşan iyonun rezonans sınır formülleri

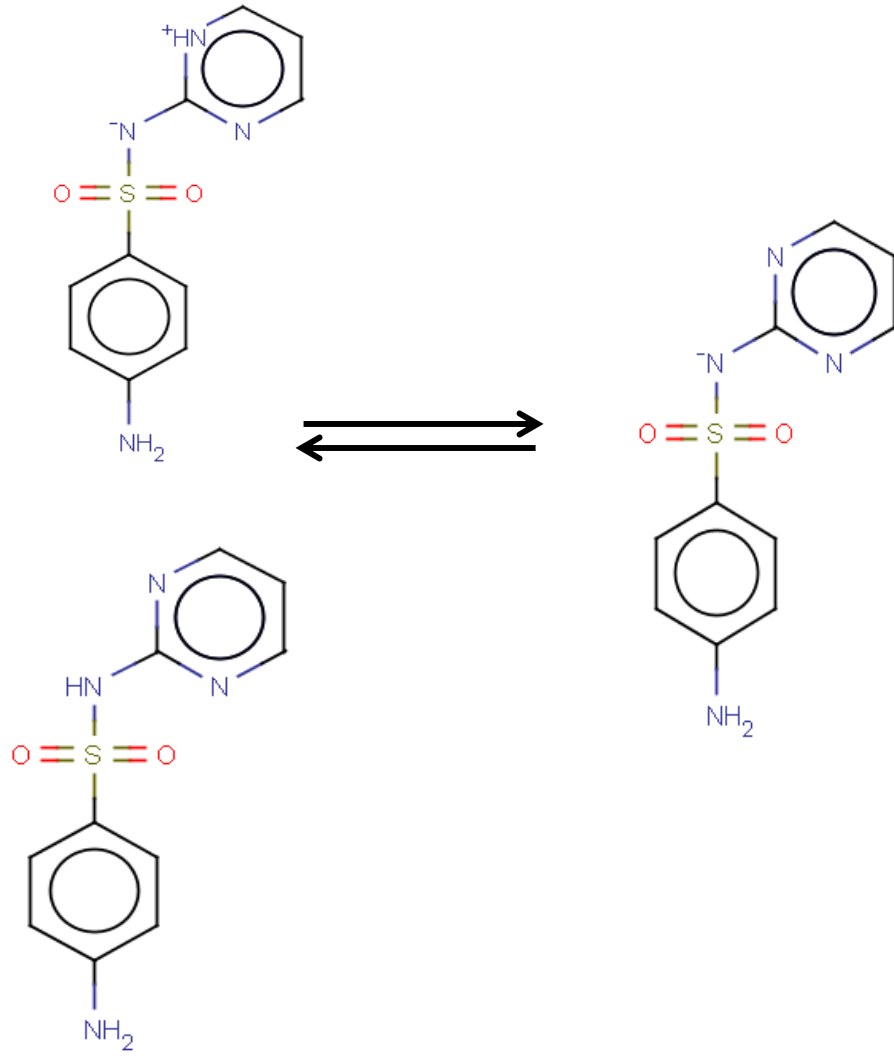
1.3.1. Sülfonamitlerin SPARC Programı ile Hesaplanan İyonlaşma Sabitleri

1.3.1.1. Sülfodiazinin İyonlaşma Sabitleri

Protonlanmış sülfodiazin yapısının genellikle ikiz iyon halinde olduğu ve anilinyum protonu için protonasyon sabitinin (pK_{a1}) aşağıdaki asit–baz dengesine uygun olarak davranıldığında 1,74 olduğu (Şekil 1.6) ve sülfodiazinin 2. protonasyon sabitinin (pK_{a2}) genellikle pirimidin halkasındaki protonun aşağıdaki tepkime şemasına uygun olarak davranıldığında 5,99 olduğu (Şekil 1.7) literatür verilerinden görülmektedir (Hilal vd., 2004).



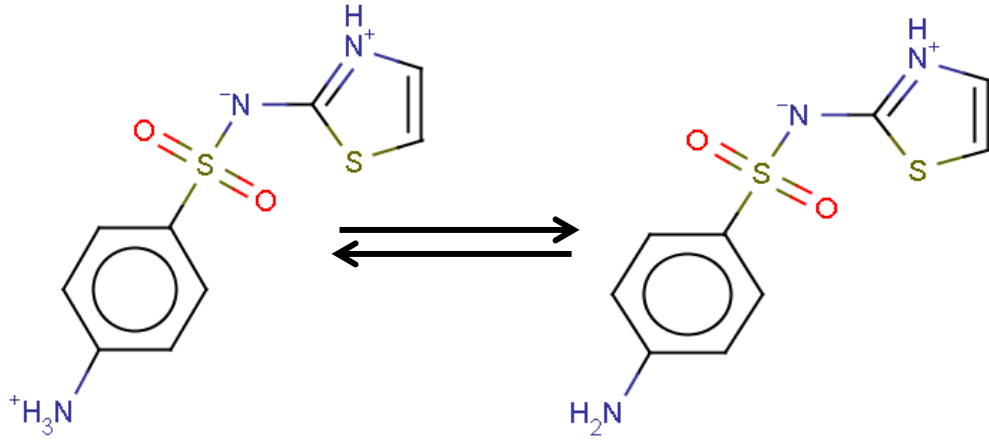
Şekil 1.6. Protonlanmış sülfodiazinin iyonlaşma davranışı



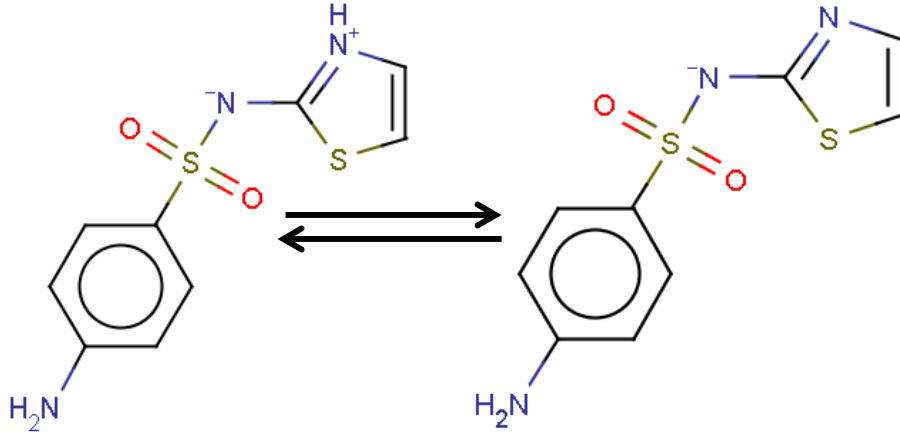
Şekil 1.7. Sülfodiazinin pK_{a2} ile ilgili iyonlaşma aşaması

1.3.1.2. Sülfotiazolün İyonlaşma Sabitleri

Protonlanmış sülfotiazolün yapısının genellikle ikiz iyon halinde olduğu ve anilinyum protonu için protonasyon sabitinin (pK_{a1}) aşağıdaki asit–baz dengesine uygun olarak davranıldığında 1,91 olduğu (Şekil 1.8) ve sülfotiazolün yapısındaki 2. protonasyon sabitinin (pK_{a2}) genellikle pirimidin halkasındaki protonun aşağıdaki tepkime şemasına uygun olarak davranıldığında 10,22 olduğu görülmektedir (Şekil 1.9).



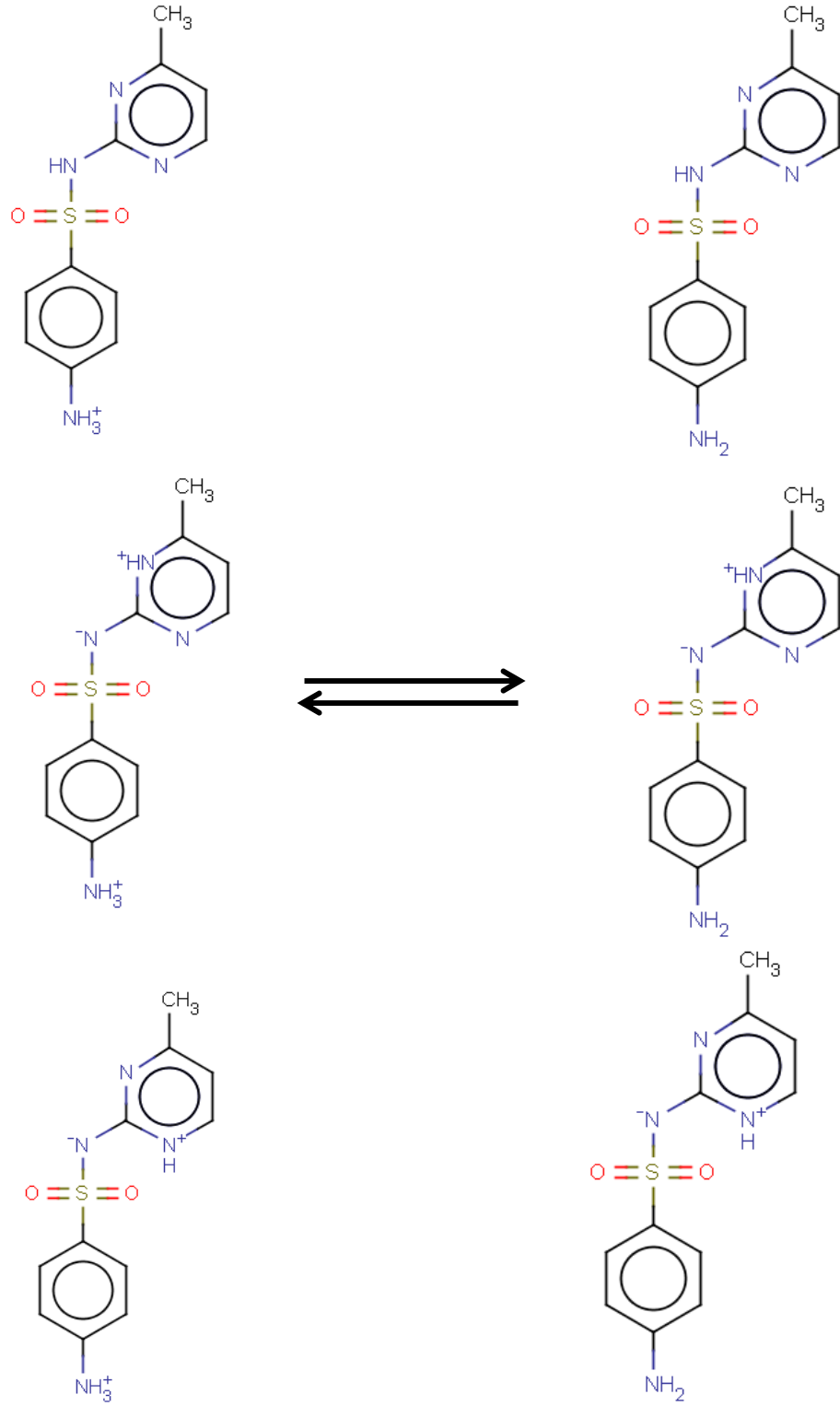
Şekil 1.8. Protonlanmış sülfotiazolün iyonlaşma davranışı



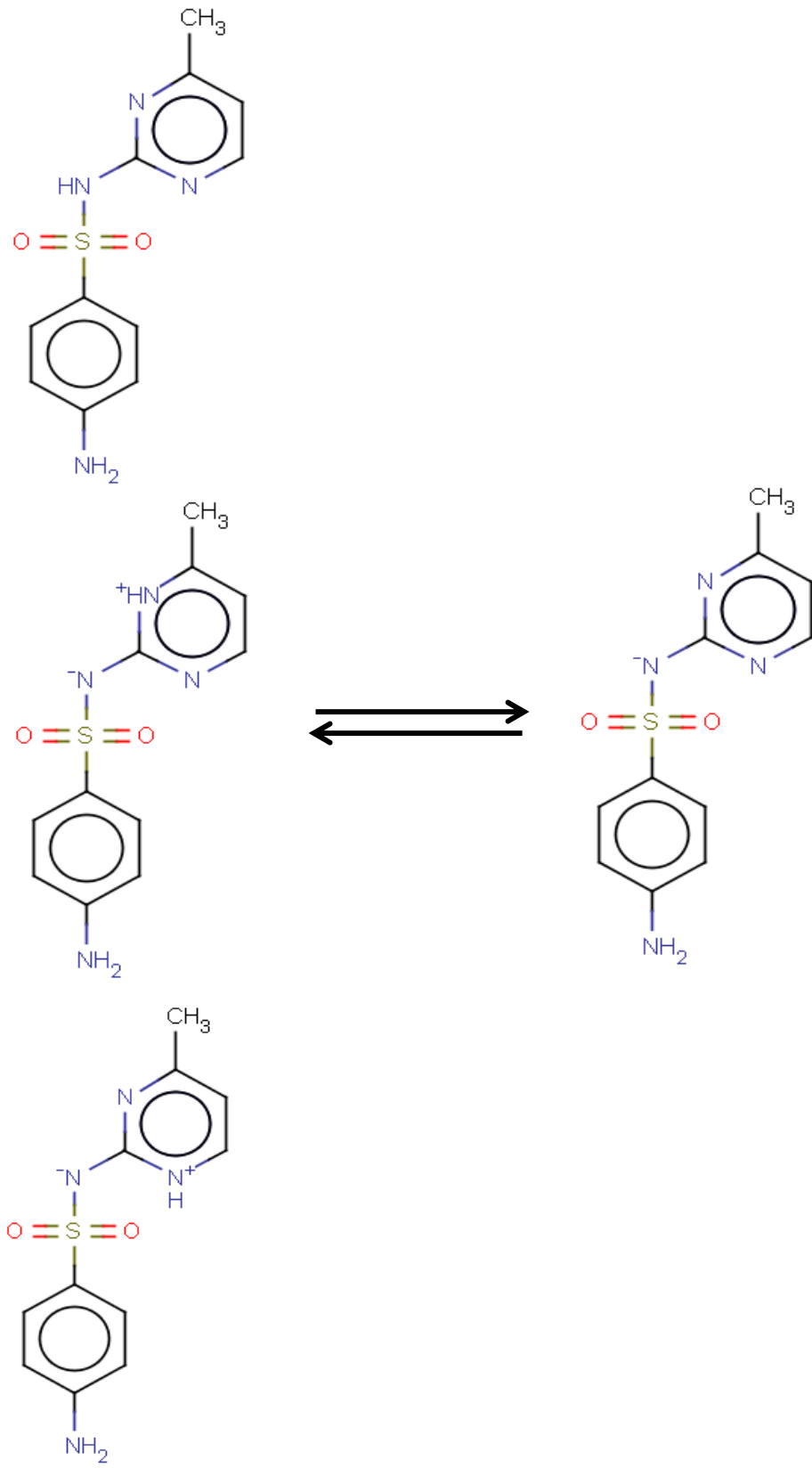
Şekil 1.9. Sülfotiazolün pK_{a2} ile ilgili iyonlaşma aşaması

1.3.1.3. Sülfomerazinin İyonlaşma Sabitleri

Protonlanmış sülfomerazin yapısının genellikle metil grubuna komşu olan veya olmayan azot üzerinden protonlanarak ikiz iyon halinde olduğu ve anilinyum protonu için protonasyon sabiti pK_{a1} 'in şemadaki asit-baz dengesine uygun olarak davranıldığında 1,79 (Şekil 1.10) ve sülfomerazinin pK_{a2} değerinin 6,66 olduğu (Şekil 1.11) önerilmektedir. Bu değişim sülfomerazin yapısındaki metil grubundan kaynaklanmaktadır.



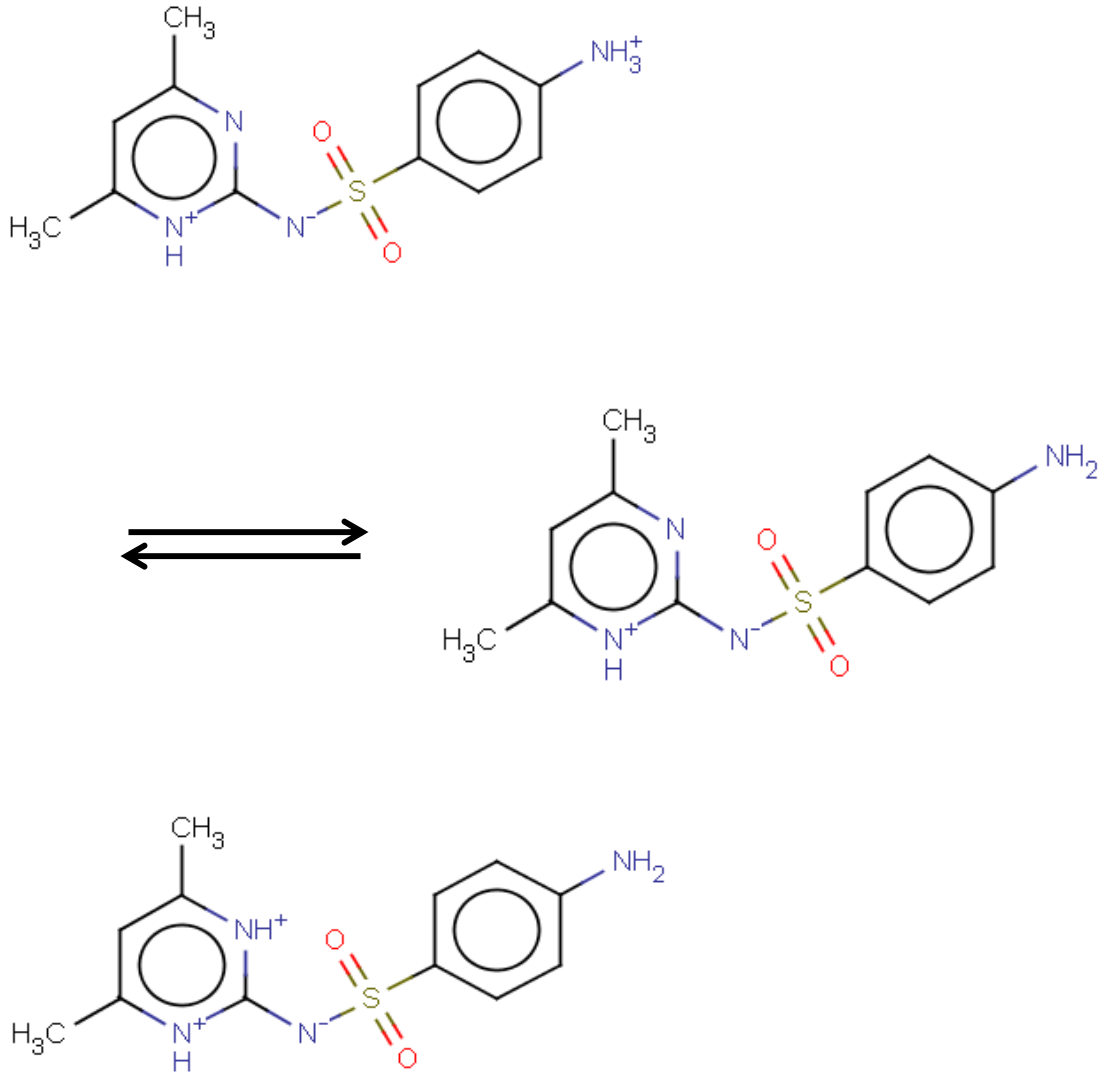
Şekil 1.10. Protonlanmış sülfomerazinin iyonlaşma davranışı



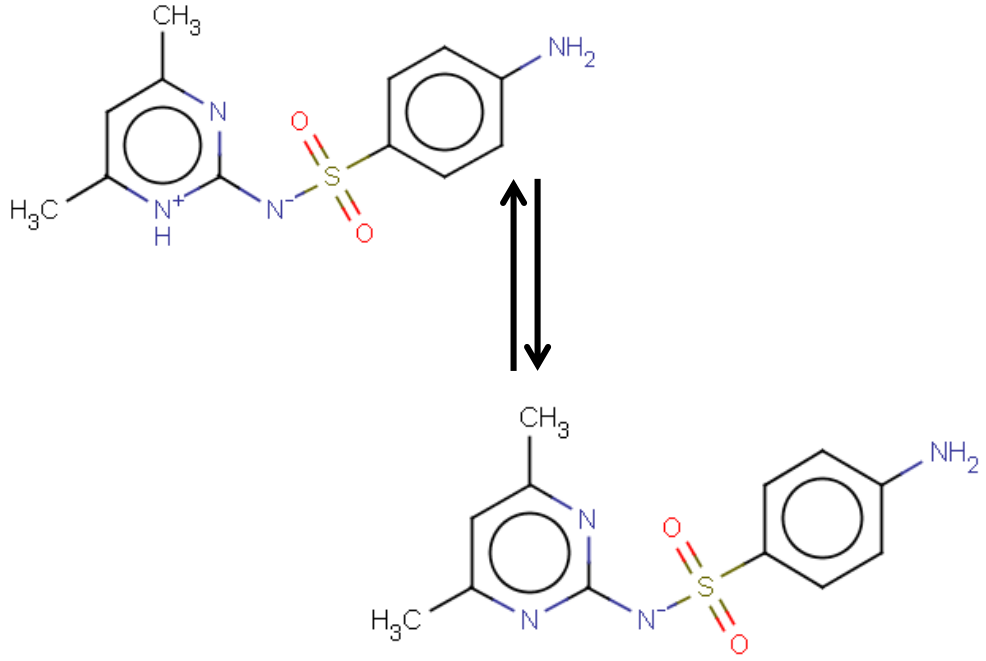
Şekil 1.11. Sülfomerazinin pK_{a2} ile ilgili iyonlaşma aşaması

1.3.1.4. Sülfometazinin İyonlaşma Sabitleri

Protonlanmış sülfometazin yapısının genellikle ikiz iyon halinde olduğu ve anilinyum katyonu ile ilgili protonasyon sabitinin şekildeki asit –baz dengesine uygun olarak davranıldığında 1,86 olduğu (Şekil 1.12) ve sülfometazinin pK_{a2} değerinin 7,31 olduğu önerilmektedir (Şekil 1.13). İyonlaşma sabitindeki etkilenme yapıya giren iki metil grubundan kaynaklanmaktadır.



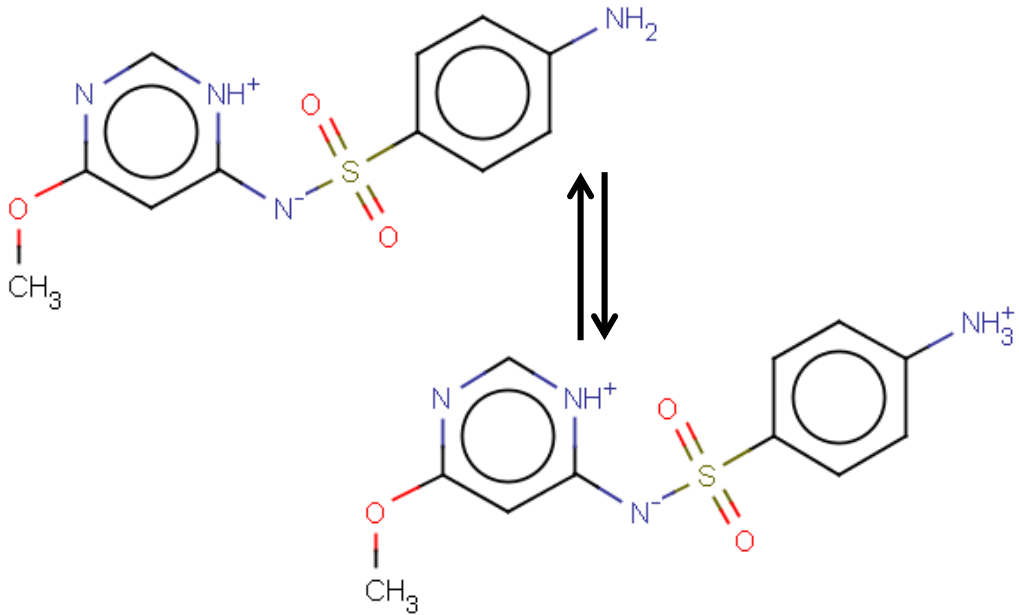
Şekil 1.12. Protonlanmış sülfometazinin iyonlaşma davranışı



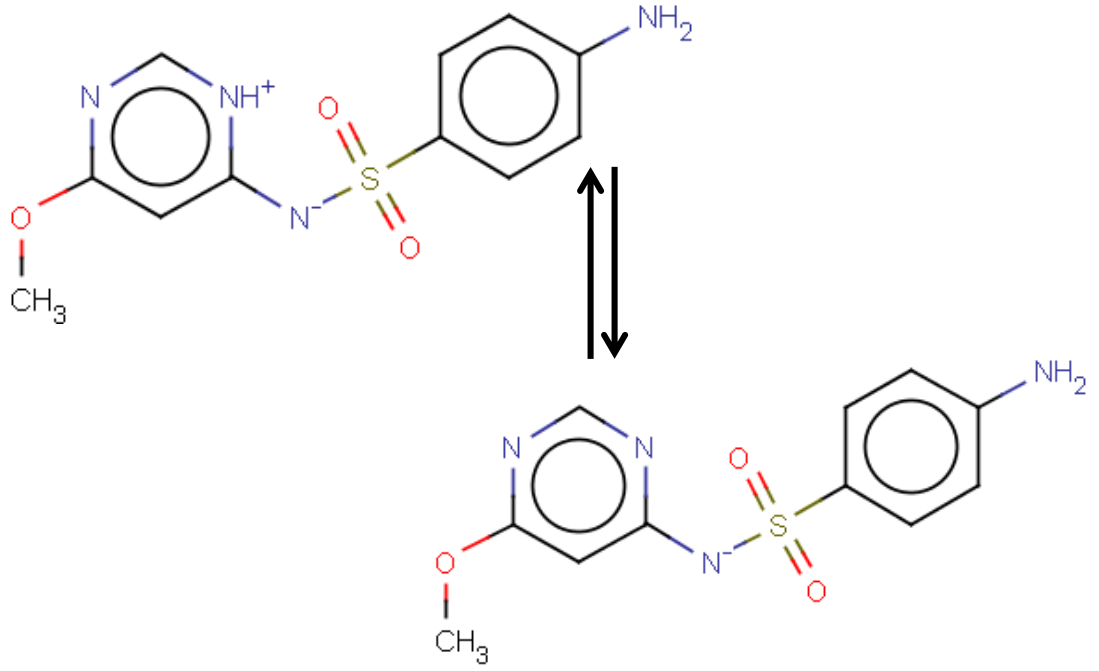
Şekil 1.13. Sülfometazinin pK_{a2} ile ilgili iyonlaşma aşaması

1.3.1.5. Sülfomonometoksinin İyonlaşma Sabitleri

Protonlanmış sülfomonometoksinin anilinyum protonuna ait pK_{a1} in şemadaki asit–baz dengesine uygun olarak davranıldığında 1,71 (Şekil 1.14) ve bileşiğin pK_{a2} değerinin 7,65 olduğu (Şekil 1.15) literatürden anlaşılmaktadır.



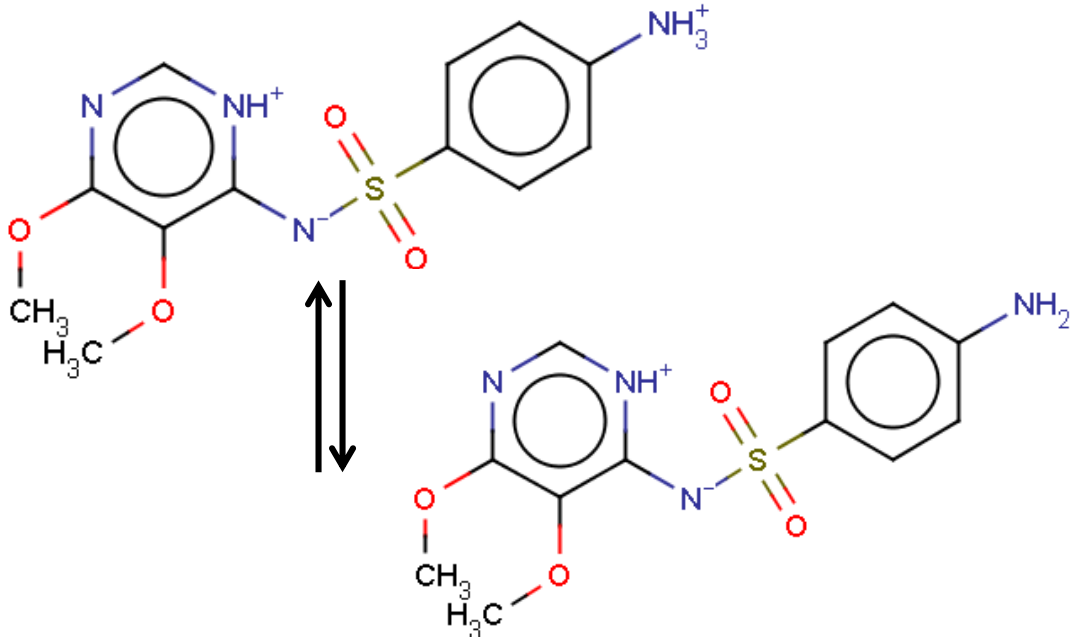
Şekil 1.14. Protonlanmış sülfomonometoksinin iyonlaşma davranışı



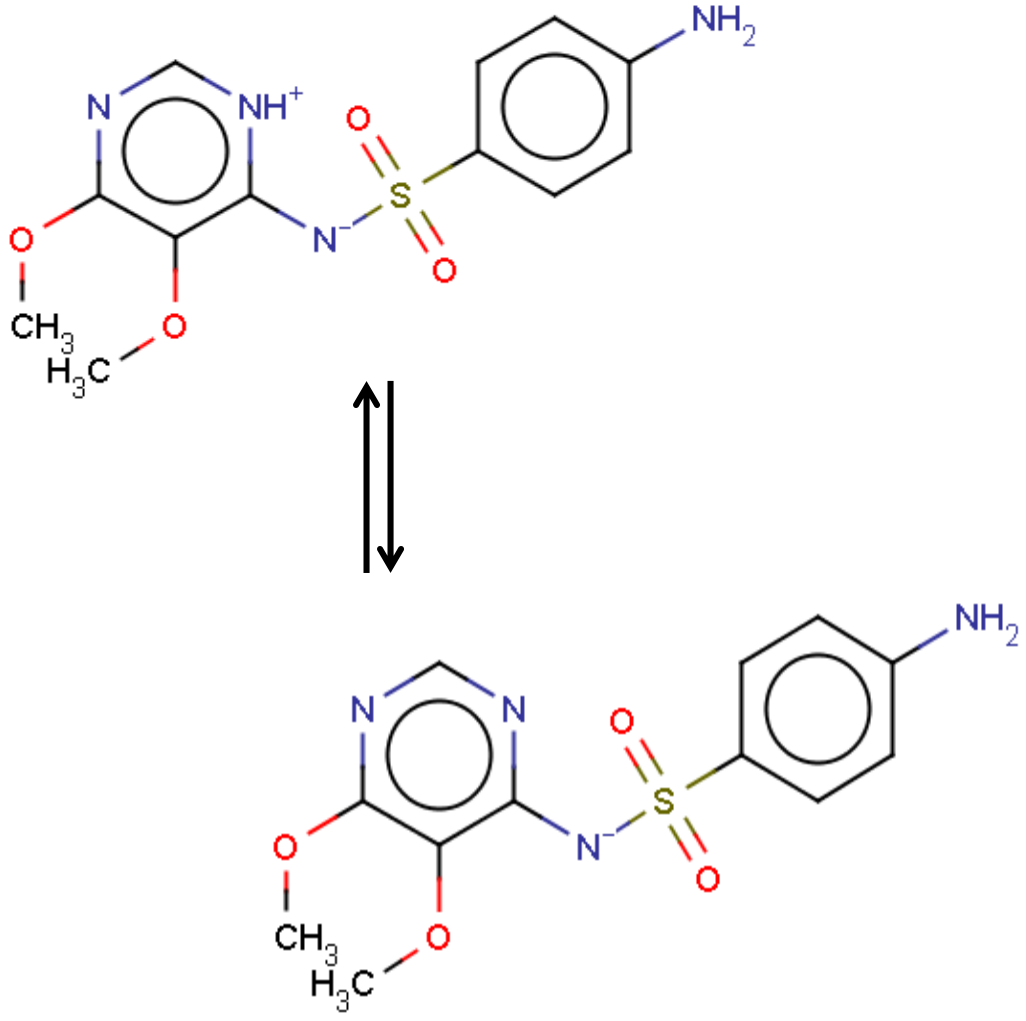
Şekil 1.15. Sülfomonometoksinin pK_{a2} ile ilgili iyonlaşma aşaması

1.3.1.6. Sülfodoksinin İyonlaşma Sabitleri

Protonlanmış sülfodoksinin anilinyum protonuna ait pK_{a1} in şemadaki asit-baz dengesine uygun olarak davranıldığında 1,67 (Şekil 1.16) ve bileşiğin pK_{a2} değerinin 6,62 olduğu (Şekil 1.17) literatürden anlaşılmaktadır



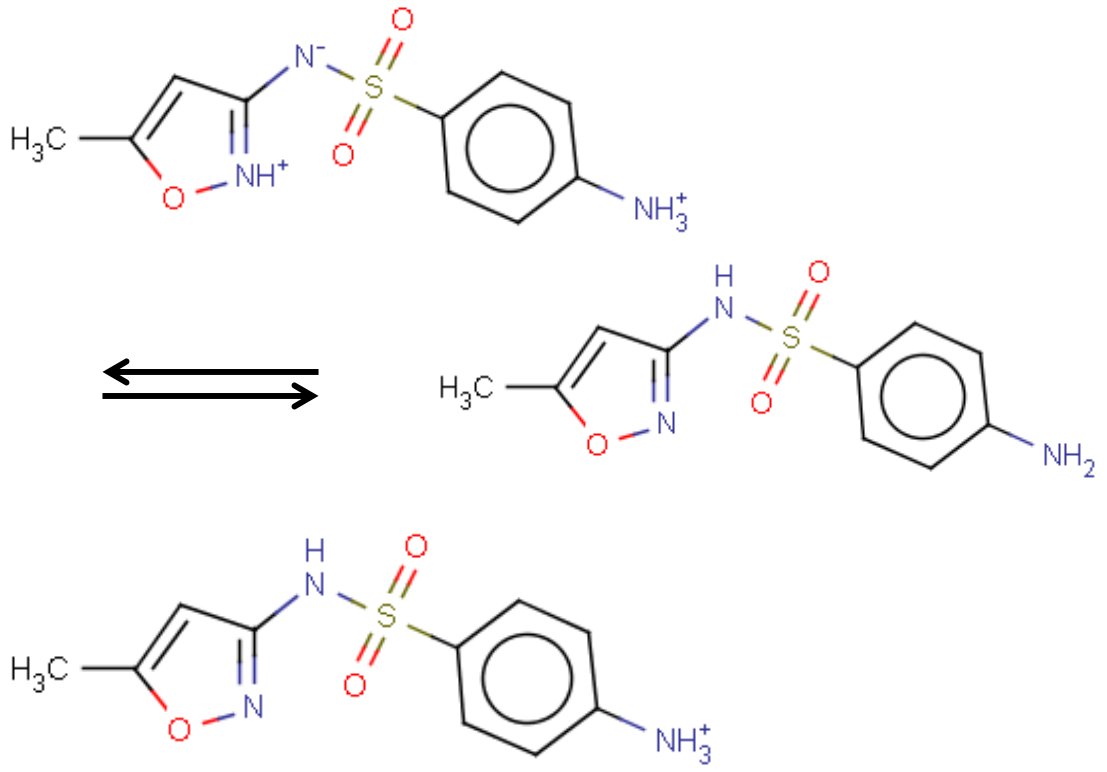
Şekil 1.16. Protonlanmış sülfodoksinin iyonlaşma davranışı



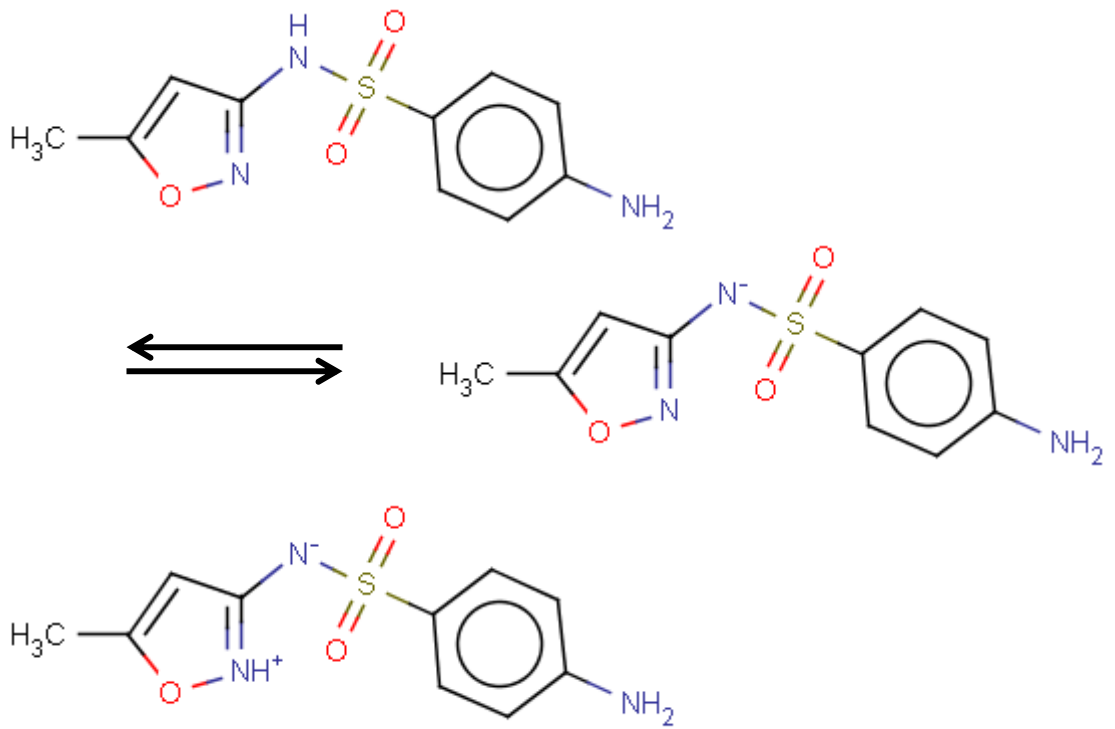
Şekil 1.17. Sülfodoksinin pK_{a2} ile ilgili iyonlaşma aşaması

1.3.1.7. Sülfometaksazolün İyonlaşma Sabitleri

Protonlanmış sülfometaksazolün yapısında anilinyum protonuna ait pK_{a1} in şemadaki asit–baz dengesine uygun olarak davranıldığında 2,07 (Şekil 1.18) ve bileşiğin pK_{a2} değerinin 8,38 olduğu (Şekil 1.19) literatürden anlaşılmaktadır.



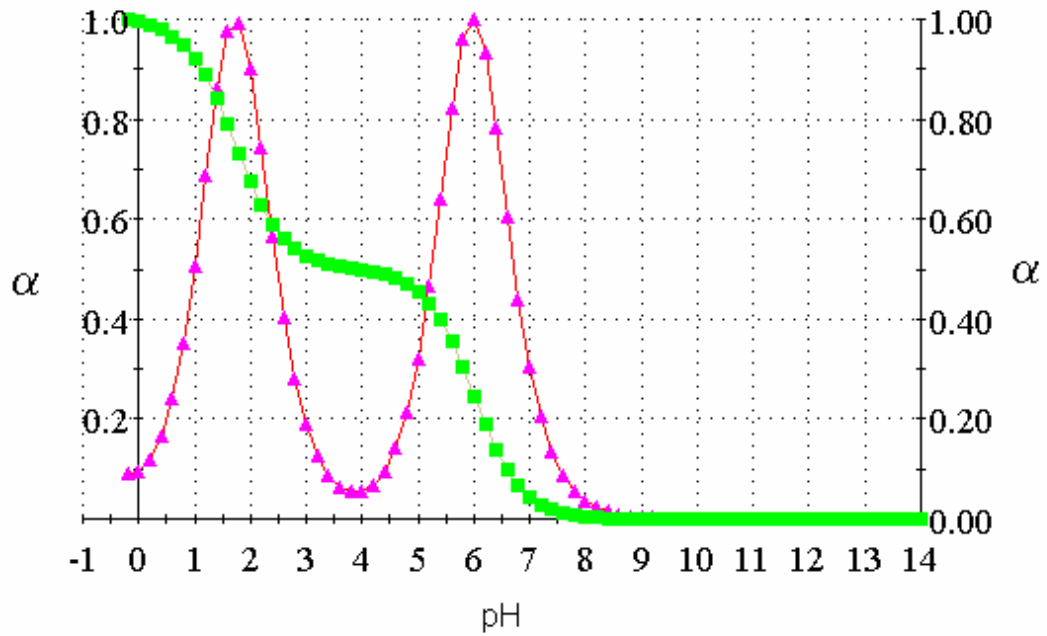
Şekil 1.18. Protonlanmış sülfometaksazolün iyonlaşma davranışı



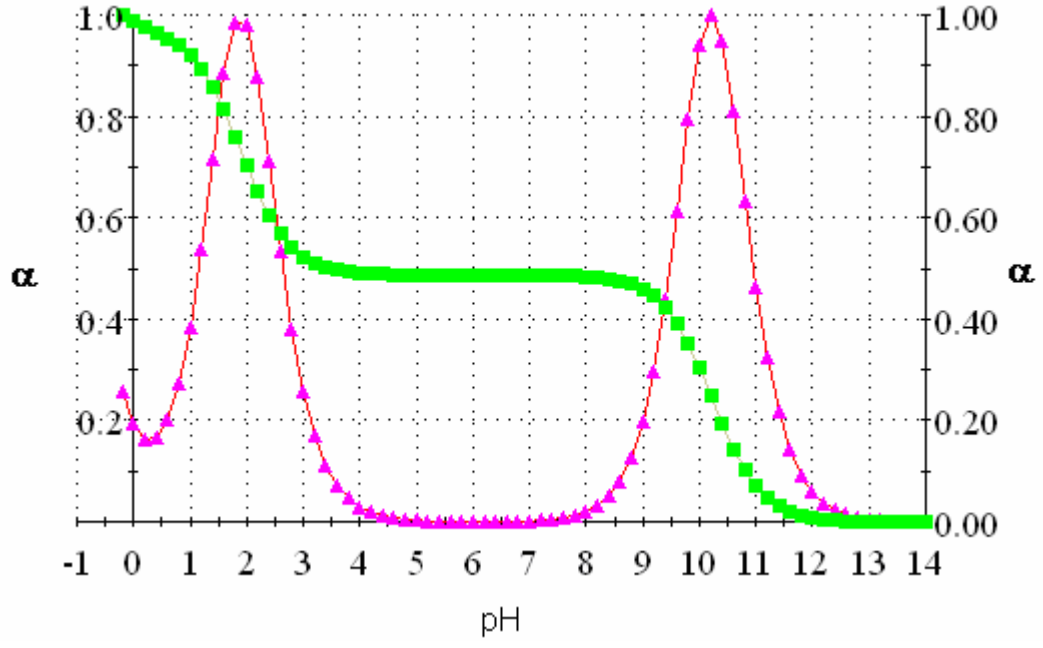
Şekil 1.19. Sülfometaksazolün pK_{a2} ile ilgili iyonlaşma aşaması

1.3.1.8. Sülfonamitlerin Türev Eğrileri

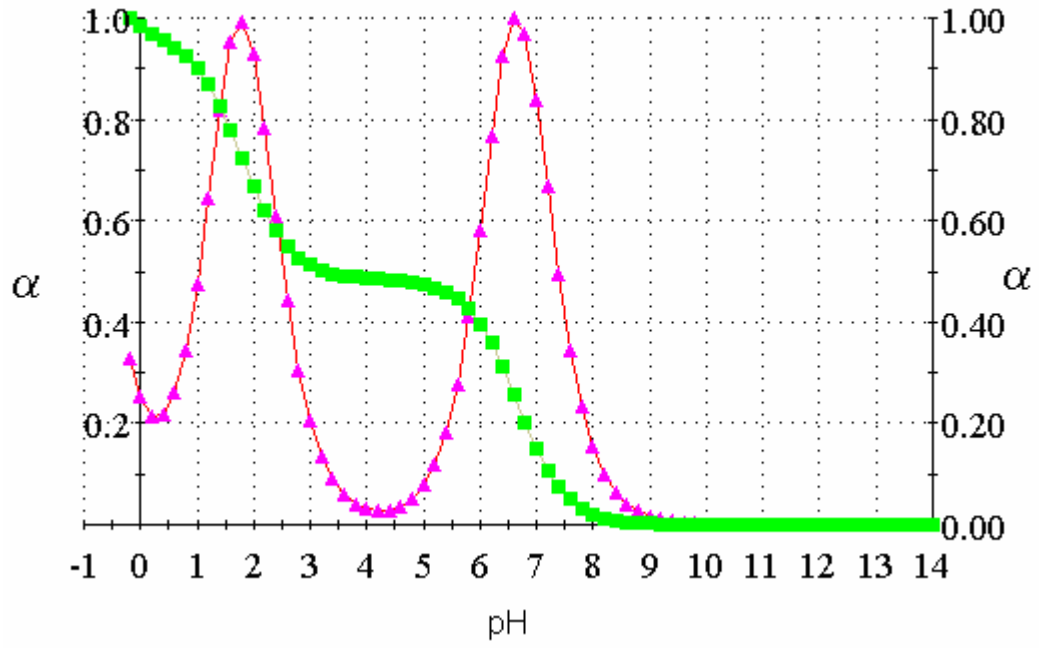
Sülfonamitlerin iki protonunun ayrı ayrı titre edildiğini gösteren türev eğrileri SPARC programı ile hazırlanabilmektedir (Şekil 1.20, 1.21, 1.22, 1.23, 1.24, 1.25 ve 1.26). Bu grafikler, aynı zamanda α - pH ilişkisini de göstermektedir. Bu grafiklerde su ortamı için önerilen pK_a değerleri kullanılmaktadır. Bu eğrilerin incelenmesiyle, titrasyon sırasında oluşan bütün konsantrasyon değişimleri açık bir şekilde görülür. Birinci eşdeğerlik noktasında sülfonamitin 1. protonunu verdiği ve 2. eşdeğerlik noktasında 2. protonun yapıdan alındığı grafiklerden görülmektedir.



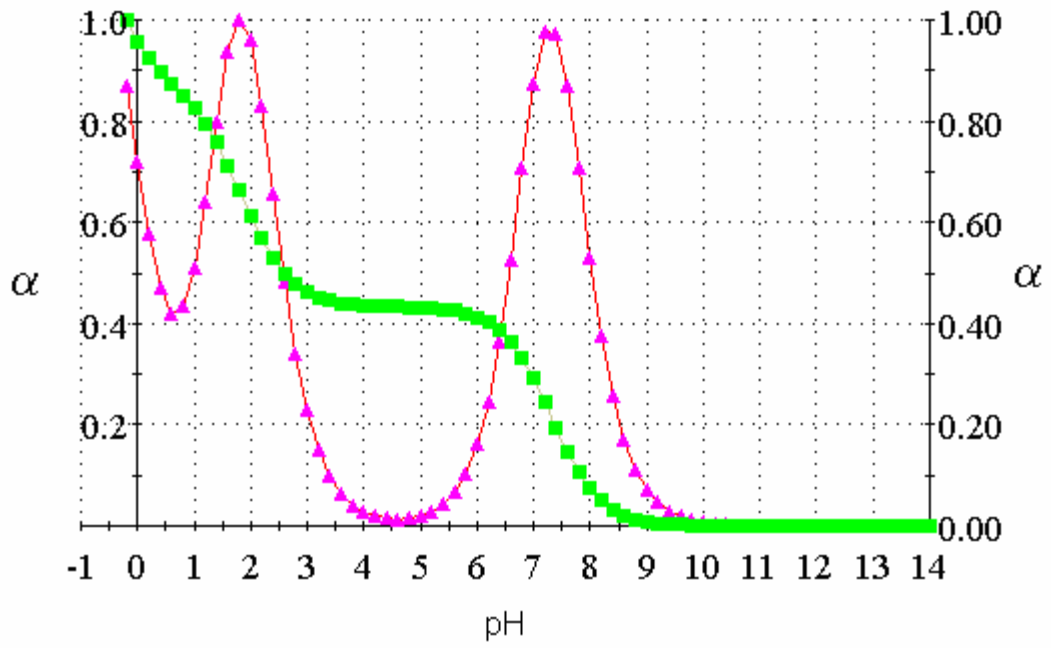
Şekil 1.20. Sülfodiazin için α - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi



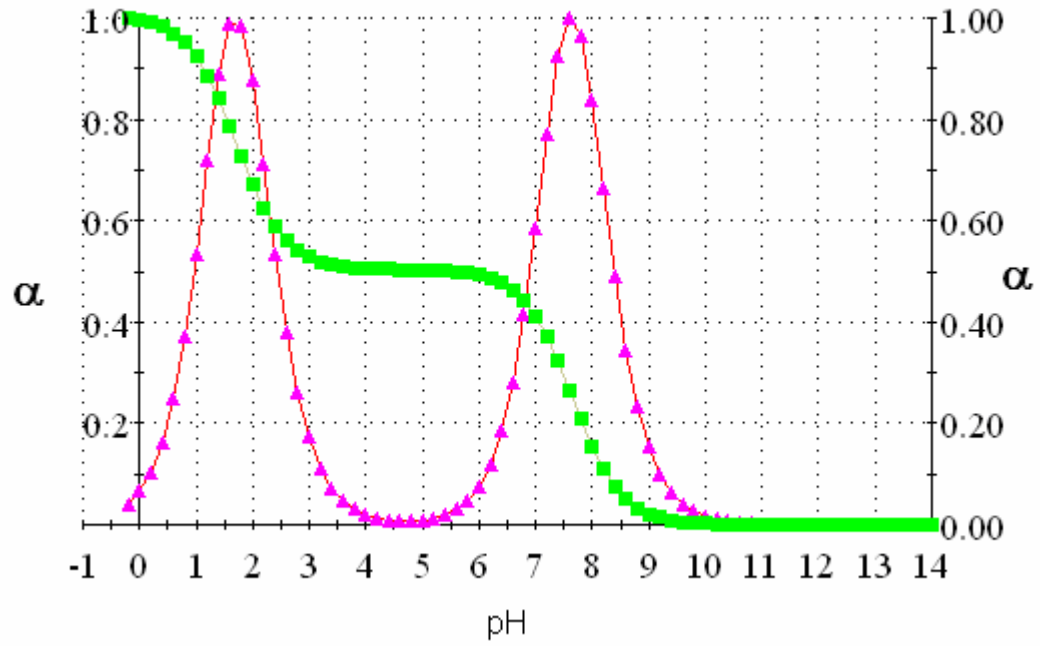
Şekil 1.21. Sülfotiazol için α - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi



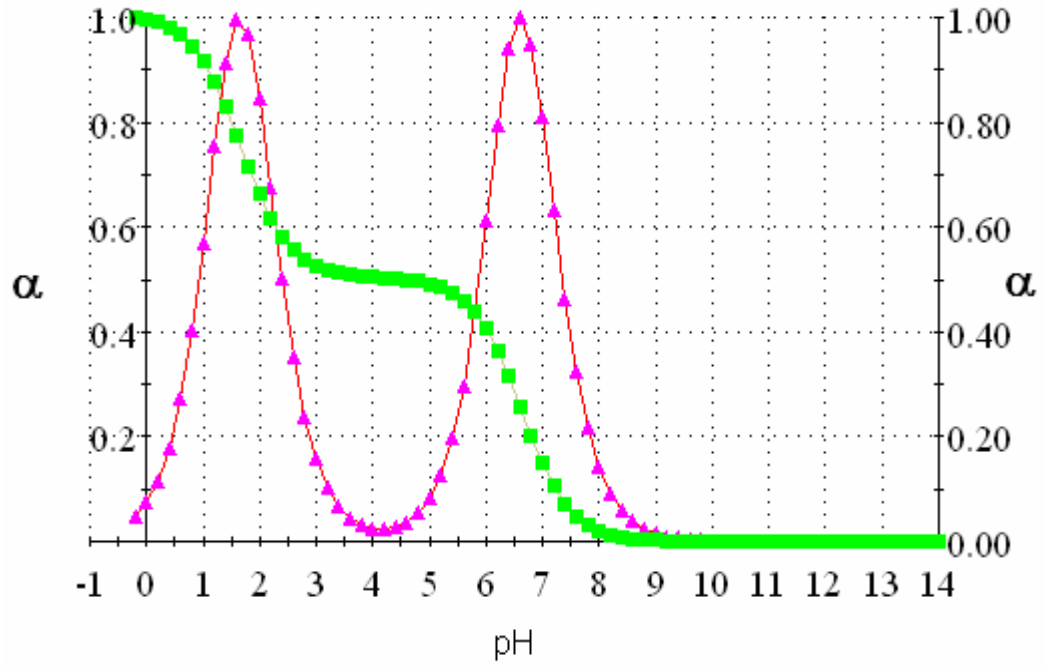
Şekil 1.22. Sülfomerazin için α - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi



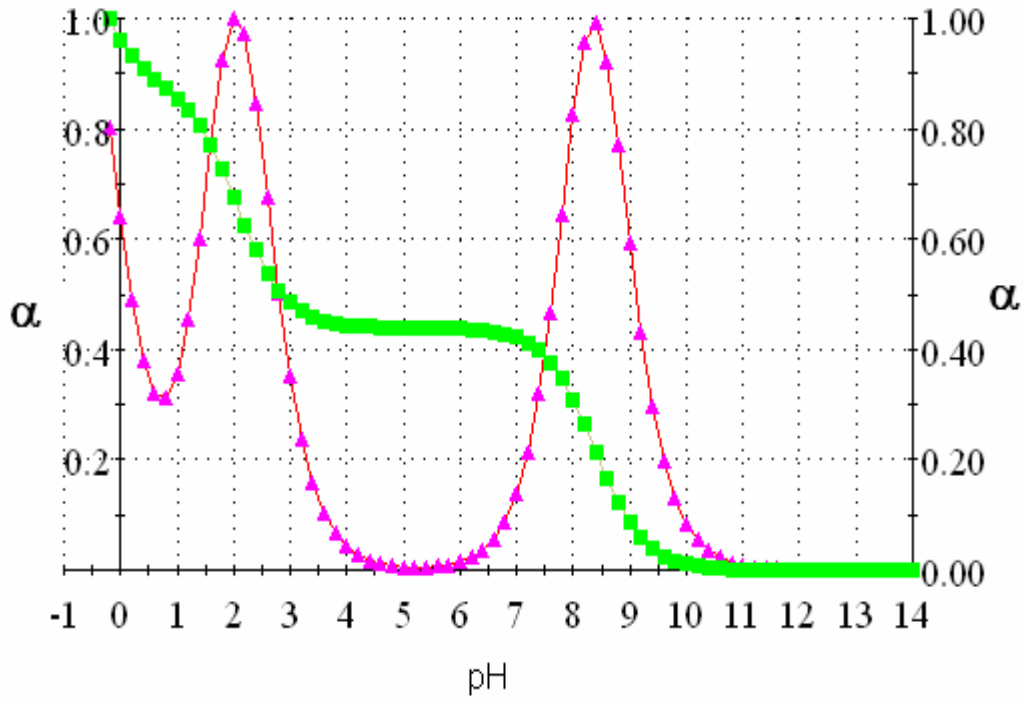
Şekil 1.23. Sülfometazin için α - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi



Şekil 1.24. Sülfomonometoksin için α - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi



Şekil 1.25. Sülfodoksin için α - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi



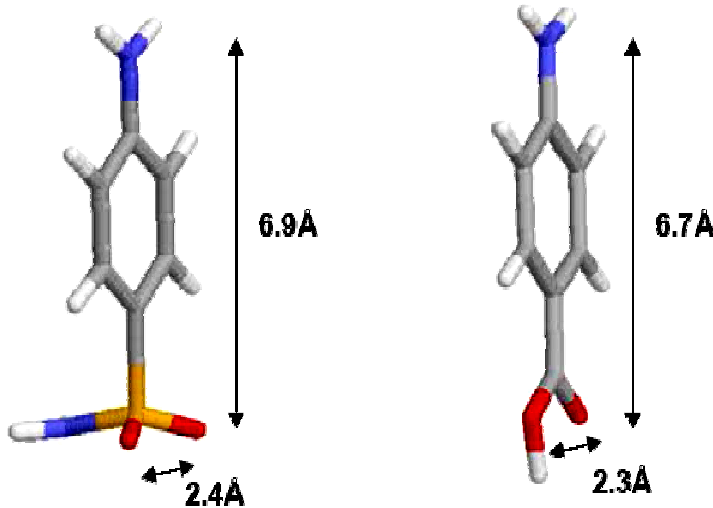
Şekil 1.26. Sülfometaksazol için α - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi

1.4. Etki Mekanizmaları

İlaçların etki mekanizmasını açıklayabilmek için, biyolojik etkisi ile fiziksel ve kimyasal özellikleri arasında ilişkiler kurulur. Bunun içinde ilacın organizmaya verilmesinden atılımına kadar geçen süre içinde ne gibi kimyasal olayların meydana geldiğini bilmek çok önemlidir. Molekölün etkileşmeye yönelik özelliklerini, fizikokimyasal parametreler belirler.

Günümüzde birçok antibiyotiğin özellikle sulfonamid grubu antibiyotiklerin pK_a değerlerinin ya doğru olarak bilinmediği veya hesaplanamadığı görülmüştür. Bundan dolayı bu bileşiklerin ayrışma sabitlerinin tayini araştırmacılara yol göstermek, davranışlarını incelemek açısından yararlı olacaktır.

Sülfonamid grubu ilaçların etki mekanizması tamamen aydınlatılmıştır. Memeli hücreleri gibi bakteri ve diğer mikroorganizmaların da gelişimleri için dihidrofolik asite (FAH₂) gereksinimleri vardır. Memeli hücreleri folik asiti besinlerle dışarıdan alabilirler. Bazı bakteri hücrelerinde ise membran, folik aside geçirgen değildir. Bu nedenle folik asidi dışarıdan alamazlar, kendileri biyosentez etmek zorundadır. Bu sentezde anahtar bileşik p-aminobenzoik asittir (PABA) (Şekil 1.27).



Şekil 1.27. Sülfonamid ve PABA'nın kimyasal yapıları

Şekil 1.27'deki formüllerin karşılaştırılmasından anlaşılabileceği gibi sülfonamidler, bir benzen halkası üzerinde serbest bir amino grubu ihtiva ederler. Kimyasal formülleri PABA'ya çok benzer. PABA'daki karboksil kökü yerine sülfonil kökü vardır. İşte bu yapısal ve boyut olarak benzerlik nedeniyle yarışmalı olarak PABA'nın yerine reaksiyona girer ve daha başlangıçta folik asit metabolizmasını inhibe ederek üremeyi durdururlar. Böylece bakteriyostatik etki gösterirler (Cates,1986).

SO₂ grubunda daha yüksek elektronegatif gruplar bulunan sülfonamidlerin yüksek bakteriyostatik etkiye sahip olduğu ispatlanmıştır. Böylece sülfonamid PABA'nın fizyolojik iyonik yapısına daha çok benzemektedir (Soriano-Correra vd., 2003). Sülfonamidlerin bakteriyostatik aktivitesi, yüküne, hidrofobik karakterine ve hücre membranlarından geçiş kabiliyetine bağlıdır. Bundan dolayı sülfonamidlerin iyonlaşmış yapıları ile hidrofobik doğası arasında bir denge kurulması gerekmektedir. Bunun için de sülfonamidlerin pK_a değerlerinin fizyolojik pH civarında olması gerekmektedir.

1.5. Farmakolojisi

Sülfonamidler ağızdan alındığında sindirim kanalında iyi emilir ve alındıktan 2-4 saat sonra en yüksek plazma düzeyine erişir. Sülfonamidler, geri dönüşümlü bir şekilde plazma albüminine bağlanırlar. Bu proteine bağlanmış haliyle ilaç inaktif durumdadır (Babacan, 1983). Vücut sıvılarına ve dokularına iyi dağılırlar. Sülfonamidlerin atılımı büyük oranda böbrekler aracılığı ile olur. Ayrıca safra, tükürük, ter, gözyaşı ile de atılırlar. Bütün sülfonamidler bakterisit etkiden çok bakteriyostatik etkilidirler. Bundan dolayı çoğalma halindeki bakterilere etkili, antimikrobik etkenlerle birlikte kullanılmaları uygun değildir. Bakterilerin bazıları metabolik yolunu değiştirip sülfonamidlere duyarsız hale gelebilirler.

Sülfonamidler, kullanıldıkları kişilerde bulantı, kusma, baş ağrısı, yorgunluk, karın ağrısı, baş dönmesi, böbrek, kan ve karaciğer bozukluklarına sebep olabilirler (Babacan, 1983).

Sülfonamidler yarılanma ömürlerine göre (ilacın yarısının atılması için gerekli zaman);

- Kısa etkili olanlar (Yarılanma ömürleri 10 saatin altında)
- Orta etkili olanlar (Yarılanma ömürleri 10-24 saat arası)
- Uzun etkili olanlar (Yarılanma ömürleri 24 saatin üstü)

olmak üzere 3 gruba ayrılırlar. Kısa etkililer böbreklerden hızla atılan şekilleridir. Uzun etkililerin ise böbreklerden atılımı çok yavaştır ve haftada bir uygulama, yeterli plazma düzeyi sağlar (Özalp, 2002) .

1.6. Potansiyometrik Analiz Yöntemleri

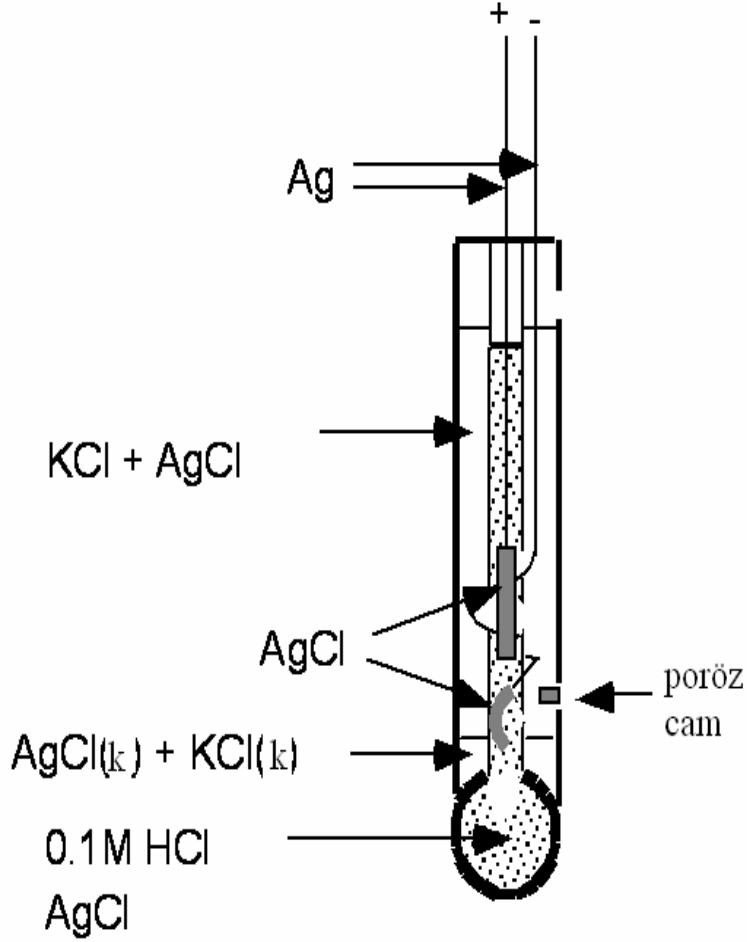
Elektrokimyasal hücrelerde fark edilebilir bir akımın geçmediği koşulda yapılan potansiyel ölçümlerine dayanan analiz yöntemleridir. Bir karşılaştırma elektrodu ve uygun bir çalışma elektrodu ile oluşturulan elektrokimyasal hücrede ölçülen gerilim değerlerini kullanarak hücre çözeltisindeki iyonların nicel analizine potansiyometri denir. Potansiyometrik yöntemlerin gerektirdiği düzenekler, basit ve ucuzdurlar. Birçok analitik uygulamada, elektrotlardan birinin yarı-hücre potansiyelinin sabit, çalışılan çözeltinin bileşiminden bağımsız olması ve değerinin bilinmesi istenir (referans elektrot).

1.6.1. Cam Elektrot

İyon seçici elektrotlar içinde en yaygın kullanılanı cam elektrottur. Cam elektrotta membran olarak ince bir cam zar vardır. Bu membran, yapısındaki oksitlerin türüne ve derişimine göre çeşitli iyonlara karşı seçimlilik gösterir (Şekil 1.28). H^+ iyonlarına karşı seçimlilik gösteren cam elektrot, H^+ iyonları derişiminin $1 - 10^{-13}$ M olduğu aralıkta Nernst eşitliğine uyar. Ölçülen elektrot gerilim değeri ile pH arasında doğrusal bir ilişki vardır. Nernst eşitliği aşağıdaki gibi verilir.

$$E_{\text{hücre}} = K - 0,0592 \text{ pH}$$

Ölçüm yapılmadan önce, ölçülecek pH değeri aralığına uygun tampon çözeltilerle kalibre edilmesi gerekir. Bu elektrot, çok asidik ve çok bazik çözeltilerde asit hatası ve çok bazik çözeltilerde alkali hatası nedeniyle kullanılmaz (Gündüz, 2002).



Şekil 1.28. Kombine cam pH elektrodu

1.6.2. Potansiyometrik Titrasyon

Potansiyometrik titrasyon, nicel analizde her titrant eklenmesinden sonra ölçülen gerilim değerlerinin, eklenen titrant hacmine karşı grafiğe geçirilmesini temel alır. Sigmoidal şekilli olan potansiyometrik titrasyon eğrilerinde, eşdeğerlik noktası

eğrinin eğiminin en büyük olduğu noktadır. Eşdeğerlik noktası civarında titrant eklenmesi çok özenli olarak yapılarak bu hacmin yeterli doğruluk ve kesinlikte belirlenmesi gerekir. Asit-baz tepkimelerinde cam elektrot kullanılır. Asidin veya bazın kuvveti azaldıkça, 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.

Potansiyometrik titrasyonlarda eşdeğerlik noktasının belirlenmesinde, mL titrant-mV, mL titrant – pH ve ϕ -pH grafiklerinden yararlanılır. Titrasyonda eşdeğerlik hacmi, titrasyon eğrisinin birinci ve ikinci türevleri alınarak saptanabilir.

1.7. Su-Organik Çözücü Karışımlarında pK_a Tayini

Su-organik çözücü karışımları, suda çözünmeyen bileşiklerin asitlik ve bazlık sabitlerinin tayinlerinde tercihli olarak kullanılmaktadır. Bu ortamların sıvı kromatografik ve kapiler elektroforetik ayırmalarda kullanılması ve bileşiklerin ayırmadaki davranışlarında iyonlaşma sabitlerinin etkin olmasından dolayı su - organik çözücü karışımlarındaki iyonlaşma sabitlerine ihtiyaç duyulmaktadır. İyonlaşma sabitlerinin tayininde alternatif yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar:

1. Potansiyometrik yöntemler
 2. Spektroskopik yöntemler
 3. Sıvı kromatografik yöntemler
 4. Elektroforetik yöntemler
- dir.

1.7.1. Potansiyometrik Yöntemle İyonlaşma Sabiti Tayini

İyonlaşma sabitlerinin tayininde bilinen ilk yöntemdir. Potansiyometrik titrasyon düzeneği, sıcaklık kontrollü ve inert atmosfer uygulanabilir şekilde hazırlanır. Kullanılan elektrodun kararlı ve çalışılan ortama uygun olması gereklidir. Son zamanlarda elektrot teknolojisindeki gelişmeler tekrarlanabilirlik ve duyarlılığı yeterli hale getirmiştir. Su-organik çözücü karışımlarında IUPAC'ın önerdiği titrant

KOH'dir. Ayarlı olması gerekir; titrasyon karbonat hatası getirmeyecek koşulda yapılmalıdır. İyonlaşma sabitinin tayininde son zamanlarda su-organik çözücü karışımlarında elektrot standardizasyonları yapılabildiği için elde edilen iyonlaşma sabitleri, termodinamik değerlerdir. Tüm titrasyon koşullarını, iyonik şiddet de dâhil olmak üzere dikkate alan ve sistematik yaklaştırmayı temel alan doğrusal olmayan (non-linear) regresyon programları bu amaçla kullanılmaktadır. Su-organik çözücü karışımlarının özelliklerinin bilinmesi, iyonlaşma sabitlerinin yorumlanmasını sağlamaktadır. Potansiyometrik yöntemle iyonlaşma sabiti tayininde 3–5 mM derişim yeterlidir. Suda çözünmeyen ve bu nedenle su ortamında iyonlaşma sabitleri tayin edilemeyen ilaçların iyonlaşma sabitleri potansiyometrik yöntemle su organik çözücü karışımında tayin edilir. Bu çalışmalarda iyonik şiddet fizyolojik iyonik şiddet olan 0,15 M değerine ayarlanır. Yasuda –Shedlovski ekstrapolasyonu uygulanarak sudaki değer belirlenir (Takacs-Novak vd., 1997; Avdeef vd., 1999).

1.7.2. Spektroskopik Yöntemler

İyonlaşma sabitleri spektrofotometrik ölçümler ile de tayin edilebilir (Polster ve Lachmann, 1989). Bunun için belli bir dalga boyu aralığında kaydedilen absorbans verilerinden yararlanılır. Bu tayinde aşağıdaki bağıntı esas alınmaktadır.

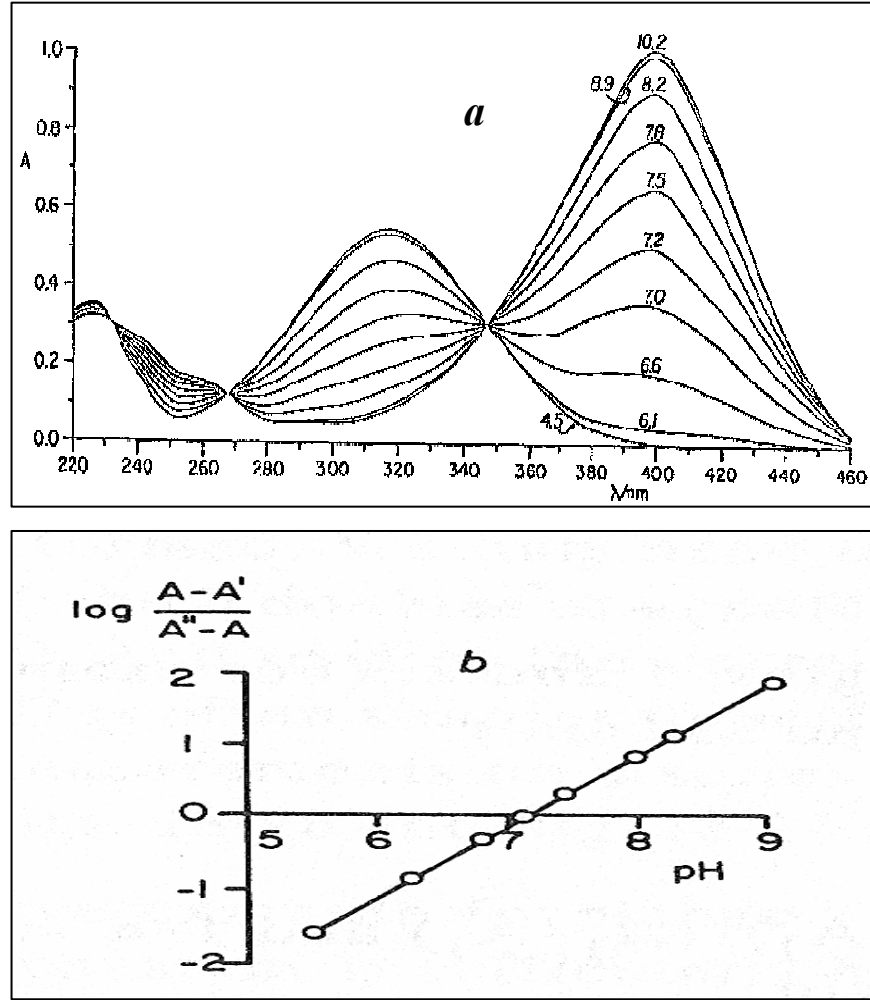
$$pK_a = pH + \log \frac{A_{obs} - A_M}{A_I - A_{obs}}$$

Bu bağıntıda A_M moleküler formun, A_I iyonlaşmış türlerin absorbans değerlerini ifade etmektedir. Absorbans pH a karşı grafiğe geçirilerek veya $\log ((A-A')/(A''-A))$ pH ya karşı grafiklenerek kesim noktasından pK_a değerleri bulunabilir (Şekil 1.29).

Spektrofotometrik yöntemin avantaj ve dezavantajları şunlardır:

- Yöntemin doğruluğu ve kesinliği yeterlidir.
- $10^{-5} - 10^{-6}$ M derişim çalışma için uygundur.
- Çalışılan bileşikler saf olmalıdır.
- Yapıda en az bir tane kromofor grubun bulunması ve bunun absorbans özelliklerinin yeterli olması gereklidir.

- Nötral ve iyonlaşmış formların spektral özelliklerinin yeterince farklı olması gerekir.



Şekil 1. 29. Spektroskopik bir çalışmada (a) $A - \lambda/\text{nm}$ ve (b) log absorbans farkı - pH grafikleri (A' : moleküler türün absorpsansı; A'' : iyonik türün absorpsansı)

Spektroskopik yöntemle tayinde günümüzde DAD sistemleri kullanılmakta ve bu sistemler LC-DAD ve CE-DAD olarak ayırma yöntemleri ile kombine olarak kullanılmaktadır (Beltran vd., 2003). Absorbanstaki en büyük değişme, pH'ın pK_a civarında olduğu koşulda gözlenir. Bu yaklaşımla suda az çözünen ilaçların pK_a değerleri tayin edilebilmektedir (Akay vd., 2002). Bu amaçla geliştirilmiş bilgisayar programları, pH ile dalga boyu ve absorpsans arasındaki ilişkiyi temel alır (Ando ve Heimbach, 1997; Allen vd., 1998; Mitchell vd., 1999). Spektroskopik yöntemle elde edilen veriler, potansiyometrik yöntemle elde edilen verilerle uyumludur.

1.7.3. Sıvı Kromatografik Yöntemler

Yöntem, özellikle sıvı kromatografik ayırmada yararlanılan organik çözücü – su karışımlarına uygulanabilmektedir. Çalışılan bileşiklerin alıkonma davranışları ile mobil faz pH' sı arasındaki ilişkilerden yararlanılarak iyonlaşma sabitleri tayin edilir. Kapasite faktörünün pH ile değişimi, sigmoidal davranış gösterir. Bu sigmoidalin orta noktasındaki pH değeri, o bileşiğin çalışılan ortamdaki iyonlaşma sabitini verir (Poole ve Poole, 1997; Hardcastle ve Jano, 1998). Ayrıca asidik veya bazik bileşiklerin pK_a sabitlerinin tayininde ortamın iyonik şiddetini de dikkate alarak hesaplama yapabilen non-lineer regresyon programları da geliştirilmiştir.

Bu yöntem ile çalışmanın bazı avantajları vardır;

- Bileşiğin saf olması gerekmez.
- ppm ve ppb düzeyinde analit ile çalışma imkanı sağlar.
- Çalışılan ortam su-organik çözücü ikili karışımdır.
- Bu ortamlardaki pH standardizasyonunun bilinmesi gereklidir.

1.7.4. Elektroforetik Yöntemler

Bu yöntem, özellikle büyük molekül kütleli bileşiklerin ayrılmasına uygulanabilmektedir. Kapiler elektroforez yönteminde (CE) çok düşük örnek hacimleri ve derişimleri ile çalışabilme olanağı vardır. Asidik veya bazik türlerin iyonlaşma sabitlerinin tayininde farklı pH'lardaki mobiliteler kullanılır. Sıvı kromatografi yönteminden farklı olarak suda pK_a tayini yapabilmemiz mümkündür (Janos, 2004). Ayrıca CE ile elde edilen pK_a değerlerinin CE-DAD ile karşılaştırma olanağı sağlar (Geiser vd., 2005; Poole vd., 2004).

Bu yöntem ile çalışmanın bazı avantajları vardır;

- Geniş bir pH aralığında çalışılabilir (pH 2-11).
- Yeterli doğruluk ve kesinlikte sonuçlar elde edilir.
- Bileşiklerin saf olması gerekmez.
- Sudaki çözünürlükleri düşük olan bileşiklerin tayini için uygundur.

- μM düzeyinde analit ile çalışma imkanı sağlar.
- Uygun kalibrasyon yöntemleri ile su-organik çözücü karışımlarında çalışma imkanı getirir.

1.8. İyonlaşma Sabitlerin Tayininde Kullanılan Bağıntılar

1.8.1. Kuvvetli Monoprotik Asitler için Gran Eşitlikleri

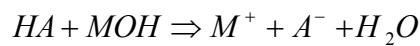
V_a hacminde derişimi C_a olan bir kuvvetli monoprotik asiti, C_b derişimindeki MOH kuvvetli bazı ile titre edelim. Titrasyon esnasında asit çözeltisine ilave edilen baz ile asitin bir kısmı tepkimeye girer ve aynı zamanda hacmin artışı nedeniyle geride kalan asit derişiminde seyrelme olur. Çözeltide eşdeğerlik öncesi bölgede $[H^+]$ aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır.

$$[H^+] = \frac{C_a V_a - C_b V_b}{V_a + V_b} \quad (1.1)$$

Eşdeğerlik noktasından ilerde ortamda baz fazlası vardır ve ortamda $[OH^-]$ aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır.

$$[OH^-] = \frac{C_b V_b - C_a V_a}{V_a + V_b} \quad (1.2)$$

Asitin bazla etkileşmesini ifade edelim.



$$[A^-] = \frac{C_a V_a}{V_a + V_b} \quad (1.3)$$

$$[M^+] = \frac{C_b V_b}{V_a + V_b} \quad (1.4)$$

Burada C_a ve C_b , asit ve bazın başlangıç derişimlerini; $V_a/(V_a + V_b)$ ile $V_b/(V_a + V_b)$ titrant ilavesi ile seyrelmeyi ifade eder.

Yük dengesini ifade edelim.

$$[H^+] + [M^+] = [A^-] + [OH^-] \quad (1.5)$$

$$[H^+] + \frac{C_b V_b}{V_a + V_b} = \frac{C_a V_a}{V_a + V_b} + [OH^-] \quad (1.6)$$

Bu ifadeyi

$\Delta = [H^+] - [OH^-]$ yi vermek üzere düzenleyelim.

ϕ , nötrale edilen asitin kesrini gösteren mol oranıdır ve aşağıdaki bağıntı ile verilir.

$$\phi_{ab} = \frac{C_b V_b}{C_a V_a}$$

ϕ_{ab} , titrasyonun başlangıcında 0; eşdeğerlik noktasında 1 dir. Titrasyon süresince V_b ile değişir.

Eşdeğerlik noktasını lineer bir ilişki ile belirlemek istediğimizde 6 nolu eşitliği Δ cinsinden ifade ederiz.

$$\Delta = [H^+] - [OH^-] = \frac{C_a V_a - C_b V_b}{V_a + V_b}$$

Bu eşitliğe $V_{eş}$ terimini yerleştirelim. Bilindiği gibi eşdeğerlik noktasında $\phi_{ab} = 1$ dir .

$$\phi_{ab} = \frac{C_b V_{eş}}{C_a V_a} \text{ olur ve } V_{eş} = \frac{C_a V_a}{C_b} \text{ olarak ifade edilebilir.}$$

Önceki eşitlikte $C_a V_a$ yı $V_{eş} C_b$ olarak ifade edelim.

$$\Delta = [H^+] - [OH^-] = \frac{C_a V_a - C_b V_b}{V_a + V_b}$$

$$\Delta = \frac{C_b V_e - C_b V_b}{V_a + V_b}$$

$$\Delta(V_a + V_b) = C_b (V_{eş} - V_b)$$

eşitliği elde edilir. Eşitliğin sol tarafında bilinenler mevcuttur.

$$\Delta(V_a + V_b) = C_b V_{eş} - C_b V_b$$

$\Delta(V_a + V_b)$ ile V_b ilişkisi lineerdir. Eğim, $-C_b$ ve x eksenini kestiği nokta ise

$$V_b = V_{eş}$$

dir.

Bu eşitlik, asidik bölgede $\Delta = [H^+] - [OH^-] \approx [H^+]$ ve bazik bölgede $\Delta = [H^+] - [OH^-] \approx [OH^-]$ yaklaşımı ile düşünülür.

$\Delta = [H^+] - [OH^-] \approx [H^+]$ olduğundan $\Delta(V_a + V_b) = C_b (V_{eş} - V_b)$ gösterimi

$$[H^+](V_a + V_b) = C_b (V_{eş} - V_b)$$

şeklinde gösterilir. Bu bağıntı sıklıkla aşağıdaki şekilde verilir.

$$\phi = (V_0 + V_{KOH}) \cdot 10^{-pH} \quad (\text{asidik bölge}) \quad (1.7)$$

Eşdeğerlik ötesinde bazik bölgede $\Delta = [H^+] - [OH^-] \approx -[OH^-]$ olduğundan

$$\Delta(V_a + V_b) = C_b(V_{eş} - V_b) \text{ gösterimi}$$

$$- [OH^-](V_a + V_b) = C_b(V_{eş} - V_b) \text{ veya}$$

$$[OH^-](V_a + V_b) = C_b(V_b - V_{eş}) \text{ şeklinde gösterilir.}$$

Bu son bağıntıyı biraz daha düzenleyelim.

$$[OH^-](V_a + V_b) = C_b(V_b - V_{eş})$$

$$\frac{K_{su}}{[H^+]}(V_a + V_b) = C_b(V_b - V_{eş})$$

$$\frac{(V_a + V_b)}{[H^+]} = \frac{C_b}{K_{su}}(V_b - V_{eş})$$

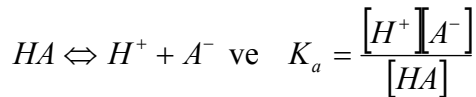
Bu ifade ilk defa Gran tarafından kullanıldığı için Gran eşitliği olarak bilinir (Gran, 1952; Gran 1988). $(V_a + V_b) / [H^+] - V_b$ ilişkisi lineerdir ve x eksenini kesim noktası $V_b = V_{eş}$ dir. Bu bağıntı sıklıkla aşağıdaki şekilde ifade edilir (Levie, 1997).

$$\phi = (V_0 + V_{KOH}) \cdot 10^{+pH} \quad (\text{bazık bölge}) \quad (1.8)$$

1.8.2. Zayıf Monoprotik Asitler için Gran Eşitlikleri

Bir HA tek protonlu zayıf asitinin MOH kuvvetli bazı ile titre edildiğini düşünelim. Asitin iyonlaşma sabiti K_a olsun. Bu tip bir titrasyonda eğri, başlangıç, eşdeğerlik öncesi, eşdeğerlik ve eşdeğerlik sonrası bölgeler olarak düşünülür.

Bilindiği gibi HA asitinin iyonlaşma dengesi



dir. Eşdeğerlik öncesinde HA'nın iyonlaşmamış halinin derişimi aşağıdaki gibi hesaplanır.

$$[HA] \cong \frac{C_a V_a - C_b V_b}{V_a + V_b}$$

Aynı şekilde $[A^-]$ derişimi de aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır.

$$[A^-] \cong \frac{C_b V_b}{V_a + V_b}$$

Bu iki eşitliği birleştirdiğimizde ve K_a bağıntısını düzenlediğimizde

$$[H^+] = \frac{K_a [HA]}{[A^-]} \cong \frac{\frac{K_a (C_a V_a - C_b V_b)}{(V_a + V_b)}}{\frac{C_b V_b}{(V_a + V_b)}} \quad (1.9)$$

bağıntısı elde edilir. Bu eşitliği $V_{eş}$ için aşağıdaki bağıntımızı düşünerek yeniden düzenleyelim.

$$V_{eş} = \frac{C_a V_a}{C_b}$$

Bu durumda aşağıdaki bağıntı elde edilir.

$$[H^+] = \frac{K_a [HA]}{[A^-]} \cong \frac{\frac{K_a (C_a V_a - C_b V_b)}{C_b}}{\frac{C_b V_b}{C_b}}$$

$$[H^+] = \frac{K_a (V_{eş} - V_b)}{V_b}$$

Görüldüğü gibi Gran eğrisinin eşdeğerlik öncesi bölgesi için kalibrasyon fonksiyonu budur. Bu bağıntıyı lineer fonksiyon olarak düşünelim.

$$[H^+]. V_b = K_a V_{eş} - K_a V_b \quad (y = a - mx).$$

Burada değişken V_b ile gösterilen baz hacmidir. V_b nin katsayısı eğimdir. –Eğim bize K_a yı verir. $y = 0$ iken $V_{eş} = V_b$ dir. Eşdeğerlik sonrası bölgede ise ortamda kuvvetli baz hakimdir ve kuvvetli bazla ilgili Gran fonksiyonu bu amaçla kullanılır. Bu fonksiyon x ekseninde ϕ_{ab} kullanılarak da hazırlanabilir. 9 no’lu bağıntıyı terimleri götürecek şekilde düzenlediğimizde,

$$\begin{aligned} [H^+] &\cong \frac{K_a(C_a V_a - C_b V_b)}{C_b V_b} \\ [H^+] C_b V_b &= K_a C_a V_a - K_a C_b V_b \end{aligned}$$

olarak yazabiliriz.

Her iki tarafı asidin mmol sayısına bölersek ($C_a V_a$) bu durumda eşitlik,

$$\frac{[H^+] C_b V_b}{C_a V_a} = \frac{K_a C_a V_a}{C_a V_a} - \frac{K_a C_b V_b}{C_a V_a}$$

$$\phi_{ab} = \frac{C_b V_b}{C_a V_a}$$

$$[H^+] \phi_{ab} = K_a - K_a \phi_{ab}$$

ϕ_{ab} V_b ile değişir ve eşdeğerlik noktasında 1’dir. $\phi_{ab} = 0$ olduğunda titrasyon başlangıç noktasındadır. Bu fonksiyonda da eğim yine $-K_a$ yı verir. Diprotik asitlerde bilinmeyen parametre sayısı oldukça fazladır. Ancak pK_{a1} ve pK_{a2} değerleri arasındaki fark yeterli olduğunda titrasyon eğrilerinin lineerleştirilmesi, iki farklı monoprotik asit gibi düşünülerek yapılır (Levie, 1997).

1.8.3. Gran Metodu Kullanılarak Karbonat Hatasının Hesaplanması

Standart baz çözeltilerinin hazırlanmasında kullanılan katı maddeler daima karbonat iyonu ile kirlenmiş haldedirler. Ticari olarak satılan ve ayarlı olduğu belirtilen maddelerde bile %0,5 –1,5 karbonat hatası söz konusudur. Karbonat hatası %2 değerini geçtiği zaman analizde problem getirir. Bir baz çözeltisi ayarlanmadan önce karbonat uzaklaştırmak için genellikle bir işlem gerekir. Karbonat hatasını gidermede önemli bir yaklaşım çözeltiye bir miktar baryum tuzu ilave edilerek bekletmek ve sonra üstteki berrak kısmı ayarlayarak kullanmaktır. Baz çözeltisinin kuvvetli asit ile ayarı, Gran fonksiyonu ile yapılır. Gran fonksiyonu bu amaçla kullanılmak istendiğinde öncelikle bir potansiyometrik titrasyon düzeneğinde belli derişimdeki kuvvetli asit, ayarlanacak baz ile titre edilir ve takiben absis (x) ekseninde mL baz, ordinat ekseninde Gran fonksiyonu kullanılarak eşdeğerlik öncesi ve sonrası bölgede elde edilen iki lineer fonksiyonun absis eksenini kestiği yerler bulunur.

$$\phi = (V_0 + V_{\text{KOH}}) \cdot 10^{-\text{pH}} \quad (\text{asidik bölge})$$

$$\phi = (V_0 + V_{\text{KOH}}) \cdot 10^{+\text{pH}} \quad (\text{bazik bölge})$$

Burada

V_0 = Başlangıç hacmi

V_{KOH} = İlave edilen KOH hacmi
dir.

Asidik bölgede ϕ 'nin 0 olması için elde ettiğimiz lineer fonksiyonun eğim ve kesim noktalarından yararlanırız. Çözeltide % karbonat hatasını hesaplamak için;

% karbonat hatası = ((bazik bölgedeki kesim - asidik bölgedeki kesim / 2) / bazik veya asidik bölgedeki kesim) x 100

formülü kullanılır.

Karbonat hatasını gidermek için çalışmada ticari ayarlı titranta baryum tuzu ilavesi ile karbonatı çöktürülmüş titrant kullanılması gerekir. Bazik bölgede excel ile

bulunan kalibrasyon fonksiyonunda yaklaştırmalardan dolayı hatalı değer bulunur. Bu nedenle bazık bölgedeki veriler microcal origin gibi bir hesap programında değerlendirilir.

1.8.4. Kromatografide Horvath – Melander – Molnar Bağıntıları

Kromatografik ayırma, çözünen (S) ile ODS gibi hidrokarbon ligand (L) arasında oluşan kompleksin davranışıyla gerçekteşir (Horvath vd., 1977). Bu denge aşağıdaki bağıntı ile ifade edilir.



Bu dengeye ait denge sabiti 1.11 eşitliği ile verilir.

$$K = \frac{[SL]}{[S][L]} \quad (1.11)$$

Zayıf bir monoproitik asit (HA) mobil fazda kısmen iyonlaşır.



Buna özgü denge sabiti, K_{a_m} , aşağıdaki bağıntı ile ifade edilir.

$$K_{a_m} = \frac{[H^+]_m [A^-]_m}{[HA]_m} \quad (1.13)$$

Bu bağıntıda $[H^+]_m$, $[A^-]_m$ ve $[HA]_m$ türlerin mobil fazdaki derişimleridir.

Bir kromatografik ayırmada zayıf asitin sabit faz ile etkileşmesi ve buna özgü denge sabiti, K_{LHA} , aşağıdaki eşitlikler ile ifade edilir.



$$K_{LHA} = \frac{[LHA]_s}{[HA]_m [L]_s} \quad (1.15)$$

Burada $[LHA]_s$ ve $[L]_s$ oluşan kompleks ve sabit gazın derişimlerini göstermektedir.

Oluşan anyonik tür ile kolondaki etkileşim ve buna özgü denge sabiti şu şekilde verilir.



$$K_{LA^-} = \frac{[LA^-]_s}{[A^-]_m [L]_s} \quad (1.17)$$

Bir çözünenin alıkonması kapasite faktörü ile ifade edilir. ϕ verilen bir kolonda sabit faz ve mobil fazın hacim oranlarıdır ve sabittir.

$$k = \phi \frac{[LHA]_s + [LA^-]_s}{[HA]_m + [A^-]_m} \quad (1.18)$$

Bu son bağıntı 1.13, 1.15, 1.17 bağıntılarından yararlanılarak aşağıdaki şekilde ifade edilebilir.

$$k = \phi \frac{K_{LHA} [L]_s + K_{LA^-} [L]_s \left[\frac{K_{a_m}}{[H^+]_m} \right]}{1 + \left[\frac{K_{a_m}}{[H^+]_m} \right]} \quad (1.19)$$

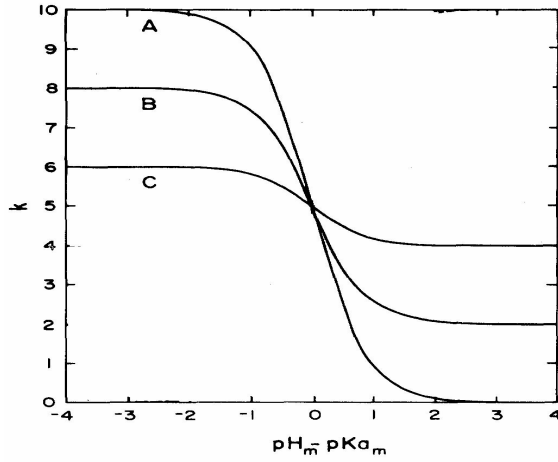
Moleküler formun kapasite faktörü ve iyonlaşan formun kapasite faktörü sırasıyla

$$k_o = \phi [L]_s K_{LHA} \quad \text{ve} \quad k_{-1} = \phi [L]_s K_{LA^-}$$

olarak verilebilir. Bu bağıntılar genel eşitlikte (1.19) yerine yazılırsa son denklem elde edilir.

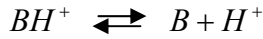
$$k = \frac{k_0 + k_{-1} \frac{K_{a_m}}{[H^+]_m}}{1 + \frac{K_{a_m}}{[H^+]_m}}$$

Bu bağıntı, mobil faz pH sı ve kapasite faktörlerini kullanarak zayıf asitin iyonlaşma sabiti hesaplanabilir.



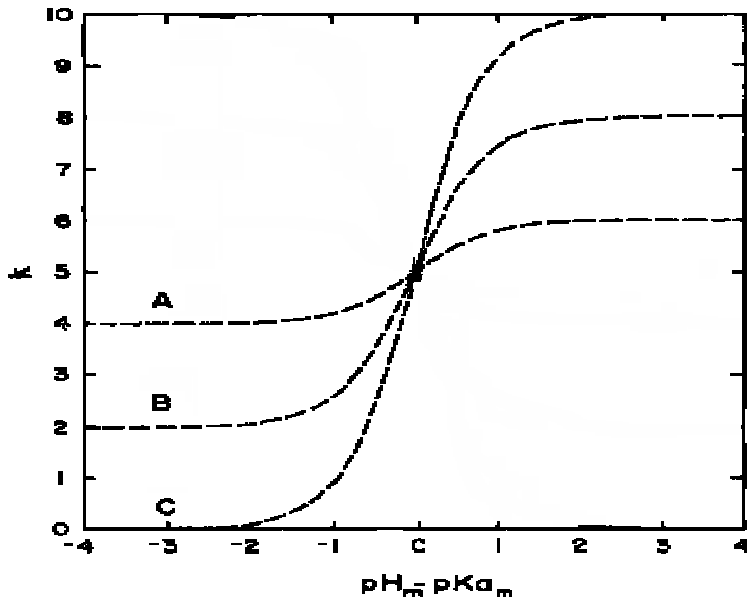
Şekil 1.30. Zayıf asidik bileşiklerde k-pH arasındaki ilişki

Zayıf monoprotik bir bazın mobil fazda iyonlaşma dengesi için verilen eşitlik elde edilir.



Monoprotik zayıf bazlar için verilen denklem ve eşitlikler düzenlenirse yandaki bağıntı elde edilir. Burada k_0 nötral ve k_1 protonlanmış bazın kapasite faktörleridir.

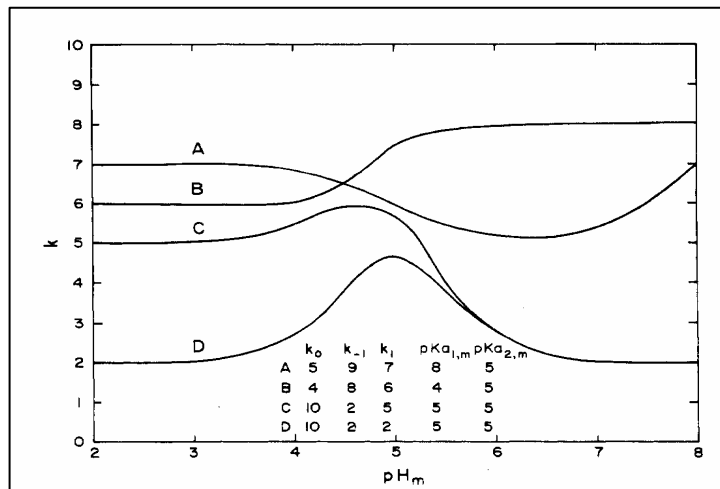
$$k = \frac{k_0 + k_{-1} \frac{[H^+]_m}{K_{a_m}}}{1 + \frac{[H^+]_m}{K_{a_m}}}$$



Şekil 1.31. Zayıf bazik bileşiklerde k-pH arasındaki ilişki

Benzer olarak verilen eşitlikler amfolit bileşikler için düzenlenirse yandaki eşitlik elde edilir. Burada k_0 , k_{-1} ve k_1 sırasıyla nötr, anyonik ve katyonik türlere ait kapasite faktörleridir.

$$k = \frac{k_0 + k_{-1} \frac{K_{a1_m}}{[H^+]_m} + k_1 \frac{[H^+]_m}{K_{a2_m}}}{1 + \frac{K_{a1_m}}{[H^+]_m} + \frac{[H^+]_m}{K_{a2_m}}}$$



Şekil 1.32. Amfoterik bileşiklerde k-pH arasındaki ilişki

1.8.5. Kromatografide Temel Kavramlar

Kromatografide bir pik, alıkonma zamanı, t_R , ile tanımlanır. Kromatografide karşılaştırmalarda alıkonma zamanı yerine kapasite faktöründen, k , yararlanılır. Kapasite faktörü, aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1.20)$$

Burada t_R bileşene, t_0 , kolonda tutunmayan türe ait alıkonma zamanlarıdır. k değerinin büyük oluşu, bileşenin sabit fazda iyi tutulduğu için kolon boyunca yavaş ilerlediğini; k değerinin küçük olması, bileşenin mobil faza ilgisinin fazla olmasından dolayı kolon boyunca hızlı ilerlediğini gösterir. HPLC ayırmalarında k , mümkün olduğunca 1-10 arasında tutulmalıdır. k çok küçükse, bileşik, çözücü pikinden ayrılamaz; k çok büyürse ayırma işlemi çok zaman alır. k değerlerinin bu aralıkta olması, mobil faz ve durgun faz bileşimlerinin değiştirilmesi ile sağlanır.

İki pikin birbirinden ayrılması seçicilik faktörü α , ile verilir.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R_2} - t_{R_0}}{t_{R_1} - t_{R_0}} \quad (1.21)$$

dır. α , 1,15 ise iki bileşiğin %98 oranında fazla birbirinden ayrıldığı kabul edilir.

Birbirini izleyen iki pik arasındaki ayırma gücü, R_s , için farklı hesaplama yöntemleri geliştirilmiştir. Aşağıdaki bağıntı kullanılarak hesaplama yapılabilir.

$$R_s = (1/4)\sqrt{N} [(\alpha-1)/\alpha] [k/(1+k)] \quad (1.22)$$

Burada;

R_s : Pik çifti için ayırma gücü,

$\sqrt{N}$: Etkin tabaka sayısı,

α : Seçicilik faktörü,

k : Kapasite faktörü

dür.

Ayırma gücü için geliştirilen diğer bir bağıntı, aşağıda verilmiştir.

$$R_S = 1,18 \times \frac{(t_2 - t_1)}{W_{0,5} + W_{p0,5}} \quad (1.23)$$

Burada;

R_S : Pik çifti için ayırma gücü,

t_1 : Birinci pikin alıkonma zamanı, s,

t_2 : İkinci pikin alıkonma zamanı, s,

$W_{0,5}$: Birinci pikin zaman ekseninde yarı genişliği,

$W_{p0,5}$: İkinci pikin zaman ekseninde yarı genişliği

dir.

Bir kromatografik ayırmada en az ayrılan pikler, kritik pik çifti olarak adlandırılır.

Pik çiftinin temel çizgide birbirinden ayrılabilmesi için ayırma faktörünün 1,5 olması gerekir.

Bir kromatografik ayırmada etkin tabaka sayısı, aşağıdaki bağıntı ile belirlenir.

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{0,5}} \right)^2 \quad (1.24)$$

Burada;

N : Teorik tabaka sayısı

t_R : Bileşene ait alıkonma zamanı

$W_{0,5}$: Pikin yarı yüksekliğindeki pik genişliği

dir.

Bir kromatografi kolonunun boyu, L , ile hesaplanan N değeri kullanılarak, kolondaki bir kuramsal plakanın yüksekliği, H hesaplanır. t_R 'nin değeri, L ile doğru orantılı, t_R/t_W 'nin değeri ise $(L)^{1/2}$ ile doğru orantılı olduğundan, bir pikin genişliğinin ölçüsü olan t_W değeri de $(L)^{1/2}$ ile doğru orantılı olarak artar. Bir kolonda N değeri ne kadar büyük ise, yani H değeri ne kadar küçük ise, kolonun verimi o kadar yüksektir. H 'nin değerini büyüten her etken, kolonun verimini düşürür ve pik genişlemesine neden olur.

1.8.6. Sıvı Kromatografide Mobil Faz Optimizasyonu

Sıvı kromatografik bir yöntemin geliştirilmesinde üzerinde durulacak en önemli husus, yeterli ayırmaya ulaşıldığının belirlenmesidir. Yüksek performans sıvı kromatografide ayırmanın optimizasyonu, seçiciliğin maksimum hale getirilmesini gerektirir. Kromatografik sistemin seçiciliği, kromatografik sistemde çözünen, mobil faz bileşenleri ve durgun faz arasındaki bütün etkileşimleri yansıtır. Bu etkileşimler, sıcaklık, mobil fazın yapısı, mobil faz pH'sı gibi deneysel koşulların değiştirilmesiyle yönetilebilir. Bu faktörlerin ikisi sabit tutularak diğer değişkenin, analitin alıkonmasındaki etkisi incelenir. Seçicilik, çözünenlerin dağılma katsayıları ile ilgilidir ve çözünenlerin kapasite faktörlerinin bir fonksiyonudur. Bu nedenle çözünenlerin alıkonma davranışlarını ve onların deneysel koşullara bağımlılığını anlamak, seçiciliğin ve devamında ayırmanın optimizasyonu için gereklidir.

Mobil fazın bileşimi, ters faz sıvı kromatografide bileşiklerin alıkonmalarında en önemli rolü oynar (Dolan vd., 1979; Barwick, 1997). Mobil faz olarak kullanılan su-organik çözücü karışımlarında polarite, mobil fazın bileşikleri elue etme gücünün bir ölçüsüdür ve çözünenin kolon ile etkileşimini belirleyen temel faktördür. RPLC'de alıkonma, mobil fazın polaritesinin artmasıyla yani su ilavesiyle artar. Bu güç çoğu kez organik çözücü-su karışımlarında organik fazın yüzdesi ile ifade edilir. Sabit pH'da alıkonmanın çözücü bileşimi (ϕ) ile değişimini belirlemek üzere aşağıdaki doğrusal yaklaşım kullanılır (Schoenmakers vd., 1991).

$$\ln k_i = \ln k_0 - S\phi \quad (1.25)$$

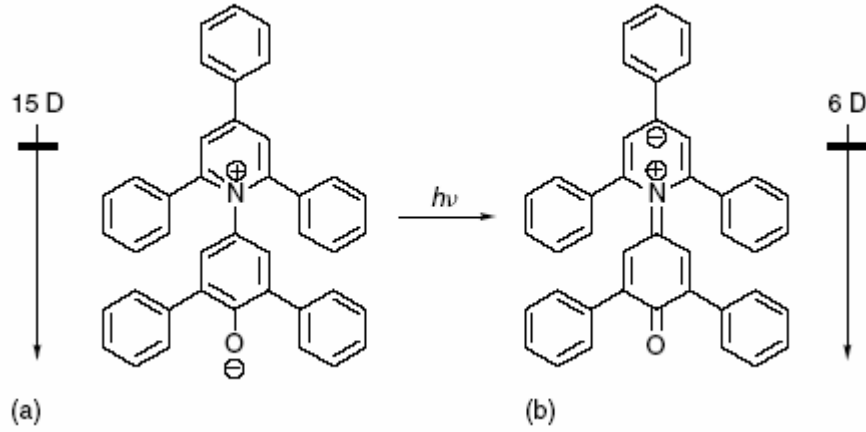
Burada k_0 , ϕ 0 olduğunda (saf su veya tampon çözelti mobil faz olarak kullanıldığında) ekstrapolasyonla bulunan kapasite faktörüdür. S ise eğimdir. Kapasite faktörü 1-10 arasında değilse $\ln k$ 'nın ϕ 'ye göre çizimi bir eğri verir. İkinci dereceden denklemi kullanmamak için kapasite faktörünün 1-10 arasında olması istenir.

Asetonitril düşük vizkozitesi, düşük absorpsiyonu, simetrik pik şekli verebilmesi, polaritesi ve dielektrik sabitinden dolayı ($\epsilon = 35,9$) organik çözücü olarak ters faz sıvı kromatografide sıklıkla kullanılır. Çizelge 1.1'de ters faz sıvı kromatografide sıkça kullanılan organik çözücülerin önemli özellikleri verilmiştir.

Çizelge 1.1. Sıvı kromatografide sıklıkla kullanılan çözücüler ve özellikleri

Çözücü	Molekül ağırlığı	K.N °C	R.I	UV abs. nm	Viskozite cP	μ Debye
Asetonitril	41	82	1,341	195	0,358	3,37
Metanol	32	65	1,326	205	0,584	1,66
Etanol	46	78	1,359	205	1,19	1,68
Dioksan	88	101	1,421	215	1,26	0,45
Tetrahidrofuran	72	66	1,404	215	2,20	1,70
Isopropanol	60	82	1,375	205	2,39	1,68
Su	18	100	1,333	185	1,00	1,84

Solvatokromik çözücü-polarite ölçümleri, kromatografik alıkonmada mobil faz polaritesinin değişmesinin bağımsız incelenmesine imkân tanımaktadır. LC'de ve diğer kromatografi türlerinde tutunma olayını incelemek için kullanılan iki solvatokromik skala vardır. Dimroth ve Reichardt'ın $E_T(30)$ skalası, tek parametre skalasıdır. $E_T(30)$ skalası, 2,6-difenil-4-(2,4,6-trifenil-N-piridino) fenolat (ET30, Dimroth-Reichardt betaini) molekülünün (Şekil 1.3.) elektronik absorpsiyonuna ait $\lambda_{\max}$ değerinin çözücünün polaritesi ile değişmesini belirtmektedir (Johnson vd., 1986; Reichardt, 1994).



Şekil 1.33. ET-30 molekülü; a) temel halde b) uyarılmış formda

Reichardt betaini kullanılarak belirlenen polarite değerleri, $E_T(30)$ olarak verilir. Yaklaşık 200 çözücü ve çözücü karışımının $E_T(30)$ değerleri bilinmektedir. $E_T(30)$ çözücü polarite skalası, hidrojen bağı donör kabiliyetine (HBD) olduğu gibi çözücünün dipolarite / polarizlenme özelliğine de duyarlıdır. Diğer skala ise Kamlet ve arkadaşlarının geliştirdiği π^* çözücü polarite / polarizlenebilirlik özelliği ile ilişkili çok parametrelilik π^* skalasıdır (Kamlet vd., 1983). Bu skala, hidrojen bağı veya iyon dipol etkileşimleri gibi kuvvetli bağların olmadığı çözücü çözünen etkileşimlerini açıklayabilmek için geliştirilmiştir. Ayrıca çözücünün hidrojen bağı donör veya akseptör etkileşimlerinin α ve β skalaları, bu güçlü bağlanmaları ifade etmek için kullanılır (Çizelge 1.2). Kamlet - Taft yöntemleri, tek parametre skalasından daha açıktır, çünkü üç farklı etkileşimi ayrı ayrı ifade edebilmektedir. $E_T(30)$ skalası, tek parametre skalası olmasına rağmen çözücünün dipolarlık / polarizlenebilirlik özelliği kadar çözücünün hidrojen bağı donör kabiliyetini de ifade edebilmektedir ve hidrojen bağı verme etkisine karşı duyarlılığı bu skalayı sulu, ters faz mobil fazları ile ilgili çalışmalarda yararlı hale getirir.

Kamlet ve arkadaşlarına göre verilen bir çözücünün $E_T(30)$ polaritesi, dipolarite/polarizabilite skalasına (π^*) ve çözücünün hidrojen bağı donör veya akseptör etkileşimlerinin α ve β skalalarına aşağıdaki eşitlikle bağlanabilir.

$$E_T(30) = 28,21 + 12,40\pi^* + 14,40 \alpha \quad (1.26)$$

Metanol-su ve asetonitril-su çözücü karışımları için bu değerlerin su muhtevası arttıkça arttığı bilinmektedir (Çizelge 1.2) (Roses ve Bosch, 1993; Bosch vd., 1994).

Çizelge 1.2. Asetonitril-su karışımları için solvatokromik parametreler

Hacimce yüzde (%v/v)	Ağırlıkça yüzde (%w/w)	Mol kesri x	α	β	π^*	E_T^N
0	0	0	1,13	0,580	1,14	1
5,0	3,9	0,0177	1,088	0,590	1,132	0,98
10,0	8,0	0,0366	1,047	0,590	1,114	0,95
12,5	10,0	0,0465	1,029	0,600	1,104	0,94
15,0	12,1	0,0568	1,012	0,600	1,095	0,92
20,0	16,3	0,0787	0,981	0,600	1,075	0,90
25,0	20,6	0,1022	0,956	0,610	1,055	0,88
30,0	25,0	0,1277	0,937	0,610	1,035	0,86
35,0	29,5	0,1553	0,923	0,610	1,014	0,84
	30,0	0,1583	0,922	0,610	1,012	0,84
40,0	34,2	0,1855	0,913	0,610	0,993	0,83
45,0	38,9	0,2184	0,908	0,610	0,971	0,82
	40,0	0,2264	0,908	0,610	0,966	0,82
50,0	43,8	0,2546	0,906	0,610	0,949	0,81
55,0	48,8	0,2945	0,906	0,610	0,927	0,80
	50,0	0,3051	0,906	0,610	0,922	0,80
60,0	53,9	0,3387	0,905	0,600	0,905	0,79
65,0	59,1	0,3881	0,903	0,600	0,884	0,78
70,0	64,5	0,4435	0,897	0,600	0,863	0,77
	70,0	0,5059	0,89	0,590	0,84	0,76

log k değerleri ile $E_T(30)$ mobil faz solvatokromik parametresi arasında doğrusal bir ilişki olduğu belirlenmiştir. log k değerleri ile çözünenin $E_T(30)$ değeri arasındaki ilişki, log k'nın organik modifiyerin mol kesrine olan ilişkisinden daha iyi bir doğrusallık gösterir. $E_T(30)$ parametresi yerine E_T^N normalize edilmiş parametre (birimsiz), diğer parametrelerle aynı birimlerin kullanılabilmesi amacıyla tercih edilmektedir. Normalize edilmiş parametre aşağıdaki bağıntı ile bulunur.

$$E_T^N = [E_T(\text{çözücü}) - E_T(\text{TMS})] / [E_T(\text{su}) - E_T(\text{TMS})] \quad (1.27)$$

Burada $E_T(\text{TMS})$ trimetil silanolün E_T değerini göstermektedir.

Log k ile bu parametre arasındaki ilişki aşağıdaki bağıntı ile verilir.

$$\text{Log } k = C + e E_T^N \quad (1.28)$$

Burada C kesim noktası, e ise eğimdir. Bu bağıntı, kompleks karışımların ayrılmasında deneysel çalışmayı önemli ölçüde azaltır. Bu model, ayırmanın optimizasyonu için farklı organik modifiyer derişimlerinde ve mobil fazın farklı pH değerlerinde bileşiklerin kromatografik davranışlarını tahmin etmemizi sağlar. Burada eğim, çözünenin tutunmasının mobil faz polaritesindeki değişmelere ne dereceye kadar duyarlı olduğunu ifade eder. Bir bileşiğin organik modifiyer derişimi değişik olan iki farklı mobil fazda k değerlerinin ölçümü, kromatografik ayırma için yeterli olabilir. log k - E_T^N lineerliği nedeniyle birçok durumda iki kapasite faktörü değerinin bulunması ile bu bağıntı kullanılarak mobil faz optimize edilebilir.

1.8.7. Mobil Fazda pH Standardizasyonu

Kromatografik ayırmada mobil faz pH'sı, iyonlaşabilen bileşiklerin ayrılmasında önemli bir faktördür. Bilindiği gibi kapasite faktörü, çözünenin nötral ve iyonik formlarının kapasite faktörlerinin mobil fazda bu formların mol kesirlerine göre ağırlıklı ortalamasıdır.

Sıvı kromatografide kullanılan mobil fazların pH'sı, önceleri sulu çözeltinin pH'sı olarak alınmıştır. Oysa HPLC çalışmalarında su hiçbir şekilde tek başına mobil faz olarak kullanılamaz. Tampon çözelti halinde veya bir organik modifiyer ile birlikte kullanılır. Bundan dolayı organik modifiyer ilavesi ile pH değişimini göz önüne almak gerekir (Roses vd., 1996; Augiar de vd., 1997). HPLC mobil fazında organik modifiyer olarak genellikle asetonitril ve metanol tercih edilir. Bu ortamlarda pH standardizasyonu ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Barbosa vd., 1999; Barbosa ve Sanz-Nebot, 1995; Covington vd., 1985). Sulu faz pH'sının ölçümü çok daha kolaydır, ancak su organik çözücü karışımında elektrolitin iyonlaşması seçimli solvasyona çok bağımlıdır ve çözünene göre değişir. Bu nedenle HPLC mobil fazına ve su ortamına ait pK_a değerleri farklıdır (Bosch vd., 1998). Organik çözücü-su

karışımlarında ortamın dielektrik sabitinin azalması nedeniyle aktivite katsayıları dikkate alınmaktadır. pH'nın sudaki pH yerine mobil fazdaki değerinin kullanılması, çözünenin tutulması ile pH arasındaki ilişkiye çok daha iyi uyum göstermektedir.

Referans değer pH standart çözeltisi (RVS) olarak potasyum hidrojen fitalat çözeltisi seçilmiştir ve 0,05 mol/kg fitalat temel alınmıştır (Rondinini vd., 1987). Asetonitril-su ortamında (%70'e kadar) potasyum hidrojen fitalat tamponu için çeşitli sıcaklıklarda standart pH değerleri belirlenmiştir ve değerler Çizelge 1.3'de verilmiştir (Rondinini ve Nese, 1987).

Çizelge 1.3. Asetonitril su karışımında 0,05 m KHPH için pH_s değerleri

t, °C	Asetonitrilin ağırlıkça yüzdesi, %w/w ve mol kesri,x				
	5; 0,0226	15;0,0719	30;0,1583	50;0,3050	70; 0,5059
15	4,163	4,533	5,001	5,456	6,159
25	4,166	4,533	5,000	5,461	6,194
40	4,178	4,542	5,008	5,475	6,236

Asetonitril-su ve metanol-su gibi çözücü karışımlarında standart referans tampon çözeltilerinin bu ortamlara ait pH değerleri, pH_s, bilindiği için bu karışımlarda pH ölçümleri pH'nın tanımına uygun olarak aşağıdaki bağıntı dikkate alınarak yapılır.

$$pH_x = pH_s + \frac{E_s - E_x}{g} \quad (1.29)$$

Burada pH_x, X çözeltisinin pH değeri, pH_s, referans standart çözeltinin pH değeri, E_s ve E_x sırasıyla referans standart çözeltinin ve X çözeltisinin e.m.k değerleri ve g, Nerst sabitidir ($g = (ln10)RT/F$) (Barbosa vd., 1998a,b).

Mobil fazın pH'sı, alıkonmanın anlaşılmasında son derece önemlidir. Mobil faz pH'sı, çözünenlerin iyonlaşma derecesini, durgun faz ve mobil faz katkılarının davranışlarını etkilediği için seçiciliğin optimizasyonunda dikkate alınmalıdır. Mobil fazın pH optimizasyonu, çözücü bileşiminin optimizasyonundan çok daha

komplikedir. Zira pH'nın değişmesi ile sadece iyonlaşan cözünen yapıların seçicilik ve alıkonma özellikleri değişmez, aynı zamanda pik genişliği ve pik simetrisi de değişir. Bu nedenle ayırmanın hesabında pik simetrisinin de göz önüne alınması gerekir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Sülfonamidler, ilk bulunan antibakteriyeller olmalarına rağmen bu bileşiklerin özelliklerini inceleyen yeterli çalışmalar, yeni tekniklerin gelişimiyle beraber son yıllarda yapılmıştır.

Sülfonamidler, veterinerlikte çok kullanılan antibakteriyellerdir ve hayvansal ürünlerde kalıntılarının tayini giderek önem kazanmıştır. Avrupa birliği hayvansal orijinli gıdalarda bu bileşikler için maksimum kalıntı limitini 0,1 ppm olarak belirlemiştir (Anonim, 1991). Yine bu bileşiklerle çalışmada ortalama geri kazanmanın %70-%110 aralığında olması ve geri kazanma için RSD< %20 olması gerektiği belirtilmektedir (Anonim, 1993). Bu nedenle sülfonamidlerin kalıntı tayininde sıvı kromatografisi giderek önemli bir yöntem haline gelmiştir. Yapılan literatür taramasında bu konudaki önemli çalışmalar kısaca aşağıda özetlenmiştir.

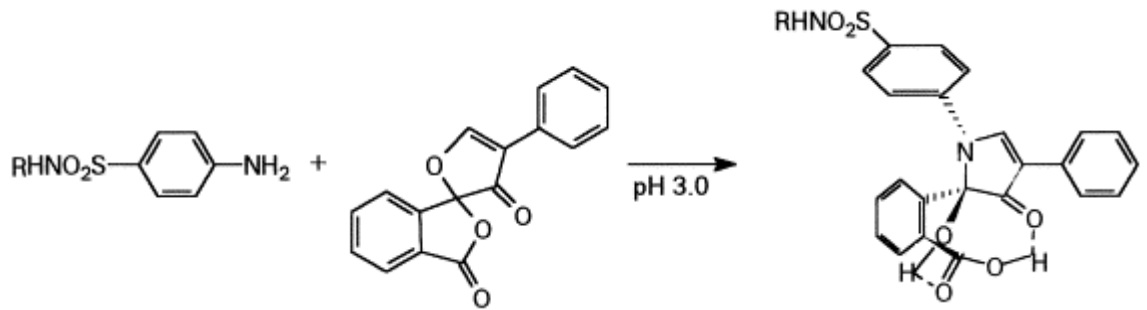
Sülfonamidlerin sıvı kromatografik ayırmaları ile ilgili önemli sayılabilecek çalışmalar aşağıda verilmiştir. Bu çalışmaların hiç birinde ayırma teorik bir yaklaşımla gerçekleştirilmemiştir.

Botsoglou vd. (1997), farklı polaritedeki 7 tane sülfonamidin, çeşitli kromatografik şartlarda alıkonma davranışını incelemişlerdir. Mobil fazın, fosfat tamponu derişiminin, pozitif ve negatif yüklü iyon çifti oluşturunuların etkisini tespit etmişlerdir.

Furusawa (1999), sülfodimidin ve oksitetrasiklin kalıntılarını et ve yumurtada sıvı kromatografi-DAD yöntemi ile tayin etmiştir. Çalışmada mobil faz olarak akış hızı 1,0 mL/dakika olan, asetonitril-asetik asit-su (28:4:68,v/v, pH 2,8) karışımını kullanmışlardır. LiChrospher 100 RP-8 (250 x 4 mm, 5 µm) analitik kolon kullanılmıştır. Sep-Pak katı faz kartuşları kullanarak numunede geri kazanım arttırılmaya çalışılmıştır. Ortalama geri kazanımın % 80,2'den daha büyük olduğu belirtilmektedir.

Chienthavorn ve Smith (1999), ters faz sıvı kromatografi yönteminde sulu tampon ve celüsyonu sağlamak için yüksek sıcaklık kullanarak sülfoguanidin, sülfonilamit, sülfonilik asit, sülfasetamit, sülfotiazol, sülfopridin ve sülfometazinin ters faz sıvı kromatografik davranışını incelemiş ve alıkonma faktörü üzerine pH etkisini inceleyerek bu sıcaklıkta pK_a değerlerini belirlemişlerdir.

Stoev ve Michailova (2000) çalışmalarında, hayvansal kaynaklı gıdalarda sülfonamit kalıntılarının tayininde 10 adet sülfonamiti fluoressamin ile türevlendirmişler (Şekil 2.1) ve oluşan floresans özellikteki ürünleri sıvı kromatografik yöntemle ayırmışlardır. Türevlendirmede pH'nın 2,5–3,5 aralığında en uygun olduğu vurgulanmıştır. 405 nm eksitasyon ve 490 nm emisyon dalga boyunun uygun olduğu belirtilmektedir. Çalışmada Chrompack (250 x 4 mm, 5 μ m 100 RP₁₈ ODS-2) analitik kolon, mobil faz olarak akış hızı 1,5 mL/dakika olan asetonitril-su (65:35, v/v) karışımı kullanılmıştır. Mobil faz 0,01 M K₂HPO₄ içerecek şekilde hazırlanmış ve pH'sı 3,0'e H₃PO₄ ile ayarlanmıştır. Çalışmacılar, 1 μ g/kg'dan daha düşük dedeksiyon limitlerine ulaştıklarını belirtmektedirler.



Şekil 2.1. Türevlendirme tepkimesi

Kishida ve Furusawa (2001), sülfonamitlerin izokratik ayırımı için uygun şartları incelemişler ve yeterli ayırma ve seçiciliğe ulaşmak için N, N-dimetilformamitin etkisini araştırmışlardır. Çalışmacılar, tavuk kas dokusunda 6 adet sülfonamitin tayinini LC-DAD sistemi ile yapmışlardır. LiChrospher 100 RP-8 (250 x 4 mm, 5 μ m) analitik kolon ve % 1 asetik asit (pH 3,0-suda) – asetonitril - dimetilformamit

(78:22:5, v/v/v) içeren mobil fazı kullanmışlardır. Çalışılan sülfonamitler için 267 nm yi uygun dalga boyu olarak seçmişlerdir.

Caballero vd. (2001), sülfasetamit, sülfodiazin, sülfoguanidin, sülfometizol, sülfometazin, sülfometaksazol, sülfotiazolün C18 kolonda ayrımlarını, asetonitril ve sitrik asit tamponu kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Çalışmacılar, mobil faza SDS ilave ederek organik çözücü miktarını düşürmüşlerdir. Ancak yeterli ayırmaya ulaşamamışlardır.

Hela vd. (2003), 12 adet sülfonamiti lineer gradient programda LC-DAD yöntemi ile çalışmışlardır. Çalışmanın amacı, özellikle dapson için daha iyi geri kazanım değerleri elde etmektir. Çalışmada Phenomenex Luna C-18 (250 x 2 mm, 5 µm) analitik kolonu ve 0,01 M amonyum asetat (pH 4,6) (A) ve asetonitril (B) karışımını kullanmışlardır. Mobil faz akış hızı, 0,35 mL/dakika ve kolon sıcaklığı, 40 °C dir. Dedeksiyon limiti, tüm analitler için 1 ppb seviyesinde bulunmuştur. Sülfonamitler için 260 nm, dapson için 294 nm dalga boyu olarak seçilmiştir. Geliştirilen bu yöntem, LC-MS çalışmaları için de uygun olarak verilmektedir.

Martel ve Zeggane (2003), fluorimetrik dedeksiyon ile bal numunelerinde sülfotiazol tayini yapmışlardır. Bu amaçla sülfonamiti fluoressamin ile türevlendirmişler ve oluşan floresans özellikteki ürünleri sıvı kromatografik yöntemle ayırmışlardır. Balda sülfotiazolün kantitasyon limitinin 10 µg/kg olduğu vurgulanmıştır. 405 nm eksitasyon ve 490 nm emisyon dalga boyunun uygun olduğu belirtilmektedir. Çalışmada Hypersil BDS C-18 (250 x 4 mm, 5 µm) analitik kolon ve mobil faz olarak akış hızı 1,0 mL/dakika olan %2 asetik asit – asetonitril (60:40, v/v) (pH 4,5) karışımı kullanılmıştır. Sülfometizol, internal standart olarak seçilmiştir.

Pecorelli vd. (2004), kas dokusunda 10 tane sülfonamitin LC-DAD yöntemi ile tayinini yapmışlardır. Çalışmada asetonitril - 0,05 M asetat tamponu (pH = 4,5) gradient koşullarda mobil faz olarak kullanılmıştır. C-8 Phenomonex analitik kolon (250 x 3 mm, 5 µm) ve Phenomonex guard kolon kullanılmıştır. Mobil faz akış hızı, 0,4 mL/dakikadır. 270 nm görüntülenme dalga boyu olarak seçilmiştir. Çalışmada

sülfodiazin-sülfotiazol ve sülfokinoksalin-sülfodimetoksin pik çiftleri için yeterli ayırma ulaşılamamıştır. Önerilen metot Avrupa Birliği normlarına göre doğrulanmıştır.

Maudens vd. (2004), 12 adet sülfonamitin bal numunelerinde tayinini fluorimetrik dedeksiyon ile yapmışlardır. Çalışılan bileşikler fluoressamin ile türevlendirilmiş ve oluşan floresans özellikteki ürünleri sıvı kromatografik yöntemle ayırmışlardır. Numuneye hidroliz, sıvı-sıvı ve katı-sıvı ekstraksiyonu uygulamışlardır. Purospher Star RP-18 end-capped analitik kolon (150 x 4,6 mm, 5 µm) ve guard kolon kullanılmıştır. Mobil faz akış hızı, 0,7 mL/dakikadır. Gradient olarak çalışılmıştır. 0,02 M asetat tamponu-asetonitril (98:2, (v/v), pH 4,75) ve asetat tamponu-asetonitril (68:32, (v/v)) kullanılmıştır.

Zayas-Blanco vd. (2004), sütte sülfometazin kalıntısının tayinini amaçladıkları çalışmalarında, Pelliguard LC-18 koruyucu kolonu Spherisorb ODS-2 kolonla birlikte kullanmışlardır. Dalga boyu 265 nm'dir. İzokratik çalışmada metanol-40 mM amonyum asetat (35:65, v/v) kullanılmıştır. Geri kazanma, % 82,8 (3,9) olarak verilmektedir.

Msagati ve Nindi (2004), 16 adet sülfonamit bileşiğini su, idrar, süt, karaciğer ve böbrek numunelerinde HPLC-ES-MS yöntemiyle tayin etmişlerdir. Numune temizleme ve zenginleştirmede sıvı membran kullanmışlardır. Tespit limiti 1,8-10 ppb arasında değişmektedir. C₁₈ Clipseus Higgins (150 mm x 3,0 mm x 5 µm) kolonu kullanmışlardır. Kolon sıcaklığı 35°C'dir. Çalışmada sülfonamitlerin pK_a değerleri, ACD pK_a DB programı ile hesaplanan değerlerdir.

Carda-Broch ve Berthod (2004), 17 sülfonamitin oktanol-su dağılma katsayılarını karşıt akım kromatografisi ile tespit etmişlerdir. Bu değerlerden yararlanarak sülfonamitlerin pK_{a1,g} ve pK_{a2,g} değerlerini tahmin etmişlerdir (Çizelge 2.1).

Çizelge 2.1. Sülfonamitlerin oktanol-su dağılıma katsayıları ve $pK_{a1,g}$ ve $pK_{a2,g}$ değerleri

Bileşik	pK_{a1}	pK_{a2}	$\log P_{o/w}$ (pH 5)
Sülfobenzamit	2,16	4,36	0,62
Sülfoasetamit	1,82	5,85	-0,33
Sülfokloropridazin	1,72	6,39	0,69
Sülfodiazin	1,98	6,01	-0,14
Sülfodimetoksin	3,40	5,76	1,65
Sülfoguanidin	2,46	11,15	-1,07
Sülfomerazin	2,16	6,80	0,10
Sülfometazin	2,46	7,45	0,27
Sülfometizol	2,24	5,30	0,30
Sülfometaksazol	1,81	5,46	0,69
Sülfometoksipridazin	1,96	7,96	0,16
Sülfonilamit	3,22	10,61	-0,76
Sülfofenazol	2,57	5,93	1,31
Sülfopridin	2,37	7,48	-0,05
Sülfokinoksalin	2,62	6,00	1,44
Sülfotiazol	2,06	7,07	-0,05
Sülfisaksazol	2,15	5,00	0,60

Kishida vd. (2005), sülfomonometoksin, sülfodimetoksin ve bunların N⁴ asetil türevlerinin tayinini tavuk plazmasında LC-DAD yöntemi ile yapmışlardır. Çalışmada organik modifiyer içermeyen 0,001 M sodyum asetat (pH 7,2), mobil faz ve Supelco polietilen glikol (PEG), ters faz analitik kolon (150 x 4,6 mm, 5 µm) olarak kullanılmıştır. Mobil faz akış hızı, 1,0 mL/dakika ve kolon sıcaklığı, 30 °C dir. 267 nm görüntülenme dalga boyu olarak seçilmiştir. Çalışmada ortalama geri kazanım değerleri %78'den büyük bulunmuştur.

Zotou ve Vasiliadou (2006), sulfoasetamit, sulfotiazol, sulfopiridin, sulfomerazin, sulfometoksipridazin ve sulfometaksazol olmak üzere 6 adet sülfonamitin bal numunelerinde analizini HPLC yöntemi ile yapmışlardır. Analitlerin ortalama geri

kazanımlarının %80 - %117 arasında ve dedeksiyon limitlerinin 20-25 µg/kg arasında olduğu vurgulanmıştır. Çalışmada Inertsil ODS-3 (250 x 4 mm, 5 µm) analitik kolon ve mobil faz olarak akış hızı 1,0 mL/dakika olan metanol- 0,05 M asetat tamponu (pH 3,6) (20:80,v/v) kullanılmıştır. Kafein, internal standart olarak seçilmiştir.

Sülfonamitlerin iyonlaşma sabitlerinin tayini hakkında birkaç çalışma bu kısımda özetlenmiştir.

Lin vd. (1997a), 13 tane sülfonamitin göç davranışlarını ve ayrılmasını miseller elektrokinetik kapiler kromatografi yöntemiyle belirlemişlerdir. Bu çalışmada sülfonamitlerin pK_a değerlerini tayin etmek için pH etkisinde elektroforetik mobiliteler ölçülmüş ve bu değerlerden yararlanarak bileşiklerin sudaki pK_a değerlerini hesaplamışlardır. Çalışmada ayrıca elektroforetik ayırma üzerinde durulmuş ve tampon pH'sının ve misel konsantrasyonunun önemi vurgulanmıştır. Optimum ayırma koşulunda SDS derişimi 40 mM dır ve tamponun pH'ı 5,8 dir. Bu çalışmada sülfonamitlerin belirlenen pK_{a2} değerleri, Çizelge 2.2' de verilmiştir (Lin vd., 1997a).

Çizelge 2.2. Sülfonamitlerin kapiler elektroforez yöntemiyle belirlenen pK_{a2} değerleri (Lin vd., 1997a)

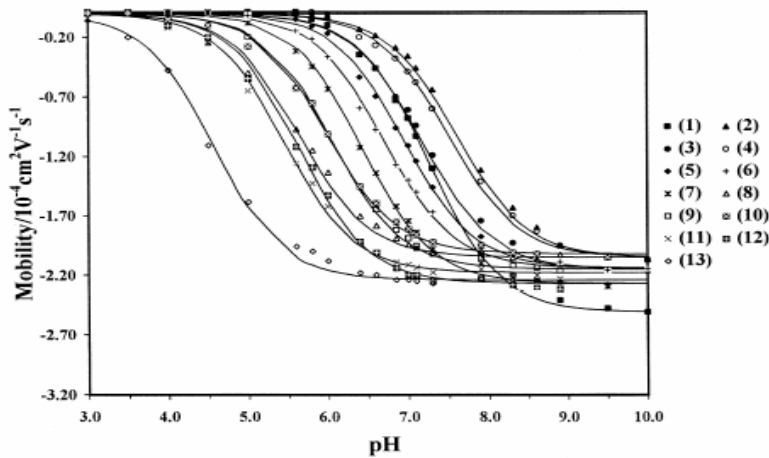
Bileşikler	pK_{a2}
Sülfotiyazol	7,24
Sülfometazin	7,65
Sülfometoksipiridazin	7,19
Sülfisomidin	7,50
Sülfomerazin	6,94
Sülfometer	6,68
Sülfodiazin	6,43
Sülfokinoksalin	5,65
Sülfomonometoksin	6,03
Sülfodimetoksin	5,99
Sülfokloropiridazin	5,49
Sülfometaksazol	5,65
Sülfisaksazol	4,57

Lin vd. (1997b), 16 tane sülfonamitin göç davranışlarını, düşük pH’larda sitrat tamponu kullanarak kapiler elektroforez yöntemiyle incelemişlerdir. Bu tamponda 16 sülfonamitin pozitif yüklü hallerinde ayrılacaklarını göstermişlerdir.

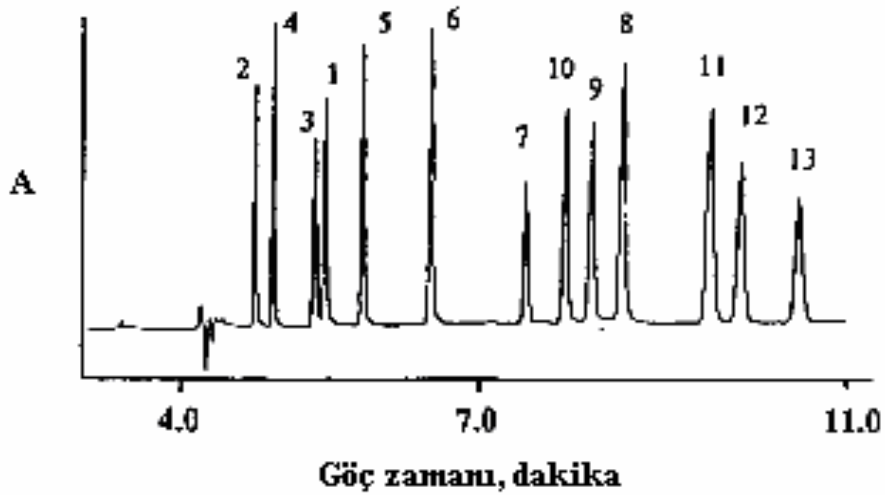
Lin vd (1997c), 13 tane sülfonamitin pK_a değerlerini pH nın elektroforetik mobilité üzerinde etkisini inceleyerek tayin etmişlerdir (Şekil 2.2). Sülfonamitlerin göç davranışlarını pK_{a1} değerlerinin etkilediğini ve göç sırasının yük / kütle oranına bağlı olduğunu belirlemişlerdir. Optimum ayırma koşulunda tampon derişiminin 60 mM olduğu ve pH’nın 6,9 olduğu belirtilmektedir (Şekil 2.3). pH-mobilité arasındaki ilişkidenden yararlanarak 13 bileşiğin pK_a değerlerini hesaplamışlardır (Çizelge 2.3).

Çizelge 2.3. Sülfonamitlerin kapiler elektroforez yöntemiyle belirlenen pK_a değerleri (Lin vd., 1997c)

Bileşik Adı	pK_{a1}	pK_{a2}
(1)sülfotiyazol	2.08	7.07
(2)sülfometazin	2.28	7.42
(3)sülfometoksipiridazin	2.09	6.95
(4)sülfisomidin	2.68	7.26
(5) sülfomerazin	2.17	6.77
(6)sülfometer	1.87	6.57
(7)sülfodiazin	2.10	6.28
(8)sülfaquinoksalin	1.86	5.56
(9)sülfomonometoksin	1.98	5.96
(10) sülfodimetoksin	1.87	5.86
(11)sülfokloropiridazin	1.90	5.40
(12)sülfometaksazol	1.83	5.57
(13)sülfisaksazol	1.66	4.71



Şekil 2.2. Sülfonamitlerin elektroforetik mobilité pH ilişkileri (Lin vd., 1997c)



Şekil 2.3. Çalışılan sülfonamitlerin elektroferogramı (pH 6,9; 60 mM tampon; 15 kV voltaj) (Lin vd., 1997c)

Cross ve Cao (1998), 23 adet sülfonamitin kapiler elektroforetik ayrımını incelemişler ve 6 μ molar fosfat tamponunda 21 sülfonamiti ayırabilmişlerdir. Sülfonilamit ve sülfoguanidini ayıramamışlardır.

Cabellero vd., (2001), 15 sülfonamitin miseller kromatografi ile ayrımını optimize etmişler ve hazırladıkları yöntemi kullanarak sülfonamit tayinini gerçekleştirmişlerdir. pH'nın kapasite faktörü üzerinde etkilerini inceledikleri çalışmalarında pH 3'te çalışmayı tercih etmişlerdir. Bu çalışmada, 0,019 M SDS içeren ve % 5,8 asetonitril bulunduran mobil fazı kullanmışlardır.

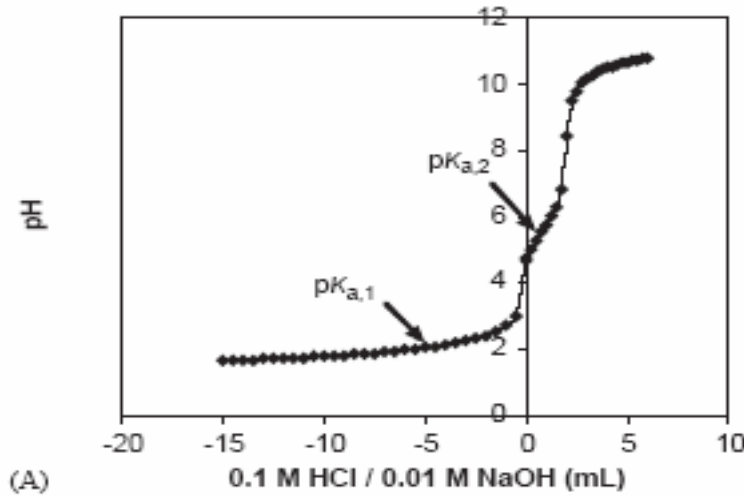
Mengellers vd. (1997), 12 adet sülfonamitin antimikrobiyel aktiviteleri ile fizikokimyasal özellikleri arasındaki ilişkiyi incelemişlerdir. Bu amaçla, bileşiklerin pK_a ve hidroforisite sabitlerini tayin etmişlerdir. HPLC ile iyonlaşma sabiti tayin edilen tek literatürdür. Çalışmada Chromsep C18 kolon ve mobil faz olarak asetonitril - 0,025 M potasyum fosfat tamponu (10:90,v/v) kullanılmıştır. Bu çalışmada sülfonamitlerin belirlenen pK_{a2} ve log P değerleri, Çizelge 2.3' de verilmiştir (Mengellers vd., 1997).

Çizelge 2.4. Sülfonamitlerin HPLC yöntemiyle belirlenen pK_{a2} ve log P değerleri (Mengellers vd., 1997)

Bileşikler	pK_{a2}	log P
Sülfonilamit	-	-0,072
Sülfodimidin	-	0,691
Sülfisomidin	-	0,226
Sülfometoksipiridazin	-	0,849
Sülfomerazin	-	0,812
Sülfodiazin	6,6	0,631
Sülfodimetoksin	6,2	1,648
Sülfokloropiridazin	6,0	1,305
Sülfometaksazo	5,9	1,396
Sülfisaksazol	4,9	2,259
Sülfodoksin	6,1	1,271
Sülfotroksazol	6,0	1,376

Carda-Broch ve Berthod (2004), 17 tane sülfonamitin oktanol-su dağılıma katsayılarını karşıt akım kromatografisi ile tayin etmişlerdir. Teorik modellerden yararlanarak asitlik sabitlerini hesaplamışlardır.

Qiang ve Adams (2004), 26 tane antibiyotiğin potansiyometrik yöntemle ayrışma sabitini tayin etmişlerdir. Sülfonamitlerin pK_{a1} değerlerini 0.1 M HCl ile; pK_{a2} değerlerini 0.01 M NaOH ile potansiyometrik yöntemle titre ederek belirlemişlerdir. Sülfamerazin ve sülfametazin için pK_{a1} pK_{a2} değerleri sırasıyla 2,06 (0,30); 6,90 (0,05); 2,07 (0,30); 7,49 (0,13)'dür. Sülfokloropridazinin titrasyon eğrisi Şekil 2.4'de verilmiştir.



Şekil 2.4. Sülfokloropridazinin titrasyon eğrisi

Ruiz ve arkadaşları (2005), suda az çözünen bazı ilaçların metanol-su karışımında pK_a 'larını değerlendirmişlerdir. Fenoller, alifatik karboksilik asitler, benzoik asit türevleri, aminler ve imidazol türevleri kullanılmıştır. Bu çalışma ile 100'e yakın ilacın sudaki pK_a değerleri Yasuda-Shedlovski eşitliği kullanarak tahmin edilmiştir.

Ruiz Angel vd. (2005), on iki tane sülfonamitin oktanol-su dağılma katsayılarını ters faz sıvı kromatografi ve miseller kromatografi yöntemleri ile incelemişlerdir.

Geiser vd. (2005), sülfonilamit, sülfobenzamit, sülfodimetoksin, sülfadoksin, ve sülfisaksazolün pK_a değerlerini kapiler bölge elektroforezle incelemişlerdir. Bu bileşiklerin pK_{a1} ve pK_{a2} değerlerini sırasıyla 1,78; 11,19; 1,20 4,36; 1,62 6,13; 1,52 6,01; 1,32; 5,00 dir.

3. MATERİYAL VE YÖNTEM

3.1. Genel Bilgi

Bu bölümde sülfonamitlerin iyonlaşma sabitlerinin potansiyometrik ve kromatografik yöntemle tayininde kullanılan cihazlar ve kimyasallar hakkında bilgi verilmiştir.

3.2. Kullanılan Cihazlar

3.2.1. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi Cihazı

Sülfonamit grubu bileşiklerin kapasite faktörü tayinleri ve kromatografik ayırmaları, Shimadzu HPLC cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sistemde, sistem kontrol ünitesi (SCL 10 AVP), pompa (LC10 ADVP), dedektör (SPDM 10A VP Foto Diyod Array), oto enjektör (SIL 10 ADVP (70Vial Model Rack 7)), kolon fırını (CTO 10 AVP) ve gaz giderme ünitesi (DGU 14 A) bulunmaktadır. Çalışmada kolon etüvü kullanılarak 25 °C’de çalışılmıştır.

Çalışmada, Phenomonex Prodigy ODS3 100 A° ve YMC Pack ODS –AM (5 µm, 250 mm x 4,6 mm ID) end-capped kolonlar kullanılmıştır.

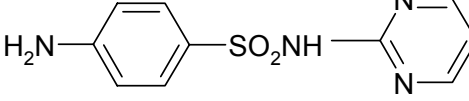
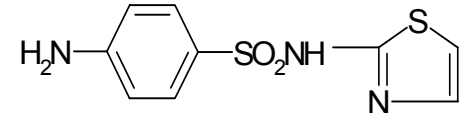
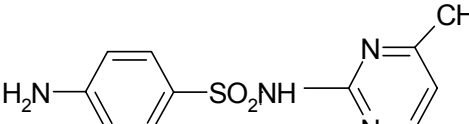
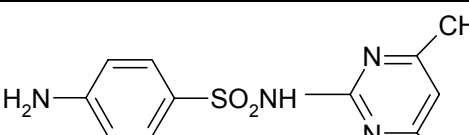
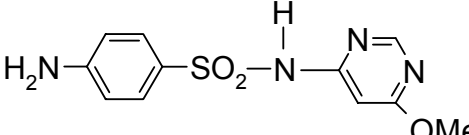
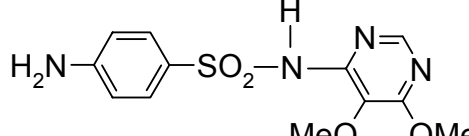
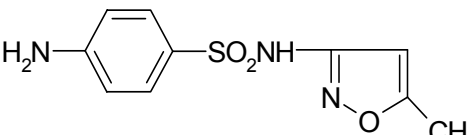
3.2.2. pH / İyon Metre

Potansiyometrik titrasyonlarda ve HPLC mobil fazının pH ölçümlerinde Metleer Toledo MA 235 pH/ iyon analiz cihazı kullanılmıştır. Hanna HI 1332 Ag/AgCl kombine cam elektrottan yararlanılmıştır. pH ölçümlerinde sabit sıcaklık su banyosu (HETO CBN 8-30 ve HETO HMT 200 sıcaklık kontrol ünitesi) kullanılarak, 25 °C ± 0,1 °C sıcaklıkta, N₂ atmosferinde çalışılmıştır.

3.3. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya HPLC saflıktadır. Bu tezde çalışılan sülfonamitler ve bunlar ile ilgili bilgiler, Çizelge 3.1’de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışılan sülfonamitler ve özellikleri

Bileşik özellikleri	Kimyasal yapısı	Özellikler
Sülfodiazin, Vetranal, (4-Amino-N-(2-pirimidinil) benzensülfonamit)	 <chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2ccncc2)cc1</chem> $C_{10}H_{10}N_4O_2S$ 250,28 g/mol	E.N: 254,4 – 255,0 °C CAS No: 68-35-9 HPLC saflıkta > %99,8 UV @ 218-254 nm
Sülfotiazol, Vetranal, (4-Amino-N-(2-tiazol)benzensülfonamit)	 <chem>Nc1ccc(S(=O)(=O)Nc2ccsc2)cc1</chem> $C_9H_9N_3O_2S_2$ 255,32 g/mol	E.N: 200,8 – 202,0 °C CAS No: 72-14-0 HPLC saflıkta > %99,9 UV @ 260-284 nm
Sülfomerazin, Vetranal, (4-Amino-N-(4-metil-2-pirimidinil) benzensülfonamit)	 <chem>Cc1ccncc1Sc2ccc(N)cc2</chem> $C_{11}H_{12}N_4O_2S$ 264,31 g/mol	E.N: 236,0 - 236,4 °C CAS No: 127-79-7 HPLC saflıkta > %99,9 UV @ 246-280 nm
Sülfometazin (sülfodimidin), Vetranal, (4-Amino-N-(4,6-dimetil-2-pirimidinil) benzensülfonamit)	 <chem>Cc1cc(C)cnc1Sc2ccc(N)cc2</chem> $C_{12}H_{14}N_4O_2S$ 278,33 g/mol	E.N: 195,8 °C CAS No: 1981-58-4 HPLC saflıkta > %99,9 UV @ 246-260 nm
Sülfomonometoksin, Vetranal, (4-Amino-N-(6-metoksi-4-pirimidinil) benzensülfonamit)	 <chem>COc1ccncc1NS(=O)(=O)c2ccc(N)cc2</chem> $C_{11}H_{12}N_4O_3S$ 280,3 g/mol	E.N: 203-206 °C CAS No: 1220-83-3 HPLC saflıkta > %99,9 UV @ 272 nm
Sülfodoksin, Vetranal, (4-Amino-N-(5,6-dimetoksi-4-pirimidinil) benzensülfonamit)	 <chem>COc1cc(OC)cnc1NS(=O)(=O)c2ccc(N)cc2</chem> $C_{12}H_{14}N_4O_4S$ 310,33 g/mol	E.N: 197,2 – 197,9 °C CAS No: 2447-57-6 HPLC saflıkta > %99,9 UV @ 280 nm
Sülfometaksazol Vetranal, (4-Amino-N-(5-metil-3-isoxazolil) benzensülfonamit)	 <chem>Cc1ccocn1NS(=O)(=O)c2ccc(N)cc2</chem> $C_{10}H_{11}N_3O_3S$ 253,28 g/mol	E.N: 169,7 – 170,3 °C CAS No: 723-46-6 HPLC saflıkta > %99,9 UV @ 251 nm

Çalışmada yararlanılan diğer kimyasal maddeler ve özellikleri, Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Adı	Kullanım amacı	Açıklama
Trifloroasetik asit (TFA)	Mobil faz pH’sının ayarlanmasında	Merck, analitik saflıkta
Fosforik asit	Mobil faz pH’sının ayarlanmasında	Merck, analitik saflıkta
Formik asit	Mobil faz pH’sının ayarlanmasında	Merck, analitik saflıkta
Dietilmalonik asit	Mobil faz pH’sının ayarlanmasında	Merck, analitik saflıkta
Sodyum hidroksit	Mobil faz pH’sının ayarlanmasında	Merck, analitik saflıkta
KBr	Kolonda tutunmayan türün kolonu terk etme zamanını belirlemede	Merck, analitik saflıkta
Potasyum hidrojen fitalat	pH metre için kalibrasyon çözeltisi	Merck (Referans Değer Standardı)
Asetonitril	Su ile ikili karışımları halinde çalışılan ortam	Merck , HPLC saflığında
Hidroklorik asit	Hücre kalibrasyonu ve baz çözeltisinin ayarlanması	Merck, analitik saflıkta
Potasyum hidroksit	Titrant	Merck, ayarlı çözelti (Titrisol)
Potasyum klorür	İyonik şiddet ayarlayıcı	Merck, analitik saflıkta
Stronsiyum nitrat	Karbonat çöktürücü	Merck, analitik saflıkta

3.4. Kullanılan Çözeltiler

3.4.1. Potansiyometrik Titrasyonlar

3.4.1.1. %50 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı

100 mL’lik stok ortam için 50 mL saf su alınmış ve üzerine 50 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir.

3.4.1.2. İyonik Şiddet Ayarlayıcı

Her bir ortamda iyonik şiddeti ayarlamak üzere KCl kullanılmıştır. Bu amaçla yukarıda hazırlanışı belirtilen çözücü karışımına 0,1 M derişimi sağlayacak şekilde katı KCl eklenmiş ve manyetik karıştırıcı kullanılarak katının çözünmesi sağlanmıştır.

3.4.1.3. Hücre Kalibrasyon Çözeltisi

Organik modifiyer-su ikili karışımından 20 mL alınmış, buna 0,1 M derişimde KCl içerecek şekilde katı KCl ilave edilmiştir.

3.4.1.4. Asit Çözeltisi

1 M standart hidroklorik asit (Titrisol) çözeltisi, ortamın organik modifiyer yüzdesine uygun olarak 0,1 M'a seyreltilmiştir.

3.4.1.5. Baz Çözeltisi

1 M standart KOH (Titrisol) çözeltisi, çalışılan organik modifiyer-su ikili karışımında 0,025 M olacak şekilde seyreltilerek titrant olarak kullanılmıştır. Hazırlanan baz çözeltisinin karbonat hatasını gidermek için stronsiyum nitrat kullanılmıştır. Bu çözelti, derişimi belli HCl ile ayarlanmıştır.

3.4.1.6. Sülfonamitlerin Çözeltileri

Sülfonamitlerin standart çözeltileri, yaklaşık $3,0 \cdot 10^{-3}$ M derişimde olacak şekilde asetonitril-su ikili karışımında günlük olarak hazırlanmış ve 10 mL çözelti çift cidarlı hücreye alınmıştır. +4 °C de muhafaza edilmişlerdir.

3.4.2. Kromatografik Çalışmalar

3.4.2.1. Sülfonamidlerin HPLC Ayırımında Kullanılan Çözeltileri

Çalışılan sülfonamidlerin her birinden 0,0030 g, 50 mL ACN’de çözülerek 60 ppm’lik çözeltileri hazırlanmıştır. Sıvı kromatografi cihazına her bir stok çözeltiden 100 µL’nin 1,50 mL’ye çalışılan mobil faz ile seyreltilmesi ile hazırlanan çalışma çözeltilerinden 20 µL enjekte edilmiştir. Her bir bileşik için ikişer kez enjeksiyon yapılarak ortalama alıkonma zamanları belirlenmiştir. Çalışma dalga boyu, 270 nm’dir.

3.4.2.2. Sülfonamid Karışımı

Çalışılan sülfonamidlerin stok çözeltilerinden 100 µL alınmış ve 1,50 mL’ye çalışılan mobil faz ile seyreltilmiştir. Hazırlanan bu karışımdan 20 µL enjekte edilmiştir. Her bir karışım için ikişer kez enjeksiyon yapılarak ortalama alıkonma zamanları tespit edilmiştir. Çalışma dalga boyu, 270 nm’dir.

3.4.2.3. %25 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı, pH 4,50

1 Litrelik stok mobil fazın hazırlanmasında 250 mL asetonitril alınmış ve üzerine 750 mL su ilave edilmiştir. Mobil faza 25 mM derişimde olacak şekilde 1,70 mL H₃PO₄ (% 85 (a/a) ; 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran su- asetonitril karışımında hazırlanmış NaOH’den (1M) pH 4,50’e getirmek için ilave edilmiştir

3.4.2.4 %20 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı, pH 4,50

1 Litrelik stok mobil fazın hazırlanmasında 200 mL asetonitril alınmış ve üzerine 800 mL su ilave edilmiştir. Mobil faza 25 mM derişimde olacak şekilde 1,70 mL H₃PO₄ (% 85 (a/a) ; 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde

asetonitril bulunduran su - asetonitril karışımında hazırlanmış NaOH'den (1 M) pH 4,50'e getirmek için ilave edilmiştir.

3.4.2.5. %16 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı, pH 4,50

1 Litrelik stok mobil fazın hazırlanmasında 160 mL asetonitril alınmış ve üzerine 840 mL su ilave edilmiştir. Mobil faza 25 mM derişimde olacak şekilde 1,70 mL H₃PO₄ (% 85 (a/a) ; 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran su- asetonitril karışımında hazırlanmış NaOH'den (1 M) pH 4,50'e getirmek için ilave edilmiştir.

3.4.2.6. Sülfonamitlerin pK_a Tayininde Kullanılan Çözeltileri

Çalışmada kullanılan tüm sülfonamit standart çözeltileri, yaklaşık 350 ppm derişimde olacak şekilde asetonitrilde hazırlanmış ve enjeksiyondan önce mobil faz ile seyreltilmiştir.

3.4.2.7. %50 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı

100 mL'lik stok ortam için 50 mL saf su alınmış ve üzerine 50 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Kullanılan mobil fazlar Whatman süzgeç kâğıdından vakum altında süzölüp degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

3.4.2.8. %40 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı

100 mL'lik stok ortam için 60 mL saf su alınmış ve üzerine 40 mL asetonitril ilave edilmiştir.

3.4.2.9. %30 (v/v) Asetonitril -Su İkili Karışımı

100 mL'lik stok ortam için 70 mL saf su alınmış ve üzerine 30 mL asetonitril ilave edilmiştir.

3.4.2.10. Potasyum Bromür Çözeltisi

Çalışılan koşullarda kapasite faktörlerinin belirlenmesi için kullanılan KBr çözeltisi, derişimi %0,01 (w/v) olacak şekilde suda hazırlanmıştır. KBr'nin hazırlanan bu çözeltisinden 20 µL enjekte edilerek kolonda tutunmayan türe özgü t_0 alıkonma zamanı belirlenmiştir. Çalışma dalga boyu 200 nm'dir.

3.4.2.11. Potasyum Hidrojen Fitalat Çözeltisi

$C_6H_4(COOK)(COOH)$, primer standart pH referans çözeltisi olarak kullanılmıştır. 2 saat 110°C'da kurutulmuştur. 0,05 molal derişimde kullanılmıştır.

Çalışmalarda gerekli çözeltiler, kullanılacakları gün hazırlanmışlardır.

3.5. Yöntem

3.5.1. Potansiyometrik Titrasyonlar

Potansiyometrik çalışmalarda;

- 1- Çalışılan ortamda mutlak pH değerlerini elde etmek için hücre kalibrasyonu,
- 2- Asitin baz ile titrasyonu ile bazın ayarı ve karbonat hatası tayini,
- 3- Çalışılan bileşğin $3,0 \cdot 10^{-3}$ M'luk %50 (v/v) asetonitril-su ikili karışımında hazırlanan çözeltisinin titrasyonu,
- 4- Titrasyonla ilgili grafikler değerlendirilerek titrasyonun stokiyometrik davranışının ve takiben uygun bağıntılarla pK_a değerinin tayini,
- 5- Geri kazanılan madde miktarının belirlenmesi ve kantitatif sonuçların istatistiksel olarak değerlendirilmesi

yapılmıştır.

Sülfonamidlerin protonasyon sabitlerinin potansiyometrik yöntemle tayininde, %50 (v/v) asetonitril – su derişiminde çalışılmıştır. Bu ortamda iyonik şiddeti ayarlamak üzere KCl kullanılmıştır. KCl derişimi 0,1 M olacak şekilde ayarlanmıştır. Çalışılan ortamda kullanılan çözücü karışımında mV değerlerinden pH değerlerine geçebilmek için sülfonamidlerin titrasyonlarından önce hücre kalibrasyonu yapılarak E° standart potansiyeli belirlenmiştir. Bu amaçla kuvvetli asitlere özgü Gran fonksiyonu kullanılmıştır. Bunun için 20 mL 0,1 M derişimde KCl içerecek şekilde hazırlanan asetonitril – su ikili karışımı, çift cidarlı titrasyon kabına alınmış ve 0,1 M HCl çözeltisi 0,1 mL’lik kısımlar halinde ilave edilmiştir. Bu asit çözeltisinin 2 mL’si, hücre kalibrasyonu için yeterlidir. Sülfonamidlerin titrasyonlarından önce titrant (KOH çözeltisi) yaklaşık 0,025 M derişimde hazırlanmış ve 20 mL 0,025 M hidroklorik asit çözeltisinin bu çözelti ile potansiyometrik yöntemle titrasyonu ile ayarlanmıştır. Bu verilerle bazın derişimi ve karbonat hatası, Gran metodu kullanılarak tespit edilmiştir. Titrasyonlarda karbonatı giderilmiş titrant kullanılmıştır.

Sülfonamidlerin $3,0 \cdot 10^{-3}$ M’lık çözeltilerinden 10 mL, çift cidarlı hücrede karbonatı giderilmiş ayarlı baz çözeltisi ile titre edilmiştir. Sülfonamid çözeltisine 1 M HCl (stok, titrisol)’den uygun hacim ilave edilerek stokiometrik oranda protonlanmıştır. Titrasyonlar, azot atmosferinde 25°C de yapılmıştır. Her bir bileşik, her bir ortamda 3 kez titre edilmiştir. Titrasyon verileri, ϕ -pH grafiklerinde değerlendirilmiştir. Her bir bileşik için 2 protonun ayrı ayrı titre edildiğini gösteren çift dönüm noktalı titrasyon eğrileri elde edilmiştir. Gran fonksiyonları ve PKPOT programı, pK hesaplamalarında kullanılmıştır.

3.5.2. Sıvı Kromatografik Yöntemle Çalışmalar

HPLC yöntemi ile iyonlaşma sabitlerinin tayini çalışmasında, %50 (v/v), % 40 (v/v) ve % 30 (v/v) asetonitril-su karışımlarında çalışılmıştır. pH metre, pH değerleri belirlenirken potasyum hidrojen fitalat çözeltisi ile ayarlanmıştır. pH metrenin kalibrasyonu, kombine pH elektrodu ile 298,15 K referans alınarak yapılmıştır. Elektrot, okunan değerlerin kararlı olabilmesi için çalışılan su-organik çözücü

karışımında bekletilmiştir. Her bir ortam için potasyum hidrojen fitalat çözeltisi 0,05 mol/kg derişimde hazırlanmış ve başlangıç potansiyel değeri belirlenmiştir. Her bir çözelti için 3 ölçüm yapılmıştır. Takiben her bir mobil fazın pH değeri, 1,6 – 9,5 aralığında olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu ayarlama işleminde tampon aralığı dikkate alınarak 100 mM TFA, fosforik asit, formik asit ve %0,1 (w/v) dietil malonik asit kullanılmıştır. Bu asit ilavelerinden sonra mobil faza aynı derişimde asetonitril – su karışımında hazırlanmış olan 1 M NaOH ilave edilmiştir.

Bilindiği gibi HPLC çalışmasında kapasite faktörleri, t_0 dikkate alınarak hesaplanır. Sülfonamitlerin kapasite faktörlerinin hesaplanmasında kullanılacak t_0 değeri %0,01 (w/v) KBr'nin sudaki çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmada gerek KBr ve gerekse sülfonamitlerin alıkonma zamanları, ikişer enjeksiyonla ölçümlerin ortalaması alınarak, seçicilik faktörleri komşu pikler için kapasite faktörlerinden yararlanılarak hesaplanmıştır.

3.5.3. HPLC-DAD Yöntemiyle Çalışmalar

Çalışılan sülfonamitlerin, bir önceki yöntemde anlatıldığı şekilde her bir pH koşulunda spektrum verileri, DAD ile 190-500 nm aralığında kaydedilmiştir. Bu veriler, düzenlenerek STAR adlı program ile iyonlaşma sabitleri hesaplanmıştır.

3.5.4. Sıvı Kromatografik Ayırmanın Optimizasyonu

Sıvı kromatografik bir çalışmada öncelikle mobil fazda pH sabit tutularak ve organik modifiyer yüzdesi değiştirilerek mobil faz polaritesinin ayırmadaki etkisi incelenir. Bu tez çalışmasında da aynı yol izlenmiş ve pH 4,50'de sabit tutularak, asetonitrilin üç farklı derişiminin (%25, % 20 ve %16 (v/v)) etkisi incelenmiştir. KBr, t_0 zamanını belirlemek için her bir koşulda kullanılmıştır. Her bir bileşiğin kapasite faktörleri hesaplanmış, $\log k - E_T^N$ grafiği kullanılarak ayırma için en uygun koşul belirlenmiştir.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

4.1. Potansiyometrik Yöntemle İyonlaşma Sabitlerinin Tayini

Bu bölümde sülfodiazin, sülfotiazol, sülfomerazin, sülfometazin, sülfomonometoksin, sülfodoksin ve sülfometaksazolün %50 (v/v) su-asetonitril ikili karışımlarında gerçekleştirilen potansiyometrik titrasyonları ile ilgili veriler, çizelgelerde derlenmiştir. Her bir bileşik için çizelgelere alınan bu veriler ilgili grafikler ile değerlendirilmiş ve bu grafikler aşağıda verilmiştir.

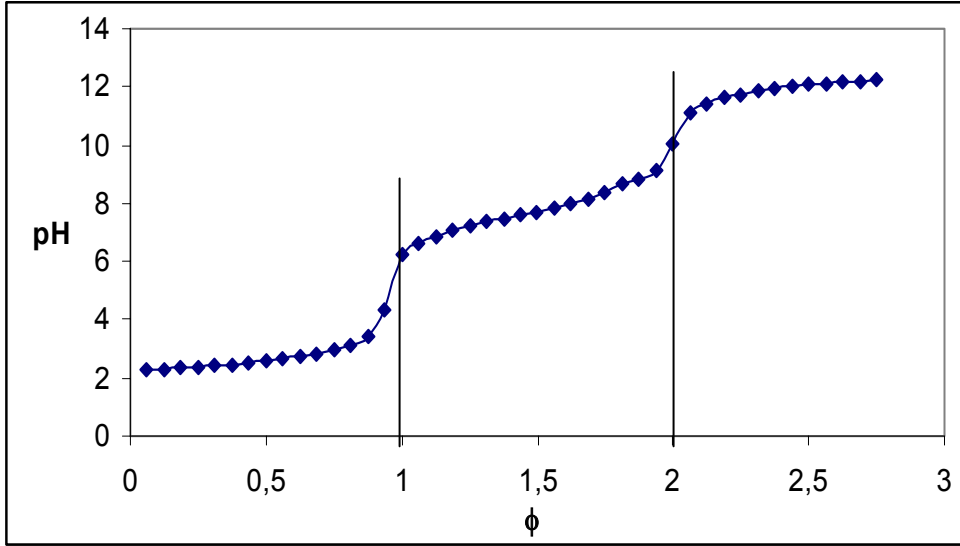
4.1.1. Sülfodiazinin % 50 (v/v) Asetonitril–Su İkili Karışımındaki Potansiyometrik Titrasyon Grafikleri

Bu bileşiğin $3,72 \cdot 10^{-3}$ M lık çözeltisinden 10 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı 0,025 M KOH ile titre edilmiştir. Veriler, Çizelge 4.1’de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi mV değerleri E^0 değeri kullanılarak pH olarak da ifade edilmiştir.

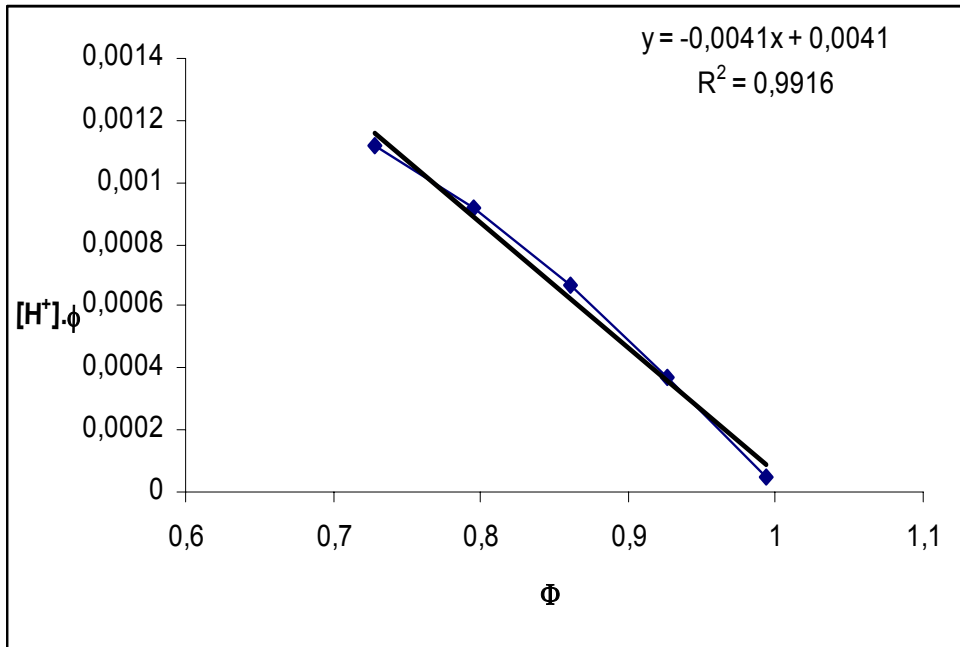
Çizelge 4.1. Sülfodiazinin % 50 (v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometrik titrasyon verileri

mL	mV	pH	mL	mV	pH
0,1	270,8	2,285	2,3	-43,4	7,596
0,2	269,1	2,314	2,4	-50,0	7,708
0,3	267,3	2,344	2,5	-58,1	7,845
0,4	265,3	2,378	2,6	-66,6	7,989
0,5	262,8	2,421	2,7	-76,4	8,154
0,6	260,1	2,466	2,8	-89,4	8,374
0,7	257,1	2,517	2,9	-107,0	8,671
0,8	254,2	2,566	3,0	-118,0	8,857
0,9	250,1	2,635	3,1	-132,0	9,094
1,0	245,3	2,716	3,2	-190,0	10,074
1,1	239,5	2,814	3,3	-250,0	11,089
1,2	232,1	2,939	3,4	-271,0	11,444
1,3	222,0	3,110	3,5	-282,2	11,633
1,4	204,9	3,399	3,6	-289,4	11,755
1,5	150,3	4,322	3,7	-295,4	11,856
1,6	39,0	6,204	3,8	-300,0	11,934
1,7	13,5	6,635	3,9	-304,3	12,006
1,8	-1,0	6,880	4,0	-307,9	12,067
1,9	-12,0	7,066	4,1	-310,7	12,115
2,0	-21,0	7,218	4,2	-313,4	12,160
2,1	-28,9	7,351	4,3	-315,7	12,199
2,2	-36,3	7,476	4,4	-317,9	12,236

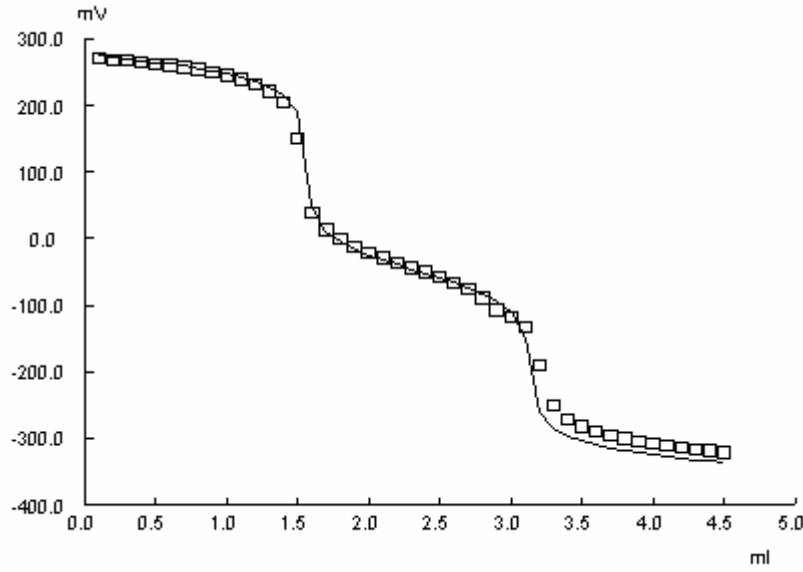
Bu bileşiğin titrasyonuna ait pH- ϕ , Gran ve PKPOT grafikleri, Şekil 4.1, 4.2 ve 4.3'de verilmiştir. Şekil 4.1'den görüldüğü gibi bileşik stokiometriye uygun iki dönüm noktalı titrasyon grafiği vermektedir.



Şekil 4.1. Sulfodiazinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki potansiyometrik titrasyon grafiği, ϕ - pH



Şekil 4.2. Sulfodiazinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki Gran grafiği, 1. eşdeğerlik öncesi



Şekil 4.3. Sülfodiazinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki PKPOT programı ile elde edilen titrasyon grafiği

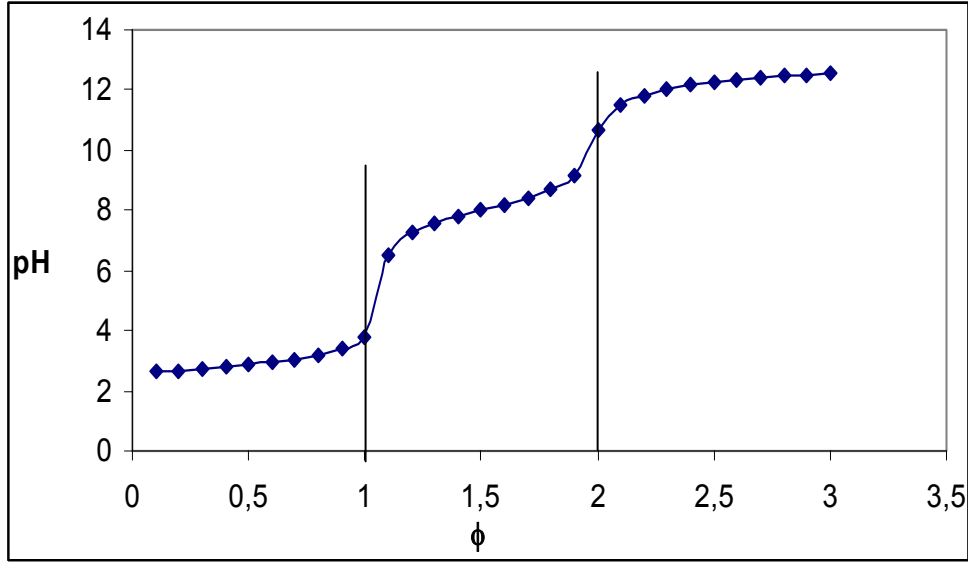
4.1.2. Sülfotiazolün % 50 (v/v) Asetonitril – Su İkili Karışımındaki Potansiyometrik Titrasyon Grafikleri

Bu bileşiğin $2,78 \cdot 10^{-3}$ M'lık çözeltisinden 10 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı 0,025 M KOH ile titre edilmiştir. Veriler, Çizelge 4.2'de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi mV değerleri E^0 değeri kullanılarak pH olarak da ifade edilmiştir.

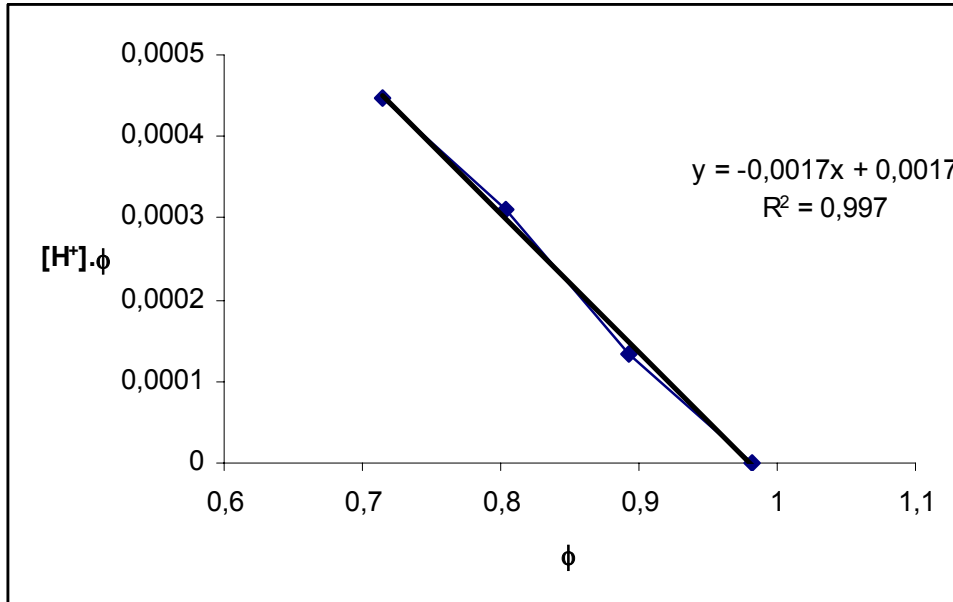
Çizelge 4.2. Sülfotiazolün % 50 (v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometrik titrasyon verileri

mL	mV	pH	mL	mV	pH
0,1	260,6	2,615	1,6	-70	8,203
0,2	257,5	2,667	1,7	-83,5	8,431
0,3	253,9	2,728	1,8	-99,4	8,700
0,4	250,2	2,791	1,9	-125,5	9,141
0,5	245,8	2,865	2	-215	10,654
0,6	240,5	2,955	2,1	-265,5	11,508
0,7	234,1	3,063	2,2	-285,2	11,841
0,8	225,8	3,203	2,3	-296,4	12,030
0,9	213,5	3,411	2,4	-304,8	12,172
1	189,3	3,820	2,5	-310,5	12,268
1,1	28,5	6,538	2,6	-315,1	12,346
1,2	-13,9	7,255	2,7	-318,9	12,410
1,3	-33,1	7,579	2,8	-322,3	12,468
1,4	-46,5	7,806	2,9	-325,4	12,520
1,5	-58,4	8,007	3	-327,9	12,563

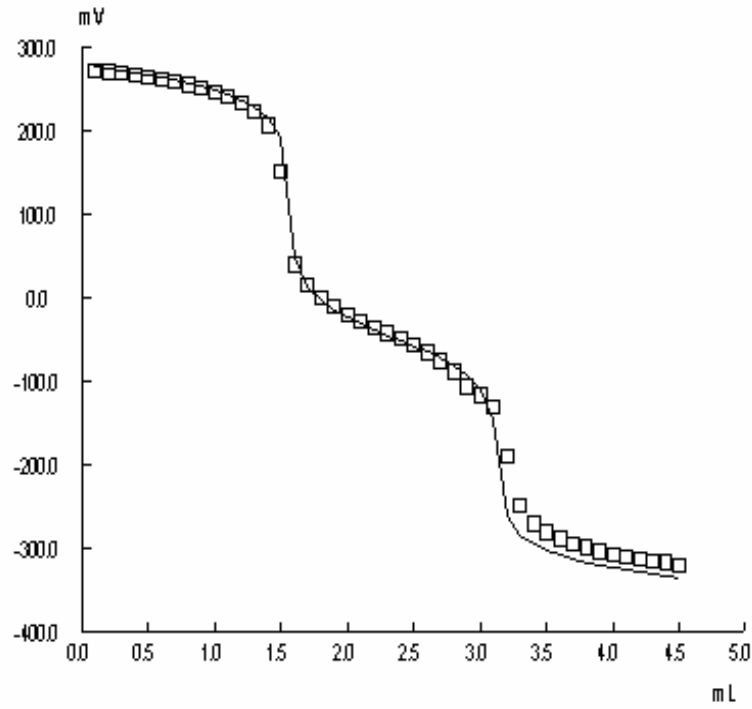
Bu bileşiğin titrasyonuna ait pH- ϕ , Gran ve PKPOT grafikleri, Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6'da verilmiştir. Şekil 4.4'den görüldüğü gibi bileşik stokiometriye uygun iki dönüm noktalı titrasyon grafiği vermektedir.



Şekil 4.4. Sülfotiazolün %50 (v/v) ACN-su ortamındaki potansiyometrik titrasyon grafiği, ϕ - pH



Şekil 4.5. Sülfotiazolün %50 (v/v) ACN-su ortamındaki Gran grafiği, 1. eşdeğerlik öncesi



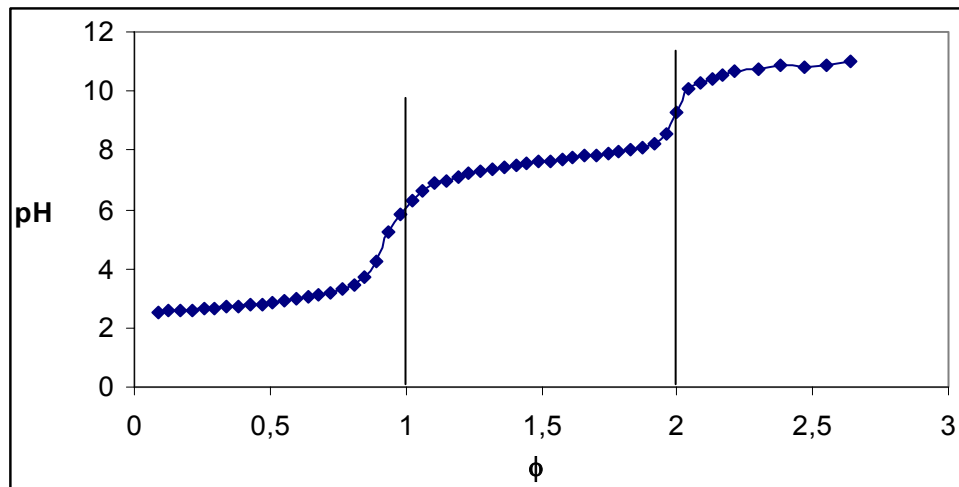
Şekil 4.6. Sulfotiazolün %50 (v/v) ACN-su ortamındaki PKPOT programı ile elde edilen potansiyometrik titrasyon grafiği

4.1.3. Sülfomerazinin % 50 (v/v) Asetonitril – Su İkili Karışımındaki Potansiyometrik Titrasyon Grafikleri

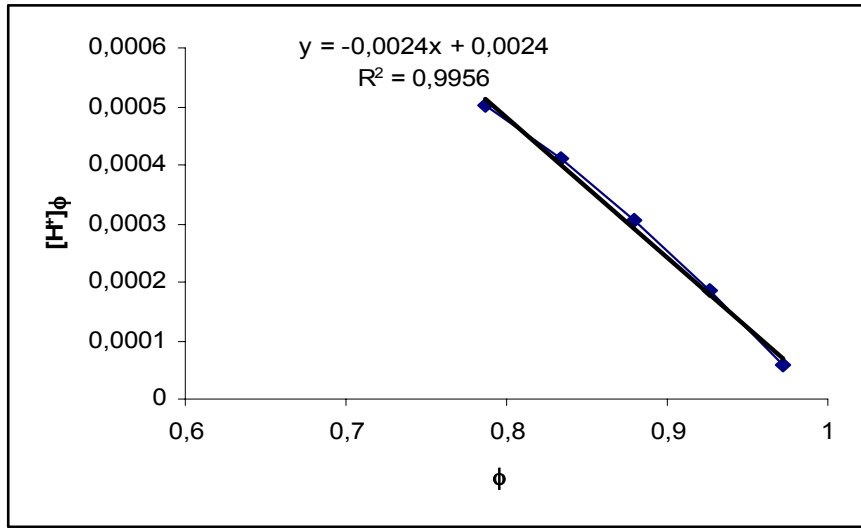
Bu bileşiğin $3,0 \cdot 10^{-3}$ M'lık çözeltisinden 10 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı 0,025 M KOH ile titre edilmiştir. Veriler, Çizelge 4.3'de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi mV değerleri E^0 değeri kullanılarak pH olarak ifade edilmiştir. Şekil 4,7'den görüldüğü gibi bileşik uygun iki dönüm noktalı titrasyon grafiği vermektedir. Ancak stokiyometriye uygun davranmamaktadır. Bu bileşiğin titrasyonuna ait pH- ϕ , Gran ve PKPOT grafikleri, Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.3. Sülfomerazinin % 50 (v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometrik titrasyon verileri

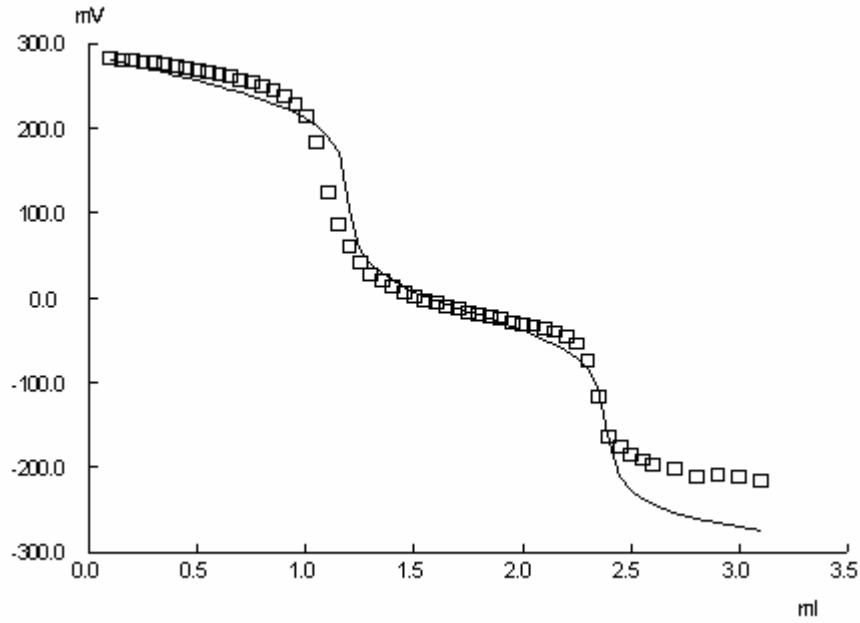
mL	mV	pH	mL	mV	pH
0,1	282,8	2,541	1,5	1,9	7,289
0,15	281,4	2,564	1,55	-2,5	7,363
0,2	280	2,588	1,6	-6,1	7,424
0,25	278,4	2,615	1,65	-10,1	7,492
0,3	276,9	2,640	1,7	-13,6	7,551
0,35	275,1	2,671	1,75	-17	7,608
0,4	273,2	2,703	1,8	-19,6	7,652
0,45	271,1	2,738	1,85	-22,4	7,699
0,5	268,9	2,776	1,9	-25,3	7,748
0,55	266,5	2,816	1,95	-28,4	7,801
0,6	264	2,858	2	-31,1	7,847
0,65	260,9	2,911	2,05	-33	7,879
0,7	257,6	2,967	2,1	-35,8	7,926
0,75	253,7	3,032	2,15	-39,8	7,994
0,8	249,3	3,107	2,2	-45	8,081
0,85	244	3,196	2,25	-54,1	8,235
0,9	237,4	3,308	2,3	-74,4	8,578
0,95	228,5	3,458	2,35	-117,6	9,309
1	214,2	3,700	2,4	-164,6	10,103
1,05	184	4,211	2,45	-176,2	10,299
1,1	123,3	5,237	2,5	-184,4	10,438
1,15	87,3	5,845	2,55	-191,2	10,553
1,2	61	6,290	2,6	-197,3	10,656
1,25	42	6,611	2,7	-202,6	10,745
1,3	26,9	6,866	2,8	-212,1	10,906
1,35	20,2	6,979	2,9	-208	10,837
1,4	13	7,101	3	-212,1	10,906
1,45	7,2	7,199	3,1	-216,3	10,977



Şekil 4.7. Sülfomerazinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki potansiyometrik titrasyon grafiği, ϕ - pH



Şekil 4.8. Sülfomerazinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki Gran grafiği, 1. eşdeğerlik öncesi



Şekil 4.9. Sülfomerazinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki titrasyon grafiği PKPOT programı ile elde edilen titrasyon grafiği.

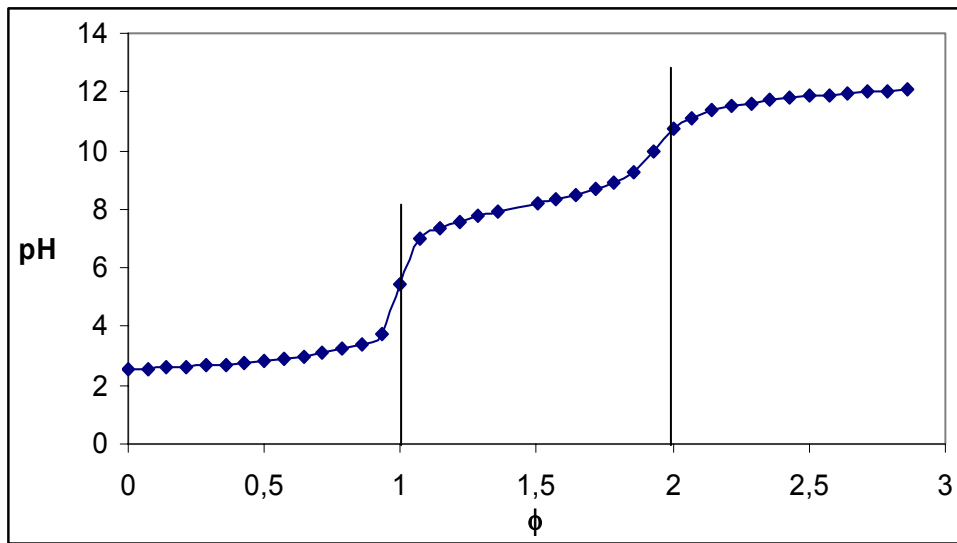
4.1.4. Sülfometazinin % 50 (v/v) Asetonitril – Su İkili Karışımındaki Potansiyometrik Titrasyon Grafikleri

Bu bileşiğin $3,0 \cdot 10^{-3}$ M'lık çözeltisinden 10 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı 0,025 M KOH ile titre edilmiştir. Veriler, Çizelge 4.4'de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi mV değerleri E^0 değeri kullanılarak pH olarak

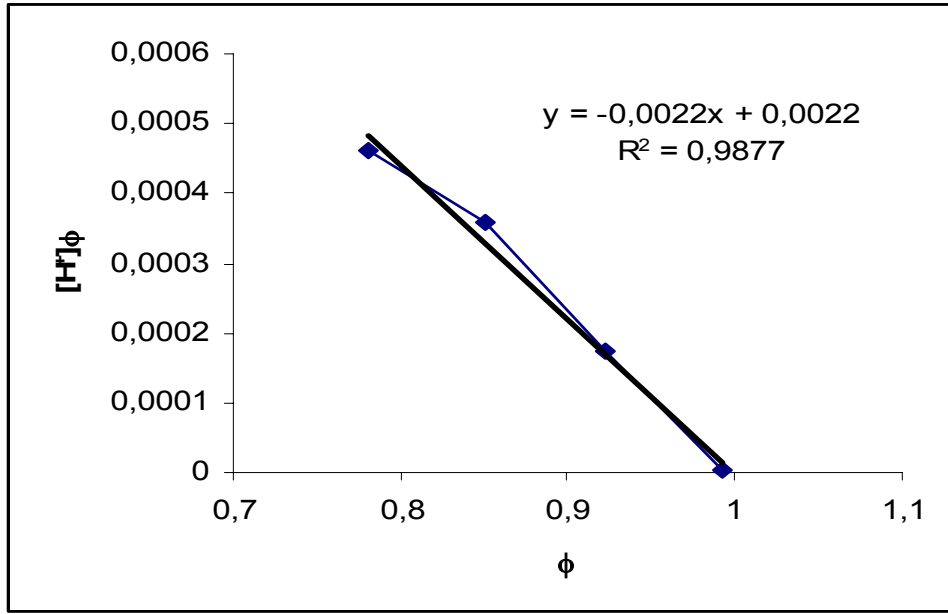
da ifade edilmiştir. Bu bileşiğin titrasyonuna ait pH- ϕ , Gran ve PKPOT grafikleri, Şekil 4.10, 4.11 ve 4.12’de verilmiştir. Şekil 4.10’ dan görüldüğü gibi iki dönüm noktalı stokiyometriye uygun titrasyon grafiği vermektedir. Ancak ikinci eşdeğerlik noktası sıçraması son derece azdır.

Çizelge 4.4. Sülfometazinin % 50 (v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometrik titrasyon verileri

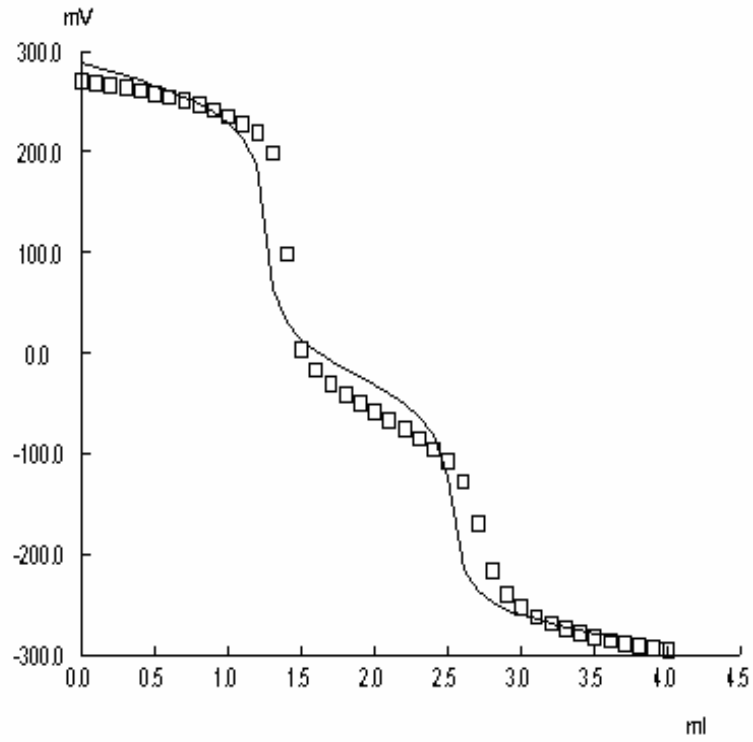
mL	mV	pH	mL	mV	pH
0	269,9	2,519	2,1	-66,7	8,208
0,1	268,1	2,549	2,2	-75,4	8,355
0,2	266,1	2,583	2,3	-85,1	8,519
0,3	263,9	2,620	2,4	-95,6	8,697
0,4	261,2	2,666	2,5	-108	8,906
0,5	258	2,720	2,6	-127,4	9,234
0,6	254,6	2,777	2,7	-169,4	9,944
0,7	251,2	2,835	2,8	-216,6	10,742
0,8	247,3	2,901	2,9	-239,9	11,136
0,9	241,5	2,999	3	-253	11,357
1	234,7	3,114	3,1	-262,1	11,511
1,1	228	3,227	3,2	-268,9	11,626
1,2	219,2	3,376	3,3	-274,2	11,716
1,3	198,4	3,727	3,4	-278,6	11,790
1,4	98,8	5,411	3,5	-282,5	11,856
1,5	3,8	7,017	3,6	-285,7	11,910
1,6	-17,1	7,370	3,7	-288,6	11,959
1,7	-30,4	7,595	3,8	-291,3	12,005
1,8	-41,2	7,777	3,9	-293,6	12,044
1,9	-50,3	7,931	4	-295,8	12,081



Şekil 4.10. Sülfometazinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki potansiyometrik titrasyon grafiği, ϕ - pH



Şekil 4.11. Sülfometazinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki Gran grafiği, 1. eşdeğerlik öncesi



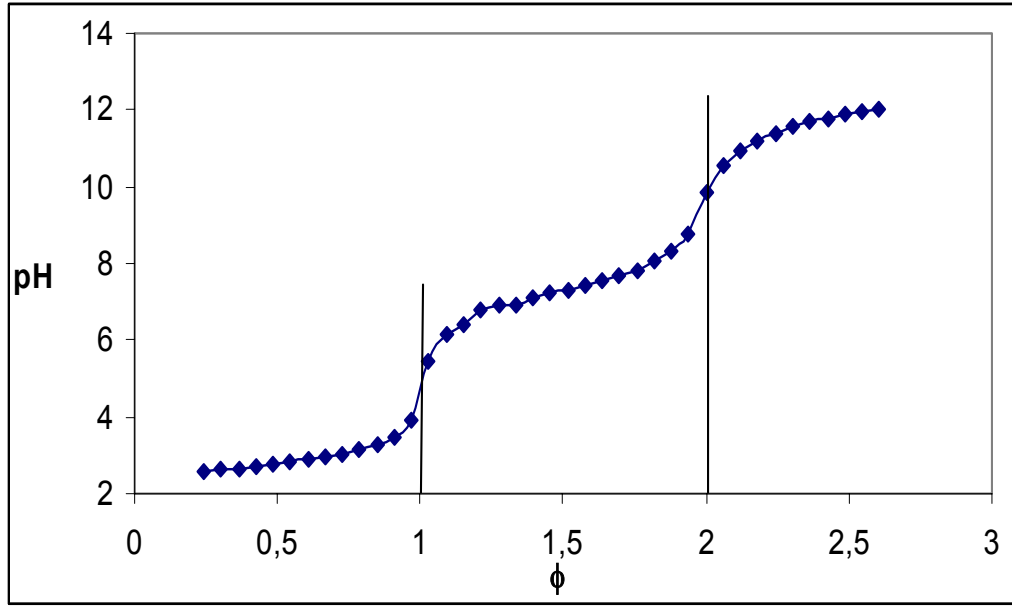
Şekil 4.12 Sülfometazinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki PKPOT programı ile elde edilen titrasyon grafiği

4.1.5. Sülfodoksinin % 50 (v/v) Asetonitril – Su İkili Karışımındaki Potansiyometrik Titrasyon Grafikleri

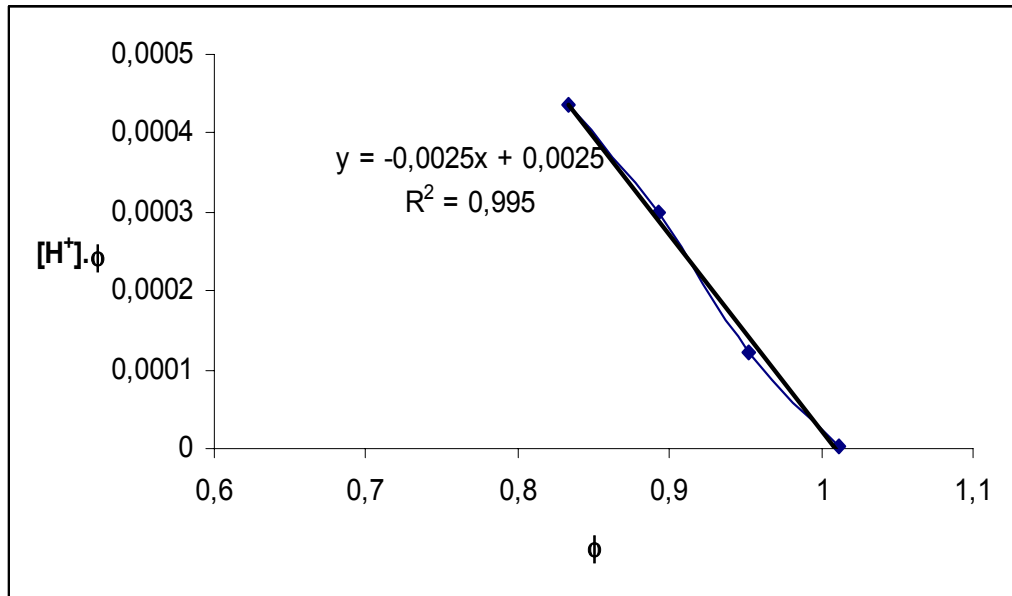
Bu bileşiğin $3,87 \cdot 10^{-3}$ M lık çözeltisinden 10 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı 0,025 M KOH ile titre edilmiştir. Veriler, Çizelge 4.5’de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi mV değerleri E^0 değeri kullanılarak pH olarak ifade edilmiştir. Bu bileşiğin titrasyonuna ait pH- ϕ , Gran ve PKPOT grafikleri, Şekil 4.13, 4.14 ve 4.15’de verilmiştir. Şekil 4.13’den görüldüğü gibi bileşik stokiyometriye uygun iki dönüm noktalı titrasyon grafiği vermektedir.

Çizelge 4.5. Sülfodoksinin % 50 (v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometrik titrasyon verileri

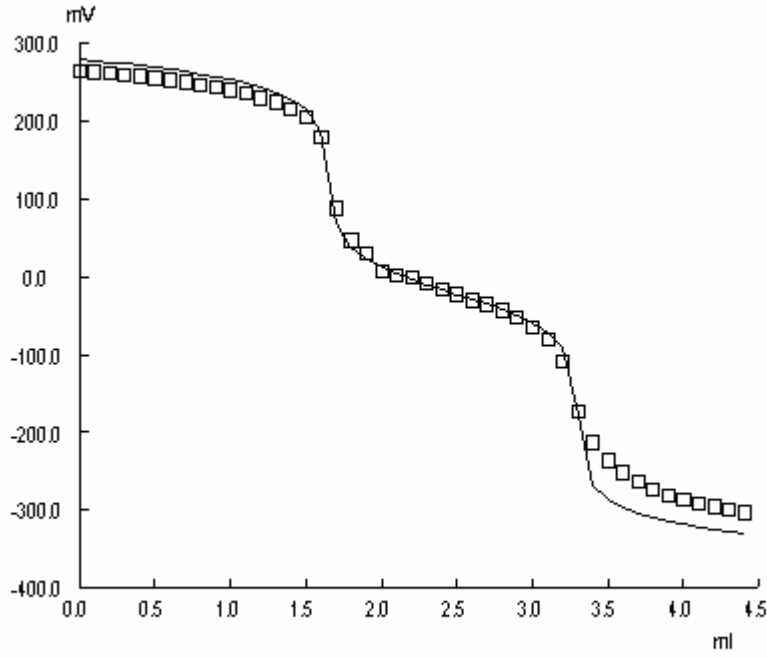
mL	mV	pH	mL	mV	pH
0,4	257,8	2,574	2,4	-16	7,203
0,5	255,6	2,612	2,5	-23,2	7,324
0,6	253,2	2,652	2,6	-30,1	7,441
0,7	250,2	2,703	2,7	-35,3	7,529
0,8	247,2	2,754	2,8	-43,2	7,662
0,9	244	2,808	2,9	-52,5	7,819
1	240,3	2,870	3	-65,1	8,032
1,1	235,6	2,950	3,1	-80,7	8,296
1,2	230,2	3,041	3,2	-109,4	8,781
1,3	224,2	3,142	3,3	-173	9,856
1,4	215,9	3,283	3,4	-213,6	10,543
1,5	204,5	3,475	3,5	-236	10,921
1,6	180	3,889	3,6	-252,1	11,193
1,7	88,2	5,441	3,7	-263,4	11,384
1,8	46,5	6,146	3,8	-273,6	11,557
1,9	30	6,425	3,9	-281,4	11,689
2	7,4	6,807	4	-287,3	11,788
2,1	1,7	6,903	4,1	-291,8	11,864
2,2	-0,7	6,932	4,2	-295,8	11,932
2,3	-8,7	7,079	4,3	-299,7	11,998



Şekil 4.13. Sülfodoksinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki potansiyometrik titrasyon grafiği, ϕ - pH



Şekil 4.14. Sülfodoksinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki Gran grafiği, 1. eşdeğerlik öncesi



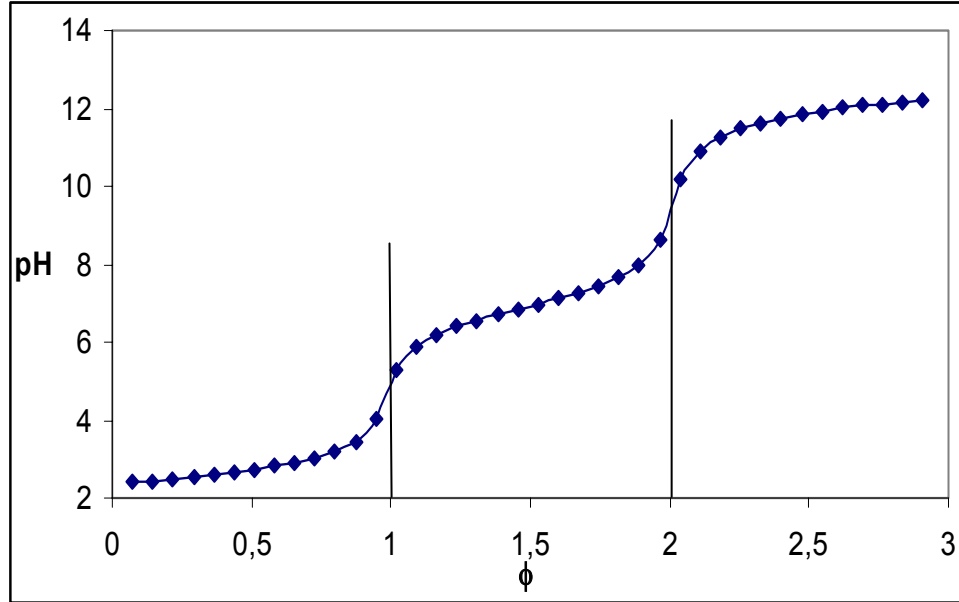
Şekil 4.15 Sülfodoksinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki PKPOT programı ile elde edilen titrasyon grafiği

4.1.6. Sülfomonometoksinin % 50 (v/v) Asetonitril – Su İkili Karışımındaki Potansiyometrik Titrasyon Grafikleri

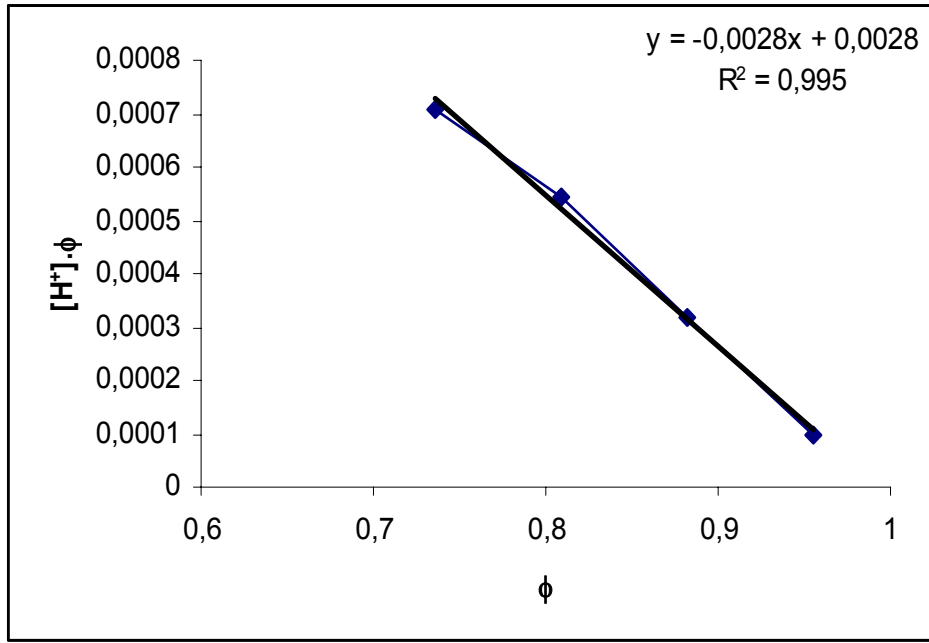
Bu bileşiğin $3,24 \cdot 10^{-3}$ M'lık çözeltisinden 10 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı 0,025 M KOH ile titre edilmiştir. Veriler, Çizelge 4.6'da verilmiştir. Çizelge 4.6'dan görüldüğü gibi mV değerleri E^0 değeri kullanılarak pH olarak da ifade edilmiştir. Bu bileşiğin titrasyonuna ait pH- ϕ , Gran ve PKPOT grafikleri, Şekil 4.16, 4.17 ve 4.18'de verilmiştir. Şekil 4.16'dan görüldüğü gibi bileşik stokiyometriye uygun iki dönüm noktalı titrasyon grafiği vermektedir.

Çizelge 4.6. Sülfomonometoksinin % 50(v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometrik titrasyon verileri

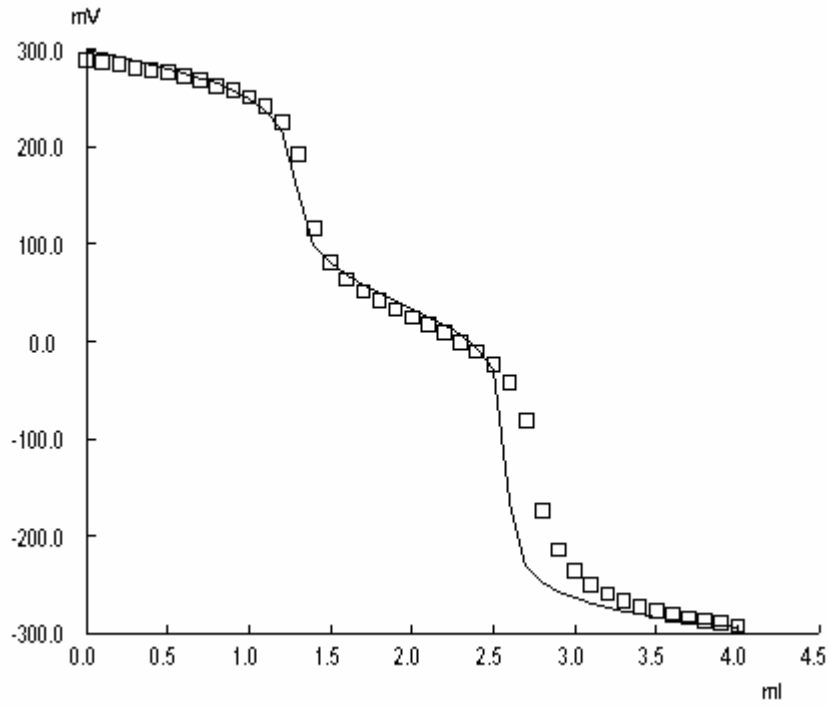
mL	mV	pH	mL	mV	pH
0,1	287,8	2,397	2,1	16,9	6,976
0,2	285,4	2,437	2,2	8,7	7,115
0,3	281,6	2,502	2,3	-0,2	7,265
0,4	279,2	2,542	2,4	-10,1	7,432
0,5	276,2	2,593	2,5	-22,7	7,645
0,6	272,6	2,654	2,6	-41,2	7,958
0,7	268,1	2,730	2,7	-81,1	8,633
0,8	263,1	2,814	2,8	-173,8	10,199
0,9	257,7	2,906	2,9	-213,7	10,874
1	251,2	3,016	3	-235,5	11,242
1,1	242	3,171	3,1	-249,2	11,474
1,2	225,8	3,445	3,2	-259	11,640
1,3	192,9	4,001	3,3	-266,2	11,761
1,4	117,1	5,282	3,4	-271,8	11,856
1,5	82,1	5,874	3,5	-276,4	11,934
1,6	64,1	6,178	3,6	-280,4	12,001
1,7	51,6	6,389	3,7	-283,9	12,061
1,8	41,8	6,555	3,8	-286,9	12,111
1,9	32,8	6,707	3,9	-289,5	12,155
2	24,9	6,841	4	-291,9	12,196



Şekil 4.16. Sülfomonometoksinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki potansiyometrik titrasyon grafiği, ϕ - pH



Şekil 4.17. Sülfomonometoksinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki Gran grafiği, 1. eşdeğerlik öncesi



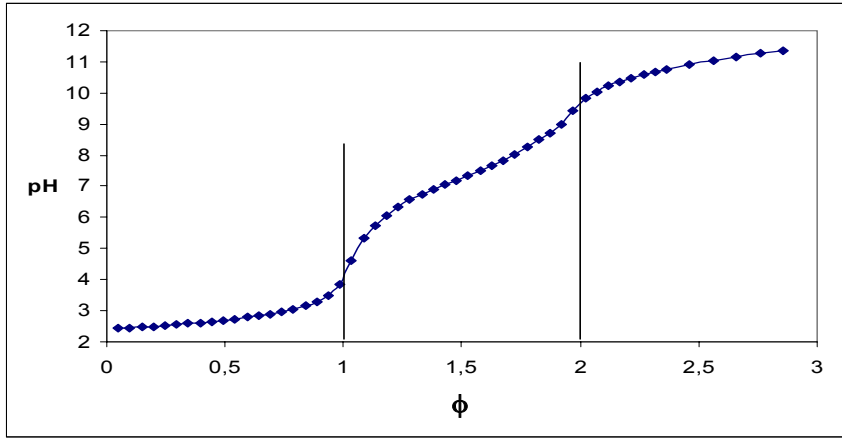
Şekil 4.18 Sülfomonometoksinin %50 (v/v) ACN-su ortamındaki PKPOT programı ile elde edilen titrasyon grafiği

4.1.7. Sülfometaksazolün % 50 (v/v) Asetonitril – Su İkili Karışımındaki Potansiyometrik Titrasyon Grafikleri

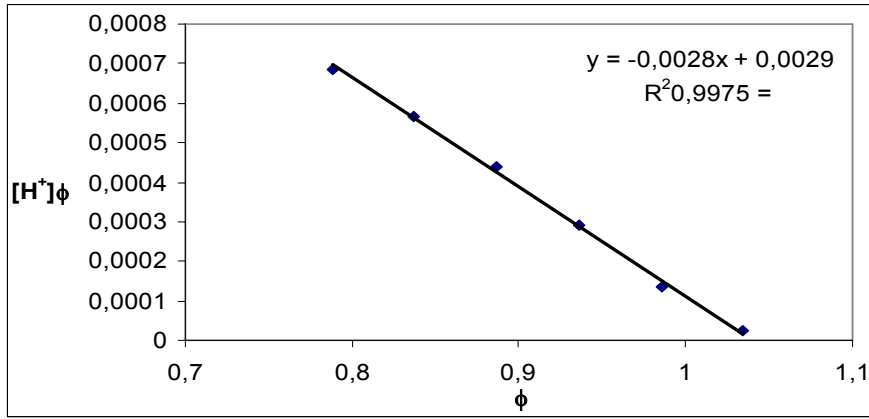
Bu bileşiğin $2,7 \cdot 10^{-3}$ M'lık çözeltisinden 10 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı 0,025 M KOH ile titre edilmiştir. Veriler, Çizelge 4.7'de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi mV değerleri E^0 değeri kullanılarak pH olarak da ifade edilmiştir. Bu bileşiğin titrasyonuna ait pH- ϕ , Gran ve PKPOT grafikleri, Şekil 4.19, 4.20 ve 4.21'de verilmiştir. Şekil 4.19'dan görüldüğü gibi bileşik stokiyometriye uygun iki dönüm noktalı titrasyon grafiği vermektedir.

Çizelge 4.7. Sülfometaksazolün % 50 (v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometrik titrasyon verileri

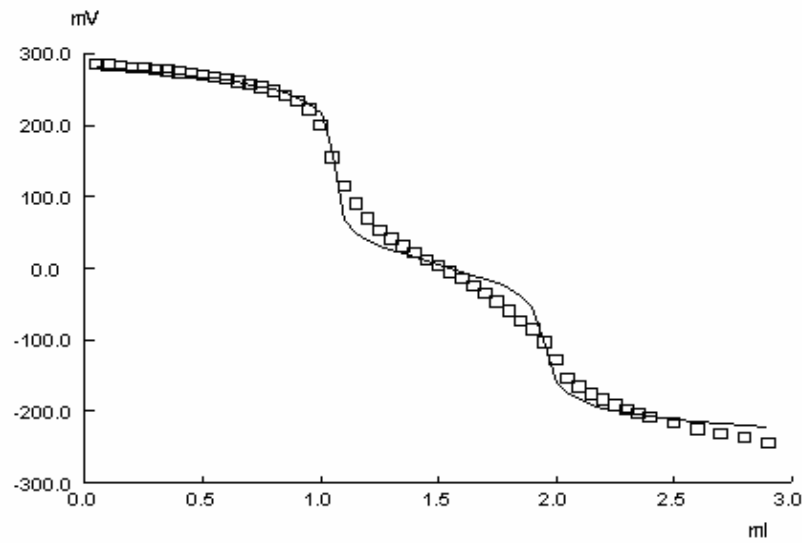
mL	mV	pH	mL	mV	pH
0,05	285,7	2,427	1,4	21,4	6,894
0,1	284,4	2,449	1,45	12,3	7,048
0,15	283	2,472	1,5	3,9	7,190
0,2	281,4	2,499	1,55	-4,7	7,335
0,25	280,3	2,518	1,6	-14,3	7,498
0,3	278,3	2,552	1,65	-24,6	7,672
0,35	276,2	2,587	1,7	-34,5	7,839
0,4	274,4	2,618	1,75	-46	8,033
0,45	272,2	2,655	1,8	-59,6	8,263
0,5	269,7	2,697	1,85	-73,9	8,505
0,55	267,1	2,741	1,9	-85,4	8,699
0,6	264,5	2,785	1,95	-103,4	9,004
0,65	261,2	2,841	2	-128,1	9,421
0,7	257,5	2,903	2,05	-153,3	9,847
0,75	253,1	2,978	2,1	-165,3	10,050
0,8	248,2	3,061	2,15	-175	10,214
0,85	241,8	3,169	2,2	-183,2	10,353
0,9	233,8	3,304	2,25	-190,6	10,478
0,95	221,9	3,505	2,3	-197,1	10,588
1	200,6	3,865	2,35	-202,6	10,681
1,05	155,4	4,629	2,4	-207,9	10,770
1,1	114,9	5,314	2,5	-216,4	10,914
1,15	90,2	5,731	2,6	-224,4	11,049
1,2	70,4	6,066	2,7	-231	11,161
1,25	53,6	6,350	2,8	-236,8	11,259
1,3	40,9	6,565	2,9	-243,8	11,377
1,35	30,7	6,737			



Şekil 4.19. Sulfometaksazolün %50 (v/v) ACN-su ortamındaki potansiyometrik titrasyon grafiği, ϕ - pH



Şekil 4.20. Sulfometaksazolün %50 (v/v) ACN-su ortamındaki Gran grafiği, 1. eşdeğerlik öncesi



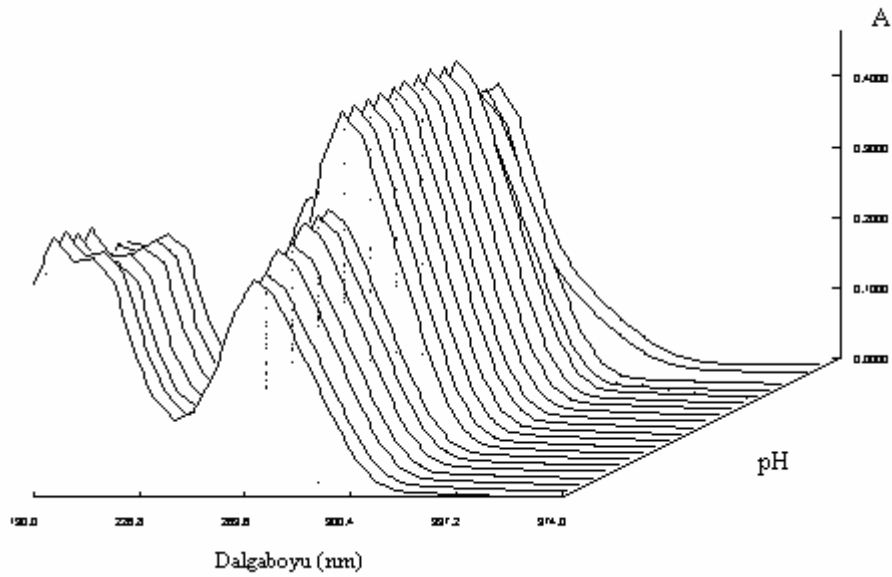
Şekil 4.21. Sulfometaksazolün %50 (v/v) ACN-su ortamındaki PKPOT programı ile elde edilen titrasyon grafiği

4.2. HPLC-DAD Yöntemi

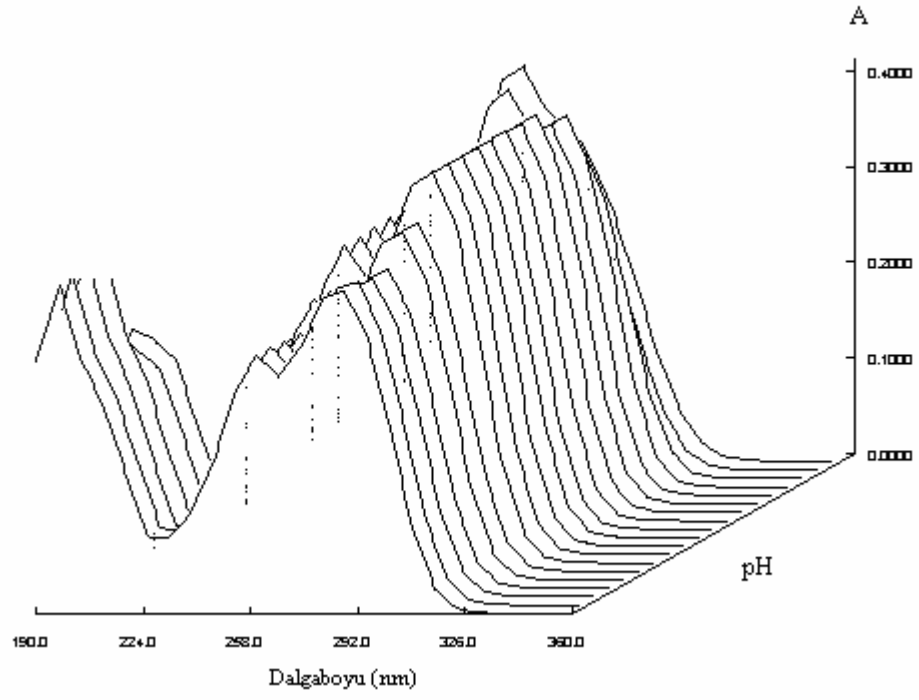
Bu bölümde sülfodiazin, sülfotiazol, sülfomerazin, sülfometazin, sülfomonometoksin, sülfodoksin ve sülfometaksazolün su-asetonitril ikili karışımları kullanılarak gerçekleştirilen sıvı kromatografik çalışmalarında diyot array dedektörden elde edilen spektrumları aşağıda verilmiştir. Sülfonamitlerin HPLC-DAD spektrumları, % 50, %40 ve %30 (v/v) asetonitril - su karışımında elde edilmiştir. Çalışılan sülfonamit bileşiklerinin bu ortamlarda yapılan pK_a tayini esnasındaki enjeksiyonlarında, çalışma dalga boyu olarak 190-500 nm aralığı seçilmiştir. Grafikler, absorbansın etkilendiği dalga boyu aralığında verilmiştir.

4.2.1. Sülfonamitlerin %50(v/v) Asetonitril-Su İkili Karışımında LC-DAD Yöntemi ile Elde Edilen Spektrumları

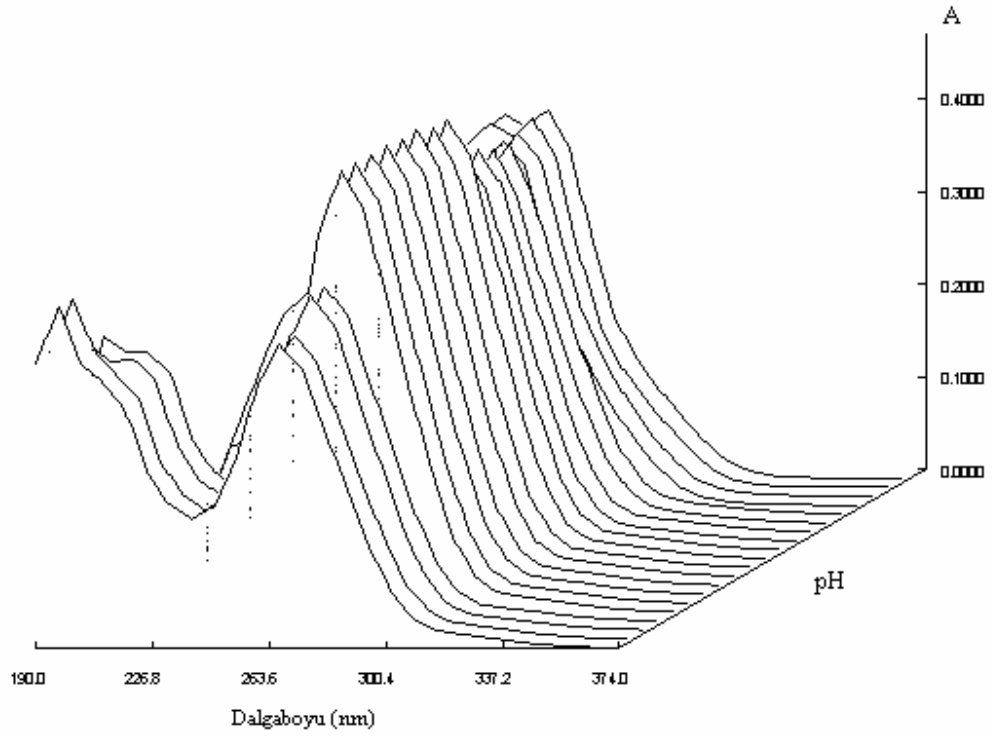
Sülfodiazin, sülfotiazol, sülfomerazin, sülfometazin, sülfomonometoksin, sülfodoksin ve sülfometaksazol için % 50 (v/v) asetonitril su karışımında pH 2,25-9,65 aralığında elde edilen spektrumlar, dalga boyu-absorbans-pH ekseninde sırasıyla Şekil 4.22, Şekil 4.23, Şekil 4.24, Şekil 4.25, Şekil 4.26, Şekil 4.27 ve Şekil 4.28’de verilmektedir.



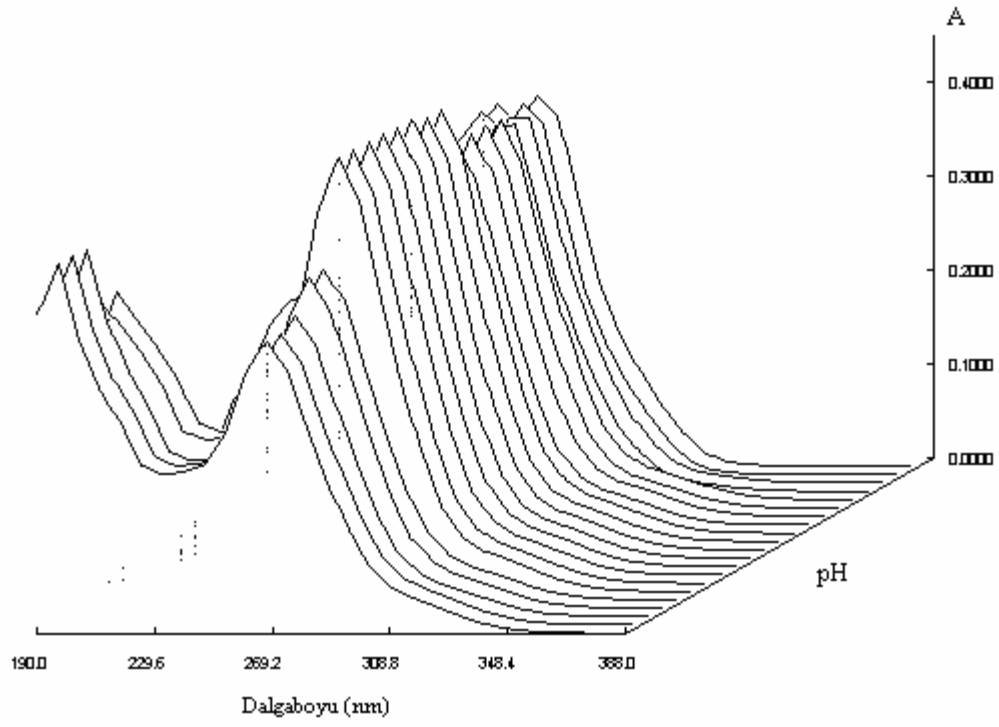
Şekil 4.22. Sülfodiazinin %50 ACN-H₂O ortamında elde edilen DAD spektrumu



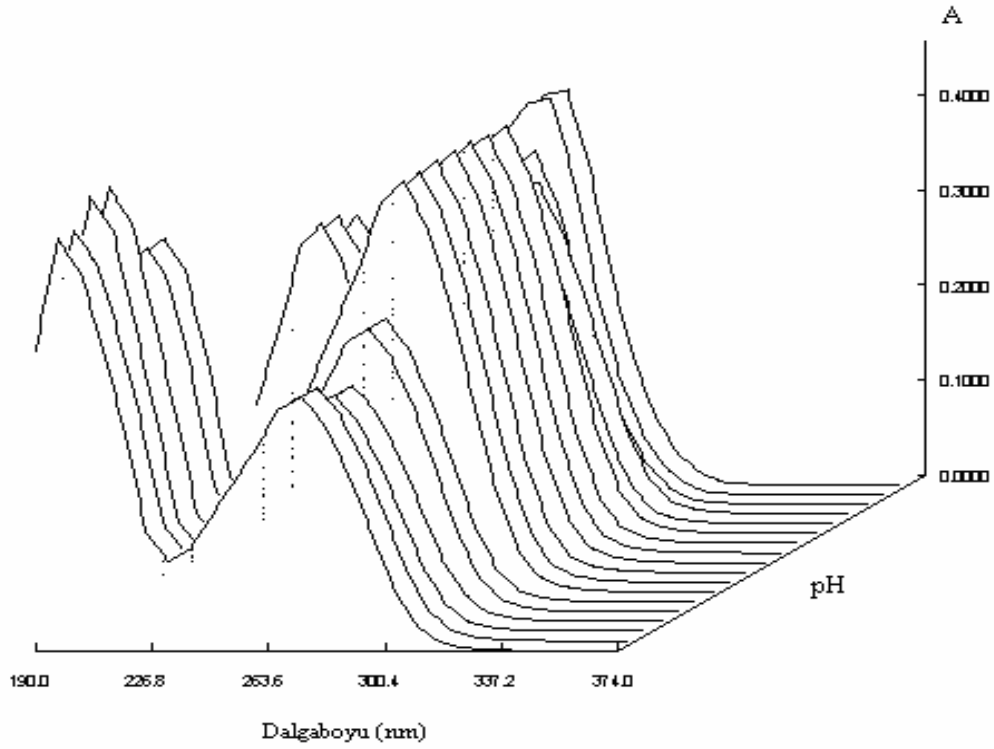
Şekil 4.23. Sülfotiazolün %50 ACN-H₂O ortamında elde edilen DAD spektrumu



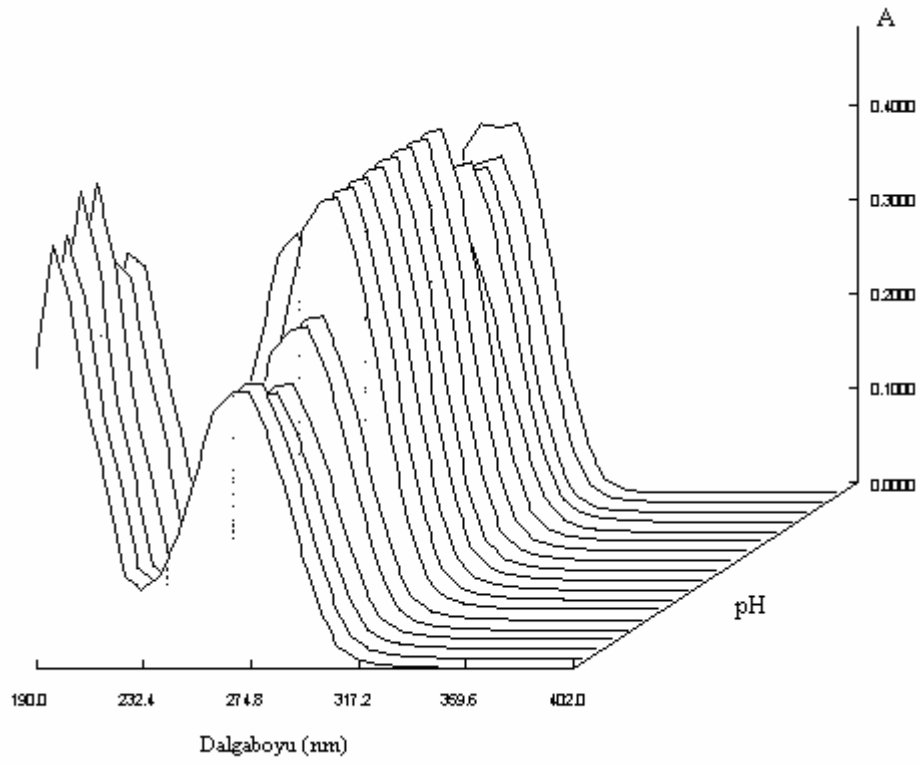
Şekil 4.24. Sülfomerazinin %50 ACN-H₂O ortamında elde edilen DAD spektrumu



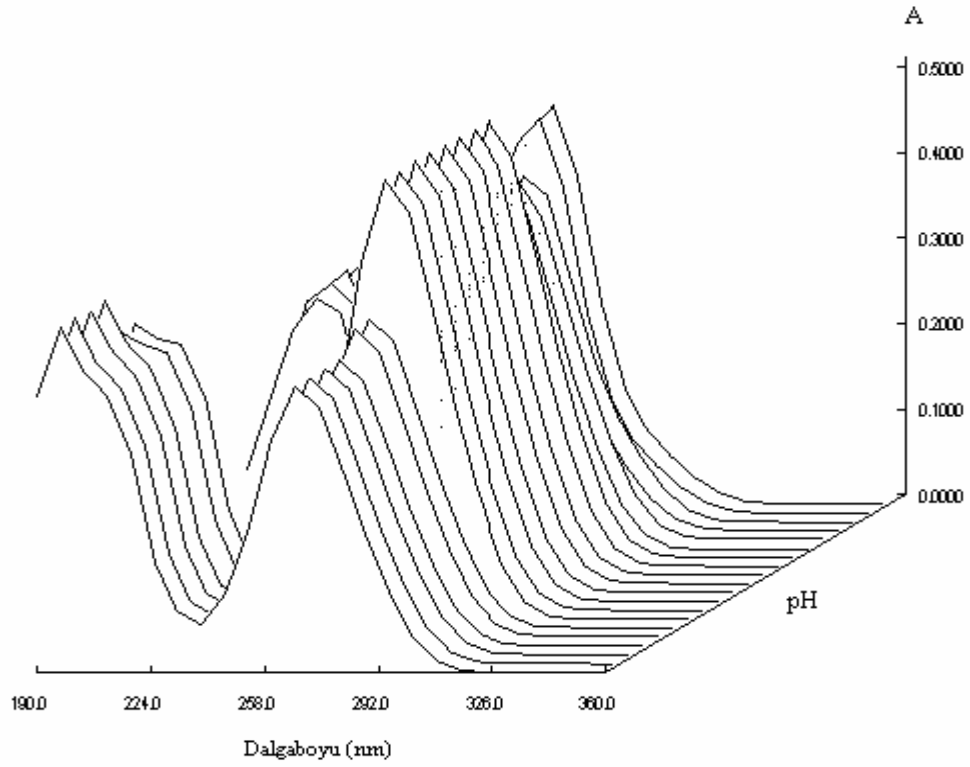
Şekil 4.25. Sülfometazinin %50 ACN-H₂O ortamında elde edilen DAD spektrumu



Şekil 4.26. Sülfomonometoksinin %50 ACN-H₂O ortamında elde edilen DAD spektrumu



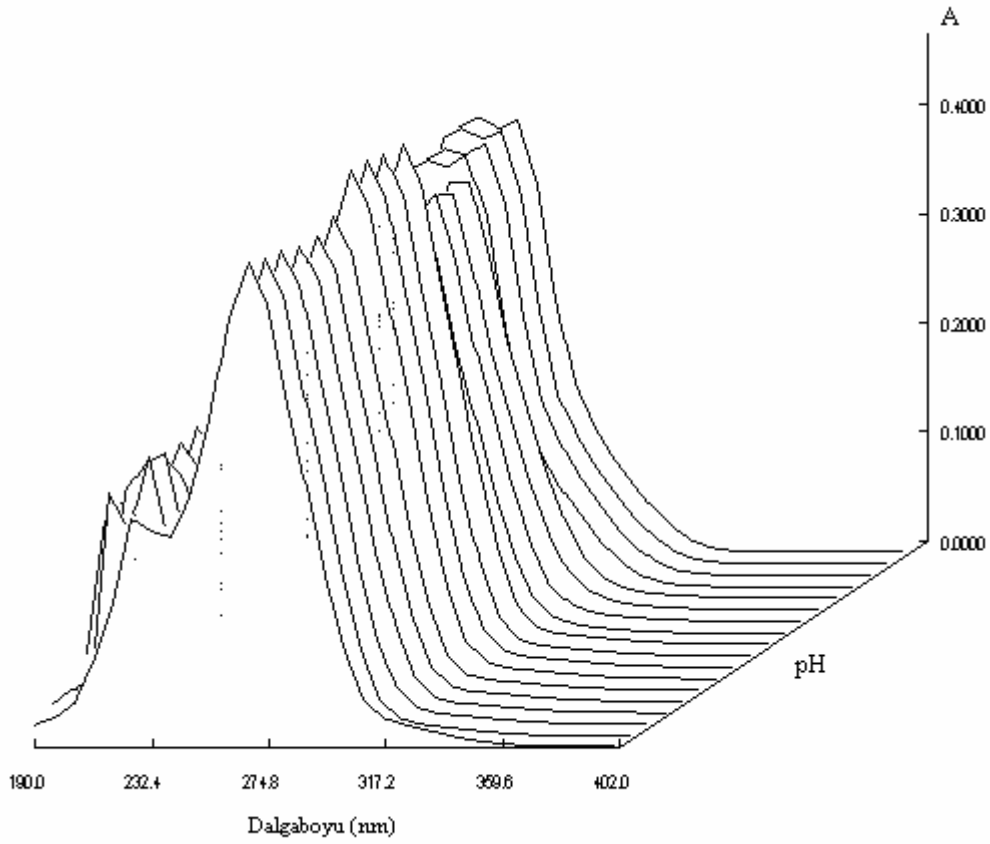
Şekil 4.27. Sülfodoksinin %50 ACN-H₂O ortamında elde edilen DAD spektrumu



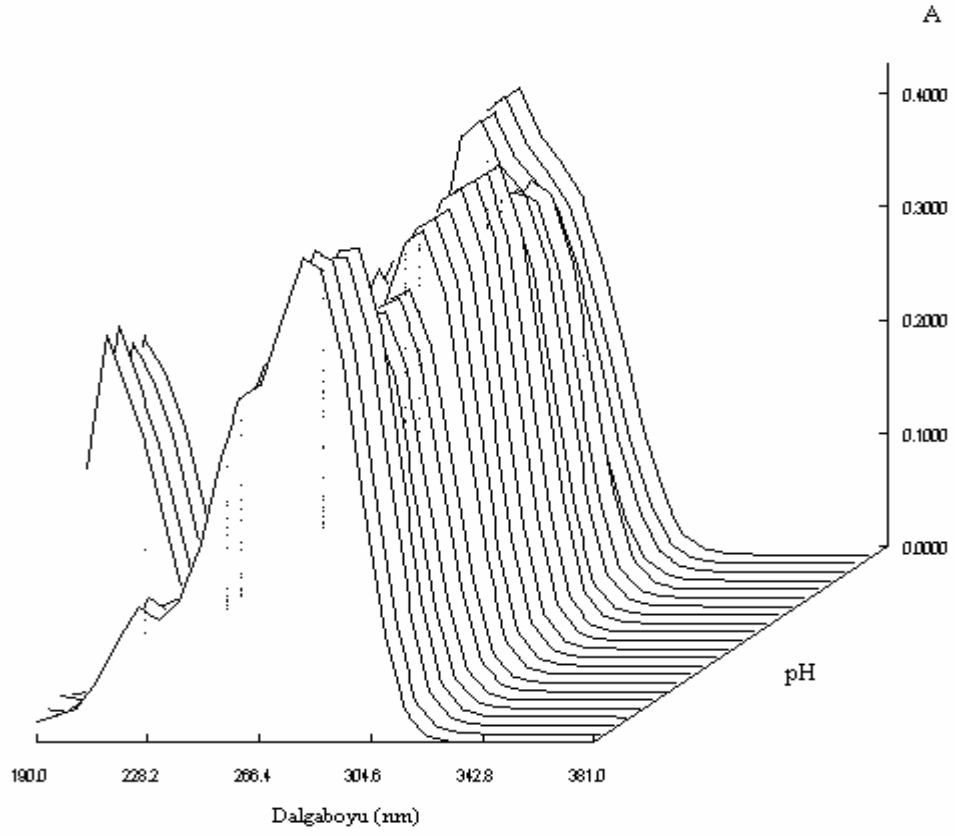
Şekil 4.28. Sülfometaksazolün %50 ACN-H₂O ortamında elde edilen DAD spektrumu

4.2.2. Sülfonamitlerin %40 (v/v) Asetonitril-Su İkili Karışımında HPLC-DAD Yöntemi ile Elde Edilen Spektrumları

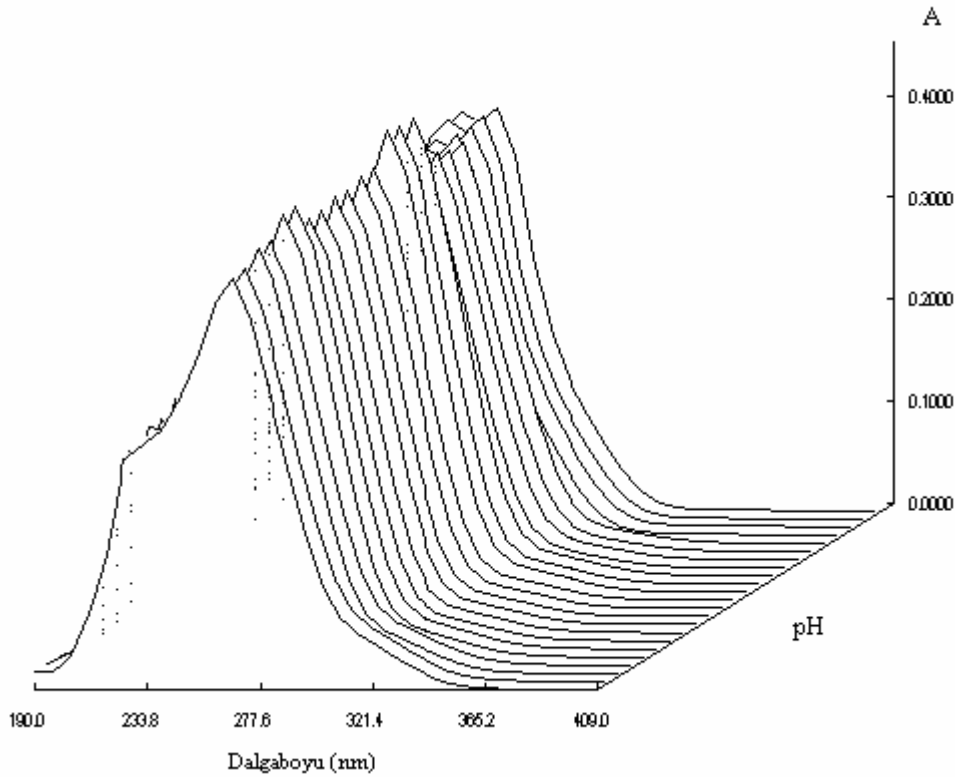
Sülfodiazin, sülfotiazol, sülfomerazin, sülfometazinin, sülfomonometoksin, sülfodoksin ve sülfometaksazol için % 40 (v/v) asetonitril su karışımında pH 1,68-9,50 aralığında elde edilen spektrumlar, dalga boyu-absorbans-pH ekseninde sırasıyla Şekil 4.29, Şekil 4.30, Şekil 4.31, Şekil 4.32, Şekil 4.33, Şekil 4.34 ve Şekil 4.35’de verilmektedir.



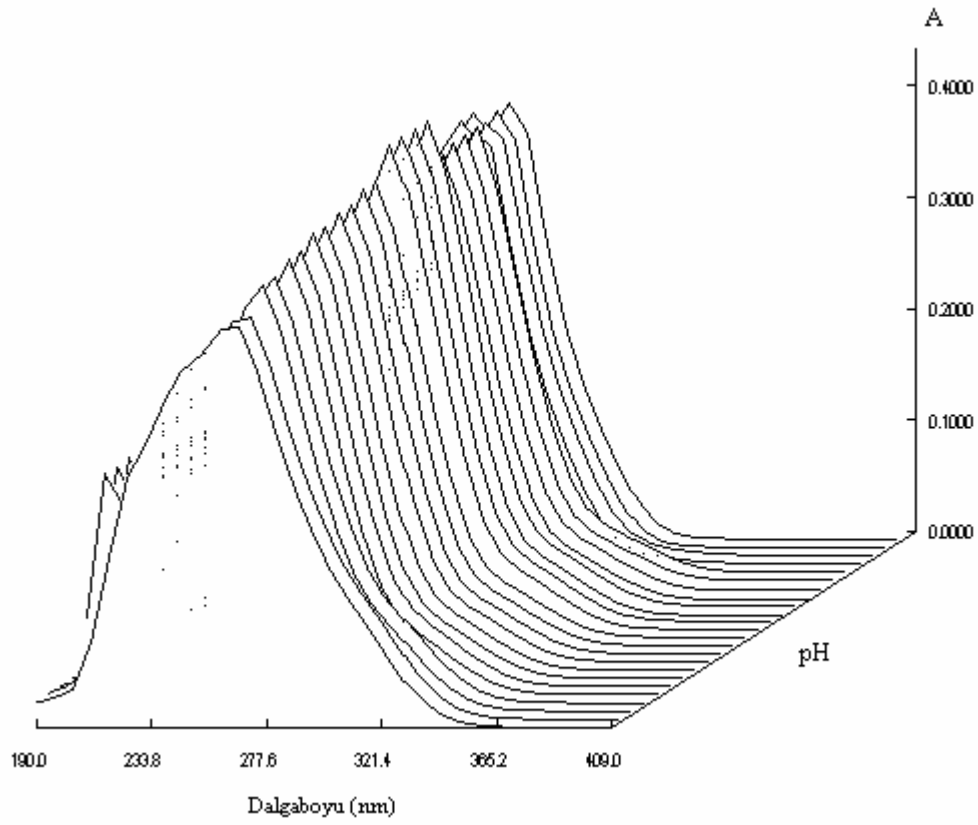
Şekil 4.29. Sülfodiazinin %40 ACN-H₂O ortamında elde edilen DAD spektrumu



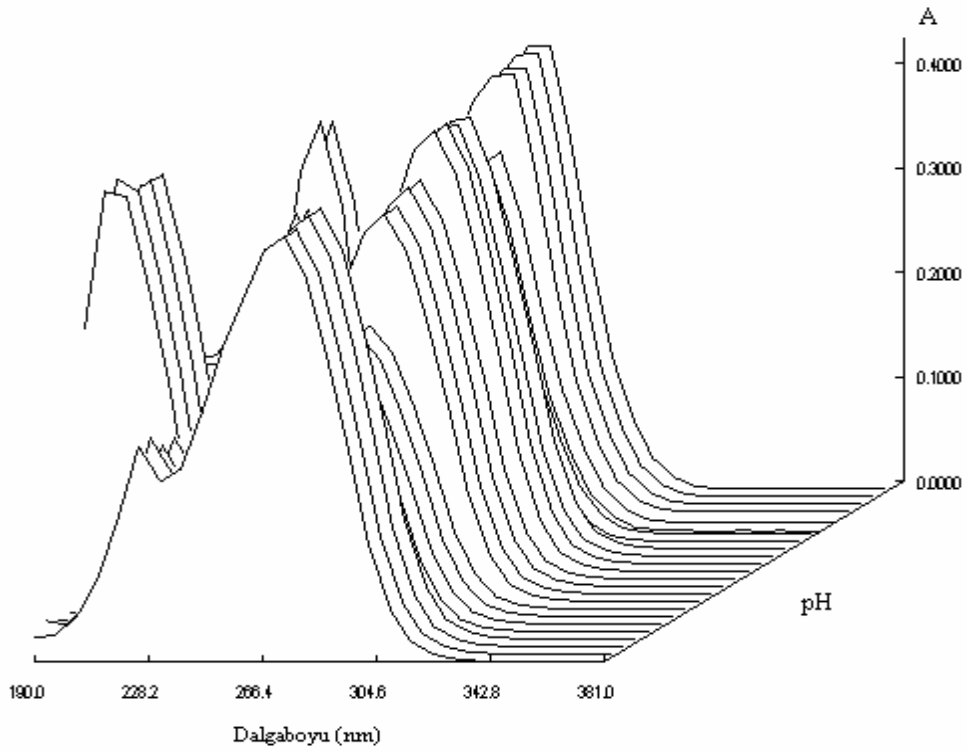
Şekil 4.30. Sülfotiazolün %40 ACN-H₂O ortamında elde edilen DAD spektrumu



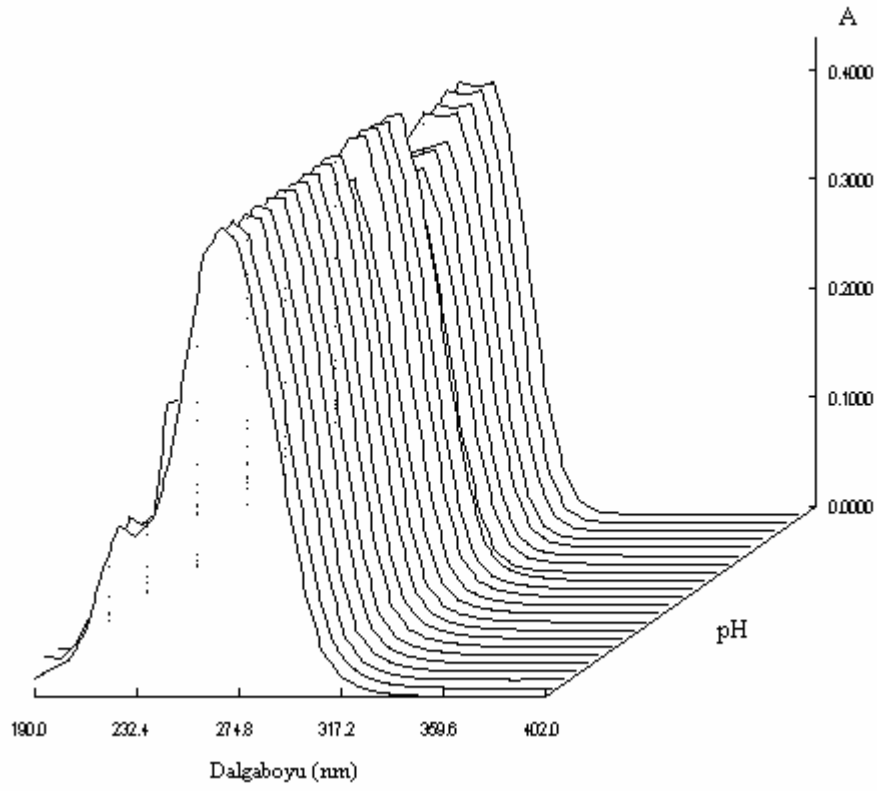
Şekil 4.31. Sülfomerazinin %40 ACN-H₂O ortamında elde edilen DAD spektrumu



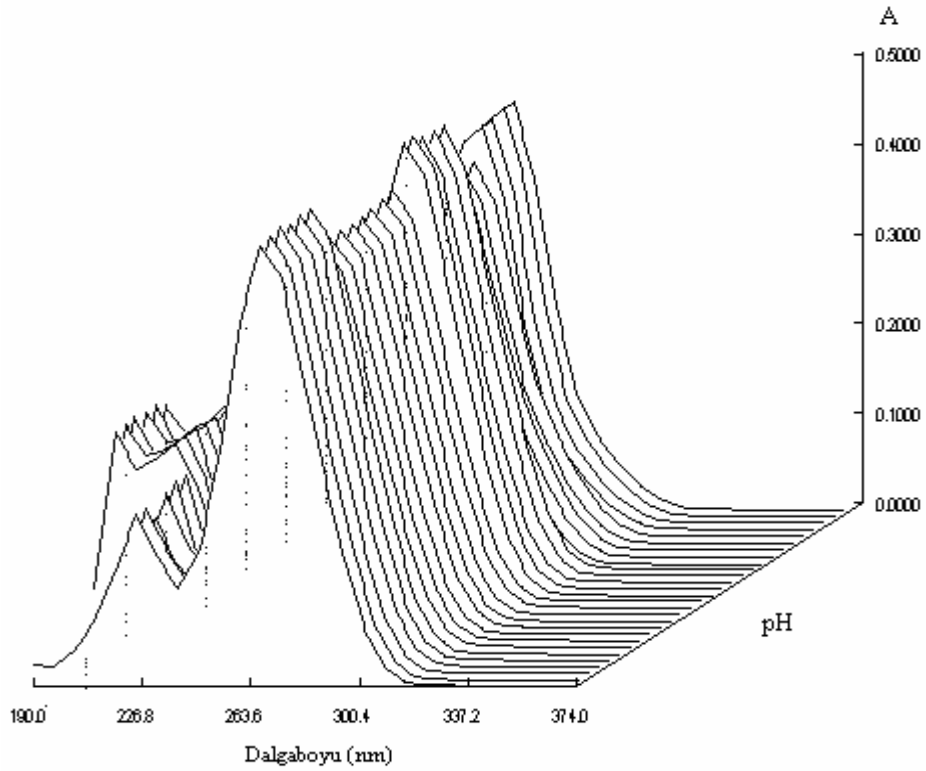
Şekil 4.32. Sülfometazinin %40 ACN-H₂O ortamında elde edilen DAD spektrumu



Şekil 4.33. Sülfomonometoksinin %40 ACN-H₂O ortamında elde edilen DAD spektrumu



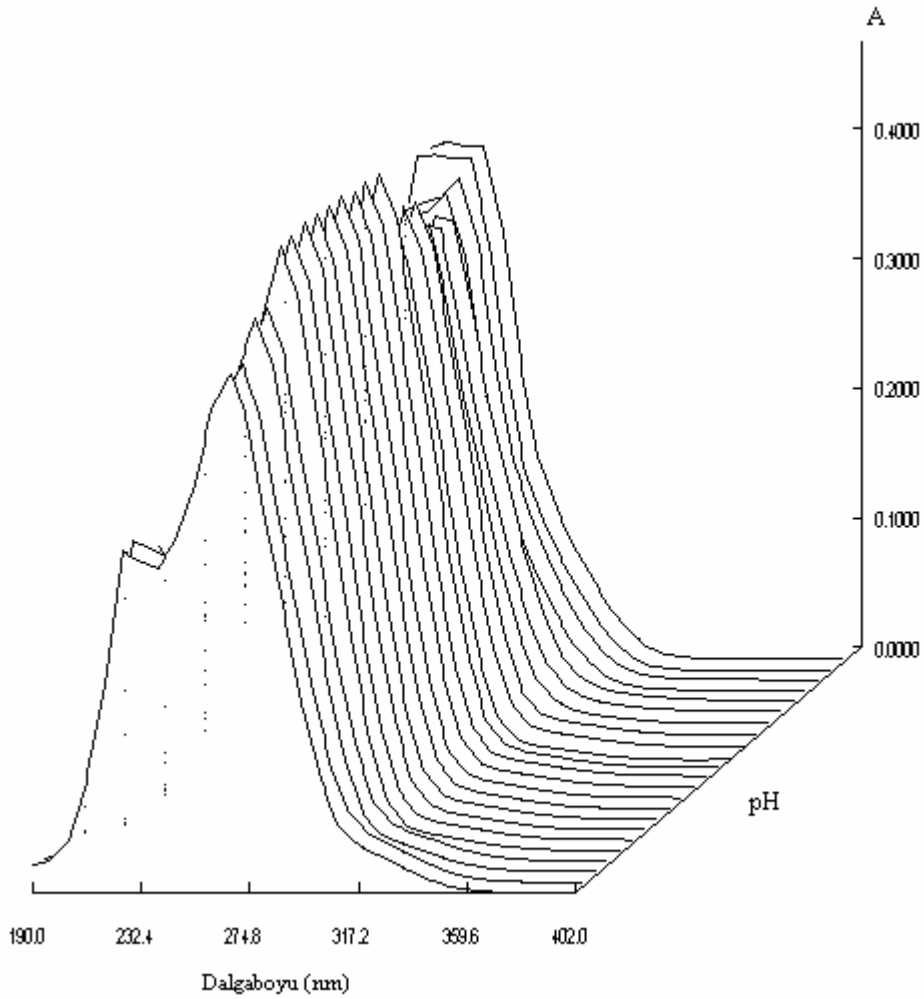
Şekil 4.34. Sülfodoksinin %40 ACN-H₂O ortamında elde edilen DAD spektrumu



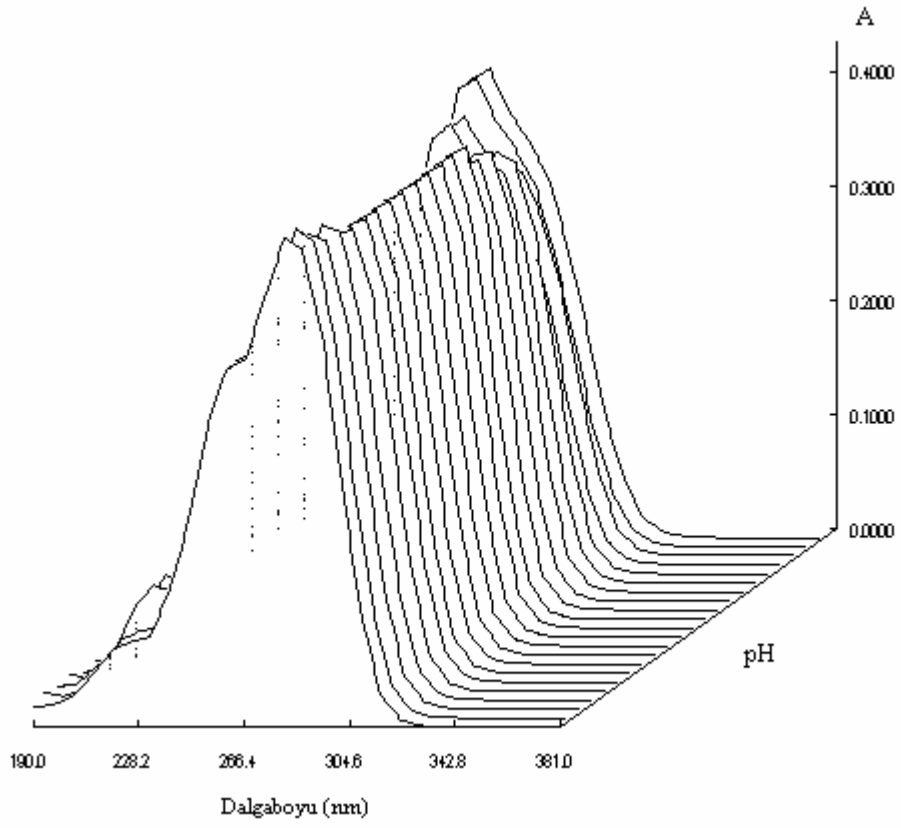
Şekil 4.35. Sülfometaksazolün %40 ACN-H₂O ortamında elde edilen DAD spektrumu

4.2.3. Sülfonamitlerin %30 (v/v) Asetonitril-Su İkili Karışımında HPLC-DAD Yöntemi ile Elde Edilen Spektrumları

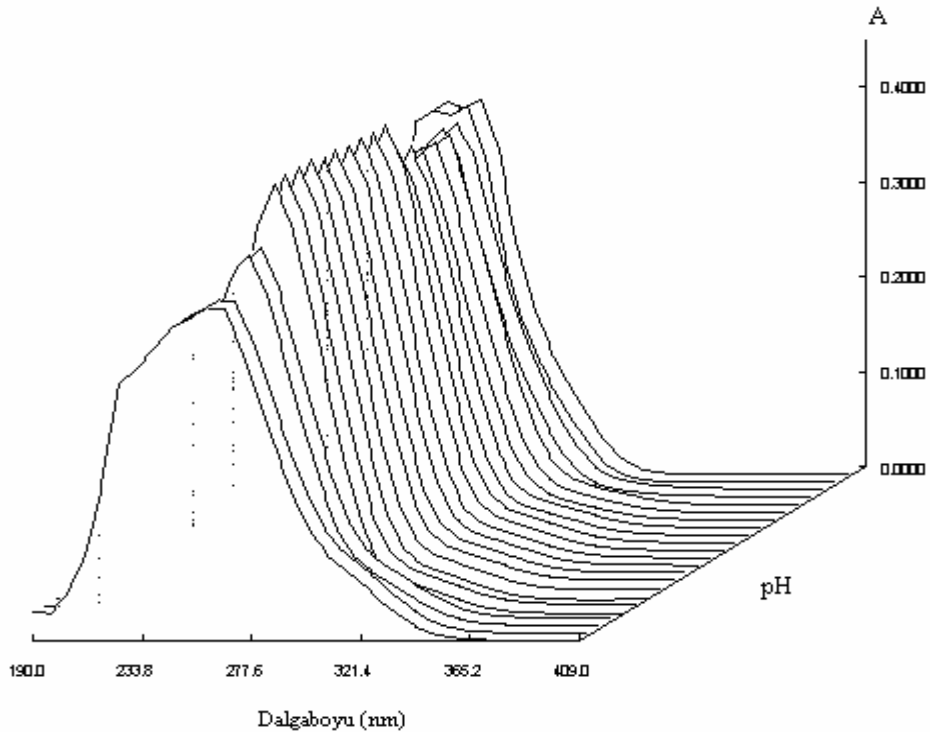
Sülfodiazin, sülfotiazol, sülfomerazin, sülfometazinin, sülfomonometoksin, sülfodoksin ve sülfometaksazol için % 30 (v/v) asetonitril su karışımında pH 1,70-9,00 aralığında elde edilen spektrumlar, dalga boyu-absorbans-pH ekseninde sırasıyla Şekil 4.36, Şekil 4.37, Şekil 4.38, Şekil 4.39, Şekil 4.40, Şekil 4.41 ve Şekil 4.42’de verilmektedir.



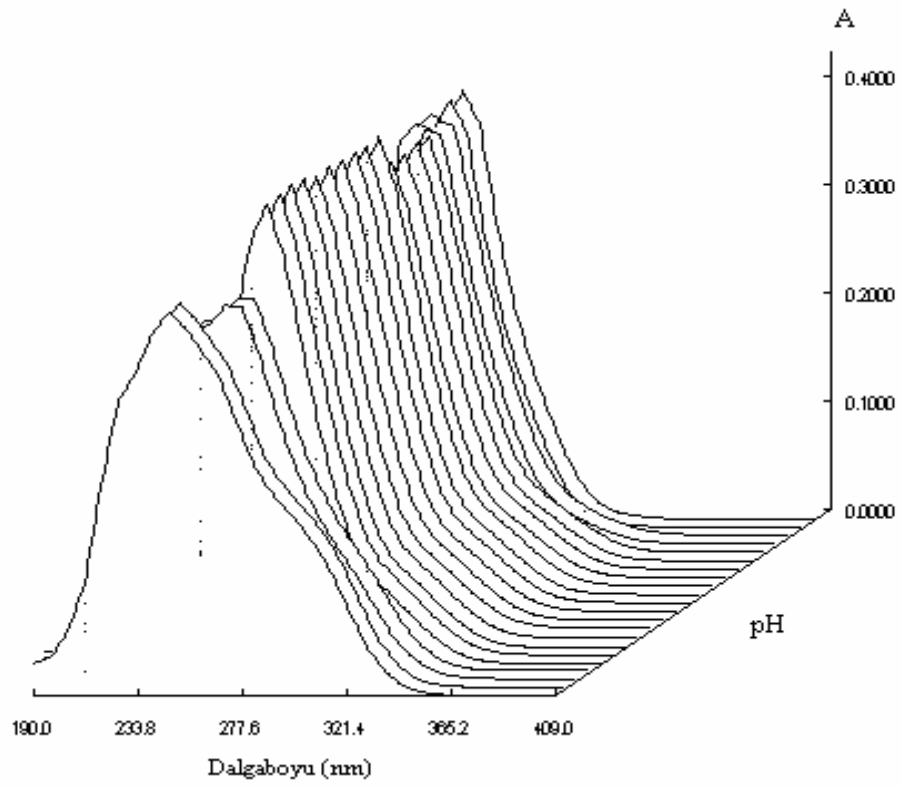
Şekil 4.36. Sülfodiazinin %30 ACN-H₂O ortamında elde edilen DAD spektrumu



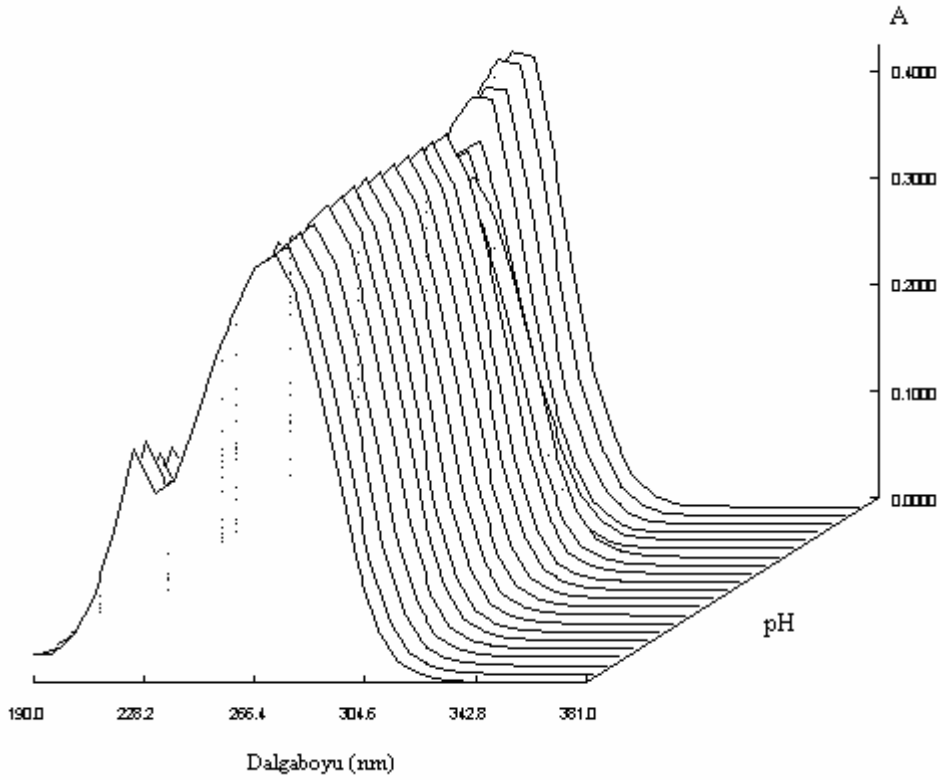
Şekil 4.37. Sülfotiazolün %30 ACN-H₂O ortamında elde edilen DAD spektrumu



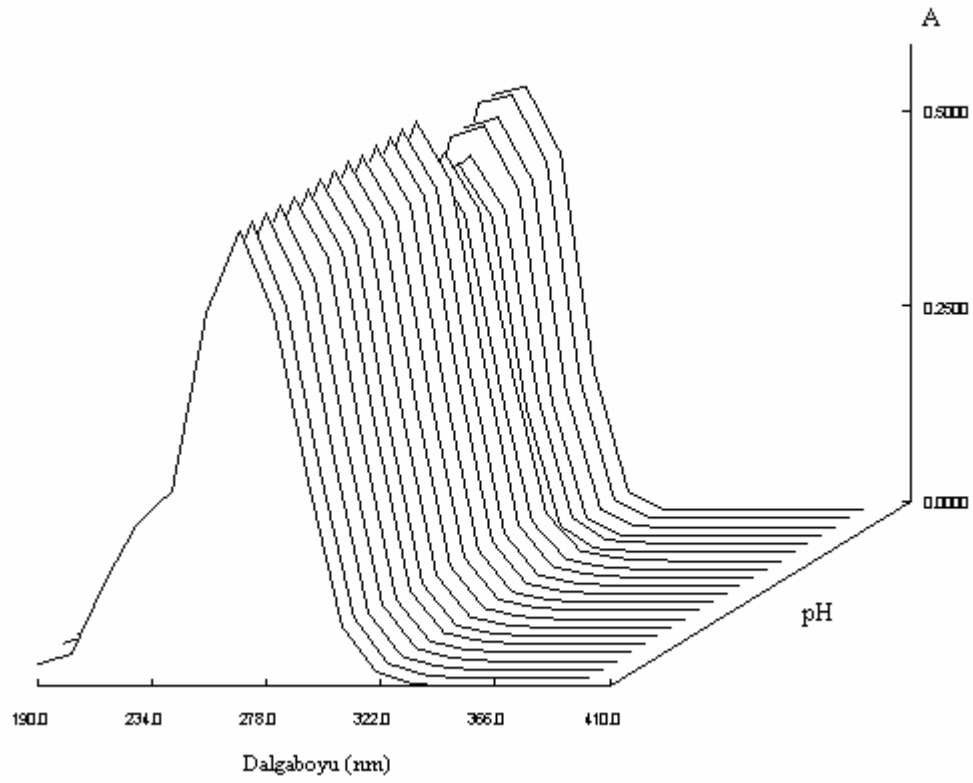
Şekil 4.38. Sülfomerazinin %30 ACN-H₂O ortamında elde edilen DAD spektrumu



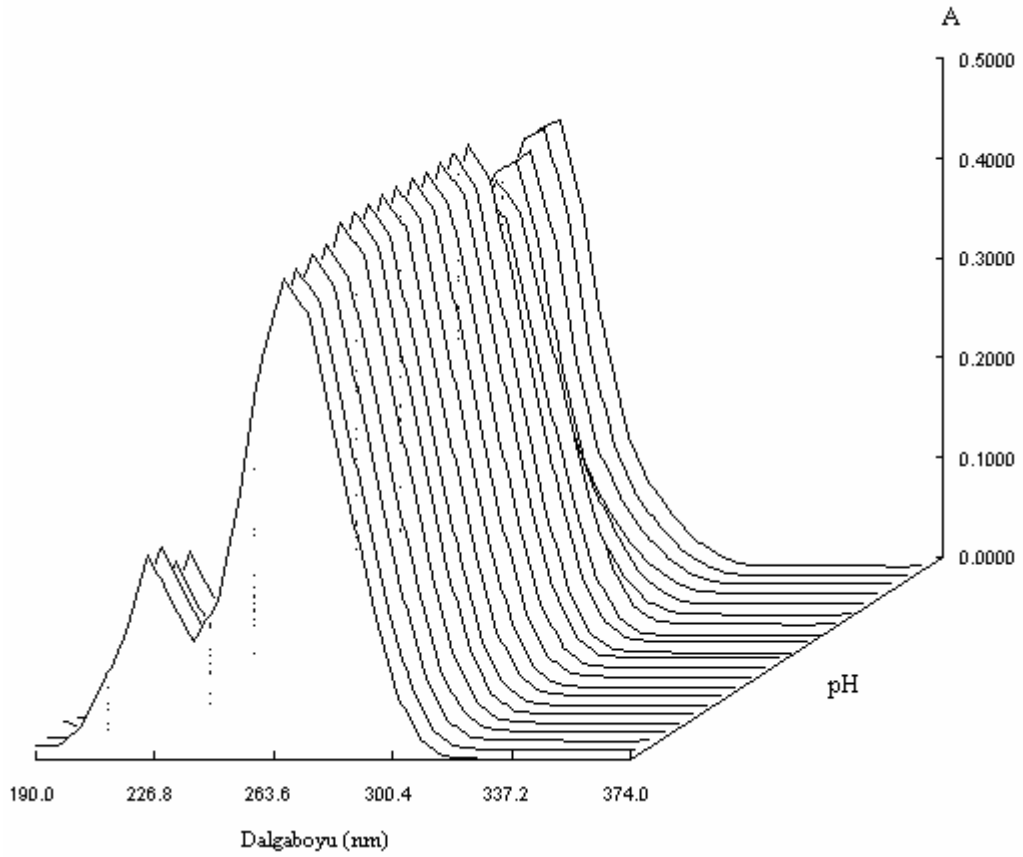
Şekil 4.39. Sülfometazinin %30 ACN-H₂O ortamında elde edilen DAD spektrumu



Şekil 4.40. Sülfomonometoksinin %30 ACN-H₂O ortamında elde edilen DAD spektrumu



Şekil 4.41. Sülfodoksinin %30 ACN-H₂O ortamında elde edilen DAD spektrumu



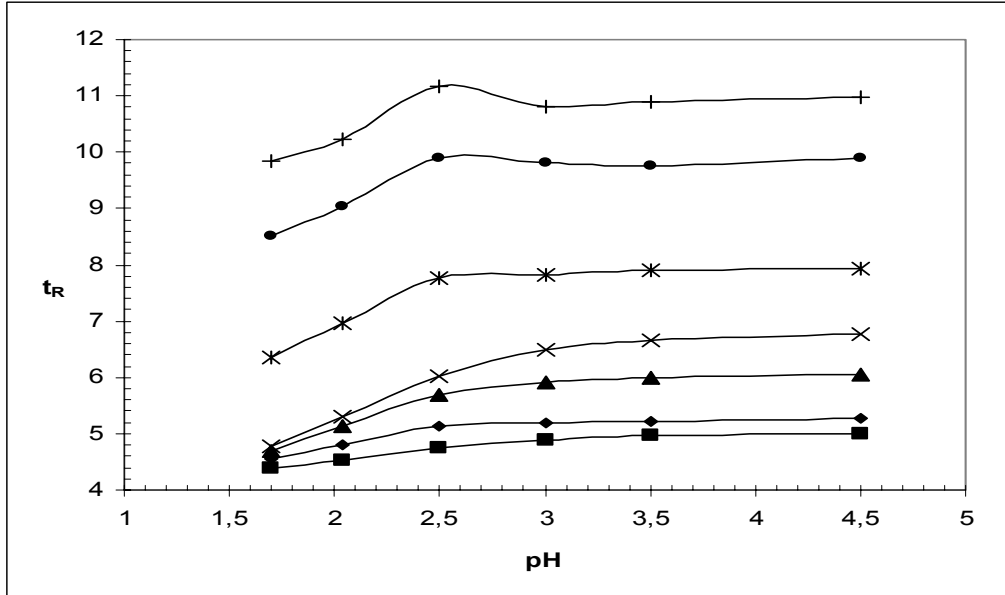
Şekil 4.42. Sülfometaksazolün %30 ACN-H₂O ortamında elde edilen DAD spektrumu

4.3. Sıvı Kromatografi Yöntemi

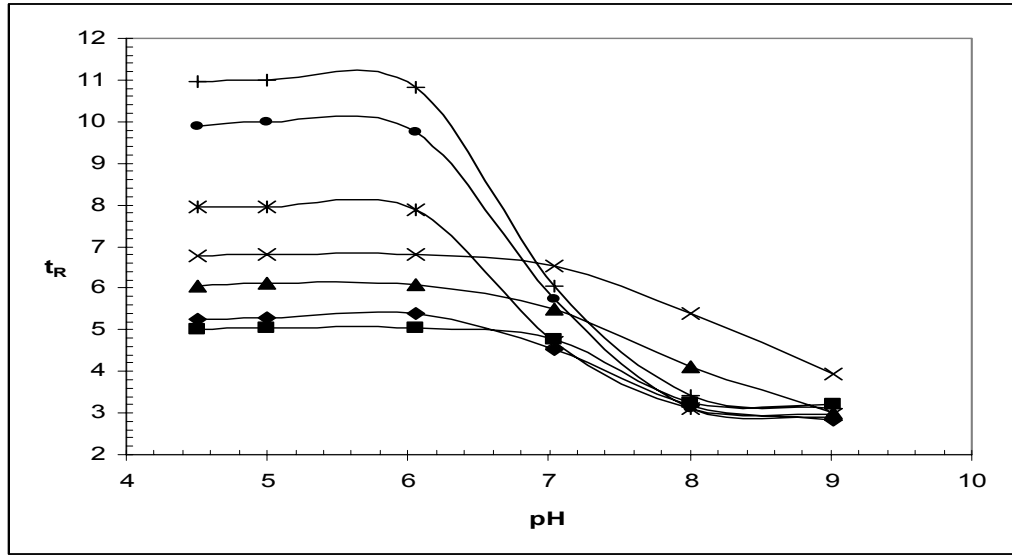
Bu bölümde sülfodiazin, sülfotiazol, sülfomerazin, sülfometazin, sülfomonometoksin, sülfodoksin ve sülfometaksazolün su-asetonitril ikili karışımları kullanılarak gerçekleştirilen sıvı kromatografik çalışmalarında alıkonma zamanları üzerine pH etkisi incelenmiş ve pH 1,7 – 9,5 aralığında elde edilen alıkonma zamanları ile pH arasındaki doğrusal olmayan ilişkiler incelenmiştir. Sülfonamitlerin HPLC yöntemi ile çalışmaları, %30, %40 ve %50 (v/v) asetonitril su karışımlarında gerçekleştirilmiştir.

4.3.1. Sülfonamitlerin %30 (v/v) Asetonitril-Su İkili Karışımında HPLC Yöntemi ile Elde Edilen t_R -pH Grafikleri

Sülfotiazol, sülfodiazin, sülfomerazin, sülfometazin, sülfomonometoksin, sülfodoksin ve sülfometaksazol için % 30 (v/v) asetonitril su karışımında pH 1,7 - 4,5 ve pH 4,5 - 9,0 aralığında elde edilen alıkonma zamanı t_R – pH grafikleri sırasıyla Şekil 4.43 ve Şekil 4.44 'de verilmiştir.



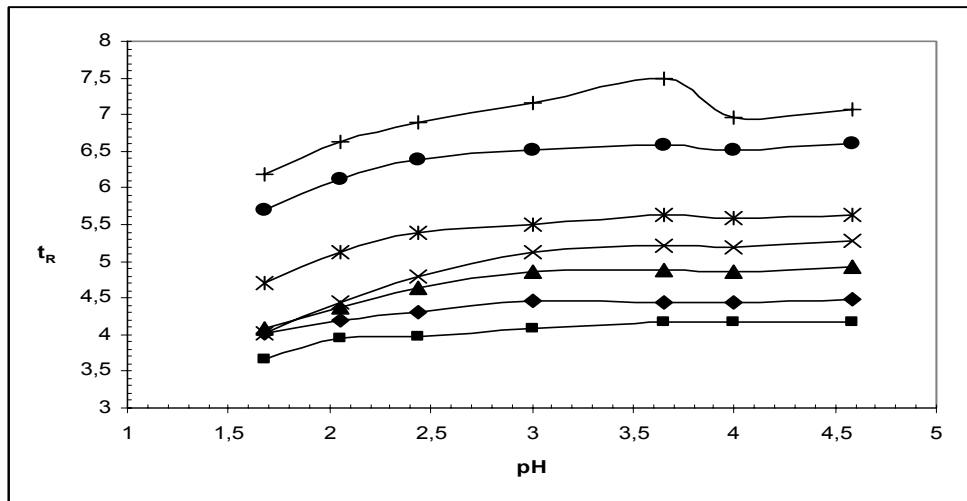
Şekil 4.43. Çalışılan sülfonamitlerin %30 ACN-H₂O ortamında, pH 1,7 – 4,5 aralığında t_R -pH ilişkisi. Simgeler : ■ sülfotiazol; ◆ sülfodiazin; ▲ sülfomerazin; × sülfometazin; * sülfomonometoksin; • sülfodoksin; + sülfometaksazol.



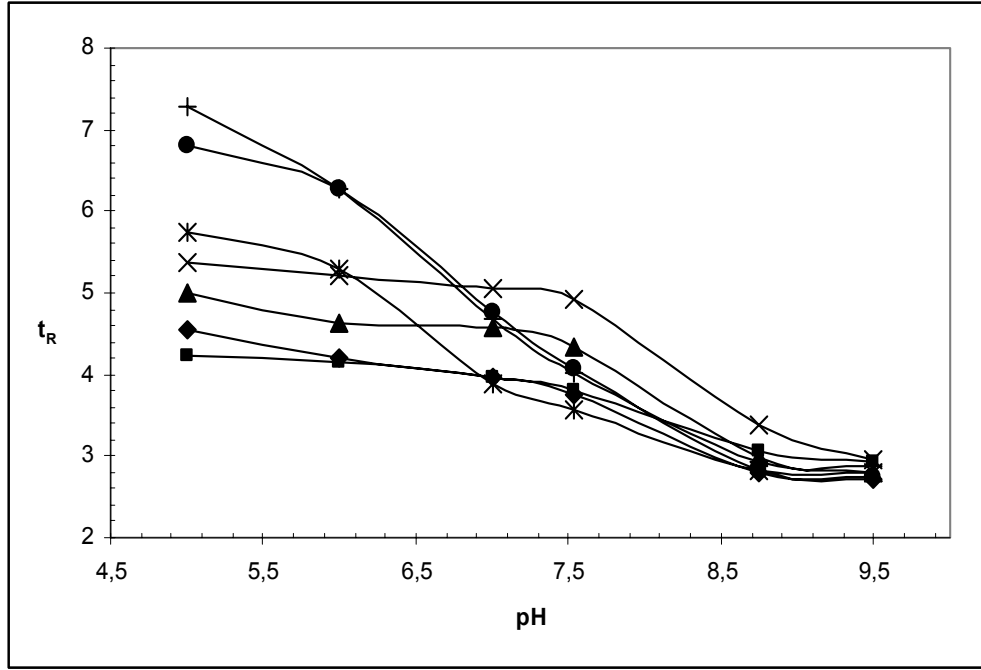
Şekil 4.44. Çalışılan sülfonamitlerin %30 ACN-H₂O ortamında, pH 4,5-9,0 aralığında t_R -pH ilişkisi. Simgeler : ■ sülfotiazol; ◆ sülfodiazin; ▲ sülfomerazin; × sülfometazin; * sülfomonometoksin; • sülfodoksin; + sülfometaksazol.

4.3.2. Sülfonamitlerin %40 (v/v) Asetonitril-Su İkili Karışımında HPLC Yöntemi ile Elde Edilen t_R -pH Grafikleri

Sülfotiazol, sülfodiazin, sülfomerazin, sülfometazin, sülfomonometoksin, sülfodoksin ve sülfometaksazol için % 40 (v/v) asetonitril su karışımında pH 1,7 - 4,6 ve pH 5,0 - 9,5 aralığında elde edilen alıkonma zamanı t_R – pH grafikleri sırasıyla Şekil 4.45 ve Şekil 4.46 'da verilmiştir.



Şekil 4.45. Çalışılan sülfonamitlerin %40 ACN-H₂O ortamında, pH 1,7 – 4,6 aralığında t_R -pH ilişkisi. Simgeler : ■ sülfotiazol; ◆ sülfodiazin; ▲ sülfomerazin; × sülfometazin; * sülfomonometoksin; • sülfodoksin; + sülfometaksazol.



Şekil 4.46. Çalışılan sülfonamidlerin %40 ACN-H₂O ortamında, pH 5,0 – 9,5 aralığında t_R -pH ilişkisi. Simgeler : ■ sülfotiazol; ◆ sülfodiazin; ▲ sülfomerazin; × sülfometazin; * sülfomonometoksin; ● sülfodoksin; + sülfometaksazol.

4.3.3. Sülfonamidlerin %50 (v/v) Asetonitril-Su İkili Karışımında HPLC Yöntemi ile Elde Edilen t_R -pH Grafikleri

Sülfotiazol, sülfodiazin, sülfomerazin, sülfometazin, sülfomonometoksin, sülfodoksin ve sülfometaksazol için % 50 (v/v) asetonitril su karışımında pH 1,7 - 9,5 aralığında elde edilen alıkonma zamanı (t_R) – pH davranışı incelenmiş ancak alıkonma zamanlarında yeterli değişim gözlenemediği için grafikler halinde verilmemiştir.

4.4. Kromatografik Ayırmanın Optimizasyonu

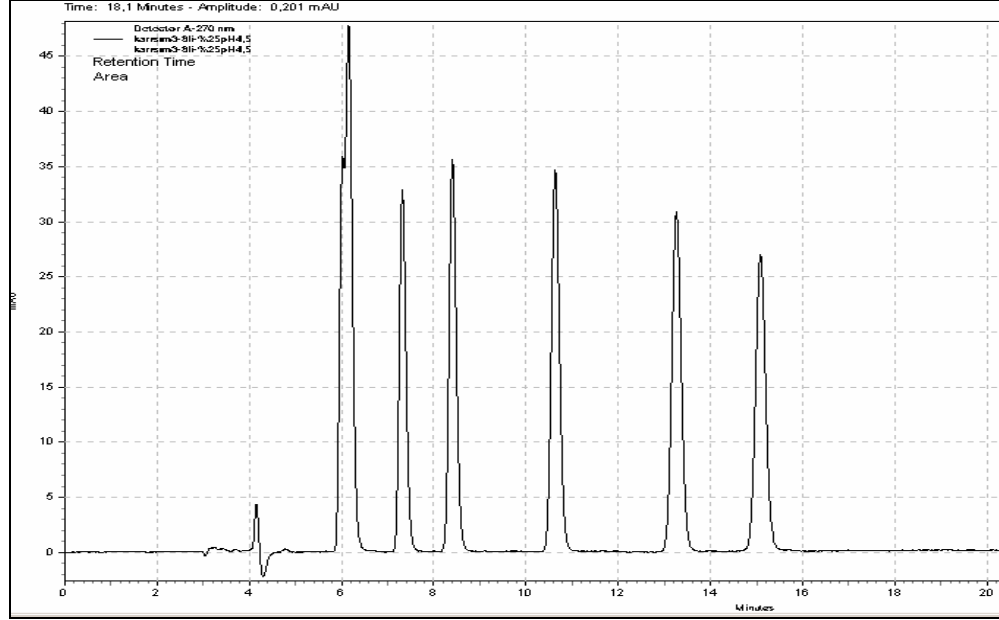
Bu çalışmada, pK_a değerleri birbirine yakın olan yedi adet sülfonamitin (sülfodiazin, sülfotiazol, sülfomerazin, sülfometazin, sülfomonometoksin, sülfodoksin ve sülfometaksazol) kromatografik ayırımı üzerinde durulmuştur. Bileşiklerin pik simetrisi ve alıkonma davranışları incelendiğinde YMC – ODS (5 μ m, 250 mm x 4,6 mm ID) kolon tercih edilmiştir. Bileşiklerin iyonlaşma sabitlerinin tayini çalışmalarında, pH 4,5’ de kapasite faktörlerinin daha büyük olduğu belirlenmiş ve bu pH değeri, mobil faz pH’ sı olarak kabul edilmiştir. Bir kromatografik çalışmada kapasite faktörlerinin $1 < k < 10$ aralığında olması gerekir (Schoenmakers vd., 1979; Dolan vd., 1979). Bu tez çalışmasında bu durum göz önünde bulundurularak mobil faz organik modifiyeri olan asetonitrilin derişimi %25 , %20 ve %16 (v/v) olarak belirlenmiştir. Çalışılan mobil fazlara 25 mM fosforik asit olacak şekilde derişik fosforik asit ilave edilmiş ve NaOH ilavesi ile mobil faz pH’sı, 4,50’ye ayarlanmıştır. Çalışmada enjeksiyon hacmi 20 μ L, dalga boyu (λ) 270 nm, akış hızı 0,8 mL/dakika ve kolon sıcaklığı 25°C’dir. Bu koşullarda elde edilen kromatogramlar, Şekil 4.47, Şekil 4.48 ve Şekil 4.49’da görülmektedir. Her bir bileşik için iki tekrarlı enjeksiyonlarda elde edilen alıkonma zamanları, kapasite faktörleri, α seçicilik değerleri ve kapasite faktörünün logaritmaları, Çizelge 4.8, Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10’da verilmiştir.

Çizelge 4.8. Sülfonamitlerin %25 (v/v) ACN-H₂O ortamı için kromatografik verileri

Bileşik adı	tr_1	tr_2	tr_{ort}	K	α	log k
Sülfotiazol	6,023	6,021	6,022	0,805	-	-0,094
Sülfodiazin	6,141	6,153	6,147	0,842	1,047	-0,075
Sülfomerazin	7,31	7,314	7,312	1,191	1,415	0,076
Sülfometazin	8,392	8,396	8,394	1,515	1,272	0,181
Sülfomonometoksin	10,628	10,628	10,628	2,185	1,442	0,339
Sülfodoksin	13,261	13,262	13,2615	2,974	1,361	0,473
Sülfometaksazol	15,088	15,084	15,086	3,521	1,184	0,547
KBr	3,337	3,337	3,337			

Çizelge 4.8’den görüldüğü gibi %25 organik modifiyer bulunduran koşulda en küçük kapasite faktörü 0,8 ve en büyük kapasite faktörü 3,5’tir. α değerleri incelendiğinde ilk elüe olan iki bileşik için $\alpha < 1,15$ olduğu ve bu iki bileşiğin ayıramayacağı

anlaşılmaktadır. Bu durum iki bileşiğin ayrılamadığını gösteren Şekil 4.47'deki kromatogramda da görülmektedir.

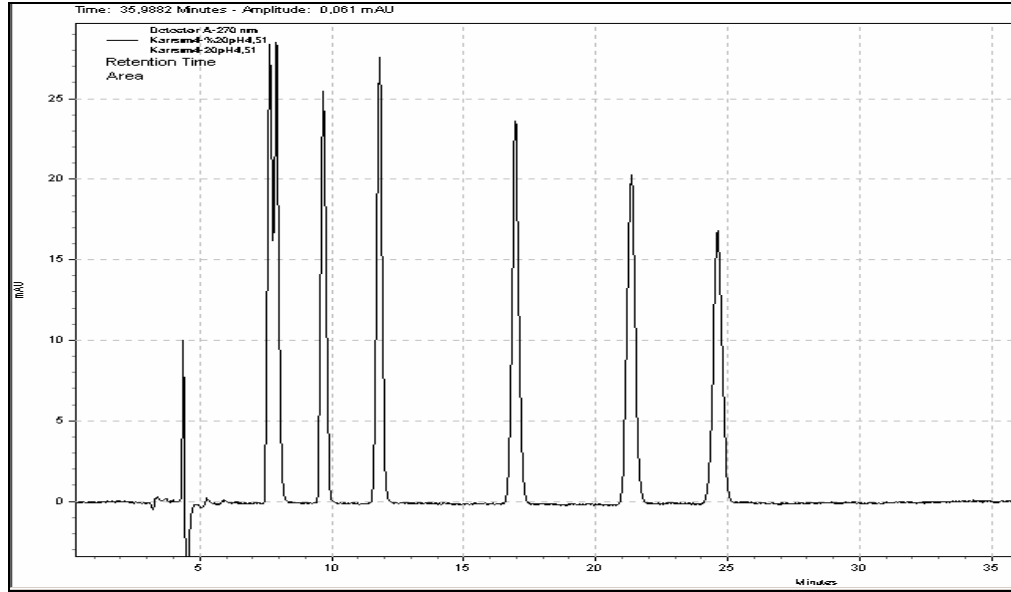


Şekil 4.47. %25 (v/v) ACN-H₂O ortamında çalışılan sülfonamitlere ait kromatogram.

Çizelge 4.9. Sülfonamitlerin %20 (v/v) ACN-H₂O ortamı için kromatografik verileri

Bileşik adı	tr ₁	tr ₂	tr _{ort}	k	α	log k
Sülfadiazin	7,547	7,544	7,546	1,228	-	0,089
Sülfotiazol	7,790	7,779	7,785	1,298	1,057	0,113
Sülfomerazin	9,566	9,565	9,566	1,824	1,405	0,261
Sülfometazin	11,686	11,687	11,687	2,450	1,343	0,389
Sülfomonometoksin	16,842	16,844	16,843	3,973	1,621	0,599
Sülfodoksin	21,221	21,227	21,224	5,266	1,326	0,722
Sülfometaksazol	24,504	24,505	24,505	6,235	1,184	0,795
KBr	3,390	3,384	3,387			

Çizelge 4.9'dan görüldüğü gibi %20 organik modifiyer bulunduran koşulda en küçük kapasite faktörü 1,2 ve en büyük kapasite faktörü 6,2' dir. α değerleri incelendiğinde ilk elüe olan iki bileşik için $\alpha < 1,15$ olduğu ve bu iki bileşiğin ayrılamayacağı anlaşılmaktadır. Bu durum iki bileşiğin ayrılamadığını gösteren Şekil 4.48'deki kromatogramda da görülmektedir. Çizelge 4,9'da ilk iki bileşik için seçicilik faktörünün 1,057 olduğu ve bu değer Çizelge 4,8'deki 1,047 değerinden bir miktar büyük olduğu görülmektedir. Bu verilere göre 1. ve 2. bileşiğin ikiz pik vermesi beklenir ve bu şekilde davranıldığı Şekil 4.48'de görülmektedir.

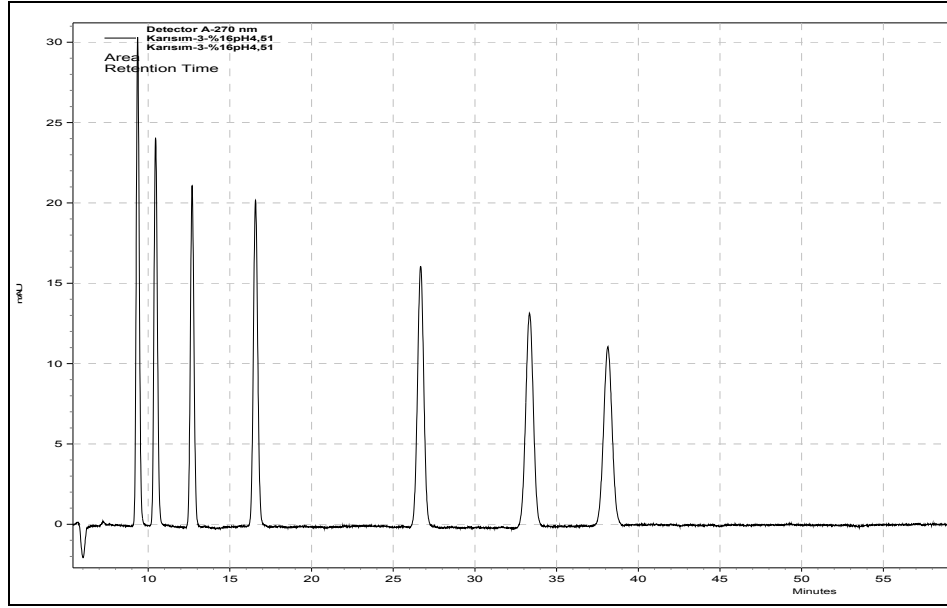


Şekil 4.48. %20 (v/v) ACN-H₂O ortamında çalışılan sülfonamitlere ait kromatogram.

Çizelge 4.10. Sülfonamitlerin %16 (v/v) ACN-H₂O ortamı için kromatografik verileri

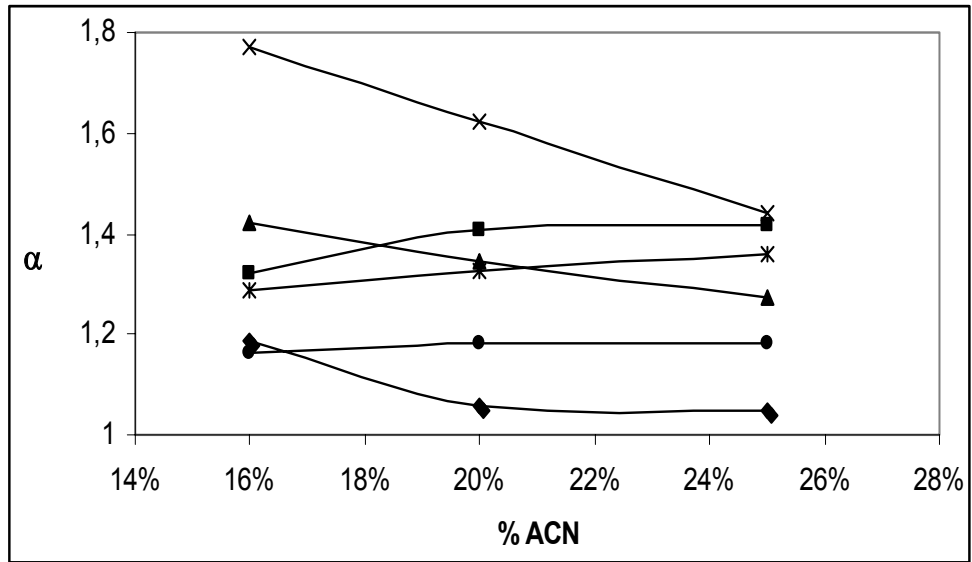
Bileşik adı	tr ₁	tr ₂	tr _{ort}	k	α	log k
Sülfadiazin	9,307	9,307	9,307	1,723	-	0,236
Sülfotiazol	10,405	10,405	10,405	2,044	1,186	0,310
Sülfomerazin	12,640	12,640	12,640	2,698	1,320	0,431
Sülfometazin	16,524	16,524	16,524	3,834	1,421	0,584
Sülfomonometoksin	26,634	26,634	26,634	6,791	1,771	0,832
Sülfodoksin	33,289	33,289	33,289	8,738	1,287	0,941
Sülfometaksazol	38,092	38,092	38,092	10,143	1,161	1,006
KBr	3,390	3,384	3,387			

Çizelge 4.10'dan görüldüğü gibi %16 organik modifiyer bulunduran koşulda en küçük kapasite faktörü 1,7 ve en büyük kapasite faktörü 10,1'dir. Bu derişimde çalışılan sülfonamitlere ait α değerleri incelendiğinde, ilk elüe olan iki bileşik için α > 1,15 olduğu ve bu iki bileşiğin ayrılacağı anlaşılmaktadır. Bu durum iki bileşiğin ayrıldığını gösteren Şekil 4.49'daki kromatogramda da görülmektedir.



Şekil 4.49. %16 (v/v) ACN-H₂O ortamında çalışılan sülfonamitlere ait kromatogram.

Çalışılan bileşiklerin % ACN derişimine karşı α değerleri grafiğe geçirilirse, %16 organik modifiyer bulunduran mobil fazın ayırma için daha uygun olacağı görülmektedir (Şekil 4.50).



Şekil 4.50. %16, %20 ve %25 (v/v) ACN-H₂O ortamında çalışılan sülfonamitlere ait α değerleri. Simgeler: ◆ sülfodiazin / sülfotiazol; ● sülfomerazin / sülfotiazol; ▲ sülfometazin / sülfomerazin; * sülfomonometoksin / sülfometazin; ■ sülfodoksin / sülfomonometoksin; × sülfometaksazol / sülfodoksin.

5. SONUÇ

5.1. Sülfonamitlerin İyonlaşma Sabitlerinin Potansiyometrik Yöntemle Tayini

Bu çalışmada, sülfodiazin, sülfotiazol, sülfomerazin, sülfometazin, sülfomonometoksin, sülfodoksin ve sülfometaksazolün iyonlaşma sabitleri, potansiyometrik yöntemle tayin edilmiştir. Ortam olarak %50 (v/v) su-asetonitril ikili karışımı kullanılmıştır. Bileşiklerin su-asetonitril ikili karışımında çözünürlüklerinin uygun geldiği koşuldaki çözeltileri hazırlanmış ve ayarlı titrisol çözeltisinden hazırlanan ve karbonat hatası giderildikten sonra tekrar ayarlanan KOH ile titre edilmiştir. Titrasyon verileri, pH- ϕ grafiklerinde değerlendirilmiştir. pK_a değerlerinin hesaplanmasında Gran doğrusal grafikleri, 1. ve 2. eşdeğerlik öncesi bölgeler için hazırlanmış ve bu doğrusal fonsiyonların eğimlerinden iyonlaşma sabitleri hesaplanmıştır. PKPOT programı, pK_a hesaplamalarında kullanılan bilgisayar programıdır. Bu programda tahmini pK_a değerleri olarak literatürün su ortamı için verdiği değerler ve pH- ϕ grafiklerinin yarı nötralizasyonlarındaki pK_a değerleri kullanılmıştır. Her bir bileşik için 3 titrasyon yapılmış olup değerler çizelgelerde verilmiştir.

Çizelge 5.1. Sülfadiazinin potansiyometrik yöntemle belirlenen pK_a değerleri

Tit.n o	pH- ϕ		Gran		PKPOT	
	pK_1	pK_2	pK_1	pK_2	pK_1	pK_2
1	2,55	7,70	2,39	7,20	2,66	7,60
2	2,74	7,18	2,60	6,85	2,65	7,69
3	2,60	7,52	2,46	7,09	2,42	7,75
Ort (sd)	2,63 (0,10)	7,47 (0,26)	2,48 (0,11)	7,05 (0,18)	2,58 (0,14)	7,68 (0,08)

Çizelge 5.2. Sülfatiazolün potansiyometrik yöntemle belirlenen pK_a değerleri

Tit. no	pH- ϕ		Gran		PKPOT	
	pK_1	pK_2	pK_1	pK_2	pK_1	pK_2
1	2,90	8,00	2,77	7,54	2,70	8,28
2	2,90	8,02	2,77	7,41	2,71	8,18
3	2,92	8,10	2,80	7,50	2,81	8,14
Ort (sd)	2,91 (0,01)	8,04 (0,05)	2,78 (0,02)	7,48 (0,07)	2,74 (0,06)	8,20 (0,07)

Çizelge 5.3. Sülfamerazinin potansiyometrik yöntemle belirlenen pK_a değerleri

Tit. no	pH- ϕ		Gran		PKPOT	
	pK_1	pK_2	pK_1	pK_2	pK_1	pK_2
1	2,81	7,49	2,62	7,42	2,74	7,57
2	2,80	7,60	2,74	7,34	2,75	7,50
3	2,80	7,56	2,74	7,34	2,81	7,44
Ort (sd)	2,80 (0,01)	7,55 (0,06)	2,70 (0,07)	7,37 (0,05)	2,77 (0,04)	7,50 (0,07)

Çizelge 5.4. Sülfametazinin potansiyometrik yöntemle belirlenen pK_a değerleri

Tit. no	pH- ϕ		Gran		PKPOT	
	pK_1	pK_2	pK_1	pK_2	pK_1	pK_2
1	2,77	8,07	2,60	7,47	2,74	8,17
2	2,79	8,10	2,66	7,52	2,75	8,18
3	2,60	8,05	2,41	7,77	2,73	8,08
Ort (sd)	2,72 (0,10)	8,07 (0,03)	2,56 (0,13)	7,59 (0,16)	2,74 (0,01)	8,14 (0,06)

Çizelge 5.5. Sülfamonometoksinin potansiyometrik yöntemle belirlenen pK_a değerleri

Tit.no	pH- ϕ		Gran		PKPOT	
	pK_1	pK_2	pK_1	pK_2	pK_1	pK_2
1	2,70	6,88	2,55	6,47	2,82	7,04
2	2,88	7,04	2,74	6,85	2,96	7,08
3	2,66	6,72	2,64	6,40	2,83	7,03
Ort (sd)	2,75 (0,12)	6,88 (0,16)	2,64 (0,10)	6,57 (0,24)	2,87 (0,08)	7,05 (0,03)

Çizelge 5.6. Sülfadoksinin potansiyometrik yöntemle belirlenen pK_a değerleri

Tit. no	pH- ϕ		Gran		PKPOT	
	pK_1	pK_2	pK_1	pK_2	pK_1	pK_2
1	2,77	7,34	2,60	6,82	2,79	7,44
2	2,88	7,19	2,74	6,80	2,94	7,45
3	2,80	7,20	2,77	6,91	2,84	7,46
Ort (sd)	2,82 (0,06)	7,24 (0,08)	2,70 (0,09)	6,84 (0,06)	2,86 (0,08)	7,45 (0,01)

Çizelge 5.7. Sülfametaksazolün potansiyometrik yöntemle belirlenen pK_a değerleri

Tit. no	pH- ϕ		Gran		PKPOT	
	pK_1	pK_2	pK_1	pK_2	pK_1	pK_2
1	2,72	6,69	2,50	6,52	2,50	6,80
2	2,60	6,87	2,56	6,70	2,60	6,75
3	2,66	6,78	2,53	6,61	2,48	6,72
Ort (sd)	2,66 (0,06)	6,78 (0,09)	2,53 (0,03)	6,61 (0,09)	2,53 (0,06)	6,76 (0,04)

5.2. Sülfonamitlerin İyonlaşma Sabitlerinin HPLC-DAD Yöntemiyle Tayini

STAR bilgisayar programı, spektral verilerden yararlanarak pK_a değerlerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. pK_{a1} ve pK_{a2} değerlerinin hesaplanabildiği görülmüştür. Bu program kullanılarak hesaplanan iyonlaşma sabitleri, Çizelge 5.8 de verilmiştir.

Çizelge 5.8. Sülfonamitlerin HPLC-DAD yöntemiyle belirlenen pK_{a1} ve pK_{a2} değerleri

Bileşik	%50		%40		%30	
	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a1}	pK_{a2}	pK_{a1}	pK_{a2}
Sülfodiazin	2,49(0,04)	7,45(0,09)	2,03(0,21)	7,15(0,05)	1,86(0,05)	7,05(0,05)
Sülfotiazol	2,81(0,04)	7,99(0,12)	2,18(0,05)	7,78(0,06)	1,57(0,11)	7,62(0,06)
Sülfomerazin	2,84(0,03)	8,24(0,09)	2,36(0,07)	7,90(0,05)	1,80(0,06)	7,48(0,06)
Sülfometazin	2,80(0,03)	8,61(0,09)	2,26(0,13)	8,32(0,10)	1,75(0,08)	8,07(0,10)
Sülfomono-metoksin	2,89(0,03)	6,87(0,07)	2,14(0,06)	6,54(0,06)	1,94(0,08)	6,42(0,10)
Sülfodoksin	2,79(0,04)	6,32(0,08)	2,11(0,05)	6,13(0,14)	2,06(0,10)	6,54(0,09)
Sülfometak-sazol	2,84(0,03)	7,07(0,04)	2,41(0,10)	6,65(0,06)	2,02(0,08)	6,35(0,06)

5.3. Sülfonamitlerin İyonlaşma Sabitlerinin Sıvı Kromatografik Yöntemle Tayini

Sıvı kromatografik yöntemle pK_a değerlerinin hesaplanmasında alıkonma zamanlarının pH ile değişiminden yararlanılmıştır. Değişim % 30 ve % 40 için yeterlidir. Hesaplanan değerler, Çizelge 5.9 da verilmiştir.

Çizelge 5.9. Sülfonamitlerin HPLC yöntemiyle belirlenen pK_a değerleri

Bileşik	%50		%40		%30	
	pK _{a2}	pK _{a1}	pK _{a2}	pK _{a1}	pK _{a2}	pK _{a1}
Sülfodiazin	8,04 (0,02)	-	7,86 (0,17)	2,05 (0,18)	7,36 (0,01)	2,03 (0,13)
Sülfotiazol	8,02 (0,02)	-	7,84 (0,15)	-	7,63 (0,01)	1,84 (0,38)
Sülfomerazin	8,18 (0,08)	-	8,08 (0,01)	2,03 (0,13)	7,80 (0,06)	1,82 (0,25)
Sülfometazin	8,48 (0,05)	-	8,27 (0,10)	1,96 (0,16)	8,11 (0,04)	2,05 (0,08)
Sülfomono- metoksin	7,42 (0,05)	-	7,22 (0,16)	-	6,91 (0,01)	2,07 (0,05)
Sülfodoksin	7,61 (0,08)	-	7,32 (0,09)	-	6,94 (0,02)	2,06 (0,11)
Sülfometak- sazol	7,40 (0,04)	-	6,91 (0,10)	-	6,65 (0,03)	1,52 (0,19)

5.4. Sülfonamitlerin Sıvı Kromatografik Yöntemle Ayrılması

Bu çalışmada, pK_a değerleri tayin edilen yedi adet sülfonamitin (sülfodiazin, sülfotiazol, sülfomerazin, sülfometazin, sülfomonometoksin, sülfodoksin ve sülfometaksazol) sıvı kromatografik yöntemle ayırımı optimize edilmiştir. Bileşiklerin pik simetrisi ve alıkonma davranışları incelendiğinde YMC – ODS kolon tercih edilmiştir.

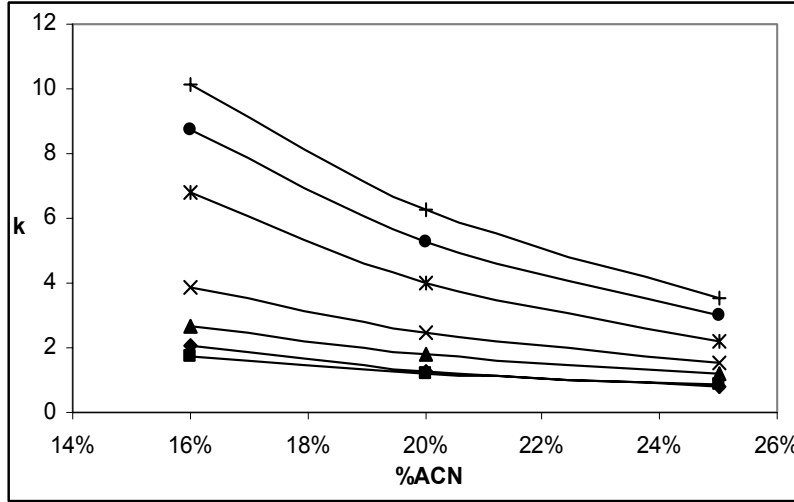
Bilindiği gibi bir sıvı kromatografik ayırmada kapasite faktörünün mobil faz organik modifiyerinin hacimce yüzdesi ile değişmesi incelenir. Bu tür bir yaklaşımda

$$k = b_0 + b_1V_1 + b_2V_2 + b_{11}V_1^2 + b_{22}V_2^2 + b_{12}V_1V_2 \quad (5.1)$$

dir (Hu ve Massart 1989; Augiar vd., 1997). Bu bağıntıda V₁ organik modifiyerin yüzdesi, V₂ ise mobil fazın pH' sıdır. Mobil faz pH' sı sabit tutularak sadece organik modifiyer yüzdesi incelenmek istendiğinde bu bağıntı aşağıdaki şekli alır.

$$k = b_0 + b_1V_1 + b_{11}V_1^2 \quad (5.2)$$

Bu bağıntı, kapasite faktörünün organik modifiyerin yüzdesi ile değiştiğini gösterir. Yapılan bu çalışmada kapasite faktörünün organik modifiyerin yüzdesi ile lineer olmayan değişimi, Şekil 5.1’de ve kapasite faktörünün organik modifiyerin yüzdesine bağlılığı ile ilgili 2. derece fonksiyonlar, Çizelge 5.9’da görülmektedir.



Şekil 5.1. Sulfonamitlerin k - %ACN arasındaki ilişki. Simgeler: ■ sulfodiazin; ◆ sulfotiazol; ▲ sulfomerazin; × sulfometazin; * sulfomonometoksin; • sulfodoksin; + sulfometaksazol.

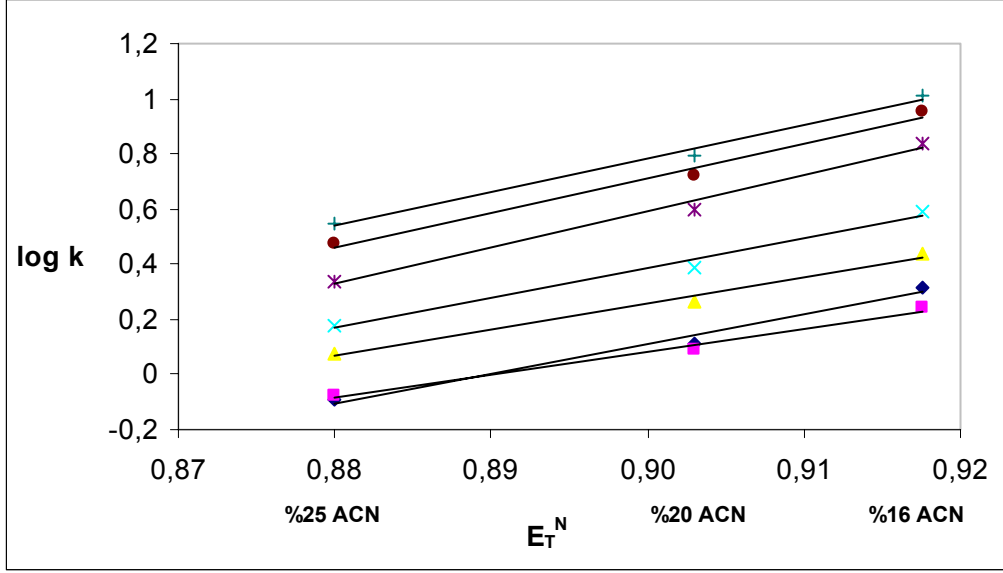
Çizelge 5.9. Kapasite faktörünün organik modifiyerin yüzdesi ile değişim denklemi

Bileşik	Denklem	R
Sulfodiazin	$y = 51,722x^2 - 30,995x + 5,358$	1
Sulfotiazol	$y = 97,667x^2 - 53,810x + 8,153$	1
Sulfomerazin	$y = 102,110x^2 - 58,610x + 9,462$	1
Sulfometazin	$y = 176,670x^2 - 98,200x + 15,023$	1
Sulfomonometoksin	$y = 385,440x^2 - 209,210x + 30,397$	1
Sulfodoksin	$y = 455,110x^2 - 250,640x + 37,199$	1
Sulfometaksazol	$y = 482,440x^2 - 271,380x + 41,213$	1

Bir kromatografik ayırmada bu 2.derece bağıntılardan yararlanmak yerine organik modifiyer yüzdesinin dar bir aralıkta değiştiği koşullarda mobil faz polarite parametresi E_T^N ve kapasite faktörü arasındaki doğrusal ilişkiden yararlanılır.

$$\log k = a + b E_T^N \quad (5.3)$$

Bu çalışmada bileşiklerin kapasite faktörlerinin logaritması ($\log k$) ile E_T^N polarite parametresi arasındaki ilişki incelenmiştir (Şekil 5.2). Bu bağıntının çalışılan bileşiklere uygulanmasında elde edilen regresyon eşitlikleri, Çizelge 5.10’ da verilmiştir.



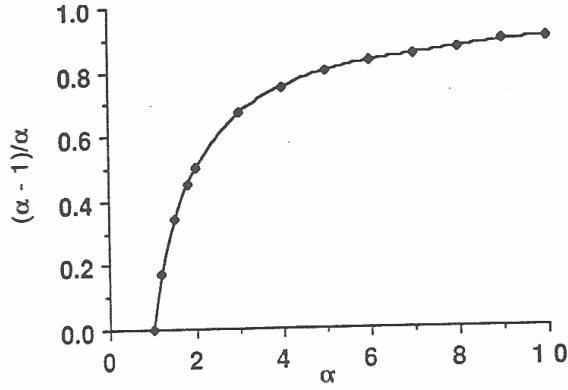
Şekil 5. 2. Çalışılan sülfonamitlere ait $\log k$ - E_T^N grafiği

Çizelge 5.10. Çalışılan sülfonamitlerde polarite parametresinin $\log k$ üzerine etkisi

Bileşikler	$\log k = a + b E_T^N$	R
Sülfodiazin	$Y = 8,2724x - 7,3618$	0,994
Sülfotiazol	$Y = 10,809x - 9,6174$	0,992
Sülfomerazin	$Y = 9,4607x - 8,2585$	0,994
Sülfometazin	$Y = 10,759x - 9,2983$	0,993
Sülfomonometoksin	$Y = 13,14x - 11,263$	0,994
Sülfodoksin	$Y = 12,506x - 10,543$	0,995
Sülfometaksazol	$Y = 12,239x - 10,233$	0,996

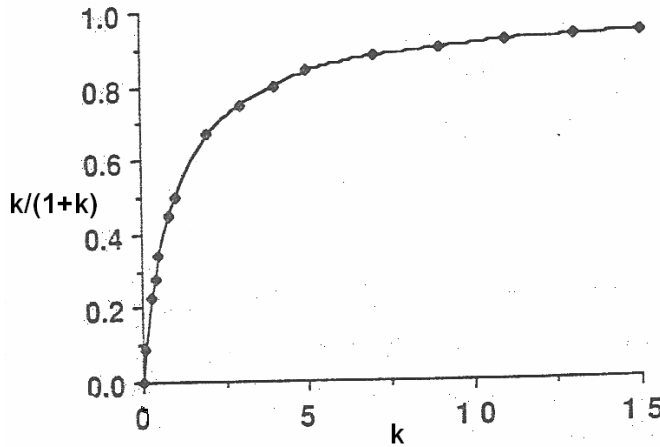
Çizelgeden görüldüğü gibi her bir bileşik için regresyon katsayısı, doğrusal ilişkiyi doğrulamaktadır. Çalışılan bileşiklerden mobil faz polaritesinden en çok etkilenen bileşik sülfomonometoksindir.

Seçiciliğin kromatografik ayırmada etkisi, $(\alpha - 1)/\alpha$ 'nın α ile değişimini gösteren grafikler ile değerlendirilir. Bu grafiklerde α 'nın 1 olması halinde ayırmanın olmadığı; α 'nın 2' den büyük olması durumunda ayırmanın çok kolaylaştığı görülür (Şekil 5.3). Ayırma için yeterli görülen α değeri, 1,15' dir. Çalışmada %16 asetonitril derişiminde yeterli ayırma kriterinin sağlandığı görülmektedir.



Şekil 5.3. $(\alpha - 1)/\alpha$ 'nın α ile değişimi

Alıkonmanın ayırmada etkisi, $k/(1+k)$ 'nın k ile değişimini gösteren grafikler ile değerlendirilir (Şekil 5.4). Bu grafiklerde k 'nın 5' den daha büyük olmasından sonra artık doğrusal olmayan bir değişimin gözlemlendiği ve bu oranın çok fazla değişmediği bir diğer deyimle kapasite faktörünü arttırmanın ayırma gücüne olumlu katkı yapmadığı görülür. Çalışmada %16 asetonitril derişiminde en küçük k değerinin 1,74; en büyük k değerinin 10,28 olduğu görülmektedir. Asetonitril derişimini daha azaltmak sadece ayırma süresini uzatacaktır.



Şekil 5.4. $k/(1+k)$ 'nın k ile değişimi

Kromatografik bir çalışmada yeterli ayırmaya ulaşıp ulaşılmadığının tayini için temel parametre, birbirini izleyen iki pik arasındaki ayırma gücünün, R_s , hesaplanmasıdır. Ayırma gücünün hesaplanmasında etkinlik, seçicilik ve alıkonma olmak üzere üç temel faktör vardır.

$$R_s = \underbrace{(1/4)\sqrt{N}}_{\text{Etkinlik}} \underbrace{[(\alpha-1)/\alpha]}_{\text{Seçicilik}} \underbrace{[k/(1+k)]}_{\text{Alıkonma}} \quad (5.4)$$

Seçicilik, alıkonma ve her ikisinin bir arada etkisini inceleyen veriler Çizelge 5.11’de verilmiştir.

Çizelge 5.11. Sülfonamitlerin çalışılan ortamlarda seçicilik ve alıkonma parametreleri

Bileşik % Derişim		α	$[(\alpha-1)/\alpha]$	k	$[k/(1+k)]$	$[(\alpha-1)/\alpha] \times [k/(1+k)]$
Sülfodiazin / Sülfotiazol	%25	1,047	0,045	0,842	0,457	0,021
	%20	1,057	0,054	1,298	0,565	0,030
	%16	1,186	0,157	2,044	0,671	0,105
Sülfomerazin / Sülfotiazol	%25	1,415	0,293	1,191	0,544	0,159
	%20	1,405	0,288	1,824	0,646	0,186
	%16	1,320	0,242	2,698	0,730	0,177
Sülfometazin / Sülfomerazin	%25	1,272	0,214	1,515	0,602	0,129
	%20	1,343	0,255	2,450	0,710	0,181
	%16	1,421	0,296	3,834	0,793	0,235
Sülfomono- metoksin / Sülfometazin	%25	1,442	0,307	2,185	0,686	0,210
	%20	1,621	0,383	3,973	0,799	0,306
	%16	1,771	0,435	6,791	0,872	0,379
Sülfodoksin / Sülfomono- metoksin	%25	1,361	0,265	2,974	0,748	0,199
	%20	1,326	0,246	5,266	0,840	0,207
	%16	1,287	0,223	8,738	0,897	0,200
Sülfometaksazol / Sülfodoksin	%25	1,184	0,155	3,521	0,779	0,121
	%20	1,184	0,155	6,235	0,862	0,134
	%16	1,161	0,139	10,143	0,910	0,126

Çalışılan sülfonamitlerin etkinlik, seçicilik, alıkonma ve ayırma gücü verileri %16 (v/v) ACN-H₂O ortamı için Çizelge 5.12’de verilmektedir.

Çizelge 5.12. Sülfonamidlerin %16 (v/v) ACN-H₂O ortamı için etkinlik, seçicilik, alıkonma ve ayırma gücü verileri

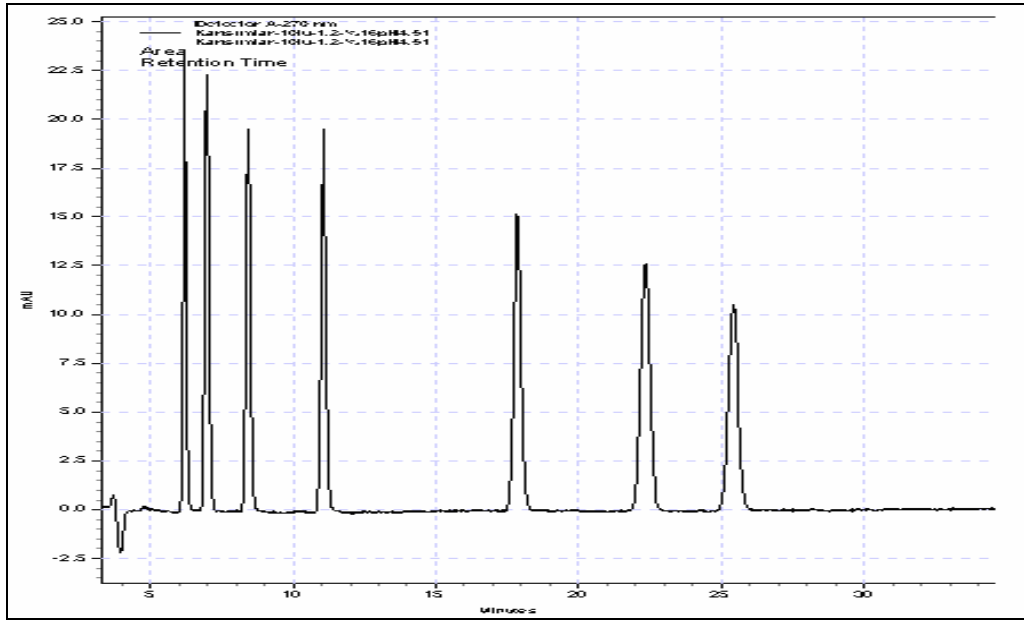
Bileşik Çifti	Etkinlik	Seçicilik	Alıkonma	R _s
Sülfodiazin / Sülfotiazol	36,691	0,157	0,671	3,894
Sülfotiazol / Sülfomerazin	38,025	0,242	0,730	6,718
Sülfomerazin / Sülfometazin	39,074	0,296	0,793	9,172
Sülfometazin / Sülfomonometoksin	39,812	0,435	0,872	15,102
Sülfomonometoksin / Sülfodoksin	39,842	0,223	0,897	7,970
Sülfodoksin / Sülfometaksazol	39,551	0,139	0,910	5,003

Bütün verilerin ışığında kromatogramlardan da yararlanarak şunları söyleyebiliriz: Çalışılan bu 7 bileşik için optimum ayırma koşulu, pH 4,5' da %16 (v/v) ACN içeren mobil fazdır. Elüsyon sırası, sülfadiazin, sülfotiazol, sülfomerazin, sülfometazin, sülfomonometoksin, sülfodoksin ve sülfometaksazol şeklindedir. Yan zincirdeki R grupları, alıkonma verilerinden görüleceği gibi durgun fazla hidrofobik etkileşiminde önemli rol almaktadır. Yan zincirinde metil ve metoksi bulunan gruplarda alıkonma artmaktadır. %16 (v/v) ACN-H₂O koşulunun ayırma için yeterli olduğu, pik şekillerinin ve karışımda bulunan bileşiklerin derişimlerinin kantitatif çalışma için uygun olduğu anlaşılmaktadır. Ayırma, 0,8 mL/dakika akış hızında yaklaşık 40 dakikada tamamlanmaktadır. Akış hızını arttırarak ayırmanın daha kısa sürede tamamlanması amaçlanmıştır ve akış hızı, kolon basıncı dikkate alınarak 1,2 mL/dakika olarak ayarlanmıştır. Bu koşuldaki veriler, Çizelge 5.13'de ve bu akış hızına ait kromatogram, Şekil 5.5'de verilmiştir.

Çizelge 5.13. Sülfonamidlerin %16 (v/v) ACN-H₂O ortamı için 1,2 mL/dakika hızda kromatografik verileri

Bileşik adı	tr ₁	tr ₂	tr _{ort}	K	α	log k
Sülfadiazin	6,159	6,151	6,155	1,740	-	0,241
Sülfotiazol	6,927	6,919	6,923	2,082	1,196	0,319
Sülfomerazin	8,390	8,387	8,389	2,735	1,313	0,437
Sülfometazin	11,008	11,013	11,011	3,902	1,427	0,591
Sülfomonometoksin	17,799	17,796	17,798	6,924	1,774	0,840
Sülfodoksin	22,253	22,269	22,261	8,911	1,287	0,950
Sülfometaksazol	25,350	25,339	25,345	10,284	1,154	1,012
KBr	2,250	2,242	2,246			

Kromatogram incelendiğinde %16 (v/v) ACN-H₂O mobil fazı ile çalışmada akış hızının 1,2 mL/dakika olması koşulunda tüm kromatografik verilerin 0,8 mL/dakika akış hızı ile elde edilen veriler ile uyumlu olduğu görülmektedir. Kromatogramdan ve çizelgeden görüldüğü gibi bu koşuldaki ayırma yaklaşık 25 dakikada tamamlanmaktadır. En son elüe olan bileşiğin kapasite faktörünün ilk elüe olan bileşiğin kapasite faktörüne oranı 6 civarındadır ve izokratik ayırma yeterlidir.



Şekil 5.5. %16 (v/v) ACN-H₂O ortamında 1,2 mL/dakika akış hızında çalışılan sülfonamitlere ait kromatogram

Bu tez çalışması ile 7 adet sülfonamitin iyonlaşma sabitleri, 3 farklı yöntemle tayin edilmiştir. Teorik yaklaşımla kromatografik ayrımları optimize edilmiştir. Çalışma ile iyonlaşma sabitleri konusunda yeterli veri olmayan sülfonamitlerle ilgili boşluğa katkı sağladığımızı düşünmekteyiz. Ayrıca önerilen ayırma modelinin sıvı kromatografik ayırmada etkenleri inceleyen tek bir yayın olduğunu gördüğümüz bu bileşik grubu için diğer çalışmacılara katkı sağlayacağı inancındayız.

6. KAYNAKLAR

- Akay, M., A., Canel, E., Kılıç, E., Köseoğlu, F., 2002. Determination of the protonation constants of some substituted salicylideneanilines by the spectrophotometric method in ethanol-water mixtures. *Turkish Journal of Chemistry*, 26, 37-44.
- Allen, R., I., Box, K., J., Comer, J., E., A., Peake, C., Tam, K., Y., 1998. Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants of ionizable drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17, 699 – 712.
- Ando, H., Y., Heimbach, T., 1997. pK_a determination by using a HPLC equipped with DAD as a flow injection apparatus. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 16, 31 – 37.
- Anonim, 1991. Commission of the European Communities, Establishment by the European Community of Maximum Residue Limits (MRLs) for Residues of Veterinary Medical Products in European Community VI, ESC-EEC-EAEC, Brussels, October.
- Anonim, 1993. Codex Alimentarius Commission, Joint FAO/WHO Food Standards Program, Residues of veterinary drugs in food, vol 3, 2nd edn, Codex Alimentarius Commission, Rome, Italy.
- Augiar de P. F., Bourguignon B., Massart D. L., 1997. Comparison of models and designs for optimisation of the pH and the solvent strength in HPLC. *Analitica Chimica Acta*, 356, 7-18.
- Avdeef, A., Box, K.J., Comer, J.E.A., Gilges, M., Hadley, M., Hibbert, C., Patterson, W., Tam, K.Y., 1999. pH Metric log P 11. pK_a determination of water soluble drugs in organic solvent- water mixtures. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 20, 631 - 641.

- Babacan, M., 1983. Klinikte Antimikrobikler, Atatürk Üniversitesi Yayınları, No:624, Erzurum.
- Barbosa, J., Berges, R., Sanz-Nebot, V., I., Toro, 1999. Chromatographic behaviour of ionizable compounds in liquid chromatography. Part 2. Standardization of potentiometric sensors and effect of pH and ionic strength on the retention of analytes using acetonitrile-water mobile phases. *Analytica Chimica Acta*, 389, 43-52.
- Barbosa, J., Berges, R., Sanz-Nebot, V., 1998a. Retention Behaviour of Quinolone Derivatives in High-Performance Liquid Chromatography; Effects of pH and Evaluation of Ionization Constants. *Journal of Chromatography A*, 823, 411-422.
- Barbosa, J., Toro, I., Sanz-Nebot, V., 1998b. Secondary chemical equilibria in high - performance liquid chromatography: Influence of ionic strength and pH on retention of peptides. *Journal of Chromatography A*, 823, 497-509.
- Barbosa, J., Berges, R., Sanz-Nebot, V., 1996. Solvatochromic parameter values and pH in aqueous-organic mixtures used in liquid chromatography. Prediction of Retention of a Series of Quinolones. *Journal of Chromatography A*, 719, 27-36.
- Barbosa, J., Barron, D., Beltran, J., L., Sanz-Nebot, V., 1995. PKPOT, a program for potentiometric study of ionic equilibria in aqueous and non-aqueous media. *Analytica Chimica Acta*, 317, 75-81.
- Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., 1995. Assignment of Reference pH-Values to Primary Standard Buffer Solutions for Standardization of Potentiometric Sensors in Acetonitrile-Water Mixtures. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 353, 148-155.
- Barwick, V., J., 1997. Strategies for solvent selection – a literature review. *Trends in Analytical Chemistry*, 16-6, 293-308.

- Bell, P.H., Bone, J., F., Romblin, R.O., 1944. The relationship of structure to activity of sulfanilamide type compounds. *Journal of American Chemical Society*, 66(5), 847.
- Beltran, J., L., Sanli, N., Fonrodona, G., Barron, D., Ozkan, G., Barbosa, J., 2003. Spectrophotometric, potentiometric and chromatographic pK_a values of polyphenolic acids in water and acetonitrile-water media. *Analitica Chimica Acta*, 484, 253-264.
- Beltran, J.L., Codony, R., Prat, M.D., 1993. Evaluation of stability constants from multi-wavelength absorbance data: program STAR. *Analitica Chimica Acta*, 276, 441-454.
- Bosch, E., Bou, P., Roses, M., 1994. Linear description of solute retention in reversed phase liquid chromatography by a new mobile phase polarity parameter. *Analitica Chimica Acta*, 299, 219-229.
- Bosch, E., Espinosa, S., Roses, M., 1998. Retention of ionizable compounds on high performance liquid chromatography. III Variation of pK values of acids and pH values of buffers in acetonitrile-water mobile phases. *Journal of Chromatography A*, 824, 137-146.
- Botsoglou, N., A., Fletouris, D., J., Simeonidou, E., J., Psomas, I., E., 1997. Retention behavior of multiple sulfonamides in various liquid chromatographic systems. *Chromatographia*, 46, No. 9/10.
- Botsoglou, N., A., 2000. Drug residues in foods: Pharmacology, food safety and analysis. 85s, New York.
- Caballero, R.D., Torres-Lapasio, J.R., Baeza-Baeza, J.J., and Garcia-Alvarez-Coque. M.C. 2001. Micellar chromatographic procedure with direct injection for the determination of sulfonamides in milk and honey samples. *Journal of Liquid*

Chromatography & Related Technologies, 24(1), 117-131.

Caballero, R.D., Carda-Broch, S., Garcia-Alvarez-Coque, M.C. 2001. Hydro-organic and micellar-organic reversed-phase liquid chromatographic procedures for the evaluation of sulfonamides in pharmaceuticals. *Analytical Letters*, 34(7), 1189-1203.

Carda-Broch, S., Berthord A., 2004. Countercurrent chromatography for the measurement of the hydrophobicity of sulphonamide amphoteric compounds. *Chromatographia*, 59, 79-87.

Chienthavorn, O., Smith, R., M., 1999. Buffered superheated water as an eluent for reversed-phase high performance liquid chromatography. *Chromatographia*, 50, No. 7/8.

Cross, F., R., Cao, J., 1998. Salt effects in capillary zone electrophoresis III. Systematic and selective factors in the high ionic strength separation of sulfonamides in sodium phosphate buffers. *Journal of Chromatography A*, 818, 217-229.

Covington, A. K., Bates R. G., Durst, R. A., 1985. Definition of pH Scales, Standard Reference Values, Measurements of pH and related terminology. *Pure and Applied Chemistry*, 57, 531.

De Augiar, P., F., B., Bourguignon, B., Massart, D., L., 1997. Comparison of models and designs for optimization of the pH and solvent strength in HPLC. *Analitica Chimica Acta*, 356, 7-17.

Doğu, H., 1994. Türkiyede satılan bazı sülfö grubu ilaçların fizikokimyasal parametrelerinin tayinleri üzerinde çalışmalar, 51s.

Dolan, J. W., Gant, J. R., Synnyder .R., 1979. Gradient elution in high performance liquig chromatography. II: Practical application to reversed- phase systems.

- Journal of Chromatography, 165, 31-58.
- Domagk, G., J., 1935. Ein Beitrag zur Chemotherapie der bakteriellen infektionen. Dtsch. med. Wochenschr. 61, 250-253.
- Furusawa, N., 1999. High-performance liquid chromatographic determination / identification of oxytetracycline and sulphadimidine in meat and eggs. Chromatographia, 49, 5/6, 369-373.
- Furusawa, N., 2003. Rapid high-performance liquid chromatographic determining technique of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and sulfaquinoxaline in eggs without use of organic solvents. Analytica Chimica Acta, 481, 255-259.
- Geiser, L., Henchoz, Y., Galland, A., Corrupt, P., A., Veutley, J., L., 2005. Determination of pK_a values by capillary zone electrophoresis with a dynamic coating procedure. Journal of Separation Science, 28, 2374-2380.
- Gran G., 1952. Determination of the equivalence points in potentiometric titrations. Part II, Analyst, 77, 661-671.
- Gran G., 1988. Equivalence volumes in potentiometric titrations. Analytica Chimica Acta, 206, 111-123.
- Gündüz, T., 2002. Instrümental Analiz, 913s, Ankara.
- Hardcastle J., Jano I., 1998. Determination of dissociation constants of polyprotic acids from chromatographic data. Journal of Chromatography B, 71, 739-756.
- Hela W., Brandtner M., Widek R., Schuh R., 2003. Determination of sulfonamides in animal tissuesw using cation exchange reversed phase sorbent for sample cleanup and HPLC-DAD for detection. Food Chemistry, 83, 601-608.

- Hilal, S., H., Karicckhoff, s., W., Carreira, L., A., 2004. Prediction of the solubility, activity coefficient, and liquid/liquid partition coefficient of organic compounds. *QSAR & Combinatorial Science*, 23, 709-719.
- Horvath, C., Melander, W., Molnar, I., 1977. Liquid chromatography of ionogenic substances with nonpolar stationary phases. *Analytical Chemistry*, 49, 142-154.
- Horwitz, W. 1981. Review of analytical methods for sulfnamides. Analytical methods for sulfonamides in foods and feeds. I. Review of methodology. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 64(1): 104-130.
- Hu, Y., Massart, D. L., 1989. Uniform shell desing for optimisation in reversed – phase liquid chromatography. *Journal of Chromatography*, 485, 311-323.
- Janos Pavel, 2004. Determination of equilibrium constants from chromatographic and electrophoretic measurements. *Journal of Chromatography A*, 1073, 15-28.
- Johnson, B. P., Khaledi, M. G., Dorsey, J. G., 1986. Solvatochromic Solvent Polarity Measurements and Retention in Reversed Phase Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, 58; 2354-2365.
- Kamlet M. J., Abboud J.-L. M., Abraham M. H., Taft R. W. 1983. Linear solvation energy relationships. 23. A comperehensive collection of the solvatochromic parameters, π^* , α and β , and some methods for simplifying the generalized solvatochromic equation. *Journal of Organic Chemistry*, 48-17, 2877-2887.
- Kishida K., 2007. Restricted – access media liquid chromatography for determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and N⁴-acetyl metabolites in eggs. *Food Chemistry*, 101, 281-285.

- Kishida K., Nishinari, K., Furusawa, N., 2005. Liquid chromatographic determination of sulfamonomethoxine, sulfadimethoxine, and N⁴-acetyl metabolites in Chicken plasma. *Chromatographia*, 61, 81-84.
- Kishida K., Furusawa N., 2001. Matrix solid phase dispersion extraction and high – performance liquid chromatographic determination of residual sulfonamides in chicken. *Journal of Chromatography A*, 937, 49-55.
- Levie, R., 1997. Principles of quantitative chemical analysis, 737s, Singapore.
- Lin, C., E., Lin, W., C., Chen, Y., C., Wang, S., W., 1997a. Migration behavior and selectivity of sulfonamides in capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 792, 37-74.
- Lin, C., E., Chang, C., C., Lin, W., C., 1997b. Migration behavior and separation of sulfonamides in capillary zone electrophoresis. II. Positively charged species at low pH. *Journal of Chromatography A*, 759, 203-209.
- Lin, C., E., Chang, C., C., Lin, W., C., 1997c. Migration behavior and separation of sulfonamides in capillary zone electrophoresis. III. Citrate buffer as a background electrolyte. *Journal of Chromatography A*, 768, 105-112.
- Cates, L.A., Sulfa Drugs in Handbook of Chemotherapeutic Agents, Vol. 1, M. Verderame ed., CRC Press, Boca Raton, 1986, 1.
- Martel, A., C., Zeggane, S., 2003. HPLC Determination of sulfatiazole in French Honeys. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 26-6, 953-961.
- Maudens, K., E., Zhang, G., F., Lambert, W., E., 2004. Quantitativ analysis of twelve sulfonamides in honey after acidic hydrolysis by high-performance liquid chromatography with post – column derivatization and fluorescence detection.

Journal of Chromatography A , 1047, 85-92.

McCally, D., 2000. Effect of temperature and flow-rate on analysis of basic compounds in high-performance liquid chromatography using a reversed-phase column. Journal of Chromatography A, 902, 311-322.

Mengellers, M. J. B., Hougee, P. E., Janssen, L. H. M. Van Miert, A. S. J. P. A. M., 1997. Structure - activity relationships between antibacterial activities and physicochemical properties of sulfonamides. Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics, 20, 276-283.

Mitchell, R. C., Salter, C., J., Tam, K., Y. 1999. Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants. Part III, resolution of multi-protic ionization systems. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 20, 289 - 295.

Msagati, T., A., M., Nindi, M., M., 2004. Multiresidue determination of sulfonamides in variety of biological matrices supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection. Talanta. 64. 87-100.

Özalp, E.A.D., 2002. Farmakoloji, Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul.

Pang, G., F., Cao, Y., Z., Fan, C., L., Zhang, J., J., Li, X., M., Li, Z., Y., Jia, G., Q., 2003. Liquid chromatography – fluorescence detection for simultaneous analysis of sulfonamide residues in honey. Analytical and Bioanalytical Chemistry. 376, 534-541.

Pavel Janos., 2004. Determination of equilibrium constants from chromatographic and electrophoretic measurements. Journal of Chromatography A, 1037, 15-28.

- Pawelczyk, E. and Zajac, M. 1976. Acid hydrolysis of sulfatiazole. *Acta Polonian Pharmacy*, 33(4): 479-484.
- Pecorelli, I., Bibi, R., Fioroni, L., Galarini, R., 2004. Validation of a confirmatory method for determination of sulfonamides in muscle according to the European Union regulation 2002/657/EC. *Journal of Chromatography A*, 1032, 23-29.
- Polster J., Lachmann H., 1989. *Spectrometric titrations: Analysis of chemical equilibria*. VCH, Weinheim, pp 433, Germany.
- Poole, S. K., Patel, S., Dehring, K., Workman, H., Poole, C., F., 2004. Determination of acid dissociation constants by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* , 1037, 445-454.
- Poole, C. P., Poole, S. W., 1997. *Chromatography Today*. Fifth impression. Elsevier Science, B.V., Amsterdam.
- Qiang, Z., Adams, C., 2004. Potentiometric determination of acid dissociation constants (pK_a) for human and veterinary antibiotics. *Water Research*, 38, 2874-2890.
- Reichardt C., 1994. Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. *Chemical Reviews.*, 94, 2319-2358.
- Reginald F., Cao, J., 1998. Salt effects in capillary zone electrophoresis III. Systematic and selective factors in the high ionic strength separation of sulphonamides in sodium phosphate buffers. *Journal of Chromatography A* , 818, 217-229.
- Rondinini, S., Mussini, P. R., Mussini, T., 1987. Reference Value Standard and Primary Standard for pH Measurements in Organic Solvents and Water +

Organic Solvent Mixtures of Moderate to High Permittivities. *Pure & Applied Chemistry*, 59 (11), 1549-1560.

Rondinini, S., Nese, A., 1987. Standard pH Values for Potassium Hydrogenphthalate Reference Buffer Solutions in Acetonitrile-Water Mixtures up to 70 wt % at Various Temperatures. *Electrochimica Acta*, 2(10), 1499-1505.

Roses, M. and Bosch, E., 1993. Linear solvation energy relationships in reversed phase liquid chromatography. Prediction of retention from a single solvent and a single solute parameter. *Analitica Chimica Acta*, 274, 147-162.

Roses, M., Canals, I., Allemann, H., Katrin, S., Bosch, E. 1996. Retention of ionizable compounds on HPLC. 2. Effect of pH, ionic strength and mobile phase composition on retention of weak acids. *Analytical Chemistry*, 68, 4094-4100.

Ruiz R., Roses, M., Rafols C., Bosch, E. 2005. Critical validation of a new simpler approach to estimate aqueous pK_a of drugs sparingly soluble in water. *Analitica Chimica Acta*, 550, 210-221.

Ruiz Angel. M.J., Carda- Broch, S., Garcia-Alvarez-Coque. M.C., Berthod, A. 2005. Effect of ionization and the nature of the mobile phase in quantitative structure-retention relationship studies. *Journal of Chromatography A*, 1063, 25-34.

Schoenmakers, P. J., Billiet, H. A. H., De Galan, L. 1979. Influence of organic modifiers on retention behaviour in reversed- phase liquid chromatography and its consequences for gradient elution. *Journal of Chromatography*, 185, 179-195.

Schoenmakers, P. J., Van Molle, S., Hayes, C. M. G., Uunk, L. G. M., 1991. Effects of pH in Reversed Phase Liquid Chromatography. *Analitica Chimica Acta*, 250, 1-19.

- Soriano-Correra, C., Esquivel, R. O., Sagar, R., P. 2003. Pysicochemical and structural properties of bacteriostatic sulfonamides: Theoretical study. *International Journal of Quantum Chemistry*, 94(3): 165-172.
- Stoev, G., Michailova A., 2000. Quantitative determination of sulfonamide residues in foods of animal origin by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography A*, 871, 37-42.
- Takacs-Novak, K., Box, K., J., Avdeef, A. 1997. Potentiometric pK_a determination of water-insoluble compounds: validation study in methanol/water mixtures. *International Journal of Pharmaceutics*, 151, 235-248.
- Torres-Lapasio, J., R., Roses, M., Bosch, E., Garcia-Alvarez-Coque, M., C., 2000. Interpretive optimization strategy applied to isocratic separation of phenols by reversed-phase liquid chromatography with acetonitrile-water and methanol-water mobile phases. *Journal of Chromatography A*, 886, 31-46.
- Zayas-Blanco, de F., Garcia-Falcon, M., S., Gandara-Simal, J. 2004. Determination of sulfamethazine in milk by solid phase extraction and liquid chromatographic separation with ultraviolet detection. *Food Control*, 15, 375-378.
- Zotou, A., Vasiliadou, C., 2006. Selective determination of sulfonamide residues in honey by SPE-RP-LC with UV detection. *Chromatographia*, 64, 5/6, 307-311.

ÖZGEÇMİŞ



Adı Soyadı : Nurullah Şanlı

Doğum Yeri : Bingöl

Doğum Yılı : 30.04.1977

Medeni Hali : Evli

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Isparta Anadolu Lisesi – 1995

Lisans : Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü-1999

Yüksek Lisans : Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı-2002

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl:

Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Araştırma Görevlisi 2000-2001

Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen edebiyat Fakültesi, Öğretim Görevlisi, 2001-...

Yayınları (SCI ve diğer makaleler)

1. N. Sanli, G. Fonrodona, D. Barrón, G. Özkan and J. Barbosa, “Prediction of chromatographic retention, pKa values and optimization of the separation of polyphenolic acids in strawberries” Journal of Chromatography A, Volume 975, Issue 2, 1 November 2002, Pages 299-309
2. J. L. Beltran., N. Sanli, G. Fonrodona, D. Barrón, G. Özkan, J. Barbosa “Spectrophotometric, potentiometric and chromatographic pKa values of polyphenolic substances in water and acetonitrile-water media.” Analytica Chimica Acta, Volume 484, Issue 2, 19 May 2003, Pages 253-264.

3. Denizli A., Şanlı N., Garipcan B., Patır S., Alsancak G. Methacryloylamidoglutamic acid incorporated porous poly(methylmethacrylate) beads for heavy metal removal. *Industrial and Engineering Chemistry Research*, September 15, 2004, Volume 49 (Issue 19) 6101.
4. Nurullah Şanlı, Gemma Fonrodona, Jose Barbosa, Guleren Ozkan, J.Luis Beltran. Modelling retention in liquid chromatography of polyphenolic acids- Prediction of solvent composition and pH of the mobile phase. *Analytica Chimica Acta*, 537, 2005, 53-61.
5. Aktaş, A.H., Şanlı, N, Pekcan. G., 2006. Spectrometric Determination of pKa Values for Some Phenolic Compounds in Acetonitrile-Water Mixtures. *Acta Chim. Slov.* 2006, 53, 214-218.
6. F.Z. Erdemgil, S. Şanlı, N. Şanlı, G. Özkan, J. Barbosa, J.L. Beltran. Determination of pK_a values of some hydroxylated benzoic acids in methanol-water binary mixtures by LC methodology and potentiometry. *Talanta*-2007, 72 489–496.