



Marmara University Publication No : 518
Faculty of Science and Letters Publication No: 29

KİMYA '92

CHEMISTRY '92

**VIII. KİMYA VE KİMYA MÜHENDİSLİĞİ
SEMPOZYUMU**

**TURKISH
VIII th NATIONAL SYMPOSIUM
ON
CHEMISTRY AND CHEMICAL ENGINEERING**

VOLUME II

Editor-in-Chief
Adnan AYDIN

**ORGANIC CHEMISTRY
BIOCHEMISTRY
BIOTECHNOLOGY
FOOD CHEMISTRY**

Co-Editors
Mine ENGİNÜN
Kemal YELEKÇİ

Marmara University
Faculty of Science and Letters
Department of Chemistry



7-11 September 1992
Istanbul, Türkiye



Marmara University Publication No : 518

Faculty of Science and Letters Publication No : 29

Turkish
VIII th National Symposium
on
Chemistry and Chemical Engineering

CHEMISTRY '92

VIII.
KİMYA VE KİMYA MÜHENDİSLİĞİ
SEMPOZYUMU

KİMYA '92

VOLUME II

Organic Chemistry
Biochemistry
Biotechnology
Food Chemistry

Sponsored by

AKSA Acrylic Chemical Ind. Co., Türkiye
BASF Sümerbank A.Ş. Türkiye
EGE HOLDİNG A.Ş. Türkiye
TÜBİTAK Scientific and Technical Research
Council of Türkiye
AK- KİM Kimya Sanayi ve Tic. A.Ş. Türkiye
FAKO İlaçları A.Ş. Türkiye
İNCEKARALAR Ltd. Ş. Türkiye
PROCTER & GAMBLE A.Ş. Türkiye
SARTES Engineering – Contr. Co., Türkiye
AGROSAN Kimya Sanayi ve Tic.A.Ş. Türkiye
IBM Türkiye
ICI Türkiye
LIFE İlaç Sanayi Türkiye
ATOM KİMYA Sanayi ve Tic. A.Ş. Türkiye
TURKISH CHEMICAL MANUFACTURERS'
ASSOCIATION
TURKISH CHEMICAL SOCIETY
ATABAY şirketler Grubu Türkiye
KERMANLAR Koll.Şti. TÜRKİYE

Edited by

Adnan AYDIN

Co-Editors

Mtne ENĞİNÜN

Kemal YELEKÇİ

Marmara University
Faculty of Science and Letters, Istanbul, Türkiye
7-11 September, 1992

Turkish
VIII th National Symposium
on
Chemistry and Chemical Engineering

7 - 11 September, 1992
Istanbul, Türkiye

HONORARY COMMITTEE

Prof. Dr. Hakkı Dursun YILDIZ (Rector of Marmara University)
Prof. Dr. Orhan OĞUZ (Retired Rector of Marmara University)
Prof. Dr. Ali Rıza BERKEM (Chairman of Turkish Chemical Society)
Alber BİLEN (Chairman of Turkish Chemical Manufacturers' Assoc.,)

ORGANIZATION COMMITTEE

Marmara University, Faculty of Science and Letters

Prof. Dr. Adnan AYDIN (Chairman)
Prof. Dr. Mahir ARIKOL
Prof. Dr. Mine ENGİNÜN
Prof. Dr. Mustafa L. BERKEM
Prof. Dr. Nurbay GÜLTEKİN
Assoc. Prof. Dr. Kemal YELEKÇİ
Assist. Prof. Dr. Sülün TAŞCIOĞLU

ASSISTANTS IN ORGANIZATION

Ece KÖK
Mustafa BALCI
Hilal GÜRBÜZ
Seyfullah MADAKBAŞ
Aydan SAN
Metin ÖZER
A. Aykut ERSOY
Bahattin YALÇIN
Ebru ARISAL

SCIENTIFIC COMMITTEE

- | | |
|---------------------------------|---------------------------------|
| Prof. Dr. Hüseyin AFŞAR (e) | Prof. Dr. Cemil İBİŞ (b) |
| Prof. Dr. Ahmet AKAR (c) | Prof. Dr. Yüksel İNEL (a) |
| Prof. Dr. Ayşe Havva AKSOY (c) | Prof. Dr. Nursen İPEKOĞLU (c) |
| Prof. Dr. Zikri ALTUN (d) | Prof. Dr. Şeniz KABAN (e) |
| Prof. Dr. Mahir ARIKOL (d) | Prof. Dr. Neşet KADIRGAN (e) |
| Prof. Dr. Yaman ARKUN (a) | Prof. Dr. Mehmet KARPUZCU (a) |
| Prof. Dr. Adnan AYDIN (d) | Prof. Dr. Ünel KÖKLÜ (c) |
| Prof. Dr. Ayfer BAPÇUM (b) | Prof. Dr. Emine KÖKOĞLU (b) |
| Prof. Dr. İnci BAŞAR (d) | Prof. Dr. Ayten KÖSEOĞLU (b) |
| Prof. Dr. Cuma BAYAT (b) | Prof. Dr. Abdülkadir KUYULU (e) |
| Prof. Dr. Mustafa L. BERKEM (d) | Prof. Dr. Selim KÜSEFOĞLU (a) |
| Prof. Dr. Fahir BORAK (a) | Prof. Dr. Murat ORBAY (b) |
| Prof. Dr. Zekiye ÇINAR (e) | Prof. Dr. Z. İlsen ÖNSAN (a) |
| Prof. Dr. Nejat DALAY (b) | Prof. Dr. Hadi ÖZBAL (a) |
| Prof. Dr. Binay DAĞSÖZ (b) | Prof. Dr. Eyüp ÖZCAN (b) |
| Prof. Dr. Salih DİNÇER (e) | Prof. Dr. Süheyla ÖZERİŞ (b) |
| Prof. Dr. Solmaz DOĞANCI (d) | Prof. Dr. Mehmet PALA (e) |
| Prof. Dr. Umur DRAMUR (b) | Prof. Dr. Ahmet SAATÇI (d) |
| Prof. Dr. Ekrem EKİNCİ (c) | Prof. Dr. Serpil SALMAN (b) |
| Prof. Dr. Nesrin EMEKLİ (d) | Prof. Dr. Ünal SANIGÖK (b) |
| Prof. Dr. Mine ENGİNÜN (d) | Prof. Dr. Sezai SARAÇ (c) |
| Prof. Dr. Güner ERKMEN (b) | Prof. Dr. Hikmet SAVCI (d) |
| Prof. Dr. Yürdun FIRAT (d) | Prof. Dr. Sıdıka SUNGUR (e) |
| Prof. Dr. Selahattin GÖKMEN (e) | Prof. Dr. Musa ŞAHİN (d) |
| Prof. Dr. Hüseyin GÜLENSOY (b) | Prof. Dr. İnci TEZCAN (d) |
| Prof. Dr. Nurbay GÜLTEKİN (d) | Prof. Dr. Şebahat TÜZÜN (b) |
| Prof. Dr. İsmet GÜRGEY (b) | Prof. Dr. Nermin UYSAL (d) |
| Prof. Dr. M. Ali GÜRKAYNAK (b) | Prof. Dr. Süheyla UZMAN (e) |
| Prof. Dr. Belkıs HALFON (a) | Prof. Dr. Yusuf YAĞCI (c) |
| Prof. Dr. Amable HORTAÇSU (a) | Prof. Dr. Turay YARDIMCI (d) |
| Prof. Dr. Öner HORTAÇSU (a) | Prof. Dr. Yavuz YORULMAZ (d) |

(a) Bosphorus University, Istanbul - TÜRKİYE
 (b) Istanbul University, Istanbul - TÜRKİYE
 (c) Technical University of Istanbul - TÜRKİYE
 (d) Marmara University, Istanbul - TÜRKİYE
 (e) Yıldız University, Istanbul - TÜRKİYE

Proceedings of
Turkish VIII th National Symposium on
Chemistry and Chemical Engineering, Volume I-IV
Istanbul, Türkiye
7- 11 September, 1992

ISBN - 975 - 400 - 066 - 2

Published by Marmara University, Faculty of Science and Letters,
81040 Göztepe, Istanbul, Türkiye.

All Rights Reserved

© 1992 Marmara University, Faculty of Science and Letters. No part of this publication may be reproduced or utilized in any form or by any means, electronic and mechanical, including photocopying, recording or by any information storage and retrieval system, without written permission from the copyright owner.

Printed in Türkiye

CONTENTS İÇİNDEKİLER

ORGANİK KİMYA ORGANIC CHEMISTRY

*A NEW AND STEREOSPECIFIC SYNTHESIS OF CONDURITOL-C, E
AND F*

CONDURİTOL C, E VE F'NİN YENİ VE STEREOSPEŞİFİK
OLARAK SENTEZİ

Hasan SEÇEN, Serdar GÜLTEKİN, Ahmet MARAŞ, Yaşar SÜTBEYAZ, Metin BALCI .. 1

*INVESTIGATION OF THE OXIDATION OF SOME PRIMARY AND
SECONDARY ALCOHOLS BY POTASSIUM CHLOROCHROMATE*

BAZI BİRİNCİL VE İKİNCİL ALKOLLERİN POTASYUM
KLOROKROMAT İLE YÜKSELTGENME TEPKİMELERİNİN
İNCELENMESİ

Beytiye ÖZGÜN 7

*DEHYDRATION REACTIONS OF SOME ALCOHOLS BY USING METAL
(II) SULFATES AS CATALYSTS*

BAZI SUSUZ METAL (II) SÜLFAT KATALİZÖRLERİ İLE ALKOLLERİN
DEHİDRASYON REAKSİYONLARININ İNCELENMESİ

Hayrettin BEYNEK ve Ülkü OYMAN 11

*THE SYNTHESIS OF ALLENE AND ALKYNE IN BENZOBICYCLO
[3.2.1] OCTANE SYSTEMS AND INVESTIGATION OF THEIR
FORMATION MECHANISM*

BENZOBİSİKLO [3.2.1] OKTAN SİSTEMLERİNDE ALLEN VE ALKİN
SENTEZİ VE OLUŞUM MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Yavuz TAŞKESENLİGİL ve Metin BALCI 15

THE FUNCTIONALIZATION OF BENZONORBORNADIENE

i- HIGH TEMPERATURE BROMINATION

ii- ELECTROCHEMICAL REACTION

BENZONORBORNADİENİN FONKSİYONALİZASYONU

1- YÜKSEK SICAKLIK BROMİNASYONU

ii- ELEKTROKİMYASAL REAKSIYONLARI

Arif DAŞTAN, Ümit DEMİR, Osman ÇAKMAK, Fatih KÖLELİ ve Metin BALCI. 21

SYNTHESIS OF 1,2-BENZO-1,3,4-CYCLOHEPTATRIENE

1,2-BENZO-1,3,4-SİKLOHEPTATRIENİN SENTEZİ

Yaşar Kemal YILDIZ, Hasan SEÇEN ve Metin BALCI..... 27

*ADDITION OF EPICHLOROHYDRIN TO POLYOXACHLOROHYDRINS
AND SYNTHESSES OF POLYOXAEPICHLOROHYDRINS*

**POLİOKSAKLORHİDRİNLERE EPİKLORHİDRİNİN KATILMASI VE
POLİOKSAEPİKLORHİDRİNLERİN SENTEZİ**

Hallî HOÇGÖREN ve Nureddin ÇOLAK 31

*CYCLOADDITION REACTIONS OF DICHLOROKETENE WITH ALLYL
ETHERS*

**DİKLOROKETEN İLE BAZI ALLİLETERLERİN SİKLOKATILMA
TEPKİMELERİ**

Hülya ŞENÖZ, Mehmet TOY, Süleyman YILDIRIR..... 37

*SYNTHESIS OF HETEROCYCLIC COMPOUNDS WITH
INTRAMOLECULAR (2+2) CYCLOADDITION*

**MOLEKÜL İÇİ (2+2) SİKLOADİSYON TEPKİMESİ İLE BAZI
HETEROSİKLİK BİLEŞİKLERİN SENTEZİ**

Mehmet TOY, Hülya SENÖZ ve Süleyman YILDIRIR 41

*THE REARRANGEMENT OF ISOXAZOLIDINE-5-
SPIROCYCLOPROPANES: THE REGIOSELECTIVITY IN NITRONE-
METHYLENECYCLOPROPANE 1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION
REACTION*

İZOKSAZOLİDİN-5- SPIROSİKLOPRONANLARIN ÇEVİRİLMESİ:
NİTRONMETİLEN SİKLOPROPAN 1,3-DİPOLAR SİKLOKATILMA
REAKSİYONUNDA REGİOSEÇİMLİLİK

Yaşar DÜRÜST, Alberto BRAND, Francesco DE SARLO..... 45

*CYCLOADDITION REACTIONS OF 7- SUBSTITUED
CYCLOHEPTATRİENE (CHT) COMPOUNDS WITH BENZYNE AND P-
BENZOQUINONE*

7- SÜBSTİTÜE SİKLOHEPTATRİEN (SHT) BİLEŞİKLERİNİN BENZİN
ve p- BENZOKİNONLA SİKLOKATILMA REAKSİYONLARI

Abdullah MENZEK ve Metin BALCI 49

SYNTHESIS OF (E), (Z)-3,5-DIMETHYL-2,4-HEXADIENOIC ASİD

(E), (Z)- 3,5- DİMETİL-2,4- HEKZADİENOİK ASİDİN SENTEZİ

Kemal YELEKÇİ..... 55

*PREPARATION OF SOME N-ALKYL NITRO ANTHRANILIC ACID
DERIVATIVES*

BAZI N-ALKİL NİTRO ANTRANİLİK ASİT TÜREVLERİNİN
HAZIRLANMASI

Hallı HOŞGÖREN ve Giray TOPAL..... 59

*SUBSTITUED HYDRAZONES OF QUINOLINE-4-AND QUINOLINE-8-
CARBOXALDEHYDES*

KİNOLİN-4- VE KİNOLİN-8- KARBOKSALDEHİDİN SÜBSTİTUE-
HİDRAZONLARI

Şeniz KABAN ve Ercan AYDEMİR..... 65

*PHOTOCHEMICAL INVESTIGATION OF DISUBSTITUED
BENZOBARRELENE*

*DİSÜBSTİTÜE BENZOBARELENLERİN FOTOKİMYASAL
İNCELENMESİ*

Ramazan ALTUNDAŞ ve Metin BALCI 71

*PHOTOCHEMICAL DEHYDROGENATION OF ABIETIC ACID; A SOLAR
PHOTOCHEMICAL PRODUCTION METHOD*

*ABİETİK ASİDİN FOTOKİMYASAL DAHİDROJENASYONU; SOLAR
FOTO KİMYASAL ÜRETİM METODU*

Sıddık İÇLİ ve Adnan BULUT..... 77

*SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF SOME
ARYLOXYTHIOPHOSPHORYL COMPOUNDS*

*BAZI ARİLOKSİTİYOFOSFORİL BİLEŞİKLERİNİN SENTEZİ VE
SPEKTROSKOPİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ*

İsmail Erdem GÜMRÜKÇÜOĞLU ve Mustafa ODABAŞOĞLU..... 83

*NOVEL SYNTHESIS OF PHENYL, (PHTALİMİDO FORMYL), METHYL
PHOSPHINIC ACID ESTERS*

*FENİL (FTALİMİDO FORMİL) METİL FOSFİNİK ASİT ESTERLERİNİN
SENTEZLERİ*

Salih YAŞLAK..... 89

A NEW SYNTHETIC APPROACH TO SYNTHESIS OF BW 301U.

*BW 301U BİLEŞİĞİNİN SENTEZİNE YENİ BİR SENTETİK
YAKLAŞIM*

İnci DURUCASU ve Edward C.TAYLOR..... 91

*STUDIES OF THE OPTIMUM CONDITIONS IN SYNTHESIS 3,5
DIMETHYL TETRAHYDRO- 1,3,5- THIADIAZIN -2- THIONES AND ITS
REACTIONS WITH METAL CATIONS*

3,5 DİMETİL TETRAHİDRO- 1,3,5- TİADİAZİN -2- TİON'un
SENTEZİNDE OPTİMUM ŞARTLARIN ARAŞTIRILMASI VE METAL
KATYONLARI İLE REAKSİYONLARI

Ayşe ERÇAĞ ve Eylül ÖZCAN..... 97

*THE SYNTHESIS OF 1,3- THIAZINES WITH VARIABLE QUINONE-
METHIDE PRECURSORS AND THE DETERMINATION OF THE
MECHANISM*

DEĞİŞİK KİNON, METİD ÖNCÜLERİ İLE 1,3- TİYAZİNLERİN
SENTEZİ VE MEKANİZMA SAPTANMASI

Orhan BİLGİÇ, Sevim BİLGİÇ ve Mine YALÇINKAYA..... 101

*THE SYNTHESIS OF 3-PHENYLCOUMARIN DERIVATIVES OF
MACROCYCLIC ETHERS*

MAKRO HALKALI ETERLERİN 3- FENİLKUMARİN TÜREVLERİNİN
SENTEZLERİ

Mustafa BULUT ve Çakıl ERK..... 105

*SYNTHESES OF NAPHTHOFURAN AND NAPHTHODIOXOCIN
DERIVATIVES*

NAFTOFURAN VE NAFTODİOKSOSİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ

Ayşegül TUNCA, Naciye TALINLI ve Ahmet AKAR..... 109

*STUDIES ON THE STRUCTURES OF TWO TRITERPENE
GLYCOSIDES FROM *Cephalaria transilvanica**

Cephalaria transilvanica'dan İZOLE EDİLEN İKİ TRİTERPEN
GLİKOZİDİN YAPILARI ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

Süheyla KIRMIZIGÜL ve Hüseyin ANIL..... 113

COMPOSITION OF THE ESSENTIAL OIL OF Origanum onites L.

ORIGANUM ONİTES L. UÇUCU YAĞININ BİLEŞİMİ

Muzaffer ÖGÜTVEREN, F.Zerrin ERDEMGİL, Mine KÜRKÇÜOĞLU, Temel ÖZEK,
K.Hüsnü Can BAŞER..... 119

*SYNTHESIS OF ACETOACETANILIDE TYPE PIGMENT AND
DETERMINATION OF THEIR STRUCTURES*

ASETOASETANİLİD TÜRÜ PİGMENT SENTEZİ VE YAPILARININ
AYDINLATILMASI

Bilgehan GÜZEL ve Selahattin SERİN..... 125

*SYNTHESIS OF ORGANIC PIGMENTS USING COMPOUNDS OF
NAPHTHOL AS DYES*

NAFTTOL AS BOYARMADDELERİN BİLEŞENLERİNDEN
YARARLANILARAK ORGANİK PİGMENT SENTEZİ

Bilgehan GÜZEL ve Selahattin SERİN..... 131

*THE SYNTHESIS OF SOME AZO DYES AND IDENTIFICATION OF
THEIR SPECTROSCOPIC PROPERTIES*

BAZI AZO BOYAR MADDELERİNİN SENTEZİ VE SPEKTROSKOPİK
ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

İsmail E. GÜMRÜKÇÜOĞLU, Hasan KOCAOKUTGEN ve Selami ŞAŞMAZ..... 137

*THE SYNTHESIS of LUMINESCENT N-SUBSTITUTED PERYLENE
DIIMIDES AND PHOTSENSITIZATION STUDIES FOR SOLAR
PHOTOCHEMICAL REACTIONS*

LÜMİNESANT N- SÜBSTİTÜE PERİLEN DİİMİDLERİN SENTEZLERİ
VE FOTOSENSİZATÖRLÜKLERİNİN SOLAR FOTOKİMYASAL
REAKSİYONLAR İÇİN İNCELENMESİ

Huriye İCİL ve Sıddık İÇLİ..... 143

SENSITIZATION OF ACETYLATED, NITRO, HALOGENATED AND SULPHONATED Cu(II) AND Zn (II) PHTHALOCYANINES AND NON-METAL DERIVATIVES

Cu⁺⁺, Zn⁺⁺ GİBİ METALLERİ İÇEREN FTALOSİYANİNLERİN ASETİLLİ, NİTRO, HALOJENLİ VE SÜLFO TÜREVLERİ İLE METALSİZ FTALOSİYANİNLERİN SENTEZLENMESİ

Sıddık İÇLİ, Bircan DİNDAR..... 147

POTANTIOMETRIC TITRATIONS OF 2-SUBSTITUTED OXAZOLO [4-5,b] PIRIDINE DERIVATIVES IN NON AQUEOUS SOLVENT

SUSUZ ORTAMDA 2- (SÜBSTİTÜE)- OKSAZOLO [4-5-b] PİRİDİN TÜREVLERİNİN POTANSİYOMETRİK TİTRASYONU

Cemil ÖĞRETİR, Gözen BERKET ve Mehmet POYRAZ..... 153

DETERMINATION OF pKa VALUES OF SOME 2-SUBSTITUTED PHENALEN-1,3 (2H)- DIONES IN ETHANOL-WATER MIXTURES BY SPECTROPHOTOMETRIC TITRATION METHOD

FENALEN-1,3 (2H)- DİON VE BAZI 2- SUBSTİTE TÜREVLERİNİN pKa'LARININ ETANOL- SU KARIŞIMLARI İÇİNDE SPEKTROFOTOMETRİK TİTRASYON YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

Nermin HOCAOĞLU (ERTAN)..... 159

DETERMINATION OF THE ACIDITY CONSTANTS OF SOME OXAZOLO [4.5-b] PYRIDINE DERIVATIVES AND THEIR EVALUATION

OKSAZOLO [4,5-b] PİRİDİN TÜREVLERİNİN ASİTLİK SABİTLERİNİN HESAPLANMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Cemil ÖĞRETİR, Halil BERBER ve Nevin KANIŞKAN..... 163

SOLVENT EFFECT ON CONFORMATIONAL EQUILIBRIA OF 2-METHYL AND 2-HALO CYCLOHEXANONE ETHYLENE KETALS

2- METİL VE 2- HALO SİKLOHEKSANONUN ETİLEN KETALLERİNİN KONFORMASYONEL DENGELERİ ÜZERİNE ÇÖZÜCÜ ETKİLERİ
Safiye ERDEM, Tereza VARNALI, Viktorya AVİYENTE ve M.F. Ruiz-Lopez..... 169

ELECTRONIC STRUCTURE OF [Br(PMe₃)₃Rh(OCH₂CMe₂)]

[Br(PMe₃)₃Rh(OCH₂CMe₂)] KOMPLEKSİNİN ELEKTRONİK YAPISI

C. ÜNALEROĞLU, M.J. CALHORDA..... 175

THEORETICAL STUDY OF CONFORMATIONAL EQUILIBRIUM OF 5-HETEROSUBSTITUTED- 1,3- DIOXANES

5- SÜBSTİTÜYE- 1,3- DİOKSAN'LARDA KONFORMASYONEL DENGİNİN TEORİK OLARAK İNCELENMESİ

Gökşin APAYDIN, Tereza VARNALI, Viktorya AVİYENTE ve M.F. Ruiz-Lopez..... 179

THE DETERMINATION OF RESPONSE FACTOR OF n-PENTAN WITH FLAME IONIZATION DETECTOR (F.I.D.)

ALEV İYONLAŞMA DETEKTÖRÜ (F.I.D.) İLE n-PENTANIN RESPONSE FAKTÖRÜNÜN İNJEKSİYON METODUYLA TAYİN EDİLMESİ

A. Dinçer BEDÜK ve Mustafa PEHLİVAN..... 185

DICARBONYL COMPOUNDS AND THEIR PHOSPHOR CONTAINING ANALOGS

DİKARBONİL BİLEŞİKLERİ VE ONLARIN FOSFORLU ANALOGLARI

Valeh ISMAYILOV, Hacalı NECEFOGLU, Niftali YUSUBOV..... 191

BIOCHEMISTRY
BIOTECHNOLOGY
FOOD CHEMISTRY

BİYOKİMYA
BİYOTEKNOLOJİ
BESİN KİMYASI

THE ISOLATION OF DAO FROM PEA SEEDLING

BEZELYE TOHUMUNDAN DİAMİN OKSİDAZ ENZİMİNİN
İZOLAYONU VE SAFLAŞTIRILMASI

Yüksel AVCIBAŞI GÜVENİLİR ve Nuran DEVECİ..... 195

THE ISOLATION OF DAO FROM PIG LIVER

DOMUZ CİĞERİNDEN DİAMİN OKSİDAZ ENZİMİNİN İZOLASYONU
VE SAFLAŞTIRILMASI

Yüksel AVCIBAŞI GÜVENİLİR ve Nuran DEVECİ..... 199

INVESTIGATION OF ENZIMATIC PEPTIDE SYNTHESIS

ENZİMATİK PEPTİD SENTEZLERİNİN İNCELENMESİ

Yeşim YEŞİLOĞLU ve Ayten SAĞIROĞLU..... 203

EFFECT OF 18. CROWN. 6. ON BACTERIAL α -AMYLASE ACTIVITY

BAKTERİYEL α -AMİLAZIN AKTİVİTESİ ÜZERİNE 18. TAÇ. 6
ETERİN ETKİSİ

Çetin AYTEKİN, Işıl GÜLSÜN, Halil HOŞGÖREN, Yavuz ENSARI..... 207

AFFINTY TO SOME INHIBITORS OF GLYCATED CARBONIC
ANHYDRASE-II FROM THE ERYTHROCYTES OF DIABETIC PATIENT

DİABETLİ HASTA ERİTROSİTLERİNDEN ELDE EDİLEN GLİKE
KARBONİK ANHİDRAZ-II ENZİMİNİN BAZI İNHİBİTÖRLERE KARŞI
İLGİSİ

Ö.İRFAN KÜFREVİOĞLU, Mehmet ÇİFTÇİ, Hasan ÖZDEMİR, Nazan DEMİR ve
Mehmet GÜNDOĞDU..... 213

THE INHIBITION KINETICS OF BOVINE ERYTHROCYTE CARBONIC ANHYDRASE WITH SOME ACTIVE CATIONS

SİĞİR ERİTROSİT KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN BAZI AKTİF KATYONLARLA İNHİBİSYON KİNETİĞİ

Hasan ÖZDEMİR, Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU, Nazan DEMİR, Nuri BAKAN..... 219

THE INFLUENCE OF THE INTERFACIAL BEHAVIOR ON THE HYDROLYSIS OF TRIOLEIN BY A CANDIDAL LIPASE

CANDİDAL LİPAZ İLE TRİOLEİN HİDROLİZİNE ARAYÜZEY ÖZELLİKLERİNİN ETKİSİ

H. İbrahim EKİZ ve Arif ÇAĞLAR..... 223

ESTERIFICATION REACTIONS WITH IMMOBILIZED LIPASES

İMMOBİLİZE LİPAZLARLA ESTERİFİKASYON REAKSİYONLARI

Ayten SAĞIROĞLU, Azmi TELEFONCU..... 227

SUBSTRATE SPECIFITY OF POLYPHENOL OXIDASE ISOLATED FROM DOG-ROSE

KUŞBURNU MEYVASINDAN İZOLE EDİLEN POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN SUBSTRAT SPESİFİTE

Halis ŞAKIROĞLU, Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU ve Münir OKTAY..... 233

CELL ADHESIVE PROTEINS COLLAGEN AND FIBRONECTIN IMMOBILIZATION ONTO POROUS PHEMA BEADS

HÜCRE YAPIŞTIRICI PROTEİNLER COLLAGEN VE FİBRONEKTİNİN GÖZENEKLİ PHEMA PARTİKÜLLERE İMMOBİLİZASYONU

Adil DENİZLİ ve Erhan Pişkin..... 237

INVESTIGATION OF PHAGOCYTOSIS WITH MONODISPERSE POLYSTYRENE PARTICLES

MONODİSPERS POLİSTİREN PARTİKÜLLERLE FAGOSİTOZ OLAYININ İNCELENMESİ

Hakan AYHAN, S.All TUNCEL, Erhan Pişkin..... 243

DETERMINATION OF AFFINITY PERFORMANCES OF CIBACRON BLUE F3GA ATTACHED MONODISPERSE POLYSTYRENE MICROBEADS

CIBACRON BLUE F3GA BAĞLI MONODİSPERS POLİSTİREN MİKROTAŞIYICILARIN AFİNİTE PERFORMANSLARININ BELİRLENMESİ

A.DENİZLİ, A.TUNCEL, D.PURVIS, C.R.LOWE, E. PİŞKİN..... 249

EFFECT OF LAURUS NOBILIS L. LEAVES EXTRACTS ON BLOOD SUGAR LEVEL

DEFNE YAPRAKLARINDAN ELDE EDİLEN EKSTRELERİN KAN ŞEKERİ DÜZEYİNE ETKİSİ
Refiye YANARDAĞ, Ayfer BAPÇUM, Şebnem CAN..... 255

COLOSTRUM FATTY ACID COMPOSITION OF TURKISH WOMEN

TÜRK ANNELERİNİN KOLOSTRUM YAĞ ASİDİ KOMPOZİSYONU
Ayşe OGAN, Refiye YANARDAĞ, Nesrin EMEKLİ, Ayfer BAPÇUM. 261

DETERMINATION OF UREA BY HANTZSCH REACTION

HANTZSCH TEPKİMESİNİN ÜRE SAPTANMASINA UYGULANMASI
Fatma AYDIN ve H.Nursevin ÖZTOP..... 267

DETERMINATION OF Zn^{2+} BY REACTIVATION OF APOCARBONIC ANHYDRASE IN CHRONIC RENALE FAILURE PATIENTS SERA AND PLEVRAL FLUIDS

KRONİK BÖBREK HASTA SERUMLARINDA VE PLEVRA SIVISINDA Zn^{2+} MİKTARININ APOKARBONİK ANHİDRAZIN TEKRAR AKTİVASYONU İLE TAYİNİ
Nazan DEMİR, Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU ve Ebubekir BAKAN..... 273

AFFINITY CHROMATOGRAPHY APPLICATIONS OF CIBACRON BLUE F3GA IMMOBILIZED PHEMA HYDROGELS

CIBACRON BLUE F3GA İMMOBİLİZE PHEMA HİDROJELLERİN AFİNİTE KROMATOGRAFİSİNE UYGULANMASI
A.DENİZLİ, A.TUNCEL, A. KOZLUCA, F. KAYIRHAN, E.PİŞKİN..... 277

THE QUALITATIVE ANALYSIS OF RENAL STONES SURGICALLY REMOVED FROM 250 PATIENTS AND STATISTICALLY EVALUATION OF THE RESULTS

250 HASTADAN AMELİYATLA ALINAN BÖBREK TAŞLARININ KALİTATİF ANALİZİ VE SONUÇLARIN İSTATİSTİK DEĞERLENDİRMESİ

Münlre HACİBEKİROĞLU ve Nevzat BARAN..... 283

A STUDY OF KINETIC PARAMETERS OF ENZYME PRODUCTIVITY OF RECOMBINANT E.coli CULTURE

REKOMBİNANT E. coli KÜLTÜRLERİ İLE ENZİM ÜRETİMİNİN KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Dilek KAZAN, Amable HORTAÇSU ve Agnes ÇAMURDAN 289

ACTIVE AND STABLE PAL ENZYME PRODUCTION CONDITIONS

AKTİF VE KARARLI PAL ENZİMİ ÜRETİM KOŞULLARININ ARAŞTIRILMASI

Serpil TAKAÇ ve Bülent AKAY..... 295

ISOLATION OF PROTEASE FROM ONOPORDUM TURCICUM AND A NEW APPROACH IN KINETIC MODELLING

ONOPORDUM TURCICUM' DAN PROTEAZ İZOLASYONU VE KİNETİK MODELLEMEDE YENİ BİR YAKLAŞIM

İ.Melih TAMER ve Mehmet MUTLU..... 301

INFLUENCE OF FERMENTATION PARAMETERS ON MILK CLOTTING ACTIVITY IN THE PRODUCTION OF MICROBIAL RENNIN

MİKROBİYAL RENNİN ÜRETİMİNDE FERMENTASYON PARAMETRELERİNİN SÜT PIHTILAŞTIRMA AKTİVİTESİNE ETKİSİ

Fatma AYHAN, Abdurrahman TANYOLAÇ, Serdar S. ÇELEBİ..... 307

BOX-WILSON EXPERIMENTAL DESIGN ON THE OPTIMISATION OF MICROBIAL RENNIN PRODUCTION

MİKROBİYAL RENNİN ÜRETİM OPTİMİZASYONUNDA BOX-WILSON DENEYSEL TASARIMI

Fatma AYHAN, Abdurrahman TANYOLAÇ, Serdar S.ÇELEBİ 313

IMMOBILIZATION OF BACTERIORHODOPSIN ON SYNTHETIC MEMBRANES

BACTERIORHODOPSİN'İN SENTETİK BİR ZARA TUTTURULMASI

Vedat SEDİROĞLU, Ufuk GÜNDÜZ, Meral YÜCEL, Lemli TÜRKER ve İnci EROĞLU..... 319

INCREASE OF ENZYMATIC HYDROLYSIS RATE OF TRIACETIN WITH POLYMERIC PARTICLES

POLİMERİK PARTİKÜLLER İLE TRIASETİNİN ENZİMATİK HİDROLİZ HIZININ ARTIRILMASI

Fatma KAYIRHAN, Serdar S.ÇELEBİ ve Arif ÇAĞLAR..... 325

A STUDY OF PLASMID STABILITY IN IMMOBILIZED MIXED CULTURES OF RECOMBINANT E.coli

TUTUKLANMIŞ KARIŞIK REKOMBİNANT E.coli KÜLTÜRLERİNDE PLAZMİD STABİLİTESİNİN İNCELENMESİ

Vildan DİNÇBAŞ ve Amable HORTAÇSU 331

MODELLING OF GROWTH KINETICS OF ZOOGLOEA RAMIGERA

ZOOGLOEA RAMIGERA'NIN BÜYÜME KİNETİĞİNİN MODELLENMESİ

Haluk BEYENAL ve Abdurrahman TANYOLAÇ 337

GROWTH KINETICS of Catharanthus roseus

Catharanthus roseus'un BÜYÜME KİNETİĞİ

H.İbrahim EKİZ, Ferda MAVİTUNA ve Paul WILLIAMS 343

THE EFFECTS OF BIOFILM DENSITY AND EFFECTIVE DIFFUSION COEFFICIENT ON THE PERFORMANCE OF HOLLOW FIBER BIOFILM REACTOR (HFBR)

BIYOFİLM DERİŞİMİ ve ETKİN DİFÜZYON KATSAYISININ HOLLOW FİBER BIYOFİLM REAKTÖR (HFBR) PERFORMANSINA ETKİLERİ

Haluk BEYENAL ve Abdurrahman TANYOLAÇ..... 347

INVESTIGATION OF PROTEIN CELL INTERACTION ON MODIFIED POLYURETHANE MEMBRANS

MODİFİYE POLİÜRETAN MEMBRANLARDA PROTEİN VE HÜCRE ETKİLEŞMESİNİN İNCELENMESİ

Ali İhsan ŞERBETÇİ ve Erhan PİŞKİN..... 353

A NEW BIOSENSOR FOR THE DETERMINATION OF GLUCOSE

GLİKOZ TAYİNİ İÇİN YENİ BİR BIYOSENSÖR

Pınar ERDOĞDU, Serdar S. ÇELEBİ, Meral ARCA ve Attila YILDIZ..... 359

A SURFACE MODIFIED POLYCARBONATE MEMBRANE FOR ENZYME ELECTRODES

YÜZEYİ MODİFİYE EDİLEN POLİKARBONAT MEMBRAN İLE GELİŞTİRİLEN ENZİM ELEKTRODU

Selma MUTLU ve Erhan PİŞKİN..... 365

IMPROVING OF DRUG RELEASE RATE OF POLYMERIC MATRIX DEVICES BY ZONE FREEZING METHOD

POLİMERİK MATRİKS TİPİ TAŞIYICILARIN İLAÇ SALIM HIZININ "ZONE FREEZING" YÖNTEMİ İLE GELİŞTİRİLMESİ

Abdurrezak ÖNCÜ, Emin ARCA ve Yılmaz KAPTAN..... 369

BATCH AND CONTINUOUS ETHANOL PRODUCTION FROM GLUCOSE USING IMMOBILIZED S. cerevisiae

TUTUKLANMIŞ *S. cerevisiae* HÜCRELERİ KULLANILARAK KESİKLİ VE SÜREKLİ SİSTEMLERDE GLİKOZDAN ETANOL ÜRETİMİ

Gülnur BİROL, Elvan SOLAY, Betül KIRDAR ve Z.İlsen ÖNSAN..... 375

PAL ENZYME ACTIVITY AND STABILITY IN L-PHENYLALANINE PRODUCTION BY FREE AND IMMOBILIZED Rhodotorula glutinis

SERBEST VE TUTUKLANMIŞ *Rhodotorula glutinis* İLE L-FENİLALANİN ÜRETİMİNDE PAL ENZİM AKTİVİTE VE KARARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Serpil TAKAÇ, Bülent AKAY, Pınar ÇALIK, İlknur KARADAĞ ve Tunçer H. ÖZDAMAR..... 381

BIOPRODUCTION OF L-ALANINE FROM ASPARTIC ACID

BİYODÖNÜŞÜMLE ASPARTİK ASİTTEN L-ALANİN ÜRETİMİ

Güzide ÇALIK ve İ.Halil VURAL..... 387

RADYASYON PROSES DOZİMETRİSİNDE DOZHES PROGRAMININ KULLANIMI

A.Yılmaz ERKOL, M. Unal AZAKLIOĞULLARI..... 393

SIMULATION OF BIOREACTOR PERFORMANCE IN BIOPROCESSES

BİYOPROSESLERDE BİYOREAKTÖR PERFORMANSININ SİMÜLASYONU

Ahmet ÖZEMRE ve Fazilet VARDAR SUKAN..... 399

DETERMINATION OF VITAMIN C CONTENT OF THE VEGETABLES AND FRUITS CONSUMED IN THE DISTRICT OF TRABZON

TRABZON YÖRESİNDE TÜKETİLEN SEBZE VE MEYVELERİN C VİTAMİNİ YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

Nedime DÜRÜST, Yaşar DÜRÜS, Doğan SÜMENGİN..... 403

IDENTIFICATION OF UV-IRRADIATED FOODSTUFFS BY ESR

UV-IŞINLARI İLE İŞINLANMIŞ GIDALARIN ESR İLE TANINMASI

Semlha ÇAKIR..... 407

EFFECT OF HARVESTING TIME ON SOME CONSTITUENTS OF TOMATOES

HASAT ZAMANININ DOMATESLERİN BAZI BİLEŞENLERİNE ETKİSİ

Hacı ORAK..... 413



MARMARA
ÜNİVERSİTESİ

ORGANİK C, F VE FOSFOR YERİ VE SİNTEZİNİN
OLARAK HİZMETİ

HAZIRLAYAN: Doç. Dr. Mustafa GÜLVERİN, Ahmet MARIŞ,
Yazar: SÜTHERLAND, JOHN RICHARD

Yayıncı: Marmara Üniversitesi Yayınevi, Etiler, Beşiktaş, İstanbul, Türkiye

A NEW AND REFINED EDITION OF ORGANIC C, F AND P

SÖZLEŞME

A new and refined edition of Organic Chemistry of Carbon, Fluorine and Phosphorus has been prepared. The text is written in a clear and concise style and is suitable for use as a text book in the schools and colleges. The book is divided into three parts: Part I deals with Carbon, C, F and P; Part II deals with the organic chemistry of Carbon, C, F and P; Part III deals with the organic chemistry of Carbon, C, F and P. The book is written in a clear and concise style and is suitable for use as a text book in the schools and colleges.

YAZAR

ORGANİK KİMYA
ORGANIC CHEMISTRY

MARMARA

ÜNİVERSİTESİ

The book is written in a clear and concise style and is suitable for use as a text book in the schools and colleges. The book is divided into three parts: Part I deals with Carbon, C, F and P; Part II deals with the organic chemistry of Carbon, C, F and P; Part III deals with the organic chemistry of Carbon, C, F and P. The book is written in a clear and concise style and is suitable for use as a text book in the schools and colleges.

İSTANBUL, TÜRKİYE

Yayıncı: Marmara Üniversitesi Yayınevi, Etiler, Beşiktaş, İstanbul, Türkiye

Yayıncı: Marmara Üniversitesi Yayınevi, Etiler, Beşiktaş, İstanbul, Türkiye



AYMİN 7883
ORGANİK KİMYA
ORGANIC CHEMISTRY

MARMARA
ÜNİVERSİTESİ

CONDURİTOL C, E VE F'İNİN YENİ VE STEREOSPEŞİFİK OLARAK SENTEZİ

Hasan SEÇEN ,Serdar GÜLTEKİN, Ahmet MARAŞ,
Yaşar SÜTBELAZ, Metin BALCI

Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 25240-Erzurum-Türkiye

A NEW AND STEREOSPECIFIC SYNTHESIS OF CONDURİTOL-C, E AND F

SUMMARY

A new and stereospecific synthesis for Conduritol-C 8 and Conduritol-E 13a has been developed starting from p-benzoquinone 1. 1,4-oxygen functionalities were introduced in both synthesis by the reduction of dibromo p-benzoquinone 2 with NaBH₄. 2,3-oxygen functionalities were introduced by KMnO₄ oxidation of 4 for Conduritol C 8. Oxidation of 3 with m-chloroperbenzoic acid gave 9. Acid-catalyzed ring opening reaction of 9 gave 10a which leads to Conduritol-E. For conduritol-F was used 1,4-cyclohexadiene 14 where hydroxy groups have been introduced by classical KMnO₄ oxydation followed by photo-oxygenation and by reductive extrusion of one oxygen atom with P(OEt)₃ provides 18. Acid-catalyzed ring-opening reaction of 18 gave the conduritol-F 19a.

ÖZET

p-Benzokinin'dan çıkılarak conduritol-C 8 , conduritol-E 13a için yeni ve stereospesifik bir sentez yöntemi geliştirildi. Conduritol-C 8 ve Conduritol-E 13a için 1,4-oksijen fonksiyonel grupları dibromo p-benzokininun NaBH₄ ile indirgenmesi suretiyle yerleştirildi. Conduritol-C için 2,3-fonksiyonel grupları KMnO₄ oksidasyonu ile gerçekleştirildi. 3 bileşiğinin m-kloroperbenzoik asit ile oksidasyonu 9'u ; bunun da asit katalize halka açılması conduritol-E'ye giden 10a bileşiğini oluşturdu. Conduritol F için 1,4-sikloheksadien'den çıkılarak klasik KMnO₄ oksidasyonu ile hidroksil gruplarının yerleştirilmesini takiben fotooksijenasyon ve P(OEt)₃ ile oksijenlerden birinin redüktif olarak eliminasyonundan 18 elde edildi. 18'in asit katalize halka açılma reaksiyonu beklenen conduritol-F'yi 19a verdi.

GİRİŞ

Conduritoller (1) 1,2,3,4-sikloheksen tetrol izomerleri olup glikosidaz enzimleri için ilginç inhibitörlerdir (2). Pekçok conduritol türevinin antibiyotik, antilösemik büyüme düzenleyici aktiveye sahip olduğu bulunmuştur (1,3). Teorik olarak altı conduritol diastereoizomeri mümkündür. Şu ana kadar bu izomerlerden yalnızca ikisinin conduritol-A (4) ve conduritol-F (5) tabiatda mevcut olduğu tespit edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda conduritollerin karbohidratlardan, sübstitüe benzenlerin mikrobiyal oksidasyonlarından ve çiral inositollerin deoksijenasyonundan sentezlenebileceği gösterilmiştir(1,6). Bu çalışmada biz conduritol-C 8, conduritol-E 13a ve conduritol-F 19a için yeni bir sentez yöntemi sunmaktayız.

DENEL BÖLÜM

[1α,2β,3α,4β]-1,4-diasetoksi-2,3-dibromo-5-sikloheksen 4.

3'ün(22.5 mmol) 10 ml piridin içindeki çözeltisine asetik anhidrit (103 mmol) ilave edildi. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığında 8 saat karıştırıldı ve 0

0°C'ya soğutulup 60 ml 4N HCl çözeltisi içine döküldü. Organik faz eterle ekstrakte edilip suyla yıkandı. kurutuldu (MgSO₄). Çözücünün uçurulması ile 4 elde edildi. (verim %76, e.n.91-92 °C, kristallendirme çözücüsü:kloroform/hekzan).

(1α,2β,3α,4β,5β,6β)-1,2-dibromo-3,4,5,6-tetraasetoksi sikloheksan 6 -5 °C'de 4'ün (16 g, 45 mmol) 500 ml etanol içindeki çözeltisine KMnO₄ (7.10 g,45mmol) ve MgSO₄ (5.4 g, 45 mmol) 'ın 200 ml sudaki çözeltisi 5saat içinde ilave edildi. İlavenin tamamlanmasından sonra aynı sıcaklıkta 15 saat ek karıştırma yapıp katı artıklar süzüldü ve sıcak suyla yıkandı. Çözelti 50 ml'ye konsantrte edilip organik faz etil asetat ile ekstrakte edildi, Na₂SO₄ üzerinden kurutuldu.Çözücü evaporate edilip kloroform/hekzandan yeniden kristallendirmek suretiyle saf 5 elde edildi. 4'ün asetilizasyonundaki metod 5'e uygulanarak 6 elde edildi (verim %51, e.n. 140-141°C).

(1α,2β,3β,4β)-1,2,3,4-tetraasetoksi-5-sikloheksen 7 [Conduritol-C tetraasetat]. 6'nin (5g,10.5 mmol) 10 ml DMSO içindeki çözeltisine Zn tozu (2 g30 mmol) ve 50 mg iyot ilave edildi. Manyetikolarak 95 °C'de 12 saat karıştırılan çözelti oda sıcaklığına soğutulup 50 ml su içine döküldü. Sulu faz eterle ekstrakte edildi, Na₂SO₄ üzerinden kurutuldu. Çözücünün evaporate edilmesiyle conduritol-C tetraasetat 7 elde edildi,ürün kloroform/hekzan'dan kristallendirildi.(Verim,% 61, e.n. 90-91°C)

(1α,2β,3β,4β)-1,2,3,4-tetrahidroksi-5-sikloheksen 8[Conduritol-C]. 500 mg (1.59 mmol) Conduritol-C tetraasetat 7 20 ml mutlak metanolde çözülüp çözelti NH₃ gazıyla doyuruldu ve 24 saat oda sıcaklığında karıştırıldı.Metanol ve asetamid'in evaporate edilmesiyle geride kalan Conduritol C 8 mutlak etanolden kristallendirildi (Verim % 80, e.n, 151-152°C).

(1α,5α,6β,10β,11α,12β)-2,4,7,9-tetra oksa -3,3,8,8-tetrametil- 11,12- dibromo-trisiklo [8.2.0^{1.5.0}6.10] dodekan 11.Epoksit 9 (1g, 3.47mmol) 10 ml 0.5 N H₂SO₄ çözeltisi içinde çözüldü ve 90 °C'de 6 saat geri soğutucu altında kaynatıldı. Oda sıcaklığına soğutulup BaCO₃ ile nötralize edildi. Katı artıkların filtrasyonundan sonra çözücünün düşük basınç altında uzaklaştırılması 10 a'yı verdi (%61). 10 a' nın (500 mg, 1.63 mmol) 250 ml mutlak benzendeki çözeltisine 2,2-dimetoksi propan (430 mg,4.13 mmol) ve 20 mg p-toluen sülfonik asit ilave edildi. Çözelti 3 saat geri soğutucu altında kaynatılıp benzenin uçurulması ve etil asetat/hekzan'dan yeniden kristallendirmek suretiyle 11 elde edildi (%88, e.n.162-163°C)

(1α,2β,3α,4α,5β,6β)-1,2dibromo-3,4,5,6-tetraasetoksi-sikloheksan 10b 4'ün sentezindeki metod uygulanarak 10 a'nın asetillendirilmesiyle 10 b elde edildi (verim %76, e.n. 140-141°C).

(1α,5α,6β,10β)-2,4,7,9-tetraoksa-3,3,8,8-tetrametil-trisiklo [8.2.0^{1.5.0}6.10]-11-dodeken 12. 7'nin sentezindeki metod uygulanarak 11'in debrominasyonu ile 12 elde edildi (verim %74, e.n.53-54°C).

(1α,2α,3β,4β)-1,2,3,4-tetrahidroksi-5-sikloheksen 13a [Conduritol-E]. 12 (200 mg , 0.88 mmol) 5 ml 0.5 N H₂SO₄ içinde çözüldü, oluşan çözelti oda

sıcaklığında 3 saat karıştırılıp asit $BaCO_3$ ile nötralize edildi. Katı artıkların filtrasyonundan sonra çözücünün evaporate edilmesiyle Conduritol-E 13a elde edildi (verim % 77, e.n.176-177 °C, kristallendirme çözücüsü: MeOH/Hekzan).

3,8,10-Triksa-9,9-dimetil-trisiklo(5.3.0^{1.7.0}2.4)-5-deken 18.

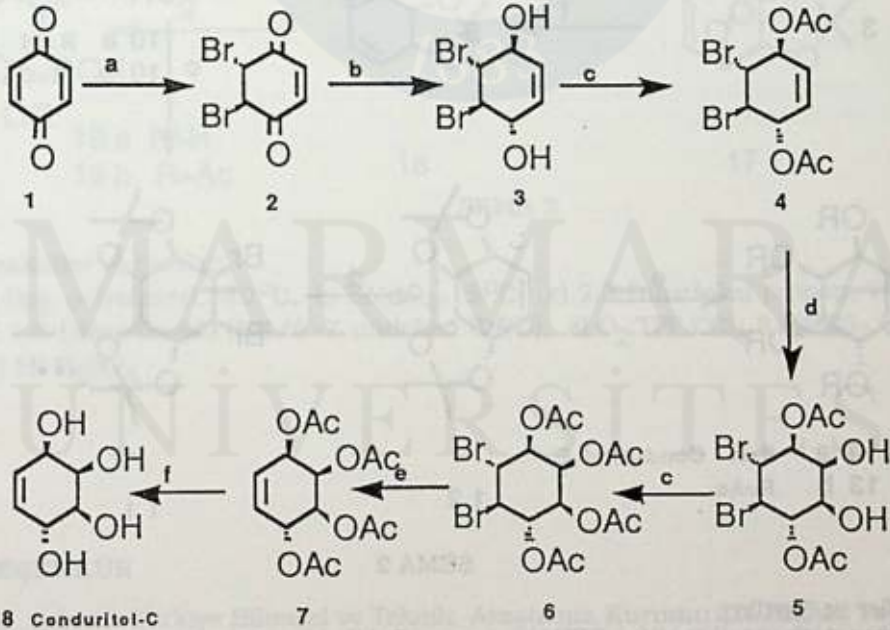
Endoperoksit 17. (450 mg, 2.44 mmol) 50 ml kloroformda çözüldü.

0 °C'de manyetik olarak karıştırılan çözeltiliye basınç dengeli bir damlatma hunisinden 400 mg (2.44 mmol) P (OEt)₃'ün 5 ml kloroformdaki çözeltisi 1 saat içinde ilave edildi. Aynı sıcaklıkta 1 saat, oda sıcaklığında da 1 saat karıştırmadan sonra çözücü uzaklaştırılıp ham ürün nötral Al_2O_3 (25 g) kolondan 9.5/0.5 hekzan etil asetat karışımıyla elue edilerek saf 18 elde edildi (sıvı ürün, verim %50).

(1 α ,2 α ,3 β ,4 α)-1,2,3,4-tetrahidroksi-5-siklohekzen 19a (Conduritol F _____). Conduritol E'nin sentezindeki yöntem uygulanarak 18'in asidik ortamdaki hidrolizinden Conduritol F 19a elde edildi (verim% 86, e.n.106-108 °C, kristallendirme çözücüsü : metanol/pentan).

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Conduritol-C sentezimizde p-benzokininon çıkış maddesi olarak kullanıldı ve ilk olarak p-benzokininonun brominasyonunu takiben karbonil gruplarının



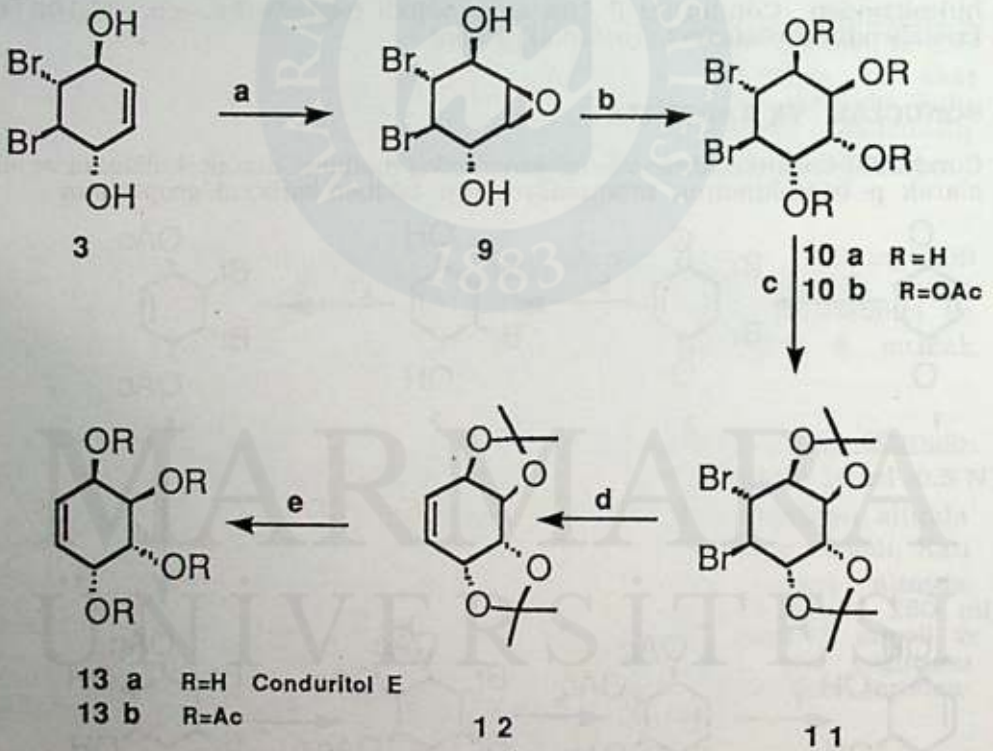
ŞEMA 1

Reaktifler ve Şartlar:

a) Br_2 , CCl_4 , 0 °C, 2 saat b) $NaBH_4$, su, eter, 0 °C c) Asetik anhidrit, piridin, oda sıcaklığı, 12 saat d) $KMnO_4$, -15 °C, 20 saat e) Zn, DMSO, 95 °C, 12 saat f) NH_3 , MeOH, oda sıcaklığı, 24 saat

İndirgenmesiyle konfigürasyonu belirli bir ürün olan 3 elde edildi (7). Alkol gruplarının asetata çevrilerek korunmasını müteakip çift bağın $KMnO_4$ ile oksidasyonu ile tek bir izomer olarak 5 elde edildi. 5'teki hidroksil grupları asetillendirilerek 6 elde edildi. 6'daki brom fonksiyonel gruplarının Zn ile elimine edilmesiyle 7, bunun da ammonolizi ile Conduritol C 8 elde edildi (şema 1).

onduritol-E sentezimizde başlangıç maddesi olarak yine p-benzokinin 1 kullanılmıştır. 3'ün m-kloro perbenzoik asit ile oksidasyonu tek ürün olarak epoksit bileşiği 9'u vermiştir. Bu bileşikteki epoksit halkasının açılmasıyla iki ürün beklenirken tek ürün olarak conduritol-E yapısını ihtiva eden 10a elde edilmiştir. Ürün tetraasetatına çevrilerek spektroskopik yöntemlerle yapısı aydınlatılmıştır. 10 a'nın ketalizasyonu ile 11, bunun da çinko ile debrominasyonu ile 12; 12'nin hidrolizi ile de Conduritol-E 13 a elde edilmiştir. Conduritol-E 13a, asetatına 13b çevrilerek karakterize edilmiştir (şema 2).



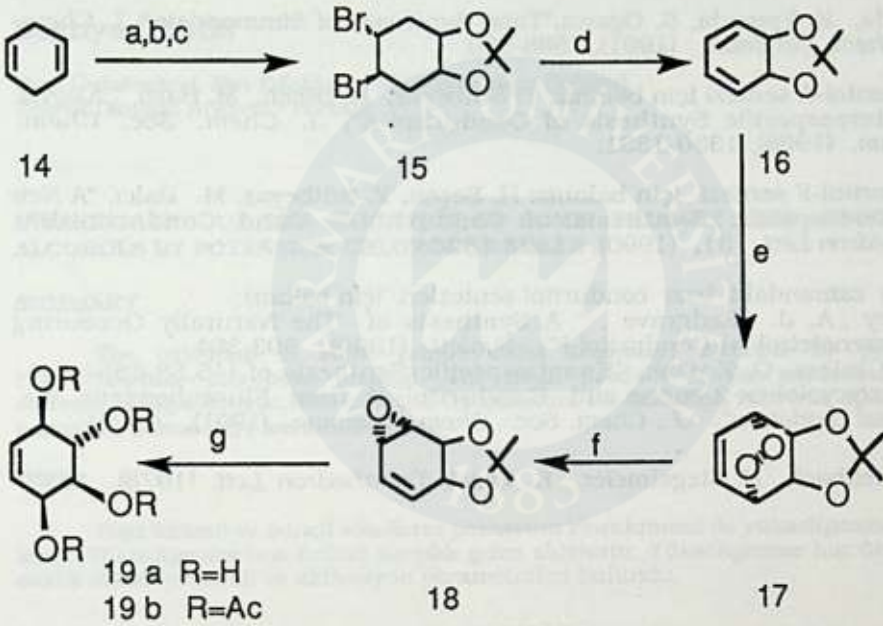
ŞEMA 2

Reaktifler ve Şartlar:

a) 3-Kloro perbenzoik asit(m-CPBA), eter, reflüks, 12 saat b) 0.5 N H_2SO_4 , reflüks, 4 saat c) 2,2- dimetoksipropan, p-toluensulfonik asit, benzen, 3 saat d) Zn, DMSO, 95°C, 12 saat, e) 0.5 N H_2SO_4 , reflüks, 4 saat.

Daha önceki çalışmalarda Conduritol-F için pekçok sentetik yöntem ortaya konulmuştur (1). Biz de daha önceki çalışmalarımızda trans-benzen diasetat ve

oksepin' den çıkararak stereospesifik olarak conduritol-F'nin sentezlenebileceğini gösterdik (5). Bu çalışmamızda da cis-benzendiol'ün bir türevi olan 16'nın conduritol -F'ye dönüşebileceğini gösterdik. 16'nın fotooksisjenasyonundan (4) elde edilen 17 trietoksi fosfit ile muamele edildiğinde yine stereokimyası belirli bir ürün olan 18'in oluştuğu görüldü.18'in asidik ortamda hidrolizli ile de tek ürün olarak conduritol F 19a elde edildi.



ŞEMA 3

Reaktifler ve Şartlar:

- a) Br₂, petrol eteri, -40°C, b) KMnO₄, -5°C, c) 2,2-Dimetoksi propan, TosOH,
d) 1,8-Diaza bisiklo (5.4.0) -7-undeken (DBU), e) O₂, TPP, CCl₄ f) P(OEt)₃, CHCl₃
g) 1N H₂SO₄

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Türkiye Bilimsel ve Teknik Araştırma Kurumu (TÜBİTAK, Proje No: TBAG/ 1063) ve Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi tarafından desteklenmiştir. Yüksek ayrımlı NMR spektrumları Prof. Dr. Waldemar ADAM (Würzburg Üniversitesi/Almanya) tarafından alınmıştır. Teşekkürlerimizi arz ederiz

KAYNAKLAR

1. Conduritoller için daha geniş bilgi için bakınız : M. Balcı, Y. Sütbeyaz, H. Seçen, "Conduritols and Related Compounds", *Tetrahedron*, 46, (1990), 3715-3742.
2. a) M. C. McIntosh, S. M. Weinreb, "A Strategy for Synthesis of Conduritol via Stereodivergent Vinylsilane-Aldehyde cyclizations", *J. Org. Chem.* 56, (1991), 5010-5012.
3. N. Chida, K. Yamada, S. Ogawa, "Total Synthesis of Simmondsin", *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1991), 588-590.
4. Conduritol-A sentezi için bakınız: Y. Sütbeyaz, H. Seçen, M. Balcı, "A Novel and Stereospecific Synthesis of Conduritol-A", *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1988), 1330-1331.
5. Conduritol-F sentezi için bakınız: H. Seçen, Y. Sütbeyaz, M. Balcı, "A New and Stereospecific Synthesis of Conduritol-F and Conduritol-B", *Tetrahedron Lett.* 31, (1990), 1323-1326.
6. Yakın zamandaki bazı conduritol sentezleri için bakınız:
 - a) S.V Ley, A. J. Redgrave, "A Synthesis of The Naturally Occurring cyclohexenetetrol (+)-Conduritol-F", *Synlett.* (1990), 393-394.
 - b) H. A. Carless, O. Z. Oak, "Enantiospecific Synthesis of (4S,5S,6S)-4,5,6-Trihydroxycyclohex-2-enone and Conduritol C from Fluorobenzene via Microbial Oxidation", *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* (1991), 61-62.
7. H. J. Altenbach, H. Stegelmeier, E. Vogel, *Tetrahedron Lett.* (1978), 3333-3336.

BAZI BİRİNCİL VE İKİNCİL ALKOLLERİN

POTASYUM KLOKROKROMAT İLE YÜKSELTGENME

TEPKİMELERİNİN İNCELENMESİ

Beytiye ÖZGÜN

Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü,
Teknik Okullar, Ankara - Türkiye

INVESTIGATION OF THE OXIDATION OF SOME PRIMARY AND SECONDARY ALCOHOLS BY POTASSIUM CHLOROCHROMATE

SUMMARY

The oxidation of some primary and secondary alcohols by potassium chlorochromate has been studied. The main product of the oxidation is the corresponding aldehyde. The effect of temperature on oxidation rate was studied and activation parameters were evaluated.

ÖZET

Bazı birincil ve ikincil alkollerin potasyum klorokromat ile yükseltgenmesi incelendi. Yükseltgenme ana ürünü karşılık gelen aldehittir. Yükseltgenme hızı üzerine sıcaklık etkisi incelendi ve aktivasyon parametreleri bulundu.

GİRİŞ

Bazı birincil ve ikincil alkollerin çeşitli okzokrom (VI) bileşikleri kullanılarak yapılan yükseltgenme tepkimelerinin kinetik ve mekanizmasına ilişkin bazı çalışmalar yapılmıştır (1, 2).

Potasyum klorokromat kullanılarak bazı birincil ve ikincil alkollerin yükseltgenme tepkimesine ilişkin birkaç çalışma yapılmıştır (3, 4). Ancak yükseltgenme kinetiğine ilişkin bir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışmada bazı birincil ve ikincil alkollerin potasyum klorokromat ile yükseltgenme tepkimesi nötral ortamda incelendi. Tepkime hızı üzerine sübstütient ve sıcaklık etkisi araştırıldı. Aktivasyon parametreleri tayin edildi.

DENEL BÖLÜM

Kinetik ölçümler için yalancı I. derece tepkime koşulları sağlandı. Bu amaçla alkol derişimi KCC derişiminin 10 katı olarak alındı. Çözücü olarak dimetil sülfoksit (DMSO) kullanıldı. Kullanılan KCC çözeltisinin başlangıç derişimi, Co, ve tepkime sonunda harcanmadan kalan KCC derişimi, C, tyodometrik titrasyonla bulundu.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çeşitli alifatik birincil ve ikincil alkollerin KCC ile yükseltgenme tepkimesi çözücü olarak dimetil sülfoksit kullanılmasıyla incelendi. Nötral koşullarda KCC'in kullanılan çözücünde homojen bir karışım oluşturduğu ve çözücü ile bir tepkime vermediği görüldü. Yükseltgenme tepkimesi alkol derişiminin KCC derişimine göre 10 kat fazla olduğu yalancı birinci derece tepkime koşullarında yapıldı. Hız sabitlerinin bulunması için t'ye karşı log Co/C grafiğe alındı. Elde edilen doğrunun eğiminden hız sabiti bulundu. Sonuçlar Çizelge 1 ve 2'de görülmektedir.

Çizelge 1 : Birincil alkollerin (R CH₂ OH) Potasyum klorokromat ile yükseltgenme tepkimesi hız sabitleri

$$[\text{Alkol}] = 0,10 \text{ mol dm}^{-3}, [\text{KCC}] = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$$

Sübstütient (R)	$\times 10^6 k \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$			
	298	303	308	313K
H	5,4	5,8	6,1	7,6
Et (C ₂ H ₅ -)	6,4	7,1	7,3	8,4
n-Pr (CH ₃ CH ₂ CH ₂ -)	7,2	7,9	8,1	9,0
n-Bu (CH ₃ CH ₂ CH ₂ CH ₂ -)	7,8	8,1	9,0	9,3
İzo-Bu [(CH ₃) ₃ CH-CH ₂ -]	8,5	9,2	9,3	9,7

Çizelge 2. İkincil Alkollerin Potasyum Klorokromat İle Yükseltgenme Tepkimesi Hız Sabitleri

$$[\text{Alkol}] = 0,10 \text{ mol dm}^{-3}; [\text{KCC}] = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$$

Alkol	$\times 10^6 k \text{ mol}^{-1} \text{ s}^{-1}$			
	298	303	308	313 K
İzo-propil alkol	11,0	12,0	13,0	14,0
2-Bütanol	8,3	9,8	10,2	11,3
2-Pentanol	7,3	7,9	9,1	10,1
Sikloheksanol	16,3	17,2	20,0	22,5

Çizelge 1 ve 2'de görüldüğü gibi sıcaklık arttıkça hız sabiti de artmaktadır. RCH₂ OH alkolünde R büyüdükçe hız sabitlerinde de artma görülmektedir.

Kullanılan alkollerin KCC ile yükseltgenme tepkimeleri üzerine sıcaklığın etkisini incelemek ve aktivasyon parametrelerini bulmak amacı ile 298 K, 303 K, 313 K ve 308 K'da çalışıldı.

Standart yöntemle hesaplanan aktivasyon parametreleri Çizelge 3 ve 4'de görülmektedir.

Çizelge 3 : Birincil Alkollerin (R CH₂ OH) Potasyum klorokromat ile Yükseltgenme Tepkimesi Aktivasyon Parametreleri.

$$[\text{Alkol}] = 0,10 \text{ mol dm}^{-3}; [\text{KCC}] = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$$

Sübstütient (R)	E _a Jmol ⁻¹ k ⁻¹	ΔH* kJmol ⁻¹	ΔS* Jmol ⁻¹ K ⁻¹	ΔG* kJmol ⁻¹
H	17,15	14,70	345,74	103,0
Et	12,24	9,76	295,06	102,6
n-Pr	11,18	8,71	314,07	102,3
n-Bu	10,06	7,58	317,26	102,1
İzo-Bu	6,90	4,42	327,11	101,9

Çizelge 4 : İkincil Alkollerin Potasyum klorokromat ile Yükseltgenme Tepkimesi Aktivasyon Parametreleri:

$$[\text{Alkol}] = 0,10 \text{ mol dm}^{-3}; [\text{KCC}] = 0,01 \text{ mol dm}^{-3}$$

Alkol	E _a Jmol ⁻¹ k ⁻¹	ΔH* kJmol ⁻¹	ΔS* Jmol ⁻¹ K ⁻¹	ΔG* kJmol ⁻¹
İzopropil alkol	12,6	10,1	305,6	101,2
2- Bütanol	14,6	12,1	301,4	101,9
2- Pentanol	18,3	15,8	244,9	102,3
Sikloheksanol	17,6	15,1	285,9	100,3

Aktivasyon serbest enerji değerlerinin birbirine yakın ve hemen hemen sabit olması tüm alkollerde aynı yükseltgenme mekanizmasının geçerli olabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. E.J. Corey and W.J. Suggs, "Pyridinium chlorochromate. An efficient reagent for oxidation of primary and secondary alcohols to carbonyl compounds" **Tetrahedron Letters**, 31 (1975) 2647 - 2650.
2. K.K. Banerji, "Kinetics and mechanism of the oxidation of alcohols by pyridinium chlorochromate" **Bulletin of The Chemical Society Of Japan**, 51 (9) (1978). 2732 - 2734.
3. P.H.J. Carlsen and J.E. Brænden, "Oxidation of alcohols with potassium chlorochromate" **Acta Chem. Scand. Ser.**, 1341 (5), (1987) 313 - 317.
4. P. H.J. Carlsen, M. Husbyn, M. J.E Brænden and R. Eliason. "Potassium chlorochromate on a solid support: A convenient and mild reagent for the oxidation of alcohols" **Acta Chem. Scand.** 43 (5), (1989) 485 - 488.

Standard deviation of the distribution of the number of successes in n trials is \sqrt{npq} . The probability of having k successes in n trials is given by the binomial distribution formula:

$$P(X = k) = \binom{n}{k} p^k q^{n-k}$$

where $\binom{n}{k} = \frac{n!}{k!(n-k)!}$ is the binomial coefficient.

k	P(X = k)
0	0.0000
1	0.0000
2	0.0000
3	0.0000
4	0.0000
5	0.0000
6	0.0000
7	0.0000
8	0.0000
9	0.0000
10	0.0000

MARMARA
ÜNİVERSİTESİ

1. The probability of having k successes in n trials is given by the binomial distribution formula:

$$P(X = k) = \binom{n}{k} p^k q^{n-k}$$

2. The probability of having k successes in n trials is given by the binomial distribution formula:

$$P(X = k) = \binom{n}{k} p^k q^{n-k}$$

3. The probability of having k successes in n trials is given by the binomial distribution formula:

$$P(X = k) = \binom{n}{k} p^k q^{n-k}$$

4. The probability of having k successes in n trials is given by the binomial distribution formula:

$$P(X = k) = \binom{n}{k} p^k q^{n-k}$$

5. The probability of having k successes in n trials is given by the binomial distribution formula:

$$P(X = k) = \binom{n}{k} p^k q^{n-k}$$

6. The probability of having k successes in n trials is given by the binomial distribution formula:

$$P(X = k) = \binom{n}{k} p^k q^{n-k}$$

7. The probability of having k successes in n trials is given by the binomial distribution formula:

$$P(X = k) = \binom{n}{k} p^k q^{n-k}$$

8. The probability of having k successes in n trials is given by the binomial distribution formula:

$$P(X = k) = \binom{n}{k} p^k q^{n-k}$$

9. The probability of having k successes in n trials is given by the binomial distribution formula:

$$P(X = k) = \binom{n}{k} p^k q^{n-k}$$

10. The probability of having k successes in n trials is given by the binomial distribution formula:

$$P(X = k) = \binom{n}{k} p^k q^{n-k}$$

BAZI SUSUZ METAL (II) SÜLFAT KATALİZÖRLERİ İLE ALKOLLERİN DEHİDRASYON REAKSIYONLARININ İNCELENMESİ

Hayrettin BEYNEK ve Ülkü OYMAN

Trakya Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Edirne - Türkiye

DEHYDRATION REACTIONS OF SOME ALCOHOLS BY USING METAL (II) SULFATES AS CATALYSTS

SUMMARY

This research carried out since, the information is very limited about the utility of metal (II) sulfates as catalysts in the dehydration reactions and this method were utilized very seldomly. In this study dehydration reactions of primary, secondary, tertiary and cyclic alcohols containing six carbon were investigated by using $\text{CoSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CuSO_4 and NiSO_4 as heterogenous catalysts. In our experiment alcohols and catalysts were heated for 4-24 hours at 110-150 °C under atmospheric pressure. No product were obtained by reactions done with primary alcohols. Alkenes from other alcohols, were obtained with 25 % to 90 % efficiency. Reactions were realized stereoselectively and only cis-alkenes were product. Small amount of ketones was obtained as by products because of the dehydrogenation reaction. According to result of these experiments it was concluded that $\text{CoSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CuSO_4 and NiSO_4 can be used especially as stereoselective catalysts for dehydration of 3-hexanol, 3-methyl-3-pentanol and cyclohexanol.

ÖZET

Bu araştırmanın yapılması, dehidrasyon reaksiyonlarında, metal (II) sülfatların katalizör olarak kullanılması hakkındaki bilgilerin sınırlı olması ve bu yöntemin çok az kullanılmış olması göz önüne alınarak düşünülmüştür. Bu çalışmada heterojen katalizör olarak $\text{CoSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, CuSO_4 ve NiSO_4 kullanılarak 6 karbonlu primer, sekonder, tersiyer ve halka yapılı alkollerin dehidrasyon reaksiyonları incelenmiştir. Denemelerde, alkoller ve katalizörler, atmosfer basıncında, 110-150 °C arasında ve 4-24 saat sürelerde ısıtılmıştır. Primer alkol ile yapılan reaksiyonlarda herhangi bir ürün oluşmamıştır. Diğer alkollerle yapılan reaksiyonlarda % 25 - % 90 arası verimle alken elde edilmiştir. Reaksiyonlar stereoselektif olarak gerçekleşmiş ve sadece cis-alken oluşmuştur. Reaksiyonlarda çok az miktarda, dehidrojenasyon ürünü olarak, keton oluşmuştur. Denemelerden, kullanılan metal (II) sülfatların, 3-heksanol, 3-metil-3-pentanol ve sikloheksanolün dehidrasyon reaksiyonlarında, özellikle stereoselektif katalizör olarak kullanılabilecekleri sonucuna varılmıştır.

GİRİŞ

Alkollerin dehidrasyon reaksiyonları, alken elde edilmesi için kullanılan genel yöntemlerden birisidir. Dehidrasyon reaksiyonları homojen

ve heterojen ortamda gerçekleştirilebilir. Homojen ortamda yapılan çalışmalarda, çeşitli alkollerin mineral asitler (H_2SO_4 , H_3PO_4 vb.), organik asitler, (sülfonik asit, oksalik asit vb.) asit anhidritleri (ftalik, anhidrit, asetik anhidrit v.b.) ve halojenli birleşikleri ($SOCl_2$, $POCl_3$ v.b.) ile verdiği reaksiyonlar incelenmiştir. (1). Heterojen fazda yapılan çalışmalarda çeşitli alkollerin özellikle alumina üzerindeki dehidrasyon reaksiyonları incelenmiştir. (2, 3, 4, 5). Oksit katalizörlerle yapılan çalışmalarda elde edilen ürünlerin, alumina katalizörü ile yapılan çalışmalarda elde edilen ürünlerle karşılaştırmaları yapılmıştır. (6). Katı katalizörler içinde en az çalışma yapılan katalizörler metal (II) sülfat katalizörleridir. (7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14). Bu çalışmada üzerinde çok az çalışma yapılan $CoSO_4 \cdot H_2O$ (12, 13, 14) ve $NiSO_4$ (12, 14) ile birlikte bilinen ve kullanılan bir katalizör olan $CuSO_4$ (8, 9, 10, 11, 12, 14) seçilerek n-hekzanol, 3-hekzanol, 3-metil-3-pentanol ve siklohekzanolün dehidrasyon reaksiyonları incelenmiştir. Bu alkollerden siklohekzanol dışındakilerle bir çalışma yapılmamıştır. Siklohekzanolle Al_2O_3 katalizörlüğünde yapılan çalışmalarda yüksek verimle siklohekzen elde edilmiştir. (3).

DENEL BÖLÜM

Deneylerde katalizör olarak $CuSO_4$, $CoSO_4 \cdot H_2O$ ve $NiSO_4$ alkol olarak n-hekzanol, 3-hekzanol, 3-metil-3-pentanol ve siklohekzanol kullanıldı. Katalizörler, $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 'ın 275 °C'ta 48 saat, $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ 'ın 280 °C'ta 18 saat $CoSO_4 \cdot 7H_2O$ 'ın 220 °C'ta 8 saat süre ile ısıtılması ile hazırlandı. Dehidrasyon işlemi 100 ml.'lik iki boyunlu bir balonda, alkol ve katalizörün manyetik bir karıştırıcı üzerinde karıştırılıp ısıtılması ile gerçekleştirildi. Tersiyer alkol 4 saat diğer alkoller 24 saat sürelerle ısıtılıp karıştırıldılar. Oluşan ürün su toplama kabında toplandı ve ekstrakte edildi. Ürünün gaz kromatogramı alındı, daha sonra damıtılarak saflaştırıldı. Saf ürünlerin IR ve NMR'ları alınarak ürünler tanımlandı. Sonuçlar Tablo-I ve Tablo-II'de verilmiştir.

Tablo - I : Oluşan ürünlerin tanımlanması.

Alkol	Alken	IR (KBr)cm ⁻¹	NMR (200MHz CDCl ₃) ppm
3-Heksanol	Cis-2-Heksen	2850 - 3050, 1640 - 1660, 1420-1480, 1080,860, 670-710	0,9 (m) , 1,3 (m) 1,6 (m) , 2 (m), 5,4 (m)
3-metil-3-pentanol	Cis-3-metil 2-peton	2850-3000, 2720,1670, 1300,1200, 1110,1070, 1040, 790-830	0,9(m), 1,6(t) 2(m), 5,2(t)
Siklohekzanol	Siklohekseen	2810-2990, 2650,1650, 1600, 1420-1460, 1260, 1140, 1040, 1010, 880, 810	1,6(t), 2(d), 5,6 (t)

Tblo - II : Oluşan ürünlerin % verimleri.

Katalizör	% Cis-2-Heksen	% Cis-3-metil -2-penten	% Sikloheksen
CuSO ₄	91.2	80.4	82
CoSO ₄ . HO	26.2	83.3	67.2
NiSO ₄	54	59.5	89.7

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada CoSO₄ . H₂O . CuSO₄ ve NiSO₄ ile yapılan dehidrasyon reaksiyonlarında oluşan ürünler stereoselektif olarak gerçekleşmiştir. Stereoselektif reaksiyonlara en fazla alumina ile gaz fazında yapılan çalışmalarda rastlanmaktadır. (3). Alkollerden katı katalizörler ile yapılan dehidrasyon reaksiyonlarının nasıl yürüdüğü kesin olarak açıklanamamıştır. Bazı çalışmalar birbirini tamamlar şekilde gerçekleşirken, bazıları tamamen ters bir şekilde gerçekleşmiştir. (3, 4). Bu reaksiyonlar için ileri sürülen teorilere göre (3), reaksiyonlar katalizörün gözenekleri içinde oluşmaktadır. Bu sırada alkolün OH ve H'i katalizör yüzeyine bağlanarak ayrılmakta ve aynı zamanda alken oluşmaktadır. Çalışma Şartlarına göre reaksiyonlar anti ve syn-eliminasyonu şeklinde gerçekleşebilir. Anti-eliminasyona göre oluşan reaksiyonlarda OH'in ayrılmasından sonra, protonun ayrılabilmesi için π-kompleksine benzer karakterde bir hal oluşmaktadır. Katalizörün yüzeyinin artırılması ile reaksiyon hızının artması bu teorileri desteklemektedir.(4, 14). Bu çalışmada elde edilen alkenlerin cis-miktarının fazla olması ileri sürülen teorilerle uygunluk göstermektedir. Alkol molekülünün katalizöre yaklaşımı ve yapmış olduğu bağ, oluşan alkenin yapısı üzerinde önemli rol oynamaktadır. Metil gruplarının sterik etkilerinden dolayı OH ve H'in katalizör yüzeyi ile yapmış olduğu bağ cis-ürün lehinde gerçekleşmiştir. n-Heksanol için kullanılan katalizörler bu şartlarda yetersiz kalmışlar ve bir ürün oluşmamıştır. Diğer alkollerin dehidrasyon işlemlerinde, bu metal (II) sülfatların rahatlıkla katalizör olarak kullanılabileceği görülmüştür. Metal (II) sülfatlarla yapılan dehidrasyon reaksiyonlarının daha kesin bir sonuca ulaşması için, daha fazla sayıda alkol ile kinetik ve mekanizmal çalışmalar yapılması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. D.V. Banthorpe, "Elimination Reactions" Elsevier Publishing Company Vol. 2, Amsterdam (1962) 156-166.
2. H. Pines and C.N. Pillai, "Dehydration of Alcohols Over Alumina Modified By Amonia", J. Am. Chem. Soc. 82 (1960) 2401.
3. H. Pines and C.N. Pillai, "Mechanism of Dehydration of Aliphatic

- Alcohols and The Formation of Cyclopropanes During Dehydrations" J. Am. Chem. Soc. 83 (1961) 3274 - 3279.
4. H. Pines and J. Herling, "Dehydration of 3-Phenylpropanol, 1-Phenyl-2-Propanol Over Aluminas And In The Presence of 33 % Sulfuric Acid, J. Org. Chem. 31, 12 (1966) 4088-92.
 5. H. Pines and E.J.Blanc, "Mechanism of Cis- And Trans- 2-Alkyl, 2-Phenyl, 3-t-Butylcyclohexanols Over Alumina Catalyst". J. Org. Chem. 33, 5, (1968) 2035-43.
 6. A. Lundeen and W.R. Van Hoozer, J. Chem. Edu. 32 (1967) 3386-89.
 7. A. Mayer and M.C.R. Tout, Hebd, Seances Acad. Sci. 32 (1933) 1231.
 8. M.V. Schlatter, "Use of The Tertiary Butyl Group As A Blocking Group In The Synthesis of 1, 2, 3 Tri Alkylbenzenes" J. Am. Chem. Soc. 76 (1954) 4952.
 9. P. Bautista and M. Hunger, "Dehydratisierung von gas förmigem [2-D]-2-Butanol And CaSO₄" Angew. Chem. 80, 4, (1968) 150.
 10. G.W. Francis and J.F.Berg, "Copper(II) sulfati Dehydration of Alcohols" Acta. Chem. Scand. B. 31, 8, (1977), 721.
 11. R.V. Hofmann and R.D. Bishop, "Anhydrous Capper(II) Sulfate And Efficient Catalyst For The Liquid Phase Dehydration of Alcohols" J.Org. Chem. 45 (1980) 917.
 12. R. Özkan, "Susuz Metal Sulfat Katalizörleri Kullanılarak Bazı Alkollerden Sıvı Fazda Su Çıkarılması" Diss. Thesis A. Ü. Fen Fak. (1982).
 13. Ü. Oyman, "Dehydration of Some 1-(2-Furyl) and 1-(2-Thienyl) 1-Alkanols Using By CoSO₄ As Catalyst, Rew. Roum. Chem. 35, 1, (1990) 63-66.
 14. T. Nishiquchi and C. Kamio, J. Chem. Soc. Perkin Trans 1,4 (1989) 707-710.

BENZOBİSİKLO[3.2.1]OKTAN SİSTEMLERİNDE ALLEN VE ALKİN SENTEZİ VE OLUŞUM MEKANİZMALARININ ARAŞTIRILMASI

Yavuz TAŞKESEN LİGİL(*) ve Metin BALCI(**)

(*) Atatürk Üniversitesi, Kâzım Karabekir Eğitim Fakültesi, Kimya Eğitimi Anabilim Dalı, Erzurum-Türkiye

(**) Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Erzurum-Türkiye

THE SYNTHESIS OF ALLENE AND ALKYNE IN BENZOBICYCLO[3.2.1] OCTANE SYSTEMS AND INVESTIGATION OF THEIR FORMATION MECHANISM

SUMMARY

An independent synthetic way leading to alkyne **3** has been developed to reveal the real structure of the intermediate (alkyne **3** or allene **2**) formed by dehydrobromination of vinylbromide **1**. For this reason, 2-dibromomethylenebenzenorbornene **8** was synthesized and converted to 2-bromo derivative **6** by t-BuLi at low temperature. Dehydrobromination of **6** by t-BuOK yielded benzobicycloalkyne **3** as a highly reactive intermediate which was trapped by 1,3-diphenylbenzofuran (DBI) to give two rearranged cycloadducts (**12,13**) after column chromatography. Structural assignments of these rearranged cycloadducts were made on the basis of spectral data and X-ray crystal analyses. When dehydrobromination of **6** was carried out by using two equivalent t-BuOK in the presence of DBI, allenic cycloadducts were isolated. In the absence of DBI, enoether **9** was formed as the sole product in high yield. This experimental results establish the formation of the highly reactive intermediate, cycloalkyne **3** instead of the allene **2** by dehydrobromination of vinylbromide **1**. Semiempirical quantum mechanical calculations support also experimental results.

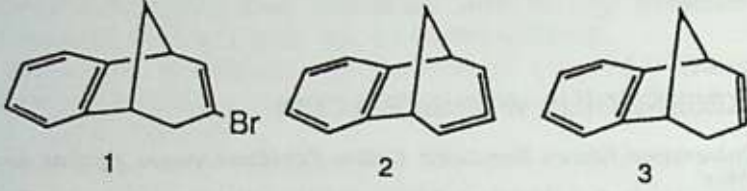
ÖZET

Vinilbromür **1**'in dehidrobrominasyonunda oluşan ara ürünün (alkin **3** veya allen **2**) yapısını ortaya çıkarmak için, gerilimli sıklık bir alkin olan **3**'ün başka bir yöntem ile sentezine çalışıldı. Bu amaçla, 2-dibromometilenbenzenorbornen bileşiği **8** sentezlendi ve düşük sıcaklıkta t-BuLi ile muamele edilerek 2-bromo türevine **6** dönüştürüldü. **6**'nın t-BuOK ile dehidrobrominasyonundan oluşan benzobisikloalkin **3**, kuvvetli bir yakalayıcı olan 1,3-difenilbenzo izofuran (DBI) ile siklo katılma ürünleri olarak yakalandı. Yakalanma ürünleri kolonda ilgili keton bileşiklerine düzenlendiğinden, alkin yakalanma ürünleri yerine iki düzenlenmiş keton (**12,13**) izole edildi. Bu iki ürünün yapısı; ¹H-, ¹³C-NMR, kütle ve X-ray analizi ile aydınlatıldı. **6**'nın dehidrobrominasyonunda (DBI varlığında) iki ekvalent t-BuOK kullanıldığında, alkin katılma ürünleri yerine allen katılma ürünleri elde edildi. Ortamda DBI yokken aynı reaksiyondan, enoeter **9** tek ürün olarak izole edildi. Bu deneysel sonuçlar, vinilbromür **1**'in dehidrobrominasyonunda ara ürün olarak benzobisikloalkin **3**'ün oluştuğunu ortaya koydu. Semi-ampirik kuantum mekanik hesaplamalar da deneysel çalışmaların destekler sonuçlar verdi.

GİRİŞ

Küçük halkalı sıklık allenler, gerilimli organik bileşiklerin önemli bir sınıfını teşkil ederler(1). Sıklık allenlerde gözlenen açı deformasyonu ve torsiyon gerilimi, bu bileşikler izole edilemeyecek kadar kararsız, reaktif birer ara ürün yapmıştır. Bu nedenle, bu gerilimli moleküllerin sentezi, izolasyonu veya yakalanması geçen 25 yılın yoğun bir çalışma alanı olmuştur. Bu çalışmaların birinde, 3-bromo-6,7-benzobisiklo[3.2.1]okta-2,6-dien'in **1** bazık dehidrobrominasyonundan oluşan ara ürün, kuvvetli bir yakalayıcı olan 1,3-difenil-

benzoiizofuran (DBI) ile [2+4] siklokatılma ürünleri halinde yakalanmış ve bu reaksiyondan, ara ürün olarak gerilimli sıklık bir allen **2** oluştuğu ileri sürülmüştür(2).



Ara ürün olarak oluştuğu ileri sürülen bu allenin **2**, diğer gerilimli sıklık allenlerin aksine dimerleşerek trisiklik hidrokarbonlar vermemesi (ortamda yakalayıcı reaktif yokken), bu reaksiyondan ara ürün olarak gerilimli bisiklik bir alkinin **3** oluştuğu fikrini düşündürmüştür. Bu nedenle bu çalışmanın amacı, sikloalkin **3**'ün başka bir yöntemle sentezi ve DBI ile yakalanması ve daha sonra yakalanma ürünlerinde baz katalizli çift bağ izomerizasyonunun incelenmesidir. Böylece vinilbromür **1**'in dehidrobrominasyonunda oluşan ara ürünün yapısına (allen **2** veya alkin **3**) açıklık getirilmesi olunacaktır.

DENEL BÖLÜM

2-Bromometilenebenzonorbornenin 6 Potasyum tert-Bütoksit (1 ekivalent) ve 1,3-Difenilbenzoiizofuran ile Reaksiyonu 1g (4,25 mmol) 2-bromometilenebenzonorbornen **6**, 50 ml lik bir balonda 20 ml kuru THF da çözüldü. Bu çözeltiye, önce 1,49 g (4,22 mmol) DBI ve sonra 0,52 g (4,64 mmol) t-BuOK (%10 aşırı) konuldu. Reaksiyon karışımı azot atmosferinde 6 saat geri soğutucu altında reflux edildi ve manyetik olarak karıştırıldı. Oda sıcaklığına kadar soğutulan karışımdan THF nin büyük bir kısmı uzaklaştırıldıktan sonra, kalıntıya bir miktar su verildi ve sulu kısım önce eterle (4x30 ml), sonrada CH₂Cl₂ ile (2x20 ml) ekstrakte edildi. Ekstraktlar ayrı ayrı su ile yıkandı ve birleştirilerek MgSO₄ üzerinden kurutuldu, süzülde ve süzüntüye bir miktar maleikanhidrit ilave edilerek, DBI nin sarı rengi kayboluncaya kadar oda sıcaklığında karıştırıldı. Çözücü vakumda uzaklaştırıldıktan sonra, ham ürün (3 g) 150 g Al₂O₃ (aktivite IV, nötral) kolonundan petrol eteri-toluen (8:2) ile elue edildi. Yaklaşık 40 fraksiyon (25'er ml lik) biriktirildikten sonra kolon CH₂Cl₂ ile yıkandı. İlk kolon çalışmasından her iki izomer (**12,13**) büyük oranda izole edildi. Karışım halinde gelen fraksiyonlardan çözücü çekilerek kalan kısım yeniden aynı şartlarda kolon kromatografisine tabi tutuldu. Her iki kolon çalışmasından kolondan geliş sırasına göre : toplam 197 mg (%11) **12** izomeri elde edildi. Bu izomer eterde kristallendirildi ve renksiz kristallerin erime noktası 237-238°C bulundu. İkinci izomer (**13**), (213 mg, %12) eter-pentan karışımından kristallendirildi ve renksiz kristallerin erime noktası 194-195°C bulundu.

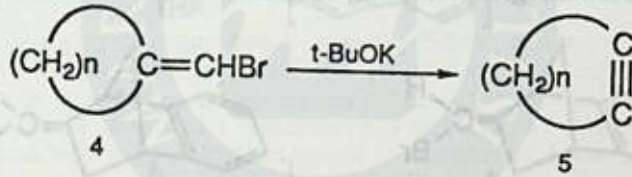
12 için ¹H-NMR Spektrumu (200 MHz, CDCl₃, TMS) δ 1.83 (dd, J=11.2 Hz, 1H), 2.18 (d, J= 11.2 Hz, 1H), 2.68(dd, J=12.8 Hz, 1H), 3.12 (dd, J=12.8 Hz, 1H), 3.30 (dd, 1H), 4.35 (d, J= 4.0 Hz, 1H), 6.49 (d, 1H), 6.60 (dd, 1H), 6.90-7.38 (m, 9H), 7.48-7.81 (m, 7H).

¹³C-NMR (50 MHz, CDCl₃), 201.09, 150.56, 146.11, 143.65, 140.69, 139.92, 138.20, 134.75, 133.37, 131.50, 130.38, 129.26, 129.22, 128.85(2x), 128.74, 127.80, 127.19, 127.12(2x), 126.91(2x), 126.75, 126.28, 126.14, 123.02, 122.09, 55.71, 44.33, 38.48, 37.12, 35.09. IR-Spektrumu (KBr, cm⁻¹) 3060, 3020, 2980, 2950, 2920, 2875, 1680, 1620, 1590, 1480, 1445, 1280, 1240, 770, 765, 755, 705, 700. MS(m/e) 424(M⁺).

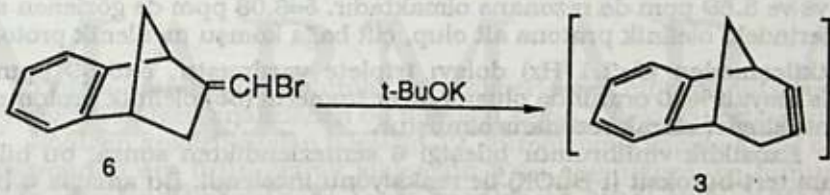
13 için $^1\text{H-NMR}$ Spektrumu (200MHz, CDCl_3 , TMS) δ 1.92(d, $J = 10.4$ Hz, 1H), 2.35 (ddt, $J = 10.4$ Hz, 1H), 2.64 (dd, $J = 15.2, 3.2$ Hz, 1H), 3.20 (dt, 15.2 Hz, 1H), 3.35 (m, 1H), 3.95 (d, $J = 4.5$ Hz, 1H), 6.61-6.96 (m, 8H), 7.06-7.36 (m, 5H), 7.48-7.43(m, 5H). $^{13}\text{C-NMR}$ (50 MHz, CDCl_3), 201.10, 145.98, 143.63, 142.89, 139.71, 138.97, 138.35, 133.50, 132.88, 130.46, 129.92, 129.22, 128.92, 128.68, 127.52, 127.30(2x), 127.19, 127.05, 126.48(2x), 126.33(2x), 126.12, 125.81, 123.87, 123.19, 55.58, 46.11, 46.07, 40.16, 38.35. IR-Spektrumu (KBr, cm^{-1}) 3060, 3020, 2980, 2940, 2865, 1675, 1620, 1595, 1490, 1475, 1445, 1280, 1240, 770, 750, 740, 700. MS (m/e) 424 (M^+).

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

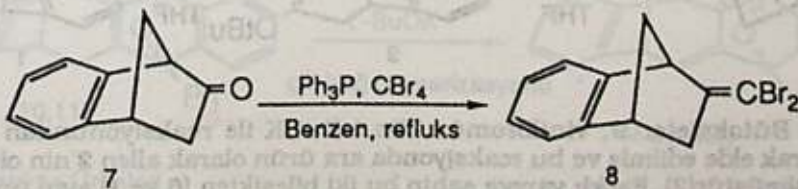
Gerilimli sıklık alkin **5** sentezinde yaygın olarak kullanılan yöntemlerden biri, bromometilensikloalkanların **4** potasyum tert-bütoksik ile olan düzenlenme reaksiyonudur(3). Bu reaksiyonda α -eliminasyonu ile önce bir alkilidene karben oluşmakta, bu karbenin düzenlenmesi ile halka genişlemiş sikloalkin **5** meydana gelmektedir.



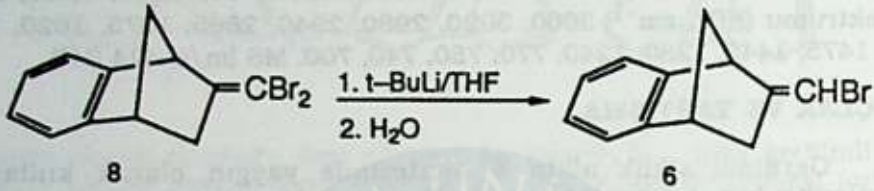
Buna göre hedeflenen benzobisikloalkin **3**'ün sentezi için 2-bromometilenebenzonorbornen bileşiğinin **6** sentezlenmesi gerekmektedir. Bu bileşik sentezlendiği takdirde potasyum tert-bütoksit ile reaksiyona sokularak arzu edilen benzobisikloalkin **3** böylece sentezlenmiş olacaktır.



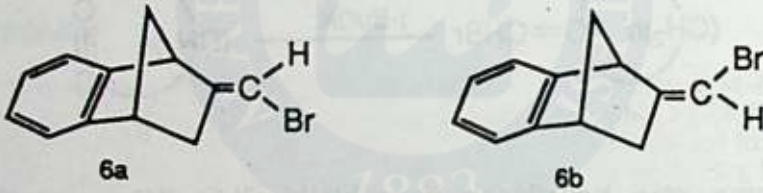
Çalışmada önce 2-benzonorbornenon **7** sentezlendi. Bu bileşik **7** literatürde belirtildiği şekilde benzonorbornadienden çıkılarak kolayca elde edildi(4,5). Sonraki kademede keton **7** CBr_4 ve trifenilfosfin ile muamele edilerek exosiklik dibrom bileşiğine **8** dönüştürüldü. Oluşan ürün **8** kromatografik yolla saflaştırıldı ve yapısı spektroskopik yöntemlerle aydınlatıldı.



Böylece 2-bromometilenebenzonorbornen **8** için gerekli ana iskelet elde edilmiş oldu. Bundan sonraki kademede brom atomlarından birinin hidrojen ile sübstitüe edilmesi gerekir. Bunun için exosiklik dibrom bileşiği **8**, -100°C 'de önce tert-butillityum, müteakiben H_2O ile muamele edildi. Gerekli kromatografik saflaştırma işlemlerinden sonra yüksek verimle (%86) arzu edilen exosiklik vinilbromür **6** elde edildi.

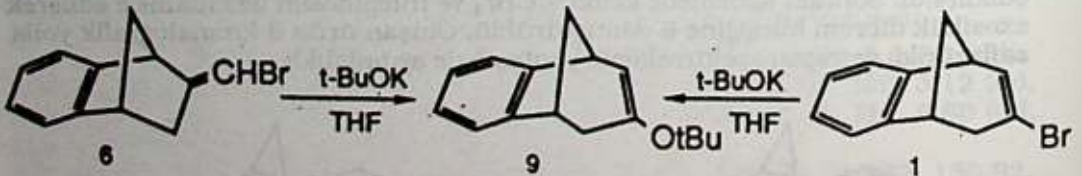


Bileşiğin **6** yapı tayini ^1H -ve ^{13}C -NMR ile yapıldı. Yapılan spektroskopik incelemelerden **6** bileşiğinin iki stereozomerden (**6a** ve **6b**) oluştuğu ve bu izomerlerden **6a**'nın %80 oranında, **6b**'nin ise %20 oranında oluştuğu spektrum integrasyonundan belirlendi.



Bu iki stereozomer kromatografik yöntemlerle birbirinden ayrılmadı. Bu nedenle, karışım halinde ^1H -ve ^{13}C -NMR spektrumları kaydedildi. Karışıma ait 250 MHz ^1H -NMR spektrumunda exosiklik çift bağ protonları olefinik bölgede $\delta=6.08$ ve 5.69 ppm de rezonans olmaktadır. $\delta=6.08$ ppm de gözlenen sinyal, **6a** izomerindeki olefinik protona ait olup, çift bağa komşu metilenik protonlarla alilik etkileşmeden ($J=2.1$ Hz) dolayı triplete yarılmıştır. $\delta=5.69$ ppm deki rezonans sinyali %20 oranında oluşan diğer izomerin (**6b**) olefinik protonuna ait olup geniş singlet olarak rezonans olmuştur.

Exosiklik vinilbromür bileşiği **6** sentezlendikten sonra, bu bileşiğin potasyum tert-bütoksit ($t\text{-BuOK}$) ile reaksiyonu incelendi. Bu amaçla **6** bileşiği THF içinde $t\text{-BuOK}$ ile muamele edildi. Kromatografik saflaştırma işlemlerinden sonra yapılan spektroskopik incelemelerden bütoksieter **9**'un tek ürün olarak %20 verimle oluştuğu görüldü.

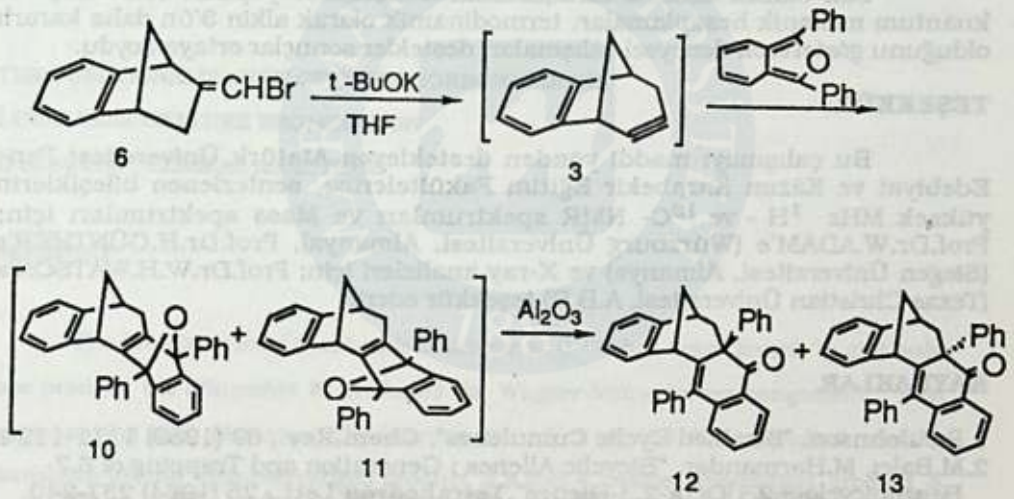


Bütoksieter **9**, vinilbromür **1**'in $t\text{-BuOK}$ ile reaksiyonundan da tek ürün olarak elde edilmiş ve bu reaksiyonda ara ürün olarak allen **2**'nin oluştuğu ileri sürülmüştür(2). Farklı yapıya sahip bu iki bileşikten (**6** ve **1**) aynı ürünün **9**

oluşması, her iki reaksiyonda da aynı ara ürünün (alkin 3) oluştuğunu ortaya koymaktadır.

İleri sürdüğümüz gibi, bu reaksiyondan gerçekten sikloalkin 3 oluşuyorsa, bu ara ürünün varlığı 1,3-difenilbenzofuran (DBI) ile yakalanarak doğrulanmış olacaktır. Bu nedenle, exosiklik vinilbromür 6 ve DBI'nın kuru THF'deki çözeltisi, bir ekvivalent t-BuOK ile reaksiyona sokuldu. Bu reaksiyondan kolon kromatografisi ile iki ürün izole edildi. Kristallendirme ile saflaştırılan bu 2 ürünün yapısı ¹H-, ¹³C-NMR, kütle spektrumu ve Röntgen (X-ray) analizleri ile aydınlatıldı.

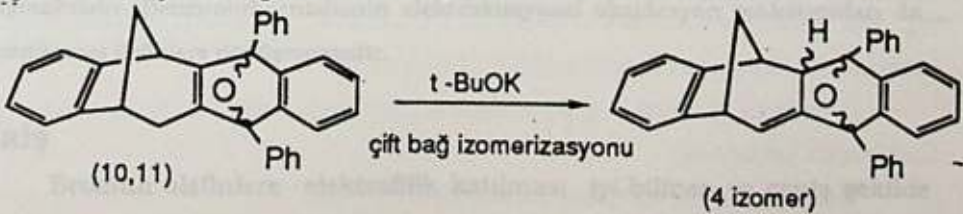
Gerek ¹³C-NMR'da δ=201.09 ve 201.10 ppm'de gözlenen sinyaller, gerekse IR spektrumunda 1675 ve 1680 cm⁻¹'de gözlenen gerilme titreşimleri bu iki üründe de karbonil grubunun varlığını açıkça göstermektedir. Bu nedenle, izole edilen ürünlerin beklenen yakalanma ürünleri (10,11) olmadığı ve kolonda ilgili keton bileşiklerine (12,13) düzenlenmiş ürünler olacağı kanaatine varıldı.



Yapıya kesinlik kazandırmak için izomerlerden birinin röntgen analizi (X-ray) yapıldı. Röntgen analizinden bu bileşiğin keton 12 olduğu ortaya çıktı.

Röntgen analizi yapılan bileşiğin 12, düzenlenmiş yapıda keton olması, bu reaksiyondan ara ürün olarak sikloalkin 3'ün oluştuğunu ve bunun DBI tarafından yakalandığını ve daha sonra yakalanma ürünlerinin (10,11) ilgili keton bileşiklerine (12,13) düzenlendiğini kanıtlamaktadır. İzole edilen diğer ürün 13, röntgen analizi yapılan bileşik 12 izomer olması nedeniyle yapısı da endo olarak belirlendi.

Alkin katılma ürünleri (10,11) izole edilemediği için, baz katalizli çift bağ izomerizasyonu doğrudan bu bileşikler üzerinde incelenemedi.



Alkin Katılma Ürünleri

Allen Katılma Ürünleri

Bu nedenle, exosiklik vinilbromür 6'nın dehidrobrominasyonu 2 ekvalent t-BuOK kullanılarak (DBI) varlığında tekrarlandı. Bu reaksiyondan kolon kromatografisi ile 4 izomerik katılma ürünü izole edildi. Yapılan spektroskopik incelemelerden bu ürünlerin, vinilbromür 1'in t-BuOK ile reaksiyonunda (DBI varlığında) oluşan allen katılma ürünleri (2) oldukları tesbit edildi.

İki ekvalent baz kullanıldığında allen katılma ürünlerinin oluşması, kullanılan bazın aşırısının alkin katılma ürünlerinde (10,11) çift bağı izomerize ettiğini açıkça göstermektedir.

Tüm bu deneysel sonuçlar vinilbromür 1'in bazik dehidrobrominasyonunda, ileri sürüldüğü gibi (2), ara ürün olarak allen 2'nin oluşmadığını, aksine alkin 3'ün oluştuğunu ortaya koymaktadır. Bu durum, yeterince küçük sıklık yapılar, alkinlerin allenlerden daha kararlı olduğunu göstermektedir.

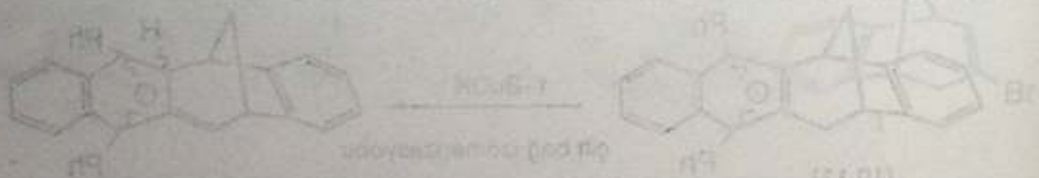
Son olarak allen 2 ve sikloalkin 3 üzerinde yapılan semi-ampirik kuantum mekanik hesaplamalar, termodinamik olarak alkin 3'ün daha kararlı olduğunu göstererek deneysel çalışmalarını destekler sonuçlar ortaya koydu.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı maddi yönden destekleyen Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat ve Kâzım Karabekir Eğitim Fakültelerine, sentezlenen bileşiklerin yüksek MHz ^1H - ve ^{13}C - NMR spektrumları ve Mass spektrumları için; Prof.Dr.W.ADAM'e (Würzburg Üniversitesi, Almanya), Prof.Dr.H.GÜNTHER'e (Siegen Üniversitesi, Almanya) ve X-ray analizleri için; Prof.Dr.W.H.WATSON'a (Texas Christian Üniversitesi, A.B.D) teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- 1.R.P.Johnson, "Strained Cyclic Cumulenes", *Chem.Rev.*, 89 (1989) 1111-1124.
- 2.M.Balçı, M.Harmandar, "Bicyclic Allenes : Generation and Trapping of 6,7-Benzobicyclo[3.2.1]Octa-2,3-Dienes", *Tetrahedron Lett.*, 25 (1984) 237-240.
- 3.K.L.Erickson, J.Wolinsky, "Rearrangement of Bromomethylene cycloalkanes with Potassium t-Butoxide", *J.Am.Chem.Soc.*, 87 (1965) 1142-1143.
- 4.T.F.Mich, E.S.Nienhouse, T.E.Farina, J.J.Tufariello, "The Generation of Benzyne-A Warning", *J.Chem.Educ.*, 45 (1968) 272.
- 5.D.J.Sandman, K.Mislow, W.P.Giddings, J.Dirlam, G.C.Hanson, "Stereochemistry of 2-Benzonorbornenone", *J.Am.Chem.Soc.*, 90 (1968) 4877- 4884.



BENZONORBORNADİENİN FONKSİYONALİZASYONU

İ-YÜKSEK SICAKLIK BROMİNASYONU

İİ-ELEKTROKİMYASAL REAKSİYONLARI

Arif DAŞTAN, Ümit DEMİR, Osman ÇAKMAK, Fatih KÖLELİ ve Metin BALCI

Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü Erzurum

THE FUNCTIONALIZATION OF BENZONORBORNADIENE

İ-HIGH TEMPERATURE BROMINATION

İİ-ELECTROCHEMICAL REACTIONS

SUMMARY

The bromination of benzonorbornadiene at 0 °C has been found to give only one product, the dibromide **5** produced via Wagner-Meerwein rearrangement with accompanying aryl migration. The bromination of **1** at 150 °C resulted in the formation of the non-rearranged product **2,3** and **4**, besides rearranged product **5**. The electrochemical oxidation reaction of benzonorbornadiene also gives rearranged products.

ÖZET

Benzonorbornadienin 0 °C de bromlanması aril göçüyle Wagner-Meerwein düzenlenmesi sonucu yalnız dibrom **5** ürününü vermektedir. 1'in 150 °C de bromlanması sonucu düzenlenmiş ürünün yanında düzenlenmemiş **2,3** ve **4** ürünleri oluşmaktadır. Benzonorbornadienin elektrokimyasal oksidasyon reaksiyonları da düzenlenmiş ürünlere dönüşmektedir.

GİRİŞ

Bromun olefinlere elektrofilik katılması iyi bilinen ve geniş şekilde araştırılan reaksiyon olmasına rağmen bromlanma mekanizması hala

tartışma konusudur(1). Yapılan çalışmalar çerçevesinde, şu anda bromlama reaksiyonları için kabul edilen gerçek şudur. Brom önce molekül yapısına bağlanarak köprülü bromonyum iyonu veya bromokarbyonyum oluşturur. Karşıt iyon olarakta çözücünün protik veya aprotik oluşuna göre bromür veya tribromür kabul edilmiştir. Karşıt iyonun bromonyum iyonuna arka taraftan atak yapması sonucu anti katılma ürünü oluşur.

DENEL BÖLÜM

1-Benzonorbornadienin 150 °C dibrominasyonu 300 mg (2.11 mmol) benzonorbornadien 25 ml dekalinde çözüldü. Manyetik olarak karıştırılan çözelti 150 °C ye ısıtıldı . Daha sonra 368 mg (2.30 mmol) B₂ ısıtılarak gaz halinde reaksiyon ortamına gönderildi. 1-2 dakika bu sıcaklıkta karıştırılan reaksiyon muhtevası oda sıcaklığına kadar soğutuldu. Dekalın vakum altında 60-70°C de destile edilerek uzaklaştırıldı. 637 mg vizkoz ürün karışımı 65 gr silikajel dolgu maddesi içeren kolona yüklendi. Hekzan ile elue edildi. Eluantlar 25 ml'lik fraksiyonlar halinde toplandı . İlk 600 ml'lik eluantın (250mg) % 89 trans dibrom 2 ve % 11 Exo-cis-dibrom 3 içerdigi NMR integrasyon oranlarından belirlendi. Daha sonra bu karışım silikajel ince tabaka kromatografisi ile (9/1) (Hekzan/Kloroform) ile ayrıldı. Önden yürüyen yoğun maddenin saf transdibrom 2 olduğu belirlendi. Açık sarı vizkoz sıvı. Kolondan elde edilen daha sonraki 500 ml'lik eluantın (332mg) % 62 Exo - cis-dibrom 3 ve % 38 düzenlenmiş dibrom 5 olduğu NMR değerlerinden belirlendi. Bu karışım silikajel ince tabaka kromatografisi ile (4/1) (Hekzan/Kloroform) kullanılarak ayrıldı. Önden yürüyen fraksiyon Exo-cis-dibrom 3 saf olarak izole edildi. Diklorometan /Hekzan (1/3) karışımında kristallendirildi. Beyaz kristaller (E.N. 78-79°C) İnce tabakada 2. fraksiyon düzenlenmiş dibrom 5 saf olarak izole edildi. Etanolde kristallendirildi. Beyaz kristaller(E.N. 76-77 °C) Kolondan elde edilen son 400 ml lik eluanttan 55 mg saf Endo-cis-dibrom 4 izole edildi. Diklorometan/Hekzan(1/4) karışımında kristallendirildi. Beyaz kristaller.(E.N. 125-126°C).

Ürünlerin kolondan geliş sırasına göre izole edilen toplam miktar ve oranları şu şekildedir.

Transdibrom(2) 222 mg (% 34.85)

Exo-Cis-dibrom(3) 235 mg (% 36.89)

Düzenlenmişdibrom(5) 125 mg(% 19.62)

Endo-cis-dibrom(4) 35 mg (%8.63)

2- Benzonorbornadienin 1 metoksilasyonu

100mg (0.7 mmol) Benzonorbornadien 1 Pt-Pt elektrotlarla 30 ml 0.4M Metanol/ LiClO₄ ile anodik olarak ortalama 200 mA akım ile 1 saat elektroliz edildi. Çözücü evaporatörde çektilirdikten sonra eter ile work up yapıldı. Elde edilen ham ürün 30 gr silikajel üzerinden %5 Hekzan/ Etilasetat ile saflaştırıldı. %91 verimle dimetoksi bileşiği 6 elde edildi. Açık sarı sıvı .

3-Benzonorbornadienin Etoksilasyonu

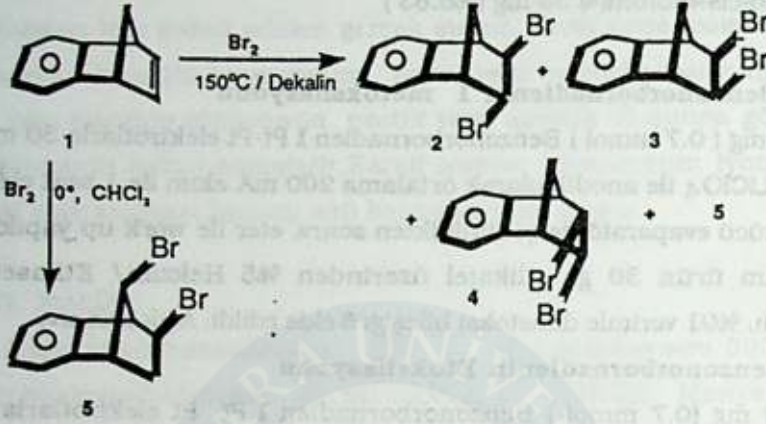
100 mg (0.7 mmol) Benzonorbornadien 1 Pt- Pt elektrotlarla 30 ml 0.4M Etanol/ LiClO₄ ile anodik olarak ortalama 10 mA akım ile 5 saat elektroliz edildi. Çözücü evaporatörde çekildikten sonra eter ile work up yapıldı.Elde edilen ham ürün 30 gr silikajel üzerinde %5 Hekzan/ Etilasetat ile saflaştırıldı.%63 verimle Dietoksi bileşiği 7 elde edildi açık sarı sıvı.

4-Benzonorbornadienin Asetoksilasyonu

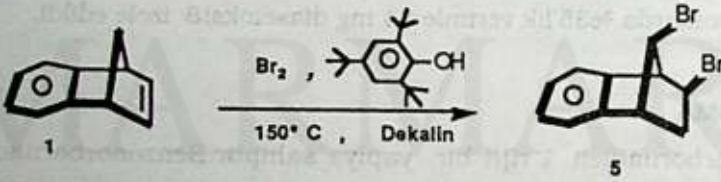
200 mg (1.4mmol) Benzonorbornadien NaCH₃COO ve 30 ml asetik asit eşliğinde ortalama 16 mA akımla 5 saat elektroliz edildi. Elde edilen ham ürün %5'lik Hekzan/ Etilasetatla 30 gr silikajel üzerinde kolon edildi. İlk fraksiyonlarda reaksiyona girmemiş 100 mg benzonorbornadien geldi Daha sonraki fraksiyonlarda %35'lik verimle 64 mg diasetoksi8 izole edildi.

TARTIŞMA

Benzonorbornadien 1 rijit bir yapıya sahiptir.Benzonorbornadien 1 oda sıcaklığında bomla reaksiyonu sonucu, oluşan bromonyum iyon ara ürünü düzenlenerek aril kayma ürününü 5 oluşturur (2) .Bromlamada reaksiyon sıcaklığının ürün dağılımını etkileyen en önemli parametre olduğu bilinmektedir (3).Benzonorbornadienin 150 °C de bromlanma sisonucu, düzenlenmiş ürünün yanısıra, oluşması mümkün üç normal katılma ürünü yüksek verimle elde edildi.

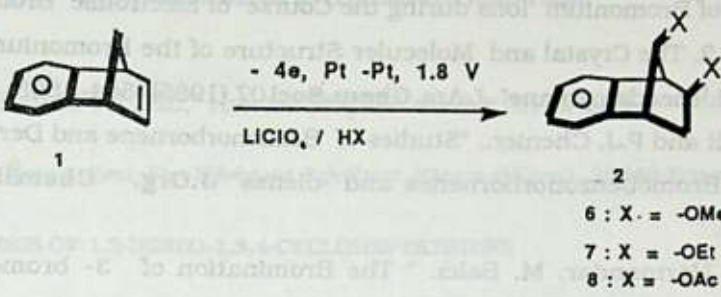


Yüksek sıcaklık brominasyonunda gerek iskelet yapısının korunması, gerekse syn katılma ürünlerinin gözlenmesi ; bu şartlar altında katılmanın radikalik olabileceğini akla getirmektedir. Bu nedenle reaksiyonun radikalik olup olmadığını belirlemek amacıyla reaksiyon radikal yakalayıcı inhibitör (2,4,6-tri-tert butil fenol) eşliğinde denendi. Radikal yakalayıcı eşliğinde yapılan reaksiyondan yalnız düzenlenmiş ürün 5 oluştuğu gözlemlendi.



Yüksek sıcaklık brominasyonunda, radikalik katılma ile bromonyum iyonu üzerinden olan katılma yarışma halindedir. Brom radikalleri, bu şartlar altında inhibe edildiği için yalnız bromonyum iyonu üzerinden katılma gözlenmektedir.

Benzonorbornadienin 10°C deki brominasyonunda olduğu gibi, elektrokimyasal reaksiyonları da düzenlenmiş ürünlere dönüştü.



SONUÇ

Halojen elektrofillerinin çift bağlara katılmaları genellikle stereospesifik olup, anti katılma ürünü oluştururlar. Anti katılma konjuge olmayan olefinler için genel bir katedir. Bu çalışmada yüksek sıcaklıkta brominasyon yapılarak syn katılma ürünlerinin elde edilebileceği belirlendi. Ayrıca rijit yapıda ve düzenlenmiş ürünlere dönüşen bisiklik olefinlerden normal katılma ürünlerinin elde edilebileceği tesbit edildi. Bunlara ilaveten, bisiklik yapıdaki olefinlerin elektrokimyasal oksidasyonu, bazı disüstitüe bisiklik hidrokarbonların sentezi için uygun görünmektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı maddi yönden destekleyen Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesine, sentezlenen bileşiklerin yüksek MHz $^1\text{H} - ^{13}\text{C}$ -NMR spektrumları için Prof. Dr. W.M. Jones'e (University of Florida, U.S.A.) teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1- a) G.H Schmid., P.G.Garrat., "The Chemistry of double Bonded Functionol Groups" Patai, S.Ed., Wiley, Newyork.

b) H.Slebocka-Tilk., R.G. Ball., R. S. Brown., "The Question of Reversible

Formation of Bromonium Ions during the Course of Electrophilic Bromination of Olefins 2. The Crystal and Molecular Structure of the Bromonium Ion of Adamantylideneadamantane" **J.Am.Chem.Soc**107,(1985)4504-4508.

2- J.W. Wilt and P.J. Chenier., "Studies of Benzonorbornene and Derivatives. II. The ac-Bromobenzonorbornenes and -dienes" **J.Org. Chem**35,(1970) 1562-1570.

3- a) M. Harmandar. M. Balcı. " The Bromination of 3- bromo - 6,7- Benzobicylo[3.2.1]octa - 2,6- diene and characterization of products" **Tetrahedron** 44(1988) 3645-3652.

b) O. Çakmak ., M. Balcı., " Synthesis of 2,3-,2,5-, and2,6- Dibromobenzobarrelenes High Temperature brominationI" **Tetrahedron Lett**,31 (1990) 2349-2352.

c) M. Balcı., O.Çakmak., and T. Hökelek. " Synthesis of 2,3-2,5- and 2,6- Disubstituted- Benzobarralenes High Temperature Bromination II " **Tetrahedron**48 (1992) 3163- 3132.

1,2-BENZO-1,3,4-SİKLOHEPTATRIEN'İN SENTEZİ

Yaşar Kemal YILDIZ, Hasan SEÇEN ve Metin BALCI

Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 25240-Erzurum-Türkiye

SYNTHESIS OF 1,2-BENZO-1,3,4-CYCLOHEPTATRIENE

SUMMARY

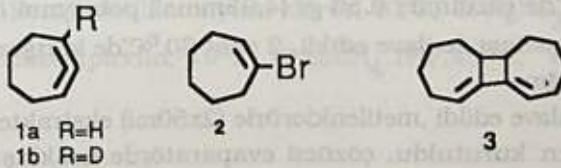
7,7-Dibromo-2,3-benzobicyclo[4.1.0]heptane 5 have been synthesized and then -silver ion- catalyzed reactions have been studied. Hydroxy alcohol 6 was converted to the corresponding vinylbromide 8 which gave upon reaction with base the allene dimer 10 by dimerization of the formed allene 9.

ÖZET

1,2- Benzo-1,3,4-sikloheptatrien 9 için çıkış maddesi olan 7,7-dibromo-2,3-benzobisiklo[4.1.0]heptan sentezlendi ve gümüş iyon katalize reaksiyonları incelendi. Hidroksi alkol 6 vinil bromür'e 8 dönüştürüldü. 8 in bazla muamelesi sonucunda oluşan allenin 9 dimer ürünü 10 elde edildi.

GİRİŞ

Gerilimli siklik allenlerin sentezi için ilk teşebbüs Favorski tarafından yapılmış ve gerilimli siklik allenlerden ilk olarak 1,2- sikloheptadienin 1a sentezi Ball ve Landor tarafından başarılmıştır(1). Bu araştırmacılar sentezlerinde 2 bileşiğinin dehidro-brominasyonu sonucu 1'in dimer ürünü 3'ü elde etmişlerdir(1). Daha sonraları gerilimli siklik allenler üzerine yapılan çalışmalar bu bileşiklerin izole edilemeyecek veya spektroskopik olarak gözlenemeyecek kadar reaktif olduğunu göstermiştir(1). Balcı ve Jones(2) çalışmalarında 1,2-Sikloheptadien'in 1b optikce aktif olduğunu göstermişlerdir.



Halkalı sistemlerde çift bağların halka gerilimini daha da artırdığı bilinmektedir. Bu açıdan 1a bileşiğine benzen anelasyonunun etkisini görmek için çalışmamızda 10 bileşiğinin sentezi hedeflendi. 10 bileşiği sentezlenerek yapısı spektroskopik ve kimyasal yöntemlerle aydınlatıldı.

**DENEL BÖLÜM**

1-Bromo-7-hidroksi-3,4-benzo sikloheptadien 6. 3 gr (9.9 mmol) dibromkarben katılma ürününe 5 , 15 ml su , 30 ml aseton ve 1,69 gr gümüş nitrat katıldı. Otoklavda 8-9 atmosfer , 124-126 °C'de 30 dakika mekanik olarak karıştırıldı. Oda sıcaklığında reaksiyon karışımına 50 ml su ve 250 ml metilen klorür ilave edildi. Çökelti (AgBr) filtre edilerek süzünüden uzaklaştırıldı. Sulu faz metilen klorür ile (2x50 ml) ekstrakte edildi. Organik faz Na_2SO_4 üzerinden kurutuldu evaporatörde çözücü uzaklaştırıldı. Madde kolon kromatografisi yöntemiyle silikajel kolonla saflaştırıldı. 6 Karbontetraklorürden kristallendirildi (verim %32, e.n.64-65°C, renksiz kristal).

1,7-Dibromo-3,4-Benzosikloheptadien 7. 2,39 gr (10mmol) alkol bileşiğine 6, 30 ml mutlak benzen ilave edildi reaksiyon sıcaklığı -5°C'ye düşürüldü. 1,58 gr (20mmol) pirdin ve 5,42gr (20mmol) fosfor tribromür ilave edildi.12 saat karıştırılıp reaksiyon sıcaklığı 0 °C 'de iken 30 ml su ilave edildi. Sulu faz kloroform ile (3x50ml) ekstrakte edildi ve organik faz sodyum sülfat üzerinden kurutuldu. Çözücü evaporatörde uzaklaştırıldı. Dibromür 7 kolon kromatografisi yöntemiyle silikajel kolondan saflaştırıldı (%56, renksiz sıvı).

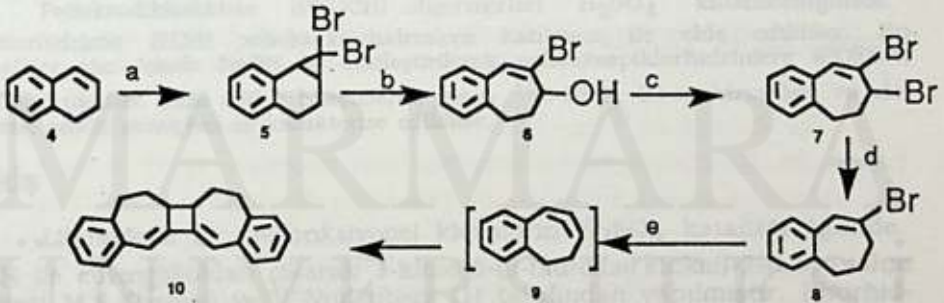
1-Bromo-3,4-benzosikloheptadien 8. 1 gr (3,3 mmol) 1,7-Dibromo-3,4 Benzo - 1.3 sikloheptadien 7 bileşiği 30 ml THF'de çözüldü. 30ml THF'de süspanse edilmiş 140 mg (3.68mmol) LiAlH_4 'ün üzerine damlatma hunisi vasıtasıyla ilave edildi. 40-45 °C'de 2 saat karıştırıldı. Reaksiyon karışım sıcaklığı 0°C'ye soğutuldu. Su ilave edildi, süzgeç kağıdından süzülde, süzünü kloroform ile (2x50 ml) ekstrakte edildi. Organik faz CaCl_2 üzerinden kurutuldu, çözücü evaporatörde uzaklaştırıldı, kolon kromatografisi yöntemi ile silikajel kolonda saflaştırıldı (%85, renksiz sıvı) .

Dimer 10. 1 gram (4,5 mmol) vinilbromür bileşiği 8 30 ml THF'de çözüldü, üzerine 20 ml THF'de çözülmüş 0,56 gr (4,95mmol) potasyum tersiyer-bütoksit damlatma hunisi vasıtası ile ilave edildi, 2 saat 60 °C'de karıştırıldı. Reaksiyon karışımı oda sıcaklığına

getirildi, 50 ml su ilave edildi ,metilenklorürle (2x50ml) ekstrakte edildi.Organik faz CaCl_2 üzerinden kurutuldu, çözücü evaporatörde uzaklaştırıldı. Karışım aliminyum oksit kolondan saflaştırıldı, dimer 10 kloroform/hekzandan kristallendirildi (%20,e.n.121-122°C, renksiz kristal) .

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada hedeflenen allenin 9 sentezi için 3,4-dihidronaftalin 4 çıkış maddesi olarak kullanıldı. İlk olarak bu bileşiğe dibromokarbon katılarak 7,7-Dibromo-2,3-benzobisiklo [4.1.0]heptan 5 sentezlendi. 5'in AgNO_3 eşliğinde aseton-su içinde $124-126^\circ\text{C}$ 'de otoklavda açılması suretiyle alkol 6 elde edildi. 6 bileşiği PBr_3 ile muamele edilerek dibromür 7'ye dönüştürüldü. 7 bileşiğinin LiAlH_4 ile indirgenmesi sonucunda allen sentezi için düşünülen reaktiflerden 1-bromo-3,4-benzo-1,3-sikloheptadien 8 sentezlendi. Bu bileşiğin C7 karbonundaki protonlar alilik pozisyonda bulunduğundan dolayı asidiktir, bu nedenle baz tarafından protonlardan biri kolayca koparılarak istenilen dehidrobrominasyon gerçekleşebilir ve böylece hedeflenen allen 9 sentezlenebilir. Bu eliminasyon, baz olarak potasyum tert-bütoksit kullanılarak, 60°C 'de gerçekleştirildi. Reaksiyon sonucunda termodinamik kararlı olan allen dimeri 10 tek ürün olarak izole edildi. Benzo grubu sıklık allenlerde halka gerilimini her ne kadar artırmakta ise de ortamda diğer ürünlere neden olacak pozisyon bulunmadığından dolayı molekül gerilimli sıklık allene dönüşmektedir.



REAKTİFLER VE ŞARTLAR:

a) $\text{CHBr}_3, \text{NaOH}, \text{Benziltriethylamonyum klorür}, 40^\circ\text{C}$. b) AgNO_3 , aseton, su, $115-120^\circ\text{C}$. c) PBr_3 , benzen, piridin, -10°C . d) $\text{LiAlH}_4, \text{THF}, 45^\circ\text{C}$. e) K-tert-butoksit, THF.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi tarafından desteklenmiştir. Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Dekanlığına ve yüksek ayırmalı NMR spektrumlarımızı alan Prof.Dr.Harald Günther'e (Siegen Üniversitesi/Almanya) teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR

- 1) R.P.Johnson, "Strained Cyclic Cumulenes", Chem. Rev. 89, (1989), 1111-1124.
- 2) M. Balcı, W. M. Jones, "Chirality as Probe for the Structure of 1,2-Cycloheptadiene and 1,2-cyclohexadiene", J. Am. Chem. Soc. 102, (1980), 7607-7608.

POLİOKSAKLORHİDRİNLERE EPİKLORHİDRİNİN KATILMASI VE POLİOKSAEPİKLORHİDRİNLERİN SENTEZİ

Halil HOŞGÖREN ve Nureddin ÇOLAK

Dicle Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Diyarbakır-Türkiye

ADDITION OF EPICHLOROHYDRIN TO POLYOXACHLOROHYDRINS AND SYNTHESES OF POLYOXAEPICHLOROHYDRINS

SUMMARY

Polyoxadichlorohydrin (PODCH) oligomers were obtained by adding epichlorohydrin (ECH) to polyoxachlorohydrins (POCHs) using H_2SO_4 catalyst. These compounds were converted to polyoxaepichlorohydrins (POECHs) by treatment with NaOH in ether solution. The structure of obtained products were characterized by ^{13}C -NMR, IR-spectrums and elemental analysis results.

ÖZET

Polioksadiklorohidrin (PODCH) oligomerleri H_2SO_4 katalizöründe, epiklorhidrinin (ECH) polioksaklorhidrinlere katılması ile elde edildiler. Bu bileşikler eter içinde NaOH ile etkileştirilerek polioksaepiklorhidrinlere (POECH) dönüştürüldüler. Elde edilen bileşiklerin yapısı ^{13}C -NMR, IR-spektrumları ve elemental analiz sonuçları ile karakterize edildiler.

GİRİŞ

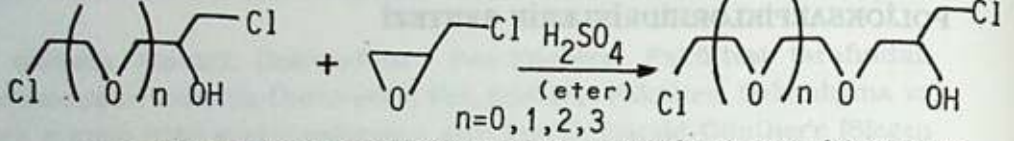
Literatürde ilk polifonksiyonel klorhidrin H_2SO_4 katalizöründe ECH ile etlenglikoldan çıkararak 1-kloro-3-(β -hidroksi etoksi)-2-propanolun sentezi M.S.Kharash ve W.Nudenberg (1) tarafından yapılmıştır. Klorhidrinler ile ECH'in H_2SO_4 katalizöründe kondensasyonu T.Kawai (2) tarafından yapıldığını görmekteyiz. Polietilen glikollerin bazı aromatik ve alifatik epoksitlere katılması $HClO_4$ katalizöründe ise Ç.Erk (3,4) tarafından yapılmıştır.

Son yıllarda bazı epoksit ve diepoksitlerin türevleri, makrosiklik eter sentezinde kullanılmaya başlanmıştır. Örneğin 1986 yılında Y.Nakatsuji ve arkadaşları (5), 1987 yılında ise J.M.Pugia ve arkadaşları (6) oligoelülendiglisisidil eterleri ve 2-susbtü-2- (kloro metoksi) oksiran bileşiklerini sırasıyla makrosiklik eter sentezinde kullandılar.

Bu çalışmada ise alkolik fonksiyonel gruplar taşıyan krown eterleri sentezleyebilmek için bazı PODCH ve POECH türevleri hazırlanmıştır.

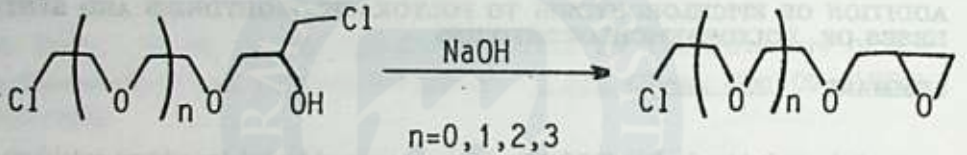
DENEL BÖLÜM

PODCH'lerin Sentezi



1 mol ECH ve 2 mol POCH katalik miktarda H_2SO_4 (% 98) ile 140-170 °C'ta 10 saat geri soğutucu altında ısıtıldı. Soğutulduktan sonra reaksiyon karışımı $NaHCO_3$ ile nötrleştirilerek düşük basınç altında destillendi

POECH'lerin Sentezi



200 mL eter içinde çözülen 0,3 mol PODCH 0°C'ye soğutuldu. Toz haline getirilen 0,36 ml NaOH karıştırılarak iki saat içinde kısım kısım yukarıdaki PODCH çözeltisine ilave edildi. Reaksiyon karışımı 0°C'ta iki saat daha karıştırıldı. Süzülen eter fazı birkaç kez saf su ile yıkınarak, reaksiyona girmeyen NaOH fazlası uzaklaştırıldı. Daha sonra eter fazı Na_2SO_4 üzerinde kurutuldu. Eter uçurularak ürün düşük basınç altında destillendi.

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada yeni PODCH ve POECH türevleri $n=0,1,2,3$ için hazırlandı. Hazırlanan bileşiklerin kaynama noktaları, n_D^{25} kırılma indisleri, elementel analiz sonuçları ile reaksiyon % verimleri Tablo-1'de verildi. Bileşiklerin yapıları ^{13}C -NMR ve IR- spektrumları ile doğrulanmıştır. Ayrıca Tablo-1'den görüldüğü gibi, hesaplanan ve bulunan C ve H % değerleri uyum içinde oldukları görülmektedir. PODCH ve POECH türevlerinin ($n=0,1,2,3$) ^{13}C -NMR kimyasal kayma değerleri Tablo-2 ve 3'te verilmiştir. $n=0$ için 1,6-dikloro-4- oksa-2-hekzanol ve 1,2-epoksi-4-oksa-6-klorohekzan bileşiklerinde 5 farklı kimyasal kaymaya sahip C atomları için 5 farklı pik gözlenmektedir. (şekil-1.2) Buna karşılık $n=1,2,3$ durumunda bileşiklerin C iskeletindeki bütün C'lerinin pikleri çıkmamaktadır. Bu durum PODCH ve POECH türevlerindeki X_n C'ların yakın kimyasal kayma değerlerine sahip olmalarından ötürüdür. (şekil-3.4).

POECH türevlerinin IR-spektrumlarında 1150 - 1085 cm^{-1} bölgesinde C-O-C asimetrik esnemesinden ötürü, absorpsiyon bandı 1125 cm^{-1} 'de gözlemlendi. ayrıca PODCH türevlerinin 3500 cm^{-1} 'deki OH absorpsiyon bantları da POECH türevlerinin spektrumunda kaybolmaktadır. Bu da epoksit halkasının oluşumuna ilave bir kanıttır.

Tablo-1 : Polioksadiklorhidrin ve polioksaepiklorhidrin'lerin Fiziksel özellikleri ve elemental analiz sonuçları

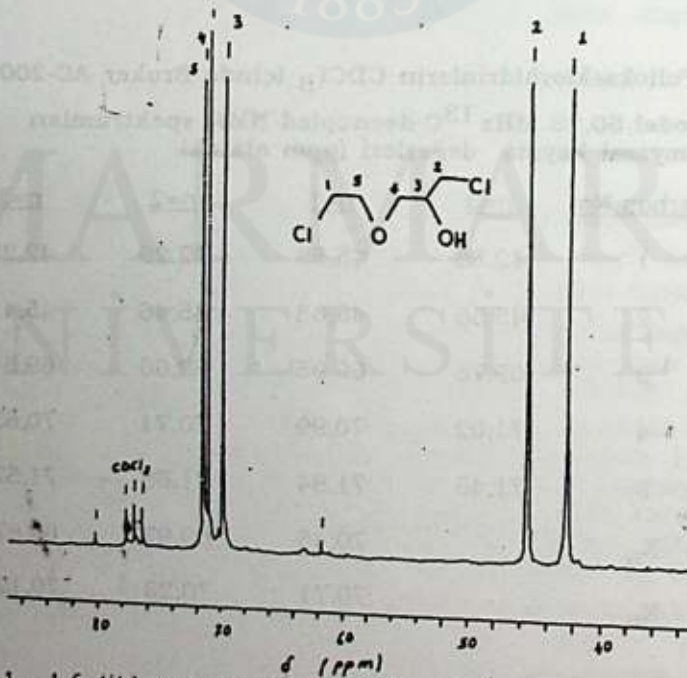
Bileşiğin adı	Kapak formülü k.n.(°C)	% verim	Elemental Analiz				25 n _D	
			hesaplanan		bulunan			
			%C	%H	%C	%H		
1,6-dikloro-4-oksa-2- hekzanol	C ₅ H ₁₀ Cl ₂ O ₂	140-144	40	34,68	5,78	34,83	5,90	1.4750
1,9-dikloro-4,7-dioksa-2- nonanol	C ₇ H ₁₄ Cl ₂ O ₃	126-128	55	38,71	6,45	39,00	6,82	1.4741
1,12-dikloro-4,7,10- trioksa-2-dodekanol	C ₉ H ₁₈ Cl ₂ O ₄	148-153	50	41,38	6,90	42,32	7,31	1.4691
1,15-dikloro-4,7,10,13- tetraoksa-2-pentadekanol	C ₁₁ H ₂₂ Cl ₂ O ₅	176-184	34	43,28	7,21	43,80	7,81	1.4727
1,2-epoksi-4-oksa-6- klorohexan	C ₅ H ₉ ClO ₂	96-100	51	43,96	6,59	43,59	6,45	1.4497
1,2-epoksi-4,7-dioksa-9- klorononan	C ₇ H ₁₃ ClO ₃	96-100	41	46,54	7,20	46,70	7,33	1.4558
1,2-epoksi-4,7,10-trioksa- 12-klordodekan	C ₉ H ₁₇ ClO ₄	128-130	42	48,11	7,57	48,00	7,93	1.4594
1,2-epoksi-4,7,10,13- tetraoksa-15- kloropentadekan	C ₁₁ H ₂₁ ClO ₂	162-166	56	49,16	7,82	49,72	8,11	1.4610

Tablo-2 : Polioksaklorhidrinlerin CDCl₃ içinde Bruker AC-200 L model 50,33 MHz ¹³C-decoupled NMR spektrumları kimyasal kayma değerleri (ppm olarak)

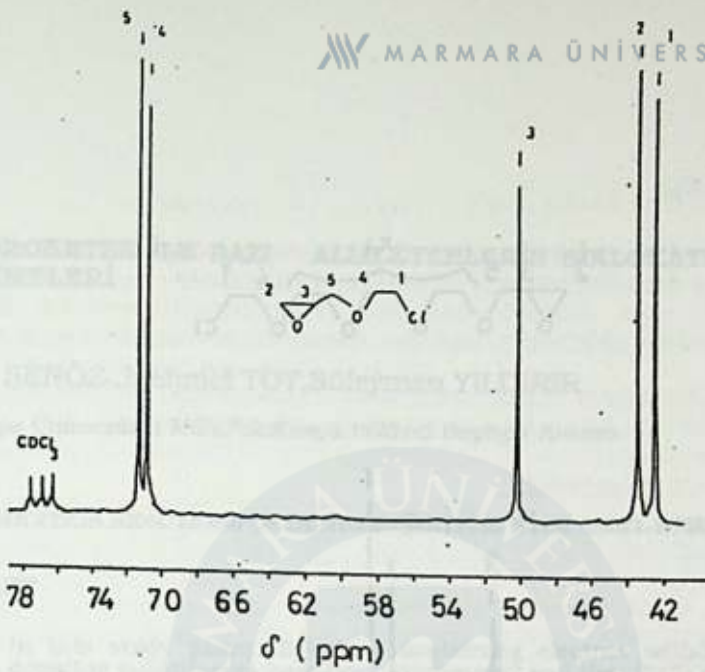
Karbon No	n=0	n=1	n=2	n=3
1	42.58	45.53	42.29	42.25
2	45.58	45.63	45.46	45.41
3	69.75	69.95	69.66	69.54
4	71.02	70.99	70.74	70.63
5	71.45	71.84	71.65	71.57
X _n	-	70.45	69.97	69.87
X _n	-	70.71	70.23	70.12

Tablo- 3 : Polioksapiklorhidrinlerin $CDCl_3$ içinde Bruker AC-200 L model 50,33 MHz ^{13}C -decoupled NMR spektrumları kimyasal kayma değerleri (ppm olarak)

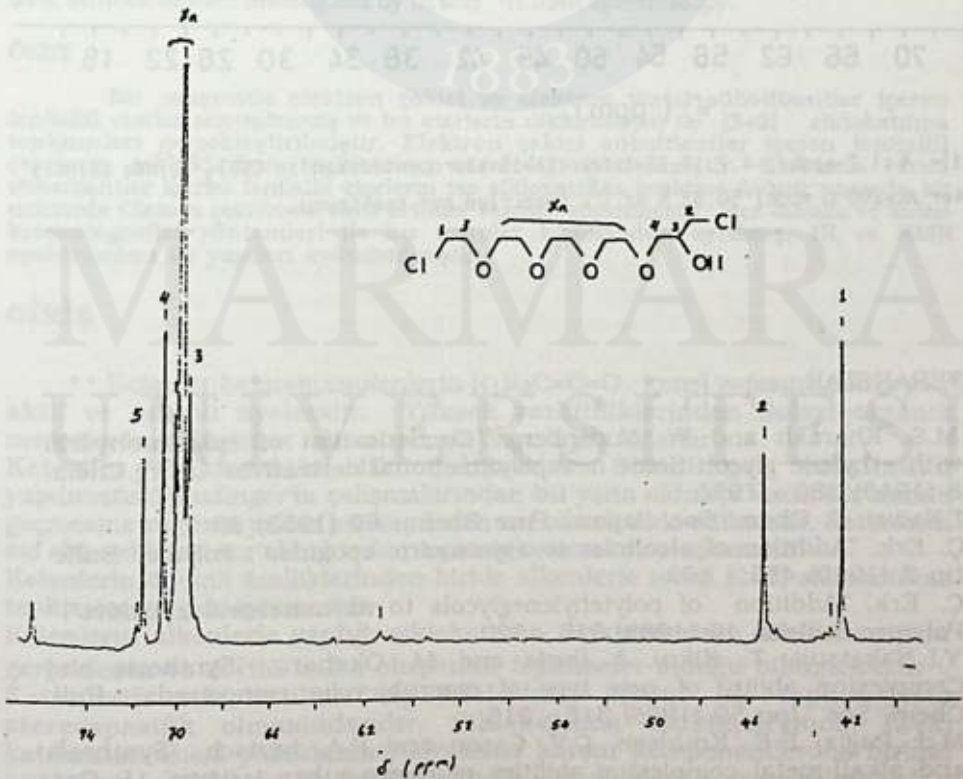
Karbon No	n=0	n=1	n=2	n=3
1	42.49	42.28	42.09	42,33
2	43.46	43.39	43.00	43,64
3	50.23	50.11	49.77	50,28
4	70.86	70.67	70.36	70,82
5	71.38	71.39	71.09	71,49
X_n	-	69,94	69,63	70,10



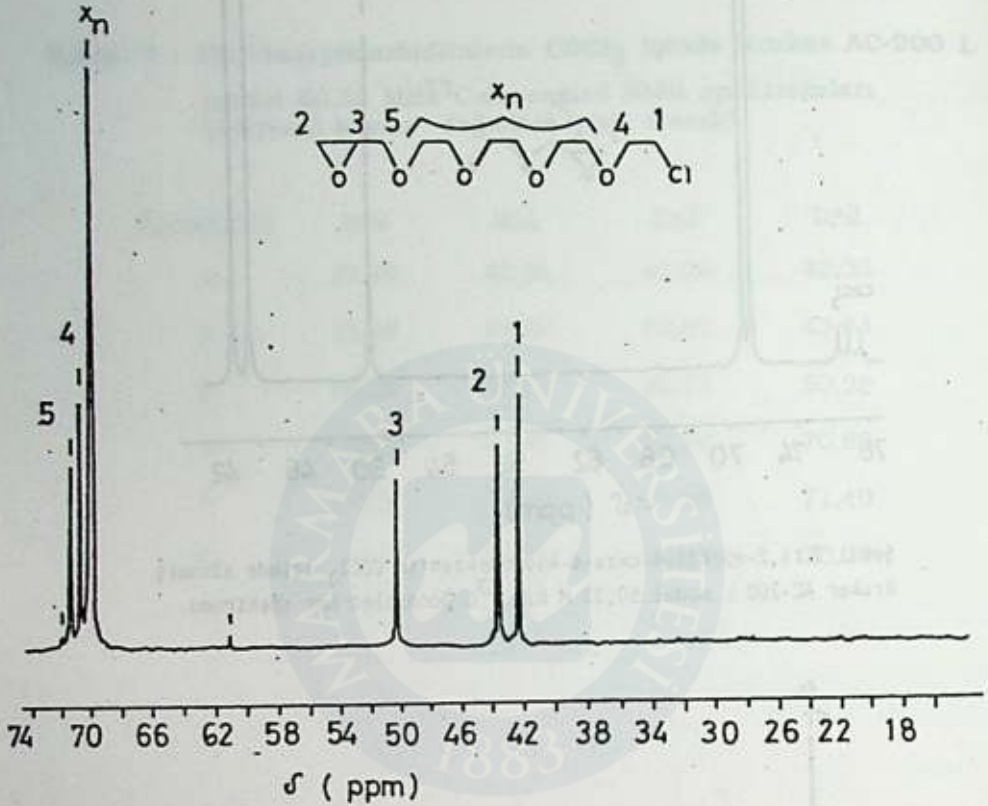
Şekil 1. 1,6-dikloro-4-oksa-2- heksanol'un $CDCl_3$ içinde alınmış Bruker AC- 200 L model 50,33 MHz ^{13}C - Decoupled nmr spektrumu



Şekil 2 : 1,2-epoksi-4-okta-6-kloroheksan'ın CDCl₃ içinde alınmış Bruker AC-200 L model 50,33 M ilz. ¹³C Decoupled nmr spektrumu.



Şekil- 3 : 1,15- dikloro-4,7,10,13-tetradeka-2-pentadekanol'ün CDCl₃ içinde alınmış Bruker AC-200 L model 50,33 ilz. ¹³C- Decoupled nmr spektrumu



Şekil- 4:1,2-epoksi-4,7,10,13-tetraokza-15-kloropentadekan'ın CDCl_3 içinde alınmış Bruker AC-200 L model 50,33 K Hz. ^{13}C Decoupled nmr spektrumu.

REFERANSLAR

1. M.S. Kharash and W. Nudenberg, "Condensation of epichlorohydrin with ethylene glycol: Some new polyfunctional derivatives" J.Org.Chem. 8 (1943) 180 - 193
2. T.Kawai, J. Chem. Soc. Japon., Pure Chem., 80 (1953) 88
3. Ç. Erk, "Addition of alcohols to asymmetric epoxides", Polymer Bulletin 2 (1980) 455 - 460
4. Ç. Erk, "Addition of polyethyleneglycols to asymmetrical epoxides", Polymer Bulletin 10 (1983) 315 - 320
5. Y. Nakatsuji, T. Kikui, I. Ikeda and M. Okahara, "Synthesis and Complexing ability of new type of macrobicyclic compounds", Bull. Chem. Soc. Jpn 59 (1986) 315 - 316
6. M.J. Puglia, B.E. Knudsen, C.V. Cason and R.A. Bartsch, "Synthesis and alkali-metal complexing abilities of crown ether tertiary", J. Org. Chem. vol. 52 No: 4 (1987) 541 - 547

DİKLOROKETEN İLE BAZI ALLİLETERLERİN SİKLOKATILMA TEPKİMELERİ

Hülya ŞENÖZ , Mehmet TOY, Süleyman YILDIRIR

Hacettepe Üniversitesi Müh.Fak.Kımya Bölümü Beytepe Ankara

CYCLOADDITION REACTIONS OF DICHLOROKETENE WITH ALLYL ETHERS

SUMMARY

In this study phenylallylethers containing electron withdrawing and electron donating substituents have been synthesized and the [2+2] cycloaddition reactions of these ethers with dichloroketene was realized . It has been observed that phenylallyl ethers having electron withdrawing substituents did not give cycloaddition reactions, but the phenylallyl ethers having electron donating substituents yield [2+2] cycloadducts and also claisen rearrangement byproducts. These products were separated by TLC and column chromatography methods and their structures were investigated by IR and ¹H NMR spectroscopy.

ÖZET

Bu çalışmada elektron çekici ve elektron verici sübstittentler içeren fenilallil eterler sentezlenmiş ve bu eterlerin dikloroketen ile [2+2] siklokatalma tepkimeleri gerçekleştirilmiştir. Elektron çekici sübstittentler içeren fenilallil eterlerin siklokatalma tepkimeleri vermediği gözlenmiştir. Elektron verici sübstittentler içeren fenilallil eterlerin ise siklokatalma tepkime ürünü yanında bir miktarda Claisen çevrilmesi türü ürünler verdiği gözlenmiştir. İnce tabaka ve kolon kromatografisi yöntemleri ile bu ürünler birbirinden ayrılmış, IR ve NMR spektrumları ile yapıları aydınlatılmıştır.

GİRİŞ

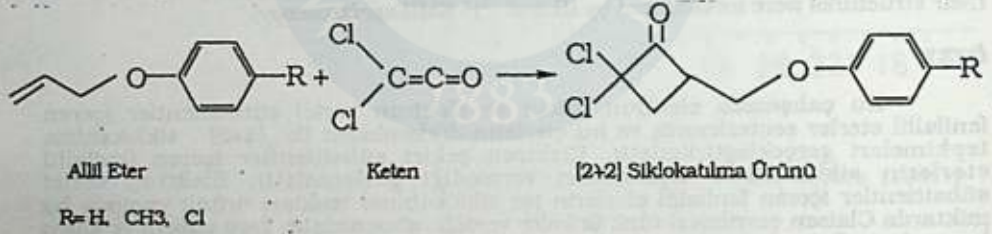
Ketenler heterokumulenlerin $R_1R_2C=C=O$ genel yapısına sahip çok aktif ve önemli üyeleridir. Yüksek reaktivitelerinden dolayı organik sentezlerde endüstri ve laboratuvarında önemli yer tutarlar. Ketenler hakkındaki ilk çalışmalar Staudinger tarafından yapılmıştır. Staudinger'in çalışmalarından bu yana oldukça uzun bir zaman geçmesine rağmen yalnız bir kaç keten saf olarak elde edilmiştir. Ketenlerin saf elde edilmesi zor olduğundan tepkime ortamında oluşturulur. Ketenlerin önemli özelliklerinden biride alkenlerle ısasal [2+2] siklokatalma tepkimesi gerçekleştirmesidir. Ketenlerin alkenlerle yaptığı siklokatalma tepkimelerinin tek basamakta gerçekleşen ve dörtlü halka oluşturan tepkimeler olduğu bilinmektedir¹. Ketenlerin siklokatalma tepkimelerinin önemi bu tepkimelerin stereospesifik olmasındandır. Siklokatalma tepkimelerinde, [2+2] katılmaları ısasal yasaklanmış olmasına karşın komponentlerden birinin antrafacial yaklaşımı ile bu tepkimeler ısasal olarak gerçekleşebilirler. Ketenler bu tip tepkimeler için ideal antrafacial yaklaşan komponentlerdir. Ketenin karbon atomlarından biri sp hibriti yaptığı için antrafacial katılma için minimum bir sterik engel içerir.

DENEL BÖLÜM

Bu çalışmada kullanılan fenillallileter, p-klorofenillallileter, p-tollillallileter, p-nitrofenillallileter ve p-siyanofenillallileter sentezlenmiştir². Çok reaktif olan dikloroketen ise trikloroasetilklorürün Zn ile eliminasyonundan elde edilip, tepkime ortamında siklokatalıma tepkimesine sokulmuştur. Siklokatalıma tepkimesi helyum atmosferi altında kuru eter/dimetoksetan çözücü karışımında 48 saat kaynatılarak gerçekleştirilmiştir³.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tepkime sonucunda p-nitro ve p-siyano gibi elektron çekici sübsitientler içeren eterlerin, ketenler ile siklokatalıma tepkimelerine girmedikleri görülmüştür. Çünkü kuvvetli elektron çekici sübsitientlerin allil çift bağı üzerindeki elektronları çekerek doymamış bileşikteki elektron yoğunluğunu azalttığı, dolayısıyla bu siklokatalıma tepkimesini engellediği düşünülmektedir. Elektron verici sübsitient içeren eterler ise dikloroketen ile [2+2] siklokatalıma tepkimesi vererek diklorosiklobütanon türü ürünler vermişlerdir. Siklokatalıma tepkimesi yanında bir miktarda Claisen türü bir çevrilme ile yan ürününde oluştuğu gözlenmiştir⁴.



İnce tabaka ve kolon kromatografisi yöntemleri kullanılarak bu ürünler birbirinden ayrılmış, yapıları IR ve NMR spektroskopisi yöntemleri ile aydınlatılmıştır. Siklokatalıma ürünlerinin IR spektrumunda; karbonil grubu pikı dördü halkanın gerginliğinden dolayı 1810-1812cm⁻¹ 'de gözlenmektedir. Etere ait C-O gerilme bantları ise 1200-1100 cm⁻¹ civarında gözlenmektedir.

¹H NMR spektrumlarında ise;

δ=6.5-7.5 ppm 'de aromatik protonlar multiplét

δ=4.0-4.3 ppm 'de O-CH₂ protonları doublet

δ=3.1-3.4 ppm'de 4'lü halkadaki üç proton multiplét

p-tollillallileterin siklokatalıma ürününde ise;

δ=2.3 ppm'de aromatik halkaya bağlı CH₃ protonları singlet olarak gözlenmiştir.

KAYNAKLAR

- 1- H.Staudinger, E. Suter. Cyclobutanon-derivate aus Diphenyl-keten und Athylen-Verbindungen **Ber.** 1920, 53, 1092.
- 2- N.William.G. Donald, The orto Claisen Reargement **J. Am. Chem. Soc.** 1958, 80, 3271
- 3- B.Jonhston,E.Czyzewska. [2+2] Cycloaditton of Dichloroketene to Ally Ethers and Thioethers **J.Org. Chem.** 1987, 52, 3693.
- 4- B.Jonhston ,K.Slessor, Synthesis of Lineatin by [2+2] Cycloadition of Dikloroketene with a Cyclic Allyl Ethers **J. Org. Chem.** 1985, 50, 114.

KATILIMLI
1. H. J. Cantow, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 1001 (1953).
2. N. Wiberg, *J. Org. Chem.* **20**, 1001 (1955).
3. E. J. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* **78**, 1001 (1956).
4. H. J. Cantow, Jr., *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 1001 (1957).
5. E. J. Corey, *J. Am. Chem. Soc.* **80**, 1001 (1958).



MARMARA ÜNİVERSİTESİ

MOLEKÜL İÇİ [2+2] SIKLOADİSYON TEPKİMESİ İLE BAZI HETEROSİKLİK BİLEŞİKLERİN SENTEZİ

Mehmet TOY , Hülya ŞENÖZ ve Süleyman YILDIRIR
Hacettepe Üniversitesi Müh.Fak.Kimya Bölümü Beytepe Ankara

SYNTHESIS OF HETEROCYCLIC COMPOUNDS WITH INTRAMOLECULAR [2+2] CYCLOADDITION

SUMMARY

As known bicyclic and tricyclic compounds containing heteroatoms can be synthesized by the reaction of intramolecular cycloaddition of ketenes. In this work, intramolecular [2+2] cycloaddition of phenoxyketenes which carry different substituents are investigated.

In order to synthesize phenoxyketenes, first phenoxyacids having formyl in o-position are synthesized and than these acids have been converted into tosylates by the interaction with p-toluenesulphonylchloride. And than phenoxyketenes have been produced by the interaction of triethylamine. It has been observed that benzofurans with different substituents formed as result of intramolecular addition with formyl group which are on o-position of phenoxyketenes.

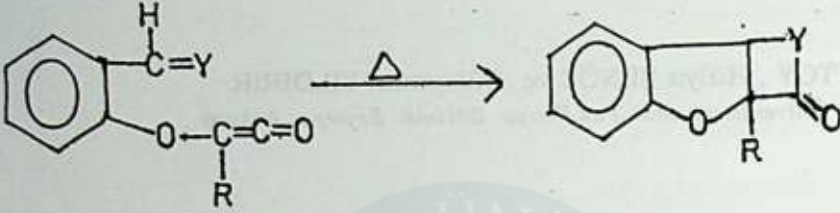
ÖZET

Ketenlerin molekül içi sikloadisyon tepkimesi ile birçok heteroatom içeren bisiklik ve trisiklik bileşikler sentezlenebilmektedir. Bu çalışmada değişik sübstüent taşıyan fenoksiketenlerin molekül içi [2+2] sikloadisyonu incelenmiştir. Fenoksi ketenleri sentezleyebilmek için öncelikle o-pozisyonunda formil grubu içeren fenoksi asitler sentezlenmiş ve bu asitler p-toluen sulfoniklorür ile etkileştirilerek tosilatına çevrilmiştir. Daha sonra trietilamin ile etkileştirilerek fenoksi ketenler oluşturulmuştur. Fenoksi ketenlerin o-pozisyonunda bulunan formil grubu ile molekül içi katılma sonucu değişik sübstüentli benzofuranlar oluştuğu gözlenmiştir.

GİRİŞ

Ketenlerin ısısal [2+2] sikloadisyon tepkimesi ile, başka yollarla sentezi oldukça güç olan siklobütanon türevleri sentezlenebilmektedir¹. Bu tepkime, molekül içi veya moleküller arası olarak gerçekleştirilebilir. Brady ve arkadaşları^{2,3}, orto konumunda doymamış gruplar içeren bazı aril gruplu ketenlerle ısısal olarak molekül içi sikloadisyon tepkimeleri gerçekleştirerek trisiklik bileşiklerin sentezlenebileceğini göstermişlerdir. Bizim bu çalışmadaki amacımız ise, orto konumunda çift bağ içeren fenoksiketenlerle ısısal molekül içi $[\pi 2s + \pi 2a]$ sikloadisyon tepkimesi sonucu heteroatom içeren trisiklik bileşikler sentezlemektir. Bu amaçla orto konumunda formil, allil ve imin (C=O, C=C ve C=N) gibi doymamış gruplar

İçeren fenoksiketenler sentezlenmiş ve bu ketenlerin ısıl molekül içi sikloadisyon tepkimeleri gerçekleştirilmeye çalışılmıştır.



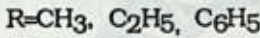
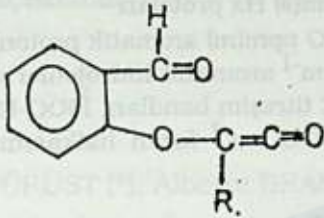
Y=C, O, N

DENEL BÖLÜM

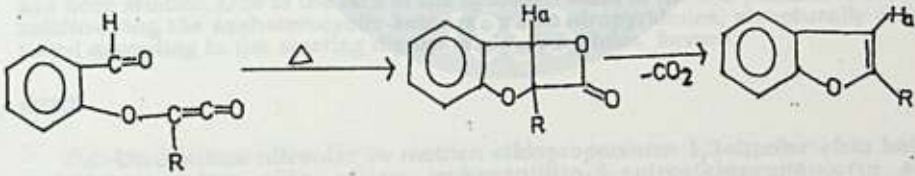
Fenoksi asitleri α -halo karboksilik asitlerin bazik ortamda salisil aldehit ile sübstütüsyonundan elde edilmiştir. Elde edilen fenoksi asitler p-toluensülfonil klörür ile önce tosilatına , daha sonra NEt_3 'li ortamda ketenine dönüştürülmüştür. Bu ketenler kararsız olduğu için keten oluşumu ve sikloadisyon aynı anda tepkime ortamında gerçekleştirilmiştir. Meydana gelen halkalı katılma ürünleri kolon kromatografisi yöntemi ile yan ürünlerden ayrılmış ve IR, 1H -NMR spektrumları alınarak yapıları aydınlatılmıştır.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu sikloadisyon tepkimesinde en olumlu sonuç orto konumunda formil (Y=O) grubu içeren bileşiklerde gözlenmiş olduğundan çalışmamız bu yöne kaydırılmıştır.



Yaptığımız çalışma sonucunda molekül içi sikloadisyon tepkimesinde elde edilen trisiklik ürünlerin kararsız olduğu, siklobütanon halkasının dekarboksile olarak benzofuran türevi bileşikler oluşturduğundan anlaşılmıştır.



- I R=CH₃
- II R=C₂H₅
- III R=C₆H₅

Benzofuran türevi ürünlerin spektroskopik verileri:

I. Ürün için IR spektrumunda: 3050 cm⁻¹ aromatik hidrojenlerin gerilme bandları, 1620 cm⁻¹ furan halkasının C=C titreşim bandları, 1600 cm⁻¹ benzen halkasının C-C titreşim bandları, 1200 cm⁻¹ furan halkasının C-O-C titreşim bandları görülmektedir.

NMR spektrumunda :

δ = 2.5 ppm(s) CH₃ protonları

δ = 6.4 ppm(s) Ha protonları

δ = 7.0-7.8 ppm(m) aromatik protonları

II. Ürün için IR spektrumunda 3050 cm⁻¹ aromatik hidrojenlerin gerilme bandları, 1615 cm⁻¹ furan halkasının C=C titreşim bandları, 1600-1400 cm⁻¹ benzen halkasının titreşim bandları 1200 cm⁻¹ furan halkasının C-O-C titreşim bandları görülmektedir.

NMR spektrumunda :

$\delta = 1.5$ ppm(t) CH₃ protonları

$\delta = 2.8$ ppm(q) CH₂ protonları

$\delta = 6.5$ ppm(s) Ha protoları

$\delta = 7.0-8.0$ ppm(m) aromatik protonlar

III. Ürün için IR spektrumunda: 3050 cm⁻¹ aromatik hidrojenlerin gerilme bandları, 1620 cm⁻¹ furan halkasının C=C titreşim bandları, 1600-1400cm⁻¹ benzen halkasının titreşim bandları, 1200 cm⁻¹ furan halkasının C-O-C titreşim bandları görülmektedir.

E.N.= 121 °C Lt. E.N.= 120-121 °C'dir.

Kaynaklar

1. I.Marko ,S.B. Ronsman Intramolecular [2+2] Cycloadditions of ketenes an ketenimium salts to olefins J. Am. Chem. Soc., 1985,107, 2192-2194 .
- 2.W.T. Brady, Y.F.Giang, Intramolecular [2+2] Cycloadditions of Phenoxyketenes J.Org.Chem.1985,50,5117-5179 .
- 3.W.T.Brady,Y.F.Giang,A.P.Marchand, Intramolecular [2+2] Cycloadditions of Ketenes to Carbonyl Groups J. Org. Chem. 1987,523457-3461.



MARMARA
ÜNİVERSİTESİ

İZOKSAZOLİDİN-5-SPİROSİKLOPROPANLARIN ÇEVİRİLMESİ : NİTRON-METİLEN SİKLOPROPAN 1,3-DİPOLAR SİKLOKATILMA REAKSİYONUNDA REGİOSEÇİMLİLİK

Yaşar DÜRÜST (*), Alberto BRANDI (**), Francesco DE SARLO (**)

(* Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 61080 Trabzon, Türkiye)

(** Dipartimento di Chimica Organica "Ugo Schiff", Università di Firenze, Via G. Capponi 9, I-50121, Firenze, Italya)

THE REARRANGEMENT OF ISOXAZOLIDINE-5-SPIROCYCLOPROPANES: THE REGIOSELECTIVITY IN NITRONE-METHYLENOCYCLOPROPANE 1,3-DIPOLAR CYCLOADDITION REACTION

SUMMARY

The thermal rearrangement of isoxazolidine-5-spirocyclopropanes obtained by 1,3-dipolar cycloaddition of C,C-disubstituted nitrones and methylenecyclopropanes has been studied. Due to the lack of the hydrogen atom at the C-3 position of the isoxazolidine ring the azaheterocyclic ketones, tetrahydropyridones, structurally differentiated according to the starting dipoles and polarophiles, formed.

ÖZET

C,C-Disubstitue nitronlar ve metilen siklopropanların 1,3-dipolar siklo katılma reaksiyonlarından elde edilen İzoksazolidin-5-spirosiklopropanların ısıl çevrilmesi çalışıldı. İzoksazolidin halkasındaki C-3 karbonunun hidrojen atomuna sahip olmaması nedeniyle başlangıç dipollere ve polarofilere bağlı olarak farklı yapılarda azaheterohalkalı ketonlar, tetrahidropiridonlar elde edildi.

GİRİŞ

İzoksazolün-5-spirosiklopropanların ısıl çevrilmeleri azaheterohalkaların, özellikle indolizin ve kinolizidin gibi azotun köprübaşı konumunda olduğu alkaloidlerin sentezi için geçerli yeni bir yöntem sunmaktadır (1,2). Bu çalışmada çeşitli nitronların metilensiklopropanlara siklokatılmaları gerçekleştirilerek katılma ürünlerinin ısıl çevrilmeleri amaçlanmıştır.

DENEL BÖLÜM

A-Nitron-metilensiklopropan 1,3-dipolar siklokatılma reaksiyonu; İzoksazolidin-5-spirosiklopropanların elde edilmesi-Uygun ketonla N-metilhidroksilaminden hazırlanan nitron ve metilen siklopropan kuru benzen veya toluende kapalı bir tüpte 60-80 °C ürünleri karışımı flaş kolon

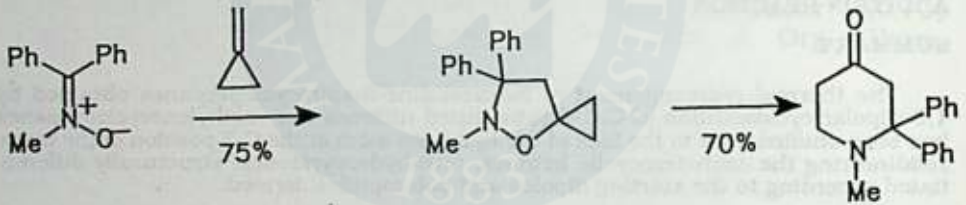
kromatografisi ile ayrılarak izoksazolidin-5-spirosiklopropanlar elde edildi.

B-İzoksazolidin-5-spirosiklopropanların ısasal çevrilmeleri; tetrahidropiridonların oluşumu-İzoksazolidin-5-spirosiklopropan FVT (Flaş Vakum Termolizi, 10^{-3} mm Hg, 300 - 400 °C) koşullarında buharlaştırılarak (25-180 °C) ele geçen ham ürün flaş kolon kromatografisi (silika jel) ile saflaştırıldı ve çevrilme ürünleri tetrahidropiridonlar elde edildi.

Elde edilen yeni bileşiklerin yapıları NMR (^1H , ^{13}C Varian Gemini 200 ve 50.3 MHz), GC-MS (Hewlett-Packard 5790-5970 A), MS (Carlo Erba QMD 1000), IR (Perkin Elmer 881) teknikleri kullanılarak aydınlatıldı. Kugelrohr damıtması için Büchi GKR-50 cihazı kullanıldı.

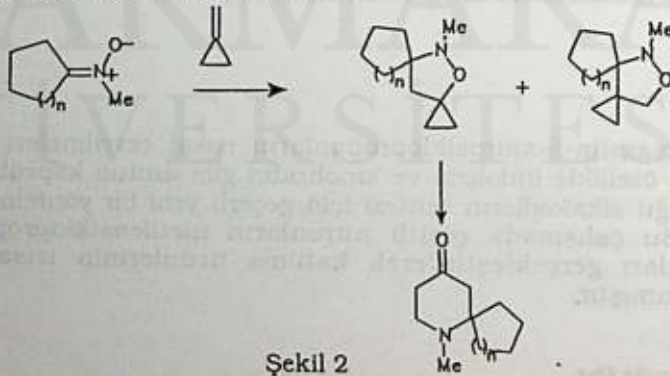
SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Nitronların metilensiklopropanlara 1,3-dipolar siklokatılmaları ile beklenen izoksazolidin-5-spirosiklopropanlar elde edildi. Örnek olarak; C,C-difenil-N-metilnitronun metilensiklopropana katılması sonucunda tek bir ürün oluştu (Şekil 1).



Şekil 1

N-Metil-siklohegzilidenamin-N-oksit ve N-metil-siklopentilidenamin N-oksitinin metilensiklopropana siklokatılmaları ile birbirine oranları 6:1 olarak bulunan izoksazolidin-5 ve izoksazolidin-4 spirociklopropan regioizomerler karışımı elde edildi (Şekil 2).



Şekil 2

İzoksazolidin-5-spirosiklopropanların verimleri başlangıç nitron bileşiği C,C-difenil-N-metilnitron olduğunda en yüksek bulunmuştur (% 75). Siklohegzan ve siklopentan halkası içeren nitronlardan oluşanlar ise oransal olarak daha düşük bir verimle elde edildiler. Bunun nedeni bu bileşiklerin oldukça uçucu bir yapıya sahip olmaları yanında başlangıç nitron

bileşiklerinin de daha az reaktif olmalarıdır.

Nitron-metilensiklopropan 1,3-dipolar siklokatalıma reaksiyonlarında beklenildiği üzere regioseçimlilik oldukça yüksek bir oranda gerçekleşti. İzoksazolidin-5-spirosiklopropanların tetrahidropiridonlara çevrilmeleri de regioseçimli bir nitelik taşımaktadır, yani sadece 5-regioizomerde siklopropan halkası seçimli olarak bölünmekte ve sekonder radikalik bir ara ürün oluşmaktadır. Daha sonra bu ara ürünün halka kapanmasına uğramasından tetrahidropiridon elde edilmektedir.

KAYNAKLAR

1. A. Brandi, S. Garro, A. Guarna, A. Goti, F. Cordero and F. De Sarlo, "Rearrangement of isoxazoline-5-spiro derivatives. 2. Synthesis and rearrangement of tetrahydroisoxazole-5-spirocyclopropanes. Preparation of precursors of quinoline, isoquinoline and indole alkaloids", *J. Org. Chem.*, 53 (1988) 2430-2434.
2. F. M. Cordero, A. Brandi, C. Querci, A. Goti, F. De Sarlo and A. Guarna, "Rearrangements of isoxazoline-5-spiro derivatives. 5. Diastereofacial selectivity in the cycloaddition of substituted five-membered cyclic nitrones and methylenecyclopropanes. Stereoselective synthesis of 3,5-substituted indolizines", *J. Org. Chem.*, 55 (1990) 1762-1767.

MARMARA
ÜNİVERSİTESİ

7- SÜBSTİTÜE SİKLOHEPTATRIEN (SHT) BİLEŞİKLERİNİN BENZİN ve p-BENZOKİNONLA SİKLOKATILMA REAKSİYONLARI

Abdullah MENZEK ve Metin BALCI

Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Erzurum - Türkiye

CYCLOADDITION REACTIONS OF 7 - SUBSTITUED CYCLOHEPTATRIENE (CHT) COMPOUNDS WITH BENZYNE AND p-BENZOQUINONE

SUMMARY

Compounds 1 and 2 were synthesized as 7-substitued CHT. The cycloaddition reactions of compounds 1 and 2 with benzyne were investigated. Reaction of benzyne with 1 gave 5 having norcaradiene (NOR) structure and reaction with 2 provided the isomer 3 and 4. 7 was obtained from the reaction of 2 with p-benzoquinone. 7 was also converted to 6 in the presence of acetic anhydride and pyridine.

ÖZET

7-Sübstitüe SHT bileşiği olarak 1 ve 2 sentezlendi. 1 ve 2 bileşiklerinin benzine süklokatilma reaksiyonları incelendi. Benzine 1 bileşiğiyle norkaradien (NOR) yapılarında 3 ve 4 izomerlerini verirken, 2 ile de NOR yapısında 5'i oluşturdu. NOR yapısında olan 7, 2'nin p-benzokinonla olan reaksiyonundan elde edildi. Daha sonra 7 püridin ve asetik asit anhidridli ortamda 6'ya dönüştürüldü.

GİRİŞ

Son 20 - 30 yılda üzerinde çalışılan konulardan biri de sükloheptatrien (SHT) - norkaradien (NOR) dengesidir (1). Bu çalışmalarda SHT ve SHT türevleri alınmıştır. Daha önceki çalışmalarda SHT 'nin benzine reaksiyonları araştırılmış, bu reaksiyonlarda [2+2], [2+4] ve En katılma

ürünleri elde edilmiştir(2). Burada elde edilen [2+4] katılma ürünü SHT yapısındadır. Bir SHT türevi olan dihidroheptalenin benzin ve diğer dienofillerle olan katılma reaksiyonları incelenmiş ve her iki SHT halkasına alt katılma ürünlerinin NOR yapısında olduğu belirlenmiştir(3). Bu çalışmada 7-sübstitüe SHT bileşiklerinin benzin ve p- benzokınonla olan siklokatılma reaksiyonlarının incelenmesi amaçlandı.

DENEL BÖLÜM

Exo - 7 - siyano - 2,5 - benzo - trisiklo [4 . 1 . 0 . 0^{1.6}] hepta - 3 - en 3 ve endo - 7 - siyano - 2,5 - benzo - trisiklo [4 . 1 . 0 . 0^{1.6}] hepta - 3 - en 4 'ün sentezleri 15,2 g (82,4 mmol) Benzendiazonyum-2 karboksilat hidroklorür, 3 g (25,6 mmol) 1, 300 mg AgNO₃, 160 ml 1,2 diklor etan ve mağnetik bar iki boyunlu 250 ml'lik bir balona kondu. Oluşan karışım 100 °C de ve N₂ altında 2 gün reflux edildi. Karışım banyoya konduktan sonra N₂ çıkarken karışımın rengi siyaha doğru gitti. Çözelti soğutuldu ve çözücüsü evaporatörde çekildi. Ham ürün silikejel kolondan eter/hekzan (1:9) ile elue edildi. Kolondan önce 3 sonra da 4 geldi. 3 ve 4 ürünleri ayrı ayrı eter/CHCl₃ den kristallendirildi. Toplam verim % 40 civarındadır. 3'ün erime noktası 163-165 °C ve 4'ün ki ise 108-110°C dir.

Exo - 7 - karbometoksi - 2,5 - benzo - trisiklo[4 . 1 . 0 . 0^{1.6}] hepta - 3 - en 5'in sentezi : 14,2 g (77 mmol) Benzendiazonyum -2- karboksilat hidroklorür, 2,89 g (19,26 mmol) 2, 300 mg AgNO₃, 180 ml 1,2 diklor etan ve mağnetik bar iki boyunlu 250 ml'lik bir balona kondu. Oluşan karışım 100 °C de ve N₂ altında 2 gün reflux edildi. Karışım banyoya konduktan sonra N₂ çıkarken, karışımın rengi siyaha doğru gitti. Çözelti soğutuldu ve çözücüsü evaporatörde çekildi. Ham ürün silikejel kolondan eter/hekzan (1:9) ile elue edildi. Ham ürün 5 eter/CHCl₃ den kristallendirildi. Verim % 45 civarındadır. Erime noktası 101-103°C dir.

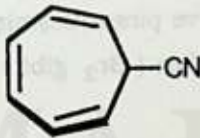
10 - Karbometoksi - tetrasiklo [6 . 3 . 2 0 2 , 7 . 0^{9.11}] trideka - 3 , 5 - dion - 4 , 12 - dien 7 :540 mg (5 mmol) p- benzokınon ile 1,0 g (6,67 mmol) 2 5 ml CHCl₃ de çözüldü. Oluşan çözelti sonokimya cihazında (Baranson 3200) ve 40 °C de 7 gün reaksiyona sokuldu. Soğutulan çözeltinin çözücüsü evaporatörde çekildi. Ham ürün eter

/ CHCl_3 den kristallendirildi. % 89 verimle 1,15 g 5 elde edildi. Erime noktası 154-156 °C dir.

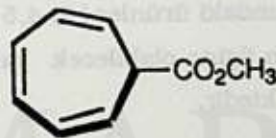
Exo - 7 - karbometoksi - 2,5 - p - diasetoksibenzo - trisiklo [4.1.0.0^{1,6}] hepta - 3 - en 6. 450 mg (1.74 mmol) 7.2.0 g (19,6 mmol) asetik anhidrid , 2,5 g pirdin ve mağnetik bar eşliğinde 25 ml'lik bir balona kondu. Oluşan karışım oda sıcaklığında 12 gün karıştırıldı. Reaksiyon karışımı seyreltik soğuk HCl çözeltisine döküldü. Soğuk karışıma 50 ml CHCl_3 katılarak 15 dakika karıştırıldı. CHCl_3 lü kısım ayırma hunisinden ayrıldı ve 2 defa daha 300 ml suyla yıkandı. Çözelti kurutulduktan sonra çözücüsü evaporatörde çekildi. % 60 verimle 482,5 g 6 ürünü elde edildi.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

7-Siyanosikloheptatrien (1) ve 7-karbometoksisikloheptatrien (2) sikloheptatrienden çıkılarak sentezlendi(4). 1 ve 2 bileşiklerinin benzine reaksiyonları gerçekleştirildi ve reaksiyon ürünleri olarak NOR yapısında 3, 4,



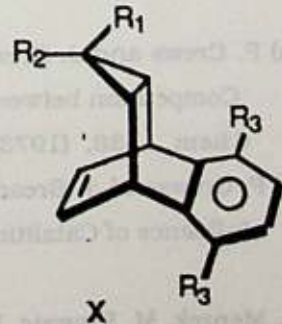
1



2

ve 5 bileşikleri elde edildi. 3 ve 4 bileşikleri birbirinin izomeridir. 1 bileşiminin

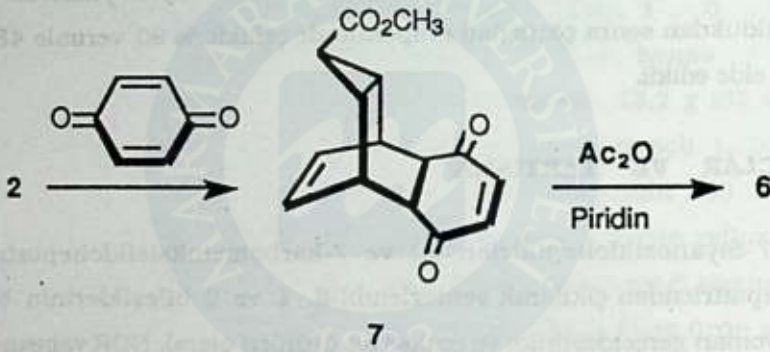
X	R ₁	R ₂	R ₃
3	CN	H	H
4	H	CN	H
5	CO ₂ CH ₃	H	H
6	CO ₂ CH ₃	H	OAc



SHT - NOR dengesinde exo ve endo olmak üzere iki tane yapı vardır. Benzin, bu iki NOR yapısından exo 'ya katılarak 3 'ü , endo'ya katılarak da 4'ü vermiştir. 2 bileşiğinin p-benzokindonla olan siklokatılma reaksiyonlarından 7 ürünü elde edildi.

Elde edilen 7 ürünü de oda sıcaklığında asetik asit, anhidrit (Ac_2O) ve piridinli ortamda 6 ürününe dönüştürüldü (5).

Elde edilen ürünler kromatografik metotlarla ayrıldı ve yapıları spektroskopik yöntemlerle belirlendi.



X yapısındaki ürünler (3, 4,5 ve 6) gerilimli ve piramitleşmiş alkenlerdir. Bu bileşiğin ilginç olabilecek katılma reaksiyonları (Br_2 gibi) verebileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

1. M. Balcı, " Cycloheptatrien - Norcaradiene Equilibrium ", *Turk. J. Chem* (1992) Baskıda.
2. a) P. Crews and J. Bread, "Cycloadditions of Benzynes with Cyclic Olefins. Competition between 2+4, Ene and 2+2 Reaction Pathways", *J. Org. Chem.*, 38, (1973) 522-528.
b) P. Crews and J. Bread, "Cycloadditions of Benzynes with Cyclic Olefins. Influence of Catalytic Silver", *J. Org. Chem.* 38, (1973) 529-532
3. A. Menzek, M. Krawiec, W.H. Watson and M. Balcı, "Synthesis of Systems

Containing Strained Double Bonds: Cycloaddition Reactions of *trans*-3,8-Dihydroheptalene", **J . Org . Chem** 56 (1991) 6755-6758.

4. W. Adam, M. Balcı and J. Rivera, "A Convenient Synthesis of Homobenzoquinone", **Synthesis** 10 (1979) 807-808.

5. A. Padwa and D.C. Dean, "Azomethine Ylide Generation via the Rhodium(II)- Induced Cyclization Reaction of Oxidmino α -Diazo ketones", **J . Org . Chem** .55 (1990) 405-406.



MARMARA ÜNİVERSİTESİ

(E), (Z)-3,5-DİMETİL-2,4-HEKZADİENOİK ASİDİN SENTEZİ

Kemal YELEKÇİ

Marmara Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
Göztepe - İSTANBUL**SYNTHESIS OF (E), (Z)-3,5-DIMETHYL-2,4-HEXADIENOIC ACID****SUMMARY**

2,4-Hexadienoic acid derivatives are very valuable intermediates in polymer synthesis as well as in many organic reactions. We aimed to synthesize this compound with a minimum number of steps and effective stereochemical control for each geometrical isomer to produce the (Z) and (E) acids. The most crucial step of the synthesis is the placement of a double bond in a stereospecific manner.

The scope of the method and its application to the preparation of the required (Z) acid is fully described.

ÖZET

2,4-Hekzadienoik asit türevleri hem polimer sentezlerinde hemde birçok organik tepkimelerde önemli bir ara üründür. Bu asidin (E) ve (Z) formlarının minimum tepkime basamağı ve etkili stereokimyasal kontrollü sentezi bu çalışmada amaç edinilmiştir. Sentezdeki en önemli basamak ise istenilen çift bağın stereospesifik bir şekilde bileşiğe yerleştirilmesidir.

Metodun kapsamı ve (Z) asidinin hazırlanmasına uygulanması detaylı bir şekilde açıklanmıştır.

GİRİŞ

(E), (Z)-3,5-Dimetil-2,4-hekzadienoik asid hem polimer kimyasında hemde sentetik organik kimyada önemli ara ürünlerden biridir (1). Asidin daha kararlı olan Z izomerinin sentezi E izomerine göre daha zordur. Elde edilen Z izomerinin esterinin hidrolli sırasında önemli miktarda E izomeri oluşmaktadır. Saf Z izomerinin etkili sentezi ekonomik açıdan çok önemlidir. Çalışmalarımızda saf Z izomerinin sentezi, elde edilen hidroksi esterin tilyonil klorür ile laktonlaştırıldıktan sonra sodyum hidroksit ile işleme sokulmasıyla başarılmıştır.

DENEL BÖLÜM

Mikroanalizler Galbraith laboratuvarlarında (Knoxvill, Tennessee) yaptırılmıştır. Erime noktaları Thomas-Hoover aletinde ölçülmüş ve düzeltilmemiştir. Nükleer magnetik rezonans spektrumları (NMR) JEOL FX 90 Q spektrometresinde alınmıştır. CDCl₃ çözücü ve tetrametilsilan iç standart olarak kullanılarak kimyasal kaymalar ppm olarak kayıt edilmiştir.

Etil 3,5-dimetil-3-hidroksi-4-hekzenoat (1) (2) : 50 mL üç boyunlu bir balon mekanik bir karıştırıcı, damlatma hunisi ve kalsiyum klorür kurutma

tüpü ile donatıldıktan sonra içerisine 3,28 g (50 mmol) aktifleştirilmiş çinko tozu eklenmiştir². Damlatma hunisine ise 8,5 g (50 mmol) etil bromoasetat ve 4,9 g (50 mmol) mesitil oksit karışımı yerleştirilmiştir. Çinko tozları kuru benzen ile kaplanarak yaklaşık 1 mL damlatma hunisindeki karışımdan ilave edilmiştir. Tepkime başlayıncaya kadar balon yavaşça ısıtılmıştır. Karıştırmaya başlanılarak ekleme hunisindeki geriye kalan karışım, ortamın aşırı ısınmamasını sağlayacak şekilde eklendi. Ekleme tamamlandıktan sonra karışım 30 dak. daha kaynatıldı. Karışım buz banyosunda soğutulduktan sonra 2,5 g derişik H₂SO₄, 7,5 g su ve 2,5 g buz karışımı ile hidroliz edildi. Organik faz ayrıldı ve sulu faz 1,5 mL benzen ile ekstrakte edildi. Organik fazlar birleştirilerek Na₂SO₄ ile kurutuldu. Benzen fazı saflaştırılmadan bir sonraki işlemde direkt olarak kullanıldı.

Etil 3-metilen-5-metil-4-hekzanoat (2) (3) Bileşik 1' in benzen çözeltisi mekanik karıştırıcı, termometre ve geri soğutuculu 100 mL ' lik bir balona yerleştirildi. Çözelti karıştırılırken 3,75 g P₂O₅ kısımlar halinde dikkatlice balona eklendi. Tepkime başlayıncaya kadar balon hafifçe ısıtıldı ve sıcaklık bir saat boyunca 60 -70 ° C 'de tutuldu. Tepkime karışımı buz banyosunda soğutuldu ve koyu kahverengi çözelti, balonun iç çeperlerine yapışmış olan fosforik asitten ayrıldı. Benzen döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Bakiye distillendi ve 4,35 g (iki basamak için % 51 verim) ürün elde edildi. kn. 78-80 ° C (9 mm Hg).

Etil (Z) -3,5-dimetil-2,4-hekzadienoat (3) : Geri soğutuculu ve mekanik karıştırıcılı üç boyunlu bir balona 16,7 mL etanol ve 0,13 g taze kesilmiş sodyum metali dikkatlice eklendi. Sodyum tamamen çözüldükten sonra 5,0 g bileşik 2 tepkime kabına eklendi. Karışım 3 saat süre ile geri soğutucu altında refluks edildi. Çözücü döner buharlaştırıcıda uçuruldu. Bakiye soğuk suda çözüldü ve sonra hemen eter ile ekstrakte edildi. Eter fazı MgSO₄ ile kurutuldu. Eter döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve 3,2 g (% 64 verim) bileşik 3 elde edildi.

(Z) - 3,5-Dimetil-2,4-hekzadienoik asit (6) : Bir önceki işlemde eter ekstraksiyonundan geriye kalan bazik çözelti buz banyosunda soğutuldu ve 2N HCl ile pH 2 'ye asitlendirildi. Yağimsı tabaka eter ile ekstrakte edilerek MgSO₄ ile kurutuldu. Eterin uzaklaştırmasından sonra iğne şeklinde sarımsı kristaller elde edildi. % 90 etanol ile tekrar kristallendirilmesi 0,6 g (iki işlem için % 14 verim) ürün 4 'ü verdi. en. 67 ° C . ¹H-NMR (ppm) : 11,06 (t, 1H-1), 6,41 (t, 1H-4), 5,68 (t, 1H-2), 2,03 (t, 3 H-8), 1,85 (t, 3 H) 1,75 (t, 3 H) . Proton spektrumunu yayınlanmış değerlerle uyum içerisindedir (4). ¹³C-NMR (ppm) : 171,23 (C1) 155,82 (C2), 139,18 (C3), 124,08 , 116,98, 27,09, 25,46, 20,26.

(E) - 3,5-Dimetil-2,4-hekzadienoik asit (5) : Geri soğutuculu 50 mL iki boyunlu bir balona 15 mL % 90 'lık oetanol, 0,31 g NaOH ve 2 g bileşik 4 eklendi. Tepkime karışımı 9 saat refluks edildi. Alkol döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve bakiye su ile karıştırıldı. Tepkimeye girmeyen organik kalıntı eter ile iki defa ekstrakte edildi ve atıldı. Sulu faz ise pH 2 değerine kadar asitlendirildi. Organik faz ayrıldı ve sulu faz ise iki defa 10 mL eter ile ekstrakte edildi. Organik fazlar birleştirilerek MgSO₄ ile kurutuldu. Eter döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı ve geriye kalan bakiye buz banyosunda soğutulularak kristallendirildi. Asetonda tekrar kristallendirilmesi ise 0,8 g (% 80 verim) prizma şeklinde bileşik 5 'i verdi.

en. 92 °C ¹H-NMR (ppm) : 11,95 (t, 1H-1), 5,77 (t, 1H), 5,70 (s, 1H) 2,26 (t, 3H), 1,85 (t, 6H). Proton spektrumu yayınlanmış değerlerle uyum içerisindedir (4)
¹³C-NMR (ppm): 172,84 (C1), 156,90, 128,63, 117,19, 27,14, 20,05, 19,83.

4,6,6- Trimetilokza-3-siklohekzen-2- on (7) : Bileşik 1'in benzen çözeltisi 12,5 mL 'ye değiştirildi. 1,3 mL tıyonil klorür bir şırınga yardımı ile 60 dak. süre içerisinde eklendi. Tepkime karışımı hiç bulutlu nokta kalmayana kadar refluks edildi. Tepkime karışımı oda sıcaklığını kadar soğutuldu ve uçucu maddeler döner buharlaştırıcıda uzaklaştırıldı. Kalan bakiye 100- 110 °C (0,005 mm Hg)' de damıtıldı. 47 g (iki basamak için % 67 verim) bileşik 6 elde edildi. Laktonun kristallenmesi buz banyosunda gerçekleştirildi. Oda sıcaklığının altında eridiği için erime noktasının tesbiti için herhangi bir çaba harçanmadı. ¹H-NMR (ppm) : 5,80 (t, 1H), 2,35 (t, 2H) . 1,97 (t, 3H), 1,43 (t, 6H). ¹³C-NMR (ppm) : 164,43, 155,28, 115,46, 79,10, 40,58, 27,36, 22,92.

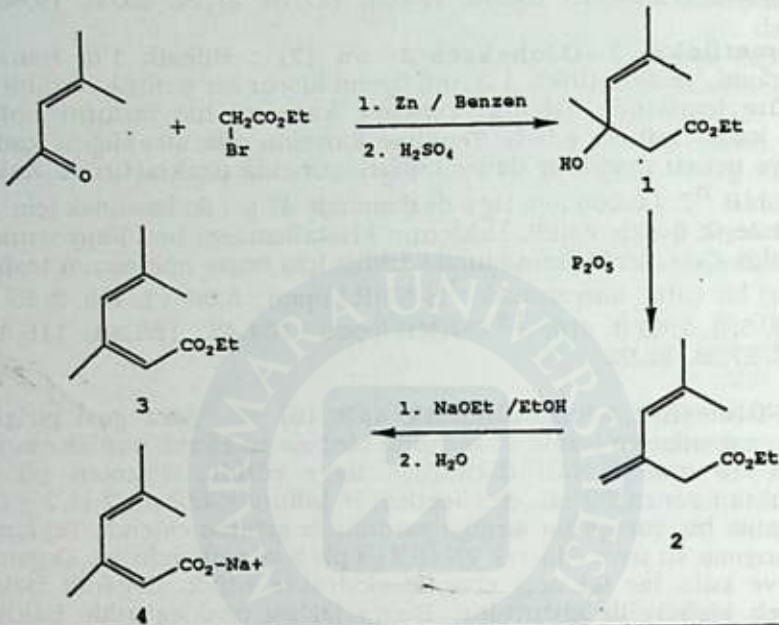
(Z) - 3,5-Dimetil-2,4-hekzadienoik asit (6) : Azot gazı girişli, soğutuculu ve damlatma hunili üç boyunlu bir balona 15 mL mutlak etanol ve 1,4 g (30 mmol) NaH dikkatlice ilave edildi. Hidrojen çıkışı tamamlandıktan sonra 90 mL eter içerisinde bulunan bileşik 7 (4,2 g 30 mmol) 2 saatlik bir sürede bir şırınga yardımı ile ortama eklendi. Tepkime sonunda karışıma su ilave edilerek 2N HCl ile pH 2 ye asitlendirildi. Organik faz ayrıldı ve sulu faz iki defa eter ile ekstrakte edildi. Organik fazlar birleştirilerek MgSO₄ ile kurutuldu. Eterin fazlası uzaklaştırıldı. Bakiye sıcak suda çözülerek süzüldü. Süzüntünün soğutulması 2,8 g (% 67 verim) bileşik 6 'ü verdi.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA : Reformatsky tepkimesinden sonra elde edilen hidroksi asidin ,1, dehidrasyonu doymamış ester 2 'yi vermiştir. Ester 2 'nin etanolik sodyum etoksit ve bunu takiben su ile işleme sokulması ester 3 'ü ve sodyum tuzu 4 'ü vermiştir. (Şema 1) 4 'ün asitlendirilmesi Z asidi 6 'yı verdiği halde, eseter 3 saponifiye edildiğinde, aynı zamanda çift bağda da izomerizasyon meydana gelmiş ve sadece E asit, 5, elde edilmiştir (Şema 2). Bu yoldan elde edilen Z asidin verimi oldukça düşüktür (% 2,5). Sadece Z asidin elde edilebilmesi için hidroksi ester tıyonil klorür ile laktonlaştırılıp NaOEt ile açıldığında seçimli olarak sadece Z asidi elde edilmiştir (toplam verim % 45) (Şema 3).

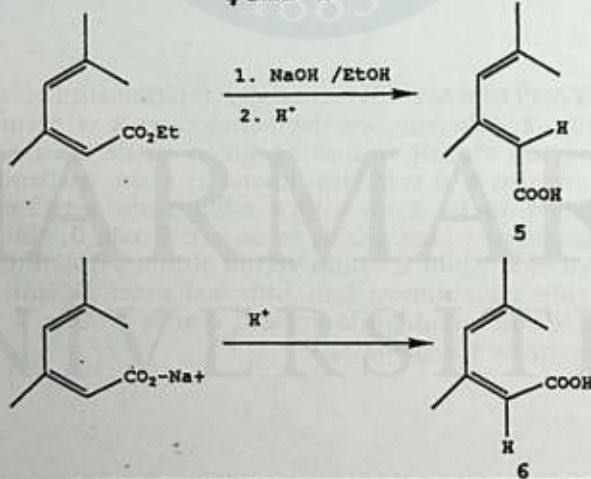
KAYNAKLAR

1. K. Yelekçi, " Ph. D. Thesis, Ohio University, Athens, Ohio, December 1987 "
2. F. Korte, D. Scharf, " Zur Darstellung und Stereochemie der 3,5-Dimethyl- und 2,3,5-Trimethyl-sorbinsäure und deren Ester". *Chem. Ber.* (1962), 443-454.
3. J. Sylvestre, G. Linstrumelle, " 1. Acides (±) cis homocarbone et (±) iso cis chrysanthème-dicarboxylique ", *Bull. Soc. Chim.* (1966), 11, 3490-3498
4. J. Besida, R.F. C. Brown, S. Colmanet, D.N.Leach, *Aust. J. Chem.* (1982), 35,1375- 1387.

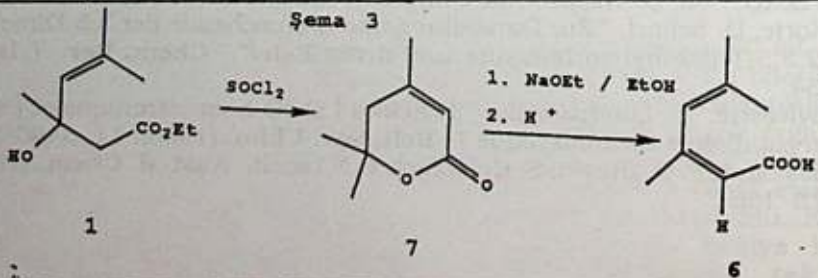
Şema 1



Şema 2



Şema 3



BAZI N-ALKİL NİTRO ANTRANİLİK ASİT TÜREVLERİNİN HAZIRLANMASI

Halil HOŞGÖREN (*) ve Giray TOPAL (**)

(*) Dicle Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Diyarbakır-Türkiye

(**) Dicle Ünlv. Eğitim Fakültesi Kimya Eğitimi Anabilim Dalı Diyarbakır- Türkiye

PREPARATION OF SOME N-ALKYL NITRO ANTHRANILIC ACID DERIVATIVES**SUMMARY**

Three new nitro derivatives of N-alkylanthranilic acid which used in metal extraction, were prepared for increasing the acidic strength of N-alkylanthranilic acid derivatives. The structure of compounds were identified IR, ^1H nmr, ^{13}C nmr and elemental analyses results.

ÖZET

Metal ekstraksiyonunda kullanılan N-Alkilantranilik asit türevlerinin asitlik gücünü artırmak amacıyla, N-Alkilantranilik asitin üç yeni nitro türevi hazırlandı. Maddelerin yapıları IR, ^1H nmr, ^{13}C nmr spektrumları ve elemental analiz sonuçlarıyla doğrulandı.

GİRİŞ

Karboksilik asitlerin solvent ekstraksiyonunda kullanımları ilk defa Fletcher tarafından gösterilmiştir (1). Daha sonra karboksilik asitlerin asitlik gücü artırılmış α - Halojen türevlerinin bu amaçla kullanıldıkları görüyoruz(2). Kendi çalışmalarımızda karboksilik asitlerin amino türevlerinin metal ekstraksiyonunda kullanılabilirlikleri araştırıldı. Bu amaçla hazırladığımız N-oktilantranilik asitin metal ekstraksiyonunda kullanımı, daha önceki çalışmamızda detaylı bir şekilde incelendi(3,4,5).

Bu çalışmada Hidrometalurjik yöntemlerle ele geçen asidik liç çözeltilerinden metal kazanımına daha elverişli reaktifler geliştirilebilmek amacıyla asitlik gücü artırılmış N-alkilantranilik asit türevleri hazırlamak ve bu şekilde daha asidik pH'larda ekstraksiyon yapmak amaçlanmıştır (ekstraksiyon sonuçları rapor halinde sunulmuştur).

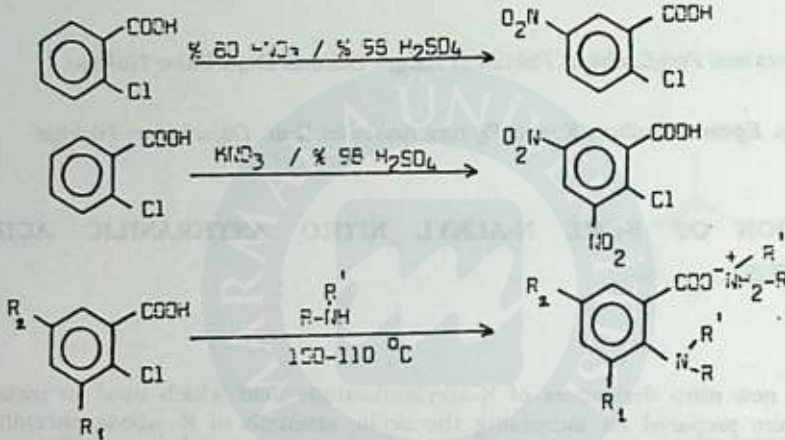
DENEL BÖLÜM

N-alkil nitro antranilik asit türevlerini hazırlamada o-kloro benzoik asidin mono nitro türevi için Bergman ve arkadaşları (6), dinitro türevi

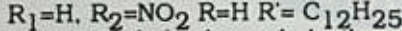
için Jensen ve arkadaşları (7) tarafından verilen yöntem kullanıldı. Daha sonra o-kloro benzoik asitin nitro türevleri ile uzun zincirli aminler kullanılarak literatürdeki Kosary ve arkadaşları (8) tarafından verilen yöntemle göre N-alkil ve N, N-dialkil nitro antranilik asit türevleri hazırlandı.

Aşağıdaki reaksiyonlara göre hazırlanan üç yeni N-alkil nitro antranilik asit türevinin elemental analiz sonuçları Tablo-1'de, IR, ¹H nmr ve ¹³C nmr sonuçları da sırasıyla Tablo-2,3 ve 4'te verilmiştir.

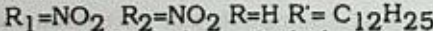
Genel reaksiyon denklemleri:



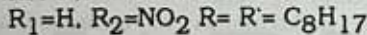
1. 5-nitro N-dodesil a.a. dodesil amin tuzu:



2. 3,5-dinitro N-dodesil a.a. dodesil amin tuzu:



3. 5-Nitro N,N-Dioktil a.a. Dioktil amin tuzu:



1. 2-Kloro-5 Nitro Benzoik Asitın Hazırlanması:

250 ml'lik balon içerisinde 0 °C ta 8 gr (% 80 lik) HNO₃ ve 20g (%98 lik) H₂SO₄ karışımı, 80 g Derişik H₂SO₄ te çözülmüş 16 g o-kloro benzoik asite karıştırılarak katıldı. Oda sıcaklığında 12 saat ve birkaç dakika da 60 °C ta geri soğutucu altında ısıtılarak reaksiyon karışımı 400 g buz üzerine döküldü. Çöken katı kısım süzülerek sudan kristallenirildi. 2-kloro-5-nitro benzoik asit 15.3 g elde edildi. Verim % 79.5 olup e.n: 158 °C dir.

2. 2-Kloro-3,5-Dinitro Benzoik Asitın Hazırlanması:

Yağ banyosuna daldırılmış 250 ml'lik bir balon içerisinde 10 g o-kloro benzoik asit 200 g H₂SO₄ içerisinde bir geri soğutucu altında oda sıcaklığında karıştırılarak çözüldü. Daha sonra ısı 80 °C ye çıkarıldığında 33 g KNO₃ yavaş yavaş ilave edildi ve 1.5 saat 120-140 °C de tutuldu. Bu karışım yavaş yavaş karıştırılarak 400 g buz üzerine döküldü. Çöken-katı süzüldü ve alkolden kristallenirildi. Verim 13 g e.n: 195-196 °C dir.

3. N-Dodesil 5-Nitro Antranilik Asidin Hazırlanması:

12 g (0,058 mol) 2-kloro-5-nitro benzoik asit 250 ml lik iki boyunlu bir balon içerisinde 53.7 g (0.29 mol) Dodesil amin ile magnetik karıştırıcı ısıtıcı ile geri soğutucu altında 3 saat yağ banyosu üzerinde 100-120 °C de ısıtıldı.

Çöken katı önce benzen daha sonra alkol ve petrol eterinden kristallenirildi. 15.8 g sarı kristalize bir ürün ele geçti. Verim % 79.5 olup e.n: 86-

88 °C dir.

4. N-Dodesil-3,5-Dinitro Antranilik Asit'in Hazırlanması:

10 g (0,04 mol) 3,5-Dinitro-2-kloro benzoik asit ve 0.2 mol Dodesil amin karışımı 150 ml alkol içinde, spiralli geri soğutucu takılmış 250 ml lik bir balon içerisinde yağ banyosunda 100-110 °C de 4 saat ısıtıldı. Çözelti daha sonra kristallenmeye bırakıldı.

Ele geçen sarı kristal madde alkolden tekrar kristallendirildi. Verim 13,5 g (% 84) e.n: 108-110 °C dir.

5. 5-Nitro-N,N-Dioktilantranilik Asit'in Hazırlanması

30.2 g (0,15 mol) 2-kloro-5 nitro benzoik asit 250 ml lik iki boyunlu bir balon içerisinde 181 g (0,75 mol) N,N-Dioktil amin ile yağ banyosu içerisinde ve geri soğutucu altında 100-110 °C de yaklaşık 2,5-3 saat ısıtıldı.

Çöken sarı renkli katı madde petrol eterinden kristallendirildi. Verim 37 g (% 60,5) e.n: 78-80 °C dir.

Tablo-1.N-Alkil Nitro Antranilik Asit Türevlerinin Element el Analiz Sonuçları

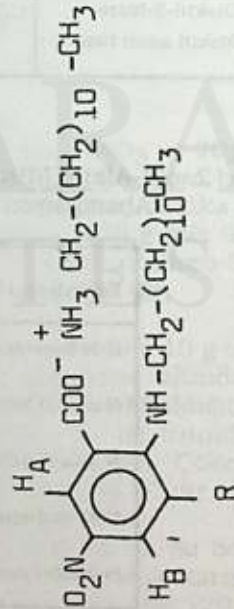
Maddenin Adı	Kapalı Formülü	ç.n C	Element Analizi					
			Teorik (%)			Deneysel (%)		
			C	H	N	C	H	N
5-Nitro N-Dodesil a.a. Dodesil amin tuzu	$C_{31}H_{57}N_3O_4$	86-88	70,13	11,58	7,77	69,53	11,25	7,85
3,5-Dinitro N-Dodesil a.a. Dodesil amin tuzu	$C_{31}H_{56}N_4O_6$	108-110	64,13	9,65	9,65	63,66	9,79	9,4
N,N-Dioktil-5-Nitro a.a. Dioktil amin tuzu	$C_{39}H_{73}N_3O_4$	78-80	72,33	11,28	11,28	71,99	11,96	6,98

Tablo 2. N-Alkil Nitro Antranilik Asit Türevlerinin Karakteristik IR Absorpsiyon Bandlarına ait Dalga Sayısı Değerleri

Fonksiyonel Grup	IR Absorpsiyon Ptki (cm^{-1})
C-H Esnemesi	2967
N-O Simetrik Esnemesi	1345
N-O Asimetrik Esnemesi	1520-1530
COO ⁻ Anyonu	1650-1550
Sekonder Amin N-H Esnemesi	3340

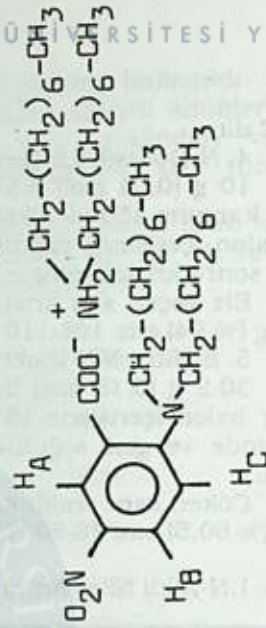
Tablo 3. N-Alkil Nitro Antranilik Asit Türevlerinin CDCl₃ İçinde Bruker AC 200L Model 200 MHz Proton nmr Spektrumlarından Elde Edilen Kimyasal Kayma Değerleri

Maddelerin Adı	Alifatik -CH ₂ -ppm	-N-CH ₂ -ppm	Alifatik -CH ₂ -ppm	Alifatik -CH ₂ -ppm	Aromatik			COOH
					H _A	H _B	H _C	
5-Nitro N,N-Dioksil Antranilik Asit Dioksil anilin tuzu (DONA)	1,3 (4S H)	2,8 (4 Htt)	0,9 (12 Htt)	8,3 (Htt) J _{AB} =2,69 meta coup.	8,2 (Htt) J _{BC} =9,22 orto coup. J _{AB} =2,96 meta coup.	6,8 (Htt) J _{BC} =9,22 orto coup.	Çözünmedi	
5-Nitro N-Dioksil Antranilik Asit Dioksil anilin tuzu (NINDA)	1,3 (4S H)	3,2 (1 Ht)	0,9 (6 Htt)	8,66 (Htt) J _{AB} =2,72 meta coup.	8,1 (Htt) J _{BC} =9,37 orto coup. J _{AB} =2,72 meta coup.	6,48 (Htt) J _{BC} =9,37 orto coup.	9,42 yayvan	
3,5-Dinitro N-Dioksil Antranilik Asit Dioksil anilin tuzu (DINDA)	1,2 (40 H)	2,9 (2 H) yarılmanmış	0,0 (6 Htt)	8,82 (Htt) J _{AB} =2,78 meta coup.	8,02 (Htt) J _{AB} =2,78 meta coup.		10,24 yayvan	



R=H_C NINDA

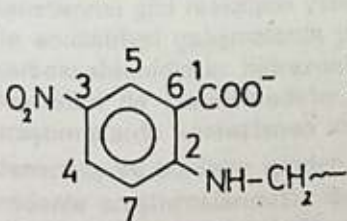
R=-NO₂ DINDA



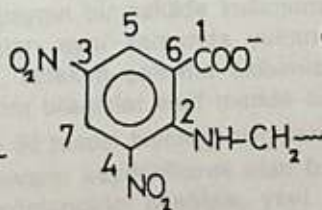
DONA

Tablo 4. N-Alkil Nitro Antranilik Asitlerin $CDCl_3$ İçinde Bruker AC 200 L Model 50 MHz. nmr Spektrometresiyle Alınmış ^{13}C Decoupled Spektrumlarına ait Kimyasal Kayma Değerleri (ppm olarak).

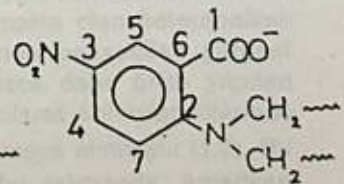
Karbon no	AROMATİK KARBONLAR			
	NİNDA ppm	DİNDA ppm	DONA ppm	NDA ppm
1	173.97	172.00	173.80	173.80
2	155.13	149.04	152.73	151.89
3	135.14	135.13	137.44	135.55
4	129.04	133.19	129.33	132.63
5	128.54	130.32	126.22	114.29
6	115.27	126.33	124.78	111.32
7	109.96	121.06	115.72	108.28
ALİFATİK KARBONLAR				
	43.06	46.40	52.21	42.87
	39.88	40.21	47.80	31.91
	31.92	31.90	31.71	29.60 X ₁
	29.67	30.02	29.23	
	29.39	29.64	27.49	
	29.15	29.34	27.05	
	28.24	28.26	26.48	
	27.26	26.90	22.53	29.11 X ₂
	26.57	26.59	13.95	27.15
	22.68	22.67		22.68
	14.10	14.08		14.21



(NINDA)



(DINDA)



(DONA)



Daha önce sentezlediğimiz N-Alkilantranilik asit türevlerinde 8 alifatik karbonlu NOA ve 12 alifatik karbonlu NDA'nın herbirinde alifatik düz zincirin karbon iskeletine ait 6 şar pik çıkmaktadır. Nitro türevlerinde NOA ve karşılık gelen DONA'da 9 pik; NDAYA karşılık gelen NINDA ve DINDA'da 11 pik çıkmaktadır. N-Alkil nitro antranilik asit türevlerinde pik sayısının fazla çıkması, iki farklı alifatik zincir yapısına sahip olmalarından kaynaklanmaktadır. Eşit uzunluktaki alifatik karbon zincirlerinden birisi halkadaki amino gurubuna bağlanırken, diğerinin, nitro türevlerinin artan asitliklerine bağlı olarak reaksiyonda kullanılan uzun zincirli aminin karbonsilat tuzu şeklinde bağlanması sonucu kimyasal kayma bakımından iki farklı alifatik karbon iskeletinin spektrumunda gözlenmesine yol açmıştır.

Bu durum nitro türevlerinin uzun zincirli amin tuzları şeklinde olduklarını göstermektedir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Hazırladığımız N-Alkil nitro antranilik asit türevleri, literatürde verilen yöntemler, spektroskopik veriler ve elementel analiz sonuçlarına göre kullanılan aminlerin tuzları şeklinde ele geçmektedir.

Maddelerin uzun zincirli amin tuzlarından kurtarılması için ayrıca çalışma yapılmamıştır. Hazırlanan maddeler, tuzları halinde sıvı-sıvı ekstraksiyonunda kullanılmıştır. Sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile ilgili sonuçlar ayrı bir çalışma halinde sunulmuştur.

REFERANSLAR

1. J.M. Fletcher "Extraction and Refining of Rarer Metals" I.M.M. London (1957) 15.
2. R. Blumberg, P. Melzer, "VII International Mineral Processing Congress", Gordon and Breach, New York (1964), 139.
3. H. Hoşgören, G. Topal "N-Oktil Antranilik Asitin Benzendeki Çözeltisiyle Cu (II), Ni (II), Co(II) ve Cu (II)-Co(II); Cu (II)-Ni(II) Karışımlarının Solvent Ekstraksiyonu *Doğa Tr. J. of Chemistry* 14-3 (1990), 189-195.
4. H. Hoşgören, G. Topal "Bazı N-Alkilantranilik Asit Türevlerinin Hazırlanması *Doğa Tr. J of Chemistry* 14-4, (1990), 303-309.
5. H. Hoşgören, C. Hamamcı, G. Topal "Benzen İçindeki N-Alkilantranilik Asit Türevleri ile Cu (II) İyonunun Sıvı-sıvı Ekstraksiyonuna İnert Tuz Etkisi *Doğa Tr. J. of Chemistry*, 15-1, (1991), 16-21.
6. E.D. Bergman, and S. Berkoviç, *J. Org. Chemistry*, 26 (1961), 919-923.
7. Jensen et all., *Acta Chemica Scandinavica*, 4 (1950), 392-393.
8. J. Kosary., J.K. Szabo, E. Kasztreiner, *Pharmazie*, 37 (7), 1982, 484-486.

KİNOLİN-4- VE KİNOLİN-8-KARBOKSALDEHİDİN SUBSTİTUE-HİDRAZONLARI

Şeniz KABAN ve Ercan AYDEMİR

Yıldız Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü

Şişli-80270, İstanbul-Türkiye

SUBSTITUTED HYDRAZONES OF QUINOLINE-4- AND QUINOLINE-8-CARBOXALDEHYDES

SUMMARY

Two heterocyclic carboxaldehydes and a series of substituted phenylhydrazines have been prepared in the first part of this study which have been started to produce some typical hydrazones for the purpose of making a remarkable contribution to the classes of biologically important compounds. Then eight new hydrazones have been synthesized in good yields and the effects of the substituents in the reactions have been investigated. Structural assignments of the obtained products have been characterized by their microanalyses, UV-, IR-, ^1H NMR- and MS- spectral data.

ÖZET

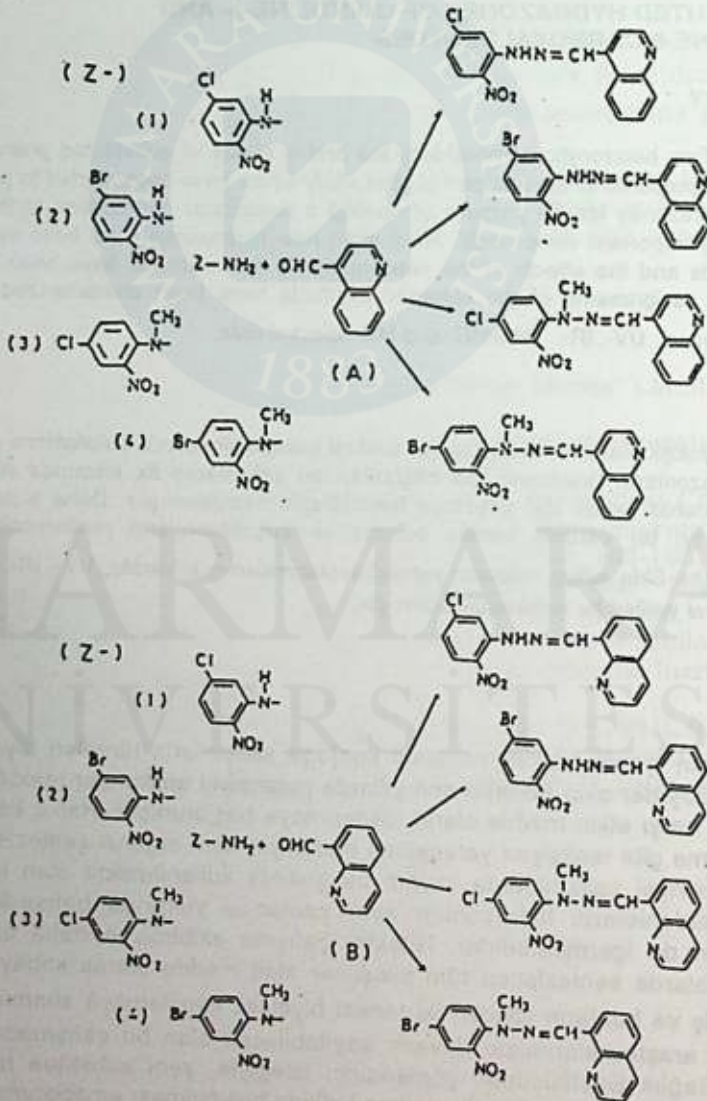
Biyolojik olarak önemli bileşikler sınıfına belirgin bir katkıda bulunabilme amacıyla bazı tipik hidrazonların üretilmesi için başlatılan bu çalışmanın ilk kısmında iki heteroçiklik karboksaldehid ve bir dizi substitue fenilhidrazin hazırlanmıştır. Daha sonra sekiz yeni hidrazon iyi bir verimle sentez edilmiş ve substituentlerin reaksiyonlardaki etkisi incelenmiştir. Elde edilen ürünlerin yapısal saptanmaları mikroanaliz, UV-, IR-, ^1H NMR-, ve MS-spektral verileri ile karakterize edilmiştir.

GİRİŞ

Azot içeren halkalı yapıdaki konjuge sistemlerin türevleri biyolojik olarak önemli bileşikler olup özellikle son yıllarda potansiyel antikanser reaktifleri ve AIDS virüsüne karşı etkin madde olarak denenmeye başlanmıştır. Halka kapanması ve kenetlenme gibi reaksiyon yetenekleri nedeniyle hem organik sentezlerde ve hem de endüstriyel çalışmalarda yaygın bir şekilde kullanılmakta olan heterohalkalı karboksaldehidlerin hidrazonları aynı zamanda yukarıda bahsedilen yapısal özellikleri de içermektedirler. Nitekim çalışma ekibimizce daha önce yapılan araştırmalarda sentezlenen tüm bileşikler aktif madde olarak kobaylar üzerinde denenmiş ve bunların içinden iki tanesi biyolojik uygulamaya alınmıştır (1,2). Bu nedenle araştırmalarımızın devamı sayılabilecek olan bu çalışmada, Amerikan Ulusal Sağlık Enstitüsünün yönlendirici isteğiyle, yeni substitue hidrazonların sentezi yapılarak bu tür bileşik sınıfına katkıda bulunulması amaçlanmıştır.

DENEL BÖLÜM

Çalışmanın ilk kısmında benzen çekirdeğindeki mobil grupların direkt substitusyonundan yararlanarak basamaklar halinde ilerleyen dizi reaksiyonlar sonucunda reaktif olarak kullanılan 5-kloro-2-nitrofenilhidrazin (1), 5-bromo-2-nitrofenilhidrazin (2), N-metil-N-4-kloro-2-nitrofenilhidrazin (3) ve N-metil-N-4-bromo-2-nitrofenilhidrazin (4) elde edilmiş (3-5) ve ayrıca metil-substüue kinolinlerin selenyum dioksit oksidasyonundan yararlanarak kinolin-4-karboksaldehid (6) ve kinolin-8-karboksaldehid (7) substratları hazırlanmıştır. Araştırmanın esasını oluşturan ikinci aşamada ise kondenzasyon ürünleri çeşitli reaksiyon koşulları denenmek suretiyle belirlenen aşağıdaki genel yöntemle göre en yüksek verimle sentezlenmeye çalışılmış ve substitüentlerin reaksiyonlardaki etkileri incelenmiştir.



Ürünlerin erime noktaları Electrothermal IA 9100 cihazında tayin edilmiş olup düzeltilmemiştir. ¹H-NMR spektrumları Bruker AM-500 FT-NMR ve Varian 200-Gemini spektrofotometrelerinde, IR spektrumları PU 9714 infrared spektrofotometresinde ve kütle spektrumları Varian MAT 111 spektrometrelerinde sağlanmış; elementel analizler Avusturya-Graz Üniversitesi laboratuvarlarında yapılmıştır.

Substitue-Hidrazonlar A 1-4 ve B 1-4 'ün Hazırlanması; Genel Yöntem: Karboksaldehidin (1.5 mmol) sıcak susuz etil alkoldeki (15 mL) çözeltisine eşdeğer miktardaki reaktifin susuz etil alkoldeki (25 mL) çözeltisi katıldı. Reaksiyon karışımı geri soğutucu altında, substrat ve reaktiflerin özelliğine bağlı olarak 15 dakikadan 3 saate kadar olan bir periyod içinde, su banyosu üzerinde kaynatıldı. Kendi haline bırakılarak soğutulan karışımdan oluşan ham ürün süzüldü ve az bir miktar soğuk etanol ile yıkandı. Kurutulduktan sonra başlangıç maddeleri ile karşılaştırmalı TLC kontrolü toluende yapıldı. Analitik saflıktaki bileşikler ham ürünün etil alkolden üç kez kristallendirilmesiyle elde edildi.

Kinolin-4-karboksaldehid 5-kloro-2-nitrofenilhidrazon A-1

Kırmızı iğne kristaller (% 97), en. 252°C; UV (kloroform): λ_{\max} 247.5, 295.8 348.1, 426.4 nm; IR (potasyum bromür): 3260, 3100-2960, 1585, 1540, 1460, 1395, 1300, 1185, 1135 ve 1045, 935 ve 845, 740 cm^{-1} ; NMR (kloroform-D): δ 6.96-6.98 (d, CH, 1H), 7.70-9.03 (m, aromatik, 9H), 11.59 (s, NH, 1H); MS: m/e 326 (M⁺), 279 (M-1, -46), 243 (M-83), 155 (M-171), 128 (M-198), 101 (M-225). Elementel analiz (%): Hesaplanan C 58.80 H 3.39 N 17.14
C₁₆H₁₁ClN₄O₂ : Bulunan C 58.87 H 3.54 N 16.98.

Kinolin-4-karboksaldehid 5-bromo-2-nitrofenilhidrazon A-2

Kırmızı iğnemsî kristal kümeleri (% 94), en. 253-254°C; UV (kloroform): λ_{\max} 248.3, 300.1, 349.1, 427.5 nm; IR (potasyum bromür): 3260, 3120 - 2960, 1585, 1540, 1460, 1395, 1295, 1190, 1145 ve 1045, 850 ve 830, 750 cm^{-1} ; NMR (kloroform-D): δ 7.07 - 7.13 (d, CH, 1H), 7.68 - 9.03 (m, aromatik, 9H), 11.56 (s, NH, 1H); MS: m/e 371 (M⁺), 325 (M-46), 243 (M-128), 217 (M+1, -155), 216 (M-155), 101 (M-270). Elementel analiz (%): Hesaplanan C 51.75 H 2.98 N 15.09
C₁₆H₁₁BrN₄O₂ : Bulunan C 51.81 H 3.02 N 14.90.

Kinolin-4-karboksaldehid N-metil-N-4-kloro-2-nitrofenilhidrazon A-3

Koyu sarı çubuk kristaller (% 92), en. 173-174°C; UV (kloroform): λ_{\max} 249.5, 350.8 nm; IR (potasyum bromür): 3100-3000, 2990-2920, 1595, 1540, 1485, 1365, 1275, 1110, 965 ve 875, 745 cm^{-1} ; NMR (dimetilsulfoksit-D₆): δ 3.35 (s, D₂O ile değişen, H₂O), 3.68 (s, N-CH₃, 3H), 7.55-8.92 (m, aromatik ve CH, 10H); MS: m/e 340 (M⁺), 294 (M-46), 155 (M-185), 129 (M-211), 101 (M-239).

Elementel analiz (%): Hesaplanan C 59.91 H 3.84 N 16.44
 $C_{17}H_{13}ClN_4O_2$: Bulunan C 59.95 H 3.91 N 16.51

Kinolin-4-karboksaldehid N-metil-N-4-bromo-2-nitrofenilhidrazon A-4

Koyu sarı çubuk kristaller (% 97), en. 191-192°C; UV (kloroform): λ_{max} 248.1, 351.3 nm; IR (potasyum bromür): 3120-3000, 3000-2930, 1585, 1560, 1495, 1375, 1275, 1100, 970 ve 880, 750 cm^{-1} ; NMR (dimetilsulfoksit- D_6): δ 3.32 (s, D_2O ile değişen, H_2O), 3.66 (s, N- CH_3 , 3H), 7.53-8.91 (m, aromatik ve CH, 10H); MS: m/e 385 (M^+), 155 (M-230), 128 (M-257), 101 (M-284).

Elementel analiz (%): Hesaplanan C 52.99 H 3.40 N 14.54
 $C_{17}H_{13}BrN_4O_2$: Bulunan C 52.63 H 3.43 N 14.41.

Kinolin-8-karboksaldehid 5-kloro-2-nitrofenilhidrazon B-1

Kırmızı tüyümsü kristaller (% 95), en. 194-195°C; UV (kloroform): λ_{max} 251.2, 283.6, 352.6, 442.5 nm; IR (potasyum bromür): 3270, 3140-3020, 1595, 1560, 1470, 1400, 1295, 1195, 1145 ve 1055, 940 ve 880, 785 cm^{-1} ; NMR (kloroform- D_6): δ 6.77-6.80 (d, CH, 1H), 7.50-9.47 (m, aromatik, 9H), 11.27 (s, NH, 1H); MS: m/e 326 (M^+), 279 (M-1, -46), 243 (M-83), 155 (M-171), 128 (M-198), 101 (M-225).

Elementel analiz (%): Hesaplanan C 58.80 H 3.39 N 17.14
 $C_{16}H_{11}ClN_4O_2$: Bulunan C 58.46 H 3.38 N 17.01.

Kinolin-8-karboksaldehid 5-bromo-2-nitrofenilhidrazon B-2

Kırmızı iğnemsî kristaller (% 95), en. 207-208°C; UV (kloroform): λ_{max} 251.3 287.7, 352.9, 444.2 nm; IR (potasyum bromür): 3260, 3100-3000, 1590, 1550, 1470, 1400, 1295, 1195, 1155 ve 1050, 875 ve 855, 785, 745 cm^{-1} ; NMR (kloroform-D): δ 6.93-6.97 (d, CH, 1H), 7.48-9.46 (m, aromatik, 9H), 11.24 (s, NH, 1H); MS: m/e 371 (M^+), 324 (M-1, -46), 243 (M-128), 216 (M-155), 101 (M-270)

Elementel analiz (%): Hesaplanan C 51.75 H 2.98 N 15.04
 $C_{16}H_{11}BrN_4O_2$: Bulunan C 51.48 H 3.02 N 14.90.

Kinolin-8-karboksaldhid N-metil-N-4-kloro-2-nitrofenilhidrazon B-3

Koyu kırmızı iğnemsî kristaller (% 91), en. 145°C; UV (kloroform): λ_{max} 254.6, 296.8, 356.0 nm; IR (potasyum bromür): 3100-2990, 2980-2880, 1600, 1540, 1500 ve 1475, 1330, 1270, 1095, 960 ve 880, 780 cm^{-1} ; NMR (dimetilsulfoksit- D_6): δ 3.33 (s, D_2O ile değişen, H_2O), 3.61 (s, N- CH_3 , 3H), 7.53-9.01 (m, aromatik ve CH, 10H); MS: m/e 340 (M^+), 293 (M-1, -46), 155 (M-185), 129 (M-211), 101 (M-239).

Elementel analiz (%): Hesaplanan C 59.91 H 3.84 N 16.44
 $C_{17}H_{13}ClN_4O_2$: Bulunan C 59.86 H 3.86 N 16.12

Kinolin-8-karboksaldehid N-metil-N-4-bromo-2-nitrofenilhidrazon B-4

Kırmızı iğne kristaller (% 96), en. 154°C; UV (kloroform): λ_{max} 254.4, 297.6, 356.5 nm; IR (potasyum bromür): 3120-2960, 2960-2840, 1585, 1550, 1490, 1370, 1285, 1100, 965 ve 870, 750 cm^{-1} ; NMR (dimetilsülfoksit- D_6): δ 3.32 (s, D_2O ile değişen, H_2O), 3.59 (s, N- CH_3 , 3H), 7.46-9.02 (m, aromatik ve CH, 10H); MS: m/e 385 (M^+), 384 ($M-1$), 155 ($M-230$), 129 ($M+1$, -257), 101 ($M-284$).
Elementel analiz (%): Hesaplanan C 52.99 H 3.40 N 14.54 Br 20.74
 $C_{17}H_{13}BrN_4O_2$: Bulunan C 52.84 H 3.49 N 14.40 Br 20.60

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Elde edilen ürünlerin IR spektrumları genel olarak incelenildiğinde aromatik =C-H gerilimleri, düzlem içi C-H bozunma bandları ve düzlem dışı C-H eğilim salınımlarıyla birlikte azot içeren heterohalkalı bileşikler için karakteristik olan konjuge C=C ve C=N halka gerilimleri gözlenilmekte ve düzlem dışı C-H eğilim salınımları aromatik halka substitusyonuna ilişkin verileri aksettirmektedir. Substrat olarak kullanılan karboksaldehidlerin IR spektrumlarında karakteristik C=O gerilimi 1680 cm^{-1} civarında görülmekte, reaktif görevini üstlenen hidrazinlerin ise 3330 ve 3310 cm^{-1} civarında asimetric ve simetric N-H gerilimleri ile 1600 cm^{-1} civarında da N-H eğilim bandları bulunmaktadır. Bileşiklerin spektrumları substrat ve reaktiflerinki ile karşılaştırıldığında bu fonksiyonel gruplara ilişkin karakteristik bandların kaybolmuş olması, diğer taraftan hidrazon bileşiğinin özelliği olan C=N geriliminin tüm yeni bileşiklerin spektrumlarında görülmesi kondenzasyonun gerçekleştiğini göstermektedir. Ayrıca tüm ürünlerin spektrumlarında $-NO_2$ gruplarından ileriye gelen asimetric ve simetric N=O salınımları ile C-X gerilimleri karakteristik bölgelerinde; metil gruplarını içeren reaktiflerden oluşturulan ürünlerin spektrumlarında da N- CH_3 den ileri gelen C-N gerilimleri 1100 cm^{-1} civarında gözlenilmektedir.

Diğer taraftan, gerek substratların 1H -NMR spektrumlarında 11.20 ve 11.43 ppm'de -CHO grubuna özgü birer singlet halinde beliren piklere ve gerekse reaktiflerin spektrumlarında 3.21, 3.48, 3.88 ve 3.88 ppm'de gözlenen NH_2 piklerine ürünlerde rastlanılmamaktadır. Azot üzerinde metil grubu içeren reaktiflerin spektrumlarında birer singlet halinde 3.13 ppm'de gözlenen metil pikleri ürünlerin spektrumlarında 3.59-3.68 ppm arasında yer almaktadırlar.

Son olarak, bileşiklerin yapılarına kesinlik kazandırmak amacıyla kütle spektral analizleri yapılmış ve ayrıca analitik saflıkta hazırlanan ürünlerin elementel analiz sonuçlarının hesaplanan C, H ve N % değerleri ile tam bir uyum içinde olduğu belirlenmiştir.

Reaksiyonlarda kullanılan reaktiflerin rezonans yapıları gözönüne alındığında görüleceği üzere aromatik halkada deaktive edici gruplar bulunmasına rağmen reaktiflerin nukleofilik gücünde azalma olmamıştır. Bunun nedeni mezomerik etkinin nukleofilik etkiye karşı gelmesinden kaynaklanmaktadır. Reaktif 1 ve 2 yapılarında $-NO_2$ grubunun elektron çekici etkisi halkaya elektron salabilen halojen tarafından giderilmektedir. Oysa reaktif 3 ve 4'te nitro grubu halojene oranla reaktifin nukleofilik gücünü ve buna bağlı olarak reaksiyonun hızını etkileyebilecek bir

konumdadır. Gerçekten de yaptığımız pek çok sayıdaki denemeden elde ettiğimiz sonuçlara göre reaktif 3 ve 4 ile yapılan reaksiyonlar, reaktif 1 ve 2 ile yapılan reaksiyonlara oranla daha uzun sürede tamamlanmıştır. Deneysel veriler substituentlerin etkisine ilişkin düşüncelerimizi doğrulamaktadır.

TEŞEKKÜR

Elementel analiz, ¹H-NMR ve MS spektrumlarını sağlayan Avusturya-Graz Üniversitesinden Dr. G. Kollenz'e, Pakistan Karaçi Üniversitesinden N. Ansari'ye ve Anadolu Üniversitesi TBAM'a içtenlikle teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- (1) Ş. Kaban and Z. Fidaner, "Synthesis of Schiff Bases by Condensation of Hetarylcarboxaldehydes with p-Phenetidine", *Monatsh. Chem.*, 121 (1990), 525-528.
- (2) N. Öcal, "Heterohalkalı Aldehidlerin Substitue-Fenilmetil hidrazonları", (Tez), Yıldız Üni., Fen-Ed. Fak., (1989).
- (3) L. Maaskant, "Chloro- and bromo-nitrophenylhydrazines, etc.", *Recl. Trav. Chim. Pay B.*, 56 (1937) 221-223.
- (4) B.S. Furniss, A.J. Hannoford, V. Rogers, P.W.G. Smith and A.R. Tatchell, "Vogel's Textbook of Practical Organic Chemistry", 4th ed., Longman Group Ltd., London (1986) 633, 662, 699.
- (5) A. Laubenheimer, "Ueber Physikalischisomere Körper", *Chem. Ber.*, 9 (1876) 760.
- (6) C.E. Kwartler and H.G. Lindwall, "Condensation Reactions of Quinoline Aldehydes", *J. Am. Chem. Soc.*, 59 (1937) 524.
- (7) V.M. Rodionov and M.A. Berkengeim, "Synthesis of quinoline aldehydes", *Chem. Abstr.*, 39 (1945) 4076-4079.

DİSÜBSTİTÜE BENZOBAELENLERİN FOTOKİMYASAL İNCELENMESİ

Ramazan ALTUNDAŞ ve Metin BALCI

Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Erzurum - Türkiye

PHOTOCHEMICAL INVESTIGATION OF DISUBSTITUED BENZOBARRELENE.

SUMMARY

Benzobarrelen derivatives 6,7 and 8 were synthesized for photochemical studies. The acetone sensitized photochemistry of 6 and 8 gave 10,13,15 by di- π -methane rearrangement. In this rearrangement vinyl - vinyl bridging was effectively determined. Homolitically breaking of cyclopropane bonds on 10 and 13 gave 11 and 14.

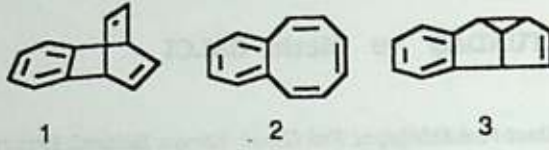
ÖZET

Fotokimyasını incelemek amacıyla benzobarrelen türevleri 6,7 ve 8 sentezlendi. 6 ve 8'in aseton sensitize fotokimyası sonucu di- π -metan düzenlenmesiyle 10,13,15 elde edildi. Bu düzenlenmede vinil-vinil köprüleşmesinin etkili olduğu görüldü. 10 ve 13 'ün siklopropan bağlarının homolitik olarak parçalanmasıyla da 11, 14 oluştu.

GİRİŞ

Zimmerman ve grubu benzobarrelenin (1) iki tip fotokimyasal düzenlenmeye maruz kaldığını, benzobarrelenin 1 singlet uyarılması sonucu $2\pi+2\pi$ siklo katılmayla benzosiklooktatetraene 2 ve bir sensitizer varlığında ışınlandırılmasıyla da di- π -metan düzenlenmesi sonucu benzo-semibulvalene 3 dönüştüğünü göstermiştir. Bu sahada döteryum işaretli çalışmalar 2'nin oluşumunda benzo-vinil ve vinil-vinil; 3'ün

oluşumunda da vinil-vinil köprüleşmesinin etkili olduğunu ortaya koymuştur.



Vinil pozisyonuna bir sübstitüent takıldığında veya farklı sübstitüentler bağlandığında benzobarrelen iskeletindeki simetri bozulacak ve di- π -metan düzenlenmesinde köprüleşme türlerini tahmin etmek güçleşecektir (2). Bu çalışmada benzobarrelen iskeletine polar sübstitüentler takılarak köprüleşme türlerinden hangisinin daha etkili olduğunu araştırıldı.

DENEL BÖLÜM

2-Bromo-3-metil-1,4-dihidro-1,4-etenonaftalin 5

624 mg (2 mmol) dibrombenzobarrelen (3) yeni destillenmiş 20 ml THF de çözüldü. Bu çözeltiliye azot gazı atmosferinde, -70°C de 3,6 ml (2,4 mmol) n-BuLi şırınga edildi. 30 dakika bu sıcaklıkta karıştırıldı. Daha sonra 320 mg (2,2 mmol) CH_3I ilave edilerek 30 dakika bu sıcaklıkta karıştırıldı. Oda sıcaklığına kadar ısınan bu karışımdan THF uzaklaştırılıp 50 ml su verildi ve (2x50 ml) hekzan ile ekstrakte edildi. Organik faz CaCl_2 üzerinden kurutuldu. Çözücü uçuruldu. Ele geçen yağimsı madde 150°C 'de 1 mm Hg'da destillendi. Eter-pentanolan kristallendirildi. Verim % 69, e.n. 44-45 $^{\circ}\text{C}$.

2-Siyano-3-metil-1,4-dihidro-1,4-etanonaftalin 6

0,297 g (1,19 mmol) 5 ve 0,247 g (2,74 mmol) CuCN 40 ml DMF'de çözüldü. 140°C 'de 22 saat karıştırıldı. Oda sıcaklığına soğutulan karışıma 200 ml su ve 200 ml benzen verilerek ekstrakte edildi. Organik faz 200 ml % 10 'luk FeCl_3 , 200ml % 10 luk NaOH ve 150 ml su ile yıkandı. CaCl_2 üzerinden kurutuldu, çözücü uçuruldu. Ham ürün eter-petrolelerden kristallendirildi. Verim % 74, e.n. 104-105 $^{\circ}\text{C}$.

3-Metil-1,4-dihidro-1,4-etenonaftalin-2-karboksilikasit 7

310 mg (1,25 mmol) 5, 20 ml THF de çözüldü. -70°C ' de 0,8 ml (1,28mmol)

n-BuLi verilip 30 dakika bu sıcaklıkta karıştırıldı. Daha sonra 1 g kuru buz (CO_2) ilave edilerek aynı sıcaklıkta 30 dakika daha karıştırıldı. THF uçuruldu ve 50 ml su verilip pH=1 oluncaya kadar seyreltik HCl ilave edildi. 2x50 ml eter ile ekstrakte edildi. Organik faz CaCl_2 üzerinden kurutuldu. Çözücü evapore edildi ve ham ürün CH_2Cl_2 : petroleterinden kristallendirildi. Verim % 70.

2-Karbometoksi-3-metil-1,4-dihidro-1,4-etenonaftalin 8.

3,79 g (17,87 mmol) asit 7 diazometan ile ester türevine çevrildi ve silikagel (30 g) kolondan süzülerek saflaştırıldı. Verim % 91.

2-Siyano-3-metilbenzobarrelenin 6 sensitize fotolizli.

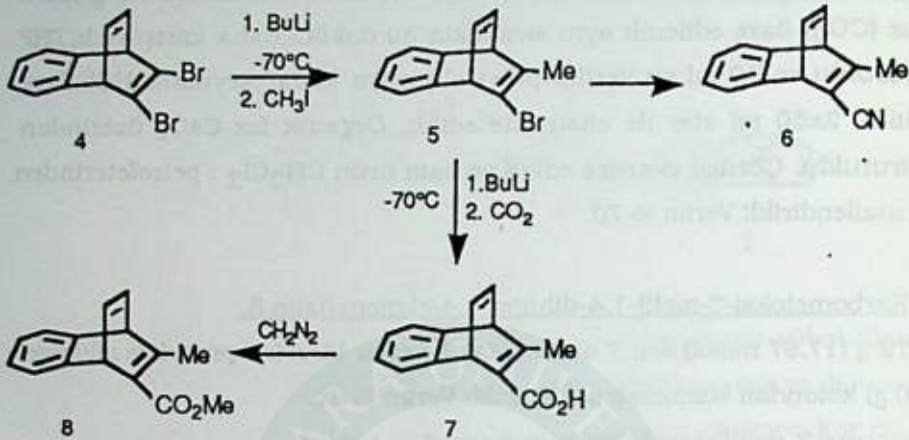
900 mg (4,66 mmol) 6 sensitizer olarak kullanılan asetonda çözüldü. UV immersion lambasıyla (180-350 nm) ışınlandırıldı. Çözücü evapore edildi. Ham ürün silikagel (70 g) kolondan eter:benzen:hekzan (3:8:89) ile yürütüldü ve 10 ar ml'lik fraksiyonlar toplandı. 20-30. fraksiyonlardan (100 mg) 10; 40-50. fraksiyonlardan (80 mg) 11 izole edildi.

2-Karbometoksi-3-metil-1,4-dihidro-1,4-etenonaftalinin 8 sensitize fotolizli

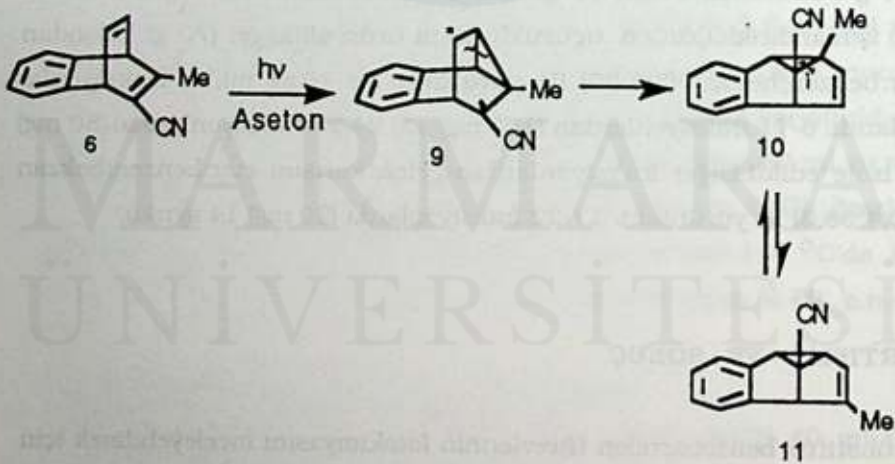
1,38 g 8 asetonda 2 saat 10 dakika UV immersion lambasıyla (180-350 nm) ışınlandırıldı. Çözücü uçuruldu. Ham ürün silikagel (70 g) kolondan eter:benzen:hekzan (3:8:89) ile yürütüldü ve 10'ar ml.lik fraksiyonlar toplandı. 5-11. fraksiyonlardan (100 mg) 13, 24-28. fraksiyonlardan (80 mg) 15 izole edildi. Diğer fraksiyonlardan gelen karışım eter:benzen:hekzan (1:0,4:98,6) ile yürütüldü. 17-22. fraksiyonlarda (20 mg) 14 ayrıldı.

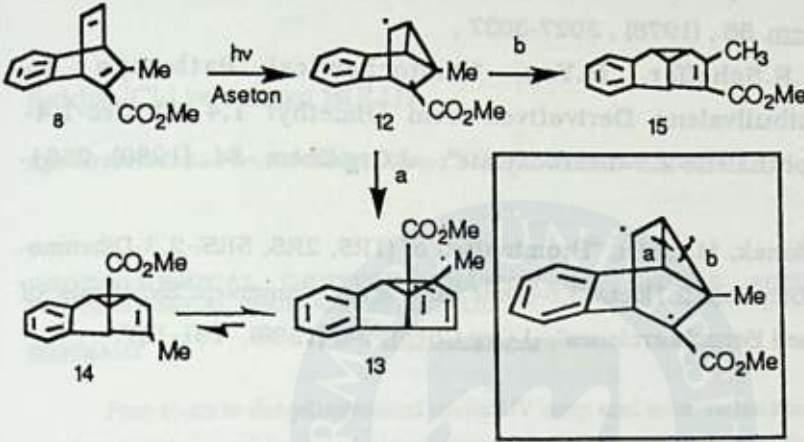
TARTIŞMA VE SONUÇ

DİSÜBSTİTÜE benzobarrelen türevlerinin fotokimyasını inceleyebilmek için ilk önce dibrombenzobarreleden 4 başlayarak 5, 6, 7, 8 sentezlendi.



6'nın aseton sensitize reaksiyonu 9 ara ürününü üzerinden 10 ve 11'e dönüşmektedir. 8'in aynı şartlarda fotokimyası da benzer bir ara ürün 12 üzerinden a yolunun tercih edilmesi ile 13'ü, b yolunun tercih edilmesiyle 15'i vermektedir.





Bu sonuçlar bizim incelediğimiz polar ve simetrik olmayan benzobarrelen sistemlerinde gözlenen di- π -metan düzenlenmelerinde vinil-vinil köprüleşmesinin etkili olduğunu ortaya koymaktadır. 11 ve 14 semibulvalen türevleri ancak bir molekül içi düzenlenme sonucu oluşabilir. 10' un 11' e dönüşümü i bağının ,14 ün oluşumu da j bağının homolitik olarak parçalanmasıyla meydana gelen biradikal ara ürün üzerinden yürüyen bir prosestir.

KAYNAKLAR

1. H.E.Zimmerman, R.S.Givens, R.M.Pagni, " The Photochemistry of Benzobarrelelene. Mechanistic and Exploratory Photochemistry. XXXV", J.Am.Chem.Soc., 90, (1968), 6096-6108.

2. a) C.O.Bender, D.W.Brooks, W.Cheng, D.Dolman, S.F.O'Shea, S.S.Shugarman, "Polar substituents in barrelene photochemistry: mechanistic aspects of the photochemistry of 2-cyanobarrelene.", Can. J.Chem. 56, (1978), 3027-3037.

b) J.R.Scheffer, M.Yap, "Photochemical Pathways to benzosembullvalene Derivatives from Dimethyl 1,4-Dihydro-1,4-ethenonaphthalene-2,3-dicarboxylate", J.Org.Chem. 54, (1989), 2561-2563.

3. O. Çakmak, M. Balcı, "Bromination of (1RS, 2RS, 5RS)-2,3-Dibromo-6,7-benzobicyclo[3.2.1]octa-3,6-diene. A New and Convenient Synthesis of Disubstitued Benzobarrelenes", J.Org.Chem. 54, (1989), 181-187.

ABIETİK ASİDİN FOTOKİMYASAL DEHİDROJENASYONU; SOLAR FOTO KİMYASAL ÜRETİM METODU

Sıddık İÇLİ ve Adnan BULUT

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, İzmir-TÜRKİYE

PHOTOCHEMICAL DEHYDROGENATION OF ABIETIC ACID; A SOLAR PHOTOCHEMICAL PRODUCTION METHOD

SUMMARY

Pine rosin is dehydrogenated under UV lamp and solar radiation with copper(II) catalyst and benzophenone photosensitizer. Spectral analysis results have shown that all the abietic type resin acids are converted to dehydroabietic acid. The excellent yield has proven that this is a successful solar chemical production method.

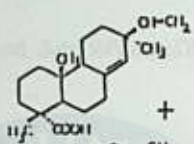
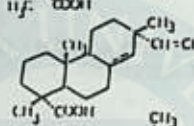
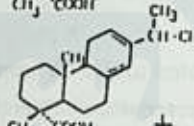
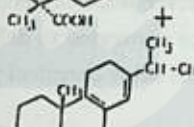
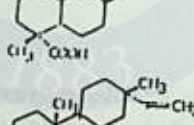
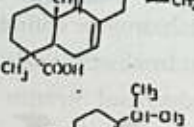
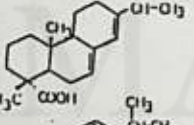
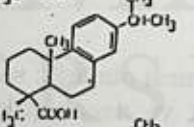
ÖZET

Çam kolofan, UV lambası ve solar radyasyonu altında bakır (II) katalizörü ve benzofenon fotosensitizörü ile dehidrojene edilmiştir. Spektral analizler, abietik türü reçine asitlerinin tamamen dehidroabietik aside dönüştüğünü göstermiştir. Yüksek verim bu reaksiyonu solar kimyasal üretim için uygun bir metod olduğunu göstermektedir.

GİRİŞ

Kolofan veya çam reçinesi pimarik, sandrako pimarik, isopimarik, levo pimarik, palustrik, abietik ve neoabietik asit türü reçine asitlerinden oluşmuştur(1,2). Abietik asit ana bileşendir, yaklaşık %50 oranında (Tablo 1) ve atmosferik oksidasyona dayanıklı dehidroabietik asit ise doğal kalofandaki oranı %10'un altındadır. Pd, Co, Ni, Pt katalizörleri veya iyod kükürt ile 150-300°C arasında yapılan dehidrojenasyon işlemlerinde dehidrojene ürün dehidroabietik asit oluşmaktadır. (3) İlk üçü hariç, diğer konjugedien yapılı reçine asitleri kolofanın %80-85'lik karışımıdır (1,3). Dehidrojenasyon işlemi yalnız abietik asit değil diğer konjuge guruplu reçine asitleri de dehidro abietik aside dönüşmektedir. Ancak termal dehidrojenasyon reaksiyonu, kısmi dekarboksilasyon reaksiyonuna neden olmaktadır. Bu nedenle düşük sıcaklıkta dehidrojenasyon reaksiyonu tercih edilmektedir.

Tablo 1: Çam gövde kolofanı ve kök kolofanında reçine asitlerinin oranları.

		Gövde Kolofanı(%)	Kök Kolofanı(%)
PİMARIC ACID (8(14),15-pimaradien-18-oic acid)		0.7	5.0
SANDARACOPIMARIC ACID (8(14),15-isopimaradien-18-oic acid)			
LEVOPIMARIC ACID (8(14),12-abietadiene-18-oic acid)		30.3	30.4
PALUSTRIC ACID (8,3-abietadiene-18-oic acid)			
ISOPIMARIC ACID (7,15-pimaradien-18-oic acid)		9.3	5.9
ABIETIC ACID (7,13-abietadiene-18-oic acid)		44.6	55.6
DEHYDROABIETIC ACID (8,11,13-abietatrien-18-oic acid)		6.0	1.6
NEOABIETIC ACID (8(14),13(15)-abietadien-18-oic acid)		9.2	0.5

Jones, et al, (4) oda sıcaklığında bakır (II) katalizörü ile siklohegzan fotokimyasal dehidrojenasyonunu başarmıştır. Bakır (II)'nin yeşil rengi, renksiz bakır (I)'e benzofenon fotosensitizatörü ile civa lambası radyasyonunda dönüşmektedir. Bakır (I) ise hava ile temasta tekrar yeşil renkli bakır (II)'e dönüşmektedir. Reaksiyon veriminin %90 olduğu bildirilmiştir. Bu koşullarda konjuge gruplu reçine asitlerinin aromatik halkaya dehidrojenasyonu daha kolay olabilmelidir.

DENEL BÖLÜM

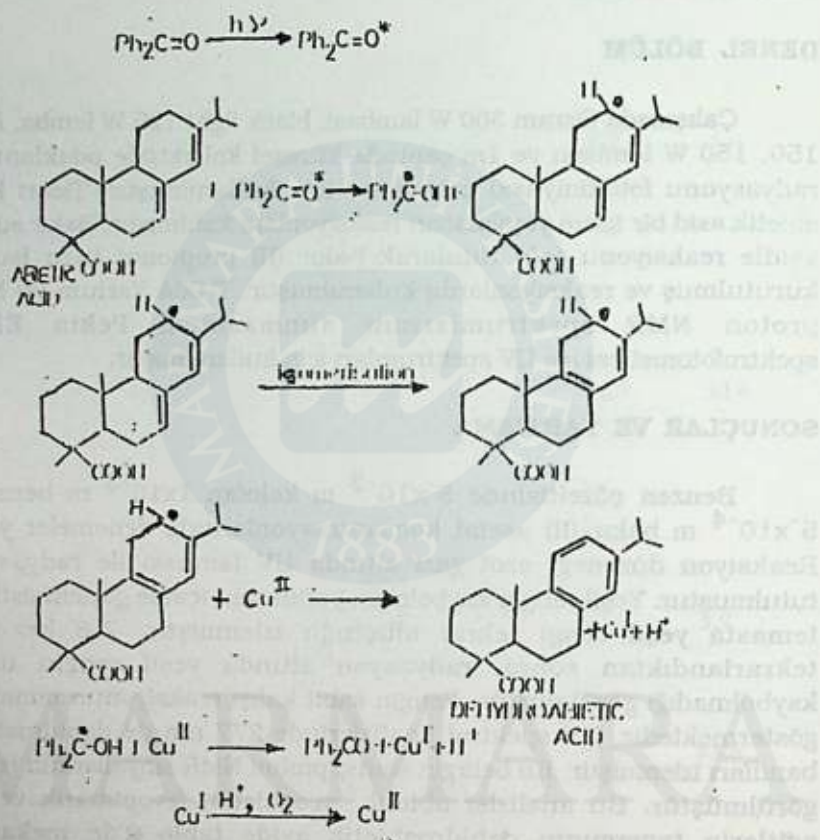
Çalışmada Osram 300 W lambası, black light 125 W lamba, Heraus TQ 150, 150 W lambası ve 1m çapında küresel kollektörle odaklanmış güneş radyasyonu fotokimyasal çalışmalar için kullanılmıştır. Ticari kolofan ve abietik asit bir işlem yapılmadan reaksiyonlara katılmıştır. Bakır sulfat asetik asitle reaksiyonu tabii tutularak bakır (II) propionat tuzu hazırlanmış, kurutulmuş ve reaksiyonlarda kullanılmıştır. T-60A Varium 60 MHz NMR, proton NMR spektrumlarının alınmasında, Pekin Elmer UV spektrofotometresi ise UV spektrumları için kullanılmıştır.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Benzen çözeltisinde 5×10^{-2} m kolofan 1×10^{-3} m benzofenon ve 5×10^{-4} m bakır (II) asetat konsantrasyonlarında denemeler yapılmıştır. Reaksiyon düzeniği azot gazı altında UV lambası ile radyasyona tabii tutulmuştur. Yeşil rengin kaybolması yarım saat içinde gözlenmiştir. Hava ile temasta yeşil rengi tekrar oluştuğu izlenmiştir. 7-8 kez bu işlem tekrarlandıktan sonra, radyasyon altında yeşil rengin uzun süre kaybolmadığı görülmüştür. Rengin sabit kalışı reaksiyonun tamamlandığını göstermektedir. UV spektral analizlerinde 277 nm de dehidroabietik asit bandları izlenmiştir. En belirgin sonuç proton NMR sinyallerinin izlenmesi de görülmüştür. Bu analizler abietik, neoabietik, levopimarik ve palustrik asitlerin tamamının dehidroabietik aside tablo 2'de mekanizma ile dönüşüğünü ispatlamaktadır.

Kolofan yerine saf abietik asit ile yapılan reaksiyon aynı sonuçlar vermiştir, ancak reaksiyon tamamlanması daha kısa sürede 4-5 kez radyasyon işlemi ile olmaktadır. Solar radyasyonda kollektör ile yapılan denemede 100 ml. çözeltinin 20 dakikada renk değişimine uğradığı gözlenmiştir. UV ve NMR spektral analizleri aynı sonuçları vermektedir. Bu sonuçlar dehidrokolofon ticari ürününün oda sıcaklığında dekarboksile olmadan güneş radyasyonu ile oluşumunu göstererek ideal bir solar kimyasal üretim metodunu ortaya koymaktadır.

Tablo 2: Abietik asidin fotokimyasal dehidrojenasyon mekanizması



TEŞEKKÜR

AvH Vakfının, radyasyon kimyası Max Plank Enstitüsünün ve İngiliz kültür heyetinin proje yardımlarına teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- 1- S. İçli and F. Uysal (1990) Studies on organic composition of pine rosin from Western Türkiye, unpublished result from Ph.D. thesis of F.Uysal, Ege University, İzmir.
- 2- A.W. Burgstaller, J.N. Marx, and D.F. Zinkel (1969) Structure and Stereochemistry of Reduction Products of Abietic type Rosin Acids. **J.Or.Chem.** **34**, 1550-1561, 3716.
- 3- H.I. Enos, G.C. Harris, and G.W. Hedrick (1968) Rosin and derivatives. **Encly. of Chem. Technol. Vol. 17**, 2nd ed. pp 475-508, New York. Wiley and Sons, Inc.
- 4- G.H. Jones, D.W. Edwards, and D. Poar (1976) A room temperature photochemical dehydrogenation catalyst. **J.C.S. Chem. Commun.** 969-970.

MARMARA
ÜNİVERSİTESİ

BAZI ARİLOKSİTİYOFOSFORİL BİLEŞİKLERİNİN SENTEZİ VE SPEKTROSKOPİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

İsmail Erdem GÜMRÜKÇÜOĞLU ve Mustafa ODABAŞOĞLU

*Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü,
Kurupelit-Samsun-Türkiye*

SYNTHESIS AND INVESTIGATION OF SOME ARYLOXYTHIO- PHOSPHORYL COMPOUNDS

SUMMARY

Some organophosphorus compounds were synthesized by reacting related substituted phenols with PSCl_3 at 150-160°C. The structure of the compounds synthesized was determined by IR, UV and $^1\text{H-NMR}$ spectroscopy techniques. The phenols containing sterically hindered groups at ortho positions formed diester derivatives while the other type of phenols produced triester derivatives. The crystal and molecular structure of tri (4-tert-butylphenyl) thiophosphate (Ib) were determined by X-ray diffraction analysis. The thiophosphoryl radical formed by irradiation of bis (2,6-dimethylphenyl) chlorothiophosphate (IIb) using γ -rays was investigated by ESR spectroscopy technique and its structure was identified.

ÖZET

Bazı organofosfor bileşikleri süstitüe fenoller ile PSCl_3 'ün 150-160°C sıcakta reaksiyonuyla sentezlendi. Sentezlenen bileşiklerin yapıları IR, UV ve $^1\text{H-NMR}$ spektroskopik teknikleriyle belirlendi. Orto pozisyonunda sterik etkili grup taşıyan fenoller diester türevlerine dönüşürken diğerleri (sterik etkili grup taşımayan) triester türevlerini oluşturdu. Tri (4-tert-butilfenil) tiyofosfatın (Ib) kristal ve moleküler yapısı X-ışınları difraksiyon analiziyle aydınlatıldı. Bis (2,6-dimetilfenil) klorotiyofosfat (IIb) bileşiğinden γ -ışınlarıyla oluşturulan tiyofosforil radikal ESR tekniği ile incelenerek yapısı belirlendi.

GİRİŞ

Ariloksitiyofosforil bileşikleri ilk olarak 1925 yılında Meyer tarafından, sulu NaOH içindeki PSCl_3 üzerine fenollerin ilave edilmesi ile

sentezlendi (1). Aynı yıllarda Broeker, arilfosfitleri elementel kükürtle kapalı tüp içerisinde sıcakta reaksiyona sokarak ariloksitiyofosfatları elde edebilmiştir (2). Bazı araştırmacılar ise P_2S_5 reaktifini fenollerle etkileştirerek aynı tür bileşikler sentezlemeyi başarmıştır (3). Organofosfor bileşiklerinin büyük insektisit aktivite gösterdiği 1930 yılında tetraetilpirofosfat üzerine yapılan incelemeler sonucu ortaya koyulmasına rağmen, tarımsal alanda kullanımı ise ancak 1942 yılından sonra başlayabilmiştir (4). Her ne kadar 2.Dünya Savaşında kimyasal silah olarak kullanılmamışlarsa da savaş yıllarında her ay birkaç yüz ton üretim yapılacak şekilde bu alanda birçok madde üretilmiştir. Daha sonraki yıllarda tarımsal amaçlı kullanım arttığından özellikle tiyofosforil grubu bulunduran bileşikler üzerine detaylı çalışmalar yapılmıştır. "Paratyon" olarak bilinen p-nitrofenil dietil tiyofosfat bileşiği tiyofosforil grubu taşıyan ilk insektisitlerdendir (5). İsektisit özellikler üzerine başta Schrader (5) olmak üzere Magee ve Gaines (6), Mel'nikov (7) önemli çalışmalar yapmışlardır.

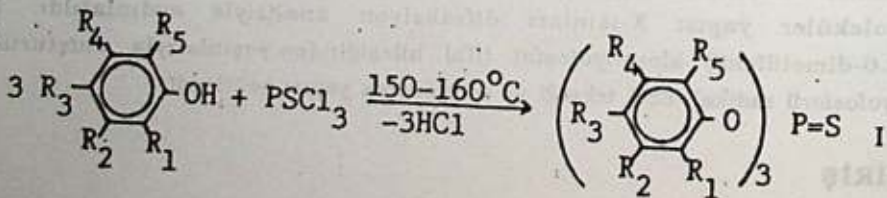
Bu çalışmada, değişik süstitüentler taşıyan fenoller $PSCl_3$ ile reaksiyona sokularak yeni tür tiyofosforil bileşikler sentezlendi. Sentezlenen bileşiklerin spektroskopik incelemeleri yapılarak yapıları aydınlatıldı. Ayrıca tri(4-tert-butilfenil)tiyofosfat bileşiğinin X-ışınları incelemesi yapılarak kristal ve molekül yapısı belirlendi.

DENEL BÖLÜM

Tiyofosforil bileşiklerinin sentezi $150-160^\circ C$ de fenollerin $PSCl_3$ ile muamele edilmesiyle gerçekleştirildi. Reaktif olarak, 4-tert-butil fenol, 2-izopropil-5-metilfenol (timol), 2-tert-butilfenol, 2,6-dimetilfenol ve 2,6-diklorfenol bileşikler kullanıldı.

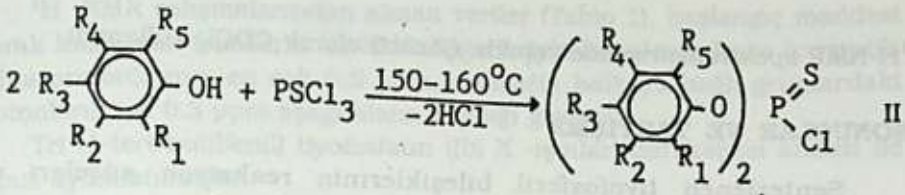
I ve II bileşikler aşağıda verilen genel reaksiyonlara göre sentezlendi.

Genel metod tri (2-izopropil-5-metilfenil) tiyofosfat (Ia) sentezinde verildiği gibidir.



Ia; $R_1=i\text{-pr}$, $R_5=Me$, $R_2=R_3=R_4=H$

Ib; $R_4=But$, $R_1=R_2=R_3=R_5=H$



IIa; $R_1=\text{Bu}^t$, $R_2=R_3=R_4=R_5=\text{H}$

IIb; $R_1=R_5=\text{Me}$, $R_2=R_3=R_4=\text{H}$

IIc; $R_1=R_5=\text{Cl}$, $R_2=R_3=R_4=\text{H}$

Tri (2-izopropil-5-metilfenil) tiyofosfat sentezi (IIa)

Boyunlarından birine geri soğutucu diğerlerine damlatma hunisi ve termometre takılmış, 250 mL'lik üç boyunlu balona (7,5 g., 0.05 mol) 2-izopropil-5-metilfenol (timol) koyularak 120°C 'lık yağ banyosunda eritildi. Erimiş timol üzerine (3.39 g., 0.02 mol) PSCl_3 yarım saat sürede damla damla ilave edildi. PSCl_3 ilavesi tamamlandıktan sonra sıcaklık 150°C ye yükseltilerek reaksiyon 2 saat devam ettirildi. Soğutulan reaksiyon karışımından PSCl_3 'ün aşırısı uzaklaştırıldıktan sonra ürün n-hekzanda kristallendirildi. E.N. 91°C (N_2 atmosferinde), verim % 91.

Hesaplanan (%): C=70.58 ; H=7.64

Bulunan (%): C=70.05 ; H=7.58

Tri(4-tert-butilfenil) tiyofosfat (IIb); E.N. 131°C , Verim % 95

Hesaplanan (%): C=70.58 ; H=7.64

Bulunan (%): C=70.21 ; H=7.54

Di(2-tert-butilfenil) klorotiyofosfat (IIa) E.N. 110°C , Verim % 64

Hesaplanan (%): C=60.53 ; H=6.85

Bulunan (%): C=60.59 ; H=6.70

Bis(2,6-dimetilfenil) Klorotiyofosfat (IIb) E.N. 124°C , Verim %73

Hesaplanan (%): C=56.39 ; H=5.28

Bulunan (%): C=56.60 ; H=5.35

Bis(2,6-diklorfenil) Klorotiyofosfat (IIc) E.N. 107°C , Verim %82

Hesaplanan (%): C=36.91 ; H=1.53

Bulunan (%): C=36.02 ; H=1.45

Sentezlenen bileşikler KBr ile disk haline getirilerek IR spektrumları alındı. Spektrumların alınmasında Perkin Elmer 4500 IR spektrometresi kullanıldı. UV çalışmalarında Varian DMS 100 UV/VIS spektrometresinden faydalanıldı. UV spektrumları, sentez ürünlerinin n-hekzandaki çözeltisinden kaydedildi. $^1\text{H-NMR}$ incelemeleri Varian 360

$^1\text{H-NMR}$ spektrometresinde yapıldı. Çözücü olarak CDCl_3 kullanıldı.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sentezlenen tiyofosforil bileşiklerinin reaksiyon süreleri ve spektroskopik verileri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1: Ariloksiltiyofosforil bileşiklerinin IR, UV ve $^1\text{H-NMR}$ verileri.

	Ia	Ib	Ila	Iib	Iic
IR	715 cm^{-1} (P=S) 1215 cm^{-1} ve (C-O-P) 975 cm^{-1}	695 cm^{-1} (P=S) 1205 cm^{-1} ve (C-O-P) 950 cm^{-1}	710 cm^{-1} (P=S) 1195 cm^{-1} ve (C-O-P) 940 cm^{-1}	705 cm^{-1} (P=S) 1145 cm^{-1} ve (C-O-P) 950 cm^{-1} 515 cm^{-1} (P-Cl)	715 cm^{-1} (P=S) 1225 cm^{-1} ve (C-O-P) 980 cm^{-1} 530 cm^{-1} (P-Cl)
UV	273.2 nm 264.7 nm 227.3 nm	271.7 nm 263.3 nm 229.4 nm	270.4 nm 263.8 nm 228.7 nm	267.6 nm 255.6 nm 222.0 nm	273.6 nm 267.5 nm 225.2 nm
$^1\text{H-NMR}$	1.18 ppm (d,18H) 2.28 ppm (s,9H) 2.23 ppm (h, 3H) 7.04 ppm (m, 9H)	1.30 ppm (s,27H) 7.25 ppm (q,12H)	1.48 ppm (s,18H) 7.34 ppm (m,8H)	2.43 ppm (s,12H) 7.05 ppm (s,6H)	17.34 ppm (m,6H)
R. Sü.	2 saat	0.5 saat	72 saat	24 saat	48 saat

s=singlet, d=dublet, q=quartet, h=heptet, m=multiplet

Bu çalışmada reaksiyon şartlarının aynı olmasına rağmen farklı tiyofosforil bileşiklerinin sentezlenmiş olması sterik etki ile açıklanabilir. Sterik etkili fenoller diester, sterik etkisi az olan ya da olmayan fenoller triester türevlerine dönüşmüşlerdir.

IR çalışmaları, bileşiklerin karakteristik absorpsiyonları olan P=S, C-O-P ve P-Cl absorpsiyonları üzerinde yoğunlaştırıldı (Tablo 1). İncelemeler P=S absorpsiyonlarının 715 - 695 cm^{-1} bölgesinde olduğunu göstermiştir. Fosfor atomuna bağlı C-O absorpsiyonları 1225 - 1145 cm^{-1} , aromatik halkaya bağlı P-O absorpsiyonları 980 - 940 cm^{-1} bölgelerinde gözlemlendi. P-Cl absorpsiyonları 530 - 505 cm^{-1} bölgesinde yer almıştır. Daha önce benzer bileşikler üzerine yapılan IR çalışmaları elde edilen verileri desteklemiştir (8, 9).

UV incelemeleri sonucu bulunan üç absorpsiyondan büyük dalga boyundaki absorpsiyon $n \rightarrow \pi^*$, diğerlerinin $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişi olduğu yorumlandı.

^1H -NMR çalışmalarından alınan veriler (Tablo 1), başlangıç maddesi olarak kullanılan fenollerin ^1H -NMR değerleriyle karşılaştırılınca aromatik halka protonlarının en çok 0.5 ppm, aromatik halkaya bağlı gruplardaki protonların ise 0.3 ppm aşağı alana kaydığı gözlemlendi.

Tri (4-tert-butilfenil) tiyofosfatın (Ib) X -ışınları difraksiyon analizi ile yapısı aydınlatılmıştır.

Iib bileşiği γ -ışınlarıyla ışınlanarak ESR tekniği ile incelenmiş ve oluşan tiyofosforil radikalinin a ve g değerleri saptanmıştır. Triester türevleri de (Ia ve Ib) γ -ışınları etkisine bırakılarak tiyofosforil radikali oluşturulması amaçlanmasına rağmen tiyofosforil radikali oluşturulamamıştır.

KAYNAKLAR

- 1- W. Meyer and W. Autenrieth, "Thiophosphoryl chlorides of the general formulas $\text{SP}(\text{OR})\text{Cl}_2$ and $\text{SP}(\text{OR})_2\text{Cl}$ and derivatives of the pentabasic tollol phosphoric acid $(\text{HO})_4\text{PSH}$ ", *Ber.*, 58B (1925) 840-847. [*Chem. Abst.*, 19 (1925) 2325.]
- 2- W. Brocker, "Phenol and cresol, especially m-cresol, derivatives of phosphorus trichloride and phosphorus, thiochloride", *J. Pract. Chem.*, 118 (1928) 287-294.
- 3- L. Rosnati, "Thiol esters of thiophosphoric acids", *Gazz. Chim. Ital.*, 76 (1946) 272-282. [*Chem. Abst.*, 42 (1948) 876.]
- 4- B.J. Walker, "**Organophosphorus Chemistry.**" Penguin Education, Penguin Library of Physical Sciences. Middlesex (1972) 200-210.
- 5- G. Schrader, "Insecticidal Phosphorus Esters," *Angewandte Chemie*, 69 (1957) 86-90.
- 6- W.J. Magee and J.C. Gaines, "Toxicity of phosphorus compounds to various insects", *J.Econ. Entomol.*, 43 (1950) 281-286 [*Chem. Abst.*, 43 (1949) 9613]
- 7- N.N. Mel'nikov, Ya. A. Mandl'baum and P.V. Popov, "Synthesis and insecticidal properties of some esters of phosphoric acid", *Doklady Akad., Nauk. S.S.S.R.*, 71 (1950) 485-487 [*Chem. Abst.*, 44 (1950) 8041]
- 8- L.J. Bellamy and L. Beecher, "The Infrared spectra of organo-phosphorous esters", *J. Chem. Soc.*, (1952) 475-483.
- 9- İ.E. Gümürkçüoğlu, "Synthesis of substituted ariloxide derivatives of phosphorus, arsenic and antimony", *Doğa Tr.J. of Chemistry*, 15 (1991) 154-159.

1- J. J. Bellamy and L. Beecher. The infrared spectra of
 of phosphoric acids and esters. *Disc. Faraday Soc.* 1962, 34, 1-10.
 2- J. J. Bellamy. *The infrared spectra of molecules*. London, Chapman and Hall, 1958.
 3- J. J. Bellamy. *The infrared spectra of molecules*. London, Chapman and Hall, 1958.
 4- E. L. Bovey. *Chemical shift in NMR spectra*. London, Butterworths, 1956.
 5- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.
 6- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.
 7- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.
 8- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.
 9- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.
 10- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.



1- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.
 2- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.
 3- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.
 4- E. L. Bovey. *Chemical shift in NMR spectra*. London, Butterworths, 1956.
 5- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.
 6- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.
 7- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.
 8- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.
 9- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.
 10- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

1- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.
 2- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.
 3- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.
 4- E. L. Bovey. *Chemical shift in NMR spectra*. London, Butterworths, 1956.
 5- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.
 6- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.
 7- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.
 8- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.
 9- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.
 10- J. H. Goldstein. *Physical properties of polymers*. London, Butterworths, 1956.

FENİL (FTALİMİDO FORMİL) METİL FOSFİNİK ASİT ESTERLERİNİN SENTEZLERİ

Salih YAŞLAK

Marmara Üniversitesi Atatürk Eğitim Fakültesi Göztepe Kampüsü - İstanbul - Türkiye

NOVEL SYNTHESIS OF PHENYL (PHTHALIMIDO FORMYL), METHYL PHOSPHINIC ACID ESTERS

SUMMARY

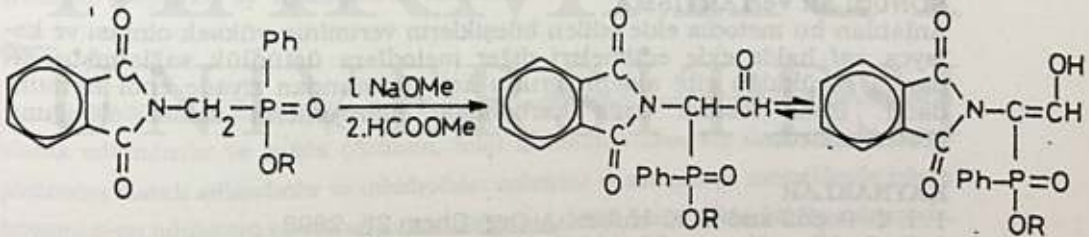
Preparation of phenyl (phthalimido formyl) methylphosphinic acid esters are reported

ÖZET

Fenil (ftalimido formil) metil fosfinik asit esterlerinin elde edilmesi

GİRİŞ

Bugün α -aminoasitlerin gayit iyi bilinmesine rağmen α -aminofosfinik asitler yeteri derecede araştırma konusu olmamıştır (1). Bazı fosfinopeptitlerin antibakteriyel aktiviteleri bilinmektedir (2). Fosfino veya fosfinopeptitlerin elde edilmesindeki en uygun yolun aldehit bileşiğini elde edip bunu daha sonra kolayca diğer fonksiyonel gruba çevirme olduğu malumdur. Bu yüzden biz burada fenil (ftalimido formil) metil fosfinik asit metil ester III ve etil esterlerinin IV yeni bir metotla elde edilmesinden bahsetmek istiyoruz.



R = Me I
R = Et II

R = Me III Verim: 75 %
R = Et IV Verim: 83 %

DENEL BÖLÜM

Sentezlerde "reagent grade" kimyasallar kullanılıp, N-Bromo metil ftalimid (3) sentezden önce hidrojen bromürden bilinen usulle saflaştırılmıştır. Dime-til fenil fosfonit (4) ve dietil fenil fosfonit(5) bilinen metodlarla elde edilmiştir. Her seferinde bu bileşikler kullanılmadan önce destile edilmelidir. Bileşik I ve II yine bilinen metodlarla elde edilmiştir (1).

Genel prosedür: Taze kesilmiş sodyum (50 m mol) ve 25 ml ksilen ihtiva eden üç boyunlu reaksiyon balonuna kondensör, karıştırıcı ve huni ilâve edilerek ksilen kaynayncaya kadar ısıtılır. Azot atmosferi altında 15 dakikalık bir zaman entervalinde 55 mmol absolut metanol (magnesium üzerinden destile edilmiş) ilâve edilir. Isıtma işlemine 15 dakika daha devam edilir ve bu zaman içerisinde 5 ml destilat toplanır. Bu şekilde elde edilen beyaz süspansiyon 20 dakikalık bir zaman entervalinde küçük porsiyonlar halinde 0°C da karıştırılan 50 mmol fenilftalimido metil fosfinik asit esterlerinin (I veya II) 400 mmol metil formattaki (taze olarak P₂O₅ üzerinden destile edilmiş) çözeltisine ilâve edilir. Karıştırma işlemine 30 dakika devam edilip meydana gelen sarı süspansiyon 3 ml % 100 lük asetik asitin 20 ml absolut benzendeki çözeltisiyle muamele edilir, bir müddet karıştırıldıktan sonra 25 ml 1 N hidroklörür asit ilâve edilir. Sulu faz ayrıldıktan sonra pH = 3-4 e gelecek şekilde derişik HCl ile muamele edilir ve etil asetatla ekstrakte edilir. Etil asetat fazları toplanır, sodyum sulfat üzerinden kurutulur ve etil asetatın vakum altında destilasyonundan sonra elde edilen bakiye benzenden kristallendirilir. Elde edilen bu sarı kristaller Feyling çözeltisini indirgeyip, sodyum bikarbonatta çözünerek sarı bir çözelti verdi.

Bu kristallerin analizleri aşağıda belirtilmiştir.

Bileşik III : erime noktası : 125-127 °C

Elementel analiz : C : 60,25 (60, % hesaplanan)

H : 3,95 % (4,0 %), N : 3,80 % (4,0 %)

³¹P-NMR (CDCl₃) : 35,0 ppm, IR (KBr) : C- OH : 3000 cm⁻¹

Bileşik IV : erime noktası : 138-140 °C

Elementel analiz : C : 61,60 % (61,0 % hesaplanan)

H : 4,80 % (5,0 %), N : 4,75 % (5,0 %)

³¹P-NMR (CDCl₃) : 34,7 ppm, IR (KBr) : C- OH : 3000 cm⁻¹

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Anlatılan bu metodla elde edilen bileşiklerin veriminin yüksek olması ve kolayca saf halde elde edilmeleri diğer metodlara üstünlük sağlamıştır. IR danda görüldüğü gibi aldehit grubu keto formundan ziyade enol formundadır. Buda fosfora bağlı karbondaki hidrojenlerin asidik olduğunu göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. I. C. Popoff and C. K. Huber, *J. Org. Chem* **28**, 2898
2. R. G. Allen, *Nature*, **56** (1978), 272
3. K. Kato, *Chemical Abstract*, **52** (1958), 10002 a
4. H. J. Harwood, *JACS*, **82** (1960), 423
5. G. Kamal, *Obshch. Khim.*, **18** (1948), 443

BW 301U BİLEŞİĞİNİN SENTEZİNE YENİ BİR SENTETİK YAKLAŞIM

İnci DURUCASU(*) ve Edward C.TAYLOR (**)

(*) Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü 25240 ERZURUM

(**) Princeton University, Department of Chemistry, NJ 08544 U.S.A.

A NEW SYNTHETIC APPROACH TO SYNTHESIS OF BW 301U.

SUMMARY

BW 301U, **2**, is formulated as 2,4-diamino-6-(2,5-dimethoxybenzyl)-5-methyl-pyrido [2,3-d] pyrimidine and it is a lipophilic antifolate drug. BW 301U is also named as piritrexim in pharmacology and as active as methotrexate (MTX) as an inhibitor of dihydrofolate reductase and mammalian cell growth. In this work, it has been aimed at synthesizing of BW 301U by using a new synthetic way. Key intermediate in the process was 1-amino-2-(2,5-dimethoxybenzyl)-[E] and [Z] 2-butene, **3**. The reaction of 2,5-dimethoxyphenylacetyl chloride, **5**, with diazomethane gave 1-chloro-3-(2,5-dimethoxyphenyl)-2-propanone, **7**, as initial material. Gabriel reaction of 1-chloro-3-(2,5-dimethoxyphenyl)-2-propanone with potassium phthalimide afforded 1-(3,5-dimethoxyphenyl)-3-phthalimido-2-propanone, **8**. Wittig condensation of this ketone with ethyltriphenylphosphonium bromide to obtain the requisite compound, 1-phthalimido-2-(2,5-dimethoxybenzyl)-[E] and [Z]-2-butene, **9**, were unsuccessful at all different reaction conditions. It has been expected to obtain key intermediate in the synthetic sequence by hydrolysis of compound **9** on acidic condition.

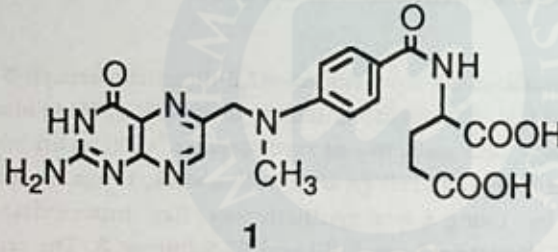
ÖZET

BW 301U, **1**, 2,4-diamino-6-(2,5-dimetoksibenzi)-5-metil-pirido-[2,3-d] pirimidin olarak adlandırılır ve yağda çözünen, folat inhibitörü olan bir ilaçtır. Eczacılıkta piritrexim olarak adlandırılır ve dihidrofolat reduktaz enziminin ve memelilerde hücre büyümesinin inhibitörü olarak en az methotrexate (MTX) kadar etkindir. Bu çalışmada, BW 301U bileşiğinin, yeni bir sentetik yol kullanılarak sentezi amaçlandı. Sentezde elde edilen ara ürün 1-amino-2-(2,5-dimetoksibenzi)-[E] ve [Z] 2-buten, **3**'ü. 2,5-dimetoksifenilasetil klorürün **5**, diazometan ile reaksiyonu, başlangıç maddesi olarak 1-kloro-3-(2,5-dimetoksifenil)-2-propanon, **7**, bileşiğini verdi. 1-kloro-3-(2,5-dimetoksifenil)-2-propanonun potasyum ftalimid ile Gabriel reaksiyonundan 1-(3,5-dimetoksifenil)-3-ftalimido-2-propanon, **8**, elde edildi. Bu ketonun, değişik şartlarda, etiltriphenilfosonyum bromür ile Wittig kondensasyon reaksiyonundan ise, gereken bileşik olan, 1-ftalimido-2-(2,5-dimetoksibenzi)-[E] ve [Z]-2-buten, **9**, elde edilemedi.

Sentezdeki anahtar ara ürün olan 3 bileşiğinin, 9 bileşiğin asidik şartlarda hidrolizinden elde edilmesi beklenilmektedir.

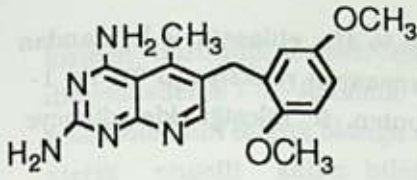
GİRİŞ

Bazı 5-deazopteridinler ya da pürido [2,3-d] pirimidinler, dihidrofolat reduktaz enziminin aktif inhibitörüdür ve antibakteriyel, antimalariyal, antitumor reaktif olarak etkindir. Bunlardan methotrexate, 1, tümör oluşumunu engelleyici ve bağışıklığı sağlayıcı bir ilaç olarak uzun yıllar denenmiştir ve halende kanser kemoterapisinde antimetabolit olarak kullanılmaktadır. Fakat aşırı derecede toksik olması ve çoğu insan tümörlerine etkisiz oluşu, bu ilacın kullanım alanını sınırlamaktadır.(1).

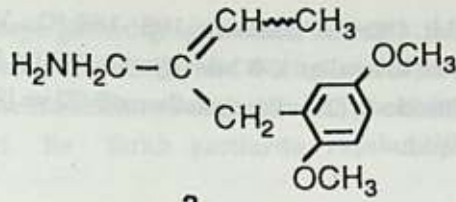


Bundan dolayı, kanserli dokuya karşı eşit etki gösteren ve fakat methotrexatin gösterdiği yan etkileri göstermeyen bir bileşik bulma umudu ile 1 bileşiğinin değişik analoglarının sentezine büyük ilgi duyulmuştur. Methotrexate yapısının her kısmı değiştirilerek, değişik analogları hazırlanmış olmasına rağmen, pteridin halkasının, değişik deazopteridin türevlerinden biri ile yer değiştirdiği analogları, kemoterapik reaktif olarak çok umut vericidir (2).

Bu çalışmada, kanser kemoterapisinde oldukça umut verici bir bileşik olan BW 301U, 2 bileşiğinin yeni bir sentetik yolla sentezi amaçlanmaktadır. BW 301U bileşiği ilk kez 1980 yılında Amerika Birleşik Devletleri Borroughs Welcome ilaç firmasında sentezlenmiş ve bileşiğe 1981 yılında patent alınmıştır (3). Bileşik, ilgili püridopirimidinler ve diğer yağda çözünen diaminoheterosiklik bileşikler arasından, histamin metabolizmasına en az etki gösteren, etkin bir dihidrofolat reduktaz enzim inhibitörü olarak bulunmuştur. Methotrexatin tersine hücrelere girişi hızlı ve sıcaklıktan bağımsızdır, bileşik hücre zarlarından difüzyonla geçmektedir.(4). Bileşik ile yapılan biokimyasal ve kemoterapik çalışmalar, Sarcoma 180 tümörüne hızlı etki ettiğini göstermiştir.(5). Bileşik, özellikle yüksek konsantrasyonlarda, methotrexate'a dirençli hücrelerde, methotrexate'dan daha etkin bulunmuştur. (6).



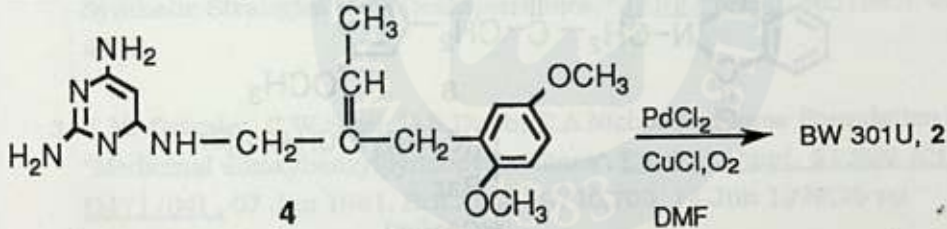
2



3

DENEL BÖLÜM

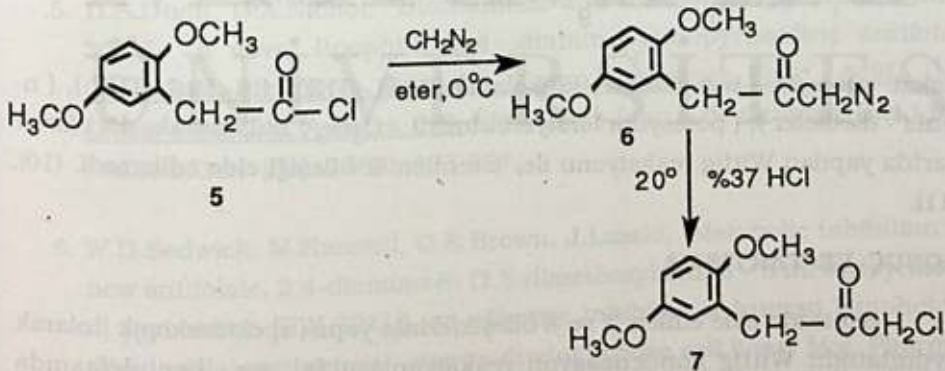
Sentezde öncelikle anahtar ürün olan, 1-amino-2-(2,5-dimetoksifenil)- [E] ve [Z] - 2- butenin, 3 eldesi amaçlandı. Çünkü 3 bileşiğinin 2-kloro-4,6-diaminopirimidin ya da 2-amino-4,6-dikloropirimidin ile kondensasyonundan 1-(2,4,6-triaminopirimidin)-2-(2,5-dimetoksifenil)-2-buten, 4, bileşiği elde edilebilir. 4 bileşiğinin PdCl₂ - CuCl - O₂ kompleks sistemi ile oksidasyonundan ise BW 301U elde edilecektir. (7).



4

DMF

Anahtar ürün olan 3 bileşiğine geçebilmek için, 2,5-dimetoksifenilasetil klorürün, 5, diazometan ile etkileştirilmesinden 6 bileşiği ve bu bileşiğin asitlendirilmesiyle, 1-kloro-3-(2,5-dimetoksifenil)-2-propanon, 7 bileşiği elde edildi. (8). (Erime noktası: 42- 43 °C , Verim: %58, buz banyosunda eterden beyaz kristaller).



5

6

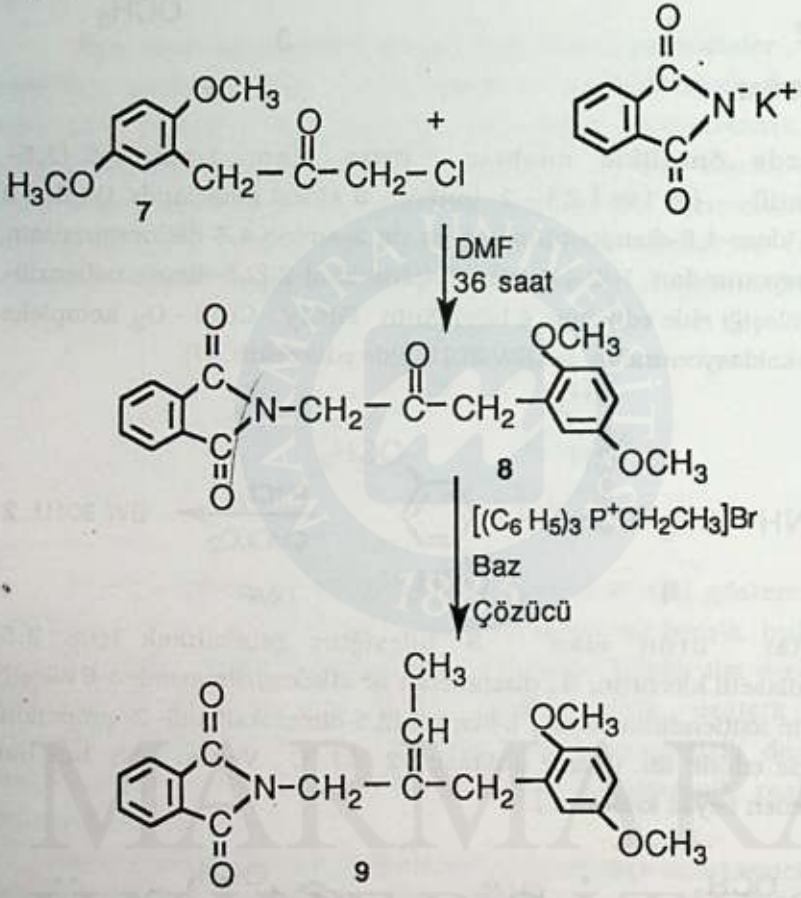
20°

%37 HCl

7

1-kloro-3-(2,5-dimetoksifenil)-2-propanon 7 nin potasyum ftalimid ile Gabriel reaksiyonundan, 1-(2,5-dimetoksifenil)-3-ftalimido-2-propanon, 8, bileşiği elde

edildi. (Erime noktası : 165 -166 °C , Verim : % 48 , etilasetat + heksandan beyaz kristaller). **8** bileşiğinden Wittig kondensasyon reaksiyonu (9) ile 1-ftalimido-2-(2,5-dimetoksibenzil)-[E] ve [Z]- 2-buten, **9** bileşiği elde edilmeye çalışıldı.



Fakat sırasıyla (baz-çözücü) çifti olarak (NaH - THF), (n- BuLi-THF), (n- BuLi - dietileter), (potasyum tersiyerbutoksit - C₆H₆) kullanarak, dört farklı şartda yapılan Wittig reaksiyonu ile, istenilen **9** bileşiği elde edilemedi. (10), (11).

SONUÇ VE TARTIŞMA

Sentezde elde edilen **7** ve **8** bileşiklerinin yapısı spektroskopik olarak aydınlatıldı. Wittig kondensasyon reaksiyonlarında ise, her defasında trifenilfosfinitiliden yilde çözeltisinin karakteristik rengi elde edilmesine rağmen, dört farklı koşulda da, istenilen **9** bileşiği elde edilemedi. Deneylerde **8** bileşiğinin, çözücünün kaynama sıcaklığının da yapılan Wittig reaksiyonu sonucunda bozunduğu, oda sıcaklığında yapılan Wittig reaksiyonunda ise

kısmen bozunup, kısmen etkileşmeye girmediği gözlemlendi. Sonuçta, 1- (2,5-dimetoksifenil) - 3 - ftalimido - 2- propanon bileşiğinin, Wittig reaksiyonuna reaktivitesinin düşük olduğu söylenebilir. Sonucu doğrulamak için, daha az sterik engelli keton bileşikleri ile farklı şartlarda yapılan Wittig reaksiyonları denenmelidir.

KAYNAKLAR

1. D.C. Palmer, J.S.Skotnicki, E.C.Taylor, Progress in Medicinal Chemistry, Ellis, G.P., West, Gb.B., Eds.; Elsevier : Amsterdam, 25, (1988), 85-231.
2. E.C.Taylor; D.C.Palmer, C.P.Tseng, T.J.George , S.R.Fletcher, P.J.Harrington, G.P.Beardsley, D.J.Dumas, A.Rosowsky, M.Wick, "Synthesis and Biological Activity of L-5-Deazafolic Acid and L-5-Deazaaminopterin: Synthetic Strategies to 5- Deazapteridines, "J.Org.Chem., 48,(1983), 4852-4860.
3. E.M, Grivsky, C.W.Sigel, D.S.Duch, C.A.Nichol (Welcome Foundation Ltd.) "Medicinal alkoxybenzylpyridopyrimidines", Eur.Pat. Appl. 21,292 (Cl.CO7 D471/04), 07 Jan 1981, Brit.Appl. 79/20,703, 14 Jun 1979,25 pp.
4. D.S.Duch, M.P.Edelstein, S.W.Bowers, C.A. Nichol, W.Seaton, "Biochemical and chemotherapeutic studies on 2,4- diamino -6-(2,5-dimethoxybenzyl)-5-methylpyrido [2,3-d] pyrimidine(BW 301U), a novel lipid-soluble inhibitor of dihydrofolate reductase," Cancer Res., 42(10), (1982), 3987-3994.
5. D.S.Duch, C.A.Nichol, "Biochemical and chemotherapy studies on BW 301U, a novel lipophilic 2,4- diaminopyridopyrimidine antifolate", Chem.Biol. Pteridines, Proc. Int. Symp. Pteridines Folic Acid Deriv.: Chem. Biol. Clin. Aspects, 7 th 1982 Blair, John A.de Gruyter, Eds.; Berlin, Fed.Reb.Ger. (Pub.1983), 903-907.
6. W.D.Sedwick, M.Hamrell, O.E.Brown, J.Laszlo, "Metabolic inhibition by a new antifolate, 2,4-diamino-6- (2,5-dimethoxybenzyl) - 5 methylpyrido [2,3-d] pyrimidine (BW 301U), an effective inhibitor of human lymphoid and dihydrofolate reductase - overproducing mouse cell lines" Mol. Pharmacol. 22(3), (1982), 766-770.
7. T. Itoh, T.İmini, H.Ogura., " A Simple Synthesis of 1,3-Dialkylpyrido [2,3-d] pyrimidines", Heterocycles, 20,11, (1983), 2177-2180.

8. H.J.Lohrlich, L.Kopanski, R.Herrmann, H.Schmidt, W.Steglich "Synthese der grevilline und verwandter 2H - Pyran - 2,5 (6H) - dione ", Liebigs Ann. Chem. (1986), 177-194.
9. G.Wittig, U.Schoellkopf., "Methylenecyclohexane", Org. Syntheses. Coll. Vol.5., (1973), 751-754.
10. A.S., Sharma, A.K.Gayen "Synthetic Studies on trans-Clerodane Diterpenoids and Congeners: Stereocontrolled Total Synthesis of (+) - 4 - Methylene- α - (3- oxobutyl) - 5 β , 8 β , 9 β - Trimethyl - trans - Decalin and Related Intermediates" Tetrahedron, 41, 20, (1985), 4581-4592.
11. L.Fitjer, U.Quabeck, "The Wittig Reaction Using Potassium-tert-butoxide High Yield Methylenations of Sterically Hindered Ketones", Syn. Commun., 15(10), (1985), 855-864.

3,5 DİMETİL TETRAHİDRO-1,3,5-TİADİAZİN-2-TİON'UN SENTEZİNDE OPTİMUM ŞARTLARIN ARAŞTIRILMASI VE METAL KATYONLARI İLE REAKSİYONLARI

Ayşe ERÇAĞ ve Eyüp ÖZCAN

İstanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Bölümü İstanbul, Türkiye

STUDIES OF THE OPTIMUM CONDITIONS IN SYNTHESIS 3,5 DIMETHYL TETRAHYDRO-1,3,5-THIADIAZIN-2-THIONE'S AND ITS REACTIONS WITH

SUMMARY

In the first section of this work influence of reaction conditions on the product yield at the synthesis of 3,5 dimethyl tetrahydro-1,3,5-thiadiazin-2-thione's which has pesticid characteristics was researched. A new method, which provide product with high yield was carried out. The obtaining product was scoured. Then its structure was elucidated. In the second part of this work it was subjected as a ligand. Complexes of this ligand with Cu^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} , Ni^{2+} was synthesized and studied by UV/visible spectrophotometry in the region of 200-500 nm at pH (acidic). This work was included studies with Cu^{2+} ion.

ÖZET

Bu çalışmanın birinci bölümünde pestisit özelliklere sahip olan 3,5 dimetil tetrahidro-1,3,5-tiadiazin-2-tion'un (DMTT) sentezinde reaksiyon şartlarının ürün verimi üzerine etkileri araştırıldı. Yüksek verimle ürün elde edilmesini sağlayan yeni bir yöntem uygulandı. Elde edilen ürün saflaştırılıp yapısı aydınlatıldıktan sonra çalışmamızın ikinci bölümünde ligand olarak denemelere tabi tutuldu. Ligandın Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} , Fe^{3+} kompleksleri yapılarak asidik pH aralığında $\lambda=200-500$ nm'de UV spektrumları alındı. Bu çalışmada yukarıdaki metallerden Cu^{2+} iyonu seçilerek üzerinde incelemeler yapıldı.

GİRİŞ

Aktif maddesi 3,5 dimetil tetrahidro-1,3,5-tiadiazin-2-tion olan ve Mylone, Dazomet, Tiazon, Basamid ticari adları ile bilinen ürünümüzün oldukça geniş kullanım alanı vardır. Nematizit, insektisit, fungusit ve herbisit etkilerin karışımına sahiptir(1). Serbest yaşayan nematodlara, kök galnematodlarına, patates nematodlarına, pythium, rhizoctonia, fusarium, verticillium, colletotricium gibi toprak fungusları ile tel kurtları ve diğer

toprak zararlılarına etkili bir fumiganttır(2).

Toprak sterilantı olarak, sera sebzeçiliği ve süs bitkileri ile fide yastıklarında kullanılmakta ve mahsul veriminde büyük artış sağlamaktadır(3). Zirai mücadelede kullanılmamasının yanında diğer sanayi dallarında da (kağıt, metal, boya, plastik) bakterisit ve dezenfektan olarak kullanılmaktadır(4). Ülkemizde üretilmemekte yabancı firmalardan ithal edilerek kullanılmaktadır. Bu nedenle DMTT'yi üretime yönelik şekilde sentez etmeyi amaçladık. Ayrıca DMTT bozundurulmak suretiyle ortamdaki uzaklaştırılabilmektedir. Metal katyonları ile reaksiyonları yapılarak DMTT'nin bozunması üzerine etkilerini gözledik. Çıkan sonuçların uygulamaya yönelik bazı yenilikler getirebileceği kanaatindeyiz.

DENEL BÖLÜM

Cihazlar: Spektrofotometrik ölçümler için "Beckmann D.B-GT spektrometer" kullanıldı. pH ölçümleri de "Metrohm Herisau pH meter E603" Cam elektrod "EA 121" ile yapıldı.

Kimyasal ve stok çözeltiler: Kimyasal maddelerin bir kısmı yerli firmalardan bir kısmı da Merck, Fluka gibi yabancı firmalardan satın alındı.

10^{-3} M DMTT nin % 10 luk alkoldeki çözeltisi deneyler sırasında taze hazırlandı. 10^{-3} M Cu^{2+} , 10^{-3} M Co^{2+} , 10^{-3} M Ni^{2+} ve 10^{-3} M Fe^{3+} çözeltileri.

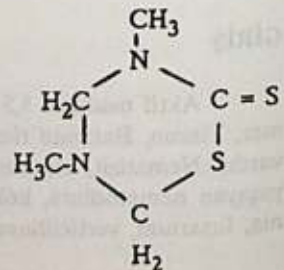
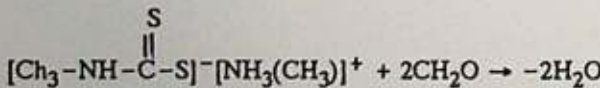
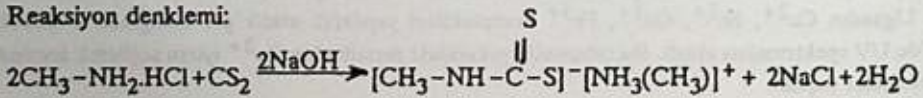
DMTT sentezi

Sentez kesikli olarak iki aşamada yapıldı. Birinci aşamada: 125 ml suda çözülmüş 67 g metilaminhidroklorür, 50 g CS_2 (teorik miktarlardan % 30 oranında fazla) ile bir cam balonda muamele edildi. Balon dıştan soğutulmak suretiyle karışımın sıcaklığı 10°C civarına getirildi. Soğutulan bu karışım üzerine 40 g NaOH in 100 ml suda çözülmesi ile elde edilen çözeltiden damla damla ilave edildi. Bütün NaOH çözeltisi bitene kadar karıştırmaya ve soğutmaya devam edildi. NaOH ilavesi bittikten sonra reaksiyon karışımından reaksiyona girmemiş CS_2 ekstrakte edildi.

Birinci aşamada elde edilen reaksiyon çözeltisi ikinci aşamada $30-40^\circ\text{C}$ civarında kapalı bir kaptaki sürekli karıştırmak suretiyle damla damla % 37 lik CH_2O ile reaksiyona sokuldu. İlave sırasında beyaz katı madde ayrılması gözlemlendi. Ayrılan ürün vakumda süzülürdü. Kurutuldu. E.N= 106° .

Ürünün sentezinde en yüksek ve verime yukarıda anlatıldığı şekilde çalışıldığı zaman ulaşıldı.

Reaksiyon denklemi:



Ürünün Elementel Analizi:

	% C	% H	% N	% S
Hesaplanan	36,97	6,16	17,25	40,52
Bulunan	36,68	6,35	16,97	39,98

Yukarıda gösterilen element yüzdelerine göre bileşiğin ampirik formülü $C_5H_{10}N_2S_2$ olarak bulundu.

Ürünün IR, 1H -NMR, UV spektrumları:

DMTT'nin IR spektrumu; -890 cm^{-1} de $-CH_2-$, -1050 cm^{-1} de $-S-CS-N-$, 1180 cm^{-1} de $C-N$, -1225 cm^{-1} de $C=S$, -1400 cm^{-1} de $C-N$, $-2820-2780$ de $-CH_2-N-CH_3$ pikleri, UV spektrumu $\lambda_{max}=300\text{ nm}$ de maksimum absorpsiyon, 1H -NMR spektrumu $\delta(\text{ppm}) = 2,685$ (3H), $\delta(\text{ppm}) = 3,5113$ (3H), $\delta(\text{ppm}) = 4,3615$ (2H), $\delta(\text{ppm}) = 4,424$ (2H) kimyasal kayma değerlerini vermektedir.

DMTT'nin Metal Katyonları ile Reaksiyonları:

Çalışmanın bu bölümünde ürünümüz ligand olarak denemelere tabi tutuldu. Ligandin Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Fe^{3+} kompleksleri yapıldı. Oluşan komplekslerin asidik pH'larda $\lambda=200-500\text{ nm}$ deki UV spektrumları alındı (Tablo 1).

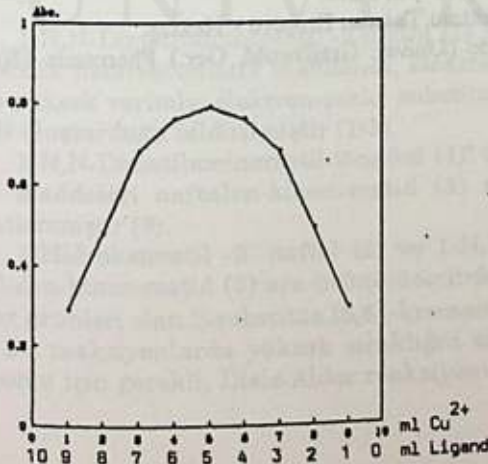
Metal-Ligand	pH	λ_{max} (nm)
Cu^{2+} -DMTT	3,57	390
Co^{2+} -DMTT	3	395
Fe^{3+} -DMTT	2	370
Ni^{2+} -DMTT	3,72	385

Tablo 1: DMTT'nin metal komplekslerinin UV absorpsiyon maksimumları

Metal katyonları ve ligand çözeltileri için en ideal derişim $10^{-3}M$ olarak seçildi. Bu konsantrasyonun altında yeterli absorpsiyon olmamakta, üzerinde ise ölçüm yapılamamaktadır. Suda az çözünen ligand etilalkol-su karışımında (% 10 luk alkol çözeltisi) çözüldü. Her çalışma için taze hazırlanarak sadece bir gün süreyle kullanıldı.

Cu^{2+} -DMTT Kompleksinin Yapısı

Jop metoduna göre Cu^{2+} -DMTT kompleksinin $pH=2,3-5,7$ arasında sürekli değişim eğrileri çizilerek metal-ligand oranı 1/1 olarak bulundu (Grafik 1). Kompleksin spektrofotometrik ölçümleri yaklaşık bir saat için geçerli olup daha sonra bir absorpsiyon artışı ile birlikte renk açık sarıdan yeşile doğru değişmekte, bulanma ve çökelmeler oluşmaktadır.

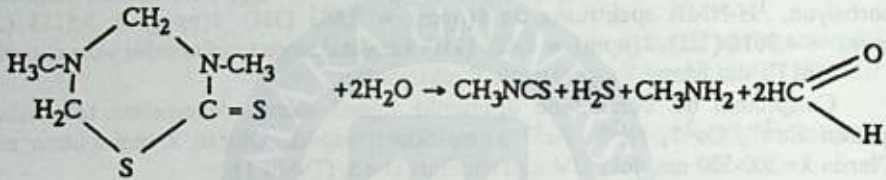


Grafik 1:
 Cu^{2+} -DMTT'nin sürekli değişim eğrisi
[DMTT] = $10^{-3}M$
(%10 alkollü çöz),
[Cu^{2+}] = $10^{-3}M$
 $pH=3,57$, $\lambda_{max}=390\text{ nm}$

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

DMTT sentezinde optimum şartlar araştırıldı ve lab. şartlarında iyi bir verimle sentez edildi. Elde ettiğimiz ürün yapısı aydınlatıldıktan sonra metal kationları ile reaksiyona sokularak metal-DMTT kompleksleri yapıldı. Cu^{2+} , DMTT kompleksi seçilerek metal ligand oranı 1/1 olarak bulundu. Cu^{2+} -DMTT kompleksinin hafif alkollü çözeltide rengi açık sarıdır. Zamanla yeşile kadar renk değişimi ve bulanıklıkla birlikte çökmeler görülmektedir. Neticede Cu^{2+} -DMTT kompleksi sulu çözeltide kısa sürede bozunmaktadır.

DMTT'nin topraktaki toksik etkisi dekompoze olma oranı ve derecesi ile tayin edilir. Isıtıldığında su varlığında topraktaki bozunma mekanizması şöyledir(1):



Denklemden de görüldüğü gibi toprakta rutubet ile temasa geçince yavaş yavaş gaz haline dönüşür ve bu gaz toprağın her tarafına yayılarak toprakta mevcut zararlı organizmaları öldürür. DMTT'nin gaz haline geçebilmesi ve arzu edilen etkiyi gösterebilmesi toprak rutubeti, toprak ısı ve toprak türü gibi faktörlerle yakın ilişki içersindedir(3). Toprakta bütün bu şartlar sağlandıktan sonra DMTT uygulanmalıdır. Uygulandıktan belli bir süre sonra da bozunarak ortamdaki uzaklaşması gerekmektedir. Hemen bozunursa zararlılara etkili olamaz, uzun süre bozunmadan kalırsa da sonradan ekilecek mahsule zarar verir. DMTT uygulandıktan belli bir süre sonra toprağa sulama ile birlikte Cu^{2+} iyonları da verilirse DMTT'nin bozunma hızının artacağı deneylerimiz neticesinde tahmin edilmektedir. Ayrıca Cu^{2+} iyonlarının bakterisit ve fungusit etkileri bilindiğine göre pestisit etkilerine sahip olan DMTT'nin etkisini de artıracak (sinerjistik etki) açıktır. Bu nedenle çalışmalarımızı bu konuda yoğunlaştırdık. Yapı aydınlatma ve diğer metal kationları ile bozunma kinetiği çalışmalarımızda devam etmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- G.S.Gruzdyev, V.A.Zinchenko, V.A.Kalunin, R.I.Slutsov, "The Chemical Protection of Plants", (1969) 126.
- 2- S.Öztürk, "Tarım İlaçları", İstanbul (1990) 273-274.
- 3- Basamid Granulat Toprak Dezenfektanı Tanıtım Broşürü - Hektaş.
- 4- W.Weuffen, D.Martin ve W.Schade (Univer. Greifswold, Ger.) Pharmazie 18(6), (1963) 420-6.

DEĞİŞİK KINON, METİD ÖNCÜLERİ İLE 1,3 - TİYAZİNLERİN SENTEZİ VE MEKANİZMA SAPTANMASI

Orhan BİLGİÇ, Sevim BİLGİÇ ve Mine YALÇINKAYA

Anadolu Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü
ESKİŞEHİR - TÜRKİYE

THE SYNTHESIS OF 1,3-THIAZINES WITH VARIABLE QUINONE-METHIDE PRECURSORS AND THE DETERMINATION OF THE MECHANISM

SUMMARY

In this work the pyrolysis of 1-N, N - dimethylaminomethyl -2-naphthol (1) with thio-benzamide and thioacetamide were investigated. In the end of the reaction of 1-N,N-dimethylaminomethyl-2- naphthol (1) with thiobenzamide, 2-phenylnaphto [5,6] -1,3- thiazine (5, R = Ph) and 3,5 -diphenylthia -2,4-diazole (6, R=Ph) with thioacetamide, 2-methylnaphto [5,6]-1,3- thiazine (5, R= Me) and 3,5-dimethyl- thia-2,4 diazole (6, R=Me) were isolated. But the yield of the second reaction was very low.

ÖZET

Bu çalışmada 1-N,N-dimetilaminometil-1-naftol (1)'ün tiyobenzamid ve tiyoasetamid ile pirolizleri incelenmek istenmiştir. 1-N,N-Dimetilaminometil-2-naftol (1)'ün tiyobenzamid ile reaksiyonu sonunda, 2-fenilnafto [5,6]-1,3-tiyozin (5,R=Ph) ve 3,5 difeniltiya 2,4-diazol (6,R=Ph) tiyoasetamid ile 2-metilnafto [5,6]-1,3-tiyazin (5,R=Me) ve 3,5-dimetiltiya, 2,4-diazol (6,R=Me) izole edilmiştir. Ancak ikinci reaksiyonun verimi çok düşük çıkmıştır.

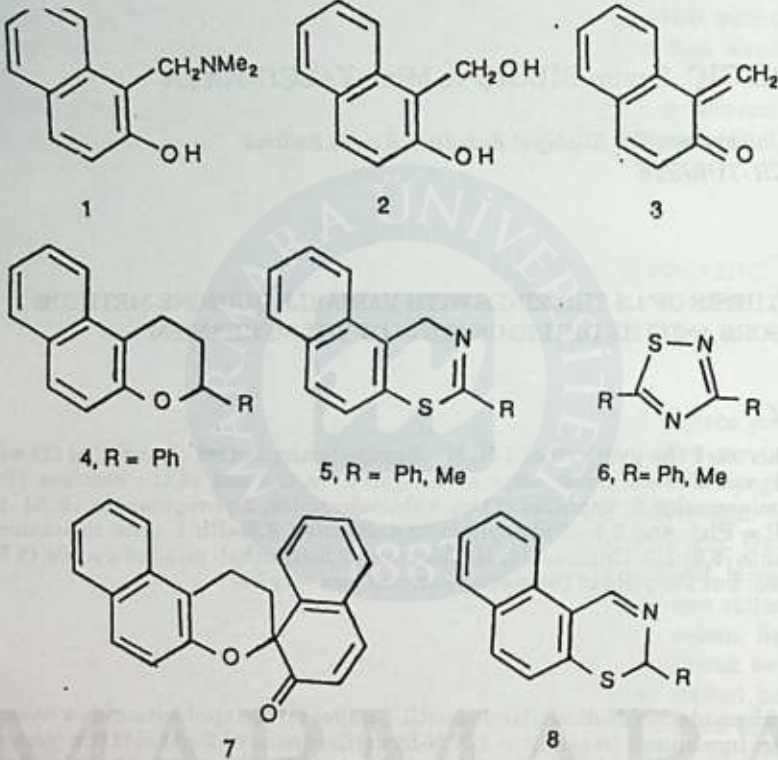
GİRİŞ

1-N,N-Dimetilaminometil -2-naftol (1) 'ün difenil eterli ortamda, 200 °C'de, polisiklik heteroaromatik maddeleri, elektron, verici substitüent içeren anilinlerle yüksek verimle; elektron-çekici substituent içeren anilinlerle ise düşük verimle oluşturduğu bildirilmiştir (1-3).

1-N,N-Dimetilaminometil-2-naftol (1) 'ün anilinlerle polisiklik heteroaromatik maddeleri naftalen-kinon-metid (3) ara-ürünü üzerinden oluşturduğu kanıtlanmıştır (3).

1-Hidroksimetil -2- naftol (2) ve 1-N,N-dimetilaminometil -2-naftol (1) ,naftalen-kinon-metid (3) ara-ürünü üzerinden ters elektron gereksinimli Diels, Alder ürünleri olan 2-substitüe [5,6] -kroman (4,R=Ph)'i verdikleri anlaşılmıştır (4). Bu reaksiyonlarda yüksek sıcaklığın sadece kinon-metid ara,ürünlerinin oluşumu için gerekli, Diels-Alder reaksiyonu için ise gerekli olmadığı savunul-

muştur (5). Bu nedenle naftalen-kinon-metid (3) ara-ürünü üzerinden polisiklik heteroaromatik madde sentezleme yöntemini yeni madde sentezlerini uygulayarak genişletmek ve biyolojik önemi olan sübstitüe tiyazinler sentezlemek istedik.



Çalışmada, izole edilen maddelerin H-nmr spektrumları, jeol PMX 60 S1 (60, MHz) ve Bruker AC 200L (200 MHz) (MAM. TUBİTAK) spektrometrelerinde, ¹³C-nmr spektrumları Bruker AC 200L (MAM.TUBİTAK) spektrometrelerinde, Kimyasal analizler, Carlo Erba Strumentazooone Mode 1106 (MAM.TUBİTAK)'da IR spektrumları 270-230 Hitachi ve IR 435 Schimadzu spektrometrelerinde, u.v. spektrumları 150-20 Hitachi ve UV 240 Schimadzu spektrometrelerinde alınmıştır.

DENEL BÖLÜM

Naftalen-kinon-metid öncüsü , 1-N,N-dimetil aminometil-2-naftol (1) stiren ile kapalı tüp içerisinde, tiyobenzamid ve tiyoasetamid ile ,

- i. Oda sıcaklığında,
 - ii. Toluenin kaynama noktasında,
 - iii. Kapalı tüp içinde,
- reaksiyonları gerçekleştirildi.

1-N,N-Dimetilaminometil-2-naftol (1)'ün stiren ile reaksiyonunda ham-ürünün ince tabaka kromatografisi (SiO_2 - CHCl_3) iki madde varlığını $R_f=0,92$ ve $R_f=0,65$ varlığını göstermiştir. Spektroskopik veriler ve elementel analizlerden, ilk maddenin ($R_f=0,92$) yapısının, naftalen-kinon-metid (3)'in dimeri (7) olduğu, ikinci maddenin ise, ($R_f=0,65$), (4, $R=\text{Ph}$) olduğu anlaşılmıştır. 1-N,N-Dimetilaminometil-2-naftol (1)'ün tiyobenzamid ve tiyoasetamid ile oda sıcaklığında yapılan reaksiyonundan sonuç alınmamıştır. Diğer yöntemlerden sonuçlar alınmıştır. Tiyobenzamid ile reaksiyonunda ham-ürünün ince tabaka kromatografisi (SiO_2 , CHCl_3) iki madde varlığını ($R_f=0,86$ ve $0,66$) göstermiştir.

Üst tabaka ($R_f=0,86$) etil alkolden sarı renkli kristaller vermiştir. 90.44 mg % 38 verim, elementel analiz ve spektroskopik veriler maddenin (5, $R=\text{Ph}$) yapısında olduğunu desteklemiştir. Alt tabaka ($R_f=0,66$) etil alkolden açık sarı renkli kristaller vermiştir. 118.25 mg. % 40 verdim, elementel analiz ve spektroskopik veriler maddenin (6, $R=\text{Ph}$) yapısında olduğunu desteklemiştir.

1-N,N-Dimetilaminometil-2-naftol (1)'ün tiyoasetamid ile reaksiyonunda ham-ürünün ince tabaka kromatografisi (SiO_2 , CHCl_3) çok sayıda leke göstermiştir. Preparatif ince tabaka kromatografik saflaştırma ile madde ($R_f=0,80$ ve $R_f=0,33$) izole edilmiştir.

Üst tabaka, ($R_f=0,80$) etil alkolden beyaz renkli kristaller vermiştir. 13.3 mg % 8,8 verim spektroskopik veriler maddenin (5, $R=\text{Me}$) yapısında olduğunu desteklemiştir.

Alt tabaka, ($R_f=0,33$) uv lambası altında parlak koyu mavi renkli leke, preparatif ince tabaka kromatografisi (SiO_2 , CHCl_3) ile saflaştırma sonunda açık sarı renkte kristalimsi madde izole edildi.

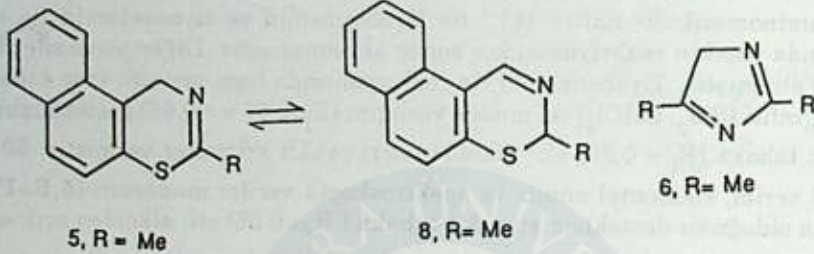
25.2 mg % 12.4 verim spektroskopik veriler ve elementel analiz maddenin (5, $R=\text{Me}$) 2,2:1 oranında denge de olan yapıları desteklemiştir.

TARTIŞMA VE SONUÇ

1-N,N-Dimetilaminometil-2-naftol (1)'ün tiyobenzamid ile 2-fenilnaftol [5,6]-1,3 tiyazin (3, $R=\text{Ph}$) ve tiyobenzamidin tiyobenzami'de 1,3-oiplar katılması ile 2,5-difeniltiya-2,4-diazol'ün (4, $R=\text{Ph}$) oluşturduğu anlaşılmıştır.

1-N,N-Dimetilaminometil-2-naftol (1)'ün tiyoasetamid ile reaksiyonu iyi bir sentez yöntemi olmadığı sonucuna varılmıştır. Çünkü farklı şartlarda gerçekleştirilen reaksiyonların hepsinde ince tabaka kromatografisinde (SiO_2 , CHCl_3) çok fazla leke gözlenmiş ve bunların arasında çok düşük verimle (5 ve 8, $R=\text{Me}$) yapısı ile dengede bulunan ve 2,5 dimetiltiya-2-4 diazol (5, $R=\text{Me}$) elde edilmiştir.

1-N,N, Dimetilaminometil-2naftol (1) fenil halkasında elektron verici sübstitüent içeren (OCH_3 , $-\text{OH}$, CH_3) gibi tiyoamidlerle ısıtılması sonunda değişik 2-sübstitüye nafta [5,6]-1,3-tiyazinlerin elde edilmesi ve biyolojik aktivitelerinin incelenmesi mümkün olacaktır.



KAYNAKLAR

1. J.L. Asherson, O. BILGIÇ, and D.W. Young, A General and Practicable Synthesis of Polycyclic Heteroaromatic Compounds. Part 4 A Rationale for the Mechanism of the Synthesis, *J.Chem.Soc., Perkin Trans I*, 1981,3041
2. O.Bilgiç, and D.W. Young, A General and Prosclicable Synthesis of Polycyclic Heteroaromatic Ccampaunds, *J.Chem. Soc.Perkin Trans I*, 1980,1233.
3. O.Bilgiç, and S.Bilgiç, 1-N,N-Dimetilaminometil-2-naftal ve anilinden Benzakridinin Naftalen-Kinon-Metid Ara-ürünü Üzerinden Sentezi, *Doğa, Tr. J. of Chemistry*, 14 (1990), 22-29.
4. J.Brugidou, and H.Christol, Dien Reation of Mannich bases of 2-Naphthol-Synthesis of 2-substituted Chromans., *Bull. Soc. Chem., Fr* 1963,256,3326 p (a).
5. M.Wakselman, and M. Wilkas, Condensation of o-chloromethyl and o-Hydroxymethyphenols Synthesis of Chromanes, *Compt. Rend.*, 1964, 258, 1526 p.

MAKRO HALKALI ETERLERİN 3-FENİLKUMARİN TÜREVLERİNİN SENTEZLERİ

Mustafa BULUT* ve Çakıl ERK⁺

(⁺)*Istanbul Teknik Üniversitesi, Fen ve Ed. Fakültesi, Kimya Bölümü, Maslak, İstanbul, Türkiye.*

(*)*Marmara Üniversitesi, Fen Ed. Fakültesi, Kimya Bölümü, Kadıköy, İstanbul, Türkiye.*

THE SYNTHESIS OF 3-PHENYLCOUMARIN DERIVATIVES OF MACROCYCLIC ETHERS

SUMMARY

Recently, we initiated a work of synthesis of novel crown ethers. Accordingly, the synthesis of 3-phenylcoumarins and their 15.Crown.5 and 18.Crown.6 derivatives were achieved successfully. 1,2,3-trihydroxy or 1,2,4-triacetoxybenzene were reacted with α -formyl ethyl phenyl acetate derivatives forming 7,8- and 6,7-dihydroxy-3-phenylcoumarins which were then reacted with ditosylate or dichloride of tetra- or pentaethyleneglycols. By this way several products of crown ethers were prepared in good yields in the presence of water/DMF/potassium carbonate. Novel Crowns have exhibited interesting fluorescence and UV spectra as well as NMR and particularly mass spectra.

ÖZET

Alkali metal- ve benzer kanyonlar ile kompleks meydana getirme özellikleri ile tanınmış olan makro halkalı polieterlerin sentezleri ve kanyon bağlama eğilimleri ile ilgili olarak daha önce bir çok çalışma yapılmıştır.¹⁾

Bu nedenle yaptığımız daha önceki çalışmalarımıza paralel olarak yeni bazı makro halkalı ürünlerin sentezi ve kanyon bağlama özellikleri üzerinde çalışılmıştır.²⁾ Özellikle benzo ve benzopiran türevlerinin ilginç özelliklerinin olduğu görülmüş ve yeni bazı moleküllerin sentezi gerçekleştirilmiştir.³⁾

Sunulan bu çalışmada öncelikle 6,7-dihidroksi ve 7,8-dihidroksi-3-fenilkumarinler sentezlenmiştir. Daha sonra bu kumarinlerin uygun ortamda polietilenglikoldiklorür veya ditosilatları DMF ortamında etkileştirilerek makro halkalı eterler elde edilmiştir.⁴⁾

GİRİŞ

Makro halkalı eterler yüzyılımızın ilginç molekül yapılarından biri olup sentetik anti-biyotik özellikleri açısından tıp ve biyokimya gibi konularda geçerlilik kazanmıştır. Sıvı-sıvı faz transferi veya membran-iyon difüzyonu gibi konuların incelenmesinde çok uygun modeller olarak kullanılmaktadır. Uzun bir süredir bu moleküllerin sentezleri stereo-kimyasal özellikleri ve özellikle çekirdek magnetik rezonans yöntemi ile iyon bağlama özellikleri incelenmektedir. Bu nedenle alınan sonuçların yeni moleküller üzerinde yeni özelliklerin çıkarılması açısından farklı fonksiyonel grup içeren yeni yapı sentezleri üzerinde durulmaktadır.⁵⁾

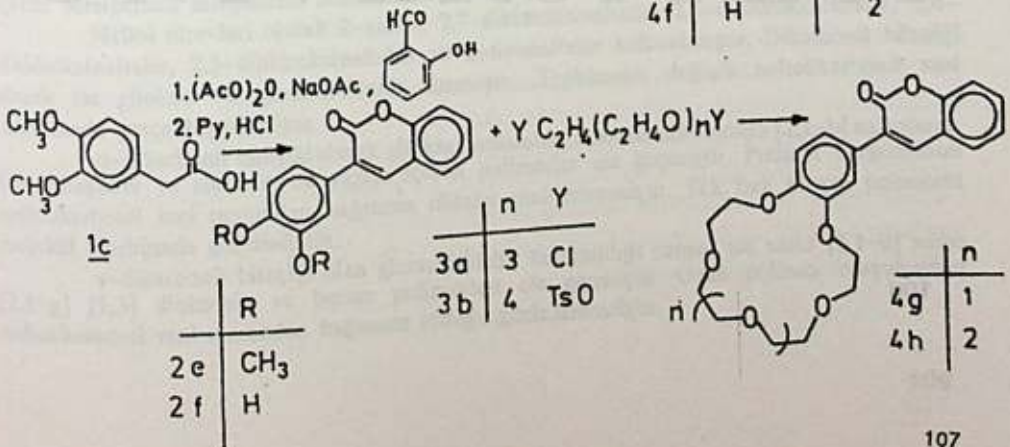
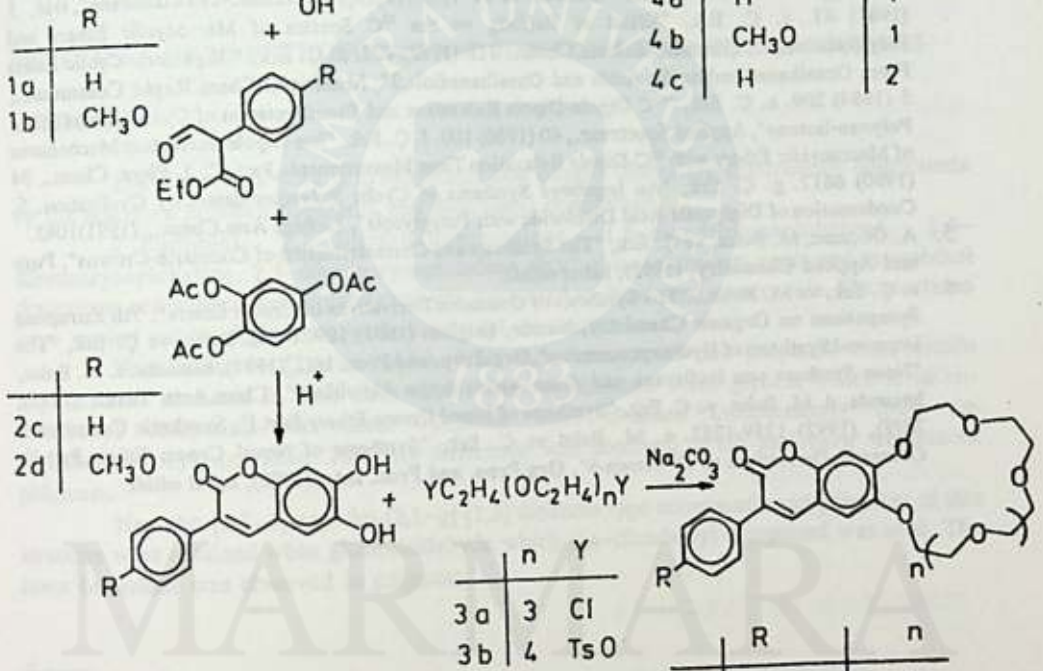
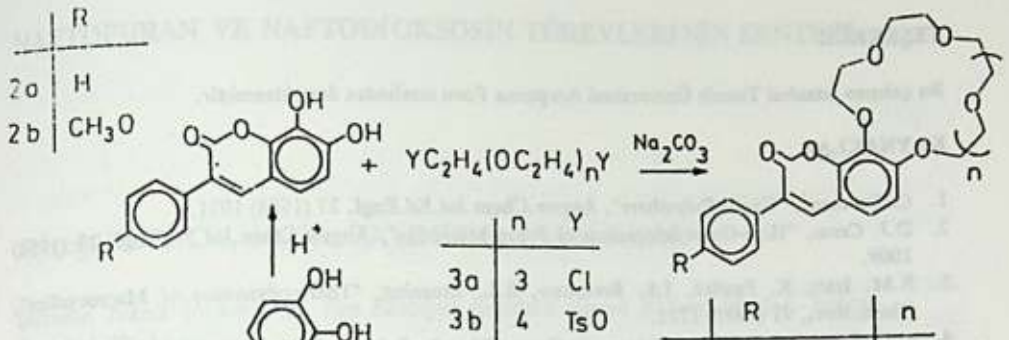
DENEL BÖLÜM

NMR spektrumları 200 MHz de BRUKER spektrometresinde, IR spektra JASCO-FTIR ve Kütle Spektrumları Hewlett Packard GC-MS spektrometresinde alınmıştır. 15.crown.5 türeylelerinin elde edilmesi için o-dihidroksi-3-fenilkumarin (20 mmol), diklorpentaetilenglikol (20 mmol), potasyum karbonat (40 mmol), DMF (45 ml) ve 15 ml su karışımı azot altında 24-36 saat karıştırılarak ısıtılır ve soğutulur, $CHCl_3$ ile ekstrakte edilir, kurutulur alkol veya diklormetandan kristallendirilir. 18.crown.6 türeylelerinin sentezi için diklorpentaetilenglikol yerine pentaetilenglikolditosilat reaksiyona sokulur.

SONUÇLAR

Bu çalışmada öncelikle o-dihidroksi-3-fenilkumarin sentezleri yapılmıştır. Bu maksat ile fenilastik asit türevleri metalik sodyum/eter ortamında etil format ile etkileştirilmiştir. Elde edilen α -formil etil fenil asetat bileşikler Pechmann reaksiyonu üzerinden 1,2,3-trihidroksibenzen veya 1,2,4-asetoksibenzen ile etkileştirilmiştir. Ele geçen o-dihidroksi-3-fenilkumarinler son derece uygun verimler ile hazırlanmalarından yeterince saf ve çözünürlük açısından uygun olmaları nedeni ile makro halkalı eter sentezleri için çok uygun bulunmuştur. Bu bileşikler DMF/su ortamında potasyum karbonat ile homojen çözeltilerde 70-80 °C de reaksiyon verirler.⁹

Formu.no	E.N.	IR Spektra (cm^{-1})	NMR Spektra	Kütle Spektra
4a	78	2830,1720,1110	3.76 8H,3.96 4H, 4.23 2H,4.39 2H, 6.86 1H,7.27 3H, 7.41 2H,7.74 1H	412,280
4c	75	2900,1710,1120	3.76 12H,3.96 4H, 4.23 2H,4.39 2H, 6.86 1H,7.27 3H, 7.41 2H,7.74 1H	446,280
4d	88	2900,1710,1120	3.74 8H,3.89 2H, 4.23 4P,6.83 1P, 7.14 1P,7.38 3H, 7.71 2H,7.97 1H	412,280
4f	viskoz	2860,1720,1110	3.74 12H,3.89 2H, 4.23 4P,6.83 1P, 7.14 1P,7.38 3H, 7.71 2H,7.97 1H	446,280
4g	75	2860,1720,1120	3.77 8H,3.94 4H, 4.19 4H,6.92 1H, 7.31 2H,7.47 2H, 7.55 1H,7.77 2H	412,280
4h	viskoz	2860,1720,1120	3.77 12H,3.94 4H, 4.19 4H,6.92 1H, 7.31 2H,7.47 2H, 7.55 1H,7.77 2H	446,280



TEŞEKKÜR

Bu çalışma İstanbul Teknik Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. C. Pedersen, "Cyclic Polyethers", *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* 27 (1988) 1021.
2. D.J. Cram, "Host-Guest Interaction of Supra Molecules", *Angew.Chem.Int.Ed.Engl.* 27 (1988) 1009.
3. R.M. Izatt, K. Pawlak, J.S. Bradshaw, R.L. Bruening, "Thermodynamics of Macrocyclics", *Chem.Rev.*, 91 (1991) 1721.
4. a. Ç. Erk, "Preparation of Assymetric Crown-Ethers", *Polymer Bull.*, 3 (1980) 47. b. Ç. Erk, ve H. Hoggören, "Some Aromatic Derivatives of 1,4,7,10,13,16-hexaoxacyclooctadecane", *ibid*, 5 (1981) 47. c. Ç. Erk, "Effect of Eu(fod)₃ on the ¹³C Spectra of Macrocyclic Ethers and Polyoxalactones", *Fresenius Z.Anal.Chem.*, 316 (1983) 477. d. Ç. Erk, "Oligomeric Cyclic Esters From Oxaalkanedicarboxylic Acids and Oxaalkanediols,3", *Makromol.Chem.Rapid Communic.*, 5 (1984) 269. e. Ç. Erk, "¹³C Dipole-Dipole Relaxation and Pseudorotation of Cyclic Ethers and a Polyoxo-lactone", *Applied Spectrosc.*, 40 (1986) 100. f. Ç. Erk, "Ion-Dipole Interaction Mechanisms of Macrocyclic Ethers with ¹³C-Dipole Relaxation Time Measurements,Part.6", *J. Phys. Chem.*, 94 (1990) 8617. g. Ç. Erk, "An Improved Synthesis of Cyclic Polyether-Esters by Cyclization. 5, Condensation of Diglycolic Acid Dichloride with Polyglycols", *Liebigs Ann.Chem.*, (1991)1083.
5. A. Göçmen, M. Bulut, ve Ç. Erk, "The Synthesis and Characterization of Coumarin-Crowns", *Pure and Applied Chemistry*, (1992), kabul edildi.
6. a. Ç. Erk, ve M. Bulut., "The Synthesis of Coumarin Derivatives of Crown Ethers", *7th European Symposium on Organic Chemistry*, Namur, Belgium (1991) 109. b. M. Bulut, ve Ç. Erk, "The Improved Synthesis of Hydroxycoumarins", *Org.Prep. and Proc. Int.*, (1991), basımda. c. M. Bulut, "Neue Synthese von Isoflavone und deren Antioxidative Aktivitäten", *Chim.Acta Turc.*, (1991), basımda. d. M. Bulut, ve Ç. Erk, "Synthesis of Novel Crown Ethers,Part.I", *Synthetic Communic.* 22(9), (1992) 1259-1263. e. M. Bulut ve Ç. Erk, "Synthesis of Novel Crown Ethers,Part.II, Coumarin Derivatives of 18-Crown-6", *Org.Prep. and Proc. Int.*, (1992), kabul edildi.

NAFTOFURAN VE NAFTODİOKSOSİN TÜREVLERİNİN SENTEZİ

Ayşegül TUNCA, Naciye TALINLI ve Ahmet AKAR

*Istanbul Teknik Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Maslak-80626-
Istanbul-Türkiye*

SYNTHESIS OF NAPHTHOFURAN AND NAPHTHODIOXOCIN DERIVATIVES

SUMMARY

The aim of this work is to synthesize new oxygen containing heterocyclic compounds by the reactions between naphthols and dicarbonyl compounds.

2-Naphthol, 2,7-dihydroxynaphthalene, 1,5-dihydroxynaphthalene, 2,6-dihydroxynaphthalene, 2,3-dihydroxynaphthalene and 2-thionaphthalene were used as naphthol derivatives and glyoxal and glutardialdehyde were used as dicarbonyl compounds. The reactions were carried out by different naphthol/carbonyl mol ratios.

Naphthofurano [2,1-b] naphthofuran type compounds and polymers that contain naphthofuran structure in their main chains were synthesized when glyoxal which is an α -dicarbonyl compound was used. Polymers were obtained independently from the naphthol/carbonyl mol ratio. The only difference was observed in the molecular weights of polymers.

Naphtho [2,1-d] naphtho [2,1-g] [1,3] dioxocin type compounds and polymers of this structure were obtained when glutardialdehyde which is γ -dicarbonyl compound was used. The same behaviour was observed in polymers.

ÖZET

Bu çalışmada çeşitli naftoller dikarbonil bileşikleriyle tepkimeye sokularak oksijen içeren heterosiklik bileşiklerin sentezi amaçlanmıştır.

Naftol türevleri olarak 2-naftol, 2,7-dihidroksinaftalin, 1,5-dihidroksinaftalin, 2,6-dihidroksinaftalin, 2,3-dihidroksinaftalin ve 2-tiyonaftalin kullanılmıştır. Dikarbonil bileşiği olarak ise glioksal ve glutardialdehit alınmıştır. Tepkimeler değişik naftol/karbonil mol oranlarında gerçekleştirilmiştir.

α -dikarbonil bileşiği olarak glioksal kullanıldığı zaman naftofurano [2,1-b] naftofuran türü bileşikler ve zincirde bu yapıyı içeren polimerler ele geçmiştir. Polimer oluşumunun naftol/karbonil mol oranından bağımsız olduğu gözlemlenmiştir. Tek fark oluşan polimerin molekül ağırlığında görülmüştür.

γ -dikarbonil bileşiği olan glutardialdehit kullanıldığı zaman ise nafto [2,1-d] nafto [2,1-g] [1,3] dioksosin ve bunun polimerleri ele geçmiştir. Gene polimer oluşumunun naftol/karbonil mol oranından bağımsız olduğu gözlemlenmiştir.

GİRİŞ

Bu çalışmada oksijen içeren heterosiklik bileşiklerin sentezi amaçlanmış ve fenollerle karbonil bileşikleri arasındaki tepkimelerden yararlanılmıştır [1].

Son yıllarda naftofuranonaftofuran türü bileşiklerin sentezi için 1,4-diariloksi-2-bütün'lerin Claisen çevrilmesinden yararlanılmaktadır [2]. Ancak bu yöntem hem zor hem de verimin düşük olmasından dolayı pek uygun değildir. Oysa fenollerle karbonil bileşikleri arasındaki tepkimelerde yüksek verimle ürün ele geçmekte ve yan ürün oluşumu az olmaktadır [3]. Tepkimeler oda sıcaklığında ve asit katalizörlüğünde gerçekleşmektedir [1]. Aynı zamanda Claisen çevrilmesi sonucunda hem [2,1-b] benzofuran hem de [1,2-b] benzofuran karışım olarak ele geçmektedir [2]. Oysa karbonil bileşikleri ile gerçekleştirilen tepkimelerde düşük sıcaklıkta tek ürün oluşumu söz konusudur [4].

DENEL BÖLÜM

Standart Yöntem : Naftol bileşiği formik asit içinde çözülüp 40-45°C'a ısıtılır. Karbonil bileşiği bu karışıma yavaş yavaş katılır. Tepkime karışımı bu sıcaklıkta 6 saat karıştırılır. Çöken kristaller alınır ve su ile yıkanır.

Ele geçen ürünler ince tabaka ve kolon kromatografisi yöntemleriyle ayrılmış ve saflaştırılmıştır. Ele geçen bileşiklerin yapıları FTIR, NMR ve MS yöntemleri kullanılarak aydınlatılmıştır. Polimerlerin molekül ağırlıkları viskozite yöntemiyle saptanmıştır.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tepkime önce kondensasyon sonra da molekül içi asetalleşme üzerinden yürümekte ve ürünler ele geçmektedir.

Gliksal kullanıldığı zaman ele geçen ürün naftofuranonaftofuran yapısında olmuştur. Naftol türevinde hidroksil gruplarının birbirine zıt konumda olduğu durumlarda (2,6 ve 1,5 konumları) beklenen siklik bileşik yerine polimer ele geçmiştir. Değişik mol oranlarında çalışılmasına rağmen polimer oluşumunu önlemek mümkün olmamıştır. Tek fark oluşan polimerin molekül ağırlığında gözlemlenmiştir.

γ -dikarbonil türevi olan glutardialdehitin kullanıldığı durumlarda ise nafto [2,1-d] nafto [2,1-g] [1,3] dioksosin türevleri ele geçmiştir. Glutardialdehit ile yapılan tepkimelerde bütün dihidroksinaftalin türevleri kullanıldığı zaman polimer elde edilmiş, sadece 2-naftol ve 2-tiyonaftalinin kullanıldığı durumlarda beklenen [1,3] dioksosin türevleri elde edilebilmiştir.

KAYNAKLAR

1. E.C.M. Coxworth, "Reaction of glyoxal at the ortho position of phenols. Synthesis of 5a,10b-dihydrobenzofuro [2,3-b] benzofurans and 2-(3-benzofuranyl) phenols", *Can.J.Chem.*, 45 (1967), 1777-1787.
2. S. Ramakanth, K. Narayanan, K.K. Balasubramanian, "On the Claisen Rearrangement of 1,4-Diaryloxy-2-Butynes", *Tetrahedron*, 40 (1984), 4473-4480.
3. R.W. Layer, "Synthesis of 2(3H) Benzofuranones from Glyoxal and Phenols", *J.Heterocycl.Chem.*, 12 (1975), 1067-1070.
4. A. Bunn, M.E.A. Cudby, J.C. Mc Gowan, "The Condensation of Resorcinol with Benzil" *Recueil*, 87 (1968), 599-608.

MARMARA
ÜNİVERSİTESİ

KAYNAKLAR

1. B.C.M. Ozworth, "Reaction of glycol in the water system at elevated temperatures", *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **1**, 1-10 (1963).

2. S. S. Stannett, "The reaction of glycol in the water system at elevated temperatures", *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **1**, 11-18 (1963).

3. S. S. Stannett, "The reaction of glycol in the water system at elevated temperatures", *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **1**, 19-26 (1963).

4. S. S. Stannett, "The reaction of glycol in the water system at elevated temperatures", *J. Polym. Sci. Polym. Chem. Ed.*, **1**, 27-34 (1963).



MARMARA ÜNİVERSİTESİ

Cephalaria transilvanica'dan İZOLE EDİLEN İKİ TRİTERPEN GLİKOZİDİN YAPILARI ÜZERİNDE ÇALIŞMALAR

Süheyla KIRMIZIGÜL ve Hüseyin ANIL

Ege Üniversitesinde Fen Fakültesinde Kimya Bölümü Bornova - İZMİR / TÜRKİYE

STUDIES ON THE STRUCTURES OF TWO TRITERPENE GLYCOSIDES FROM Cephalaria transilvanica

SUMMARY

Two triterpene glycosides (Glycoside I and II) were isolated from the dried flowers of Cephalaria transilvanica. After acidic hydrolysis it has been found that two glycosides contain same aglycone. Its structure was established as Δ^{12} -olean-3,28-diol-11-on by spectroscopic methods. Qualitative and quantitative monosaccharide determinations showed that the sugar chains of both glycosides consist of one rhamnose and three glucose units.

One of the four monosaccharides formed α -glycosidic bond and the others formed β -glycosidic linkages. The two glycosides differs from each other by the bonding positions and by the sequence of the four monosaccharides.

ÖZET

Cephalaria transilvanica kurutulmuş çiçeklerinden iki triterpen glikozit (Glikozit I ve II) izole edildi. Asidik hidroliz sonucu her iki glikozidin aynı aglikonu içerdiği belirlendi ve spektroskopik analizlerle aglikonun yapısı Δ^{12} -olean-3,28-diol-11-on olarak tayin edildi. Asidik hidroliz karışımına uygulanan kalitatif ve kantitatif monosakkarit tayinleri sonucu, her iki glikozidin şeker zincirlerinin bir rhamnoz ve üç glukoz biriminden oluştuğu ortaya konuldu. Monosakkaritlerden üçünün β -, birinin α -glikozidik bağ oluşturduğu ve iki glikozidin, şeker zincirini oluşturan monosakkaritlerin bağlanma yerleri ve sıraları bakımından farklılık gösterdikleri saptandı.

GİRİŞ

Glikozidler doğada yaygın olan ve hemen hemen tamamı bitkilerden izole edilen doğal bileşiklerdir. Antibakteriyel, insektisid, antimikotik ve antibiyotik etki göstermeleri nedeniyle tıp, tarım ve hayvancılıkta önemli kullanılış alanı bulmaktadırlar (1, 2).

Dünyada yaklaşık 25 türü bulunan Cephalaria türünden C. procera, C. nachcivanica, C. kotchy ve C. gigantea glikozitleri (3 - 9) üzerinden bazı çalışmalar yapılmış ve izole edilen birkaç triterpen glikozidin yapıları tayin edilmiştir. C. transilvanica glikozitleri üzerinde yapılan bir çalışmaya lite-

ratürde rastlanmamıştır. Bu çalışmada *C.transilvanica*'dan izole edilen ve saflandırılan iki triterpen glikozidın yapılarının aydınlatılması amaçlanmıştır.

DENEL BÖLÜM

a) Kullanılan ecza, adsorban ve aletler

¹H-NMR ve ¹³C-NMR spektrumları 200 MHz Bruker NMR Spektrometre-
siyle kaydedildi. Silillenmiş monosakkaritler üzerinde kantitatif monosak-
karit tayini PACKARD 439 gaz kromatografisi cihazıyla yapıldı.

İnce tabaka kromatografisi için silikagel G 60 (Nach Stahl, Merck), kolon
kromatografisi için silikagel 60 ve preparatif tabaka kromatografisi için si-
likagel 60 PF₂₅₄ kullanıldı. Kromatografik ayırma ve inceleme
işlemlerinde aşağıdaki çözücü sistemleri kullanıldı.

A	Kloroform/metanol/su	: 65 : 20 : 10
B	Kloroform/metanol/su	: 65 : 25 : 10
C	Kloroform/metanol/su	: 65 : 30 : 10
D	Kloroform/metanol/su	: 65 : 35 : 10
E	Etilasetat/piridin/su	: 3,6 : 1 : 1,5 [10]
F	n-Butanol/etanol/su	: 2 : 1 : 1 ve 4 : 1 : 5
G	Kloroform/aseton	: 5 : 1
H	Kloroform/metanol	: 98,5 : 1,5

b) Glikozidlerin izolasyonu, saflandırılması ve türevlendirilmeleri

Kurutulmuş ve öğütülmüş 1 kg çiçek materyali oda sıcaklığında metanolle
(2x5 lt) ekstre edildi ve metanol düşük baskıda deriştirildi. Geriye kalan ek-
stre suda çözüldü ve nötral glikozidler n-butanolle çekildi. Butanol ekstresi-
nin 5 g.1 bir silikagel kolonda sırasıyla A, B, C ve D çözücü sistemleri kul-
lanılarak ayrıldı. Glikozit I (162 mg) ve glikozit II (184 mg) saf olarak elde
edildi.

Glikozit I ve II'nin 50 şer mg.ı 10 ml. piridin/5 ml. asetik anhidrit ile asit-
lendi; H çözücü sistemi kullanılarak preparatif tabaka kromatografisi ile
saflandırıldı; 66 mg asetillenmiş glikozit I ve 72 mg asetillenmiş glikozit II
amorf katı maddeler olarak elde edildi.

c) Asidik Hidroliz; Kalitatif ve Kantitatif Monosakkarit Tayini

Glikozit I ve II'nin 40 ar mg.ı 2N HCl ile asidik hidrolize uğratıldı; aglikon-
ların ayrılmasından sonra geriye kalan monosakkarit karışımları, kağıt

kromatografisiyle E ve F çözücü sistemleri kullanılarak incelendi. Şeker zincirlerinin ramnoz ve glukozdan oluştuğu saptandı. Her iki glikozidin monosakkarit karışımları 0.4 ml piridinde çözüldükten sonra 0.2 ml hegzametil-türevleri karışımlarının gaz kromatografik analizi sonunda, her iki glikozit zincirinde ramnoz / glukoz: 1:3 olarak tayin edildi.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Glikozit I ve bunun asetil türevinin sırasıyla C₅D₅N ve CDCl₃ de kaydedilmiş ¹³C-NMR spektrum verileri Çizelge I'de yer almıştır.

Çizelge I: Glikozit I ve asetil türevinin ¹³C-NMR verileri

Glikozit I		Asetillenmiş Glikozit I	
δ(ppm)	C türü	δ(ppm)	C türü
181.1	C=O (α, β -doymamış)	181.1	C=O (α, β -doymamış)
144.8	olefinik	171.1 - 169.0	12xasetil
122.0	olefinik	143.3	olefinik
107.1	anomerik C	122.8	olefinik
104.8	anomerik C	103.8	anomerik C
103.7	anomerik C	101.4	anomerik C
101.6	anomerik C	100.3	anomerik C
		97.6	anomerik C
		82.8 - 66.2	16x CH-O - (sek. alkol)
83.8 - 69.8	16xCH-O-(sek. alkol)	65.1 - 61.6	4x -CH ₂ -O-(prim alkol)
66.5 - 62.7	4x-CH ₂ -O-(prim. alkol)	47.8 - 12.6	26x >C-, >CH -CH ₂ -ve-CH ₃
48.2 - 14.1	26x >C-, >CH -CH ₂ -ve-CH ₃	21.6 - 20.7	12xasetil CH ₃

Glikozit I ve asetil glikozit I'in Çizelge I'de verilen ¹³C-NMR verileri ile yine bu bileşiklerin ¹H-NMR verilerinin değerlendirilmesi sonrası, yapı hakkında şu bilgiler elde edildi. Glikozit I, bir triterpen (C₃₀) aglikon içermektedir; aglikon bir primer ve bir sekonder alkol grubu, çift bağa konjugé durumda bir keton grubu içermektedir. Glikozit I'in kütle spektrumunda yer alan aglikona ilişkin karakteristik fragmanlarında değerlendirilmesiyle aglikonun yapısı Δ¹² - olean - 3,28 - diol - 11 - on olarak belirlenmiştir.

Glikozit I'in asidik hidrolizi sonrası yapılan kalitatif ve kantitatif monosakkarit tayinleri, monosakkarit zincirinin 1 ramnoz ve 3 glukoz birimden oluştuğunu ortaya koymuştur. Ayrıca asetillenmiş glikozit I'in ¹³C-NMR spektrumundaki anomerik C atomlarının kimyasal kayma değerlerinden, monosakkarit zincirini oluşturan monosakkaritlerden birinin α - (δ 97.6 ppm), diğer üçünün (δ 100.3, 101.4 ve 103.8 ppm) β -glikozidik bağlı olduğu tayin edilmiştir.

Glikozit II ve bunun asetil türevinin sırasıyla C_5D_5N ve $CDCl_3$ de kaydedilmiş ^{13}C -NMR spektrum verileri Çizelge II'de yer almıştır.

Çizelge II: Glikozit II ve asetil türevinin ^{13}C -NMR verileri

Glikozit II		Asetillenmiş Glikozit II	
δ (ppm)	C türü	δ (ppm)	C türü
179.9	C=O (konjuge)	182.2	C=O (konjuge)
144.2	olefinik	169.8 - 168.2	12xasetil
122.1	olefinik	142.8	olefinik
106.9	anomerik C	123.2	olefinik
105.2	2xanomerik C	103.8	anomerik C
101.6	anomerik C	101.4	2xanomerik C
83.7 - 69.8	16xCH-O-(sek. alkol)	97.7	anomerik C
66.5 - 61.4	4x-CH ₂ -O-(prim. alkol)	83.6 - 66.1	16xCH-O-(sek. alkol)
47.6 - 19.7	15 $\geq C$ - ve -CH ₂ -	65.3 - 61.5	4x -CH ₂ -O-(prim. alkol)
48.4 - 13.9	11 $\geq CH$ ve -CH ₃	46.4 - 22.6	15 $\geq C$ - ve -CH ₂ -
		48.3 - 12.7	11 $\geq CH$ ve -CH ₃
		20.4 - 20.8	12xasetil CH ₃

Glikozit II ve asetil glikozit II'nin Çizelge II'de yer alan ^{13}C -NMR verileri ile yine her iki bileşiğin 1H -NMR verilerinin değerlendirilmesi sonucu, glikozit II'nin bir triterpen (C_{30}) aglikon içerdiği; aglikonun bir konjuge karbonil grubu ile iki -OH grubu (bir primer, bir sekonder) taşıdığı saptandı. Gerek kütle karakteristik fragmanlarının değerlendirilmesi, gerekse asidik hidroliz sonrası elde edilen serbest aglikonun, glikozit I'in aglikonuyla karşılaştırılması sonucu, her iki glikozidin aglikonlarının aynı olduğu sonucuna varıldı.

Glikozit II'nin hidrolizi sonrası uygulanan kalitatif ve kantitatif monosakkarit tayinleri sonunda, glikozit II'nin monosakkarit zincirinin de bir ramnoz ve üç glukoz biriminden oluştuğu saptanmıştır. Yine asetillenmiş glikozit II ^{13}C -NMR spektrumundaki anomerik C atomlarına ilişkin kimyasal kayma değerlerinden, monosakkarit zincirinde yer alan dört monosakkaritten üçünün β -, bir monosakkaritin α - glikozidik bağ oluşturduğu tespit edilmiştir.

Glikozit I ile glikozit II, şeker zincirini oluşturan monosakkaritlerin birbiriyle bağlanma durumları ve bağlanma yerleri bakımından farklılık göstermektedir. Kesin yapı çalışmaları devam etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Tschesche, R., Wulff, G., Fortschritte der Chemie Organische Naturstoffe, Bd., 30, Springer - Verlag, Wien (1973).
2. Wulff, G., Dtsch. Apoth. Ztg., Bd. 108 (1968).
3. Zemtsova, G. N., Bandyvkova, V. A., Chem. Abstr., 70 54843 r (1969).
4. Zemtsova, G. N., Bandyvkova, V. A., Chem. Abstr., 74, 39 165 k (1971).
5. Sokolov, L. C., Chem. Abstr., 48, 11727 (1954).
6. Mousumov, I. S., Aliev, A. M., Kondratenke, E. S., Abubakirov, N. K., Chem. Abstr., 83, 203755 (1975).
7. Zviadadze, L. D., Dekanosidze, G. E., Kemertelidze, E. Ph., Chem. Abstr., 93, 146302 s (1980).
8. Zviadadze, L. D., Dekanosidze, G. E., Dzhikiya, O. D., Kemertelidze, E. P., Shashkov, A. S., Chem. Abstr., 95, 76861 p (1981).
9. Zviadadze, L. D., Dekansizde, G. E., Kutateladze, T., Chem. Abstr., 99 102239 w (1983).
10. Colombo, P., Corbetta, D., Pirota, A., Ruffini, G., Sartori, A., J. Chromatogr. (Amsterdam), 3, 343 (1965).
11. Wulff, G., J. Chromatogr. (Amsterdam), 18, 2856 (1965).

KAYITLAR

1. Tachibane, R., Wille, G. *Festschrift für Hans-Otto Gröbner zum 60. Geburtstag*. Ed. H. O. Gröbner. Verlag W. de Gruyter.
2. Wille, G. *Math. Abh. 29, 89-107 (1958)*
3. Zsigmondy, K. *Bollett. U. M. I. 58, 265-284 (1902)*
4. Zsigmondy, K. *Bollett. U. M. I. 58, 265-284 (1902)*
5. Zsigmondy, K. *Bollett. U. M. I. 58, 265-284 (1902)*
6. Mordell, T. J., Alford, A. G., Rosen, M., Serre, D., Shimura, G., Tate, J., Thakur, J. P., Ueno, K., Wiles, G., Zagier, D., Zarhin, V. A., Zink, B., Zink, T. *Journal of Number Theory* 27, 1-162 (1987)
7. Zsigmondy, K. *Bollett. U. M. I. 58, 265-284 (1902)*
8. Zsigmondy, K. *Bollett. U. M. I. 58, 265-284 (1902)*
9. Zsigmondy, K. *Bollett. U. M. I. 58, 265-284 (1902)*
10. Zsigmondy, K. *Bollett. U. M. I. 58, 265-284 (1902)*
11. Zsigmondy, K. *Bollett. U. M. I. 58, 265-284 (1902)*
12. Wille, G. *J. Number Theory* 18, 355-357 (1982)

MARMARA
ÜNİVERSİTESİ

ORIGANUM ONİTES L. UÇUCU YAĞININ BİLEŞİMİ

Muzaffer ÖĞÜTVEREN (***), F. Zerrin ERDEMGİL (*)
 Mine KÜRKÇÜOĞLU (***), Temel ÖZEK (***),
 K. Hüsnü Can BAŞER (***)

(*) Anadolu Üniversitesi, Tıbbi Bitkiler Araştırma Merkezi,
 26470, Eskişehir, Türkiye

(**) Anadolu Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakognози Ana Bilim Dalı,
 26470, Eskişehir, Türkiye

COMPOSITION OF THE ESSENTIAL OIL OF ORIGANUM ONITES L.

SUMMARY

The water and steam distilled essential oils of *Origanum onites* L. were subjected to GC and GC/MS analysis and their physicochemical properties were determined.

The major component of the oils; carvacrol (65.91-67.06%), linalool (12.84-14.84%) and p-cymene (3.24-3.74%) were isolated.

ÖZET

Origanum onites L. (İzmir kekikği)'in toprak üstü kısımlarından su ve su buharı distilasyonları ile elde edilen uçucu yağlar Gaz Kromatografisi ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi ile analize tabi tutulmuştur ve bazı fizikokimyasal özellikleri belirlenmiştir. Yağların ana bileşenleri karvakrol (% 65.91-67.06), linalool (% 12.84-14.84) ve p-simen (% 3.24-3.74) olarak bulunmuştur.

GİRİŞ

Son yıllarda Türkiye'de ve diğer ülkelerde hastahkların tıbbi bitkilerle tedavi edilmesi üzerine yapılan çalışmalar gittikçe artmaktadır. Bu nedenle çeşitli bitkilerin ve bitkisel çayların kullanımı da yaygınlaşmaktadır (1). Yurdumuzda Batı ve Güney Anadolu'da yetişen ve halk arasında kekik adıyla kullanılan toplam 21 *Origanum* türü ve 5 taksonu bulunmaktadır (2). Yurdumuzda halk arasında kekik adıyla kullanılan bir baharat türü olan *Origanum onites* L. herbasının oldukça fazla rağbet görmesi ve bugüne kadar yapılan farmakolojik deneylerde belirlenen önemli özellikleri bu bitkinin uçucu yağına ait bileşenlerin aydınlatılmasını gerekli kılmıştır. *Origanum onites* L. mideyi, sedatif, antimikrobiyal, antiseptik, antihelmintik ve kadriovasküler stimulan özellik gösterir. Uçucu yağ ise dahilen kolagog, haricen antiseptiktir (3). Karın ve dişeti nevralfilerini gidermede infüzyonundan yararlanılmaktadır (4). Ayrıca yapılan farmakolojik deneylerde uçucu yağın sıçanların barsaklarındaki kasılmayı önlediği ve analjezik aktivite gösterdiği tespit edilmiştir (3). Bu nedenle *O. onites* L. herbansından su ve su buharı distilasyonu ile elde edilen uçucu yağların yapısındaki bileşenler GC ve GC/MS ile belirlenmiştir. *Origanum* türleri yurdumuzun bilhassa Ege ve Akdeniz bölgelerinde doğa'dan toplanıp kurutulduktan sonra büyük miktarlarda ihracat dolar döviz geliri elde edilmiştir (5). *Origanum onites* L. yurdumuzda en çok ihracatı yapılan kekik türüdür. 1968'de Calzolari ve arkadaşları Türk *Origanum onites* için yaptıkları çalışmalarda %

83.10 karvakrol bulmuşlardır (6). Türkiyede yapılan çalışmalarda % 1.5-3.9 oranında uçucu yağ verimi ve % 47-80 kadar karvakrol elde edilmiştir. (7). Yunanistan'da ise Kokkini ve arkadaşları O. onites L.'den % 1.84-4.54 oranında uçucu yağ elde etmişlerdir (8).

DENEL BÖLÜM

Bu çalışmada materyal olarak İzmir yöresinden toplanılan O. onites L. herbasının toprak üstü kısımları kullanılmıştır. Bitki gölgede kurutulduktan sonra su ve su buharı distilasyonlarına tabi tutularak uçucu yağlar elde edilmiştir. Bu distilasyonu cam Clevenger aparatı, su buharı distilasyonu ise yarı-pilot ölçekli 80 L kapasiteli paslanmaz çelik distilasyon ünitesi kullanılarak yapılmıştır. Su distilasyonu için 10 gram, su buharı distilasyonu için ise 8.4 kg. kaba toz edilmiş drog kullanılmıştır. Uçucu yağların verimleri kuru drog üzerinden hesaplanmış ve nem miktarları Volümetrik yöntemle tayin edilmiştir. Yağlardaki ortalama nem % 7.61 olarak belirlenmiştir (9).

Distilasyon İşlemi

Su distilasyonu
Su buharı distilasyonu

Yağ verimi (%)

1.99
1.56

Gaz Kromatografisi (GC) ve Gaz Kromatografisi/Kütle Spektrometresi (GC/MS) Analiz Koşulları:

Tablo 1. GC ve GC/MS Analiz Koşulları

	GC	GC/MS
Cihaz	Shimadzu GC-9A	Shimadzu GC/MS QP2000
Kolon	Thermon-600 T (E. Silika kaplı kolon 50 m x 0,25 mm)	Thermon-600 T (E. Silika Kaplı kolon, 50 m x 0,25 mm)
Taşıyıcı Gaz	Azot	Helyum
Dedektör Sıcaklığı	250 °C	250 °C
Enjeksiyon Sıcaklığı	250 °C	250 °C
Split Oranı	60 : 1	60 : 1
Isı Programı	70 °C/10'//2°C/dak// 180 °C - 30'	70 °C/10'//2°C/dak// 180 °C - 30'
Entegratör Yazıcı	C-R4A	-
Kağıt hızı	5 mm/dak	-
İyon Kaynağı Sıcaklığı	-	250 °C
Elektron Enerjisi	-	70 eV
Kütle Aralığı	-	10-400 m/z
Scan Aralığı	-	2 Sn
Dedektör	FID	-

Uçucu yağda bulunan bileşenler eritilmiş silika kaplı kolonda tutunma sürelerine göre ayrılmış ve relatif yüzdelere göre değerlendirilmiştir. Ayrıca uçucu yağdaki bileşenler Gaz kromatografisi kolonundan ayrılıp iyonlaştırıldıktan sonra her birinin kütle spektrumları alınmıştır. Değerlendirme işlemleri GC/MS cihazının 43000 maddelik NBS/NIH/EPA kütüphanesi, TBAM terpen kütüphanesi yanında "The Wiley/NBS Registry of Mass Spectral Data" ve diğer kaynaklar kullanılarak yapılmıştır (10-13). Her iki çalışmaya ait analiz koşulları Tablo 1 de verilmiştir.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada *O. onites*'in kurutulmuş toprak üstü kısımlarından su ve su buharı distilasyonu ile elde edilen uçucu yağ örneklerinin verimleri ve bileşimleri karşılaştırılmış, aralarında büyük farklılıklar olmadığı gözlenmiştir.

Uçucu Yağların Fizikokimyasal Özellikleri

Distilasyon İşlemi	Fizikokimyasal Özellikler		
	d_{20}	$[\alpha]_D^{20}$	$[\eta]_D^{20}$
Su Distilasyonu	0.98	-4°08'	1.5055
Su Buharı Distilasyonu	0.95	-5°26'	1.5065

Su ve su buharı Distilasyonundan elde edilen uçucu yağlar kolon kromatografisine tabi tutulmuştur. Kromatografik ayırım sonucu toplanan birinci ve üçüncü fraksiyonlar sırasıyla monoterpenhidrokarbon (MTHC) ve oksijenli monoterpen (OCMT) fraksiyonları olup içerdikleri ana bileşikler Gaz kromatografisi/Kütle spektrometrisi'nde tanımlanmıştır. Uçucu yağlarda toplam 68 bileşik gözlenmiştir. Su buharı distilasyonu ile elde edilen yağda 53, su distilasyonu ile elde edilen yağda ise 49 bileşik tanımlanmıştır. Bu bileşikler sırasıyla toplam yağın % 74.94'üne ve % 72.05'ine tekabül etmektedir.

Vokou ve arkadaşlarının Yunanistan'da yaptıkları bir çalışmada % 51.0-84,5 kadar karvakrol ana bileşen olarak bulunmuştur. Elde ettikleri bileşenlerin en önemlileri arasında p-simen, g-terpinen, b fellandren, trans-tuyanol, cis-tuyanol, linallil asetat ve murolen bulunmaktadır (14). Akgül ve arkadaşları ise *O. onites* L. bitkisinden % 3.4 oranında elde ettikleri verimle uçucu yağda % 74.06 karvakrol tespit etmişlerdir (15). Aynı şekilde J. J. C. Scheffer ve arkadaşları da % 3.1'lik verimdeki uçucu yağda % 60.7-72.3 kadar karvakrolun varlığını belirlemişlerdir (16).

Her iki distilasyon yönteminde sağlanan uçucu yağlardaki ana bileşenin karvakrol (67) olduğu belirlenmiştir (Tablo 2). Ayrıca Bugüne kadar yapılan tüm *Origanum türleri*'nin uçucu yağ üzerinde yapılan çalışmalarda elde edilen bileşiklerden farklı olarak bir seskiterpen olan ledene *(46) (% 0.811-1.084) bulunmuştur. (17). Ayrıca her iki distilasyon işlemlerinden elde edilen uçucu yağlarda 2-butanone *(3) % 0.003 oranında GC/MS kütüphanesinden sağlanan bilgilerden yararlanarak bulunmuştur (10-13).

TABLO 2. SU VE SU BUHARI DİSTİLYASYONU İLE ELDE EDİLEN UÇUCU YAĞLARIN BİLEŞENLERİ

Pik No	Bileşenler	Su Buharı Distilasyonu			Su Distilasyonu		
		toplam yağ	MTHC	OX	toplam yağ	MTHC	OX
1	octane		0.045			0.038	
2	nonane		0.071			0.077	
3	2-butanone *	0.033		t	0.003		
4	ethanol		0.046			0.044	
5	3-methyl butanal	0.055			0.004		
6	decane		0.438			0.491	
7	tricyclene	0.009	0.081		0.008	0.092	
8	α -pinene	0.450	3.334		0.429	3.455	
9	camphene	0.262	1.731		0.24	1.668	
10	undecane	0.003	0.177			0.217	
11	β -pinene	0.040	0.304		0.044	0.339	
12	Isoamyl acetate		0.049			0.046	
13	sabinene		0.027		0.004	0.018	
14	Δ^3 -carene	0.035	0.341		0.033	0.320	
15	myrcene	0.634	5.035		0.523	4.995	
16	α -phellandrene	t	t				
17	α -terpinene	0.579	4.780		0.523	5.003	
18	limonene	0.143	1.134		0.161	1.360	
19	1,8-cineole	0.046	0.643	0.034	0.083	0.729	0.021
20	β -phellandrene	0.100	0.690		0.088	0.625	0.053
21	2-hexenal	0.020			0.032		
22	(Z)- β -ocimene	0.045	0.367		0.044	0.458	
23	γ -terpinen	2.416	20.895		2.083	20.96	
24	(E)- β -ocimene	0.017	0.138		0.015	0.165	
25	p-cyeme	3.739	30.809		3.236	33.99	
26	α -terpinolene	0.095	0.857		0.089	0.961	
27	6-methyl-3-heptano	0.021		0.021	0.026		0.023
28	tetradecane		0.378			0.434	
29	cis-linalool oxide	0.069		0.037	0.087		0.035
30	l-octen-3-ol	0.128		0.128	0.131		0.128
31	trans-sabinenhydr	0.088		0.095	0.036		0.043
32	trans-linalool oxide	0.046		0.052	0.078		0.328
33	linalool	12.845		14.024	14.844		18.066
34	linalyl acetate	0.023		0.060			0.058
35	bornylacetate	0.017			0.012		
36	α -bergamotene		0.107			0.058	
37	β -caryophyllene	0.942	9.739		0.731	9.685	
38	terpinen-4-ol	0.529		0.551	0.534		0.635
39	carvacrolmethylethe	0.165			0.101		
40	aromadendrene		1.613			1.115	
41	pulegone	0.035			0.034		
42	trans-pinocarveol	0.026		0.028	0.027		0.028
43	α -humulene	0.061	0.321		0.040	0.510	
44	(Z)- β -farnesene	0.016			0.020		
45	α -terpineol	0.029		0.028	0.021		0.046
46	ledene*		1.084			0.811	
47	isoborneol	1.406		1.528	1.270		1.815

TABLO 2. (DEVAM)

Plk No	Bileşenler	Su Buhan Distilasyonu			Su Distilasyonu		
		toplam yağ	MTHC	OX	toplam yağ	MTHC	OX
48	heptadecane	0.073	0.242		0.094	0.119	
49	carvone			0.128			0.111
50	B-bisabolene	0.582	4.549		0.422	5.547	
51	γ-elemene	0.115	0.018		0.106	0.082	
52	Δ-cadinene	0.103	1.149		0.136	0.982	
53	octadecane		0.083			0.039	
54	trans-carveol	0.035		0.049	0.033		0.102
55	calamenene	0.037	0.079		0.033	0.102	
56	p-cymen-8-ol	0.065		0.076	0.068		0.106
57	carvacryl acetate	0.139		0.137	0.113		0.012
58	phenylethyl alcohol			0.015			0.02
59	dodecanol		0.057			0.053	
60	patchulane	0.370		0.411	0.365		0.332
61	eicosane			0.028			0.005
62	cumin alcohol	0.013		0.064	0.013		0.025
63	spathulenol	0.262		0.399	0.265		0.347
64	eugenol			0.125			0.154
65	T-cadinol	0.248		3.983	0.243		0.313
66	thymol	3.288			3.635		3.308
67	carvacrol	67.06		75.16	65.913		71.697
68	docosane		2.469				

1 < 0.01

* GC/MS Kütüphanesinden bulunmuştur.

KAYNAKLAR

1. T. Baytop. "Türkiye'de Bitkiler İle Tedavi". İst. Ünl. Yay. No. 2355. İstanbul (1984) 282-283.
2. P.H. Davis. "Flora of Turkey and the East Aegean Islands". Vol. 7. Edinburg (1982) 297-313.
3. Cingil M. İpek, Karmer, N.İ. Sarıkardaşoğlu, Cingil. C., Başer K.H.C.. Origanum onites ve O. minutiflorum Uçucu Yağlarının Farmakolojik Etkileri," **IX. Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantı Kitabı**", Eskişehir, (Baskıda).
4. G. Tümen ve O.A. Sekendiz. O. onites L. "Balıkesir ve Merkez Köylerinde Halk İlaç Olarak Kullanılan Bitkiler", Uludağ Ünl., Balıkesir (1989) 106-111).
5. İhracat Ruloları, İGEME, Ankara (1992).
6. Lawrence B.M., Progress in Essential Oils, "Perfumer and Flavorist", 2 (1976-77) 42-43.
7. K.H. Can Başer, Essential Oils of Turkish Labiatae", **Advanced in Labiatae Science**", London (1991) 1-2.
8. S. Kokkini, D. Vokou, R. Karousou, "Essential Oil Yield of Lamiaceae Plants in Greece "11th Int. Congress of Essential Oils Fragrances and Flavours, India (1989) 1-11).
9. The United States Pharmacopeia (U.S.P. XXII). Mach Printing Co. Easton. Pa. (1989).
10. W. Jennigs and T. Shibamoto, "Qualitative Analysis of Flavour and Fragrance Volatiles by, Glass Capillary Gas Chromatography". Academic Press, London (1980).
11. A.A. Swigar and R.M. Silverstein", **Monoterpenes: Infrared, Mass. 1 H NMR and 13 C NMR Spectra and Kovats Indices**". Aldrich Chemical Co. Inc. Wisconsin (1981).
12. R.E. Ardrey, C. Brown, A.R. Allan, T.S. Bal and A.C. Moffat". **Aneight Peak Index of Mass Spectra of Compaunds of Frensic Interest**". Scottish Academic Press, Edinburg (1983).
13. **Eiht Peak, Index of Mass Spectra**". 3rd Edition, 1-7, The Royal Society of Chemistry (1986).
14. D. Vokou, S. Kokkini, J.M. Bessiere, "O. onites (Lamiaceae) in Greece: Distribution, Volatile oil Yield and Composition", **Economic Botany**, 42 (3) (1988) 407-412.
15. A. Akgül and A. Bayrak, "Constitutents of Essential Oils from Origanum Species Growing Wild in Turkey", **Planta Medica**. (1987) 1-120.
16. J.J.C. Scheffer, A. Looman, A.Bacrheim Svendsen, E. Şarer, "The Essential Oils of Three Origanum Species in Grown in Turkey". **Progress in Essential Oil Research**. Berlin (1986) 151-156.
17. E. Guenther, "the Essential Oils", Vol. 2. Huntington. New York (1975) 281.

ASETOASETANİLİD TÜRÜ PİGMENT SENTEZİ VE YAPILARININ AYDINLATILMASI

Bilgehan GÜZEL ve Selahattin SERİN

Ç.Ü. Fen - Edebiyat Fakültesi, Kimya Bl. Balçalı- Adana- Türkiye

SYNTHESIS OF ACETOACETANILIDE TYPE PIGMENT AND DETERMINATION OF THEIR STRUCTURES

SUMMARY

Acetoacetanilid pigments have two active hydrogen atoms. These pigments can be obtained in seven possible configurations due to the shifting of two protons between carbonyl and azo groups. In this study, configuration and location of intramolecular hydrogen bonding of synthesized pigments were determined by using UV-vis., IR and NMR spectroscopic techniques.

ÖZET

Asetoasetanilid tipi pigmentler yapılarında bulunan iki aktif protonun karbonil grupları veya azo grubu üzerine kayabilmesi nedeniyle yedi değişik tautomerik formda oluşabilmektedir. Bu çalışmada, sentezlenen asetoasetanilid türü pigmentlerin yedi değişik yapıdan hangisinde olduğu ve molekül içi hidrojen köprülerinin yerleri UV-vis., IR ve NMR gibi spektroskopik yöntemler kullanılarak belirlenmiştir.

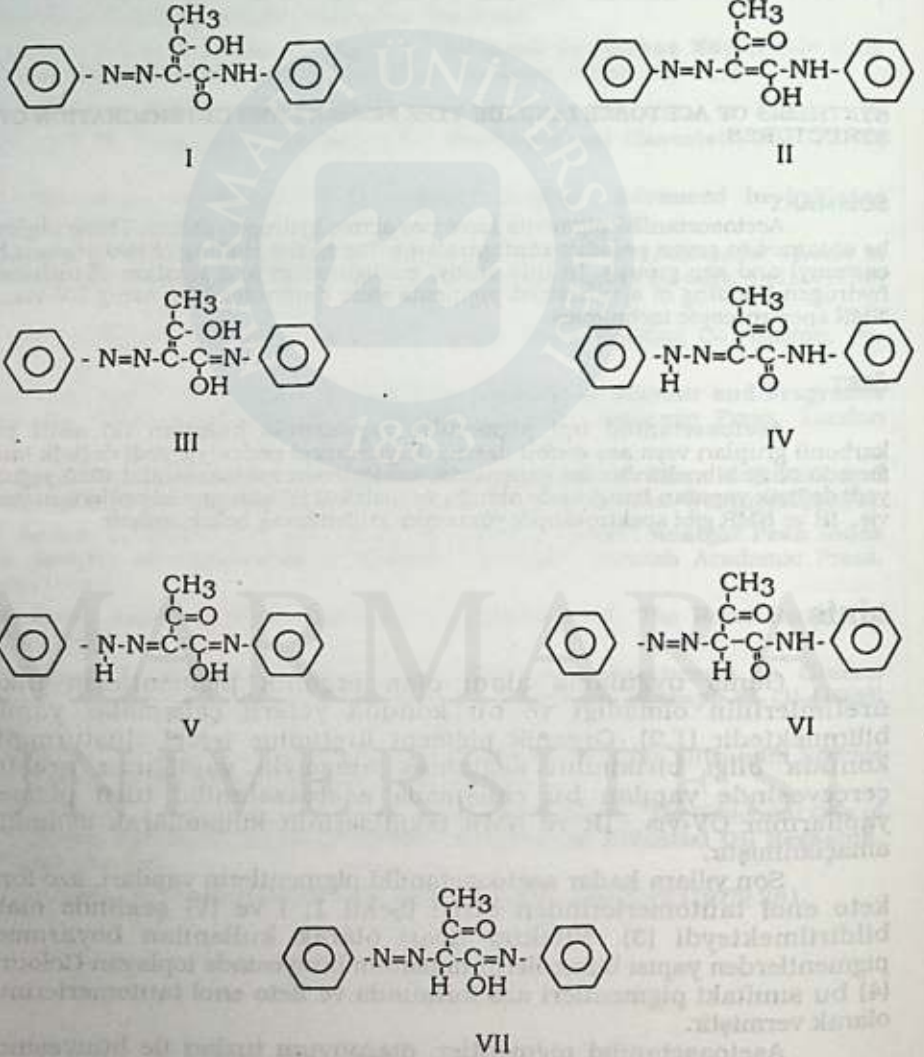
GİRİŞ

Geniş uygulama alanı olan organik pigmentlerin ülkemizde üretimlerinin olmadığı ve bu konuda yeterli çalışmalar yapılmadığı bilinmektedir (1,2). Organik pigment üretimine temel oluşturmak ve bu konuda bilgi birikimini sağlamak amacıyla yaptığımız araştırmalar çerçevesinde yapılan bu çalışmada asetoasetanilid türü pigmentlerin yapılarının UV-vis., IR ve NMR tekniklerinin kullanılarak aydınlatılması amaçlanmıştır.

Son yıllara kadar asetoasetanilid pigmentlerin yapıları, azo formunun keto enol tautomerlerinden birisi (Şekil 1; I ve IV) şeklinde olabileceği bildirilmekteydi (3). Nitekim ticari olarak kullanılan boyarmadde ve pigmentlerden yapısı bilinenlerin tamamını bünyesinde toplayan Colour Indeks (4) bu sınıftaki pigmentleri azo formunda ve keto enol tautomerlerinin birisi olarak vermiştir.

Asetoasetanilid pigmentler, diazonyum tuzları ile bünyesinde aktif metilen grubu bulunduran asetoasetanilid ve türevlerine kenetlenmesi ile sentezlenen pigmentlerdir. (X-CH₂-Y) genel formülü ile gösterilen aktif metilen bileşiklerinin diazonyum tuzları ile kenetlenme reaksiyonlarının ilki 1875 yılında gerçekleştirilmiş olmasına rağmen ürünün kimyasal yapısına ilişkin tartışmalar hala güncelliğini korumaktadır (5). Tek aktif proton bulunduran gruplar için beş tautomerik form önerilirken iki aktif proton içeren gruplar için

yedi değişik yapı (Şekil 1) önerilmektedir(6). İngiliz araştırmacı A. Whitaker'ın x-ray difraksiyon tekniklerini kullanarak yaptığı çalışmalarda ticari olarak kullanılan asetoasetanilid türü pigmentlerin bir grubunu incelemiştir. Whitaker çalışmaları sonucunda, incelemiş olduğu asetoasetanilid türü pigmentlerin tamamının hidrazon yapısındaki tautomerlerden birisi (Şekil 1; III ve IV nolu yapılar) şeklinde olduğunu bildirmiştir(7).



Şekil 1. Asetoasetanilid Pigmentler İçin Önerilen Tautomerik Yapılar

METOT

0.02 Mol N,N -diethyl-2-amino-4-metoksi-sülfonamid 8 ml % 37'lik HCl içeren 60 mL suda ısıtılarak çözüldü. 0-5 °C 'a soğutulup 0.02 mol 1.4 g NaNO₂'nin 10 ml sudaki çözeltisi ile diazolandı 30 dk dinlendirilip 5 g sodyum asetat ilave edilerek ortam tamponlandı. Diğer taraftan 0.02 mol asetetanilid 1 g sodyum karbonat içeren 150 ml suda çözülerek 10 °C 'a soğutuldu ve daha önce hazırlanan diazonyum tuzu yavaş yavaş ilave edilerek kenetlendi. Ürün 6.74 kg olup verim % 80.8 'dir.

Tablo 1 Toz Pigment Haslıkları

Toz Pigm.	HASLIKLAR												
	ORGANİK ÇÖZUCÜLER						G	H	I	K	L	M	N
	A	B	C	D	E	F							
BBPY-5	5	2	4	3	3	4	147	5	3	5	5	5	5

* A: Alifatik petrol ürünleri, B: Cellosolve, C:Diethyl eter, D:Etanol E:Aseton, F:Ksilol, G: Stabilite °C/15 dk., H: Su, I: %5 Na₂CO₃, K: %5 HCl, L: Bezir yağı, M: Gliserin,, N: Boya padı
Not: Değerlendirme 1-5 skalasına göre yapılmıştır (1:en kötü, 5: en iyi)

Tablo 2. Boyalı Kumaş Üzerinde Yapılan Haslık Tayinleri

Pigment	Alkali Haslığı*	Ter Haslığı*	Utüleme Haslığı*	Yıkama Haslığı*	Asit Haslığı*
BBPY-5**	5	5	5	4	5

* Haslıklarda 1-5 (1:en iyi, 5:en kötü) sıkalası kullanılmıştır.

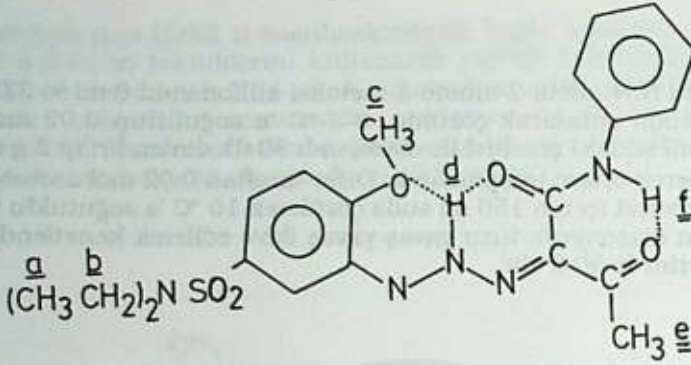
** Sentez ürünü BBPY-5 olarak kodlanmıştır.

Tablo 3. Elementel Analiz Verileri

BBPY-5	%C	%H	%N
Teorik	57.07	5.84	12.74
Deneysel	56.50	5.82	12.55

Tablo 4. IR Verileri (cm⁻¹)

	Hidrazon -NH ₁	-C=O	Aromatik	-C=N	- C H ₃ , CH ₂ -
BBPY-5	3480	1670	1535	1610	3010-2970



Şekil 2. Öngörülen Yapı ve Hidrojen Köprüleri

Tablo 5. NMR Verileri (ppm)

	a*	b*	c*	d*	e*	f*
BBPY-5	3.22	1.20	4.00	14.65	2.60	11.20

* Şekil 2'de işaretlenen protonlar

TARTIŞMA VE SONUÇ :

Sentez ürünün çeşitli solventlere karşı gösterilmiş olduğu haslıkların ASTM standartlarını göre (Tablo 1) değerlendirilmesi sonucunda pigment karakterinde olduğu tespit edilmiştir. Şablon baskı yöntemiyle pamuklu elyafa uygulanması sonucunda ise TSE standartlarına göre yapılan haslık denemeleride tekstilde kullanılabilir nitelik taşıdığını göstermiştir (Tablo 2).

Sentez ürününün elementel analiz sonuçları (Tablo 3) teorik değerlerle uyumlu olduğu tespit edildikten sonra, yapı aydınlatılması amacıyla UV-vis., IR ve NMR spektrumları alınmıştır. Sentez ürünü UV-vis. spektrumunda 385 ve 250 nm'lerde absorpsiyon vermiştir. Literatürler azo gruplarının 400 nm üzerinde ve 340 nm civarında absorpsiyon verdiğini (5), hidrazon grubu için ise maksimum absorpsiyonun 370-395 nm ler arasında olduğunu bildirmektedir (8). Buna göre 385 nm de gözlenen absorpsiyon hidrazon grubunu karakterize etmekte, 250 nm'de gözlenen absorpsiyonda karbonil grubuna yorumlanmıştır (9). UV-vis verileri başlangıçta önerilen yedi yapıdan I, II, III, VI ve VII nolu yapıların elenmesi anlamını taşımakta ve IR, NMR değerlendirmelerimizin IV ve V nolu yapılar üzerine yoğunlaşmasına neden olmuştur. IR spektrumlarında azo (-N=N-) gruplarının inaktif olmalarına karşın hidrazo gruplarının varlığını spektrumda saptama olanağı vardır(5). Nitekim 3400 cm^{-1} 'de görülen band hidrazon yapısını karakterize etmekte ve UV-vis. verilerini destekler nitelik taşımaktadır(Tablo 4). Diğer taraftan olası hidrazon yapılarından birisinin -OH grubu içermesi (Şekil 1; V nolu yapı) ve spektrumda $3400\text{-}3000\text{ cm}^{-1}$ 'de beklenen karakteristik -OH bandının olmaması yapının IV nolu formda olduğunun ilk belirtisi olarak tespit edilmiştir. Ayrıca 1670 cm^{-1} 'de karbonillere, 1610 cm^{-1} 'de -C=N grubuna, 3010 ve 2970 cm^{-1} 'de -CH₃ ve -CH₂- gruplarının karakteristik bandları tespit edilmiştir. NMR bulgularında ise hidrojen köprüsü oluşurması nedeniyle (Şekil 2.) aşağı alanlarda pik

vermişlerdir (10). NMR spektumunda ayrıca substitüe gruplardan metoksi (-OCH₃) 4 ppm 'de, singled, sülfamide bağlı etil grubu protonları 3.22 ppm 'de (-CH₂) kuartet, 1.2 ppm 'de (-CH₃) protonlarında triplet olarak, zincirdeki CH₃ 'de 2.6 ppm 'de singled olarak pik vermişlerdir (Tablo 5).

Sonuç olarak yapının kaynaklarda verildiği gibi azo yapısında olmadığı, hidrazon yapısında olduğu UV-visible, IR, NMR verilerinden yararlanılarak tespit edilmiş ve hidrojen bağlarının yerleri saptanmıştır. Diğer taraftan solventlere karşı gösterdiği haslıklara bakılarak pigment karakteri taşıdığı, boyalı kumaş üzerindeki haslıklarından da tekstilde kullanılabilir nitelik taşıdığı belirlenmiştir.

KAYNAKLAR

1. DPT, "Boyarmaddeler" VI. Beş Yıllık Kalkınma Planı, Ö.I. Komisyon Raporu Ankara (1991) 11-20
2. H. Yıldırım ERBİL, " Türkiye'de Tekstil Boyarmaddeleri ve Organik Pigment Üretim İmkanları " , TÜBİTAK, Gebze-Kocaeli(1985), 3-9.
3. K.VENKATARAMAN, "The Chemistry of Synthtic Dyes", Vol V, Academic Press, New York, (1971),314-459 S.
4. "COLOUR INDEX", The Society of Dyers and Colorists- American Association of Textile Chemists, Vol III and IV, London (1971).
5. N, ERGENÇ, " Aktif Alifatik Metilen Bileşiklerinin Diyazyonyum Tuzları ile Kenetleme Ürünlerinde Spektral Veriler " , Spektroskopi Yaz Okulu Seminer Notları, Trabzon , (1988).
6. A. WHITAKER, " The Crystal Structure of C.I. Pigment Yellow 3. - (1-hydroxyethyliden) -2-chloro acetanilide- - azo (4'-chloro-2'-nitrobenzen)" *Zeitschrift Für Kristallographic* 163 (1983) 19-30.
7. A. WHITAKER, " Crystal Structures of Azo Pigments Derived From Acetoceanilide", *J. Soc. Dyers and Colours*, V. 104, (1988) 294-299.
8. Y. YAGI, "Studies of The Absorption Spectra of Azo Dyes and Their Metall Complexes", *Bull. Chem. Soc.*, 36(5), Japan (1963), 486-493.
9. R.H. Wiley and H.C.JR Jarboe, " -Keto- - Methyl-glutaconic Anhydride Arylhydrazones and Their Conversion to 1- Aryl-3-Carboxy-4-Methyl-6-Yridazones". *J. Am.Chem.Soc.* 77, 403 (1955).
10. A.D., MITCHELL, D.C., NONHEBEL, " The Isolation and Interconversion of Tautomers of 2-Arylhydrazones of 1-, 2,3-Trione", *Tetrahedron Letters*, 44,3859, (1975).

NAFTOL AS BOYARMADELERİN BİLEŞENLERİNDEN YARARLANILARAK ORGANİK PİGMENT SENTEZİ

Bilgehan GÜZEL ve Selahattin SERİN

Çukurova Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Balcalı Adana-Türkiye

SYNTHESIS OF ORGANIC PIGMENTS USING COMPOUNDS OF NAPHTHOL AS DYES

SUMMARY

We have realized the synthesis of organic pigments, using low commercial value Naphthol AS type dyes. Properties of the synthesized dyes, compliance with the standards, application of these dyes on cotton fibers and suitability to the textile industry investigated.

ÖZET

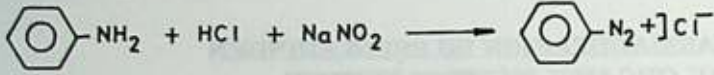
Bu çalışmada tekstilde kullanılmakta olan ancak ticari önemini yitirmiş Naf-tol AS türü boyarmaddelerin bileşenlerinden yararlanarak organik pigment sentezi gerçekleştirilmiştir. Sentez ürünlerinin özellikleri incelenerek standartlara uygunlukları ve pamuklu elyaf üzerine uygulamaları yapılarak tekstilde kullanılabilirlikleri araştırılmıştır..1

GİRİŞ

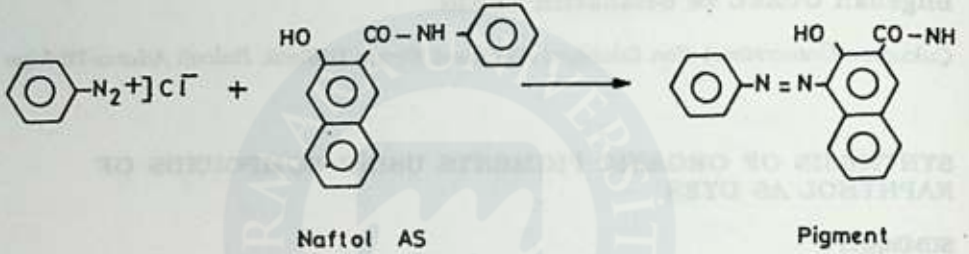
Tekstil, plastik, kauçuk, boya, gıda, kozmetik, matbaa, gibi değişik endüstri dallarının temel girdilerinden olan organik pigmentlerin ülkemizde üretimin olmadığı bilinmektedir (1). Boyarmaddeler ve pigmentler konusunda bugüne değin yapılan çalışmaların tamamı ticari önemleri nedeniyle patentli çalışmalar olup, patentlerde genellikle eksik bilgiler verilmektedir.

Naftol AS türü boyarmaddeler, suda çözünebilen iki bileşiğin elyaf üzerinde kenetlenmesi prensibine dayalı olarak kullanılan boyarmaddelerdir (2). Bu çalışmada Naftol AS boyamacılığında elyaf üzerinde yapılan bu sentezin dışarıda gerçekleştirilmesi ile organik pigment elde edilmiştir. Sentezler esas olarak değişik pozisyonlarda klor, metil gibi gruplardan biri veya heriki-sini bulunduran bir amin türevinin diazolanıp, Naftol AS olarak bilinen 3-hidroksi-2-naftanilid veya Naftol AS-D olarak bilinen 3-hidroksi-nafto-oluidin bileşiklerine kenetlenmesiyle gerçekleştirilmiştir(Şekil 1).

Reaksiyonlar incelendiğinde pigmentlerin sentezlenmesi basit organik reaksiyonlar gibi görülmektedir. Ancak kullanımda önem taşıyan tane büyüklüğü,



Amin



Şekil 1. Genel reaksiyon denklemi

kolay uflanabilirlik, parlak ve canlı renklerin eldesi sentez koşulları ile direkt ilişkili olduğu gibi değişik gruplar için farklılıklar gösterebilmektedir (3,4). Yaptığımız çalışmada değişik aminler ve Naftol AS bileşikleri kullanarak literatürlerde ve Colour Index'de bulunmayan orjinal nitelikte organik pigment sentezlenmiştir. Sentez koşullarında (pH, konsantrasyon, sıcaklık gibi) yapılan değişiklikler ve sentez sonrası yapılan pigmentasyon işlemleri ile uygun sentez koşulları ve pigmentasyon şartları tespit edilmiştir.

DENEL BÖLÜM

1. PİGMENTLERİN SENTEZİ

a-) PNR-1 [1-(2-metil-5-klorofenil)azo-2'-hidroksi-3'-(2-metil fenilamido)naftalin] Sentezi: 13.5 g (0.1 mol) 2-metil-5-kloroanilin 48.5 ml %18 lik HCl ilavesi ile ısıtılarak çözüldü, 270ml su ilave edilip 0-5oC'a soğutuldu, 7 g NaNO₂'nin %40 lik çözeltisi yavaş yavaş ilave edilerek diazolama yapıldı ve 30dk dinlendirildi. Diazolamanın tamamlanıp tamamlanmadığı test edilip nitröz asit fazlası üre ilavesi ile nötrleştirildi. Ortama 50 ml suda çözülmüş 20 g CH₃COONa ve 5ml CH₃COOH (%100 lük) ilave edilerek tamponlandı ve hacim 500 ml'ye tamamlandı (5,6).

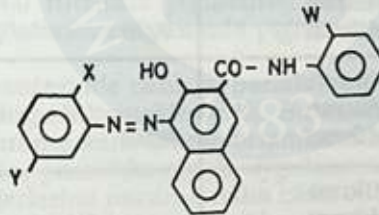
Kenetlenme bileşiği olarak kullanılacak olan 3-hidroksi-2-naftatoluidid'in (Naftol AS-D) 27.6 g'ı 50 ml %25 lik NaOH içerisinde ısıtılarak çözülüp 350 ml'ye tamamlandı ve 5-10oC'a soğutuldu. Diazo çözeltisi kenetlenme bileşiği üzerine hızla ilave edilerek kenetlenme sağlandı. Kenetlenme sonrası çöken kırmızı renkli pigment dekantasyonla ayrılıp gene dekantasyonla iki kez yıkandı. Süspansiyonun hacmi 600 ml'ye tamamlanıp 50 ml 2-propanol ilave edilerek 80o'a ısıtıldı ve bu sıcaklıkta 30 dk 2000 devirli bir karıştırıcı ile karıştırıldı. Sıcaklık 50o'a düşürülüp süzülde, vakumlu etüvde 60o'da kurutuldu (7). Ürün 39 g olup verim % 88.5 dir.

b-) PNR-2 [1-(2,5-diklorofenil)azo-2'-hidroksi-3'-(2-metil fenilamido) naftalin] Sentezi: 14.2 g 2,5 dikloroanilin 50 ml %18 lik HCl içerisinde çözülerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı 0-5°C'a soğutulup 7 g NaNO₂ in 20 ml sudaki çözeltisi yavaş yavaş ilave edilerek diazolandı. Diazolamanın tamamlanıp tamamlanmadığı test edilip 40 ml %50'lik CH₃COONa ilavesinden sonra hacim 600 ml'ye tamamlandı.

Kenetlenme bileşiği olarak kullanılan 3-hidroksi-2-naftatoluidid PNR-1 sentezinde olduğu gibi kenetlenmeye hazır hale getirildi ve diazo bileşiği yavaş yavaş ilave edilerek keneteleme yapıldı. Ürün 35 g olup verim %81 dir.

c-) PNR-3 [1-(2-metil-5-klorofenil)azo-2'-fenilamidonaftalin] Sentezi : 13.5 g (0.1 mol) 2-metil-5-kloroanilin PNR-1 sentezinde olduğu gibi diazolandı.

Kenetlenme bileşiği olarak kullanılacak olan 3-hidroksinaftarilid (Naf-tol AS) ın 13.1 gramı 25 ml metil alkol içerisinde pad yapıp üzerine 40ml %20'lik NaOH ilave edildikten sonra, sıcak su ile 400 ml'ye tamalandı ve ısıtılarak çözüldü, 5-10oC'a soğutulup önceden hazırlanmış olan diazonyum çözeltisi bu çözeltinin üzerine ilave edilerek kenetleme yapıldı ve PNR-1'de olduğu gibi pigmente edildi. Ürün 37 g olup verim %88 dir.



Pigment	X	Y	W
PNR-1	CH ₃	Cl	CH ₃
PNR-2	Cl	Cl	CH ₃
PNR-3	CH ₃	Cl	-

Şekil 2 Sentezlenen Pigmentlerin Yapısal gösterimleri

2. Elyafa uygulanması: Sentezlenen pigmentlerin gliserin ile %30'lük boya pastaları hazırlanıp daha sonra hazır olarak temin edilen boya padı (al-ginat, üre, emilgator, gazyağı, diamonyum fosfat, eiden, su karışımı içerir ve boya pastasını seyreltmede kullanılır) ve binder ile 4:100:8 oranlarında karıştırılarak pamuklu elyaf üzerine şablon baskı yöntemi ile uygulaması yapılmıştır.

3. Sentezlenen Pigmentlere Uygulanan Testler:

a. İncelik Testi: ASTM D 185-45 ve AFNOR T 30024

b. Tane Büyüklüğü: ASTM D 1366-65

c. Yağ absorpsiyonu: ASTM D 281-31 ve AFNOR T 30-022'ye göre yapılmıştır.

4. Toz Pigment Haslıkları: Colour Indeks'de (8) istenilen haslıklar göz önünde bulundurularak, The Chemistry of Syenthetic Dyes vol V sayfa 455-459 daki ASTM standartlarına göre yapılmıştır.

5. Boyalı Kumaşa Uygulanan Haslık Denemeleri: Alkali haslığı TS 474, ter haslığı TS 394, Ütleme haslığı TS 472, yıkama haslığı TS 716, asit haslığı TS 475'e göre yapılmıştır.

Tablo 1. Sentezlenen Pigmentlere Uygulanan Testler

Pigment	Tane Büyüklüğü	İncelik	Yağ Abs.
PNR-1	%80'1 0.7 Mikron %10< 0.6 Mikron %10 >0.8 Mikron	%98	1.5g/ml
PNR-2	%85'1 0.6 Mikron %05< 0.5 Mikron %10 >0.7 Mikron	%98	1.3g/ml
PNR-3	%80'1 0.7 Mikron %10< 0.6 Mikron %10 >0.8 Mikron	%98	1.8g/ml

- * İncelik 325 mesh'lik elekten geçen miktar
- **Yağ absorpsiyonu Linseed Oil ile yapılmıştır.

Tablo 2. Toz Pigment Haslıkları

Toz Pigment	HASLIKLAR													
	ORGANİK ÇÖZÜCÜLER						G	H	I	K	L	M	N	
	A	B	C	D	E	F								
PNR-1	3	3	4	3	3	3	170	5	5	5	5	5	5	
PNR-2	3	2	2	3	3	4	170	4	2	2	5	4	4	
PNR-3	3	3	4	4	3	3	170	5	4	5	5	5	5	

* A: Alifatik petrol ürünleri, B: Cellosolve, C:Dietyl eter, D:Etanol
E:Aseton, F:Ksilol, G: Stabilite oC/15 dk., H: Su, I: %5 Na2CO3, K: %5 HCl,
L: Bezir yağı, M: Gliserin., N: Boya padı
Not: Değerlendirme 1-5 skalasına göre yapılmıştır (1:en kötü, 5: en iyi)

Tablo 3. Boyalı Kumaş Üzerinde Yapılan Haslık Tayinleri

Pigment	Alkali Haslığı*	Ter Haslığı*	Ütüleme Haslığı*	Yıkama Haslığı*	Asit Haslığı*	Renk Tanımı**
PNR-1	4	5	4	4	5	M99Y90C20
PNR-2	4	5	4	4	5	Y90M90C20
PNR-3	3	4	4	4	5	Y90M99C40

* Haslıklarda 1-5 (1:en iyi, 5:en kötü) sıklası kullanılmıştır.

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Ülkemizde üretimi olmayan organik pigmentlerin sentezleri basit organik reaksiyonlarla gerçekleştirilebilir gibi görülmektedir. Ancak pigmentlerde kullanımında önem taşıyan tane büyüklüğü ve kolay ufalanabilirlik gibi özelliklerin kazandırılması diğer taraftan parlak ve canlı renklerin elde edilmesi oldukça güçtür. Bu konuda gizli tutulan ve Know-How transferinden kaçınılan konu pigmentasyon teknolojisi ve şartlarıdır. Çalışmamızın en önemli yanı orjinal nitelikte pigmentler sentezlenmesi ve tekstilde kullanılabilirliğinin gösterilmesi yanında pigmentasyon şartlarının belirlenmiş olmasıdır.

Pigment sentezinde canlı ve parlak renklerin elde edilmesinin ortam pH'sı ile ilişkili olduğu bilinmektedir (3). Bu amaçla, pH 2,6,7,8,10,ve 12 olacak şekilde ayarlanmış kenetlenme ortamlarında yapılan sentezlerden elde edilen pigmentlerin, pamuklu elyafa uygulanması sonucunda pH 6'da elde edilen ürünün diğerlerine nazaran daha canlı ve parlak olduğu, aynı zamanda kolay pigmente edilebildiği tespit edilmiştir. Tane büyüklüğü ve ufalanabilirliğin sağlanabilmesi öğütme işleminden ziyade kenetlenmenin dikkatli yapılması yanında, kenetlenme sonrası yapılan pigmentasyon işlemi ve süzme, kurutma gibi işlemlerin dikkatli yapılması ile gerçekleştirilebilmektedir (4,5).

Bu amaçla değişik konsantrasyonlarda kenetlemeler yapılmış, uygun konsantrasyon metot bölümünde verilmiştir. Kenetleme sonrası yapılan pigmentasyon işleminde ise dekantasyon ile iki kez yıkanmış ürün alkol ilavesi ile değişik sıcaklıklarda karıştırma işlemine tabi tutulmuş, karıştırma sonrası ise süzme işlemi değişik sıcaklıklarda yapılmıştır. Yapılan denemeler sonucunda 80oC'da yapılan karıştırma işlemi ile 50oC'da yapılan süzme işleminin pigmentasyon için uygun olduğu yapılan testler ile (Tablo 1) tespit edilmiştir.

Sentezlenen pigmentlerin toz haldeki (Tablo 2) ve elyaf üzerine uygulama sonrası yapılan haslık denemeleri sonucunda kullanıma uygun özellikler taşıdıkları görülmüştür. Tablo 1'de sentez ürünlerinin kullanımında önem taşıyan bazı özellikleri verilmiştir, tablo incelendiğinde tane büyüklüğünün uluslararası ASTM D 185 standardını sağladığı görülmektedir. Tablo 2'de veluslararası ASTM D 185 standardını sağladığı görülmektedir, sentez ürünlerinin rilen ve solventlere karşı haslıklarını gösteren verilerden, sentez ürünlerinin tekstilde kullanılabilir nitelikte olduğu, tekstilde kullanılan pigmentlerin Co-tekstilde kullanılabilir nitelikte olduğu, tekstilde karşılaştırılarak tespit edilmiştir. Pa-lour Indeks'de (8) verilen değerleriyle uygulandıktan sonra yapılan boyalı muklu elyafa şablon baskı yöntemi ile uygulandıktan sonra yapılan boyalı kumaş haslıklarında (Tablo 3) standartları sağladığı gözlenmiştir. Gene

boyalı kumaş örneklerinin Avrupa Skala (10) yardımıyla renk numaraları tespit edilerek tablo 3`de verilmiştir. Sonuç olarak Naftol AS bileşenlerinden yararlanılarak organik pigment sentezlenmesinin mümkün olduğu ve sentez ürünlerinin tekstilde kullanılabileceği tespit edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. DPT, Altıncı Beş Yıllık Kalkınma Planı, "Boyarmaddeler Alt Komüsyon Raporu", Ankara(1989) 19-23
2. Y. Özcan, "Tekstil Elyaf ve Boyama Tekniği" I.Ü. Yayınları, İstanbul (1978) 290-291
3. K. Venkataraman, "The Chemistry of Syenthetic Dyes" Vol V, Academic Press, New York (1971) 314-459
4. S. Serin ve B. Güzel, "Tekstilde Kullanılabilir Boyarmadde Sentezi" Ç.Ü. Fen Bilimleri Dergisi, Adana(Baskıda)
5. E. Dietz and A. Siebert, Water Insoluble Monoazo Dyestuffs, "U.S.P. 3118870", (1964)
6. W. Forter and F. Kehrer, Water Insoluble Diazo Dyestuffs, "U.S.P. 2936305" (1960)
7. M. Chbst and J. Novy, Red Azo Pigment "Czech CS233630 " 1982
8. "Colour Index" The Society of Dyers and Colourists-American Association of Textil Chemists, Vol III-IV London(1971)
9. A. Winter and A. Laska, "BIOS REPORTS 961,14 - FIAT 764" (1911)
10. H. Kuppers, "Farbe Ursprung Systematic Anwendung", Callwey Verlag, München (1977) 145-61

BAZI AZO BOYAR MADDELERİNİN SENTEZİ VE SPEKTROSKOPİK ÖZELLİKLERİNİN BELİRLENMESİ

İsmail E. GÜMRÜKÇÜOĞLU, Hasan KOCAOKUTGEN ve Selami ŞAŞMAZ
Ondokuz Mayıs Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü,
Kurupelit-Samsun, Türkiye

THE SYNTHESIS OF SOME AZO DYES AND IDENTIFICATION OF THEIR SPECTROSCOPIC PROPERTIES

SUMMARY

In this work, benzenediazonium and 4-nitrobenzenediazonium salts have been synthesized, then coupled with substituted phenols. Followed, some physical and chemical properties of related compounds have been examined and characterized by infrared, ultraviolet-visible and nuclear magnetic resonance spectroscopic techniques.

ÖZET

Bu çalışmada, benzendiazonyum ve 4-nitrobenzendiazonyum tuzları sentez edilip, karşılık gelen kenetlenme türevlerini vermek üzere süstitue fenol bileşikleriyle etkileştirildi. Takiben bu bileşiklerin bazı fiziksel ve kimyasal özellikleri belirlenerek, yapıları infrared, ultraviole-vizible ve nükleer magnetik rezonans spektroskopisi teknikleriyle incelendi.

GİRİŞ

Bilindiği gibi azoboyar maddeleri iki yada daha fazla sayıda aromatik halkayı birleştiren ve meydana gelen konjuge sistemin bir parçasını oluşturan kromofor azo (-N=N-) grubu bulunduran bileşiklerdir. Bu grup bileşikler, organik boyar maddelerin en önemli sınıfını oluştururlar (1). Boyar maddeler tekstil endüstrisi gibi çok değişik alanlarda çeşitli maddelerin çekiciliğini artırarak göze hoş gelmesini sağlamak ve /veya dış tesirlerden korumak amacıyla kullanılmaktadır (1). Bu nedenlerle azo boyar maddeleri gerek endüstride, gerekse bilimsel çalışmalarda büyük önem taşımaktadırlar. İşte bu nedenlerle yeni boyar maddelerin sentezi ve özelliklerinin belirlenmesi önem taşımaktadır.

Doğal boyar maddelerin tarihi çok eskilere dayanmakla birlikte, sentetik olanların tarihi ancak 1856 yılına kadar uzanmaktadır. Bu tarihten sonra çok hızlı bir gelişme gösteren boyar madde endüstrisi günümüze kadar çok değişik türde boyarmaddelerin yapılmasına yol açmıştır. Azo boyar maddelerin üretimi 1870 yılında başlamış ve bu tarihlerde krisoidin, parared gibi çok sayıda bileşik sentezlenmiştir. 1880 yılında tekstil ürünleri üzerinde azo boyar maddesi oluşturma yöntemi geliştirilmeye, 1912 yıllarında azo boyar maddelerinin metal kompleksleri

sentezlenmeye, 1950 yıllarından sonra ise heterosiklik bileşiklerden reaktif boyar maddeler elde edilmeye başlanarak dayanıklılıkları (Haslıkları) çok daha yüksek boyar maddeler sentezlenmiştir (1).

Yurdumuzda ise ilk kez 1943'de "Karabük Demir Çelik Fabrikaları'nda boyar madde üretilmeye başlanmış ve daha sonraları "Mensucat Boyalar A.Ş." 1967'de (Organik Kimya Sanayii ve Ticaret A.Ş." , 1971'de "Kenteş", 1972'de "Setaş Kimya Sanayii A.Ş." gibi çok sayıda fabrikalar kurulmuş olup değişik türlerde boyar maddeler üretmektedirler (2).

Azo bileşiklerinin sentezi

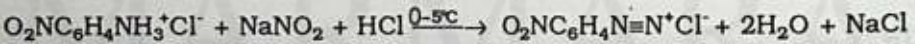
Kenetlenme tepkimeleri, Nitro bileşiklerinin indirgenmeleri, Aminlere nitro veya nitrozo bileşiklerinin etkisi ile elde edilebilir (3). Yaygın olarak kullanılan kenetlenme tepkimelerine göre diazonyum tuzu sentezlenir ve ardından bu bileşikler fenol, naftol, hidroksikinolin, aril amin, fenoleterler gibi bileşiklerle kenetlenmesi sonucu azo boyar maddeleri elde edilir (4). Diazonyum tuzu sentezi ise; direkt metod, konsantre asit metodu, Witt metodu, Griess metodu ve Knoevemagel metodu ile elde edilebilir (4).

DENEL BÖLÜM

Bu çalışmada, IR, NMR ve UV spektrumları sırasıyla Perkin-Elmer 1430, Varian EM 390- 90 MHz ve Varian DMS 100 spektrofotometrelerinde alınmıştır. Erime noktasına digital erime noktası tayin cihazında bakıldı.

4- Nitrobenzondiazonyum Sentezi

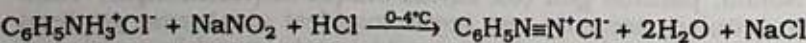
Bir beher içerisinde 4- nitroanilin (1,5 g; 10,87 mmol) konularak üzerine saf su (20 ml) ile hidroklorik asit (8 ml; %36) eklenip magnetik karıştırıcı ile iyice homojenize edildi. Bu çözelti 2 °C'a kadar soğutuldu.



Buz banyosunda soğutulmuş olan 4-nitroanilinyum tuzu çözeltisine damla damla sodyum nitrit ilave edilerek devamlı karıştırıldı ve reaksiyon ortamı 4°C'in altında tutularak diazolama işlemi gerçekleştirildi.

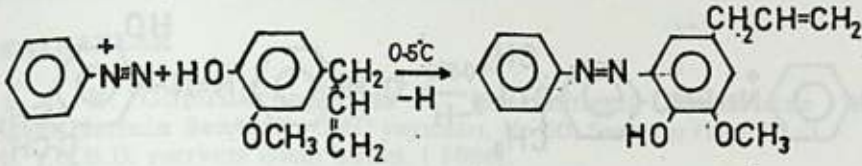
Benzendiazonyum Sentezi

Bir beher içerisinde anilin (3,825 g; 41,12 mol) konulup üzerine saf su (18 ml) ve hidroklorik asit (8 ml; %37) ilave edilerek anilinyum klorür oluşması sağlandı. Başka bir beherde stokiometrik miktarda sodyum nitrit saf suda (7,5 ml) çözülüp buz banyosunda 2°C'a kadar soğutulduktan sonra yine buz banyosuyla 0-4 °C'a kadar soğutulmuş yukarıda elde edilen anilinyum klorür çözeltisine damla damla ve sürekli karıştırılarak ilave edilip aşağıda verilen tepkimeler sonucu diazolama işlemi gerçekleştirildi.



2- Hidroksi -3-Metoksi -5- (2-Propenil) Azobenzen Sentezi (I)

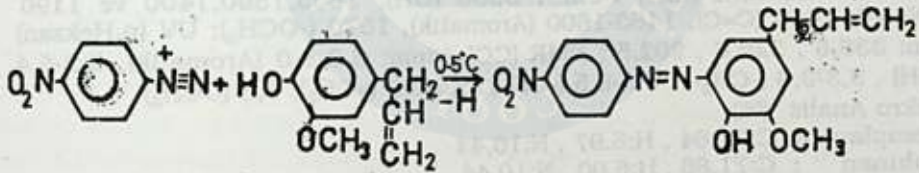
Bir miktar 2- metoksi -4-(2-propenil) fenol (6,62 g; 40 mmol) alınıp, sodyum hidroksit (50 ml; %10) ilave edilerek çözöldü ve 2 °C'a kadar soğutuldu.



0-4 °C arasında hazırlanan ve bu sıcaklıkta saklanan benzendiazonyum üzerine soğuk 2-metoksi -4-(2-propenil) fenolat çözöltüsü hızlı bir şekilde ilave edilerek 45 dk. karıştırıldı ve süzöldü. Süzölen çökelek glasiyel asetik asit içinde çözöldü ve çözönmeyen kısım süzölerək ayrıldı. Süzöntüye aynı miktar saf su katılarak çöktürölüp vakum altında kurutuldu.

4-Nitro -2'-Hidroksi-3'-Metoksi -5'(2-Propenil) Azobenzen Sentezi

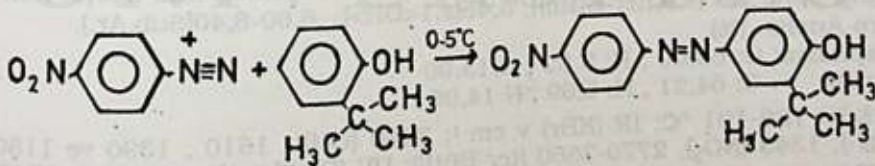
Bir miktar 2- metoksi -4-(2-propenil) fenol (6,62 g; 40 mmol) alınarak, sodyum hidroksit (50 ml; %10) ilave edilerek çözöldü ve 2 °C'a kadar soğutuldu.



0-4 °C arasında hazırlanan ve bu sıcaklıkta saklanan 4- nitro benzen diazonyum tuzu üzerine soğuk 2- metoksi -4-(2-propenil) fenolat çözöltüsü hızlı bir şekilde ilave edilerek 45 dk. karıştırıldı ve süzöldü. 2- hidroksi -3-metoksi -5- (2-propenil) azobenzen sentezinde anlatıldığı gibi saflandırıldı ve vakum altında kurutuldu.

4-Nitro -3'-ter-Bütöl-4'-Hidroksiazobenzen Sentezi (III)

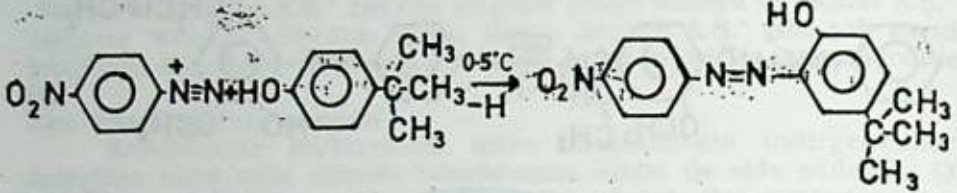
Bir miktar 2-ter-bütöl-fenol (1,7 ml; 10,88 mmol) alınarak, sodyum hidroksit (10 ml; %10) ilave edilerek çözöldü ve 2°C'a kadar soğutuldu.



0-4°C arasında hazırlanan ve bu sıcaklıkta saklanan-4-nitrobenzendiazonyum tuzu üzerine soğuk 2-ter-bütöl-fenolat çözöltüsü hızlı bir şekilde katılarak 45 dk. karıştırıldı ve süzöldü. Süzölen çökelek glasiyel asetik asit içinde çözöldü ve çözönmeyen az miktardaki kısım süzölerək ayrıldı. Süzöntüye aynı miktar saf su katılarak çöktürölüp vakum altında kurutuldu.

4-Nitro-2'-Hidroksi-5'-ter-Bütil-Azobenzen Sentezi (IV)

Toz haline getirilmiş bir miktar 4-ter-bütil-fenol (1,66 g; 10,85 mmol) alınarak sodyum hidroksit (20 ml; %10) içinde süspansiyon haline getirilip 2°C'a kadar soğutuldu.



0-4°C arasında hazırlanan ve bu sıcaklıkta saklanan 4-nitro benzendiazonyum tuzu üzerine soğuk 4-ter-bütil-fenolat süspansiyonu hızlı bir şekilde ilave edilerek 45 dk. karıştırıldı ve süzüldü. 4-nitro-3'-ter-bütil 4'-hidroksiazobenzen sentezinde anlatıldığı gibi saflandırılıp vakum altında kurutuldu.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

(I) E.N: 74,8°C; IR (KBr) ν cm^{-1} : 3500 (OH), 1605,1590,1400 ve 1190 (-N=N-), 1640 (C=C), 1450-1600 (Aromatik), 1370 (-OCH₃); UV (n.Hekzan) nm: 336,6 , 226,6 , 202,5 ; NMR (CCl₄)ppm: 6,2-8,0 (Aromatik), 5,2-5,4 (OH) , 3,3-3,6 (-CH₂-) , 5,5-6,5 (-CH=), 5,0-5,2 (=CH₂), 3,8 (OCH₃)

Mikro Analiz (%):

Hesaplanan: C:71,64 , H:5,97 , N:10,44

Bulunan : C:71,86 , H:6,00 , N:10,44

(II) E.N: 174,1 °C; IR (KBr) ν cm^{-1} : 3500 (OH), 1605, 1590, 1403 ve 1190 (-N=N-), 1640 (C=C), 1450-1600 (Aromatik), 1375 (-OCH₃); UV (n.Hekzan) nm: 356,2 , 273,6 ; NMR (CCl₄) ppm: 6,8-8,4 (Aromatik), 5,5-6,3 (-CH=), 5,2 (OH), 3,3-3,4 (-CH₂-), 4,9-5,0 (=CH₂), 3,9 (-OCH₃).

Mikro Analiz (%):

Hesaplanan: C: 61,34 , H:4,79 , N: 13,41

Bulunan : C: 61,30 , H:4,63 , N: 12,22

(III) E.N: 147-149 °C; IR (KBr) ν cm^{-1} :3470 (OH) , 1605 1400 ve 1190 (-N=N-), 1340 (NO₂), 2860-2960 (ter-Bütil); UV (Dietileter) nm: 380,9; NMR (CDCl₃) ppm: 1,4 [s,9,(ter-Bütil)], 5,45[s,1<OH>], 6,60-8,40[Sub.Ar.]

Mikro Analiz (%)

Hesaplanan: C: 63,00 , H: 5,62 , N:13,90

Bulunan : C: 64,21 . H: 5,69 , N:14,05

(IV) E.N: 188-191 °C; IR (KBr) ν cm^{-1} : 3460 (OH) , 1610 , 1390 ve 1180 (-N=N-), 1345 (NO₂), 2770-2860 (ter-Bütil); UV (Dietileter) nm: 413,1; NMR (CDCl₃) ppm: 1,45 [s,9(ter-Bütil)], 7,00-8,60[Sub.Ar.]

Mikro Analiz (%)

Hesaplanan: C: 63,60 , H: 5,77 , N: 13,90

Bulunan : C: 64,21 , H: 5,69 , N: 14,05

IR spektrumunda azo grubunun absorpsiyon değerleri 1630 - 1575 cm^{-1} , 1410 \pm 30 cm^{-1} ve 1180 cm^{-1} e gözlelenebilmektedir (5).

NMR spektroskopisi tekniği moleküllerin yapılarındaki protonların

kıymasal kayma değerleri hakkında önemli bilgiler vermektedir.

Suda çözülmeyen bu tür boyar maddelerin saflandırılmasında uygun bir çözücüde kristallendirme ile ya da uygun bir çözücüde çöktürülerek saflandırma işlemi en iyi yöntemdir (5).

KAYNAKLAR

1. İ. E. Gümrükçüoğlu ve H. Kocaokutgen, "**Bazı Azo Boyar Maddelerinin Sentezi**", OMÜ yayınları, No 60, Samsun (1990) 1-3.
2. T.O.B.B. merkezi işlem birimi, (1988).
3. A.N. Nesmeyanov, "**Fundamentals of Organic Chemistry**", Moskow, (1981).
4. K.H. Sounders and R.L.M. Allen, "**Aromatic Diazo Compounds**", (1985), 3-28-269-301.
5. K. Venkataraman, "**The Chemistry of Synthetie Dyes**", NewYork, (1970).
6. I. Havlık, C. Csunderlik and A. Toth, "**Rev. Rovm. Chim.**", 28,903-13, (1983).

KAYITLAR

1. E. D. ...
2. ...
3. ...
4. ...
5. ...
6. ...
7. ...
8. ...
9. ...
10. ...



MARMARA ÜNİVERSİTESİ

LÜMİNESANT N-SÜBSTİTÜE PERİLEN DİİMİDLERİN SENTEZLERİ VE FOTOSENSİZATÖRLÜKLERİNİN SOLAR FOTOKİMYASAL REAKSİYONLAR İÇİN İNCELENMESİ

Huriye İCİL ve Sıddık İÇLİ

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, Kimya Bölümü, Bornova, İzmir, Türkiye

THE SYNTHESIS of LUMINESCENT N-SUBSTITUTED PERYLENE DIIMIDES and PHOTOSENSITIZATION STUDIES for SOLAR PHOTOCHEMICAL REACTIONS

SUMMARY

Organic photochemical reactions involve breaking and reforming of σ , Π bonds, that require radiation mostly in short UV wavelength region, below 300 nm. Only with suitable photosensitizers, by the transfer of triplet energy in high yield to acceptor molecule, photochemical reaction may take place at above 300 nm. The luminescent perylenes with highly conjugated planar aromatic structure, and polar substituents are ideal type photosensitizers. The perylene derivatives are synthesized from perylene dianhydrides with N-aryl and N-alkyl substituents are experimented at standard photochemical dehydrogenation reaction of abietic acid. The reaction rate is found to be increased with perylenes, indicating that perylene diimides are better photosensitizers for solar photochemical reactions.

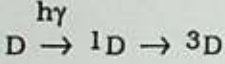
ÖZET

Organik fotokimyasal reaksiyonlar genelde σ ve Π bağlarının kopması ve tekrar oluşumlarını içermekte ve kısa UV dalga boylarında radyasyona, 300 nm nin altında, gereksinim göstermektedir. Ancak triplet enerjyi yüksek verimde akseptör moleküle transfer edebilen donör molekülleri ile fotokimyasal reaksiyon 300 nm nin üzerinde yapabilmek mümkündür.

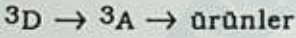
Bu amaçla lüminesant özellikli perilenler düzlemsel yoğun konjuge aromatik yapıları ve polar sübstitüentleri ile ideal donör fotosensitizatördürler. N-Aril ve N-alkil perilen türevleri perilen dianhidritlerden sentezlenerek abietik asidin standard fotokimyasal dehidrojenasyon reaksiyonu için denenmişlerdir. Reaksiyon hızının perilenler ile daha arttığının izlenmesi solar fotokimyasal reaksiyonlar için perilen diimidlere uygun fotosensitizatör olduklarını göstermiştir.

GİRİŞ

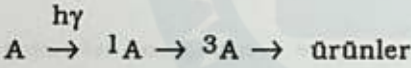
Fotokimyasal reaksiyonlarda fotosensizatörler radyasyonu absorblayarak (Donor) elektronik yapı içinde singlet-triplet dönüşümünü yapabilmektedirler.



Triples donör fotosensizatör enerjisini akseptör moleküle transferi ile istenilen reaksiyon ürününü elde edebilmek mümkün olabilmektedir.



Akseptör molekülü direk radyasyonlu fotokimyasal reaksiyona girmeyebilir veya yüksek enerjili (kısa dalga boyunda) UV radyasyonu gerekebilir (1).



Donör fotosensizatörü akseptörden istenilen ürünlerin daha düşük radyasyon enerjisi ile oluşumunu sağlayabilmektedir. Güneş radyasyonu ile 300 nm dalga boyunun üzerinde, dehidrojenasyon gibi yüksek enerji gerektiren fotokimyasal reaksiyon yapabilmek için yüksek verimde triples enerji transferi yapabilen fotosensizatörlere gereksinim vardır.

Birçok aromatik yapıli pigmentler, lüminesant özelliğe de sahiptirler. Lüminesant özellik moleküler yapı içinde singlet-triples enerji transferi ile mümkün olabildiğine göre bu moleküllerin fotosensizatör özellikleri de aşıkardır.

Plastik ve tekstil endüstrisinde pigment olarak kullanılan perilen türevlerinin güçlü fotosensitazör olabilecekleri de aşıkardır(2). Bu çalışmada N-substitüe perilen diimid türevleri, sentzenerek benzofenon fotosensitazörü ile dehidrojenasyon reaksiyonunu gerçekleştirebilen abietik asidin dehidro-abietik aside dönüşümü reaksiyonu incelemek üzere kullanılmışlardır. (3,4)

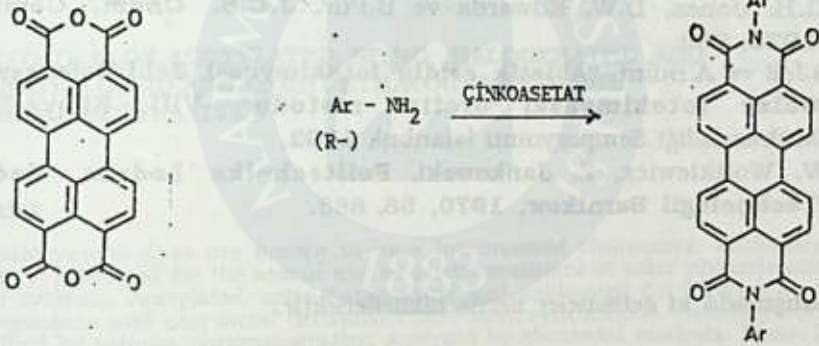
DENEL BÖLÜM

Organik sentezler için perilen dianhidrit ve amin türevleri ticari olarak temin edilmiş. Reaksiyon ürünleri UV, IR, 1H NMR spektral analizleri ve elementel analiz yöntemleri ile saptanmıştır.

Fotokimyasal reaksiyonlar için abietik asit, bakır usetat ile perilen türevleri ile reaksiyona katılmış. Radyasyon kaynağı olarak Heraus TQ150 yüksek basınç UV lambası, 350 nm üzeri radyasyon için 125 W black light lamp ve küresel kollektörle odaklandırılmış direk güneş radyasyonu kullanılmıştır.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Perilendianhidritin alkil ve arilaminler ile reaksiyonu çinko asetat katalizörlüğü altında 8 saat 230-240°C de yapılmıştır. (5)



Ar	R
FENİL	ETİL
P-ANİSİL	ASETİL
α -NAFTİL	
β -NAFTİL	

Aminlerin konsantrasyonu perilen anhidrit ve çinkoasetata kıyasla iki kat alınmıştır. Ürün karışımı süzöldükten sonra su, 2% NaOH ile yıkanmış ve 2% NaOH ile bir saat refleks edildikten sonra, süzölüp kurutulmuş, daha sonra 10% HCl ile yıkanarak kurutulmuştur. Ürünlerin elementel analiz sonuçları >99% saflıkta olduklarını göstermiştir.

Karbon radikali ara ürün mekanizmalı abietik asitin fotokimyasal dehidrojenasyon reaksiyonu benzofenon yerine perilen dilimid türevleri

ile solar radyasyonda daha hızlı oluşmaktadır.*

TEŞEKKÜR

Bu çalışmayı destekleyen Ege Üniversitesi Araştırma Fon Başkanlığına teşekkürlerimizi iletiriz.

KAYNAKLAR

- 1-C.H. DePuy and D.L. Chapman, "Molecular Reactions and Photochemistry", Prentice Hall Inc. London, 1972.
- 2-B.M. Kravovitskii and B.M. Bolotin, "Organic Luminescent Materials", p.155, 180, VCH Verlaggesellschaft. 1988..
- 3-G.H. Jones, D.W. Edwards ve B.Pur, J.C.S. Chem. Commun. 1976, 969.
- 4-S.İçli ve A.Bulut, "Abletik asidin fotokimyasal dehidrojenasyonu: Solar fotokimyasal üretim metodu", VIII. Kimya-Kimya Mühendisliği Sempozyumu İstanbul, 1992.
- 5-W. Wojtkiewicz, Z. Jankowski, Politechnika Lodzka, Katedra Technologii Barnikow, 1970, 58, 863.

* Çalışmada ki gelişmeler ilerde bildirilecektir.

MARMARA
ÜNİVERSİTESİ

CU⁺⁺, ZN⁺⁺ GİBİ METALLERİ İÇEREN FTALOSİYANİNLERİN ASETİLLİ, NİTRO, HALOJENLİ VE SÜLFO TÜREVLERİ İLE METALSİZ FTALOSİYANİNLERİN SENTEZLENMESİ

Sıddık İÇLİ, Bircan DİNDAR

Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi Kimya Bölümü Bornova, İzmir - Türkiye

SENSITIZATION OF ACETYLATED, NITRO, HALOGENATED AND
SULFONATED Cu (II) AND Zn (II) PHTHALOCYANINES AND
NON-METAL DERIVATIVES

SUMMARY

Phthalocyanine dyes are known to have luminescent characters. Phthalocyanines are synthesized for the aim of use as photosensitizers at solar photochemical reaction systems. Acetylated, nitro halogenated and sulfonated Cu (II) and Zn (II) phthalocyanines and non-metal derivatives have been synthesized. Phthalocyanines are purified by column chromatography, analyzed by elemental analysis, Mass, IR, UV, ¹H NMR and ¹³C NMR methods.

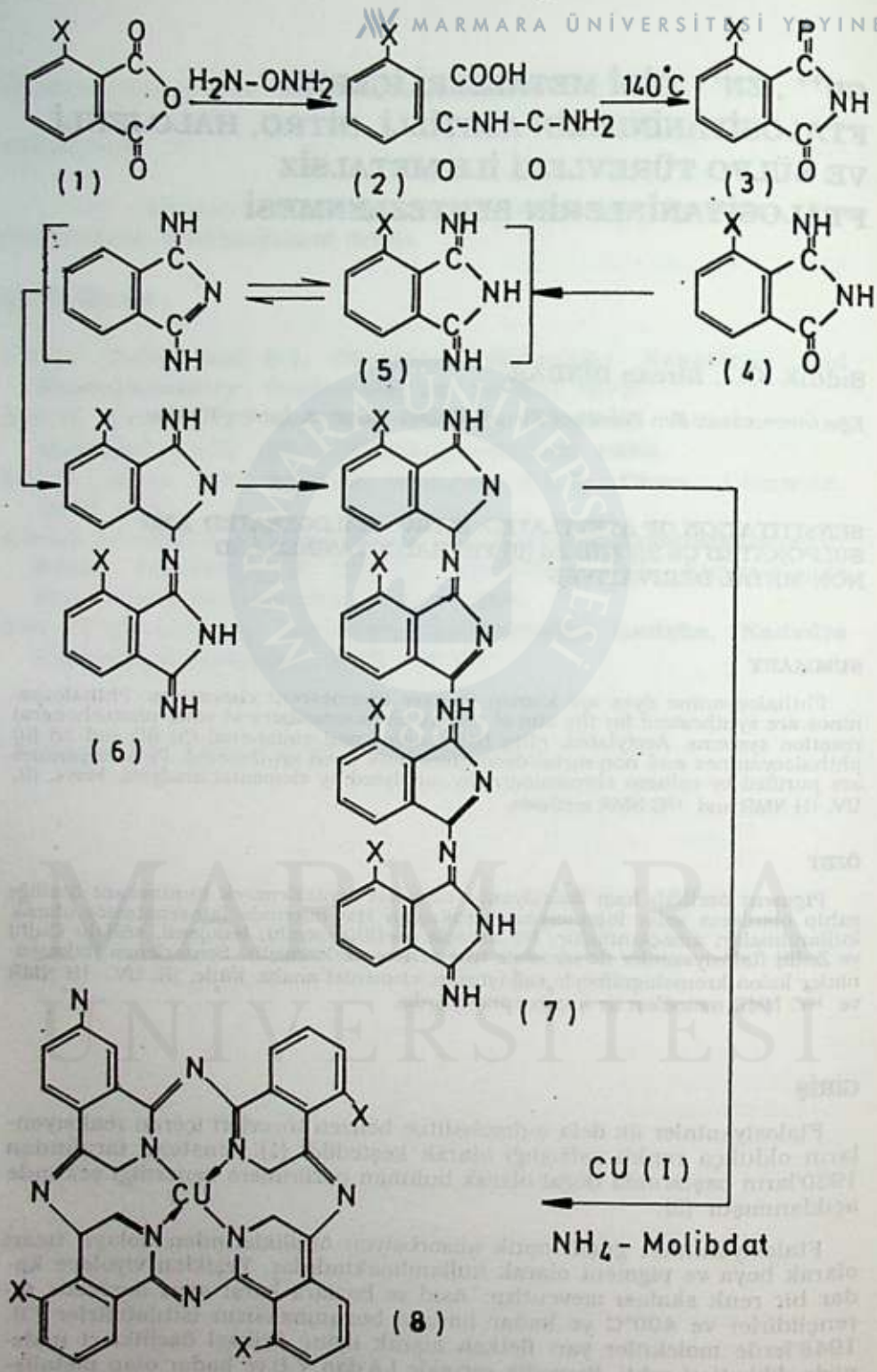
ÖZET

Pigment özellikli bazı ftalosiyanin türevleri sentezlenerek lüminesant özelliğe sahip olanların solar fotokimyasal reaksiyon sistemlerinde fotosensitizör olarak kullanılmaları amaçlanmıştır. Bu amaçla asetilli, nitro, halojenli, sülfü Cu(II) ve Zn(II) ftalosiyaninler ile metalsiz türevleri sentezlenmiştir. Sentezlenen ftalosiyaninler kolon kromatografisiyle saflaştırılıp, elemental analiz, kütle, IR, UV, ¹H NMR ve ¹³C NMR metodları ile analiz edilmişlerdir.

GİRİŞ

Ftalosiyaninler ilk defa o-disubstitue benzen türevleri içeren reaksiyonların oldukça renkli safsızlığı olarak keşfedildi (1). Linstead tarafından 1930'ların başlarında doğal olarak bulunan porfirinlere benzediği şekilde açıklanmıştır (2).

Ftalosiyaninler, güçlü optik absorpsiyon özelliklerinden dolayı, ticari olarak boya ve pigment olarak kullanılmaktadırlar. Yeşilden viyoleye kadar bir renk skalası mevcuttur. Asid ve bazlara karşı aşırı derecede dırdar rençlidirler ve 400°C ye kadar havada bozunmaksızın ısıtılabilirler (3). 1948'lerde moleküler yarı iletken olarak ilginç fiziksel özellikleri nedeniyle dikkatleri çekti. Peryodik cetvelde I.A'dan V.B'ye kadar olan metalle-



$X = -H, -NO_2, SO_3H, Vs..$

rin, molekülün merkez boşluğuna yerleştirilmesi ile çok değişen fiziksel özellikler ortaya çıkabilmektedir (4).

Ftalosiyanın sentezlerinde başlıca birkaç yöntem uygulanmaktadır. Başlangıçta, ftalodinitrillin, piridin ve bakır tuzu varlığında reaksiyonları ile elde edilmiştir (5). Daha sonra sadece farklı dinitril türevlerinden yola çıkılarak elde edilmiştir (6). Bir diğer yöntem de, ftalik anhidrit ve üreden hareketle ftalosiyanın elde etmektedir.

DENEL BÖLÜM

Bu çalışmada kullanılan yöntemde; 3-nitro ftalik anhidrit (10 mmol, 1,9412 g) ve üre (10 mmol, 2,4024 g) den çıkılarak, Cu(I) klorür (2,5 mmol, 0,0248 g) ve katalizör olarak kullanılan amonyum molibdat (0,05 mmol, 0,0618 g) varlığında nitro benzen veya yüksek kaynama noktasına sahip bir petrol fraksiyonu ortamında yaklaşık iki saat süreyle 210°C de (7) geri soğutma işlemiyle ham 1,8,15,22 - tetra - nitro ftalosiyanın elde edilmiştir. Diğer türevler de benzer şekilde elde edilmiştir. Alınan ham ürün silikajel içeren bir kolon kromatografisi yoluyla saflandırılmıştır.

Cu(I) klorür yerine Zn(II) asetat kullanıldığında Zn(II) ftalosiyanın türevlerini elde etmek mümkündür.

Bakır ftalosiyanınin sentez mekanizması aşağıdaki gibidir:

Metalsiz ftalosiyanınlerin sentezi ise, metalik komplekslerden, %25-65 H₂SO₄ ortamında 25-70°C de metallerin uzaklaştırılması mümkün olabilmektedir.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

1,8,15,22-tetra-nitro-bakır ftalosiyanınin bazı spektroskopik sonuçları aşağıdaki gibidir;

	Teorik	Bulunan
%C	50,84	50,60
%H	1,59	1,57
%N	22,23	22,28

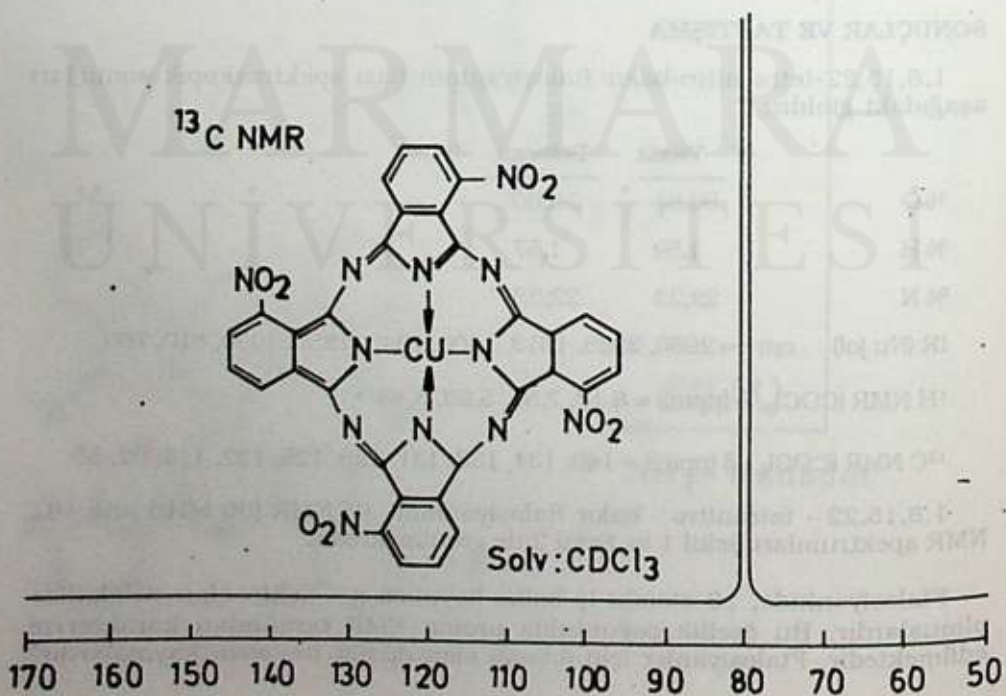
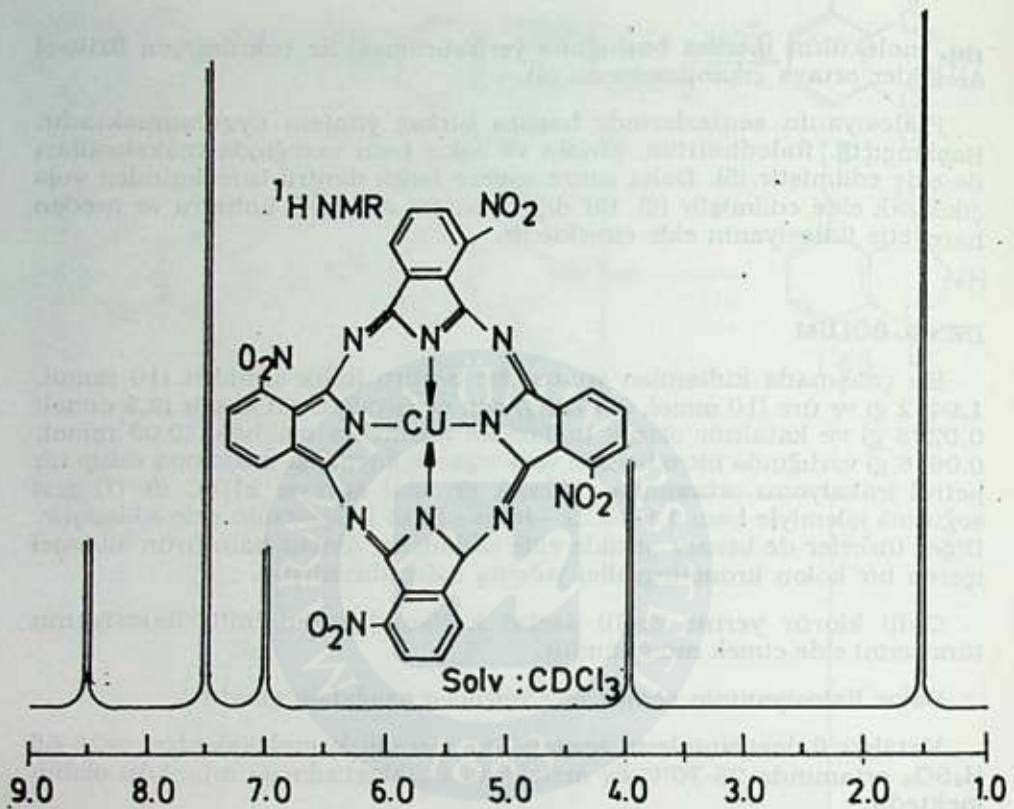
IR (Nu Jol) cm⁻¹ = 2960, 2925, 1613, 1400, 1340, 1250, 1050, 810, 760

¹H NMR (CDCl₃, δ (ppm)) = 8,17, 7,51, 5,98, 3,88 •

¹³C NMR (CDCl₃, δ (ppm)) = 149, 134, 132, 131, 128, 125, 122, 114, 92, 55

1,8,15,22 - tetranitro - bakır ftalosiyanınin ¹H NMR (60 MHz) and ¹³C NMR spektrumları Şekil 1 ve Şekil 2 de görülmektedir.

Ftalosiyanıninde, 16 atomlu iç halka boyunca η - elektronları delocalize olmuşlardır. Bu özellik çoğunlukla proton NMR tarafından karakterize edilmektedir. Ftalosiyanler için önemli olan düşük frekans kaymalarıdır.



Ftalosiyanınin IR spektrumu N - H gerilmesini 3290 cm^{-1} de göstermektedir.

Pirol veya indolün N-H gerilmesi yaklaşık 3490 cm^{-1} de meydana gelir. Gerçekte daha kondanse sistemlere gidildikçe daha düşük bir frekansa kayma umulmaktadır.

TEŞEKKÜR

Max Plank Enstitüsüne, İngiliz Kültür Heyetinin proje yardımlarına ve East Anglia Üniversitesinin sağladığı imkanlardan dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- 1 Kirk - Othmer: "Concise Encyclopedia of Chemical technology", Vol. 17, John - Wiley, New York, 1953.
- 2 R. P., LINSTED and J. M. ROBERTSON, "J. C. S." 1936, J. M. Robertson and I. Woodward; J.C.S. 1937.
- 3 VOGEL, A. I.; "Text Book of Practical ORGANIC CHEMISTRY", III. ed (1983).
- 4 BAUMANN, F. WOLF, W.; "ANEEWANDTE CHEM." 68, 133 / 50 (1956).
- 5 GILMAN, H.; "Organic Chemistry an Advanced Treatise", Vol. III, John - Wiley and Sons, London, 1953.
- 6 C. W. SCHIMEPENIG; "J. ORG. CHEM.", 28, 805, 1963.
- 7 "ULLMANN", Vol = 13 (696 - 706).
- 8 MAXWELL J., JOHNSON, M. R.; "Tetrahedron Letter", 31 (33) 4801, 1990.

... ..
... ..
... ..

... ..
... ..
... ..

TEŞEKKÜR

... ..
... ..

MARUZİYAT

1.
... ..

2.
... ..

3.
... ..

4.
... ..

5.
... ..

6.
... ..

7.
... ..

8.
... ..

MARMARA
ÜNİVERSİTESİ

SUSUZ ORTAMDA 2-(SÜBSTİTÜE)-OKSAZOLO[4-5-b]PİRİDİN TÜREVLERİNİN POTANSİYOMETRİK TİTRASYONU

Cemil ÖĞRETİR, Gözen BERKET ve Mehmet POYRAZ

Anadolu Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Eskişehir-Türkiye

POTANTIOMETRIC TITRATIONS OF 2-SUBSTITUTED OXAZOLO[4-5,b]PIRIDINE DERIVATIVES IN NON AQUEOUS SOLVENT

SUMMARY

The acidity constants (i.e. pK_a values) of some 2-substituted oxazolo[4-5,b]pyridine derivatives in nitrobenzene and acetonitrile were determined.

The anhydrous perchloric acid which had prepared in nitrobenzene was used as the titrant in the titration in the measurement which were drawn using the data obtained from potentiometric titrations. From those curves the half neutralization potentials the acidic strengths in nitrobenzene was found as follows:

2-(4-aminophenyl)- < 2-(4-methoxyphenyl)- < 2-(4-etoxyphenyl)- < 2-(4-ethylphenyl)- < 2-(4-chlorophenyl)- < 2-(4-bromophenyl)- < 2-(4-t-butylphenyl)- < 2-(4-methylphenyl)-oxazolo[4,5-b]pyridine.

When the anhydrous perchloric acid which had prepared in dioxane was used as the titrant, the acidic strengths of the studied compounds were found as follows:

2-(4-aminophenyl)- < 2-(4-methoxyphenyl)- < 2-(4-methylphenyl)- < 2-(4-bromophenyl)- < 2-(4-nitrophenyl)- < 2-(4-etoxyphenyl)- < 2-(4-chlorophenyl)- < 2-(4-ethylphenyl)- < 2-(4-t-butylphenyl)-oxazolo[4,5-b]pyridine.

These results indicate that acetonitrile is not suitable to determine the acidic strengths of 2-substituted oxazolo[4-5,b]pyridine derivatives. It is good however to determine the amount of those derivatives quantitatively.

ÖZET

2-(sübstitüe)-oksazolo[4-5,b]piridin türevlerinin nitrobenzen ve asetonitril içindeki pK_a ları tayin edilmiştir.

Nitrobenzenle yapılan çalışmada titre edici olarak nitrobenzende hazırlanmış susuz perklorik asit kullanılmıştır. Bu şekilde yapılan potansiyometrik titrasyondan eğriler çizilmiş, bu eğrilerden yarı nötralizasyon potansiyelleri, yarı nötralizasyon potansiyellerinden de nitrobenzendeki asitlik sıralaması:

2-(4-aminofenil)- < 2-(4-metoksifenil)- < 2-(4-etoksifenil)- < 2-(4-etilfenil)- < 2-(4-klorofenil)- < 2-(4-bromofenil)- < 2-(4-t-butilfenil)- < 2-(4-metilfenil)-oksazolo[4,5-b]piridin şeklinde olduğu bulunmuştur.

Asetonitrilde yapılan çalışmada titre edici olarak dioksanda hazırlanmış susuz perklorik asit kullanılmıştır. Potansiyometrik titrasyon eğrilerinden hesaplanan değerlerden asitlik sıralaması şöyle çıkmıştır.

2-(4-aminofenil)- < 2-(4-metoksifenil)- < 2-(4-metilfenil)- < 2-(4-bromofenil)- < 2-(4-nitrofenil)- < 2-(4-etoksifenil)- < 2-(4-klorofenil)- < 2-(4-etilfenil)- < 2-(4-t-butilfenil)-oksazolo[4,5-b]piridin şeklindedir.

Bu sonuçlardan asetonitril 2-(sübstitüe)-oksazolo[4-5,b]piridin türevlerinin asitliğinin tayini için uygun olmadığı, fakat miktar tayini için uygun sonuçlar verdiği sonucuna varılmıştır.

GİRİŞ

Susuz ortamda gerçekleştirilen potansiyometrik titrasyonlar zayıf asit veya zayıf bazların tayin edilmesine imkan veren çok önemli analitiksel yöntemlerdendir. Ayrıca bu tür maddelerin asitlik sabitlerinin saptanarak özelliklerindedaha iyi anlaşılması mümkün olmaktadır(1).

Asetonitril ve nitrobenzen zayıf bazların titrasyonu için uygun çözücü olduğu bilinmektedir(2-3). Diğer yandan 2-(süstitüe)-oksazolo[4,5-b]piridin türevleri bazik özellikteki antiinflamatuvar ilaçlarına kaynak teşkil etmekte olup sudaki çözünürlükleri azdır. Bu maddelerin kimyasal özelliklerinin anlaşılmasında değişik ortamlarda asitlik sabitlerinin bilinmesinin önemi vardır. Ö nedenle spektrofometrik yöntemle asitlik sabitleri saptanmış dokuz adet 2-(süstitüe)-oksazolo[4,5-b]piridin türevlerinin asitlik sabiti nitrobenzen ve asetonitril ortamında potansiyometrik olarak tayin edilmesi amaçlanmıştır.

DENEL BÖLÜM

Çalışmada kullanılan oksazolo[4,5-b]piridin türevleri Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden Yalçın, İ. ve Arkadaşları tarafından sentezlenmiş olup, yapıları şöyledir.



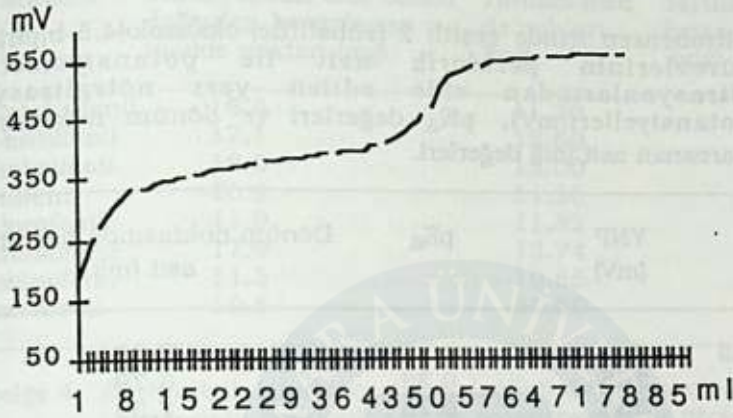
x = -OCH₃, -t-bütül, -OC₂H₅, -C₂H₅, -Cl, -Br, -NH₂, -CH₃,
-NO₂

Çalışmada çözücü olarak Merck kalitesinde nitrobenzen ve asetonitril kullanılmıştır. Titre edici olarak susuz perklorik asitin nitrobenzendeki çözeltisi ile susuz perklorik asitin nitrobenzendeki çözeltisi kullanılmıştır. Titrasyon Crison 2001 model pHmetre ve Ingold marka cam elektrot kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

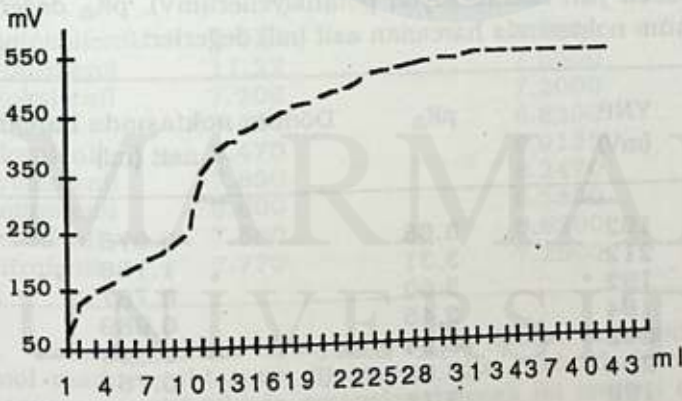
Nitrobenzen içinde çözülmüş 10⁻³M lık 2-(süstitüe)-oksazolo[4,5-b]piridin türevlerinin nitrobenzen hazırlanmış susuz 0.01N HClO₄ çözeltisi ile titrasyonuna ilişkin tipik eğri şekil. 1'de verilmektedir.

Şekil.1 ve Şekil.2'de verilen ml değerleri 0.1 ile çarpılacaktır.



Şekil.1. 2-(4-klorofenil)-oksazolo[4,5-b]piridin'in nitrobenzen ortamında perklorik asit ile potansiyometrik titrasyonu.

Aynı şekilde 2-(sübstitüe)-oksazolo[4,5-b]piridin türevlerinin asetonitrildeki $10^{-3}M$ lık çözeltisinin dioksanda hazırlanmış susuz $0.0382N$ $HClO_4$ çözeltisi ile titrasyonuna ait eğri şekil.2'de verilmiştir.



Şekil.2. 2-(4-klorofenil)-oksazolo[4,5-b]piridin'inasetonitril ortamında dioksanda hazırlanmış perklorik asit ile potansiyometrik titrasyonu.

Şekillerden görüldüğü gibi potansiyometrik titrasyon eğrileri düzgün S eğrileri olup potansiyel sıçrama aralığı $200-300mV$ 'dur. Bu ise asetonitril ve nitrobenzen bu maddelerin potansiyometrik titrasyonu için uygun çözücü olduğunu göstermektedir. Potansiyometrik titrasyon eğrilerinin yarı nötralizasyon potansiyellerinden hesaplanan pK_a değerleri ve dönüm noktasına ulaşmak için harcanan asit miktarları nitrobenzen ve asetonitril deneyler için çizelge.1'de, asetonitril içinde yapılan deneyler için

çizelge.2'de verilmektedir.

Çizelge.1. Nitrobenzen içinde çeşitli 2-(sübstitüe)-oksazolo[4,5-b]piridin türevlerinin perklorik asit ile potansiyometrik titrasyonlarından elde edilen yarı nötralizasyon potansiyelleri(mV), pK_a değerleri ve dönüm noktasında harcanan asit (ml) değerleri.

Sübstitüent	YNP (mV)	pK_a	Dönüm noktasında harcanan asit (ml)
4-metoksifenil	325	1.39	7.08
4-t-bütilfenil	365	0.32	6.79
4-etoksifenil	358	0.75	7.50
4-etilfenil	372	0.52	4.88
4-klorofenil	375	0.44	5.17
4-bromofenil	373	0.42	6.54
4-aminofenil	321	1.42	5.36
4-metilfenil	379	0.12	5.01

Çizelge.2. Asetonitril içinde çeşitli 2-(sübstitüe)-oksazolo[4,5-b]piridin türevlerinin perklorik asit ile potansiyometrik titrasyonlarından elde edilen yarı nötralizasyon potansiyelleri(mV), pK_a değerleri ve dönüm noktasında harcanan asit (ml) değerleri.

Sübstitüent	YNP (mV)	pK_a	Dönüm noktasında harcanan asit (ml)
4-metoksifenil	192	3.68	0.975
4-t-bütilfenil	212	3.31	1.166
4-etoksifenil	192	3.60	0.787
4-etilfenil	184	3.45	0.989
4-klorofenil	202	3.54	0.963
4-bromofenil	204	3.63	0.751
4-aminofenil	199	3.71	0.820
4-metilfenil	194	3.67	0.946
4-nitrofenil	198	3.62	0.844

Çizelge.3 ve Çizelge. 4'de tartılan madde miktarları ile titrasyonlardan elde edilen değerlerden hesaplanan madde miktarları karşılaştırılmaktadır.

Çizelge.3.Nitrobenzen içinde çeşitli 2-(sübstitüe)-oksazolo[4,5-b]piridin türevlerinin perklorik asit ile potansiyometrik titrasyonlarından elde edilen değerlerden hesaplanan madde miktarları ve tartılan madde miktarları.

Sübstitüent	Titrasyondan elde edilen değerden hesaplanan madde miktarı (mg)	Tartılan madde miktarı (mg)	Tartılan ve hesaplanan miktar farkı (mg)
4-metoksifenil	16.0	11.30	4.70
4-t-bütifenil	17.1	12.60	4.50
4-etoksifenil	18.0	12.00	6.00
4-etilfenil	10.9	11.20	-0.30
4-klorofenil	11.9	11.32	0.58
4-bromofenil	17.9	13.74	4.16
4-aminofenil	11.3	10.55	0.75
4-metilfenil	10.5	10.50	0.00

Çizelge.4. Asetonitril içinde çeşitli 2-(sübstitüe)-oksazolo[4,5-b]piridin türevlerinin perklorik asit ile potansiyometrik titrasyonlarından elde edilen değerlerden hesaplanan madde miktarları ve tartılan madde miktarları.

Sübstitüent	Titrasyondan elde edilen değerden hesaplanan madde miktarı (mg)	Tartılan madde miktarı (mg)	Tartılan ve hesaplanan miktar farkı (mg)
4-metoksifenil	8.410	6.7800	1.6300
4-t-bütifenil	11.22	7.5600	3.6600
4-etoksifenil	7.206	7.2000	0.0060
4-etilfenil	8.460	6.8200	1.6400
4-klorofenil	8.470	6.9135	1.5565
4-bromofenil	7.890	8.2470	-0.3570
4-aminofenil	6.600	6.3300	0.2700
4-metilfenil	7.580	6.8200	0.7600
4-nitrofenil	7.770	7.2800	0.4900

Potansiyometrik titrasyonlarda tek dönüm noktasının gözlenmesi ve 1 mol madde miktarının titrasyonu için yaklaşık 1 miliekuvalant asit harcanması moleküllerde protonlanabilecek iki merkez olmasına karşılık sadece birinci merkezin protonlanmasına ilişkin dönüm noktası gözlenebildiğini göstermektedir.

Nitrobenzen içinde elde edilen pK_a değerleri 0.1-1 arasında iken asetonitril içerisinde pK_a değerleri 3-4 arasındadır. İki azotun protonlanmasına ilişkin dönüm noktalarının gözlenmemesinin nedeni asetonitril ve nitrobenzenin $pK_a < 6$ olan maddeler için farklılandırıcı etki göstermemesinden kaynaklanabilir(4).

Nitrobenzenin elde edilen asitlik sıralaması:

2-(4-aminofenil)- < 2-(4-metoksifenil)- < 2-(4-etoksifenil)- < 2-(4-t-butifenil)- < 2-(4-etilfenil)- < 2-(4-klorofenil)- < 2-(4-bromofenil)- < 2-(4-metilfenil)-oksazolo[4,5-b]-piridin şeklinde olup C.ÖĞRETİR ve H.BERBER

tarafından spektrofotometrik olarak bulunan pK_a değerleri ile karşılaştırıldığında asitlik sıralamasının 2-(4-bromofenil)-oksazolo[4,5-b]-piridin hariç aynı olduğu görülmüştür.

Asitlik sıralamasının bu şekilde bulunması indüktif ve mezomerik etkiler ile oksazolo[4,5-b]-piridin'in 2-konumuna bağlı sübstitüentlerin uzayda serbest dönmesi ve düzlem dışı konumlanması ile açıklanabilir. İndüktif ve mezomerik olarak elektron iten sübstitüentler bileşiğin asitliğini azaltıp, bazlığını artırır. Dolayısıyla elektron iten sübstitüentlerdeki bazlık daha fazla, asitlik daha azdır. Ayrıca oksazolo[4,5-b]-piridin'in 2-konumuna bağlı sübstitüentlerin serbest dönme ve düzlem dışı konumlanması nedeniyle 2-konumuna bağlı sübstitüentlerin büyüklüğü arttıkça oksazolo piridin ile sübstitüfenil arasındaki dihedral açının artması böylece sübstitüentlerin gereken etkiyi göstermemesi yukarıda verilen sıralamanın izlenmesine neden olmuştur. Diğer yandan asetonitril içindeki asitlik sıralaması da,

2-(4-aminofenil)- < 2-(4-metoksifenil)- < 2-(4-metilfenil)- < 2-(4-bromofenil)- < 2-(4-nitrofenil)- < 2-(4-etoksifenil)- < 2-(4-klorofenil)- < 2-(4-etilfenil)- < 2-(4-t-butilfenil)-oksazolo[4,5-b]piridin şeklinde olduğu bulunmuştur.

Nitrobenzende verilen asitlik sıralamasına uymamasının nedeni asetonitril çözümlerinde meydana gelebilecek homokonjugasyon olabilir(5). Ancak Çizelge. 4'de verilen değerler asetonitrilde yapılan titrasyonların kantitatif amaçla kullanılabileceğini göstermektedir.

KAYNAKLAR

1. H.A. Laitinen and W. E. Harris, "Chemical Analysis", Second Edition, (1975)56.
2. James S. Fritz, Anal. Chem. 25(1953)407.
3. E. Kılıç and T. Gündüz, Analyst, (1986)949.
4. A. Önen, A.S. Saraç, B.U.L.L. Tche Univ. İstanbul, 40. (1987). 597.
5. T. Gündüz, E. Kılıç, G. Özkan, M. Awaad, M. Taştekin, Can. J. Chem. 68(1990)674.

FENALEN -1,3 (2H) - DİON ve BAZI 2-SUBSTİTE TÜREVLERİNİN pKa'LARININ ETANOL-SU KARIŞIMLARI İÇİNDE SPEKTROFOTOMETRİK TİTRASYON YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

Nermin HOCAOĞLU (ERTAN)

Gazi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü,
Teknik Okullar, Ankara - Türkiye

DETERMINATION OF pKa VALUES OF SOME 2-SUBSTITUTED PHENALEN-1,3
(2H)- DIONES IN ETHANOL-WATER MIXTURES BY SPECTROPHOTOMETRIC
TITRATION METHOD.

SUMMARY

In this study, 2-Phenalen-1,3 (2H)- dione and their 2-Nitroso and 2-Phenyl derivatives were synthesised by condensation reactions. Acidity constants of compounds were measured both in water and in EtOH-H₂O mixtures by spectrophotometric titration method. It was observed that pKa values of 2-phenalen-1,3 (2H)- dione and it's 2-Phenyl derivative increased while pKa of p-Nitroso derivative decreased as ethanol content increased in solvent mixture. A linear correlation was obtained between the pKa values of the compounds and dielectric constants of the solvent systems.

ÖZET

Bu çalışmada, 2-Fenalen-1,3 (2H) - dion ile 2-Nitrozo ve 2-Fenil türevleri kondensasyon tepkimeleriyle sentezlendi. Bileşiklerin asitlik sabitleri su ve etanol-su karışımları içinde spektrofotometrik titrasyon yöntemiyle tayin edildi. Çözücü karışımında etanol miktarı arttıkça, 2-Fenalen-1,3 (2H)-dion ve 2-Fenil türevinin pKa'ları artarken 2-Nitrozo-türevinin pKa'sının azaldığı gözlemlendi. Bileşiklerin pKa değerleri ile çözücünün dielektrik sabiti arasında doğrusal bir ilişki elde edildi.

GİRİŞ

Karbon asitlerinden oluşturulan karbanyonların organik sentezlerde kullanım alanı çok yaygındır. Çoğu karbanyon tepkimeleri çeşitli organik çözücüler içinde gerçekleştirilir. Bu nedenle, çeşitli çözücü sistemlerindeki iyonlaşma sabitlerinin bilinmesi önemlidir.

β- Diketonlar, keto-enol tautomerisi gösteren bileşiklerdir. Bundan dolayı çeşitli ortamlarda anyonik ve katyonik formlarda bulunabilirler.

Bu çalışmada, Fenalen -1,3 (2H) - dion'un pKa'sının tayin edilmesi ve pKa değeri üzerine 2- konumundaki bazı süstitüentlerin etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. Ayrıca, artan etanol yüzdesi ile pKa'nın değişimi incelenmiştir.

DENEL BÖLÜM

2-Fenalen-1,3 (2H) dion (1), ile 2-nitrozo (2) ve 2-Fenil (3) türevleri kondensasyon tepkimeleriyle sentezlendi. Yapıları spektrofotometrik yöntemlerle belirlendi.

Bileşiklerin pKa'ları saf su, % 20, % 50 ve % 80 (v/v) etanol-su karışımları içinde spektrofotometrik titrasyon yöntemi ile tayin edildi (4). pH değerleri, pH metre ile ölçüldü. Etanol-su karışımları için düzeltme faktörü kullanıldı (5). Bütün ölçümler 0,1 N NaCl kullanılarak sabit iyon şiddetinde gerçekleştirildi. Her pKa değeri için en az on beş ölçüm yapılarak aritmetik ortalama alındı.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

2-Fenalen -1,3 (2H) - Dion ve 2-Fenil türevinde UV bölgesinde nötral moleküllere ait bandlarda birbirine yakın iki maksimum gözlenmektedir. Bunlar keto ve enol tautomerlerin $\pi-\pi^*$ geçişlerine aittir (6). 2-Nitrozo türevi ise çalışılan ortamlarda tek maksimum göstermekte olup en kararlı oksim yapısında bulunmaktadır.

Bileşiklerin saf su, % 20, % 50 ve % 80 (v/v) etanol-su karışımları içinde tayin edilen pKa değerleri Çizelge 1'de özetlendi.

Çizelge 1. Fenalen -1,3 (2H) - dion'ların Etanol - Su Karışımları İçindeki pKa Değerleri.

Bileşik	pKa			
	Saf Su	% 20 (v/v) ^a etanol-su	% 50 (v/v) ^b etanol-su	% 80 (v/v) ^c etanol-su
Fenalen-1,3 (2H)-dion	4,92	4,99	5,33	5,47
2-Fenilfenalen -1,3 (2H) - dion	4,91*	4,89	5,03	5,27
2-Nitrozofenalen -1,3 (2H)- dion	5,34	5,26	4,98	5,10

Sıcaklık : 25°C

Derişim : 2×10^{-4} M

(a) Düzeltme faktörü -0,05

(b) Düzeltme faktörü -0,23

(c) Düzeltme faktörü -0,41

* Suda çok az çözüldüğü için çökme olmadan tek bir ölçüm yapılabildi.

Fenalen -1,3 (2H)-dion ile 2-fenil türevinin asitliklerinin etanol yüzdesi ile düzenli olarak azaldığı, buna karşılık 2-nitrozo türevinde etanol yüzdesi ile asitliğin arttığı gözlenmektedir. Etanolün dispersiyon kuvvetleri suya göre daha fazladır. Büyük ve delokalizasyonun çok olduğu anyonlarda hidrojen bağları zayıfsa dispersiyon kuvvetleri etkin olur ve böyle anyonlar etanol içinde suya göre daha yüksek asitliğe sahiptirler (7). 2-Nitrozofenalen -1,3 (2H) - dion'un asitliğinin etanol miktarı ile artması, asitlik üzerinde, hidrojen

bağlarından ziyade disperstiyon kuvvetlerinin etkin olduğunu göstermektedir.

İncelenen bileşiklerin pKa'ları ile çözücü sistemlerinin dielektrik sabitleri arasında doğrusal bir ilişki gözlemlendi. Bu sonuç, incelenen bileşiklerin asitlikleri üzerinde elektrostatik kuvvetlerin doğrudan etkili olduğunu göstermektedir.

pKa değeri üzerine fenil grubunun etkisi saf su içinde görülmezken etanol miktarı arttıkça asitlik de artmaktadır. 2-Nitrozo türevindeki sonuçlar, çözücü etkisinin sübstitüent etkisinden çok olduğunu düşündürmektedir.

KAYNAKLAR

1. B. Erstert, W. Eifler und H. Göth, "Versuche in der Reihe des 3- Hydroxy -1- oxo - phenalens und des 1.2.3 - Trioxo - 2.3 - dihydro- phenalens", *Chem. Ber.*, 101 (1968), 2162 - 2175.
2. W.O. Teeters and R. L. Shriner, "A New Preparation of Ninhydrin", *J. Am. Chem. Soc.*, 55 (1933), 3026-28.
3. O.M. Aly, W. Awad and A.M. İslam, "Comparative Study between Phtalides and Naphthalides.", *J. Org. Chem.*, 23 (1958), 1624-28.
4. A. Albert, E.P. Serjeant, "The Determination of Ionization Constants", Chapman and Hall Ltd, London (1971), 44-81.
5. B. Gutbezahl and E. Grunwald, *J. Am. Chem. Soc.*, 75 (1953), 565.
6. A. Buraway, A.E. Salem and A.R. Thompson, "Tautomerism of 1-Arylazo-2-naphtols", *J. Chem. Soc.*, 1952, 4793-98
7. C.D. Ritchie, R.E. Uschold, "Acidity in Nonaqueous Solvents.", *J. Am. Chem. Soc.*, 89 (1967), 2752-53.



MARMARA
ÜNİVERSİTESİ

OKSAZOLO[4,5-b]PİRİDİN TÜREVLERİNİN ASİTLİK SABİTLERİNİN HESAPLANMASI VE DEĞERLENDİRİLMESİ

Cemil ÖĞRETİR, Halil BERBER ve Nevin KANIŞKAN

Anadolu Üniversitesi Fen - Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Eskişehir - Türkiye

DETERMINATION OF THE ACIDITY CONSTANTS OF SOME OXAZOLO[4,5-b]PYRIDINE DERIVATIVES AND THEIR EVALUATION

SUMMARY

Acidity constants, for the first and second protonation, pK_a , of some 2-substituted oxazolo[4,5-b]pyridine derivatives were determined using Spectroscopic Technique. With the exception of molecule II, which posses an amino group as substituent, all studied molecules found to act as Hammett bases for the first protonation. It was observed both experimentally and theoretically that the pyridine ring protonates easier than that of oxazole ring. Using the obtained acidity constants and "Modified Hammett Equation" the substituent constant, σ , for the substituents on studied molecules were calculated.

ÖZET

2-Konumunda sübstütüent içeren bazı oksazolo[4,5-b]piridin türevlerinin birinci ve ikinci proton-alma asitlik sabitleri, pK_a , Spektroskopik Yöntemle saptanmıştır. 2-Konumunda sübstütüent olarak amino grubu içeren molekül II haricindeki diğer moleküllerin birinci proton alma için Hammett bazı olarak davrandıkları gözlenmiştir. Deneysel ve teorik olarak piridin halkasının oksazol halkasından daha kolay proton aldığı tespit edilmiştir. Bulunan asitlik sabitleri ve "Modifiye Hammett Eşitliği" nin kullanılmasıyla, çalışılan moleküllerdeki sübstütüentler için sübstütüent sabitleri, σ , hesaplanmıştır.

GİRİŞ

2-Konumunda sübstütüent içeren bazı oksazolo[4,5-b]piridin türevlerinin birinci ve ikinci proton-alma asitlik sabitlerinin saptanması ile ilgili çalışma yapılmamıştır. Bu türevler iki proton alma merkezine sahiptirler, deneysel ve teorik olarak ilk önce piridin halkasının proton aldığı yapılan çalışma sonunda hesaplanmıştır. Ayrıca 2-konumundaki sübstütüentlerde elektronca zengin merkez bulunması durumunda proton alma merkezinin üçe çıktığı görülmüştür.

DENEL BÖLÜM

pK_a hesaplanmasında, daha önceden sentezlenmiş maddeler kullanılmıştır (1).

Birinci proton-alma için pH bölgesin çalışma yapılmıştır. Bu

bölgedeki çalışmada kullanılan çözeltiler 0 - 7 arasında pH'sı bilinen tampon çözeltilerdir. Çalışılacak maddenin yaklaşık 10^{-4} M'lık stok çözeltisi, suda, pH'sı belli çözeltide veya uygun bir çözücüde hazırlanır. Bu çözeltiden 1 ml alarak pH'sı belli çözeltilerle 10 ml'lik çözeltileri hazırlanır ve son derişimleri hesaplanır ($M_1 \cdot V_1 = M_2 \cdot V_2$). Hazırlanan bu çözeltilerin pH= 1'de ve pH= 7'deki çözeltilerinin U.V.'de spektrumları çizilerek, çalışmanın yapılacağı maksimum dalga boyu seçilir. Seçilen dalga boyunda, hazırlanan çözeltilerin fotometrik modunda' absorbanları okunur. Bu değerlerden ϵ_{\max} hesaplanır ($A = \epsilon_{\max} \cdot b \cdot c$) ve pH'ya karşı ϵ_{\max} grafiği çizilir. Grafik bir " S " eğrisi verir. " S " eğrisinin uç kısımlarına çizilen bir doğrudan moleküler halin (ϵ_M) soğurması ile iyonlaşan halin (ϵ_I) soğurması grafikten okunarak (I) iyonlaşma oranları hesaplanır.

$$I = \frac{\epsilon_{göz} - \epsilon_M}{\epsilon_I - \epsilon_{göz}}$$

$\epsilon_{göz}$ = gözlenen halin soğurma
 ϵ_M = moleküler halin soğurması
 ϵ_I = iyonik halin soğurması

log I 'ya karşı pH (H) grafiği çizilir, doğrunun kesim noktası yarı pratonlanma değeridir ($pH^{1/2}$ veya $H^{1/2}$).

$$pK_a = m \cdot H^{1/2} \quad m = \text{eğim}$$

formülünden pK_a değeri hesaplanır.

İkinci proton alma için % H_2SO_4 ile çalışma yapılmıştır. % 1 ile % 98 arasında yüzdesi belli çözeltiler hazırlanır. Bu bölgedeki çalışma aynen pH bölgesindeki gibidir. 10 ml'lik çözeltilerin gerçek yüzdesi aşağıdaki şekilde hesaplanır.

$$\% W = \frac{\text{ilave edilen asidin ağırlığı}}{\text{asit + madde karışımının ağırlığı}} \cdot \% A$$

$$\% W = 10 \text{ ml 'lik çalışma çözeltisinin gerçek } \% H_2SO_4 \text{ miktarı}$$

$$\% A = \text{ilave edilen } H_2SO_4 \text{ yüzdesi}$$

$$pK_a = m \cdot H_o^{1/2} \quad H_o^{1/2} = \text{asitlik fonksiyonu}$$

Çizelge 3. 2-Süstitüe-oksozolo[4,5-b]piridin türevlerinin birinci proton-
alma için pK_a - σ_{hes} değerleri.

Türev No	Süstitüent	pK_a	σ_{hes}
I	Osazolo[4,5-b]piridin	1.83	(Ekstrapolasyon değeri) ^a
II	2-(4-Aminofenil)	4.85	-0.63
II	2-(4-Metoksifenil)	3.97	-0.45
IV	2-(4-Etoksifenil)	3.03	-0.25
V	2-(4-Etilfenil)	2.65	-0.17
VI	2-(4-Klorofenil)	2.49	-0.14
VII	2-(4-t-Butilfenil)	2.38	-0.11
VIII	2-(4-Metilfenil)	2.21	-0.08
IX	2-(4-Bromofenil)	2.19	-0.07
X	2-(4-Nitrofenil)	1.35	0.12

Çizelge 4. 2-Süstitüe-oksozolo[4,5-b]piridin türevlerinin ikinci proton-
alma için pK_a - σ_{hes} değerleri.

Türev No	Süstitüent	pK_a	σ_{hes}
I	Okasolo[4,5-b]piridin	-7.57	(Ekstrapolasyon değeri) ^a
II	2-(4-Aminofenil)	0.48	-0.63
III	2-(4-Metoksifenil)	-0.06	-0.27
IV	2-(4-Etoksifenil)	-4.18	-0.26
V	2-(4-Etilfenil)	-5.16	-0.19
VI	2-(4-Klorofenil)	-5.33	-0.17
VII	2-(4-t-Butilfenil)	-5.38	-0.17
VIII	2-(4-Metilfenil)	-5.67	-0.15
IX	2-(4-Bromofenil)	-4.60	-0.23
X	2-(4-Nitrofenil)	-9.08	0.12

Moleküler Orbital Hasapları

Moleküler orbital hesapları ile yapılan çalışma sonunda toplam atomik yükler aşağıdaki şekilde hesaplanmıştır.

Çizelge 5. Toplam atomik yükler.

Atom no	Atom	q (atom yükü)
1		0,11720*
2	H	0,16680
3	C	-0,01236
4	O	0,11125
5	C	-0,06336
6	C	-0,06353
7	C	0,01673
8	C	-0,20108
9	N	0,13020
	C	

Çizelge 1. (Devam ediyor)

X	2-(4-Nitrofenil)	Ekstrapolasyon değeri ^ε	1.35
---	------------------	------------------------------------	------

^aÖlçüm pH = 7'de yapılmıştır. ^bÖlçüm pH = 1'de yapılmıştır. ^cYarı proton alma değeri. ^dÖlçümün yapıldığı dalga boyları. $\epsilon pK_a - \sigma_{hes}$ grafiğinin ekstrapolasyonundan hesaplanmıştır.

Molekül II, birincil amin olduğundan ilk önce amin kısmı protonlanır. Ölçülen pK_a değeri, aminin pK_a 'sıdır. Protonlandıktan sonra sübstitüent sabitinin değeri nitrodan da fazla olduğu için piridin azotundan protonlanamaz ve Hammett bazı olarak davranamaz.

İkinci Proton Alma

İkinci protonlanma için bulunan değerler Çizelge 2. verilmiştir.

% 1 - % 98 bölgesinde yapılan çalışmada molekül II ve X'nun nötr ve protonlanmış haldeki U.V. spektrumları aynı dalga boyunda geldiğinden dolayı bu yöntem ile pK_a değerleri hesaplanamadı. Fakat ikinci proton alma için $pK_a - \sigma_{hes}$ grafiğinin ekstrapolasyonundan hesaplanmıştır.

Çizelge 2. 2-Sübstitüe-oksozolo[4,5-b]piridin türevlerinin ikinci proton alma sabitleri ve U.V. sonuçları.

	λ_{max} (nm)	ϵ_{max}
Türev No	Sübstitüent	Dikasyon ^a Monokasyon ^b Dikasyon ^a Monokasyon ^b $H^{1/2\epsilon}$ $m pK_a$ $\lambda_{(nm)}$ ^d
I	Oksazolo[4,5-b]piridin	Ekstrapolasyon değeri ^ε -7.57
II	2-(4-Aminofenil)	Ekstrapolasyon değeri ^ε 0.48
III	2-(4-Metoksifenil)	394.8 351.2 55600 400 -5.17 0.79 -4.05 395.8
IV	2-(4-Etoksifenil)	365.6 328.0 53000 1400 -5.33 0.78 -4.18 365.6
V	2-(4-Etilfenil)	365.2 330.8 52800 800 -5.90 0.87 -5.16 365.2
VI	2-(4-Klorofenil)	351.6 326.8 52400 19600 -6.24 0.85 -5.33 351.6
VII	2-(4-t-Bütilfenil)	366.8 328.0 68500 2000 -6.12 0.88 -5.38 366.8
VIII	2-(4-Metilfenil)	364.0 326.4 75000 2000 -6.24 0.91 -5.67 364.0
IX	2-(4-Bromofenil)	356.4 313.2 62000 15600 -5.78 0.78 -4.56 356.4
X	2-(4-Nitrofenil)	Ekstrapolasyon değeri ^ε -9.08

^aÖlçüm %98 H₂SO₄'te yapılmıştır. ^bÖlçüm %1 H₂SO₄'te yapılmıştır. ^cYarı proton alma değeri. ^dÖlçümün yapıldığı dalga boyları. $\epsilon pK_a - \sigma_{hes}$ grafiğinin ekstrapolasyonundan hesaplanmıştır.

Molekül II' yukarıda anlatılan gerekçe ile bu bölgede de piridin ve oksazol azotlarından protonlanması gerçekleşmez. Aynı gerekçe ile molekül X'nun da sübstitüent sabitinin değeri yüksek olduğundan ($\sigma_p = 0.78$) her iki molekülün ikinci proton alma değerleri hesaplanamamıştır.

Hammett İlişkileri

Modifiye Hammett eşitliği kullanılarak sübstitüentlerin, birinci proton alma için σ_{hes} değerleri Çizelge 3.'te ve ikinci proton alma için σ_{hes} değerleri Çizelge 4.'te verilmiştir (2).

denkleminde pK_a hesaplanır.

Bilindiği gibi Hammett eşitliğinin esas kullanım alanı, yeni bir sübstitüent için σ değerleri ve yeni bir reaksiyon için ρ değerinin hesaplanabilmesini önermesidir. Çalışmalarda aşağıdaki eşitlikten sübstitüent sabitleri hesaplanmıştır.

$$\Delta pK_a = \rho \cdot \sigma \quad \rho = \text{reaksiyon sabiti}, \quad \sigma = \text{sübstitüent sabiti}$$

İlk protonlanmanın piridin azotundan mı yoksa oksazol azotundan mı olduğu, *ab initio* MO yöntemi ile Gaussian 86 paket programındaki STO-3G basis seti ile hesaplamalar yapılmıştır (3).

SONUÇ VE TARTIŞMA



2 - Sübstitüe oksazolo[4,5-b]piridin

X; I = -H, II = -NH₂, III = -OCH₃, IV = -OC₂H₅, V = -C₂H₅,

VI = -Cl, VII = -t-Bütül, VIII = -CH₃, IX = -Br, X = -NO₂

Deneyisel çalışmada, oksazolo[4,5-b]piridinin 2- konumunda dokuz değişik sübstitüent içeren türevleri ile çalışma yapılmıştır.

Birinci Proton Alma

Birinci proton alma için bulunan değerler, Çizelge 1.'de verilmiştir.

pH bölgesinde molekül X'nun nötr ve protonlanmış haldeki U.V. spektrumları aynı dalga boyunda geldiğinden dolayı bu yöntemle pK_a değeri hesaplanamamıştır. Fakat birinci proton alma için $pK_a - \sigma$ hesafığının ekstrapolasyonundan hesaplanmıştır.

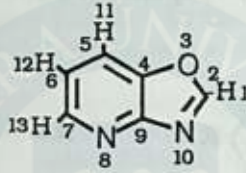
Çizelge 1. 2-Sübstitüe-oksazolo[4,5-b]piridin türevlerinin birinci proton alma sabitleri ve U.V. sonuçları.

Türev No	Sübstitüent	λ_{max} (nm)		ϵ_{max}		$H^{1/2\sigma}$	pK_a	$\lambda_{(nm)}^d$
		Katyon ^a	Nötral ^a	Katyon ^a	Nötral ^a			
I	Oksazolo[4,5-b]piridin						1.83	
II	2-(4-Aminofenil)	338.8	331.6	24100	13800	3.72	1.72	4.85 338,8
III	2-(4-Metoksifenil)	350.4	388.0	35800	500	3.06	1.30	3.97 350,4
IV	2-(4-Etoksifenil)	330.8	312.4	41600	13600	3.53	1.20	3.03 330,8
V	2-(4-Etilfenil)	328.4	311.6	45800	400	2.28	1.16	2.65 328,4
VI	2-(4-Klorofenil)	327.2	312.0	47600	21600	2.15	1.16	2.49 327,2
VII	2-(4-t-Bütülfenil)	321.2	312.4	56200	16800	2.23	1.06	2.38 321,2
VIII	2-(4-Metilfenil)	330.8	311.6	58200	15600	2.08	1.06	2.21 330,8
IX	2-(4-Bromofenil)	328.4	313.2	60200	28800	1.92	1.14	2.19 328,4

Çizelge 5.(Devam ediyor)

10	N	-0,25657
11	H	0,08626
12	H	0,07495
13	H	0,09352

Atomik yükü , en küçük (-) değere sahip olan atomun elektronca en zengin merkez olduğundan(1-q, atom yükünün birim değerden çıkartılması ile elde edilen elektron yükü) ilk protonlanmanın 8-N'deki piridin azotundan, ikinci protonlanmanın 10-N'daki oksazol azotundan olduğu saptanmıştır (3).



TEŞEKKÜR

Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Cemil Öğretir'e çalışmalarımıdaki büyük yardımlarından dolayı teşekkürlerimi sunarım.

Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyelerinden, Yalçın, İ. ve çalışma arkadaşlarına deneyde kullandığım molekülleri sağladıklarından dolayı, Moleküler Orbital hesaplarını yapan ve çalışmalarımda büyük yardımlarını gördüğümünden dolayı Bölümümüz Öğretim Üyelerinden Sayın Yrd. Doç. Dr. Nevin Kanışkan'a teşekkürlerimi sunarım.

KAYNAKLAR

- 1-S. Özden, İ. Yalçın, T. Özden, "Ankara Eczacılık Fakülte Dergisi" Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, Ankara (1984) 14, 53.
- 2-C. Öğretir, "Değişik Pirolo[3,4-d]Piridazın Türevlerinin Bulunması ve Değerlendirilmesi", (Doçentlik Tezi), Eskişehir Devlet Mimarlık Mühendislik Akademisi, Eskişehir (1979).
- 3-N. Kanışkan ve C. Öğretir, "Bazı 2-Sübstitüe-İmidazo[4,5-f]Kininolin Türevlerinin Sentezi ve Türevler Üzerinde Fizikokimyasal Çalışmalar", TBAG-861'nolu Proje), Anadolu Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, Eskişehir (1989).

2-METİL VE 2-HALO SİKLOHEKZANONUN ETİLEN KETALLERİNİN KONFORMASYONEL DENGELERİ ÜZERİNE ÇÖZÜCÜ ETKİLERİ

Safiye ERDEM, Tereza VARNALI, Viktorya AVİYENTE(*) ve M. F. Ruiz-Lopez(**)

(*) Boğaziçi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, 80815
Bebek-Istanbul-Türkiye

(**) Laboratoire de chimie Théorique, Université de Nancy I, Boite Postale 239,
54500 Vandœuvre-les-Nancy, Cedex, France

SOLVENT EFFECT ON CONFORMATIONAL EQUILIBRIA OF 2-METHYL AND 2-HALO CYCLOHEXANONE ETHYLENE KETALS

SUMMARY

Semi-empirical quantum chemical computations have been applied to the conformational equilibrium of 2-substituted cyclohexanone ethylene ketals (10-substituted 1,4-dioxaspiro[4.5]decanes). The solvent effect is taken into account in the calculations by using the "cavity model". The investigations have been done using F, Cl, and CH₃ as substituents. It has been seen that the predicted solvent effects from the computations are in good agreement with available experimental data.

ÖZET

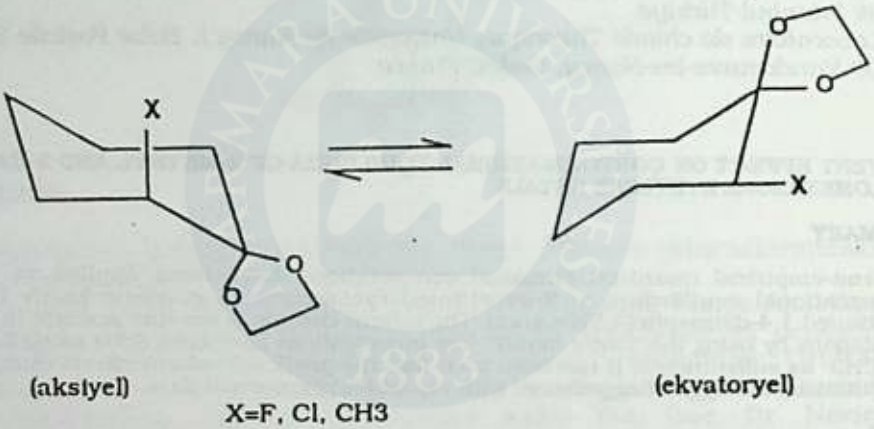
2-Substitüye sikloheksanon etilen ketallerinin (10-sübstitüye 1,4-dioksaspiro [4.5]dekanların) konformasyonel dengesi üzerine yarı ampirik kuvantum kimyasal hesaplamalar uygulandı. Hesaplamalarda çözücü etkisi, "cavity model" kullanılarak dikkate alındı. Sübstitüent olarak F, Cl ve CH₃ incelendi. Hesaplamalar sonucu elde edilen çözücü etkilerinin deneysel bulgularla yakın benzerlik gösterdiği görüldü.

GİRİŞ

Deneysel kimya çalışmalarının çoğu çözücülerin bulunduğu ortamlarda gerçekleşmektedir. Kuvantum kimyasal teorik hesaplamalar ise genellikle gaz fazı gibi kabul edilen, izole edilmiş model moleküller üzerine yapılmaktadır. Bu nedenle, çözücü içindeki moleküllerin deneysel bulguları ile aynı moleküllerin teorik hesaplamalarının sonuçları arasında bazı farklılıklar görülmektedir. Bu çalışmada çözünen ve çözücü arasındaki elektronik etkileşimleri dikkate alan "cavity model" i kullanılmıştır (1). Bu modeli şöyle açıklayabiliriz: Bir sıvı fazda birçok çözücü molekülü ile çevrili bir çözünen molekül düşünelim. Bu çözücü moleküllerin çözünen üzerinde yapacağı etkileri analiz edebilmek için çözüneni bulunduğu yerden çekip çıkarttığımızı varsayalım. Başlangıçta çözücü tarafından kaplanan ama şimdi boş olan bu hacimde bir elektriksel potansiyel ve onun meydana getirdiği "REACTION FIELD" oluşmuştur.

Bu metotta, çözücü dielektrik sabiti ile tanımlanan fiziksel bir devamlılık olarak düşünülür ki bu da çözücü ve çözünen arasındaki elektrostatik etkileşimleri temel alan en basit yaklaşımdır. Bu yaklaşımın tarihi çok eskilere gitmektedir(2). 1936'da Onsager tarafından polar sıvı etkilerinin küresel kavite

modeli ile tanımlanabileceği gösterildi(3). Daha yakın tarihimizde, Onsager'ın yöntemi Rivail ve Rinaldi tarafından kuvantum kimyasal hesaplamalara uygulandı ve küresel şekle uyan moleküller üzerindeki çözücü etkisinin bulunmasında oldukça iyi sonuçlar verdiği görüldü(4). Ancak kimyasal açıdan önemli ve ilginç birçok molekül küresel şekle uymayacağı için yeni modellerin geliştirilmesi zorunluluğu ortaya çıktı. Rivail ve grubu sözü geçen modeli genelleştirmeye çalışarak "elipsoidal cavity" modelini geliştirdiler ki bu çok daha fazla sayıda moleküle uymaktadır (4). Bu çalışmanın amacı "elipsoidal kavite" modelini aşağıdaki konformasyonel dengeye uygulamaktır.



Şekil-1. 2-Sübstitüye Sikloheksanon etilen ketallerin konformasyonel dengesi

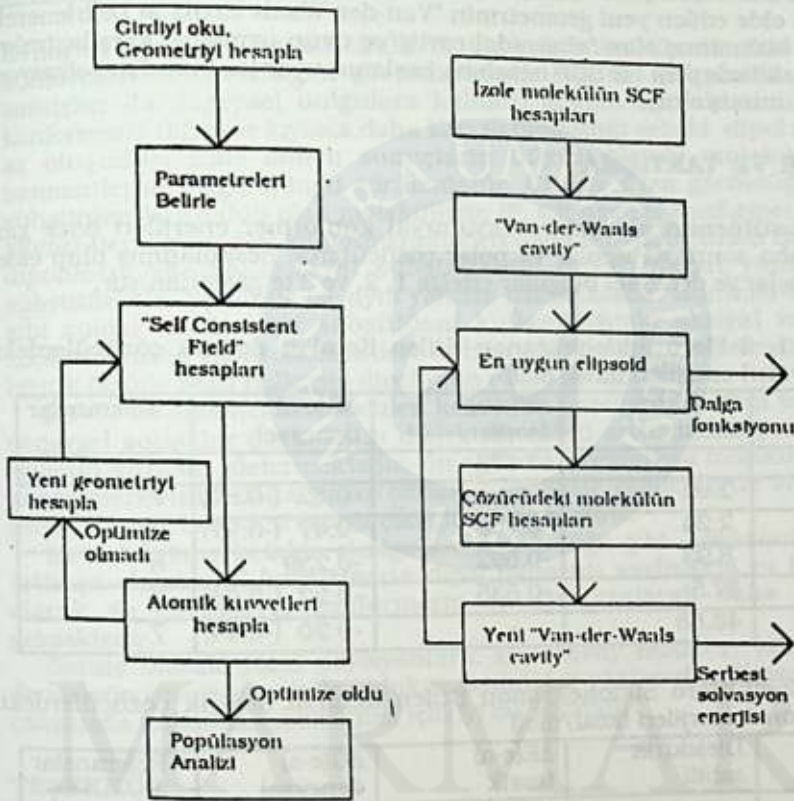
Bu moleküllerin enerjileri hem gaz fazında hem de değişik çözücüler içinde "self consistent field" hesaplamaları yapılarak bulunmuş ve literatür taraması sonucu elde edilen deneysel sonuçlarla karşılaştırılmıştır. Sonuçta kullanılan yöntemin uygunluğu hakkında da bilgi sağlanabilmektedir. Bu bilgi gerekirse yöntemde geliştirmeler yapılmasına olanak verecektir.

DENEL BÖLÜM

Yarı-ampirik PM3 "Self Consistent Reaction Field" (SCRF) hesapları, Rinaldi ve Hoggan tarafından geliştirilen GEOMOS. programı ile yapıldı (5). Her molekülün aksiyel ve ekvatoryal konformeri için bir girdi dosyası hazırlanıp programa verilir. Bu dosyada molekülün geometrisi her atomu atomu numarası, bağ uzunluğu, bağ açısı ve dihedral açısına göre tanımlayan Z-matris'i ile belirlenir. Program enerjili minimize ederek optimum geometriyi bulur. Gaz fazındaki hesaplar Şekil-2(a)'da görülen akış diyagramını izler (6).

Buna göre önce molekülün geometrisi Z-matris cinsinden okunur, ve kartezyen koordinatları bulunur. Daha sonra her atom çekirdeğine ait atomik orbitalleri bulur. Yarı-ampirik programlar atomik orbital enerjilerini belirtebilmek için önceden belirlenmiş parametreler kullanırlar. Bu parametreler bazı deneysel verileri içerirler. Daha sonra SCF hesapları tahmini moleküler orbitaller oluşturularak başlar. Yarı-ampirik programlar

tahminde bulunurken genellikle elektronları atomik orbitaller



(a)

(b)

Şekil-2. Yarı-ampririk hesaplamalar için tipik akış diyagramları
 (a) Gaz fazında, (b) Çözücülü ortamda

üzerine eşit olarak dağıtırlar, ve SCF hesapları bunu kullanarak iteratif işlemler sonucunda daha gerçekçi moleküler orbitalleri bulurlar. Geometrinin optimize olup olmadığını kontrol etmek amacıyla atomik kuvvetler de hesaplanır. Optimize olmuş geometri için atom yükleri ve dipol momenti hesaplanarak popülasyon analizi yapılır.

Gaz fazında elde edilen optimum geometri çözücülü ortamdaki hesaplara girdi olarak verilir. Çözücü ortamı içindeki moleküllerin enerjilerini hesaplayabilmek için Şekil-2(b)'deki akış diyagramı kullanılır(1). Önce izole edilmiş molekülün SCF hesapları sonucu optimize edilmiş geometrisine uygun bir "Van-der-Waals cavity" (bütün atom çekirdeklerini ve elektron bulutunu içine alacak olan hacim) bulunur ve buna en yakın "elipsoidal cavity" belirlenir. Daha sonra çözücü etkisi altındaki molekülün SCF hesapları yapılır ve sonuçta elde edilen yeni geometrinin "Van-der-Waals cavity"si belirlenerek daha önce bulunmuş olan "elipsoidal cavity"ye uyup uymadığı karşılaştırılır. Uymadığı takdirde yeni bir SCF hesabına başlanır, uyar ise buradan solvasyon enerjisi bulunmuş olur.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Her süstitüentün aksiyel ve ekvatoryal konformer enerjileri önce gaz fazında, daha sonra da apolar ve polar çözücülerde hesaplanmış olup elde edilen sonuçlar ve deneysel bulgular çizelge 1, 2, ve 3'te gösterilmiştir.

Çizelge 1. 2-Floro Sikloheksanon Etilen Ketal'in değişik çözücülerdeki konformasyonel enerjileri (kcal/mol)

Çözücü	Dielektrik sabiti	$\Delta E(e-a)$ teorik	$\Delta G(e-a)$ deneysel	Referanslar
Gaz fazı	-	-1.183	-	-
C ₆ D ₁₂	2.02	-	-0.52 (-0.80)	7
CCl ₄	2.24	-0.759	-0.47 (-0.77)	7
CD ₂ Cl ₂	8.93	-0.592	-0.239	8
CD ₃ CN	37.5	-0.535	-0.27 (-0.64)	7
(CD ₃) ₂ SO	46.68	-	-0.20 (-0.44)	7

Çizelge 2. 2-Kloro Sikloheksanon Etilen Ketal'in değişik çözücülerdeki konformasyonel enerjileri (kcal/mol)

Çözücü	Dielektrik sabiti	$\Delta E(e-a)$ teorik	$\Delta G(e-a)$ deneysel	Referanslar
Gaz fazı	-	-0.298	-	-
C ₆ D ₁₂	2.02	-	-0.89	7
CCl ₄	2.24	-0.137	-0.85 (-0.56)	7
CDCl ₃	4.81	-0.016	(-0.57)	8
CD ₃ CN	37.5	+0.121	-0.87 (-0.50)	7

Çizelge 3. 2-Metil Sikloheksanon Etilen Ketal'in değişik çözücülerdeki konformasyonel enerjileri (kcal/mol)

Çözücü	Dielektrik sabiti	Δ Dipol Moment (e-a) (Debye)	$\Delta E(e-a)$ teorik	$\Delta G(e-a)$ deneysel	Referans
Gaz fazı	-	-0.112	-0.468	-	-
CDCl ₃	4.81	-0.144	-0.578	-1.195	8
CD ₃ CN	37.5	-0.161	-0.629	-	-

Çizelge 4. Gaz Fazı PM3 hesaplarından elde edilen dipole momentler

Sübstütüent	Dipol Moment (Debye)	
	Aksiyel	Ekvatoryel
F	2.019	0.757
Cl	1.836	0.716
CH ₃	0.948	0.836

Deneyssel bulgular bu moleküllerin bir çok sübstütüentlerinin ekvatoryal konformerleri tercih ettiğini göstermektedir (9). Bu çalışmada elde edilen sonuçlar da deneyssel bulgulara kalitatif açıdan uymaktadır. Ekvatoryal konformerin diğerine kıyasla daha kararlı olmasının sebebi dipol momentinin az oluşudur. Elde edilen sonuçların büyük ölçüde moleküllerin dipol momentlerine bağlı olduğu görülmüştür. Çizelge 4'ten görüldüğü gibi polar sübstütüentlere sahip olan moleküllerin (F, Cl) aksiyel konformerlerinin dipol momentleri ekvatoryal konformerlerinden daha fazladır. Çünkü beşli halkanın dipolünün yönü ekvatoryal sübstütüentün dipolü ile zıt yönlere, aksiyel sübstütüentün dipolü ile ise aynı yönlere bakmaktadır. Bununla birlikte metil gibi apolar sayılan bir sübstütüent kullanıldığında aksiyel ve ekvatoryal konformerlerin dipol momentleri birbirine çok yakın değerlerdir ki burada büyük ölçüde beşli halkanın dipolünün etkisi görülmektedir.

2-F ve Cl Sikloheksanon etilen ketallerde (çizelge 1, 2) hem teorik hem de deneyssel sonuçlar çözücünün dielektrik sabiti arttıkça aksiyel konformere eğilimin arttığını göstermektedir. Bu eğilimin, sozkonusu moleküllerin aksiyel konformerlerinin daha polar olmaları ve polar çözücülerde stabilizasyona neden olmaları sonucu ortaya çıktığını söyleyebiliriz.

Metil takılmış ketalde çizelge 3 de görüldüğü gibi çözücünün polaritesi arttıkça ekvatoryel konformerin dipol momentü azalmakta ve buna paralel olarak da ekvatoryel konformerin enerjisi azalarak daha kararlı hale gelmektedir.

Sonuç olarak şunu söyleyebiliriz ki "cavity model"i konformasyonel dengelerin incelenmesinde oldukça faydalı bir yöntemdir. Elipsoidal şekli bu çalışmada kullanılan moleküller için iyi bir seçimdir.

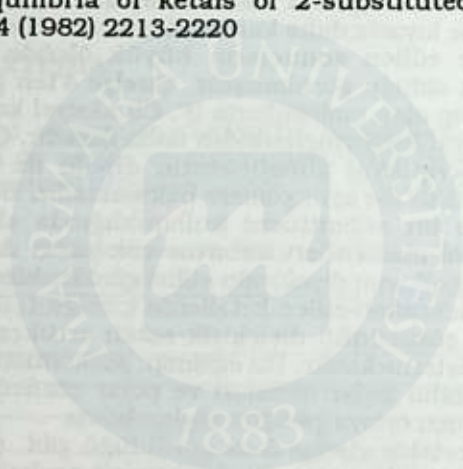
TEŞEKKÜR

Bu çalışma Boğaziçi Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiştir. (Proje no. 89EB0559)

KAYNAKLAR

1. J.L. Rivall, B. Terry, D. Rinaldi, M.F. Ruiz-Lopez, "Liquid state quantum chemistry: A cavity model", *J. Molecular Structure (Theochem)* 120 (1985) 387-400
2. J.G. Kirkwood, "Theory of solutions of molecules containing widely separated charges with special applications to zwitterions", *J. Chem. Phys.*, 2 (1934) 351-361
3. L. Onsager, "Electric moments of molecules in liquids", *J. Am. Chem. Soc.*, 58 (1936) 1486-1493
4. D. Rinaldi, M.F. Ruiz-Lopez and J.L. Rivall, "Ab initio SCF calculations on electrostatically solvated molecules using a deformable three axes ellipsoidal cavity" *J. Chem. Phys.*, 78 (1982) 834-838
5. GEOMOS, D. Rinaldi, P.E. Hoggan and A. Cartier, *QCPE* 584 (1982)

6. T. Klark, "A Handbook of Computational Chemistry", Wiley-Interscience Publ., Canada (1985) 99-101
7. I.G. Mursakulov, V.V. Samoshin, R.V. Binnatov, N.K. Kasumov, M.I. Pavolotski, N.S. Zefirov, "Stereochemical Investigations: XXXI. Effect of the structure of the ketal group on the conformational equilibrium in the ketals of 2-substituted cyclohexanones", *Zh.Org.Khim*, 19 (1983) 2527-2538
8. J.J. Wolff, G. Frenking, K. Harms, "The conformational behaviour of 10-substituted spiro[4.5]decanes", *Chem. Ber.*, 124 (1991) 551-561
- 9 I.G. Mursakulov, M.M. Guseinov, N.K. Kasumov, N.S. Zefirov, V.V. Samoshin, and E.G. Chalenko, "Stereochemical Studies. XXVI. Conformational equilibria of ketals of 2-substituted cyclohexanones", *Tetrahedron* , 38:14 (1982) 2213-2220



MARMARA
ÜNİVERSİTESİ

[Br(PMe₃)₃Rh(OCH₂CMe₂)] KOMPLEKSİNİN ELEKTRONİK YAPISI

C. ÜNALEROĞLU*, M.J. CALHORDA**

* Hacettepe Üniversitesi Kimya Bölümü, Beytepe 06532, ANKARA

** Centro de Tecnologia Química e Biológica, Apart. 127, 2780 Oeiras and Instituto Superior Técnico, LISBOA, PORTUGAL

ELECTRONIC STRUCTURE OF [Br(PMe₃)₃Rh(OCH₂CMe₂)]

SUMMARY

It is suggested that metallaioxetanes are often invoked as crucial intermediates in metal-catalyzed oxidations, epoxide synthesis and metathesis reactions(1,2). The only metallaioxetans that have been prepared and characterized as yet are those stabilized with a cyano group or a carbonyl group attached to the metallacycle. Milstein and coworkers reported the synthesis and x-ray structural characterization of a new rhodium metallacycle [Br(PMe₃)₃Rh(OCH₂CMe₂)] [I] (3). In this work, Extended Hückel Molecular calculations were done on a model compound [Br(PH₃)₃Rh(OCH₂CH₂)] [III] and the electronic structure and properties of I were investigated.

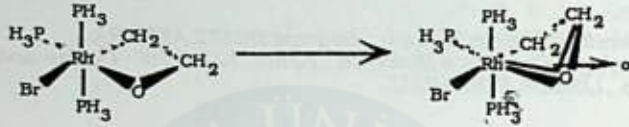
ÖZET

Metalaoksetan bileşikleri, organik bileşiklerin metal katalizli oksidasyonunda, olefinlerden epoksit eldesinde ve metatez reaksiyonlarında ortaya çıktığı öne sürülen çok önemli araürünlerdir(1,2). Bugüne kadar ancak siyano gurupları veya dörtlü halkada ki karbonille kararlı hale getirilen bazı metalaoksetan bileşikleri sentezlenmiştir. Milstein ve çalışma arkadaşları yeni bir Rodyumoksetan, Br(PMe₃)₃Rh(OCH₂CMe₂)] [I], bileşiğinin sentezini gerçekleştirmiş ve X-ışınları analiziyle yapısını aydınlatmışlardır (3). Bu çalışmada bir model bileşik olarak seçilen [Br(PH₃)₃Rh(OCH₂CH₂)] [III] kompleksi üzerine Extended Hückel Moleküler hesaplamaları yapıldı ve I nolu kompleksin elektronik yapısı ve özellikleri incelendi.

GİRİŞ

Sharpless'in metal bileşikleri üzerinden oksijen transferini açıklayan klasik mekanizmaya alternatif olarak metalaoksetan mekanizmasını ileriye sürmesiyle bu yapı birçok kimyacı tarafından çok hızlı olarak kabul edilmiş ve metal katalizli oksijen transferini içeren birçok tepkimenin açıklanmasında kullanılmıştır(4). Fakat araürün olarak metalaoksetan bileşiklerinin yapısını destekleyen çok fazla veri bulunmamaktadır. Sadece kararlı hale getirilmiş çeşitli siyano substituentleriyle [L₂Pd(OCOCH₂)] gibi bazı kompleksler [(PH₃)₂Pt(CN)₂C(CN)₂O] veya [L₂Pd(OCOCH₂)] gibi bazı kompleksler sentezlenmiştir(5). Milstein ve arkadaşları RhCl(PMe₃)₃' a BrCH₂CMe₂OH'in yükseltgen katılmasıyla BrCl(PMe₃)RhCH₂C(CH₃)₂OH kompleksini sentezlemişlerdir(3). Katılma seçimli olarak C-Br bağına olmuştur. Hidrojen eliminasyonu ile oluşan I nolu kompleksin yapısı X-ışınlarıyla aydınlatılmış ve çok ilginç olan şu sonuç bulunmuştur:

Metalaoksetan bileşiğindeki ORhC atomlarının oluşturduğu düzlem ile OCC atomlarının oluşturduğu düzlemler arası açı 0.3° dir. Bu ise hata sınırları arasında kalan bir değerdir. Sonuç olarak rodyumoksetanın yapısı düzlemseldir. Daha önce sentezlenmiş olan platinoksetan bileşiğinin ise 30° lik bükülmüş yapısının daha kararlı olduğu bulunmuştur. Bu çalışmada I nolu bileşiğin yapısının neden düzlemsel olduğunun açıklanması amaçlanmış ve bu kompleksin düzlemsel ve bükülmüş (şekil.1) geometrisinin elektronik yapısı incelenmiştir.



Şekil 1.

YÖNTEM

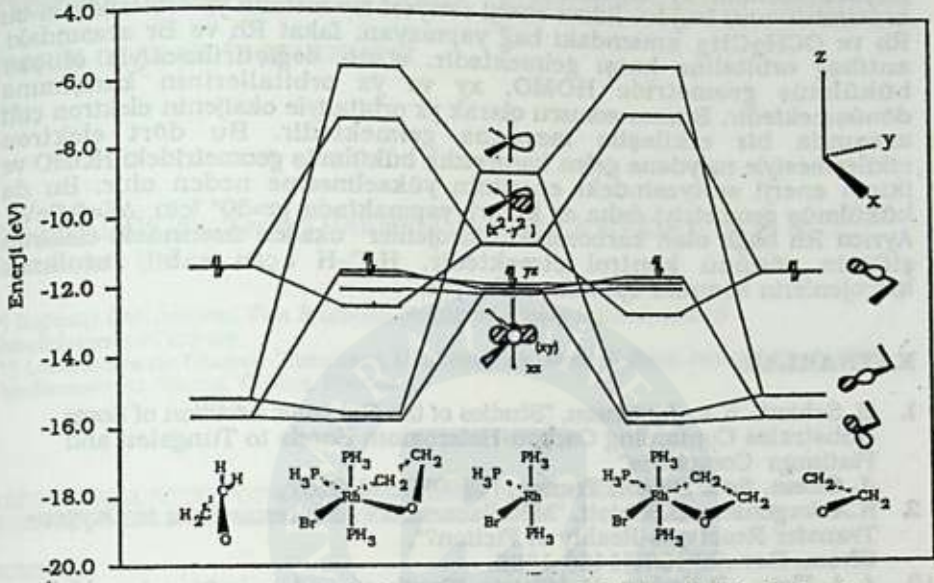
Çalışmada yarı deneysel hesaplama yöntemi olan "Extended Hückel-MO" kullanılarak $[(\text{PH}_3)_3\text{BrRh}(\text{OCH}_2\text{CH}_2)]$ kompleksinin yapısı incelenmiştir. Hesaplama kullanılan parametreler Tablo 1 de verilmektedir. Molekülün geometrisini tanımlamak için kullanılan değerler ise I nolu bileşiğin X-ışınları analiz sonuçlarından elde edilmiştir.

Tablo 1: EHM hesaplamalarında kullanılan parametreler

Atom	Orbital	H_{ii}^1 (eV)	ζ_{i1}	(C1)	ζ_{i2}	(C2)
Rh	5s	-8.09	2.135			
	5p	-4.57	2.10			
	4d	-12.50	4.29	0.5807	1.97	0.5685
Br	4s	-22.07	2.588			
	4p	-13.10	2.131			
P	3s	-18.6	1.75			
	3p	-14.0	1.30			
O	2s	-32.3	2.275			
	2p	-14.8	2.275			
C	2s	-21.4	1.625			
	2p	-11.4	1.625			
H	1s	-13.6	1.3			

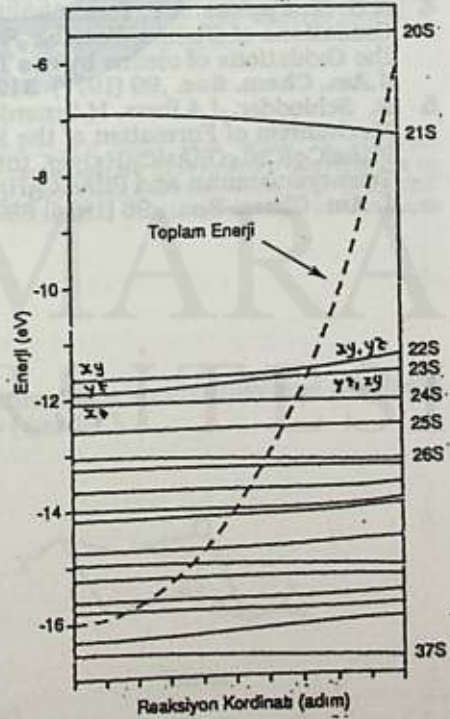
SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Düzlemsel geometrinin neden daha kararlı olduğunu açıklamak için öncelikle düzlemsel yapı incelenmiş ve daha sonra α 'nın 0° - 50° ye kadar 5° lik adımlarla değiştirilmesiyle hesaplama yapılmıştır. Şekil 2 deki moleküler orbital diyagramını Rh(PH₃)Br ile OCH₂CH₂ ligandı arasındaki etkileşmeyi göstermektedir. Şeklin sağ tarafında xy düzlemine sahip metalaoksetan, sol tarafında ise $\alpha=30^\circ$ olan metalaoksetan bileşiği görülmektedir. Bu parçalar arasında iki önemli bağlanma vardır. Bunlar sırasıyla karbonun (HOMO) ve oksijenin elektron çiftlerinin (ikinci HOMO) moleküler orbital diyagramının ortasında gösterilen d^0 ML₄ yapısındaki metallerin boş olan x^2-y^2 ve sp hibrit orbitallerine verilmesiyle meydana gelen



Şekil 2. Düzlemsel ve bükülmüş yapının moleküler orbital diagramı.

bağlardır. Her iki geometri arasında çok büyük bir farklılık görülmektedir. Önemli olan başka bir etkileşim ise oksijenin diğer elektron çiftiyle (HOMO'dan sonraki ikinci enerji seviyesi) metalin dolu olan xy orbitalleri (HOMO) arasında olmakta ve bu dört elektronun etkileşmesi bir kararsızlığa neden olmaktadır. Düşük simetriye sahip olan rodyumoksetanda α 'nın değişmesiyle ve simetri düzleminin (xy) kaybolmasıyla molekül orbitalleri karışmakta bu da moleküler orbital analizini zorlaştırmaktadır. Şekil 3 de düzlemsel yapıdan bükülmüş yapıya geçiş sırasındaki toplam enerji değişimi ve Walsh diyagramı görülmektedir. α 'nın küçük değerleri için toplam enerji fazla değişmemektedir. Şekil 3 de görüldüğü gibi düzlemsel geometriden bükülmüş rodyumoksetana geçiş sırasında alt enerji seviyeleri etkilenmemektedir. Önemli değişiklik HOMO ve ikinci enerji seviyesinde olmaktadır. Düzlemsel geometrideki HOMO



Şekil 3. α 'nın fonksiyonu olarak toplam enerjinin değişimi ve Walsh diyagramı.

başlıca metalin xy orbitallerinden oluşmaktadır ki bu Rh ve oksijen arasındaki anti bağıdır. İkinci enerji seviyesi ise metalin yz orbitalidir ki bu Rh ve OCH_2CH_2 arasındaki bağ yapmayan; fakat Rh ve Br arasındaki antibağ orbitaline karşı gelmektedir. α 'nın değiştirilmesiyle oluşan bükülmüş geometride HOMO, xy ve yz orbitallerinin karışımına dönüşmektedir. Bunun sonucu olarak yz orbitaliyle oksijenin elektron çifti arasında bir etkileşim meydana gelmektedir. Bu dört elektron etkileşmesiyle meydana gelen kararsızlık bükülmüş geometrideki HOMO ve ikinci enerji seviyesindeki enerjinin yükselmesine neden olur. Bu da bükülmüş geometriyi daha az kararlı yapmaktadır ($\alpha=30^\circ$ için $\Delta E=0.9\text{eV}$). Ayrıca Rh bağlı olan karbondaki hidrojenler oksijen üzerindeki elektron çiftinin yönünü kontrol etmektedir. H-C-H açısı sabit tutularak hidrojenlerin konumu optimize edilmiştir.

KAYNAKLAR

1. B. Schlott, K.A. Jorgensen, "Studies of the Oxidative Addition of Some Substrates Containing Carbon-Heteroatom Bonds to Tungsten and Platinum Complexes", *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, (1989) 2099-2107.
2. K.A. Jorgensen, B. Schlott, "Metallaioxetanes as Intermediate in Oxygen-Transfer Reactions-Reality of Fiction?", *Chem. Rev.*, 90(1990)1483-1506.
3. A. A. Zlota, F. Frolow, D. Milstein, "Synthesis and x-ray Structure of a Simple Metallaioxetane. Metal-Based Selectivity in Oxidative Addition", *J. Am. Chem. Soc.*, 112(1990) 6411-6413.
4. K.B. Sharpless, A.Y. Teranishhi, J.E. Backvall, "Chromyl Chloride Oxidations of Olefins. Possible Role of Organometallic Intermediates in the Oxidations of olefins by oxo Transition Metal Species", *J. Am. Chem. Soc.*, 99 (1977) 3120-3128.
5. R. Schlodder, J.A. Ibers, M. Lenarde, M. Graziniani, "Structure and Mechanism of Formation of the Metallooxacyclobutane Complex $\text{Pt}(\text{As}(\text{C}_2(\text{CN})_4\text{O})(\text{As}(\text{C}_6\text{H}_5)_3)_2$, the Product of the Reaction between Tetracyanooxiran and $\text{Pt}(\text{As}(\text{C}_6\text{H}_5)_3)_4$ ", *J. Am. Chem. Soc.*, 96 (1974) 6893-6900.

5-SÜBSTİTÜYE-1,3-DİOKSAN'LARDA KONFORMASYONEL DENGENİN TEORİK OLARAK İNCELENMESİ

Gökşin APAYDIN, Tereza VARNALI, Viktorya AVİYENTE (*) ve M. F. Ruiz-Lopez (**)

(*) Boğaziçi Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü 80815
Bebek-İstanbul-Türkiye

(**) Laboratoire de Chimie Théorique, Université de Nancy I, Boite Postale 239, 54500
Vandoeuvre-les-Nancy, Cedex, France

THEORETICAL STUDY OF CONFORMATIONAL EQUILIBRIUM OF 5-HETEROSUBSTITUTED-1,3-DIOXANES

SUMMARY

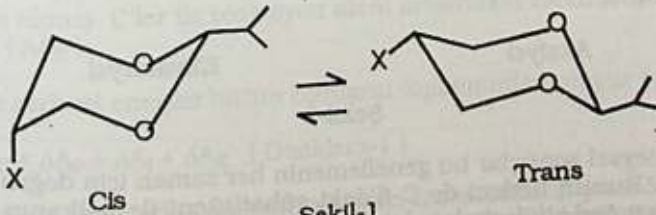
Conformational equilibria of 1,3-dioxanes with fluoro, methyl and methoxy substituents at C-5 has been studied by semi-empirical quantum chemical methods, both at gaseous phase and in the solvents with different dielectric constants. The solvent effect study has been done by the implementation of the "cavity model". Calculated values are in good agreement with the experimental values.

ÖZET

1,-3-dioksanlarda konformasyonel denge C-5'e bağlı flor, metil ve metoksi sübstitüentleri ile yarı-ampirik kuantum kimyasal metodlar kullanılarak, gaz fazında ve polaritesi farklı değişik çözücülerde çalışılmıştır. Çözücü etkisi hesabında "cavity model" kullanılmıştır. Yapılan hesaplamalar sonucu elde edilen bulgular, deneysel bulgularla uyum halindedir.

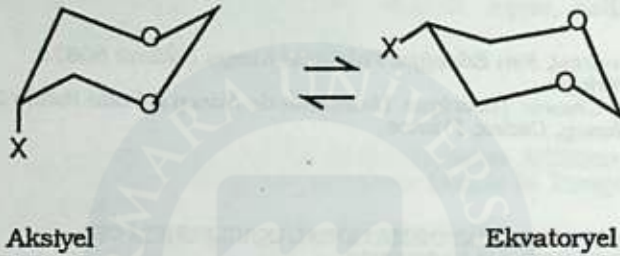
GİRİŞ

Literatürde C-5'e bağlı değişik sübstitüentlerle konfigürasyonel dengenin deneysel çalışılmalarına rastlanmaktadır (Şekil-1).



Deneysel çalışmalarda 1,3-dioksanların 2-izopropil türevlerinin cis trans izomerleri ayrı ayrı sentezlenip spektraları çekilir, dolayısıyla herbir izomerin enerjisi deneysel olarak saptanabilir.

C-2'deki bu sübstütüentin proton NMR spektrasiyla yapılan çalışmalarda H-4, H-5 ve H-6'ya, C-13 NMR spektrasiyla yapılan çalışmalarda C-4, C-5 ve C-6'ya ve bu karbonlara bağlı sübstütüentlerin sinyaline bir etkisi olmadığı tespit edilmiştir (1). Dolayısıyla Şekil-1'deki konfigürasyonel dengenin deneysel analizi ve Şekil-2'deki konformasyonel dengenin teorik olarak yapılan analizi sonucu elde edilen değerlerin karşılaştırılması mümkündür.

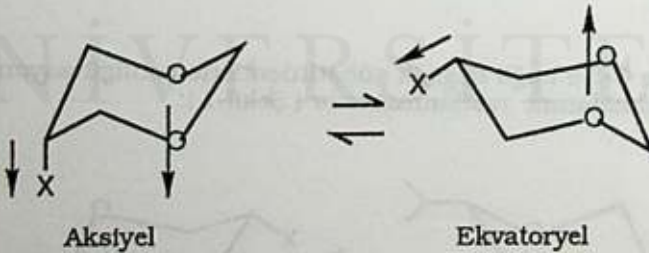


Şekil-2

5-sübstütüye-1,3-dioksanların konformasyonel dengesinden bahsederken şöyle bir genelleme yapılabilir (2):

- Şekil-1'deki X apolar bir sübstütüent ise bu sübstütüent ile halkadaki oksijenin elektron çiftleri arasındaki sterik nedenlerden doğan itme kuvvetinden dolayı ekvatoryal konformeri daha karardır.

- Şekil-2'deki X polar bir sübstütüent ise halkanın dipolü ile aksiyel sübstütüentin dipolü arasındaki itme kuvveti ekvatoryal sübstütüentle olduğundan daha fazladır (Şekil-3). Sübstütüent ile halkadaki oksijenin elektron çiftleri arasındaki sterik nedenlerden doğan itme kuvveti ile dipol-dipol itme kuvveti aynı yönde etki edeceğinden dolayı ekvatoryel konformer apolar bir sübstütüente göre daha da karardır. Eğer bu denge çözücü içerisinde düşünülürse çözücünün polaritesi arttıkça polaritesi aksiyele göre düşük olan ekvatoryal konformerin kararlılığı azalacaktır.



Şekil-3

Fakat deneysel sonuçlar bu genellemenin her zaman için doğru olmadığını göstermiştir. Bunun nedeni de C-5'deki sübstütüent ile halkanın oksijenleri arasındaki bazı özel etkileşimler olabilir.

Hesaplamalar özellikle bu genellemeye uymayan bazı sübstütüentler için de yapılmıştır. Zamandan tasarruf için hesaplarda yarı-ampirik kuantum

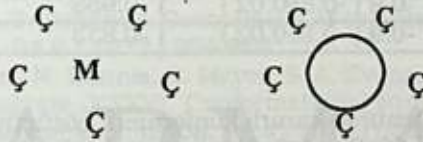
kimyasal yöntemler kullanılmıştır. Gaz fazındaki denge çalışmaları MOPAC, çözücü içerisindeki denge çalışmaları GEOMOS yazılımıyla, PM3 metodu kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

DENEL BÖLÜM

Hesaplamlarda önce gaz fazı için moleküllerin aksiyel ve ekvatoryel olmak üzere her iki konformerinin tüm geometrik parametreleri PM3 metodu ile minimize edilir (3). Sonra bu noktalarda çözücü etkisi hesaba katılarak tekrar enerji minimizasyonu yapılır.

Bu işlemde çözücü etkisinin de hesaba katılması istenirse "cavity model" uygulanır. Çözününi çevreleyen çözücü genellikle tek bir özelliğiyle hesaba katılır. Bu çalışmada da çözücü dielektrik sabiti ile hesaplarda yer almış, diğer özellikleri ihmal edilmiştir (4).

Adı geçen modelde her bir çözünen molekülünün (M) etrafının pek çok sayıda çözücü molekülleri (Ç) ile sarıldığı varsayılır (Şekil-4a). Bu sistem yani M ve Ç'ler üzerinde çalışılan modeli oluşturmaktadır. Amaç M'yi etrafındaki Ç'ler tarafından pertürb edilen kuantum sistem gibi varsaymaktır. Bu pertürbasyon enerjisini hesaplamak için M'nin Ç'lerin ve kendi geometrisinin üzerinde hiçbir etki yapmadan ortamdan uzaklaştırıldığı ve geride kendi geometrisi tarafından belirlenen boşluk bıraktığı varsayılır. Daha önce M tarafından doldurulan hacim şimdi boştur, ve "çözünen boşluğu" diye adlandırılır (Şekil-4b). Bu boşluğun varlığı nedeniyle "reaksiyon alanı" denilen bir elektrik alanı oluşmuştur. Bu reaksiyon alanı M üzerindeki yük dağılımını etkiler dolayısıyla Ç'lerin polarize olmasına neden olur.



Şekil-4a

Şekil-4b

Bu işlemi yani çözünme enerjisini dört kısımda inceleyebiliriz (5):

- 1-Çözücü içerisinde boşluğun oluşturulması (ΔA_C)
- 2-Ç'lerin M etrafında polarize olması (ΔA_P)
- 3-M'nin reaksiyon alanı tarafından etkileşim yoluyla polarize olması (ΔA_I)
- 4-Polarize olmuş Ç'ler ile reaksiyon alanı arasındaki elektrostatik etkileşim (ΔA_E).

Çözünme serbest enerjisi bütün bunların toplamından oluşur (ΔA_T).

$$\Delta A_T = \Delta A_C + \Delta A_P + \Delta A_I + \Delta A_E \quad (\text{Denklem-1})$$

Bu çalışmada üzerinde çalışılan çözünen molekülünün yani 5-sübstütüye 1,3-dioksanların geometrisi göz önünde bulundurularak, boşluğun elipsoidal bir geometri belirlediği düşünülmüş ve hesaplarda bu model uygulanmıştır (6).

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Yukarıda bahsedilen yöntemlerle flor, metil ve metoksi sübstitüye 1-3-dioksanların yapılan teorik analizi sonucunda Şekil-2'deki konformasyonel dengelerinin entalpi farkı (ΔH_{e-a}) hesaplanmış, ve deneysel yöntemlerle edinilmiş olan Gibbs serbest enerji farkları ile (ΔG_{e-a}) karşılaştırılmıştır. Bu dengelerin entropi farkı (ΔS_{e-a}) yaklaşık olarak sıfır kabul edildiği için Denklem-2'den entalpi farkının Gibbs serbest enerji farkına eşit olduğu düşünülmüştür (7).

$$\Delta G = \Delta H - T \Delta S \quad (\text{Denklem-2})$$

5-metil sübstitüentinin çalışılan tüm çözücülerde ekvatoryel izomerinin daha kararlı olduğu ve bu kararlılıkta çözücüye bağlılık göstermediği görülmüştür (Çizelge-1).

Çizelge-1. 5-metil-1,3-dioksan için enerji değerleri

Çözücü	ϵ	ΔG (e-a) kkal/mol (deneysel)	ΔH (e-a) kkal/mol (teorik)	Kaynaklar (deneysel)
Gaz fazında	—	—	0.015	—
Dietileter	4.33	-0.9 (-0.8±0.02)	-0.958	7 (8)
Asetonitril	37.5	-0.9 (-0.8±0.02)	-0.833	7 (8)

5-metoksi sübstitüentinin kararlı konformeri çözücüye göre değişmektedir (Çizelge-2). Polaritesi düşük çözücüler içerisinde ekvatoryel konformeri tercih etmekte, çözücünün polaritesi arttıkça bu tercih azalmakta, hatta polaritesi çok yüksek olan çözücülerde aksiyel konformeri daha kararlı duruma gelmektedir.

Çizelge-2. 5-metoksi-1,3-dioksan için enerji değerleri

Çözücü	ϵ	ΔG (e-a) kkal/mol (deneysel)	ΔH (e-a) kkal/mol (teorik)	Kaynaklar (deneysel)
Gaz fazında	—	—	-1.568	—
CCl_4	2.24	-0.9,-0.89	-0.348	1, 2, 7
Dietileter	4.33	-0.83	0.01	1, 2, 7
Asetonitril	37.5	0.01	0.467	1, 2, 7

Flor sübstitüenti polar bir sübstitüentten beklenenin aksine aksiyel konformeri tercih etmektedir (Çizelge-3). Bu tercih halkanın oksijenleri ile aksiyel florun "gauche" etkileşiminden doğan çekim kuvvetinden olabilir. Çözücünün polaritesinin artmasıyla bu kararlılık dahada artmaktadır.

Çizelge-3. 5-floro-1,3-dioxan için enerji değerleri

Çözücü	ϵ	ΔG (e-a) kkal/mol (deneysel)	ΔH (e-a) kkal/mol (teorik)	Kaynaklar (deneysel)
Gaz fazında	—	—	-0.770	—
CCl ₄	2.24	0.36	0.571	1, 2
Dietileter	4.33	0.62±0.04	0.958	1, 2, 3
Asetonitril	37.5	1.22±0.04	1.482	2

Yapılan teorik çalışma sonucu elde edilen bulgular ile deneysel bulguların flor ve metoksi sübstitüentleri için kalitatif, metil sübstitüentli için kalitatif aynı zamanda sayısal olarak uyum içerisinde olması "elipsoidal cavity" modelinin çözücü etkisinin çalışılmasında uygun bir metod olduğunu göstermektedir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma Boğaziçi Üniversitesi araştırma fonu (89EBO559 numaralı proje) tarafından desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

- (1) R. J. Abraham, H. D. Banks, E. L. Eliel, O. Hofer and M. K. Kaloustian, "Conformational analysis. XXI. Conformational equilibria in 5-heterosubstituted 1,3-dioxanes. Comparison of calculated and experimental solvent effect", *JACS*, **94** 6 (1972) 956-965.
- (2) M. K. Kaloustian, N. Dennis, S. Mayer, S. A. Evans, F. Alcudia, E. L. Eliel, "Conformational analysis .XXXVI. Conformational equilibria of 1,3-dioxanes with polar substituents at C-5", *JACS*, **98** 4 (1976) 956-965.
- (3) T. Clark, "A handbook of computational chemistry". A Wiley-Interscience Publ., Canada (1985) 93-101.
- (4) J. L. Rivall, B. Terryn, D. Rinaldi and M. F. Ruiz-Lopez, "Liquid state quantum chemistry: A cavity model" *J. Mol. Structure*, **120** (1985) 387-400.
- (5) D. Rinaldi, M. F. Ruiz-Lopez and J. L. Rivall, "Ab Initio SCF calculations on electrostatically solvated molecules using a deformable three axes ellipsoidal cavity", *J. Chem. Phys.*, **78** 2 (1983) 834-838.
- (6) N. Ruguini, J. L. Rivall, "Electrostatic solvent effect and acidities of aliphatic alcohols in DMSO Solution", *J. Mol. Structure*, **166** 319 (1988) 319-323.
- (7) E. L. Eliel and M. K. Kaloustian, "Configurational preferences of 5-hetero-substituents in 2-izopropyl-1,3-dioxans", *Chem. Comm.*, (1970) 290.
- (8) N. L. Allinger, D. Hindman and H. Höngig, "Conformational analysis. 125. The importance of twofold barriers in saturated molecules" *JACS*, **99** (1977) 3282-3284

Tablo 2- 2-İlk ve 3-İkinci Dönemlerin Ortalama Değerleri

Değişken	1. Dönem	2. Dönem	3. Dönem
Ortalama	1.00	1.00	1.00
Standart Sapma	0.00	0.00	0.00
Minimum	0.00	0.00	0.00
Maximum	1.00	1.00	1.00

Yapılan analizler sonucunda, 1994 yılında yapılan araştırmaya göre, öğrencilerin üniversite hayatlarındaki en önemli amaçları, "akademik başarı" ve "iş bulma" olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, öğrencilerin üniversite hayatlarındaki en önemli amaçları, "akademik başarı" ve "iş bulma" olarak belirlenmiştir. Bu sonuçlar, öğrencilerin üniversite hayatlarındaki en önemli amaçları, "akademik başarı" ve "iş bulma" olarak belirlenmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma için yardımcı olan ve destek veren tüm arkadaşlarıma teşekkür ederim.

(1) E. K. Kocaoğlu, H. O. Kocaoğlu, M. E. Kocaoğlu ve M. E. Kocaoğlu, "Üniversite Öğrencilerinin Akademik Başarılarına Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi", *Yükseköğretim Araştırmaları*, 1994, 1(1), 1-10.

(2) M. E. Kocaoğlu, H. O. Kocaoğlu, E. K. Kocaoğlu ve M. E. Kocaoğlu, "Üniversite Öğrencilerinin Akademik Başarılarına Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi", *Yükseköğretim Araştırmaları*, 1994, 1(1), 1-10.

(3) D. Kocaoğlu, H. O. Kocaoğlu, E. K. Kocaoğlu ve M. E. Kocaoğlu, "Üniversite Öğrencilerinin Akademik Başarılarına Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi", *Yükseköğretim Araştırmaları*, 1994, 1(1), 1-10.

(4) M. E. Kocaoğlu, H. O. Kocaoğlu, E. K. Kocaoğlu ve M. E. Kocaoğlu, "Üniversite Öğrencilerinin Akademik Başarılarına Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi", *Yükseköğretim Araştırmaları*, 1994, 1(1), 1-10.

(5) M. E. Kocaoğlu, H. O. Kocaoğlu, E. K. Kocaoğlu ve M. E. Kocaoğlu, "Üniversite Öğrencilerinin Akademik Başarılarına Etki Eden Faktörlerin İncelenmesi", *Yükseköğretim Araştırmaları*, 1994, 1(1), 1-10.

ALEV İYONLAŞMA DETEKTÖRÜ (F.I.D.) İLE n-PENTANIN RESPONSE FAKTÖRÜNÜN İNJEKSİYON METODUYLA TAYİN EDİLMESİ

A. DİNÇER BEDÜK (*) ve Mustafa PEHLİVAN (**)

(*) Selçuk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Konya.

(**) Selçuk Üniversitesi, Eğitim Fakültesi, Kimya Anabilim dalı, Konya

THE DETERMINATION OF RESPONSE FACTOR'S n-PENTAN WITH FLAME IONIZATION DETECTOR (F.I.D.)

SUMMARY

In this study, continuous quantitative analysis of one of the volatile organic solvent, n-pentan in gas phase, were determined by Flame Ionization Detector . (F.I.D.) For this, as a first step, the response factor of n-pentan was calculated by injection method.

During the process the flame ionization detector has been used in the experiment pictured out various picks depending on the volatile organic matters, accordingly, the instrument was firstly calibrated with a known gas and then, the response factor of the organic solvent of which quantitative analysis wanted was found in accordance with the calibration gas.

ÖZET

Bu çalışmada gaz fazındaki uçucu organik çözümlerden n-Pentan'ın sürekli kantitatif analizleri Alev İyonlaşma Detektörü (F.I.D.) ile yapıldı. Bunun için n-pentan'ın response faktörü önceden injeksiyon metoduyla hesap edildi.

Deneyde, kullandığımız Alev İyonlaşma Detektörünün, proses esnasında uçucu organik maddelerin özelliklerine bağlı olarak değişik pikler vermesi nedeniyle, alet önce belirli bir gaz ile kalibre edilmiş ve daha sonra kantitatif tayini yapılacak olan organik çözümlerin kalibre gazına göre response faktörü bulunmuştur.

GİRİŞ

Fosillerin yakıt olarak kullanılması, sanayi fırınları, atık çöplerin yakılması, kimya endüstrisi, kuru temizleme sistemleri, taşıtlardan çıkan yanmamış gazlar v.b. durumlarda atmosfere birçok hidrokarbon atıkları yayılmaktadır. Bu uçucu organik maddelerin kantitatif olarak konsantrasyonlarının sürekli bir şekilde tayini, sanayi, çevre sağlığı ve araştırma için gereklidir. Böylece atmosfere sürekli olarak verilen emisyon konsantrasyonlarının o ülkedeki yahut dünya standartlarındaki alınan kararlarla belirleniminin maksimum miktarlara uyup uymadığı kontrol edilebileceği gibi, bu emisyonları en aza indirebilmek için gerekli gaz temizleme sistemlerinin projelendirilmesinde de fayda yönünden büyük bir katkı sağlanmış olacaktır.

Alev İyonlaşma Detektörü (Flammen Ionisations Detektör) ile gaz fazındaki toplam hidrokarbon konsantrasyonlarının sürekli olarak kantitatif tayinini yapmak mümkündür. FID, proses esnasında çeşitli organik maddelerin özelliklerine göre değişik pikler verir. Bunun için FID'nin önce

belirli bir gaz ile kalibre edilmesi ve sonradan kantitatif tayini yapılacak gazın, kalibre gazına göre response faktörünün tayin edilmesi gerekir.

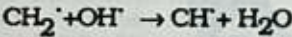
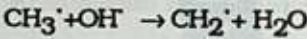
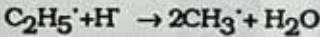
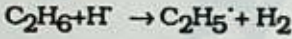
FID'nin konsantrasyon ölçüm aralığı 0-100000 ppm dir. Çalışma prensibi ise aynı anda oluşan iki prosestir.

Bu prosesler:

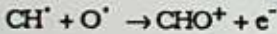
- Alevde iyonların oluşturulması
- Oluşan iyonların toplanmasıdır.

Alev iyonlaşma Detektörünün göstergesi, iyonize edilmiş karbon sayısına karşılık gelen bir ifadeyi gösterir. Bu ifadenin efektif değeri faktör hesabı ile yapılır. Buradan anlaşılacağı gibi, birçok karbon atomunun iyonlaşması, ancak hidrokarbon moleküllerinin kraking ürünlerine ayrılması ile olur, bu ürünlerin herbiri bir karbon atomu ve sübstitüentlerini içerir. Kraking prosesi FID alevinin piroliz bölgesinde oluşur. Bu olayın mekanizması genelinde hidrojen atomları ile açıklanabilir (1,2).

Aşağıdaki kraking reaksiyonları bu olaya birer örnektir.



Bu düşüncelerin ışığından giderek kimsiyal iyonlaşmanın iyon oluşumu mekanizması şöyle açıklanabilir (2,3)



MATERYAL VE METOD:

Kullanılan Cihazlar

- 1- Alev iyonlaşma detektörü: FID-123, TESTA GmbH. München.
- 2- Kayıt edici: Servogar 120, Bachofer Laboratuariumsgerate. Reutlingen.
- 3- Planimetre: Haff Planimeter.
- 4- Gaz sayacı: Hermann Pipersberg J. R. GmbH. Remscheid.
- 5- Gaz aktarıcı: Desaga. Heidelberg
- 6- Mikrolitre injektör: Hamilton CO, Reno. Nevada.

Kullanılan Kimsiyal Maddeler:

- 1- n-Pentan: E. Merck. Darmstadt.
- 2- Kalibre gazı (Azot içerisinde 94 ppm Propan), Sıfır gazı (Azot), yanma gazı (Hidrojen), sentetik hava: Fa. Messer. Griesheim GmbH.

METOD

Bu çalışmada "İnjeksiyon metodu" kullanılmıştır. Burada FID, Sıfır gazı (N₂) ve kalibre gazı (Azot içerisinde 94 ppm Propan) ile kalibre edildikten sonra (4, 5, 6) response faktörünü bulmak istediğimiz organik çözücünden mikrolitre injektör ile belirli hacimlerde FID nümune giriş hortumuna injekte edil-

lır ve kayıt edicide bu hacimlere karşılık gelen pikler gözlenir. Bunu takiben pik alanları plânimetre ile ölçülür. İnjekte edilen organik çözücü hacimlerine karşılık gelen pik alanlarından hesaplamalar yoluyla bu hacimlerine ilişkin konsantrasyon değerleri ppm-mg/m³ olarak bulunur.

Ayrıca injekte edilen organik çözücü hacimlerine karşılık gelen konsantrasyon değerleri ppm-mg/m³ teorik olarak hesaplanır. Pik alanlarından hesaplanarak bulunan konsantrasyonla, teorik olarak hesaplanan konsantrasyondan gidilerek organik çözücünün kalibre gazı olarak kullanılan Propan'a ilişkin pesponse faktörü hesap edilir. (7)

DENEYİN YAPILIŞI

n-Pentan'ın Response Faktörünün İnjesiyon Metoduyla tayını:

Alev İyonlaşma Detektörü kalibre edildikten sonra FID nümune giriş hortumuna 1 µL, 1.5 µL ve 2 µL n-Pentan mikrolitre injektör ile üçer defa ayrı ayrı injekte edilir. Kayıt edicide gözlenen pikler plânimetre ile ölçülür. Böylece injekte edilen n-Pentan hacimlerine karşılık gelen ortalama pik alanları hesaplanır. Daha sonra bu pik alanlarından ve injekte edilen n-Pentan hacimlerinden gidilerek, n-Pentan'ın kalibre gazı Propan'a göre ortalama response faktörü grafik yoluyla bulunur. Burada 1 µL n-Pentan piklerinin ölçülmesi ve ortalama toplam alana ilişkin Response faktörünün hesaplanması ve sonuçları örnek olarak incelenmiş, 1.5 µL ve 2 µL n-Pentan hacimleri için ise sadece deney sonuçları ve grafikleri verilmiştir.

Ölçümler ve Deney Sonuçları:

a) 1 µL n-Pentan Piklerinin Ölçülmesi ve Ortalama toplam alana ilişkin Response Faktörünün Bulunması (Şekil 1)

- FID ölçme aralığı : 5(0-100000 ppm)

- Tutulma zamanı : 2 sn.

- Ortalama toplam alan : 4.10 cm²

Hesaplama : 1 µL n-Pentan için ölçülen toplam ortalama pik alanına eşdeğer Propan.

$$25 \text{ cm} \times 2 \text{ cm} = 50 \text{ cm}^2 = 100000 \text{ ppm Propan}$$

$$4 \text{ cm}^2 \times 1/50 \text{ cm}^2 \times 100000 \text{ ppm} = 8200 \text{ ppm}$$

Nümune havası akış hızı: 1.2 lt/dak.

Tutulma zamanı 2 sn için bu hacim,

$$1.2 \text{ lt/dak} \times 1 \text{ dak}/60 \text{ sn} \times 2 \text{ sn} = 0.04 \text{ lt}$$

$$C_{n-Pen.} = 1 \text{ µL}/0.04 \text{ lt} = 25 \text{ µL/lt}$$

$$Q_{n-Pen.} = 0.63 \text{ g/cm}^3 = 630 \text{ mg/cm}^3$$

$$M_{n-Pen.} = 72.15 \text{ g/mol}$$

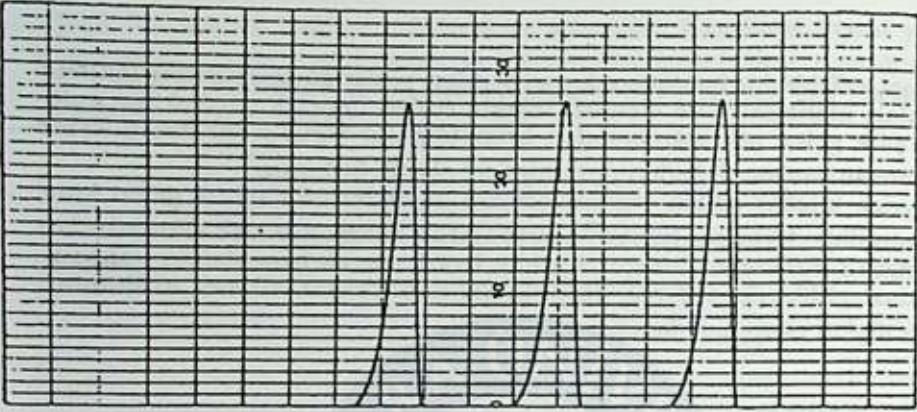
$$C_{n-Pen.inj} = 25 \text{ µL/lt} \times 630 \text{ mg/cm}^3 = 15750 \text{ mg/m}^3$$

$$C_{n-Pen.inj} = 15750 \text{ mg/m}^3 \times 22.214 \text{ lt/mol} \times 1/72.15 \text{ g/mol}$$

$$C_{n-Pen} = 4892.87 \text{ ppm}$$

$$\text{Response faktör, n-pen, } 1 \text{ µL} = 4892.87/8200 = 0.60$$

$$R_{f.n-Pentan, } 1 \text{ µL} = 0.60$$



Şekil 1 1 µL n-Pentan İnjesiyonu sonucu elde edilen pikler

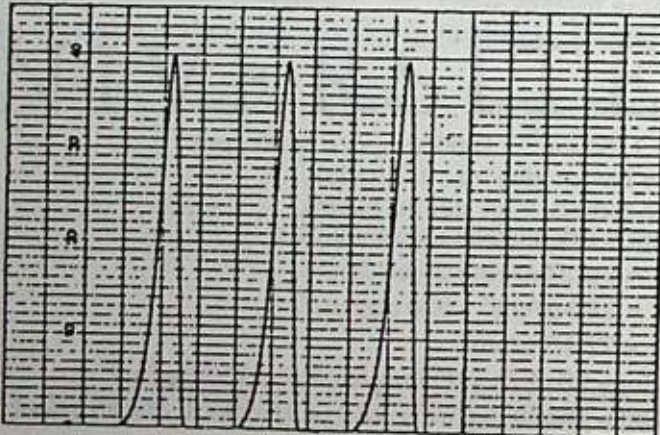
b) 1.5 µL ve 2 µL n-Pentan İnjesiyon hacimlerine karşılık gelen Re-
sponse Faktör değerleri ve grafikleri de verilmiştir. (Şekil 2, 3.)

n-Pentan'ın ortalama response faktörünü bulmak için x-y koordinat
sisteminde x - eksenine İnjekte edilen n-Pentan hacimlerini ($V \mu\text{L}$) ve y- ek-
senine İnjekte edilen n-Pentan hacimlerine karşılık gelen R_f faktörleri
gözönünde bulundurularak V/R_f değerleri çizilirse, orjinden geçen bir doğru
elde edilir. Bu doğrunun eğiminin tersi n-Pentan'ın ortalama response
faktörünü verir. Şekil 4'de grafikten bulunan değer:

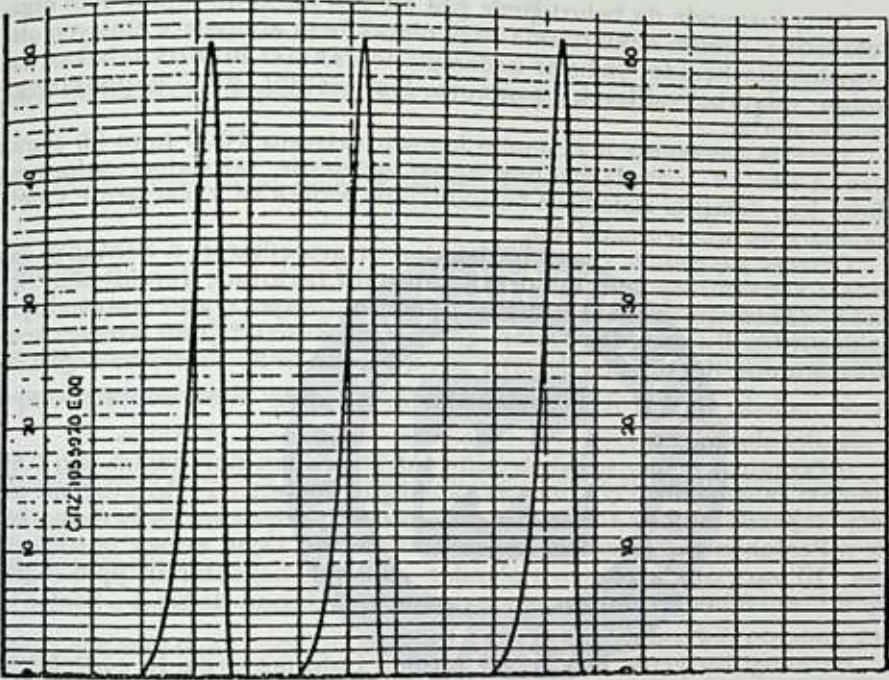
R_f n-Pentan. Ort. = 0.60 olarak bulunur.

Grafik Değerleri:

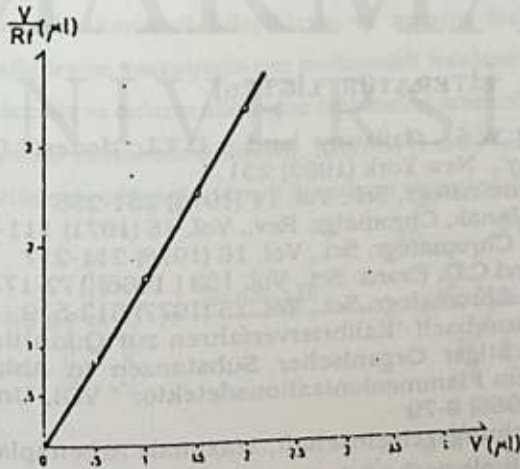
x ($V \mu\text{L}$)	y ($V/R_f \mu\text{L}$)
1	$1/0.60 = 1.67$
1.5	$1.5/0.60 = 2.50$
2	$2/0.60 = 3.33$



Şekil 2 1.5 µL n-Pentan İnjesiyonu sonucu elde edilen pikler



Şekil 3 2 µL n-Pentan İnjekşyonu sonucu elde edilen pikler



Şekil 4 n-Pentanin ortalama response faktörünün grafikte bulunması

TARTIŞMA VE SONUÇ:

Giriş kısmında da belirttiğimiz gibi bir çok kullanım alanı olan organik çözücüler, üretim miktarlarına bağlı olarak hem atmosfere emisyon olarak yayılmakta hemde yağışlar nedeniyle topraktaki humus tabakası tarafından adsorbe edilerek, zamanla içme suyu ana kaynaklarına karışmaktadırlar.

Teneffüs havasında maksimum konsantrasyonu 1000 ppm (8) olarak verilen n-Pentan insanlarda baş ağrısı, gözlerde tahrişler, solunum-sindirim-kan dolaşımı sistemleri bozuklukları, böbrek ve karaciğerde kronik hastalıklara da sebep olmaktadır.

Çevreye yayılan ve çeşitli hastalıkları ortaya çıkaran n-Pentan'ın gaz fazındaki konsantrasyonunun sürekli kantitatif tayininde gerekli olan Response faktörünün bulunması işlemini injeksiyon metoduyla gerçekleştirdik. Bu metotta kalibre gazı olarak kullandığımız Propan konsantrasyonunun R_f ortalama değeri 1 dir. n-Pentan'ın R_f ortalama değeri injeksiyon metodu verileri ve hesaplamalar sonucunda 1'den sapsmış ve $R_f = 0.60$ olarak bulunmuştur.

n-Pentan'ın response faktörünün injekte edilen her hacim için 0.60 bulunması çalışmamızın çok hassas yapıldığını gösterir. Tayin ettiğimiz ortalama response faktörü sonucunu göz önünde bulundurarak herhangi bir yerde n-Pentan'ın gaz fazındaki konsantrasyonunu tayin etmek istediğimiz zaman FID yazıcısında gözlenen alandan gidilerek hesaplanan ppm değeri ile R_f ort. = 0.60 değerinin çarpılması gerekir. Bulunan değer n - Pentan'ın gerçek emisyon değeridir.

Herhangi bir yerde FID ile gaz fazında bulunan organik çözücülerin sürekli kantitatif tayini yapılmak istenirse, deneylerimiz sonucu, bu çözücülerin önceden ortalama response faktörlerinin bulunması gerekir. Bu faktörler genel faktörler değil temperatür, basınç ve FID parametrelerine bağlı olarak değişen her alete ilişkin özel faktörlerdir.

LİTERATÜR LİSTESİ

1. J.C. Sternberg W.S. Gallaway and D.T.L. Jones, Gas Chromatography., New York (1962) 231.
2. A.T. Blades J. Chromatogr. Sci., Vol. 11 (1973) 251-255
3. P. Bocek and J. Janak, Chromatgr. Rev., Vol. 15 (1971) 111-150
4. B.A. Schaefer, J. Chromatogr. Sci., Vol. 16 (1978) 211-217
5. R.L. Hoffmann and C.D. Evans Sci., Vol. 153 (1966) 172-173
6. B.A. Schaefer, J. Chromatogr. Sci., Vol. 15 (1977) 513-519
7. W. Gans, G. Baumbach "Kalibrierverfahren zur Quantitativen Bestimmung Flüchtiger Organischer Substanzen in Abluft und Abgasen mit dem Flammenionisationsdetektor " VDI, Umwelttechnik. Reihe 15 (1985) 9-79
8. Deutsche Forschungsgemeinschaft, Maximale Arbeitsplatzkonzentrationen und Biologische Arbeitsstofftoleranzwerte, (1983) 41.

DİKARBONİL BİLEŞİKLER VE ONLARIN FOSFORLU ANALOGLARI

Valeh İSMAYILOV, Hacı NECEFOĞLU Niftalı YUSUBOV

Baku Devlet Üniversitesi, Kimya Fakültesi, Azerbaycan.

SUMMARY

In this study, β -formyldicarbonyl compounds were synthesized, and their chemical properties were investigated. It was also determined that their chlorinated derivatives were stable in comparison to their unchlorinated analogs.

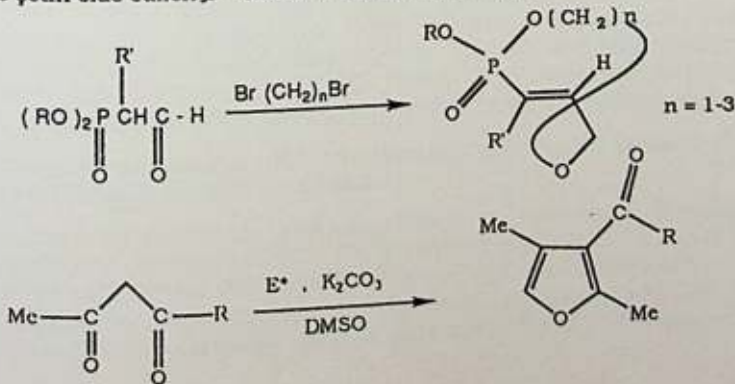
In order to investigate comparative alkylation reactions of α -phosphorylated and their unphosphorylated analogs, a series of compounds were synthesized and their alkylation reactions were studied. This time new electrophilic reactions were observed.

As a result, new heterocyclic organophosphorus compounds and their hardly made β -derivated furan synthesis methods were prepared.

ÖZET

Bu çalışmada β - formilkarbonil bileşikler sentez edilerek, onların kimyevi özellikleri incelenmiştir. Kararsız olan bu bileşiklerin klorlu türevlerinin dayanıklı olması saptanmıştır.

α - fosforlu karbonil bileşiklerin ve onların fosforsuz analoglarının (benzerlerinin) alkilleşme reaksiyonlarını mukayeseli incelemek amacı ile adı geçen bileşikler sentezlenmiş ve onların alkilleşme tepkimeleri araştırılmıştır. Bu zaman yeni elektrofil reaksiyonlar müşahade edilmiştir. Neticede yeni tip heterosiklik organofosfor bileşiklerin ve çetin elde edilen β - türevli furanların sentezi yöntemleri hazırlanmıştır:



DIKARBONİL BİLEŞİKLER VE ORALAN TETRÖLÜN ANALİZİ

YAZAN İSMAYİL HANCI, NİHAZİYE ÖZGÜR

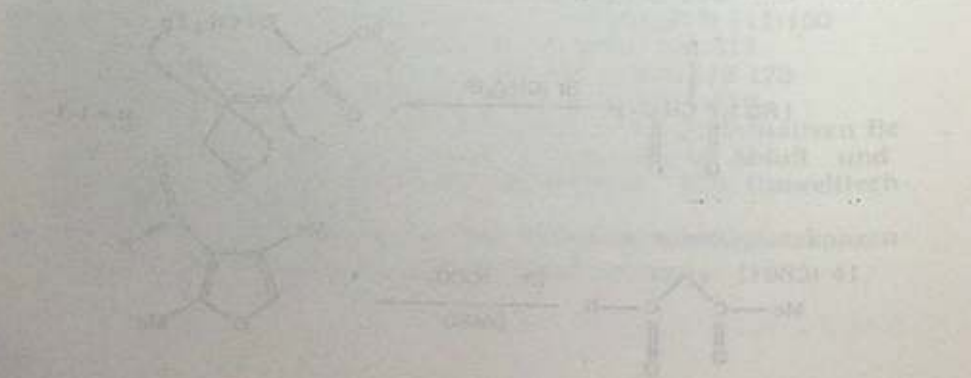
BİRİMİ: MARMARA ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ZÖKÜR

Özet: Bu çalışmada dikarbonyl bileşiklerin ve oralan tetröllerin analiz yöntemleri araştırılmıştır. Analiz için kullanılan reaktifler ve cihazlar belirtilmiştir. Ayrıca, bu bileşiklerin yapıları ve özellikleri hakkında bilgi verilmiştir.

1888

MARMARA ÜNİVERSİTESİ



BİLİMİN TORUNUNDAN İNŞAİN ÖZGÜDAY İNŞAATININ
DOLAYLARI VE SAYLAŞTIRILMASI

FÜKSEL AVCI/Şİ GÜVENLİK VE KİMLİK DİJİTAL

İstanbul, Türkiye, 2023. 100 sayfa. ISBN: 978-605-438-123-4. Marmara Üniversitesi Yayinevi, 2023. İstanbul, Türkiye.

BİYOKİMYA BİYOTEKNOLOJİ BESİN KİMYASI

BIOCHEMISTRY BIOTECHNOLOGY FOOD CHEMISTRY

ÜNİVERSİTESİ

Bu kitap, biyokimya, biyoteknoloji ve besin kimyası alanlarında çalışan araştırmacılar için hazırlanmıştır. Kitap, bu alanlardaki en son gelişmeleri ve uygulamaları kapsamlı bir şekilde ele almaktadır. Ayrıca, bu alanlardaki kariyer fırsatları ve araştırma konuları hakkında da bilgi vermektedir. Bu kitap, biyokimya, biyoteknoloji ve besin kimyası alanlarında çalışan araştırmacılar için hazırlanmıştır. Kitap, bu alanlardaki en son gelişmeleri ve uygulamaları kapsamlı bir şekilde ele almaktadır. Ayrıca, bu alanlardaki kariyer fırsatları ve araştırma konuları hakkında da bilgi vermektedir.

Özellikler: Uygulanabilir alan ve olmağı ve araştırma için bir örnek olarak sunulmuştur. Özellikle, spesifik olarak araştırma ve geliştirme alanlarında kullanılmaktadır.

Bu alanlar, özellikle sağlık, gıda ve çevre alanlarında büyük önem taşımaktadır. Özellikle, bu alanlardaki araştırmacılar, bu alanlardaki en son gelişmeleri ve uygulamaları kapsamlı bir şekilde ele almaktadır. Ayrıca, bu alanlardaki kariyer fırsatları ve araştırma konuları hakkında da bilgi vermektedir.



BIOCHEMISTRY
BIOLOGICAL
MARMARA
UNIVERSITY

BEZELYE TOHUMUNDAN DİAMİN OKSİDAZ ENZİMİNİN İZOLASYONU VE SAFLAŞTIRILMASI

Yüksel AVCIBAŞI GÜVENİLİR ve Nuran DEVECİ

*Istanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü
80626 Maslak-Istanbul-Türkiye*

THE ISOLATION OF DAO FROM PEA SEEDLING

SUMMARY

In this study the isolation of enzymes is discussed, concentrating initially on the principles of the important separation methods employed. Then the operation of these methods is illustrated by considering one specific example, purification of enzymes.

During this study, a number of the studies reported here required the use of large quantities of the peaseedling diamine oxidase (DAO). In order to satisfy this requirement a purification procedure to obtain homogeneous enzyme in high yield and in large quantity had to be developed. This enzyme is produced to study comparing total activity yielded by growing the seedlings under various conditions.

ÖZET

Son yirmibeş yıl içinde pekçok sanayi dalında uygulama alanı bulan enzimler, günümüzde yeni kullanım alanlarının ortaya çıkması ile giderek önem kazanmaktadır. Bu çalışmada bezelye tohumu DAO enzimini yüksek verimde saflaştırma işlemini gerçekleştirmek ve çok miktarda elde etmek amaçlanmıştır. Değişik koşullar altında büyüyen tohumların aktivite veriminin karşılaştırılması yapılarak enzim için büyüme koşulları ve enzimin molekül ağırlığının tespitine çalışılmıştır.

GİRİŞ

Enzimler doğal durumda suda çözünürler. Endüstriyel uygulamaların çoğu sulu çözeltilerde gerçekleştiğinden katalizör olarak serbest enzimlerin kullanılması önemli sakıncalara neden olmaktadır. Serbest enzim ile gerçekleştirilen bir reaksiyonun durdurulması, enzim istenilen anda ortamdan uzaklaştırılmadığından ancak spesifik inhibitör kullanılarak sağlanabilir. Bu durumda, serbest enzim tarafından kirletilmiş olan reaksiyon ürün veya ürünlerine yeni bir kirlilik unsuru katılmış olacaktır(1).

Enzimlerin uygulama alan ve olanağını sınırlayan başlıca etmenler; aktivite, spesiflik, kararlılık ve fiyatıdır.

Enzimin, aktivitesinin yüksek olması ve reaksiyon koşullarından olabildiğince az etkilenmesi istenir. Enzimlerin hemen hemen tümü bitkisel, hayvansal ve mikrobiyal hücrelerin oluşturduğu canlı kaynaklardan elde edilir. Enzimlerin bazı uygulama alanları tamamen saf bir özütün kullanımını gerektirir. Özellikle tıpta ve gıda sanayinde kullanılan enzimleri

bu gruba dahil edebiliriz. Bu çalışmada bezelye tohumu DAO enziminin izolasyonu, saflaştırılması ve enzimin özelliklerinin saptanması amaçlanmıştır.

DENEL BÖLÜM

Biokimyasal ürünlerin ayırma ve saflaştırılmasında kullanılan temel işlemler, kimya sanayinde kullanılanlar ile bir paralellik içindedir. Ancak söz konusu olan bu işlemlerde, biyokimyasal ürünlerin fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerine göre ayarlanıp modifiye edilmiş cihazlar kullanılmaktadır.

Gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan temel işlemler, presipitasyon, santrifigasyon, ekstraksiyon, elektroforez ve kromatografik işlemlerdir(1).

Presipitasyon: Amonyum sülfat kullanılarak söz konusu proteinlerin çözünlüklüklüğü değiştirilmiştir. Bu şekilde proteinin çözümlüden ayrılması ve çökelek oluşturması sağlanmıştır(2,3).

Santrifüjleme: 8000 rpm, 11000 rpm, 12000 rpm ve 18000 rpm devir hızlarında çalışılarak çözelti içindeki süspansiyon halindeki katı partiküller uzaklaştırılmıştır.

Ekstraksiyon: Su ve fosfat çözeltisi kullanılarak bezelye tohumu ekstrakte edilmiştir.

Elektroforez: Poliakrilamid jel elektroforez yapılmıştır.

Kromatografik işlemler: İyon değişimi ve jel filtrasyonu kullanılmıştır. İyon değişimi ve jel filtrasyonunda filtrasyon ortamı olarak DEAE-Sellüloz, DEAE-Sepharose, Ultrajel ACA 34 kullanılmıştır.

Bezelye tohumundan DAO izolasyonu ve saflaştırılmasında şu kademeler izlenmiştir.

- Bezelye tohumlarının büyümesi,
- Genel saflaştırma işlemi.

Bezelye tohumları oda sıcaklığında 12 saat damıtık su ile ıslatılmış ve sonra filizlenme belirene kadar genellikle (24 saat süresince ıslak süzgeç kâğıdı tabakaları arasına yerleştirilmiştir. Daha sonra alınan tohumlar kaba kumda birkaç mm derinlikte saçılarak büyütülmüş 7-10 gün sonunda 5-10 cm'lik taze filizler toplanmıştır(4,5).

- Ham ekstraktın hazırlanması,
- Ham homogenatın santrifüjlenmesi
- Amonyum sülfat ile fraksiyonlama
- İnert maddelerin çöktürülmesi
- Düşük iyonik kuvvette seçici çökelme
- Etanol/kloroform çöktürülmesi
- Amonyum sülfat ile doyurma
- DEAE-Sellüloz kolon
- Jel filtrasyonu

Tablo 1. Bezelye Tohumu DAO'nun Hazırlanması

	Toplam Protein (mg)	Hacim (ml)	Toplam birim (ünite)	S.A. (ü/mg)	SA. (ü/mg)	Verim (%)	Saflaştırma
Öğütme ve filtrasyon	12600	340	215	0.017	0.062	100	1
Santrifüjleme	3600	290	190	0.052	0.190	88	3
30/60 Amon.sülf. fraksiyonlama	1300	50	170	0.130	0.470	79	8
Yüksek pH'da muamele							
24 saat diyaliz	360	70	155	0.430	1.600	72	25
EtOH/Kloroform işlemi	70	72	130	1.860	6.800	60	110
85 % (NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	-	-
Düşük iyonik kuv.diyaliz	35	15	120	3.420	12.500	56	200
DEAE-Sellüloz kolon	25	15	115	4.600	16.800	53	270
Ultragel AcA 34 kolon	16	15	108	6.750	24.700	50	400

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

- Bezelye tohumu DAO saflaştırması için öncelikle bezelye tohumlarının, büyüme/aktivite profili çıkarılmıştır. Bu sebeple, en yüksek verimde DAO 7-10 günlük büyüme sonundaki hasatla elde edilmiştir.

- Bezelye tohumu DAO, ham homogenat hazırlanması, santrifüjleme, amonyum sülfat ile fraksiyonlama, inert maddelerin çöktürülmesi, kolon elektroforez ve DEAE-Sellüloz kolon kromatografisi işlemleri ile bezelye tohumundan izole edilerek saflaştırılmıştır. Ham homogenatta spesifik aktivite 0,017 (ünite/mg) olarak tespit edilmiştir. İzolasyon ve saflaştırmaları sırasında, ultrajel kolondan geçirilerek yapılan son aşamada DAO'nun spesifik aktivitesi 6.750 (ünite/mg) olarak tespit edilmiştir. Bu saflaştırma işlemleri sonucunda enzim, başlangıç aktivitesine göre 400 defa daha saf olarak elde edilmiştir.

- Bütün izolasyon ve saflaştırma kademelerinde sıcaklık belirtilmedikçe aktivasyonunun bozunmasını önlemek için 0-5°C sıcaklıklarda çalışmak gereklidir.

- İzolasyon işlemi sırasında maksimum verimi elde etmek için değişik koşullardaki enzimin stabil olması gerekmektedir.

KAYNAKLAR

1. A.Telefoncu, "**Temel ve Uygulamalı Enzimoloji**", Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, İzmir (1986).
2. Carnion,W.Jenkins, "D.Alanine-D glutamate Transaminase" (1.Purification and Characterization), **Journal of Biological Chemistry**, 240, 9, (1965), 3538-3546.
3. G.Mann, "Purification and Properties of the Amine Oxidase of Pea Seedlings", **Biochem. J.**, 59, (1955), 609-620.
4. F.Agro, "On the Nature of Chromophore in Pig Kidney DAO, **Eur. J. Biochem.** 74 (1977).
5. A.Perin, "Response of Tissue Diamine Oxidase Activity to Polyamine Administration", **Biochem.J.**, 234, (1986), 119-123.

Yıl	Kitap Adı	Yazar	Baskı Sayısı	Yayın Yılı	Yayın Yeri	Yayın Türü
1980
1981
1982
1983
1984
1985
1986
1987
1988
1989
1990



MARMARA ÜNİVERSİTESİ

1. A. T. ...
...
2. G. ...
...
3. G. ...
...
4. R. ...
...
5. A. ...
...

DOMUZ CİĞERİNDEN DİAMİN OKSİDAZ ENZİMİNİN İZOLASYONU VE SAFLAŞTIRILMASI

Yüksel AVCIBAŞI GÜVENİLİR ve Nuran DEVECİ

*İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya-Metalurji Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü
80626 Maslak-İstanbul-Türkiye*

THE ISOLATION OF DAO FROM PIG LIVER

SUMMARY

Diamine Oxidase enzyme was extracted from pig liver was purified by centrifugation, thermal denaturation, fractionation with ammonium sulphate and ion-exchange chromatography and was obtained in solid form after dialysis followed by lyophilisation.

ÖZET

Domuz ciğerinden diamin oksidaz enzimi, santrifüjleme, termal denatürasyon, amonyum sülfat ile fraksiyonlama, iyon değişim kromatografisi yöntemleriyle saflaştırılmış, diyalizlendikten sonra liyofilize edilerek katı formda elde edilmiştir.

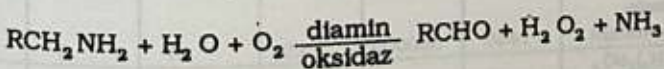
GİRİŞ

Enzim izolasyonu ve saflaştırma çalışmaları, oksidoredüktaz enzimlerden diamin oksidaz enzimi için domuz ciğerinden yapılmıştır.

Oksidoredüktazlar tarafından gerçekleştirilen reaksiyonlar çeşitli mekanizmalardan geçerek meydana gelir. Bu durum, isimleri dehidrogenazlar, aerodehidrogenazlar, oksidazlar, oksijenazlar, monooksijenazlar vb. gibi olan genel karışımlara neden olmaktadır. Oldukça benzer genel adlara sahip olan enzimler son derece farklı mekanizmalara sahiptir ve değişik yöntemlerle kullanılırlar(!)

Histamin, putresin ve kadaverin'in oksidasyonu için Best ve McHenry'nin çalışmasına kadar diaminoksidaz hakkında hiçbir bilgi bulunmamaktadır(2,3)

Zeller ana reaksiyon için aşağıdaki formülle mekanizmayı göstermiştir:



Yapılan çalışmalar sonucunda, hayvan dokularından diaminoksidazın hazırlanıp kullanılması ile 1 mol substrat için 0,5 mol O₂ tüketildiği kabul edilmiştir. Diğer yandan Werle ve von Pechmann'ın vermiş oldukları rapora

göre bitki dokularından hazırlanmış diaminoksidaz ile 1 mol veya daha fazla O_2 tüketilmektedir. Bu değişme kullanılan enzim preparatlarında katalaz veya peroksidaz kontaminasyonlarına bağlanabilir. Katalaz veya peroksidazın varlığı, H_2O_2 ispatını daha güç duruma sokmaktadır ve bu enzimatik veya kimyasal reaksiyonlara bağlı olmaktadır. Bu reaksiyonlar teorik olarak beklenen değerlerden daima daha düşük olmakta ve sonuçlar her zaman kabul edilebilir olmamaktadır.

DENEL BÖLÜM

Gerçekleştirilen çalışmalarda kullanılan temel işlemler, presipitasyon, santrifügasyon, filtrasyon, ekstraksiyon, elektroforez ve kromatografik işlemlerdir.

Presipitasyon: Amonyum sülfat kullanılarak söz konusu proteinlerin çözünürlükleri değiştirilmiştir. Bu şekilde proteinin çözülden ayrılması ve çökelek oluşturması sağlanmıştır.

Santrifügasyon: 8000 rpm, 11000 rpm, 12000 rpm, 18000 rpm devir hızlarında çalışılarak çözelti içindeki süspansiyon halindeki katı partiküller uzaklaştırılmıştır.

Ekstraksiyon: Su ve fosfat çözeltisi kullanılarak domuz ciğeri ekstrakte edilmiştir.

Elektroforez: Poliakrilamid jel elektroforez yapılmıştır.

Kromatografik işlemler: İyon değişimi ve jel filtrasyonu kullanılmıştır. İyon değişimi ve jel filtrasyonunda filtrasyon ortamı olarak DEAE-Sellüloz, DEAE-Sepharose, Ultrajel Aca 34 kullanılmıştır(4,5).

Domuz ciğerinden DAO'nun saflaştırılmasını kısaca şöyle özetleyebiliriz.

- Ham ekstraktın hazırlanması,
- Ham homogenatın santrifüjlenmesi
- Amonyum sülfat ile fraksiyonlama
- Düşük iyonik kuvvette seçici çökeltme
- İyon değişim kromatografisi
- Aktif fraksiyonların seçici çökeltmesi

Tablo 1. Domuz Ciğerinden DAO'nun İzolasyonu ve Saflaştırılmasının Özeti

		Toplam Hacim (ml)	Toplam Protein (mg)	Toplam Aktivite (ünite)	Spesifik Aktivite $\times 10^4$ (ünite/mg)	Saflaştırma Verim (%)	
1.	Ham homogenat	1700	289000	108.0	3.73	1	100
2.	10 dk.600°C'de ısıtılan homogenattan süpernatant	1440	300000	75.0	25	7	69
3.	33-60 % $(NH_4)_2SO_4$ ile ayırma	296	4300	72.4	168	45	67
4.	pH 5.3'te çökme	240	950	60.0	632	170	55
5.	Kolon elektroforez	100	175	39.5	2257	605	37
6.	DEAE-Sepharose kolondan kolon kromatografisi	30	81.55	25.0	3065	820	23

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

- Domuz ciğeri diaminoksidaz, kontrollü ısı bozundurulması, pH çökmesi, amonyum sülfat doyurması, kolon elektroforez ve DEAE-Sepharose kolon kromatografisi ile domuz ciğerinden izole edilerek saflaştırılmıştır. Ham homogenatta spesifik aktivite 3.73×10^{-4} (ünite/mg) olarak tespit edilmiştir. İzolasyon ve saflaştırma sırasında DEAE-Sepharose kolondan geçirilerek yapılan son aşamada DAO'nun spesifik aktivitesi 3065×10^{-4} (ünite/mg) olarak tespit edilmiştir. Bu saflaştırma işlemleri sonucunda enzim, başlangıç aktivitesine göre 820 defa daha saf olarak elde edilmiştir.

- Domuz ciğeri diaminoksidaz'ın saflaştırma sonucunda 3065×10^{-4} (ünite/mg) aktivite değeri çalışmalarımızda düşük görülerek bezelye tohumundan DAO saflaştırması yapılmıştır.

- Bütün izolasyon ve saflaştırma kademelerinde sıcaklık belirtilmedikçe aktivasyonunun bozunmasını önlemek için $0-5^{\circ}\text{C}$ sıcaklıklarda çalışmak gereklidir.

- İzolasyon işlemi sırasında maksimum verimi elde etmek için değişik koşullardaki enzimin stabil olması gerekmektedir.

- Saf enzim pirodoksal fosfat ile kuvvetle aktif hale gelmektedir.

KAYNAKLAR

1. A.Telefoncu, "**Temel ve Uygulamalı Enzimoloji**", Biyokimya Lisansüstü Yaz Okulu, Ege Üniversitesi, Fen Fakültesi, İzmir (1986).
2. J.Bu'lock, B.Bristionsen, **Basic Biotechnology**, John-Wiley and Sons Inc., USA, 1986.
3. H.Tabor, "Diamin Oksidase", **J.Biol.Chem.**, 188 (1951), 125.
4. T.A.Andrews, "**Electrophoresis (Theory, Techniques, and Biochemical and Clinical Applications)**", II.Ed., Clarendon Press, Oxford, 1988.
5. A.Kapeller, "Studies on Histaminase", **Biochem.J.**, 44 (1949), 70.

CONTENTS

1. The effect of...
 2. The effect of...
 3. The effect of...
 4. The effect of...
 5. The effect of...
 6. The effect of...
 7. The effect of...
 8. The effect of...
 9. The effect of...
 10. The effect of...



KAYITLAR

1. The effect of...
 The Editor: Dr. Mustafa...
2. The effect of...
 The Editor: Dr. Mustafa...
3. The effect of...
 The Editor: Dr. Mustafa...
4. The effect of...
 The Editor: Dr. Mustafa...
5. The effect of...
 The Editor: Dr. Mustafa...

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

Sıra No	Yayın Bilgileri	
	Yıl	Sayı
1	1988	1
2	1988	2
3	1988	3
4	1988	4
5	1988	5
6	1988	6
7	1988	7
8	1988	8
9	1988	9
10	1988	10

ENZİMATİK PEPTİD SENTEZLERİNİN İNCELENMESİ

Yeşim YEŞİLOĞLU ve Ayten SAĞIROĞLU

Trakya Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü Edirne-Türkiye

INVESTIGATION OF ENZIMATIC PEPTIDE SYNTHESIS

SUMMARY

In our study trypsin catalyzed synthesis of peptides were tested by using Glycine, Tyrosine, Proline, Histidine and Tryptophan amino acids at biphasic and homogen medium.

Effects synthesis of peptides were investigated by using iso amylalcohol, benzen, isopropanol, ethyl methyl keton, isooktan for solvent and reaction medium. In addition the effect of water content over the peptid formation % 5, % 10, % 15, % 20 were investigated in phosphate buffer 0.1M, pH:8 containing of isoamil alcohol reactions.

ÖZET

Çalışmamızda homojen ve bifazik reaksiyon sistemlerinde Glisin, Prolin, Tirozin, Histidin ve Triptofan amino asitleri arasında tripsin katalizörülü peptid sentezleri denendi. Çözücü ve reaksiyon ortamı olarak izoamillalkol, benzen, izopropanol, etil metil keton, izooktan'ın peptidlerin sentezine etkisi incelendi.

Ayrıca ortamın su içeriğinin peptid oluşumu üzerine etkisi de % 5, % 10, % 15, % 20 fosfat tamponu (0.1 M, pH:8) içeren izoamil alkollü reaksiyonlarda incelendi. En yüksek peptid verimi % 10-15 tampon içeren izo amil alkollü karışımlarda gerçekleşti. Diğer çözücülerin % 10 tamponlu reaksiyon karışımlarının inkübasyondan sonraki analiz sonuçlarına göre benzenli ve izooktanlı karışımlarda ürüne rastlanmadı. Diğerlerinde peptidler değişik oranlarda sentezlendi.

GİRİŞ

Bir hidrolaz enzimi olan tripsinin organik ortamda peptid sentezi reaksiyonlarını katalizlemesine bazı organik çözücülerin etkisini incelemek birinci amacımızdır. İkinci olarak aynı çözücülerdeki düşük su içeriğinin etkisini belirleyip optimizasyonunu sağlamaktır.

Son yıllarda araştırma çalışmalarının çoğunluğu sentetik kimyada enzimlerin kullanılması teşkil etmektedir. Proteolitik enzimlerin kullanımı esterlerin, amidlerin ve peptid bağlarının sentezleri için çeşitli yöntemlerde çalışılmıştır. Peptid bağlarının oluşumu ılımlı şartlar altında çabuk ilerler. Rasemizasyonun veya diğer yan reaksiyonların dışında karboksil ve amino bileşenlerinin ekimolar miktarlarını kullanarak kantitatif bir ürünle sonuçlanır(1). Organik çözücülerde peptid bağlarının enzim katalizli sentezlerini reaksiyonda

gerçek anlamda suyun önemini öğrenmek için belirlenmiş çeşitli desteklerde yada polietilen glükole modifiye edilmiş α -kimotripsin kullanarak incelenmiştir. Peptid sentezlerinde ürünler yüksek verimle çeşitli enzim türevleri kullanılarak bulunmuştur(2). Geçen on sene zarfında organik çözücülerde enzimatik reaksiyonlar, substrat ve stereo seçicilik vasıtasıyla organik sentezleri gerçekleştirmek için yaygın olarak çalışılmıştır. Bununla beraber genelde enzimler organik çözücülerle doğrudan temas ettiklerinde çabuk etkilenip çalışamaz duruma gelirler. Bu problemi gidermek için su ile karışmayan organik çözücüler ve sudan meydana gelen bifazik reaksiyon sistemleri sık sık kullanılmıştır. Örneğin Proteaz ya da lipazlarla ester yada peptid sentezleri(3). Peptidler ve amino asit türevlerinin uygun çözünlüklerini bulmak için nispeten polar çözücüler kullanmak gereklidir(4). Subtilisin proteazın seçici stereoselektivitesi belirgin ve etkilidir. Dolayısıyla bu enzim araştırmalarda D-amino asitler içeren peptidlerin çoğunu hazırlamak için kullanılmıştır(5). Son zamanlarda hidrolitik enzimlerden lipazlar ve proteazların organik çözücülerdeki dioller ve şekerlerin monoaçıllasyonunda başarılı bir şekilde görev aldıkları bulunmuştur(6). Enzimatik peptid sentezleri; seçicilikleri, en az koruma ve aktivasyon gereği, ılımlı reaksiyon şartları bakımından uygulamada ilk sıradadır(7). Denge ve çözünlük problemlerinde reaksiyon ortamını çözmek için suyun yerine organik çözücüler kullanılmıştır. Proteolitik enzimlere karşılık lipazların geniş bir spesifiteleri olduğu ve peptidlerin ikincil hidrolizlerini kataliz etmedikleri kabul edilmiştir. Biyolojik olarak aktif peptidlerin sentezlerinde halen lipazların kullanımı daha yaygındır(8).

YÖNTEM

Izoamil alkol, benzen, izopropanol, etilmetil keton, izooktan çözücülerini sırasıyla 0.1M, pH:8 fosfat tamponuyla doyurularak bunların 10'ar ml'sinde prolin, tirozin, histidin, triptofan'ın 50mM çözeltileri hazırlandı. Herbirine yukarıdaki amino asitlerin 4 katı konsantrasyonunda glisin ve katalizör olarak 1mg. serbest tripsin ilave edildi. Reaksiyon karışımlarında enzimin katalitik etkisine, ortamdaki düşük su konsantrasyonu etkisi ve her reaksiyon için optimum su içeriğinin belirlenmesi amacıyla değişen hacimlerde tampon eklenecek reaksiyonlar tekrarlanmıştır.

Reaksiyon karışımları ince tabaka kromatografisi, kağıt kromatografisi ve görünür bölgeyle analiz edilmiştir. İnce tabaka kromatografisinde adsorban olarak silikajel, yürütücü solvent olarak n-butanol: asetik asit: su (12:3:5) x2, belirteç olarak asetonda % 0.2'lik ninhidrin çözeltisi kullanıldı. Kağıt kromatografisi tekniğinde izoamilalkol, benzen, izopropanol, etil metil keton, izooktan çözücü karışımları farklı yürütücü çözücüler kullanılarak analiz edilmişlerdir. Yürütücü çözücü olarak etanol: Su: amonyak (8:1:1) x5 ve n-butanol: piridin: su (1:1:1) x16 sistemler kullanıldı. Reaksiyon karışımlarının Wattmann No:1 kağıdı üzerinde 3-3.5 saat yürümleri beklenmiş ve sonra üzerlerine ninhidrin çözeltisi püskürtüldü. 100-105 ° C'de etüvde bekletilerek lekeler belirlendi.

TARTIŞMA VE SONUÇ

Prolin, Tirozin, Histidin, Triptofan ve Glisin amino asitlerinin tripsin varlığında peptid sentezleri yapıldı. Reaksiyonlar homojen ve bifazik ortamlarda gerçekleşirildi. İzomilalkol, benzen, İzopropanol, etil metil keton, İzooktan çözücü sistemlerinde ve izomil alkolün % 5, 10, 15, 20'lik çözeltilerinde peptid ürünü elde edilmiştir. Ortamda su miktarının artmasıyla üründe artma % 10-15 aralığına kadar oldu. % 20 tampon içeren karışımda ürünlerde daha fazla artış olmadı. Bunun üzerine % 10 tampon içeren diğer çözücülerde 200 mM glisin yanında diğer amino asitlerden 50 mM eklenerek, enzim varlığında aynı şartlarda 20 saat çalkalandı. Reaksiyon sonundaki kromatografik analizlerinden; benzen içeren karışımların hiçbirinde yeni ürüne raslanmadı. İzopropanolde peptidler yanında esterlerinde sentezlendiği gözlemlendi. Ayrıca reaksiyon ortamına enzimsiz yalnız İzopropanol ve aminoasitler tek tek koyularak aynı şartlarda aynı süre inkübe edildiğinde esterlerinde oluştuğu gözlemlendi; analizle de doğrulandı. Ester oluşumu daha düşük oranlarda izoamil alkol içeren reaksiyon karışımlarında da gözlemlendi. Karışımın su yüzdesi yükseldikçe esterifikasyon oranı düştü. İzooktan çözücülü reaksiyon karışımlarında hiç birinde ürüne rastlanmadı.

Metil-etil keton çözücülü prolin, tirozin, histidin ve triptofanın glisinli reaksiyon karışımlarının tümünde en az iki çeşit ürün sentezlendi. Sonuçların bir kısmı Tablo 1.1'de görülmektedir.

Tablo 1.1 Enzimatik peptid sentezlerinde ürünlerin kağıt kromatografisine göre karakterizasyonu (Şartları metindedir.)

Çözücü + Glisin+Tripsin	Ürünlerin Leke Rengi ve Rf değerleri			
	Prolin	Tirozin	Histidin	Triptofan
Amilalkol	mavi-mor 0.15	mavi 0.18	mavi-mor 0.13	mavi-mor 0.13
	mor 0.18		açık mavi 0.18	mavi 0.18
İzopropanol	mavi 0.04	bordo 0.04	bordo 0.06	bordo 0.07
	kahverengi 0.16	açık kahve 0.15	kahverengi 0.15	kirli sarı 0.15
Etil Metil Keton	mavi 0.54	mavi 0.48	mor 0.28	sarı 0.10 mavi 0.53 pembe 0.59
	pembe 0.57	pembe 0.54	pembe 0.52	
Benzen	—	—	—	—
	—	—	—	—
İzooktan	—	—	—	—
	—	—	—	—

KAYNAKLAR

- 1- E.Çavdar, A.H.Uslan, "Enzyme Catalyzed Synthesis of Amino Acid Derivatives" VII. **Kimya ve Kimya Müh.Semp.**, 2-5 Nisan Gazımağusa KKTTC (1991)
- 2- H.Gaertner, T.Watanabe, J.V.Sinisterra, A.Puigserver "Peptide Synthesis Catalyzed by Modified α -Chymotrypsin in Low-Water organic media", **Journal of organic Chemistry** , 56 (1991) 3149-3153
- 3- Hidetaka Noritomi, Akira Watanabe, Hideo Kise "Enzymatic Reactions in Aqueous-Organic Media VII Peptide and Ester Synthesis in Organic Solvents by α -Chymotrypsin immobilized through Non-Covalent Binding to Poly (Vinyl alcohol)", **Pollmer Journal**, 21 2 (1989) 147-153
- 4- Rosa M., Blanco, Jose M.,Guisan and Peter J.Halling, "Agarose Chymotrypsin as A Catalyst For Peptide And Amino Acid Ester Synthesis in Organic Media", **Biotechnology Letters**, 11 11 (1989) 811-816
- 5- Alexey L. Margolin, Dar Fu Tai, Alexander M.Klibanov, "Incorporation of D- Amino Acids into. Peptides via Enzymatic Condensation in Organic Solvents" **Journal of the American Chemical Society**, 109 25 (1987) 7885-7887
- 6- Nicolas Chinsky, Alexey L., Margolin, Alexander M.Klibanov, "Chemoselective Enzymatic Monoacylation of Bifunctional Compounds" ; **J.Am.Chem.Soc.**, 109 12 (1987) 3802-3804
- 7-Hiroshi Kitaguchi, Dar Fu Tai, Alexander M.Klibanov,"Enzymatic Formation of An Isopeptide Bond Involving the ϵ Amino Group of Lysine" **Tetrahedron Letters**, 29 43 (1988) 5487-5488
- 8-Alexey L.Margolin, Alexander M.Klibanov, "Peptide Synthesis Catalyzed by Lipases in Anhydrous Organic Solvents", **J.Am.Chem.Soc.**, 111 1 (1989) 3802-3804

BAKTERİYEL α -AMİLAZIN AKTİVİTESİ ÜZERİNE 18. TAÇ. 6 ETERİN ETKİSİ

Çetin AYTEKİN, Işıl GÜLSÜN, Halil HOŞGÖREN, Yavuz ENSARI

Dicle Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Diyarbakır-Türkiye

EFFECT OF 18. CROWN. 6. ON BACTERIAL α -AMYLASE ACTIVITY

SUMMARY

The catalytic properties of α -amylase from *B. subtilis* has been studied during 18.Crown.6 as a weak chelation compound for removal calcium ion of this enzyme by chelation. On the contrary, it was observed that 18. Crown.6 increased α -amylase activity in a lot of cases according to control. This result suggests that dipol-ion interaction between 18. Crown. 6 and Ca^{2+} bounded α -amylase, bring in an elasticity to α -amylase quarternar structure. Thus, ability of enzyme-substrate complex formation was promoted.

ÖZET

Halkalı makro eterlerden 18. Taç. 6'nın *B. subtilis*'ten izole edilen α -amilazın aktivitesi üzerindeki etkisi incelendi. α -Amilazın prostetik grubunu oluşturan ve bu enzimin aktivite göstermesi için belli bir oranda bulunması gereken Ca^{2+} iyonlarının, 18. Taç. 6 ile iyon-dipol etkileşmesi sonucu uzaklaştırılabileceği ve böylece enzimin aktivitesinde bir azalma gözlenmesi beklenirken, tam tersine çoğu halde, kontrole nazaran aktivitede bir artma saptandı. Bu olgunun, taç eter etkisiyle Ca^{2+} iyonlarının α -amilazın dördüncül yapısına kazandırdığı rijitliğin yumuşatıldığı, böylece enzim-substrat kompleksinin oluşma olasılığını artırdığı şeklinde yorumlanabilir.

GİRİŞ

Amilaz terimi ilk kez nişasta, glikojen veya bunların parçalanma ürünleri gibi polisakkaritlerdeki α - (1 \rightarrow 4) glikozidik bağlarının hidrolizini katalizleyen enzimleri tanımlamada kullanıldı (1). Amilazlar endo-ve ekzo-amilaz olmak üzere ikiye ayrılırlar. Bir endo-amilaz olan α -amilaz-polisakkaritlerdeki α -(1 \rightarrow 4) glikozidik bağlarını gelişigüzel kırar. Ekzo-amilazlar ise polisakkaritlerin indirgen olmayan uçlarından başlayarak düzenli bir şekilde α -(1 \rightarrow 4) glikozidik bağlarını hidrolizlerler. Son ürün glukoz ve

limit dekstrin ise enzim, glukoamilaz veya α -amilaz olarak adlandırılır. Son ürün maltoz ve limit dekstrin ise enzim β -amilaz olarak adlandırılır (2).

α -Amilaz (E.C. 3.2.1.1.) veya diğer adıyla α -(1-4) glukano-glukano-hidro-laz, hayvan, bitki ve mikroorganizma gibi çeşitli canlı ortamlarda bulunmuş ve ilk kez 1947 yılında Meyer ve arkadaşları tarafından domuz pankreasından saflaştırılmıştır (3). Günümüzde değişik kaynaklardan α -amilazlar saflaştırılmış ve bunların sıcaklık, pH, çeşitli organik bileşik ve metal iyonlarının varlığında aktiviteleri incelenmiştir (4-14).

α -Amilazı saflaştırma aşamasında prateolitik enzimlerin etkisinden korumak için ortama EDTA ilave edildiği (11), Ca^{2+} iyonlarının α -amilazın aktivitesi üzerindeki etkilerini araştırmak üzere şelatlaştırma reaktifleri olarak yine EDTA'nin kullanıldığı (11,13,14) bilinmektedir.

Taç eterler (makro halkalı eterler) 1967 yılında sentezlenmiş, alkali ve toprak alkali metal iyonlarıyla kompleksleşme yetenekleri olduğu görülmüştür. Bu özelliklerinden yararlanılarak nonactin ve valinomycin gibi taç eter türevi olarak hazırlanan antibiyotikler, hücrenin Na^+/K^+ dengesini bozmaktadır.

Kompleksleşme yetenekleri gözönüne alınarak taç eterlerin bakteriyel α -amilazın aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmeye çalışılmıştır.

DENEL BÖLÜM

1. Enzim saflaştırması: Ticari olarak temin edilen B. subtilis'ten izole edilmiş α -Amylaza (sigma St Louis, E.C. 3.2.1.1., 71.9 U/mg) Gupta ve arkadaşlarının önerdiği yöntemle göre saflaştırıldı (15). Buna göre 1/3 oranında seyreltilmiş soğuk mutlak etilalkol enzim çözeltisine yavaş yavaş ilave edildi. Çözelti santrifüj ile ayrıldıktan sonra fosfat tamponunda (pH=7) çözüldü. % 60-%80 $(NH_4)_2SO_4$ çöktürmesi ile ele geçen kısım fosfat tamponunda (pH=8) çözüldü ve aynı tampona karşı gece boyu dializlendi. Bu çözelti liyofilizasyon ile uygun hacme getirildikten sonra DEAE-seluloz kolonuna (5x200 mm) verildi. 0.1-1M lık NaCl gradienti ile toplanan 2,5'ar ml.lik froksiyonlar amilaz aktivitesi bakımından Bernfeld (16) yöntemi ile test edildi. Ham ve saflaştırılmış eşit miktardaki α -amiloz örnekleri Weber-Osborn (17) yöntemine göre elektroforeze verildi.

2. Enzim Aktivitesinin Tayini: Ham ve saflaştırılmış α -Amilaz enziminin aktivitesi Bernfeld yöntemine göre 3,5-dinitro salisilat, ile spektrofotometrik olarak (489 nm'de) yapıldı. Bunun için tümü Tris-buz (pH=7) tampon-

nunda hazırlanmış olmak üzere kontrol (taç etersiz) ile aynı anda 10, 50 ve 100 mM 18. taç. 6. eter (Fluka) çözeltideki içinde 14,38 U/ml olacak şekilde α -amilaz çözünerek hazırlanan çözeltiler 25 °C de sırasıyla 15 dak. 30 dak. 60 dak. 120 dak ve 18 saatlik ön inkübasyondan sonra % 0,5 lik çözünür nişastanın (sigma St. Louis) 1 ml.si ile 25 °C de 30 dakika inkübasyona tabi tutuldu. Bu sürenin sonunda reaksiyon durdurma ve renklendirme reaktifli olarak 2 ml. 3,5-dinitro salisilat ilave edildi. 5 dakika kaynar su banyosunda tutulduktan sonra, 20 ml. saf su ile seyreltilip, Schmadzu UV 160 model spektrofotometrede 489 nm.'de absorbans okundu.

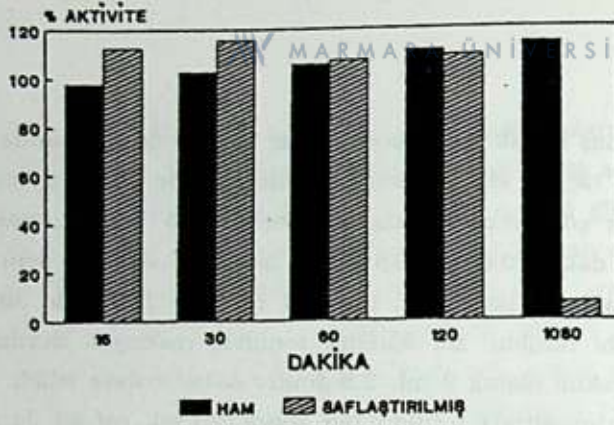
SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Ticari olarak temin edilen (ham) ve bunun saflaştırılmasından sonra ele geçen eşit miktarda enzimın 10,50 ve 100 mM 18. Taç.6.eter içindeki çözeltilerinin Bernfeld yöntemi ile ölçülen aktiviteleri sırasıyla Şekil 1,2 ve 3'te verilmiştir.

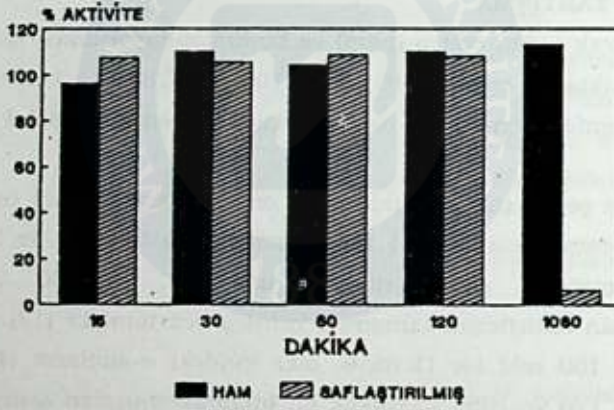
EDTA gibi şelatlaştırıcı maddeler ile ön inkübasyona tabi tutulan α -amilazın aktivitesinin azaldığı (11,14), enzimın 10mM EDTA ile 2 saatlik ön inkübasyonundan sonra nişasta ile 25°C de 30 dakikalık inkübasyonundan aktivitesini tamamen yitirdiği belirtilmiştir (13).

10,50 ve 100 mM lik 18.taç.6. eter içindeki α -amilazın (14,38 U/ml) 15, 30, 60, 120 ve 1080 dakikalık ön inkübasyonundan sonra, 25 °C de 30 dakika % 0,5 lik nişasta ile yapılan inkübasyonunda aktivitenin genellikle arttığı saptandı. Bu aktivite artışının, 18. Taç.6. eterin ham α -amilaz içinde bulunması olası çeşitli 2+ ve 1+ yüklü iyonları uzaklaştırmasından kaynaklanabileceği düşünüldü. Çünkü Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} gibi iyonların enzimın aktivitesini olumsuz yönde etkilediği belirtilmektedir (13). Bu olasılığı ortadan kaldırmak üzere aynı deneyler saflaştırılmış (15) α -amilaz için uygulandığında sonsuz süreli (1080 dak.) ön inkübasyon dışında 10 ve 50 mM 18. Taç 6 eter içindeki eşit miktarda [Protein tayini Wasburg-Christian yöntemine göre yapıldı (18)] enzim kullandığında yine kontrole nazaran aktivitede bir artış gözlemlendi. İyon-dipol etkileşimi nedeniyle enzimın aktivitesinde en azından bir azalma beklerken, aktivitenin artmasını Ca^{2+} iyonlarının enzime kazandırdığı rijit dördüncül yapının 18. Taç.6. eter etkisiyle yumuşatıldığı ve böylece enzim-substrat kompleksinin oluşmasını kolaylaştırdığını düşündürmektedir.

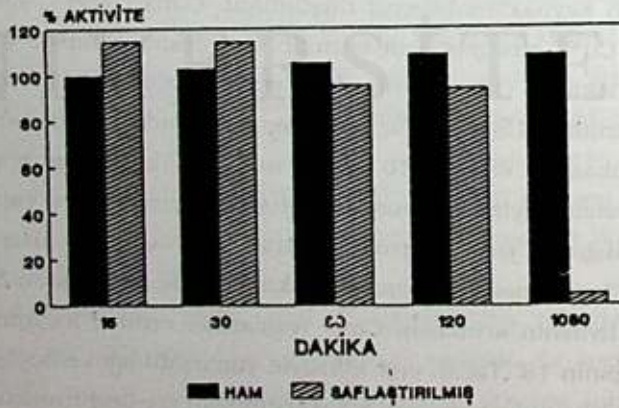
AMİLİZ



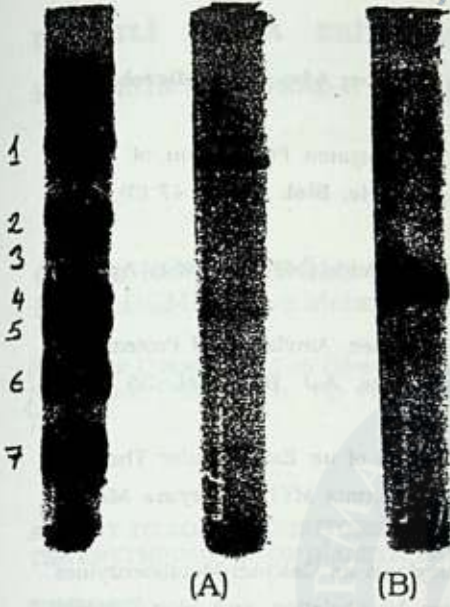
Şekil 1 : 10 mM 18.Taç.6 Eter Etkiel



Şekil 2 : 60 mM 18.Taç.6 Eter Etkiel



Şekil 3 : 100 mM 18.Taç.6 Eter Etkiel



(A) : Saflaştırılmış (B): Ham

- 1- Albumin Böving= 66.000
- 2- Albumin Egg= 45.000
- 3- Gliser Aldehit 3-Fosfat Dehidrogenoz= 36.000
- 4- Karbonik Anhidraz= 29.000
- 5- Tripsinojen= 24.000
- 6- Tripsin İnhibitör= 20.100
- 7- α -Laktalbumin= 14.200

Saflaştırılmış α -amilazın bütün taç eter derişimlerinde 1080 dakiklik ön inkübasyondan sonra aktivitesinin azalması, uzun süreli ön inkübasyonlarda taç eterin Ca^{2+} iyonlarının büyük bir kısmını selat yapısına çekmesi nedeniyle aktivitenin düşürüldüğü kanısını uyandırmaktadır.

KAYNAKLAR

1. J.A. Thoma, J.E. Spradlin and S. Dygert. In *The Enzymes* (Boyer, P.D., ed.), Academic Press, New York (1971) 5, 253-271.
2. A.L. Lehninger, Ströge Polysaccharides and Cell Walls. In *Biochemistry* Worth Publishers Inc., New York, (1987), 277-303.
3. K.H. Meyer, E.H. Fischer and P. Bernfeld. Purification and Crystallization of Amylase from Hog Pancreas. *Helv. Chim Acta* 30 (1947) 64-68.
4. W.W. Windish and N.S. Mhatre. Microbial amylases. *Adv. Appl. Microbiol.* 7, (1965) 27:1-104.

5. M.B. Ingle and R.J. Erickson. Bacterial α -amylases. **Adv. Appl. Microbiol.** 24 (1978) 257-278.
6. H. Taniguchi, C.M. Jae, N. Yoshigi and Y. Maruyama Purification of *B. circulans* F-2 amylase and its General properties. **Agric. Biol. Chem.** 47 (3) (1983) 511-519.
7. K.L. Kindle. Characteristics and production of thermostable α -amylase. **App. Biochem. Biotechnol.** 8 (1983). 153-170.
8. C. Ratcliffe, R.L. Sanders, L. Tittel and R.W. O'Brien. Amylase and Protease Secretion by the Marine Bacterium *Vibrio gasogenes*. **A.J. Biol. Sci.** 35 (1982) 457-464.
9. S.U. Kumar, F. Rehana and K. Nand. Production of an Extracellular Thermostable calcium-inhibited α -amylase by *B. Licheniformis* MY10. **Enzyme Microb. Technol.** 12 (1990) 714-716.
10. E.A. Stein, J. Hsiu and E.H. Fischer. α -Amylases as Calcium-Metalloenzymes. I. Preparation of Calcium free Apoamylases by chelation and electro dialysis. **Biochemistry.** 3 (1) (1964) 57-61.
11. J. Hsiu, E.H. Fischer and E.A. Stein. α -Amylases as Calcium-Metalloenzymes. II. Calcium and Catalytic Activity **Biochemistry.** 3(1) (1964) 61-66.
12. K. Omichi, S. Hase and T. Ikenaka. Modified malto-oligosaccharides as inhibitors of human α -amylases. **Carbohydrate Research** 208 (1990) 312-316.
13. M.V. Ramesh and B.K. Lonsane, Effect of Metal Salts and Protein Modifying Agents on Activity of Thermostable α -amylase produced by *B. licheniformis* M27 under Solid State Fermentation. **Chem. Microbiol. Technol. Lebensm** 12 (1990) 129-136.
14. L. Buranakarl, K. Ito, K.Izaki and H. Takahashi. Purification and Characterization of a raw starch-digestive amylase from non-sulfur purple photosynthetic bacterium. **Enzyme Microb. Technol.** 10 (1988) 173-179.
15. V.K. Gupta and R.P. Sethi. Studies on Thermal Stability of α -Amylase from *B. subtilis* C-1. **J. Res. Punjab Agric. Univ** 26 (4) (1989) 625-630.
16. P. Bernfeld in *Methods in Enzymology* (S.F. Colowick and M.O. Kaplan, eds). **Academic Press, New York.** 1 (1955) 149-158.
17. K. Weber and M. Osborn. The Reliability of Molecular Weight Determinations by Dodecyl Sulphate Polyacrylamide Gel Electrophoresis. **J. Biol. Chem.** 244 (1969) 4406-4412.
18. O. Warburg and W. Christian. Isolierung und kristallisation des garuns fermentes enolase **Biochem. Z.** 310 (1942) 384-421.

DIABETLİ HASTA ERİTROSİTLERİNDEN ELDE EDİLEN GLİKE KARBONİK ANHİDRAZ-II ENZİMİNİN BAZI İNHİBİTÖRLERE KARŞI İLGİSİ

Ö.İrfan KÜFREYOĞLU (*), Mehmet ÇİFTÇİ(*), Hasan ÖZDEMİR (*),
Nazan DEMİR (*) ve Mehmet GÜNDOĞDU (**)

(*Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Konya Bölümü, Erzurum- Türkiye
(**)Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı, Erzurum-
Türkiye

AFFINITY TO SOME INHIBITORS OF GLYCATED CARBONIC ANHYDRASE-II FROM THE ERYTHROCYTES OF DIABETIC PATIENT

SUMMARY

In this study, some kinetic properties of carbonic anhydrase-II obtained from the erythrocytes of diabetic patient and healthy human were investigated. Carbonic anhydrase-I and II was purified together by affinity chromatography. The determination of esterase activity of carbonic anhydrase-II was done by selective inactivation of bromopyruvate. By using sulfanilamide, NaCH_3COO , NaClO_4 , NaN_3 , NaSCN , NaCN inhibitors, K_1 constants for carbonic anhydrase-II obtained from the erythrocytes of diabetic patient and healthy human were found by means of Lineweaver-Burk graphs. K_1 values estimated for carbonic anhydrase-II was higher for NaClO_4 , NaSCN and NaCN inhibitors in diabetic patient than that of healthy human.

ÖZET

Bu çalışmada diabetli hasta ve sağlam şahıs eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz-II enziminin bazı kinetik özellikleri araştırıldı. Karbonik anhidraz-I ve II afinite kromatografisiyle birlikte saflaştırıldı. Karbonik anhidraz-II'nin esterase aktivite tayini brom piruvat seçimli inaktivasyonu yapıldı. Sulfanilamid, NaCH_3COO , NaClO_4 , NaN_3 , NaSCN , NaCN inhibitörleri kullanarak, diabetli hasta ve sağlam şahıs eritrositlerinden elde edilen karbonik anhidraz-II enzimi için K_1 sabitleri Lineweaver-Burk grafikleri yoluyla bulundu. Karbonik anhidraz-II için hesaplanan K_1 değerleri; NaClO_4 , NaSCN and NaCN inhibitörleri için diabetli hastada sağlam şahıstan yüksek bulundu.

GİRİŞ

Diabetli hastalarda uzun süre kan glukoz seviyesine maruz kalan dokular üzerinde glikasyon reaksiyonlarının çok önemli fizyolojik etkileri bilinmektedir. Nonenzimatik glikasyon reaksiyonları; hemoglobin, plazma albümin, eritrosit membran proteinlerinde tesbit edildiği gibi, en önemli eritrosit enzimlerinden olan karbonik anhidraz I ve II (CA-I ve CA-II) koenzimlerinin de diabetli hastalarda glikasyona uğradığı Kondo ve arkadaşları tarafından belirlenmiştir (1,2).

Bu çalışmada kontrolsüz diabetli hasta ve sağlam şahıs

eritrositlerinden saflaştırılan CA-II izoenziminin bazı inhibitörlere karşı ilgisi araştırılarak glikasyonun söz konusu enzimler üzerinde nasıl etkili olduğu belirlenmeye çalışılmıştır. CA-I ve CA-II izoenzimleri birlikte saflaştırıldığından, CA-II enziminin aktivite ölçümü, brom piruvatla CA-I izoenziminin inaktive edilmesi sonucu gerçekleştirilmiştir (3,4).

DENEL BÖLÜM

Materyaller

Çalışmada kullanılan Sepharose 4B, p-nitrofenilasetat, Sephadex G-25, brom piruvik asit Sigma Chemical Comp.'den, sülfanilamid, L-tirozin E.Merck AG'den, Glyco-Probe™ GSP Isolab inc.'den temin edildi.

Şahıslar

Açlık plazma glukoz seviyesi 380 mg/dl olan kontrolsüz diabetes mellituslu hasta (tip-II, 45 yaş) ve açlık plazma glukoz seviyesi 90 mg/dl olan sağlam şahıs (29 yaş)'dan EDTA'lı şişelere kan alındı.

CA-I ve CA-II İzoenzimlerinin Birlikte Saflaştırılması

Diabetli hasta ve sağlam şahıstan EDTA'lı tüplere alınan taze venöz kan 1500 rpm'de 15 dakika santrifüjlenerek plazma ve lökosit tabakaları ayrıldı. Daha sonra eritrositler 0,9'luk NaCl çözeltisi ile iki defa yıkandı. Eritrositlere 1,5 hacim 0°C'daki saf su katılıp yarım saat karıştırılarak hemoliz edildi. Hücre zarlarını uzaklaştırmak için 4°C da 48.000xg'de santrifüj edildi. Hemolizatın pH'sı katı Trisle 8,7'ye getirildi. Hemolizat, Sepharose 4B-L-tirozin-sülfanilamid yapısındaki, 25 mM Tris-HCl / 0,1M Na₂SO₄ (pH=8,7) ile dengelenmiş afinite kolonuna uygulandı. Afinite jeli 25 mM Tris-HCl/22 mM Na₂SO₄ (pH=8,7) çözeltisiyle yıkandı. 0,1 M NaCH₃COO/ 0,5 M NaClO₄ (pH=5,6) elüsyon çözeltisiyle CA-I ve CA-II izoenzimleri birlikte elüe edildi (5). Hemolizat ve saflaştırılmış enzim çözeltileri için spesifik aktiviteler hesaplanarak 163 kat saflaştırılma gerçekleştirildiği bulundu. Enzim saflığı SDS-poliakrilamid jel elektroforeziyle kontrol edildi (6).

Esteraz Aktivitesi Ölçümü

Esteraz aktivitesi Verpoorte ve arkadaşları (7) tarafından anlatıldığına benzer şekilde yapıldı. 1,5 ml tamponlanmış enzim (tampon: 0,05M Tris-SO₄ pH=7,4) ve 1,5 ml substrat (p-nitrofenilasetat) konulmasından 3 dakika sonra 25°C'da 348 nm'de LKB-Biochrom ULTROSPEC-II spektrofotometre cihazında absorbans köre karşı okundu. Ana substrat çözeltisi, 27,2 mg p-nitrofenilasetat'ın 1 ml aseton içinde çözülüp hızlıca karıştırılan 49 ml destile suya yavaş yavaş ilave edilmesiyle hazırlandı (3mM). Absorbans değerleri 5'e bölünerek µmol/dak cinsinden aktiviteler bulundu.

CA-II Aktivitesinin Brompiruvatla Seçimli İnaktivasyonla Tayini

Bu yöntemde CA-I ve CA-II brompiruvatla 50 dakika inkübe edildiklerinde CA-I % 98'den fazla aktivitesini kaybederken, CA-II'nin %95'den fazla aktivitesini koruması esasına dayanmaktadır (3,4). Bu amaçla 2 ml enzim çözeltisi, 8 ml destile su ve 10 ml 50 mM fosfat tamponu/4 mM brompiruvat (pH=7,4) karıştırıldı. 50 dakika

inkübasyondan sonra bundan 1 ml alınarak 0,5 ml 0,05M Tris-SO₄ (pH=7,4) tamponu eklendi. 1,5 ml substrat çözeltisi ilave edilerek 348 nm'de 3 dakika sonra absorbanans okundu. Böylece CA-I inaktive edilirken CA-II aktivitesi ölçülmüş oldu.

Inhibitör Çalışmaları

Inhibitör olarak sülfanilamid, NaCH₃COO, NaClO₄, NaN₃, NaSCN, NaCN kullanıldı. Inhibitörsüz ve inhibitörlü çalışmalarda deney ortamında substrat konsantrasyonları; 0,5 mM, 0,6 mM, 0,8 mM, 1 mM ve 1,2 mM alındı. Bunun için ana substrat çözeltisinden 0,5 ml-1,2 ml alındı. Inhibitör çözeltileri 0,05 ml, 0,1 ml ve 0,2 ml olmak üzere üç farklı hacimde, dolayısıyla üç sabit konsantrasyonda alındı. Üç sabit inhibitör konsantrasyonları için ayrı ayrı K_i değerleri hesaplandı.

Glike CA Miktarı Tayini

Glyco-ProbeTM GSP kiti kullanılarak 1,29 mM, 2,50 mM ve 3,90 mM standartları çalışılıp diabetli ve sağlam şahıs toplam CA izoenzimlerinin glikasyon oranları bulundu.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Tablo 1; sülfanilamid, NaCH₃COO, NaClO₄, NaN₃, NaSCN, NaCN inhibitörleri için elde edilen K_i sabitlerini göstermektedir. Tablo'2 de ise CA-II için elde edilen V_{max} ve K_M değerleri verilmektedir.

Tablo 1'den görüldüğü gibi diabetli hasta için hesaplanan K_i değerleri NaClO₄, NaSCN ve NaCN için sağlam şahsa göre yüksek bulunurken, diğer inhibitörlerde önemli bir fark görülmemiştir. NaClO₄ için; ortalama 1,9x10⁻³'den 2,3x10⁻³'e, NaSCN için; 7,1x10⁻⁴'den 9,1x10⁻⁴'e ve NaCN için; 1,2x10⁻⁶'dan 1,5x10⁻⁶'ya yükselmiştir. Tablo 2'den görüldüğü gibi K_M değerleri diabetli hasta ve sağlam şahıs için aynı bulunmuştur. V_{max} değerinde ise bir artış söz konusudur. Toplam glike CA miktarı sağlam şahısta 0,939 mM (1,3 mg protein/ml çözelti) bulunurken, diabetli hastada 2,720 mM (0,92 mg protein /ml çözelti) değeri elde edilmiştir. Bu sonuçlar öncelikle diabetli hastada CA izoenzimlerinin önemli oranda glikasyona maruz kaldığını ve glikasyon sonucunda CA-II'nin katalitik gücünün arttığını göstermektedir. K_M değerinin değişmeyip, çalışılan yarışmasız inhibitörler için bağlanma sabitlerinin (K_i sabitleri) değişmesi glukozun bağlanmasının aktif bölge haricinde gerçekleştiğini göstermektedir. Glukozun bağlanması CA-II izoenziminin inhibitörlere karşı ilgisini azaltmaktadır.

Glike serum protein ölçüm kiti, glike CA-II için de kullanılmıştır. Kit prosedüründe izah edildiği gibi; ölçümün esası, proteine bir ketoamin bağıyla bağlı glukozun, alkali şartlar altında bir tetrazolium boyasını indirgemesine dayanmaktadır. CA-II enzimi saf halde elde edildiğinden bu metodla glikasyonun tesbiti amaca uygundur. CA-II aktivite ölçümünde kullanılan seçimli inaktivasyon literatürde doğruluğu ispatlanmış ve emniyete kullanılmıştır(3,4). Bu sayede fazla zaman kaybetmeden CA izoenzimlerinin saflaştırılması ve kinetik ölçümlerde kullanılması mümkün olmuştur.

Tablo 1. Sağlam şahıs ve diabetli hasta eritrositlerinden elde edilen CA-II izoenzimi için üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda Lineweaver-Burk grafikleri yoluyla bulunan K_i değerleri.

Inhibitör cinsi	[I] (M)	Sağlam şahıs için	Diabetli şahıs için
Sülfanilamid	$0,6 \times 10^{-6}$	$3,6 \times 10^{-6}$	$3,5 \times 10^{-6}$
	$1,2 \times 10^{-6}$	$3,1 \times 10^{-6}$	$3,4 \times 10^{-6}$
	$2,4 \times 10^{-6}$	$3,8 \times 10^{-6}$	$3,5 \times 10^{-6}$
NaCH ₃ COO	$3,0 \times 10^{-4}$	$3,1 \times 10^{-2}$	$3,5 \times 10^{-2}$
	$6,0 \times 10^{-4}$	$3,0 \times 10^{-2}$	$3,4 \times 10^{-2}$
	$1,2 \times 10^{-3}$	$3,5 \times 10^{-2}$	$3,3 \times 10^{-2}$
NaClO ₄	$3,0 \times 10^{-4}$	$2,1 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^{-3}$
	$6,0 \times 10^{-4}$	$1,8 \times 10^{-3}$	$2,4 \times 10^{-3}$
	$1,2 \times 10^{-3}$	$1,9 \times 10^{-3}$	$2,3 \times 10^{-3}$
NaN ₃	$3,0 \times 10^{-4}$	$4,0 \times 10^{-4}$	$4,1 \times 10^{-4}$
	$6,0 \times 10^{-4}$	$3,9 \times 10^{-4}$	$3,8 \times 10^{-4}$
	$1,2 \times 10^{-3}$	$3,6 \times 10^{-4}$	$4,4 \times 10^{-4}$
NaSCN	$3,0 \times 10^{-4}$	$7,0 \times 10^{-4}$	$9,0 \times 10^{-4}$
	$6,0 \times 10^{-4}$	$7,3 \times 10^{-4}$	$8,9 \times 10^{-4}$
	$1,2 \times 10^{-3}$	$7,1 \times 10^{-4}$	$9,4 \times 10^{-4}$
NaCN	$0,96 \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^{-6}$	$1,5 \times 10^{-6}$
	$1,92 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-6}$	$1,6 \times 10^{-6}$
	$3,84 \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^{-6}$	$1,4 \times 10^{-6}$

Tablo 2. Sağlam şahıs ve diabetli hasta eritrositlerinden elde edilen CA-II izoenzimi için Lineweaver-Burk grafikleri yoluyla bulunan K_M ve V_{max} değerleri.

	Sağlam şahıs	Diabetli hasta
K_M (mM)	20,0	20,0
V_{max} (μmol/mg proteinxdak)	2,0	2,5

KAYNAKLAR

1. T.K.Mayer, and Z.R.Freedmann, "Protein glycosylation in diabetes mellitus: A review of laboratory measurements and of their clinical utility", *Clin. Chim. Acta*, 127 (1982), 147-184.
2. T.Kondo, K.Murakami, Y.Ohtsuka, M.Tsuji, S.Gasa, N.Tanaguchi.

- and Y.Kawakami, "Estimation and characterization of glycosylated carbonic anhydrase I in erythrocytes from patients with diabetes mellitus", *Clinica Chimica Acta*, 166 (1987) 227-236.
3. P.O.Göthe and P.O.Nyman, "Inactivation of human erythrocyte carbonic anhydrases by bromopyruvate", *FEBS Letters* , 21, 2 (1972) 402-420.
 4. C.W.Conroy and T.H.Maren, "The determination of osteopetrotic phenotypes by selective inactivation of red cell carbonic anhydrase isoenzymes", *Clin . Chim . Acta* 152 (1985) 347-354.
 5. İ.Küfrevioğlu, "Apokarbonik anhidrazitekrar aktivasyonu ile bazıcut sıvılarında Zn^{2+} tayini". Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi (1985).
 6. U.K.Laemmli, "Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4", *Nature (London)* 227 (1970) 680-685.
 7. J.A.Verpoorte, S.Mehta, J.T.Edsall, "Esteraseactivities of human carbonic anhydrases B and C , *J. Biol. Chem* ., 242, 18 (1967)4221-4229.



MARMARA
ÜNİVERSİTESİ

SIĞIR ERİTROSİT KARBONİK ANHİDRAZ ENZİMİNİN BAZI AKTİF KATYONLARLA İNHİBİSYON KİNETİĞİ

Hasan ÖZDEMİR(*), Ö.İrfan KÜFREVLİOĞLU(*), Nazan DEMİR(*) ve Nuri BAKAN(**)

(*Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Erzurum- Türkiye

(**)Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum- Türkiye

THE INHIBITION KINETICS OF BOVINE ERYTHROCYTE CARBONIC ANHYDRASE WITH SOME ACTIVE CATIONS

SUMMARY

In this study, carbonic anhydrase was purified from bovine erythrocytes by affinity chromatography. The inhibition effects of some cations (Al^{+3} , Mn^{+2} , Sr^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} and Ca^{+2}) were investigated. For three different inhibitor concentrations, average of the K_i values obtained were as follows: 5.22×10^{-4} , 3.26×10^{-3} , 2.34×10^{-3} , 3.29×10^{-3} , 3.30×10^{-3} , 1.70×10^{-3} . The results showed that Al^{+3} exhibits competitive and others noncompetitive inhibitions.

ÖZET

Bu çalışmada sığır eritrositlerinden afinite kromatografisi ile saflaştırılan karbonik anhidraz enzimi üzerine Al^{+3} , Mn^{+2} , Sr^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} ve Ca^{+2} iyonlarının, inhibisyon etkileri araştırılmıştır. Üç farklı sabit inhibitör konsantrasyonu için bulunan ortalama K_i değerleri sırayla $5,22 \times 10^{-4}$, $3,26 \times 10^{-3}$, $2,34 \times 10^{-3}$, $3,29 \times 10^{-3}$, $3,30 \times 10^{-3}$, $1,70 \times 10^{-3}$ bulunmuştur. Al^{+3} kompetitif inhibisyon gösterirken, diğerleri nonkompetitif inhibisyona sebep olmuştur.

GİRİŞ

Karbonik anhidraz (CA) (E.C.4.2.1.1, karbonat hidrolizaz), canlılarda karbondioksitin hidratasyonu ve bikarbonatın dehidratasyonu reaksiyonlarını katalizleyerek solunum olayında önemli bir rol alan çinkolu bir metaloenzimdir. İlk olarak sığır ve insan eritrositlerinde bulunan bu enzimin daha sonra birçok memeli dokularında ve bitkilerde varlığı belirlenmiştir (1,2,3).

Günümüze kadar hayvanlarda üç farklı CA izoenzimi mevcut olduğu kesin olarak belirlenmiştir. CA-I, CA-II ve CA-III şeklinde ifade edilen bu izoenzimlerin hem moleküler yapıları, hem de fizyolojik fonksiyonları hakkında çok ayrıntılı çalışmalar yapılmıştır. Üç izoenzim de sitoplazmada çözülmüş vaziyettedir. Molekül ağırlıkları 28.000 dalton olup, 259 veya 260 amino asitten ibarat tek bir polipeptid zinciri halindedir (3). Sığır eritrositlerinde CA-II izoenzimi mevcuttur. CA-II izoenzimi bilinen CA izoenzimleri içinde en yüksek aktiviteli olanıdır (4).

İnsan ve hayvan bünyesine değişik yollarla giren aktif katyonların bir kısmı (Ca^{+2} gibi) hayati fonksiyonları üstlenirken, bir kısmı da toksik etki göstermektedir. Bu çalışmada Al^{+3} , Mn^{+2} , Sr^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} ve Ca^{+2} katyonlarının siğir CA izoenzimi üzerindeki inhibisyon kinetiği araştırılmıştır.

DENEL BÖLÜM

Karbonik Anhidrazın Siğir Eritrositlerinden Saflaştırılması

Erzurum Belediyesi Mezbahasından kesim esnasında antikoagulant sıvı üzerine alınan siğir kanından önce eritrositler ayrıldı ve % 0,9'luk NaCl çözeltisi ile yıkandıktan sonra destile suda hemoliz edildi. Hemolizat santrifüjlenerek eritrosit zarları uzaklaştırıldı. Sepharose-4B matrisi üzerinde hazırlanan, L-tirozinin uzantı kolu ve sülfanilamidin ligand olarak kullanıldığı afinite jeli yardımıyla karbonik anhidraz enzimi saflaştırıldı (5). Hemolizat ve saflaştırılmış enzim çözeltileri için spesifik aktiviteler belirlenerek 246 kat saflaştırma yapıldığı tesbit edildi. Aynı zamanda SDS-pollakrilamid jel elektroforezli uygulanarak saflaştırma sonunda tek bandın ortaya çıktığı gözlemlendi (6).

Enzim Aktivitesi Tayini

CA enziminin saflaştırılması sırasında enzim aktivitesi, CO_2 'nin hidrasyonu sonucu açığa çıkan H^+ iyonundan gelen pH değişiminin brom timol mavisi indikatörü ile belirlenip geçen sürenin ölçülmesi esasına dayanan, Rickli tarafından modifiye edilmiş Wilbur-Anderson yöntemi kullanıldı (7). Kinetik çalışmalarda CA aktivitesi ölçümleri, enzimin esterez etkisine dayanan yöntemle yapıldı (8). Bu yöntemde CA enzimi substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı p-nitrofenole hidroliz etmekte ve bunun da 348 nm'de absorpsiyonu ölçülmektedir. Tayin işlemlerinde şu yol takip edildi. Kuvartz küvetlere 0,1 ml enzim çözeltisi ($3,1 \times 10^{-9}$ mol) ,1,4 ml 0,05M Tris-SQ pH=7,4 ve 1,5 ml substrat (+inhibitör) konulmasından 3 dakika sonra 25°C'da 348 nm'de köre karşı absorbans okundu. Aktivite ölçümünde kullanılan ana substrat çözeltisi şöyle hazırlandı: 27,2 mg p-nitrofenil asetat 1 ml aseton içinde çözünüp hızlıca karıştırılan 49 ml destile suya yavaş yavaş ilave edildi (3mM).

Kinetik Ölçümler

Inhibitör çalışmaları için aktif katyon tuzları olarak AlCl_3 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{SrCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, HgCl_2 , $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ve $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ seçildi. Inhibitörlü ve inhibitörsüz ortamlarda beş farklı substrat konsantrasyonunda aktiviteler belirlendi. Bu amaçla beş farklı tüpe sırayla 0,5 ml, 0,6 ml, 0,8 ml, 1,0 ml ve 1,2 ml ana substrat çözeltisinden konarak toplam hacim saf su veya inhibitör çözeltileri ile 1,5 ml'ye tamamlandı. Böylece alınan substrat konsantrasyonları reaksiyon ortamında (toplam 3 ml) 0,5 mM, 0,6 mM, 0,8 mM, 1mM ve 1,2 mM oldu. Bütün inhibitörler için 3 farklı sabit inhibitör konsantrasyonunda seçilen bu beş substrat konsantrasyonlarında aktiviteler belirlendi. Aktiviteler $\mu\text{mol} / \text{dak}$ cinsinden ifade edildi (8). Lineweaver-Burk grafikleri çizilerek inhibisyon tipleri ve K_i sabitleri belirlendi.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Seçilen 6 aktif kationun sığır karbonik anhidraz enzimi üzerine inhibisyon etkisi ile ilgili bulunan K_i sabitleri Tablo 1'de verilmiştir.

Tablo 1'den görüldüğü gibi Al^{+3} iyonu kompetitif inhibisyona sahip olup diğer aktif kationlara göre daha düşük K_i sabiti, yani daha yüksek inhibisyon göstermektedir. Mn^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} birbirine yakın K_i sabitlerine sahip olup, Sr^{+2} ve Ca^{+2} 'den daha düşük inhibisyon göstermişlerdir. Ca^{+2} 'nin inhibisyon gücü Sr^{+2} 'den daha fazladır. Bu 5 aktif kation nonkompetitif inhibisyon göstermektedir. Bu tip nisbeten ağır kationların, enzimlerin aktif bölgelerinde gerekli olan sisteinlerin tiyol gruplarına bağlandıkları ve nonkompetitif inhibisyona sebep oldukları literatürde belirtilmektedir. Bu enzim de bu duruma uygunluk göstermektedir. Al^{+3} çalışılan iyonlardan farklılık arz ederek kompetitif inhibisyon gösterdiği görülmektedir. Ağır bir kation olmaması dolayısıyla sisteinlere bağlanmamakta ve aktif bölgeye tutunmaktadır. Literatürde karbonik anhidraz enzimi üzerinde bu iyonların inhibisyon etki mekanizması ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır. Sadece Al^{+3} , Mn^{+2} , Hg^{+2} , Ni^{+2} ve Ca^{+2} iyonları için nisbi inhibisyonları belirtilmektedir (9).

Tablo 1: Sığır eritrosit karbonik anhidraz enzimi üzerinde inhibitör etkisi gösteren 6 farklı aktif kation için elde edilen K_i sabitleri.

Inhibitör cinsi	[I] (M)	K_i (M)	Inhibisyon türü
$AlCl_3$	$3,0 \times 10^{-4}$	$5,55 \times 10^{-4}$	Kompetitif
	$6,0 \times 10^{-4}$	$5,00 \times 10^{-4}$	
	$9,0 \times 10^{-4}$	$5,11 \times 10^{-4}$	
$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	$0,6 \times 10^{-3}$	$3,30 \times 10^{-3}$	Nonkompetitif
	$1,2 \times 10^{-3}$	$3,39 \times 10^{-3}$	
	$1,8 \times 10^{-3}$	$3,10 \times 10^{-3}$	
$SrCl_2 \cdot 6H_2O$	$0,6 \times 10^{-3}$	$2,57 \times 10^{-3}$	Nonkompetitif
	$1,2 \times 10^{-3}$	$2,26 \times 10^{-3}$	
	$1,8 \times 10^{-3}$	$2,18 \times 10^{-3}$	
$HgCl_2$	$0,6 \times 10^{-3}$	$3,15 \times 10^{-3}$	Nonkompetitif
	$1,2 \times 10^{-3}$	$3,33 \times 10^{-3}$	
	$1,8 \times 10^{-3}$	$3,39 \times 10^{-3}$	
$NiCl_2 \cdot 6H_2O$	$0,6 \times 10^{-3}$	$3,00 \times 10^{-3}$	Nonkompetitif
	$1,2 \times 10^{-3}$	$3,31 \times 10^{-3}$	
	$1,8 \times 10^{-3}$	$3,60 \times 10^{-3}$	
$CaCl_2 \cdot 6H_2O$	$0,6 \times 10^{-3}$	$1,66 \times 10^{-3}$	Nonkompetitif
	$1,2 \times 10^{-3}$	$1,71 \times 10^{-3}$	
	$1,8 \times 10^{-3}$	$1,73 \times 10^{-3}$	

KAYNAKLAR

1. M.J.Carter, "Carbonic anhydrase: Isozymes, properties, distribution and functional significance", *Biol . Rev .* 47 (1972) 465-513.
2. T.H.Maren, "Carbonic anhydrase: Chemistry, physiology and inhibition". *Physiol . Rev .* 47 (1967) 595-781.
3. E.E.Keha, Ö.I.Küfrevioğlu, "Karbonik anhidraz: I.İzoenzimleri ve canlılardaki dağılımı", *Biyokimya Dergisi* XIV, 1 (1989), 65-74.
4. R.S.Holmes, "Purification, molecular properties and ontogeny of carbonic anhydrase isozymes. Evidence for A, B and C isozymes in avian and mammalian tissues", *Eur . J . Biochem* 78, (1977) 511-520.
5. İ.Küfrevioğlu, "Apokarbonik anhidrazın tekrar aktivasyonu Hazi vücut sıvılarında Zn^{2+} tayini", Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi, (1985).
6. U.K.Laemmli, "Cleavage of structural proteins during in assembly of the head of Bacteriophage T4", *Nature (London)* 227 (1970) 680-685.
7. E.E.Rickli, S.A.S.Ghazanfar, B.H.Gibbons, J.T.Edsall, "Carbonic anhydrases from human erythrocytes: Preparation and properties of two enzymes" ,*J.Biol.Chem.* 239, 4 (1964) 1065-1078.
8. J.A.Verpoorte, S.Mehta, J.T.Edsall, "Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C ,*J.Biol.Chem.* 242, 18 (1967) 4221-4229.
9. G.M.Christensen, D.Olson, and B.Riedel, "Chemical effects on the activity of eight enzymes: A review and a discussion relevant to environmental monitoring", *Environmental Research* 29 (1982) 247-255.

CANDİDAL LİPAZ İLE TRİOLEİN HİDROLİZİNE ARAYÜZEY ÖZELLİKLERİNİN ETKİSİ

H. İbrahim EKİZ ve Arif ÇAĞLAR

Fırat Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 23279 Elazığ-Türkiye

THE INFLUENCE OF THE INTERFACIAL BEHAVIOR ON THE HYDROLYSIS OF TRIOLEIN BY A CANDIDAL LIPASE

SUMMARY

In the hydrolysis of triolein by the lipase of *Candida cylindracea*, attempts have been made to study the variation of the initial rates of hydrolysis with the amount of enzyme adsorbed at the lipid/water interface.

Experiments have been conducted in a continuously stirred batch reactor containing triolein in the form of emulsion droplets. With reference to the results of adsorption measurement, it was confirmed that the rate of surface reaction is directly proportional with the amount of enzyme adsorbed on emulsion droplets of triolein.

ÖZET

Candida cylindracea lipazı ile trioleinin hidroliz tepkimesinde lipid/su arayüzeyinde adsorbe olan enzim miktarı ile başlangıç hidroliz hızlarının değişimi araştırıldı. Deneyler, trioleinin emülsiyon tanecikleri şeklinde bulunduğu sürekli karıştırılmalı kesikli bir tepkime kabında yürütülmüştür. Adsorpsiyon ölçüm sonuçları yüzey tepkime hızının trioleinin emülsiyon damlacıklarındaki adsorbe olan enzim miktarı ile direkt olarak orantılı olduğunu göstermektedir.

GİRİŞ

Lipazlar gliserin esterlerini hidroliz eden enzimler olarak tanımlanırlar. Lipazların en önemli özelliği hidroliz tepkimesini hidroforik arayüzeylerde yüksek etkinlikle yürütülebilmesidir. Sulu ortamda çözünmeyen sıvı trigliseridler lipazlar tarafından yüksek oranlarda hidrolizlenirlerse de, katı ve sulu ortamda çözünmeyen sıvı trigliseridler daha düşük oranlarda hidroliz edilebilirler (1). Bu çalışmada sıvı trigliseridlerden trioleinin *Candida cylindracea* lipazı ile hidrolizinde,

(triolein/su) arayüzeyine tutunan enzim miktarının hidroliz hızına etkisi araştırılmıştır.

DENEL BÖLÜM

Deneyel Çalışma

Deneyler pH, sıcaklık ve karıştırma hızının denetlenebildiği sürekli karıştırmalı 350 ml kapasiteli kesikli bir tepkime kabında 35 C sıcaklıkta, pH=6'da ve 600 dev/dk. karıştırma hızında yapıldı. Deneylerde 0.01 M fosfat tamponunda hazırlanan *Candida cylindracea* lipazı kullanıldı. Bütün deneylerde ortama 0.137 M NaCl, 3.75×10^{-3} M $CaCl_2$, 2.5×10^{-3} M NaAc, çalışılan derişimde triolein ve enzim çözeltisi eklendi.

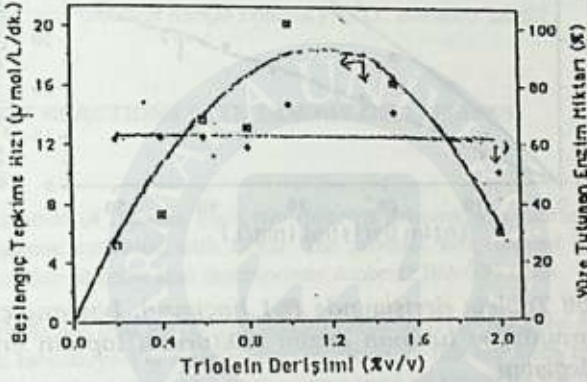
Adsorpsiyon Ölçümü

Yağ/su emülsiyonunda dinamik koşullar altında yani karıştırma devam ederken, tepkime kabı içine daldırılan bir filtreleme düzeneği ile su evresinden örnek alınarak, serbest enzim miktarı ve dolaylı olarak yüze tutunan enzim miktarı belirlendi (2 ve 3). Bu amaçla kullanılan filtreleme düzeneği, tepkime sürerken tepkime kabına daldırılarak örnekler alındı. Alınan örneklerin hacmi, her deneme için sabit olup (30 ml.), içerdikleri enzim miktarını saptamak amacıyla ikinci bir tepkime kabına aktarıldı ve üzerine hacimce %2 tribütirin eklenerek hidroliz hızı saptandı. Daha önceden hazırlanan tepkime hızına karşı enzim derişimi grafikleri yardımı ile örneklerdeki enzim derişimi saptandı. Arayüzeydeki enzim miktarı, enzim derişiminden su evresindeki enzim derişimi çıkarılarak hesaplandı. Tüm kalibrasyon grafikleri ve örnek alma işlemleri, süre ve yöntem açısından standarttır.

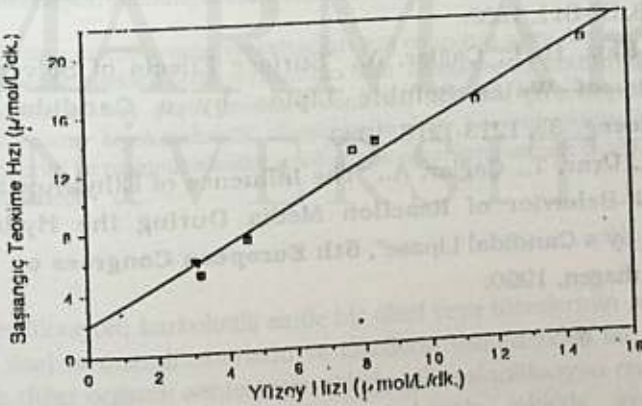
SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Bu çalışmada, arayüzeyin hidroliz tepkimesindeki etkisini deneysel olarak ortaya koymak amacıyla (triolein/su) emülsiyonunda arayüzeye tutunan enzim miktarı ve hidroliz tepkimesinin hızı saptandı. Sabit enzim derişiminde (12.5 mg/l, protein olarak), başlangıç tepkime hızı ve arayüzeye tutunan enzim miktarının triolein derişimi ile değişimi Şekil-1'de görölmektedir. Tepkime hızı %0-1.0 triolein derişimi aralığında artmakta bu derişim aşıldıktan sonra azalmaktadır. Arayüzeye tutunan enzim miktarı ise sabit kalmaktadır. Arayüzeye tutunan enzimin oluşturduğu

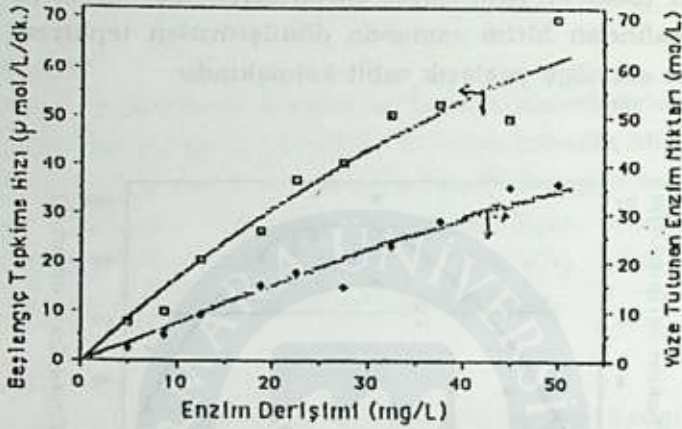
tepkime hızı (=yüzey hızı) ile toplam tepkime hızı arasında doğrusal bir ilişki olduğu saptanmıştır (Şekil-2). Toplam triolein derişimlî sabit tutulduğunda (%1 v/v), aynı ilişki farklı enzim derişimlerinde de görülmektedir (Şekil-3). Arayüzeyde enzim derişiminin artışı ile bir enzim molekölü tarafından birim zamanda dönüştürülen tepkiyen molekölü sayısı (=enzim etkinliği) yaklaşık sabit kalmaktadır.



Şekil-1. Triolein hidrolizinde başlangıç tepkime hızı ve arayüzeye utunan enzim miktarının triolein derişimlî ile değişimlî.



Şekil-2. Triolein hidrolizinde başlangıç tepkime hızının yüzey hızı ile değişimlî.



Şekil-3. Sabit Triolein derişiminde (%1 hacimce), başlangıç tepkime hızı ve arayüzeye tutunan enzim miktarlarının toplam enzim derişimi ile değişimi.

KAYNAKLAR

1. Ekiz, H.İ., Çağlar, A., Uçar, T., "A Rapid equilibrium approach to the Interfacial Kinetics of Lipid Hydrolysis by a Candidal Lipase", *Chem. Eng. J.*, 38, B7-B11, 1988.
2. Uçar, T., Ekiz, H. İ., Çağlar, A., "Surface Effects of Solvents in the Hydrolysis of Water Soluble Lipids by a Candidal Lipase", *Biotech. Bioeng.*, 33, 1213-1218, 1989.
3. Ekiz, H. İ., Uçar, T., Çağlar, A., "The Influence of Ethyl Acetate on the Interfacial Behavior of Reaction Media During the Hydrolysis of Tributyrin by a Candidal Lipase", *5th European Congress on Biotech.*, 244, Copenhagen, 1990.

İMMOBİLİZE LİPAZLARLA ESTERİFİKASYON REAKSİYONLARI

Ayten SAĞIROĞLU *, Azmi TELEFONCU **

* Trakya Üniversitesinde Fen-Edebiyat Fakültesinde Kimya Bölümü Biyokimya Anabilim Dalı
Yrd.Doç.Dr. EDİRNE

** Ege Üniversitesinde Fen Fakültesinde Kimya Bölümü Prof.Dr. Bornova- İZMİR

ESTERIFICATION REACTIONS WITH IMMOBILIZED LIPASES

SUMMARY

Immobilization of Lipases from two different sources was carried out by covalent bonding with agarose activated with CNBr. The product was trapped in a polymeric gel matrix with adsorption to celite and macroporose Amberlite IRA-938 resin.

It was confirmed that immobilize lipases prepared by using the Amberlite IRA 938 are most suitable biocatalysts of esterification reactions. In this reactions isovaleric acid with racemic and nonracemic pentanol isomerises were used as reactants. By immobilize lipases stereospecific esters were synthesized and thus resolution of racemic alcohols was achieved, and also nonracemic alcohols was obtained esterification.

ÖZET:

İki çeşit lipaz enzimi; CNBr ile aktive edilmiş agarozla kovalent bağlanarak, akrilamid ve Bis'ten hazırlanan polimer matrikse tutuklanarak Celite ve Amberlite IRA 938 reçinesine adsorbsiyon yöntemiyle immobilize edildiler.

Bunlardan esterifikasyon reaksiyonları için en uygun olanı Amberlite IRA 938 poröz reçinesine immobilize edilen lipaz preparatları oldu. Reaksiyonlar izovalerik asit ile rasemik ve rasemik olmayan beş çeşit pentanol izomerleri arasında gerçekleşti. Hazırlanan immobilize lipazların biyokatalizör olarak kullanıldığı bu reaksiyonlarda stereospesifik esterler sentezlendi ve rasemik alkoller resolusyona uğrarken rasemik olmayan alkollerde de esterleşme gözlemlendi.

GİRİŞ

Esterifikasyon; karboksilli asitle bir alkol veya türevlerinin reaktant olarak kullanıldığı özel ve önemli esterlerin ve alkollerin sentezlendiği bir süreçtir (1-5) günümüzde diğer organik sentezlerde olduğu gibi esterifikasyon reaksiyonlarında da enzimler bazı önemli avantajları nedeniyle sıklıkla kullanılmaktadır (8,10,11,12). Özellikle esteraz ve lipaz enzimlerinin spesifikleri ve selektivitelerinden yararlanarak diğer kimyasal yöntemlerle eldesi zor ve pahalı olan ticari öneme sahip ürünlerin elde edilmesi amacıyla uygulanmaktadır (6,9). Serbest enzimlerin yumuşak koşullar gerektirmesi, hassas spesifikite ve

selektiviteyi yanında, katalizlediği reaksiyonun hızını 10^{12} kat artırılabilir. Ancak uygulamada sudaki çözünürlükleri nedeniyle reaksiyon ortamından ayrılma güçlüğü ve denatürasyon sorunları ortaya çıkar. Bunun için serbest enzimler yerine inert desteklere immobilize edilmiş enzimlerin katalizör olarak kullanımı tercih edilmektedir.

Genellikle çift fazlı ortamda yapılan çalışmalardan birinde polietilen glükole (PEG) immobilize edilmiş *Pseudomonas Fragi* lipazı ile terpen alkollerinin esterleri sentezlenirken, asitlerde karbon sayısının artışı verimi arttırmaktadır (7). İki çeşit lipaz katalizörlüğünde (+) sulcatol'un esterifikasyon yoluyla resolusyonunu da Thomas ve araştırma gurubu gerçekleştirmiş tir(13) .

Lipazlar gliserin esterlerini hidrolizleyen enzimler olarak tanınırlar. En önemli özellikleri hidroliz tepkimelerini hidrofobik ara düzeylerde yüksek etkinlikle yürütebilmesidir. Bunu ilk kez Willstätter ve çalışma gurubunca belirlenmiştir (14). Yapılan araştırmalar sonunda lipazların su içeriği düşük organik ortamlarda hidrolizin tersini yani esterleşmeyi gerçekleştirdiği tespit edilmiştir. Reaksiyon ortamı enzimin cinsine göre değişen, düşük su içerikli organik çözücülerden oluşan çift fazlı sistem olup, su enzimi koruyan, reaksiyonu kolaylaştıran faktördür. Su içeriğinin artması reaksiyonun hidroliz lehine azalması, esterifikasyonun lehine olur(10,15). Ancak özellikle esteras aktivitesinin maksimum değerine organik ortamın su içeriğinin önceden optimizasyonu ile ulaşılacağı unutmamalıdır.

Sentetik pyrethroidler insektisit olarak kullanılmakta olup, asıl insektisit aktiviteyi enantiomerlerden biri gösterir. Bir Japon araştırma gurubu enzimatik hidrolizle aktif enantiomeri ayırmayı başarmıştır(16).

Değişik araştırma gurupları tarafından immobilize lipazlar transesterifikasyon(3,6), interesterifikasyon(17,18), esterifikasyon ve hidroliz reaksiyonlarında başarıyla kullanılmışlardır(9,19).

Biz çalışmamızda Domuz pankreatik lipazı ve *Candida Cylindracea* lipazını, Amberlit IRA 938 reçinesine immobilize ederek izovalerik asitle beş çeşit pentanol izomeri arasındaki esterifikasyon reaksiyonlarında katalizör olarak kullandık. Rasemik alkollerden optikçe aktif ester ve alkollerin sentezlendiğini belirledik. Diğer alkollerden de daha düşük oranda esterler sentezlendi.

DENEYSEL BÖLÜM:

MATERYAL

İzomer pentanoller, izovalerik asit, lipazlar agaroz, gum arabik, sodyum deoksikolat, CNBr, Sigma Chem. Co,dan; silikajel 60 HF, Folin belirteci, Akril amid, Bis, Tween 85, İzo oktan. Merk'ten; Amberlite IRA 938 AG. Rohmand Haes'ten temin edildi.

Jena polarimetresi, Abbe refraktometresi, Quick fit mini destilasyon takımı, pH—stat, Shimatzu IR-400 spektrofotometesi analizler için kullanılan aletlerdir.

YÖNTEM

Candida Cylindracea lipazı (CCL) ve domuz pankreatik lipazı (PPL) dört ayrı desteğe sırasıyla kovalent bağlanarak, tutuklanarak ve adsorbasyonla immobilize edildiler. Her birinin protein içeriği, hidrolaz ve esteraz aktiviteleri belirlendi. Sonuçlar tablo 1.1'de görülmektedir.

Preperatların protein içeriği Lowry yöntemi ile, hidrolaz aktivitesi, zeytinyağı substratına karşı pH-statta 0.01 N NaOH sarfiyatından hesaplandı. Esteraz aktivitesi fosfat tamponuyla (0.1 M pH: 7.4) doymun izovalerik asit ve n-butanolun (v/v) 3:2 oranındaki karışımına hazırlanan immobilize enzimler eklenerek 37°C de 16 saat çalkalandı. Reaksiyon karışımının gaz kromatografik analiz sonuçlarından hesaplandı.

Tablo 1.1 İmmobilize Lipazların karakterizasyonu

Taşıyıcı	Lipaz	Protein içeriği mg/g (enz-taş)	Hidrolaz Ak. 37°C pH:9 U/mg	Esteraz Ak. U/mg
CNBrK agaroz	PPL	224.4	2.4×10^{-4}	0.0
Akrilamid B5Polemını	CCL	57.9	0.384	— ^a
Celıt	CCL	19.6	0.52	— ^b
Amberlit IRA 938	PPL	473	3.08	0.045
"	CCL	330	0.49	0.052

a) Polimerin jelleşmesinden dolayı ölçülemedi.

b) Celiten enzimin kaçışı fazlalığından ölçülemedi.

Esterifikasyon reaksiyonları 0.1M pH:7.4 lük fosfat tamponuyla doyurulmuş izooktan içinde izovalerik asit ve 2-pentanol, 2-metil-1- butanol, 3-metil-2-butanol, 3-pentanol, neopentil alkol izomerleri arasında hazırlanan immobilize enzimler katalizatorlüğünde 35-37°C, atmosferik basınçta 82 saat çalkalanarak gerçekleştirildi. Enzimler vakumlu filtrasyonla ayrıldı. Artan izovalerik asit der. NaOH ile tuz yapılarak çekildi. Kalan reaksiyon karışımını fraksiyonlu destilasyonla ayrıldı.

Ürünlerin çevirme açıları Jena polarimetrestyle, kırma indisleri Abbe refraktometrestyle ölçüldü. Kaynama noktaları destilasyon sırasında belirlendi. Ürünlerin diğer analizleri, ince tabaka kromatografisi (TLC) ile Silikajel 60 HF adsorbantı, petrol eteri; dietileter; G.asetik asit (3:2:1 damla) çözücü sistemi ve % 3.3'lük derişik H₂SO₄'te KMnO₄ çözeltisi belirteci kullanılarak yapıldı. İnfrared spektrofotometrestyle (IR- 400 Skimatzu) ile de ürün analizleri gerçekleştirildi.

Sonuçlar Tablo 1.2'de gösterilmiş tir.

Tablo 1.2 Immobilize Lipazlarla bifaizik ortamda esterifikasyon

Reaksiyon	Imm. Enzim	Alkol	Reaktif olmayan alkol izomeri					Yeni Esterler				
			K.n.°C (mm Hg)	Ürün g	Saflık %	α_D^{30} (c 10 eter)	K.n.°C (mm Hg)	Ürün g	Saflık %	α_D^{30} (c 10 eter)		
A ₁	CCL	(±) 2-pentanol	118	0.32	95	-12.5	170	2.2	65	+13		
B ₁	PPL		119	1.4	85	-12.3	172	1.5	80	+13.2		
A ₂	CCL	(±) 2-Metil -1- butanol	129	1.8	60	-3.5	165	1.9	90	+3.9		
B ₂	PPL		130	1.4	73	-3.6	165	1.5	85	+3.8		
A ₃	CCL	(±) 3-Metil -2- butanol	112	1.3	75	-4.8	168	2.8	85	+5		
B ₃	PPL		111	1.6	70	-4.0	167	2.8	70	+4.6		
A ₄	CCL	3-pentanol	—	—	—	—	174	1.2	88	—		
B ₄	PPL		—	—	—	—	173	1.2	90	—		
A ₅	CCL	Neopentilalkol	—	—	—	—	159	0.8	70	—		
B ₅	PPL		—	—	—	—	159	0.7	73	—		

Reaksiyonlar: 10 ml izooktana 4ml İzovalerik asit ve her alkolden 3ml, neopentil alkolden 2 g ve her birinden 150 mg enzim eklenerek metinde belirtilen şartlarda gerçekleştirildi.

TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Lipazların dört ayrı desteğe üç değişik yöntemle immobilizasyonları sonunda elde edilen preparatlardan Tablo 1.1'de görüldüğü gibi Amberlit IRA 938 immobilize edilen lipazların her ikisinde hidrolaz hemde esteraz aktiviteleri bakımından, hidroliz, esterifikasyon, transesterifikasyon, interesterifikasyon reaksiyonlarında biyokatalizator olarak başarıyla kullanılabileceği belirlendi. Celite immobilize lipazda hem protein içeriği hemde hidrolaz aktivitesi yeterli bulunduğu halde enzim taşıyıcı zayıf adsorbisyon bağı nedeniyle reaksiyon ortamına taşıyıcıdan enzim kaçıışı yüksek bulunduğundan kullanılmadı.

Esterifikasyon reaksiyonlarında immobilize CCL ve PPL'in her ikisi de tatminkar katalitik aktivite gösterdiler. İzomer pentanollerde esterleşme oranı bakımından önemli bir fark gözlenmedi. Neopentil alkol'de her iki lipaz varlığında esterleşme en düşük oranda bulundu. Bu sonuçlar literatür değerleriyle uyumludur(4).

Sonuç olarak görüldü ki immobilize CCL ve PPL enzimlerinde düşük sulu organik ortamda esterifikasyon reaksiyonlarında başarıyla biyokatalizator olarak kullanılabilirler. Eğer optikçe aktif alkoller kullanılıyorsa bunların en antiomerlerine spesifik olarak etkileyip resolusyona uğratur, enantiomer alkol ve stereospesifik ester sentezi gerçekleştirilebilir. Böylece gelecekte pahalı ve yetersiz kiral madde sıkıntısına alternatif bir çare olduğu gibi çoğu ekonomik olmayan organik sentezlerin, daha kolay koşullarda düşük maliyetle yapılması mümkündür.

KAYNAKLAR

- 1- G.M.Whiteides, C.H.Wong "Enzymes as Catalysts in Synthetic Organic Chemistry" *Anqew. Chem Int. Ed. in English*, 24 6 (1985) 617-718
- 2- A.M.Klibanov B.Cambou "Unusual Catalytic Properties of Usual Enzymes" *Ann. New York Acad. Sci.*, VI (1984) 219-223
- 3- B.Cambou, A.M.Klibanov "Preparative Production of Optically Active esters and Alcohols Using Esterase Catalyzed Stereospecific Transesterification in Organic Media" *J.Am.Chem.Soc.*, 106 (1984) 2687-2692
- 4- A.Zaks,A.M.Klibanov "Enzymatic Catalysis in Organic Media at 100°C" *Science*, 224 (1984) 1249-1251
- 5- A.L.Battersby "Stereospecific Synthesis Using Enzymes" *Chemistry in Britain*, 20.(1984) 611-616
- 6- A.Sağıroğlu, A.Telefoncu "İmmobilize Lipazlarla Stereospesifik Ester Sentezleri ve Rasemik Alkollerin Resolusyonu". (Ph D Thesis), Ege Ün. Fen Bil.Ens. Dergisi 1992
- 7- T.Nishio, T.Takahashi, Y.Yoshimoto, Y.Saito, Y.Inada "Terpene Alcohols

Synthesis by Polyethylen Glycol Modified Lipase in Benzene" **Biotechnol Lett.**, 9 3 (1987) 187-190

8- G.Lazar, A.Weiss, R.D.Schmind "Synthesis Esters by Lipase" **Henkal Referate**, 22/Int 22 (1986) 5-11

9- B.Cambou, A.M.Klibanov " Collnesteras- Catalyzed resulting D,L carnitine" **Biotechnol. Bioeng**, 26 (1984) 1449-1454

10- I.L.Gatfield "The Enzymatic Synthesis of Esters in.Nonaqueous System" **Ann New York Acad of Sci.B.** (1987) 569-572

11- J. Halling "Lipid Modifications by lipases" **Enzyme. Microb. Technol.** 6.(1984) 513-520

12- M.Iwai, S.Okumuro " Synthesis of Terpene Alcohol Esters by Lipase" **Agric.Biol.Chem.**, 44 (1980) 2731-2732

13- H.M.Stokes, A.C.Oehlschlager "Enzyme Reaction in Polar Solverts: The Resolution of (±) Sulcatol With Porcine Pancreatic Lipase" **Tetrahedron Lett.** 28 19 (1988) 2091-294

14- R.Willstatter, L.E.Waldschmidt, F.Memmen " Properties of Lipases " **Z.Physiol.Chem**, 125 (1923) 93-100.

15- M.Iwai, Y.Tsu Jisaka "Lipases" B.Borgström, H.L.Brockmann Ed. **Elsevier New York** (1984) 443-460

16- H.Hirohara, S.Mitsuda, E.Ando, R.Komaki "Enzymatic Preparation of Optically Active Alcohols Related to Syntetic Pyrethroids Insecticides" **Elsevier. Sci. Publ.B.U. Amsterdam-Printed the Nederland** (1986) 119-134

17- T.Aydemir, A.Telefoncu " İmmobilize Lipazlarla Yağların İnteresterifikasyonu " (Ph D Thesis) Ege Ün.Fen Bil.Ens.Dergisi (1991)

18- K.Yokozeki, Y.Yamanaka, K.Takinami, Y.Hiros A.Tanaka, K.Sonomoto, S.Fukui " İnteresterification of fats " **Eur.J.AppL.Microbiol.Biotechnol.** 14 (1984) 1-5

19- H.İ.Ekz, T.Uçar, A. Çağlar "The Effects of Alcohols on the hydrolysis of Triacetin and Tributyrin by a Candidal Lipase" **The Journal of Fırat Ün.** 2 (1) (1987) 31-38

KUŞBURNU MEYVASINDAN İZOLE EDİLEN POLİFENOL OKSİDAZ ENZİMİNİN SUBSTRAT SPESİFİTE

Halis ŞAKİROĞLU (*), Ö.İrfan KÜFREVLİOĞLU(*) ve Münir OKTAY (**)

(*) Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Erzurum-Türkiye

(**) Atatürk Üniversitesi, Kazım Karabekir Eğitim Fakültesi Fen Bilimleri Eğitimi Bölümü, Kimya Anabilim Dalı, Erzurum-Türkiye

SUBSTRATE SPECIFICITY OF POLYPHENOL OXIDASE ISOLATED FROM DOG-ROSE

SUMMARY

This study was done to define substrates for polyphenol oxidase (PFO) which is isolated from dog-rose. For this reason, optimum pH and optimum temperature conditions were determined to define K_M and V_{max} values for 8 various substrates. Activity measures were done in 5 different substrates concentrations in optimum conditions. K_M values were found for catechol, 4-methyl catechol, L-dopa, dopamine, gallic acid, pyrogallol, L-tyrosine, and p-cresol : $7,41 \times 10^{-3}$ M, $8,64 \times 10^{-3}$ M, $6,06 \times 10^{-4}$ M, $2,82 \times 10^{-3}$ M, $2,64 \times 10^{-3}$ M, $2,79 \times 10^{-3}$ M, $8,27 \times 10^{-4}$ M ve $8,63 \times 10^{-5}$ M respectively; and V_{max} values for substrates above 41,66, 431,96, 45,45, 42,48, 111,11, 111,73, 142,85 and 40,00 $\Delta O.D. / ml \cdot min$, respectively.

ÖZET

Bu araştırmada kuşburnu meyvasından izole edilen polifenol oksidaz enziminin substratlarının belirlenmesine çalışılmıştır. Bu amaçla, 8 ayrı substrat için K_M ve V_{max} değerlerini belirlemek üzere optimum pH ve optimum sıcaklık şartları tesbit edildi. Optimum şartlarda 5 farklı substrat konsantrasyonunda aktivite ölçümleri yapıldı. K_M değerleri katekol, 4-metil katekol, L-dopa, dopamin, gallik asit, pirogallol, L-tirozin ve p-kresol için sırasıyla $7,41 \times 10^{-3}$ M, $8,64 \times 10^{-3}$ M, $6,06 \times 10^{-4}$ M, $2,82 \times 10^{-3}$ M, $2,64 \times 10^{-3}$ M, $2,79 \times 10^{-3}$ M, $8,27 \times 10^{-4}$ M ve $8,63 \times 10^{-5}$ M; V_{max} değerleri ise aynı şartlar için 41,66, 431,96, 45,45, 42,48, 111,11, 111,73, 142,85 ve 40,00 $\Delta O.D. / ml \cdot dak$ olarak bulundu.

GİRİŞ

Kuşburnu meyvası (*Rosa dumalis*), Türkiye'nin Doğu Anadolu Bölgesinde bol miktarda yetişir. Bu türün meyvaları, diğer türlere göre daha etli ve daha büyüktür. Bu yüzden meyva suyu, reçel ve marmelat yapımında kullanılır; hatta çiğ olarak tüketilir. Polifenol oksidaz enzimi (PFO) (E.C.1.10.3.1), çoğu meyvalarda olduğu gibi, kuşburnu meyvasında da enzimatik kararmaya sebep olmaktadır. Her meyva ve sebze türünün PFO enziminin polifenolik maddelerden sadece belirli yapıda olanları etkilemesi substrat spesifikliğı olayının varlığını gösterir (1). Meyva ve sebzeler birçok çeşit fenolik madde ihtivaetmesine

karşılık bunların sadece bir bölümü PFO substratı olarak iş görürler. Değişik kaynaklı PFO'lar farklı fenolik substratlarla değişik aktivite gösterirler. Meyvalarda bulunan PFO'ların en önemli tabii substratlarının katekinler, sinamik asit esterleri , 3,4-dihidroksi fenilalanin (dopa) ve L-tirozin olduğu belirtilmiştir (2).

PFO'nun substrat spesifikliğı elmalarda , armutlarda , üzümelerde , şeftalilerde, muzlarda, hurmalarda, mangolarda, kiwi meyvalarında ve patateslerde araştırılmıştır (1, 3,4,5,6)

Bu çalışmada, ilk defa tarafımızdan kuşburnu meyvasında mevcut olduğu belirlenen PFO enzimi izole edilerek substrat spesifikliğı incelendi.

DENEL BÖLÜM

Enzim Ekstraksiyonu

Kuşburnu meyvaları Atatürk Üniversitesi kampüsünde yetişkin haldeki bitkilerden Eylül ve Ekim aylarında toplandı ve incelemelerde kullanılıncaya kadar 4°C'de depo edildi.

20 g kuşburnu meyvası 100 ml % 0,5 polietilenglikol ve 10 mM askorbik asit ihtiva eden 0,5 M fosfat tamponu (pH=7,3) içinde homojenize edildi. Homojenat süzme işleminden sonra 48.000 xg 'de 5°C'de 1 saat süreyle soğutmalı santrifüjle santrifüj edildi. Elde edilyen süpernatant amonyum sülfatla % 80 doygunluğa getirilerek aynı şartlarda tekrar santrifüj edildi. Çökelek 5 mM fosfat tamponunda (pH=6,3) çözülerek aynı tampona karşı 3-4 defa değiştirilmek suretiyle 24 saat süreyle diyaliz edildi. Bu ekstrakt enzim kaynağı olarak kullanıldı.

Polifenol Oksidaz Aktivitesi Ölçümü; K_M ve V_{max} Değerlerinin Tesbiti

Substrat spesifikliklerinin belirlenmesi için yapılan PFO aktivite ölçümlerinde, spektrofotometrik metod kullanıldı ve absorbans ölçümleri 420 nm dalga boyunda gerçekleştirildi (7). Aktivite ölçümü için 0,1 ml enzim, 2,9 ml tampon+substrat çözeltisine (0,2M fosfat tamponu pH 5-7 aralığında; 0,2M Tris tamponu pH 7-8,5 aralığında; 2,5-10 mM substrat konsantrasyonlarında) ilave edildi. 30 saniyelik zaman aralıklarında absorbans artışı kaydedildi. Aktivite birimi , 1 dakikada 0.001 absorbans artışına sebep olan enzim miktarı olarak tarif edildi.

PFO'nun 8 farklı substratı için optimum pH ve sıcaklık belirlenerek bu şartlarda en az 5 farklı substrat konsantrasyonu için aktiviteler bulundu. Lineweaver-Burk grafikleri yoluyla K_M ve V_{max} değerleri hesaplandı.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Kuşburnu PFO enziminin 8 farklı substratı için optimum pH, sıcaklık, K_M ve V_{max} değerleri Tablo 1'de gösterilmiştir.

Sonuçlar incelendiğinde bu çalışmada kullanılan kuşburnu meyvasından izole edilen polifenol oksidazın, düşük sıcaklıklarda monohidroksifenollere göre dihidroksifenoller üzerinde daha etkili oldukları anlaşılmaktadır. Monohidroksifenoller üzerinde ise yüksek sıcaklıklarda etkilidir. Literatürde monohidroksifenoller için enzimin düşük sıcaklıklarda fazla etkili olmadığı belirtilmiştir. Ancak yüksek sıcaklıklarda çalışma yapılmamıştır. Çalışmamızda kullandığımız substratlardan dihidroksifenollerin optimum pH'larının 8'in üstünde, monohidroksifenollerin ise 7'nin altında oldukları tesbit edilmiştir. Vámos-Vigyazo derleme makalesinde birçok meyvalarda PFO'nun en aktif olduğu pH kesrinin 4-7,3 arasında olduğu, yalnız yabancı havuç kökünde L-dopa substratına karşı 8,6 olduğunu belirtmiştir (2). Kuşburnudan izole ettiğimiz PFO için bulduğumuz değer farklılık arz etmektedir. Kuşburnu PFO enziminin çalışılan substratlar içinde

dihidroksifenollerden L-dopa'ya , monohidroksifenollerden p-kresol'e ilgisinin diğerlerine göre daha büyük olduğu görülmektedir. Enzimin üzerinde en etkili olduğu substrat 4-metil katekol olduğu anlaşılmıştır.

Tablo 1. Kuşburnu polifenol oksidaz enziminin substrat spesifitesi ile ilgili bulunan sonuçlar.

Substrat	Optimum pH	Optimum sıcaklık°C]	K _M (M)	V _{max} (Δ O.D./ mlxdak)
Katekol	8,5	25	7,41x10 ⁻³	41,66
4-Metil katekol	8,5	20	8,64x10 ⁻³	431,96
L-Dopa	8,0	45	6,06x10 ⁻⁴	45,45
Dopamin	8,5	45	2,82x10 ⁻³	42,48
Gallik asit	8,8	35	2,64x10 ⁻³	111,11
Pirogallol	7,0	15	2,79x10 ⁻³	111,73
L-Tirozin	7,0	65	8,27x10 ⁻⁴	142,85
p-Kresol	5,0	60	8,63x10 ⁻⁵	40,00

KAYNAKLAR

1. S.Swimmer, **Source Book of Food Enzymology** AVI Publ. Co., Inc., Westport, CT. (1981).
2. L.Vamos-Vigyazo, "Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables", *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 14 (1981) 49-123.
3. M.A.M.Galeazzi, V.C.Sgarbieri, an S.M.Constantinides, "Isolation, purification and physicochemical characterization of polyphenoloxidases (PPO) from a dwarf variety of banana", *J.Food Sci.* 46 (1981) 150-155.
4. S.Hasegawa and V.P.Maler, "Polyphenol oxidase of dates", *J.Agric. Food Chem.* 28 (1980) 891-893.
5. E.Y.Park and B.S.Luh, "Polyphenol oxidase of kiwifruit", *J.Food Sci.* 50 (1985), 678-684.
6. M.Oktay, "Amasya Elmasından İzole Edilen Polifenol Oksidaz Enziminin Kinetik ve Elektroforetik Özelliklerinin Araştırılması"(Doktora Tezi), Atatürk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü(1992).
7. K.Söderhall, I.Carlberg, and T.Eriksson, "Isolation and partial purification of prophenoloxidase from *Daucus carota* L.Cell cultures", *J. Plant Physiol.* 78 (1985) 730-733.

DENEL BÖLÜM

PHEMA PARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI

PHEMA partiküller, 2-hidroksietilmetakrilat (HEMA) monomerinin etilenglikol-dimetakrilat (EGDMA) ile çapraz bağlanma reaksiyonu sonucu hazırlanmıştır. Bu çalışmada Peppas ve Muller tarafından geliştirilen Kiremitçi tarafından modifiye edilen [17] "faz dönüşüm polimerizasyonu" kullanılmıştır. PHEMA partiküllerin hazırlanmasında aşağıdaki yöntem izlenmiştir: Monomer dağıtma ortamı olarak kullanılan MgO çözeltisi hazırlanmış ve polimerizasyon reaktöründe 70°C'da 500 devir/dakika (rpm) hızda 1 saat karıştırılmıştır. Başlatıcının (AIBN), monomer içinde çözülmesi ve çapraz bağlayıcı EGDMA eklenmesiyle hazırlanan karışım uygun oranda bütanol ile karıştırılıp ortama polimerizasyon başlatılmış ve karıştırma hızı 400 rpm'e düşürülmüştür. Polimerizasyon 3 saat 70°C'da sonraki 1 saat 90°C'da devam ettirilmiştir. Bu süre sonunda polimerizasyon tamamlanmış ve ortam 1 saat süreyle karıştırılarak soğutulmuştur. Polimerik partiküller 2 N'lık HCl ile safsızlıklar polimerik yapıdan uzaklaştırılmıştır. Polimerizasyon koşulları Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Faz Dönüşüm Polimerizasyon Koşulları.

Bileşen	PHEMA
HEMA (ml)	35
EGDMA (ml)	5
n-Bütanol (ml)	5
Su (ml)	450
AIBN (mg)	50
MgO (g)	5.0
Sıcaklık (°C)	90
Karıştırma Hızı (rpm)	150

PHEMA PARTİKÜLLERİN CNBr AKTİVASYONU

Çalışmanın ilk bölümünde PHEMA partiküllerin yüzeyindeki hidroksil grupları CNBr ile aktive edilerek yüzeyde proteinlerin bağlanabileceği aktif bölgeler yaratılmıştır. Aktivasyonda izlenen yöntem şöyledir: PHEMA mikrotasıyıcılar 500 ml su ve 1000 ml 0.1 M NaHCO₃ ile yıkanır ve polimerik partiküllerin denge şişme değerine ulaşması için 1 saat suda bekletilir. Aktivasyon reaktörüne CNBr çözeltisi (10 mg CNBr/ml) eklenir ve 2 M NaOH ile pH 11.5'e ayarlanır ve 10 dakika bu değerde sabit tutulur. Polimerik partiküller ortama eklenerek aktivasyon başlatılır. Karıştırma işlemi ise manyetik olarak gerçekleştirilir. Aktivasyon +4°C'da 60 dakika sürdürülür. Aktivasyon sonunda tepkimeye girmeyen CNBr ve tepkime yan ürünlerinin uzaklaştırılması için polimerik partiküller önce FeCl₃ ve etanolün daha sonra soğuk su ve 0.1 M NaHCO₃ ile yıkanır.

COLLAGEN İMMOBİLİZASYONU

Collagen immobilizasyon deneyleri kesikli sistemde gerçekleştirilmiştir. Immobilizasyon reaktörü 200 ml hacminde pyrex camdan yapılmış dıştan ceketli bir sistemdir. CNBr aktive polimerik partiküller collagen çözeltisi içeren reaktöre eklenerek immobilizasyon işlemi başlatılır. Ortam sıcaklığı, reaktör ceketinden sabit sıcaklıkta su dolaştırılarak sabit tutulur. Immobilizasyon reaktöründeki collagen çözeltisi bir manyetik karıştırıcı ile 50 rpm sabit karıştırma hızında sürekli karıştırılmıştır. Immobilizasyon deneyleri yapılan ön denemeler ışığında pH 9.5'ta NH₄OH-NH₄Cl tamponunda sisteminde gerçekleştirilmiştir. Başlangıç collagen konsantrasyonu 0.1-2 mg/ml arasında değiştirilmiştir. Immobilizasyon işlemi 20°C'da, 40 rpm karıştırma hızında 4 saat devam ettirilmiştir. Bu süre sonunda PHEMA taşıyıcıya immobilize olan collagen miktarı başlangıç ve son durum arasındaki azalma farkı UV spektrofotometre ile izlenerek (λ: 230 nm) bulunmuştur.

FIBRONEKTİN İMMOBİLİZASYONU

CNBr aktive edilmiş PHEMA mikrotasıyıcılar manyetik karıştırılabilir bir sistemde (collagen immobilizasyonunda kullanılan immobilizasyon sisteminde, Şekil 1) fibronektin çözeltisi ile etkileştirilir. Immobilizasyon deneyleri pH 7.4'de fosfat tamponda gerçekleştirilmiştir. Başlangıç collagen konsantrasyonu 50-300 µg/ml arasında değiştirilmiştir. Immobilizasyon işlemi 20°C'da, 40 rpm karıştırma hızında 4 saat devam ettirilmiştir. Bu süre sonunda PHEMA taşıyıcıya bağlanan fibronektin miktarı başlangıç ve son durum arasındaki azalma farkı UV spektrofotometre ile izlenerek (λ: 220 nm) bulunmuştur.

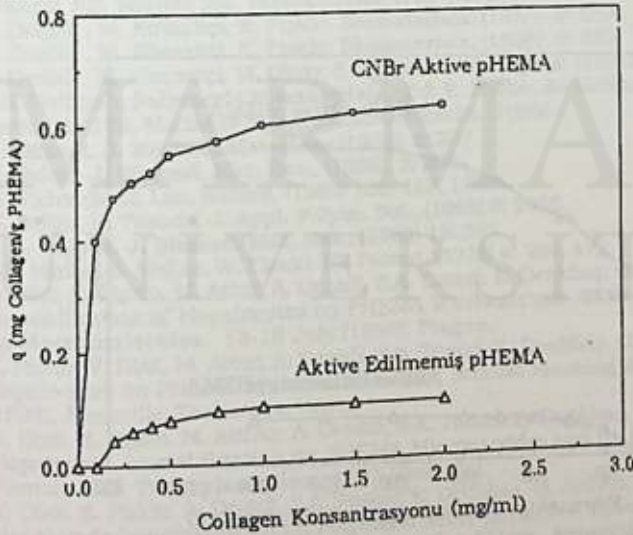
SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu bölümde, collagen ve fibronektin immobilizasyonuna collagen ve fibronektin başlangıç konsantrasyonunun etkilerinin araştırıldığı çalışmaların sonuçları verilmiştir. PHEMA partiküllerin spesifik immobilizasyon kapasitelerininin daha iyi değerlendirilmesi için PHEMA partiküllerin, collagen ve fibronektin non spesifik adsorpsiyon kapasiteleri de belirlenmiş ve sonuçları tartışılmıştır.

COLLAGEN İMMOBİLİZASYONU

İdeal bir biyoselektif matrikste aranılan özelliklerin başında liganın polimerik yüzeye CNBr aktive edilmiş fonksiyonel gruplar üzerinden bağlanması istenir. Bu aktive bölgeler dışında polimeri yapıya ligan adsorpsiyonu non-spesifik etkileşim olarak adlandırılır ve ideal biyoadsorbanda istenmeyen bir özelliktir.

Şekil 1'de PHEMA partiküllere spesifik ve non spesifik collagen adsorpsiyon kapasitelerinin collagen başlangıç konsantrasyonu ile değişimi verilmektedir. Görüldüğü gibi aktive edilmemiş PHEMA partiküllere non spesifik collagen adsorpsiyonu oldukça düşüktür. CNBr aktive PHEMA partiküllerde ise collagen immobilizasyonu collagen başlangıç konsantrasyonunun artması ile önce artmakta, 0.5 mg/ml değerinden sonra değişmeden sabit kalmaktadır. PHEMA partiküllere spesifik bağlanan collagenin sızma test deneyleri yapılmış ve PHEMA ile collagen arasındaki kovalent bağın kararlı olduğu belirlenmiştir.

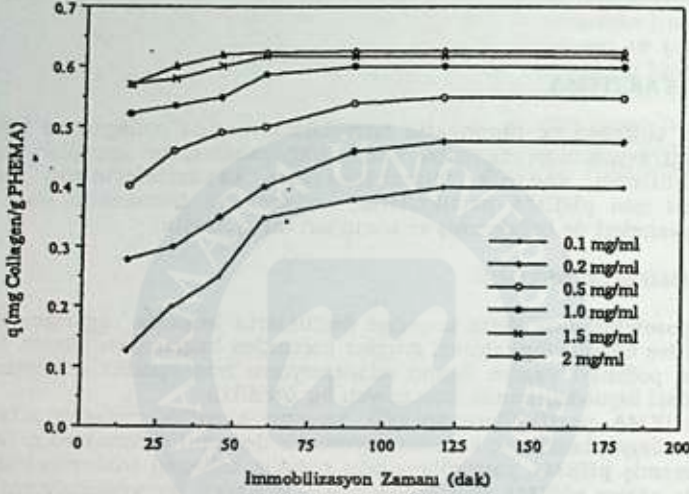


Şekil 1. Collagen Adsorpsiyon İzotermi.

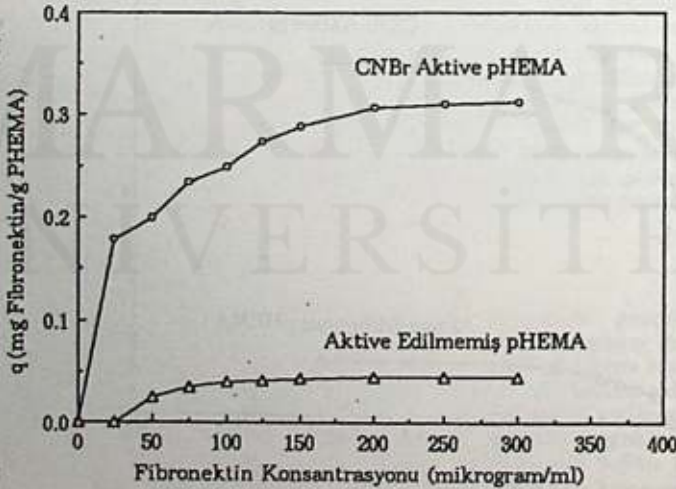
Şekil 2'de ise CNBr aktive PHEMA partiküllere spesifik collagen immobilizasyonu zamanın fonksiyonu olarak görülmektedir. Collagen konsantrasyonunun artması ile immobilizasyon hızı artmaktadır. Yaklaşık 1 saat içinde immobilizasyon tamamlanmakta ve bu süreden sonra değişmeden kalmaktadır.

FİBRONEKTİN İMMOBİLİZASYONU

Şekil 3'de pHEMA partiküllere spesifik ve non spesifik fibronektin adsorpsiyon kapasitelerinin fibronektin başlangıç konsantrasyonu ile değişimi verilmektedir. Görüldüğü gibi aktive edilmemiş pHEMA partiküllere non spesifik fibronektin adsorpsiyonu oldukça düşüktür. CNBr aktive pHEMA partiküllerde ise fibronektin immobilizasyonu fibronektin başlangıç konsantrasyonunun artması ile önce artmakta, 100 $\mu\text{g/ml}$ değerinden sonra değişmeden sabit kalmaktadır.



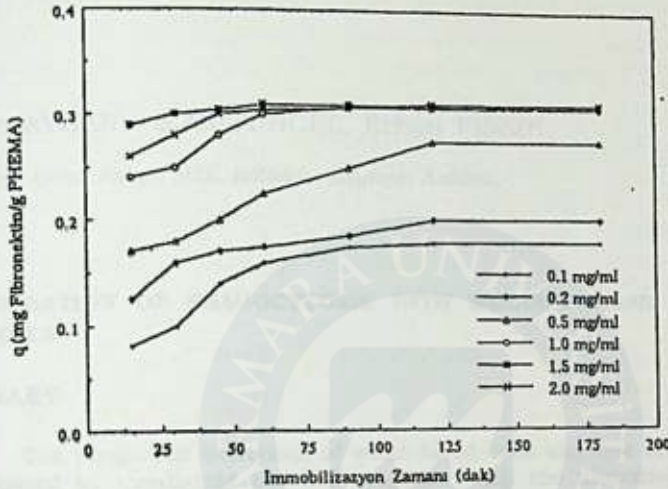
Şekil 2. pHEMA Partiküllerde Collagen Immobilizasyon Hızları.



Şekil 3. Fibronektin Adsorpsiyon İzotermi:

Şekil 4'de ise CNBr aktive pHEMA partiküllere spesifik fibronektin immobilizasyonu zamanın fonksiyonu olarak görülmektedir. Fibronektin konsantrasyonunun artması ile immobilizasyon hızı artmaktadır. Yaklaşık 50 dakika içinde immobilizasyon tamamlanmakta ve bu süreden sonra değişmeden kalmaktadır.

Collagen ve fibronektin immobilize PHEMA mikrot taşıyıcıların hücre yapışma özellikleri incelendiğinde ise hücre yapışmasının immobilize edilen biyomolekül miktarı ile orantılı olarak arttığı görülmüştür [13-16].



Şekil 4. pHEMA Partiküllerde Fibronektin Immobilizasyon Hızları.

KAYNAKLAR

1. Molday RS, Dreyer WJ, Rembaum A, Yen PS, J. Cell Biol., (1975) 64, 75.
2. Graham NB, McNeill ME, Biomaterials, (1984) 5, 27.
3. A. Denizli, M. Kiremitçi, E. Pişkin, Biomaterials, (1988), 9: 257.
4. A. Denizli, M. Kiremitçi, E. Pişkin, Biomaterials, (1988), 9: 363.
5. A. Denizli, M. Kiremitçi, M. Olcay, E. Pişkin, Artif. Organs, (1991) 14:2,138.
6. A.S. Hoffman, Polymeric Biomaterials, Ed: E. Pişkin, AS Hoffman, NATO ASI Series No 106, Martinus Nijhoff Publ., Dordrecht, (1986).
7. K. Kliment, J. Biomed. Mat. Res., (1968), 2: 237.
8. M. Refojo, J. Biomed. Mat. Res., (1969), 3: 333.
9. O. Wichterle, D. Lím, Nature, (1960) 165: 117, 1960.
10. M. Refojo, H. Yasuda, J. Appl. Polym. Sci., (1965) 9: 2425.
11. N. A. Peppas, J. Biomed. Mat. Res., (1985) 19: 397.
12. K.F. Muller, S. Heiber, W. Flankl, US Patent, (1978) 4: 224, 472.
13. V. Dđđt, E. Pişkin, M. Artur, A. Denizli, S.A. Tuncel, E. Denkbaş, G. Gltnick, Immobilization of Hepatocytes on PHEMA Microcarriers, 34th IUPAC Int. Symp. on Macromolecules, 13-18 July (1992), Prague.
14. E. Pişkin, V. Dđđt, M. Artur, A. Denizli, S.A. Tuncel, E. Denkbaş, G. Gltnick, Hepatocytes on PHEMA Microcarriers, 38th Annual Meeting of ASAIO, 7-9 May (1992), Nashville, Tennessee, USA.
15. V. Dđđt, E. Pişkin, M. Arthur, A. Denizli, S.A. Tuncel, E. Denkbaş, G. Gltnick, Hepatocyte Immobilization on PHEMA Microcarriers and its Biologically Modified Forms, Cell Transplantation, 1992 (Baskıda).
16. V. Dđđt, E. Pişkin, A. Denizli, S.A. Tuncel, E. Denkbaş, M. Arthur, G. Gltnick, Hepatocyte Immobilization on Polymeric Microcarriers: A Novel Tissue Engineering Concept for A Hybrid Bioartificial Liver, American Association for the Study of Liver Diseases, Chicago, Illinois, (1992).
17. Kiremitçi M, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara, 1988.

Çalışan ve öğrencilerimizin katkılarıyla yayımlanmaktadır. Her yıl yayımlanan bu kitap, üniversitemizin bilimsel ve kültürel faaliyetlerini yansıtmaktadır. Kitap, üniversitemizin bilimsel ve kültürel faaliyetlerini yansıtmaktadır.



Tablo 1. Ortalama Yaşın Değişimi (1980-1990)

KAYNAKLAR

1. Marmara Ü. Tıp Fak. İç Hastalıkları A.B.D. İç Hastalıkları Anabilim Dalı, 1983.
2. Çiğdem M. Nettekün, İç Hastalıkları, 1983.
3. A. Özkan, İç Hastalıkları, 1983.
4. A. Özkan, İç Hastalıkları, 1983.
5. A. Özkan, İç Hastalıkları, 1983.
6. A. Özkan, İç Hastalıkları, 1983.
7. A. Özkan, İç Hastalıkları, 1983.
8. A. Özkan, İç Hastalıkları, 1983.
9. A. Özkan, İç Hastalıkları, 1983.
10. A. Özkan, İç Hastalıkları, 1983.
11. A. Özkan, İç Hastalıkları, 1983.
12. A. Özkan, İç Hastalıkları, 1983.
13. A. Özkan, İç Hastalıkları, 1983.
14. A. Özkan, İç Hastalıkları, 1983.
15. A. Özkan, İç Hastalıkları, 1983.

MONODİSPERS POLİSTİREN PARTİKÜLLERLE FAGOSİTOZ OLAYININ İNCELENMESİ

Hakan AYHAN, S.Ali TUNCEL, Erhan PİŞKİN

Hacettepe Univ., Kimya Müh. Bölümü., Beytepe, Ankara.

INVESTIGATION OF PHAGOCYTOSIS WITH MONODISPERSE POLYSTYRENE PARTICLES

SUMMARY

The phagocytic behaviour of white blood cells and free macrophages were investigated by incubating the cells together with the monodisperse polymeric microspheres in aseptic conditions. The particle counting was performed in optical microscope to determine the average number of particles uptaken by each cell. The phagocytic response of monocytes and neutrophils decreased by increasing size of microspheres. No phagocytosis was detected in basophils, eosinophils and lymphocytes. The modification of polystyrene microsphere surface by hydrophilic functional groups caused a decrease in the number of particles uptaken by monocytes and neutrophils. On the other hand, the number of particles uptaken by monocytes and neutrophils increased when microspheres containing hydrophobic functional groups on their surfaces were used. No phagocytic response was detected against albumin coated polymeric microspheres. Fibronectin coating on the surface of polystyrene microspheres resulted an increase in the phagocytic activity of monocytes and neutrophils originated from opsonization effect. similar results were obtained in the experiments conducted with peritoneal and lung macrophages isolated from rats, but albumin coating on the polystyrene particles did not suppress the phagocytic response completely.

ÖZET

Kan hücreleri ve serbest makrofaj hücreleriyle fagositoz olayının incelenmesinin amaçlayan bu çalışmada aseptik şartlarda kan hücreleri ile makrofaj hücreleri polimerik mikrokürelerle inkübe edilerek fagositoz işlemi gerçekleştirilmiştir. Hazırlanan preparatlarda optik mikroskop yardımıyla partikül sayısı bulunmuştur. 0.9-6.0 hücreler tarafından fagosite edilen ortalama mikroküre kullanılarak, beyaz kan hücrelerinin aralığında monodispers polistiren mikroküreler kullanılarak, beyaz kan hücrelerinin fagositoz yeteneğinin artan partikül ile yapılan çalışmada monosit ve nötrofillerin fagositoz yeteneğinin artan partikül boyutu ile azaldığı görülmüştür. Basofil, eosinofil ve lenfositlerde fagositoz gözlenmemiştir. Polistiren partikül yüzeyinin hidrofilik gruplar ile modifikasyonu monosit ve nötrofillerde fagositozun azalmasına neden olmuştur. Polistiren partikül yüzeyine hidrofobik grupların takılması ise bu iki hücre türünde fagositozu arttırmıştır. Polistiren partiküller albumin ile kaplanarak kana verildiğinde monosit ve nötrofillerde fagositoz gözlenmemiştir. Fibronektin ile polimerik partiküllerin kaplanması fagositozda artış meydana gelmiştir. Kobaydan sonucunda, opsonik etki nedeniyle fagositozda artış meydana gelmiştir.

elde edilen peritoneal ve akciğer makrofajları ile yapılan çalışmalarda da benzer sonuçlar elde edilmiş, yalnız makrofajlarda fagositoz yeteneğinin albumin pasivasyonu ile yok edilemediği gözlenmiştir.

GİRİŞ

Fagositoz olayı tek hücrelilerde bir beslenme şekli olarak düşünülebilir. Ancak çok hücreli canlılarda fagositoz yabancı veya artık cisimci yok etmeye yönelik genellikle bir savunma mekanizması olarak değerlendirilir. Kandaki akyuvar hücrelerinden nötrofiller, monositler, kan kökenli serbest makrofaj hücreleri ve dokularda bulunan, Reüküloendotelial sistem (RES) hücreleri fagositoz kabiliyetine sahiptir. Monodispers polimerik mikroküreler, biyotıp mühendisliği, mikroelektronik, ve iletişim endüstrisinde önemli bir kullanım potansiyeline sahiptir [1]. Monodispers polimerik mikroküreler eşdeğer boyda çok düzgün küreler olmaları nedeniyle, özellikle biyotıp mühendisliğinde ve biyomedikal teknolojide diagnostik test kitlerinde, enzim ve hücre immobilizasyonunda ve organ görüntülenmesinde destek materyali olarak kullanılmaktadır [2-5]. Fagositoz olayının incelenmesi amacıyla da bu tür polimerik partiküllerin kullanılabilirliği gösterilmiştir. Bu çalışmada izleyici olarak kullanılan monodispers polimerik partiküllerin boy ve yüzey özellikleri değiştirilerek beyaz kan hücreleri ve makrofajların bu değişimlere verdikleri fagositoz cevabı incelenmiştir.

DENEL BÖLÜM

Mikroküre Hazırlama

Yukarıda belirtilen amaç çerçevesinde tablo 1'de verilen reçeteler ile monodispers polistiren (PS) mikroküreler üretilmiş ve mikroküre yüzeyleri kimyasal olarak amino, karboksil ve hidroksil grupları takılarak modifiye edilmiştir.

Tablo 1. PS mikrokürelerin üretim reçeteleri.

PS		PS/OH	PS/COOH	PS/NH ₂
AIBN(g)	0.28	220	220	220
Stiren(ml)	40	100	100	100
İzopropanol(ml)	180	2.0	2.0	2.0
Su(ml)	20	4.0	---	---
PAA(g)	3.0	---	5.0	---
Sıcaklık(°C)	75	---	---	4.0
Zaman(saat)	24	0.12	0.12	0.12
Karış. Hızı(rpm)	150			

Üretilen bu mikroküreler, albumin ve fibrinojen ile kaplanarak biyolojik olarak da modifiye edilmiş ve bu yolla fagositoz olayının pasivasyonu veya opsonizasyonu amaçlanmıştır.

Fagositoz çalışmaları: Akyuvar hücrelerinden monosit ve nötrofil hücreleri insan kanından elde edilmiştir. Önce insandan alınan kan, hemoliz olmaması amacıyla heparinli tüpe aktarılır ve 37°C'deki su banyosunda steril olarak beklemeye alınır. Daha sonra deney tüplerine 0.25 ml kan alınır ve üzerine 10 µl latex ilave edilerek karışım homojenize edilerek 20 dakika 37°C'de inkübasyona bırakılır. Inkübasyon tamamlanmasından sonra lamalara yayma işlemi yapılarak preparatlar yaklaşık bir saat havada kurumaya bırakılır. Kuruyan preparatlar, üzerlerinde hücre fiksasyonunu sağlamak için metanolde en az bir saat bekletilir. Fiksasyonu tamamlanmış olan preparatlar, hücrelerin stoplazmalarının boyanması için JENNER boyar maddesi ile 10 dakika, daha sonra da çekirdeklerinin boyanması için GİEMSA boyar maddesi ile en az 30 dakika etkileştirilir. Boyama işlemi tamamlanan preparatlar önce %70'lik metanol veya etanolde 1-1.5 saat bekletilir, sonra da absolu metanol veya etanolde yine 1-1.5 saat kadar muamele edilirler, daha sonra fiksasyonu tamamlanmış preparatlar üzerine kanada balzamu veya gliserin konur, lamellenir, ve mikroskopik sayım yapılmak üzere hazırlanır.

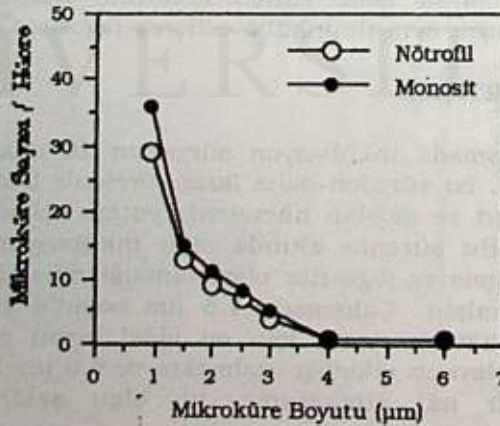
Serbest Makrofaj hücrelerinin izolasyon yöntemi : Makrofajlar kobayların akciğer ve periton kavitelerinin lavajıyla izole edilmiştir. Peritoneal makrofajların aktif olarak eldesi için kobaylar kuyruktan uyutulmuşlardır. Kobayın kanı toplardamar kesimi yöntemiyle boşaltılmıştır. Deneyler, 37°C'deki sıcak su banyosunda bekletilen EDTA (%0.2 0.15 M tuz pH:7.4) çözeltisinden bir enjektör içine 3 cc kadar alınır ve trake'den akciğere verilir. 5 dakika sonra geri çekilerek akciğer lavajı yapılır bu 5 kez tekrarlanır. Peritoneal makrofajların elde yöntemi de aynı prosedürle gerçekleştirilir, ancak lavaj periton boşluğuna yapılır. Alınan makrofajlar 20 dakika 4000 rpm' de santrifüj edilir, ve çözeltisi atılır. Daha sonra HBSS (Hank's Balans Saline Solution) çözeltisi ile dört-beş kez yıkanır, son yıkama suyu yarım hacim bırakılır. Böylece makrofajlar canlı olarak izole edilmiş olurlar. Elde edilen makrofajlara canlılık testi " Trypan Blue " boyar maddesi ile yapılır. Boyama işleminden sonra boyanabilen hücreler canlı hücrelerdir. Canlılığı tespit edilen hücrelerin Hemocytometre ile sayımları yapılır. Sayım sonunda en az 10^6 düzeyinde hücre izole edilmiş olmalıdır. Canlı olarak izole edilen makrofaj hücreleri akyuvarlara uygulanan prosedürün aynı ile inkübe edilerek fagositoz olayı incelenir.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

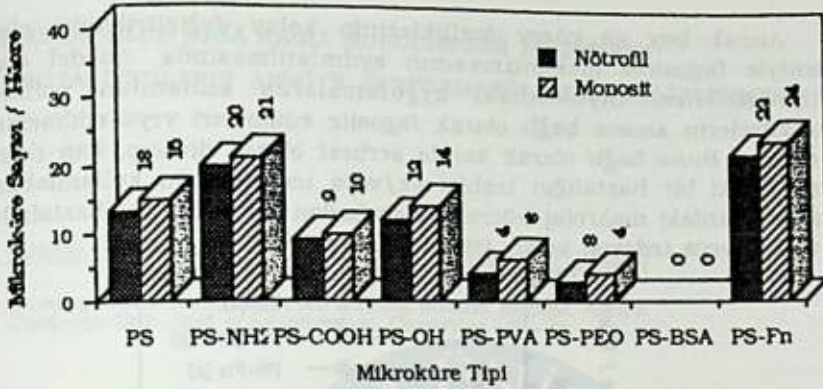
Yapılan çalışmada inkübasyon süresinin 20 dakika olarak tespit edilmesinin nedeni, bu süreden daha fazla sürelerde hücrelerin fagositozu tamamlayıp ölmeleri ve dağılan hücrelerde yutma olayının hassas olarak sayılamamasıdır. Bu sürenin altında olan inkübasyon sürelerinde ise zaman yetersiz gelmiş ve fagositoz olayı tamamlanmadığı için sağlıklı bir şekilde gözlenememiştir. Çalışmada 1.5 µm boyut'a karar verilmesinin nedeni hücre karakterizasyonu için en ideal boyut olmasıdır. Boyut arttıkça fagositoz olayının etkinliği azalmakta ve 6.0 µm boyutta neredeyse hiç görülmez bir hal almaktadır, bu olgu şekil 1'deki grafikte görülmektedir.

Fagositozda yüzey kimyasının etkisi önemlidir. Vücut savunma mekanizmasında görevli olan bu hücreler, genellikle negatif yüke sahip olduklarından, karşılaştıkları yabancı mikrokürelerin taşıdığı kimyasal yükün olayda önemli olduğu açıktır. Kullanılan kimyasal olarak modifiye edilmiş fonksiyonel gruplu mikroküreler, bu olayı doğrulamıştır. Amino fonksiyonel gruplu (PS-NH₂) mikroküreler yüzeye pozitif karakter kazandırdıkları için bu mikrokürelerin fagositozu çok sayıda olmuş, karboksil fonksiyonel gruplu (PS-COOH) mikroküreler yüzeye negatif karakter kazandırdıkları için bunlar ise diğerlerine göre çok daha az fagosite edilmişlerdir. Hidroksil fonksiyonel gruplu (PS-OH) mikroküreler ise hidrofobik karaktere sahip PS mikrokürelerine karşı hidrofilsitenin etkisini bize izlemek imkânını vermiştir. Bu durumda gözlenen ise fagositozun bariz bir değişikliğe uğramadığıdır. Bunun sebebi PS-OH mikrokürelerde yüzeye bağlanan olan OH gruplarının aralarında boşlukların bulunmasındadır. Hidrofilsite etkisinin daha iyi gözlenebilmesi amacıyla PS-PVA kaplanmış ve PS-PEO kaplanmış mikrokürelerle yapılan deneylerde yüzeyde sağlanan hidrofilsitenin etkisi daha net olarak görülebilmektedir. Hidrofilsitenin artması fagositozu bariz bir şekilde azaltmaktadır. Bütün bu sonuçlar şekil 2' de verilmektedir.

PS mikroküreler biyolojik olarak modifiye edilip fagositoz olayı incelenmiştir. Bu grup deneyler yüzeyi biyolojik olarak BSA ile modifiye edilen mikrokürelerin fagosite edilmediğini göstermiştir. Bu da fagositoz olayının doğasını doğrulamaktadır. Fagositoz yeteneğine sahip olan vücut hücrelerinin büyük bir seçiciliğe sahip olduğu bilindiğine göre, vücut için yabancı olmayan bir partikülü tanımamakta ve fagosite etmemektedirler. BSA ile kaplanan PS mikrokürelerde, -fonksiyonel grup içersinler veya içermesinler -fagositoz sıfır olarak gözlenmiştir. Bu olay benzer şekilde çalışılan makrofaj hücrelerinde de gözlenebilmiştir. Ayrıca Fibronectin (Fn) ile yapılan biyolojik modifikasyonda ise opsonitik etki (fagositozun artışı sağlayan etki) bariz bir şekilde görülebilmektedir. Yine bunlara ilişkin sonuçlar şekil 2'de verilmektedir. Makrofajlarla yapılan deneysel çalışmalar da, kan hücreleri ile benzer sonuçlar vermiştir. Mikroküre boyutunun artması ile fagositoz da belirgin azalma gözlenmektedir.

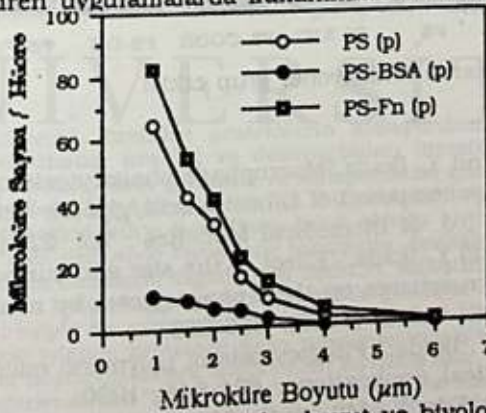


Şekil 1. PS mikrokürelerle, monosit ve nötrofil hücrelerindeki fagositoz olayında mikroküre boyut etkisi.



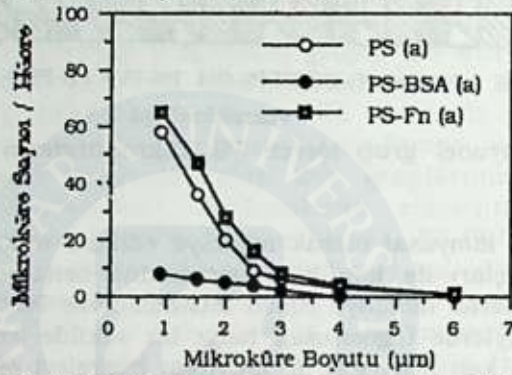
Şekil 2. Fonksiyonel grup içeren PS Mikrokürelerin fagositoz olayına etkisi.

Yüzeyleri kimyasal olarak modifiye edilmiş mikrokürelerle yapılan deneylerin sonuçları da kan hücrelerinininkine benzerdir. Dikkate değer olan, biyolojik olarak modifiye edilen monodisperse PS/BSA mikroküreler ile yapılan deneylerde fagositozun bazı bir şekilde azalması, fakat sıfır olmamıştır. Bu, kan hücreleri ile makrofaj hücreleri arasındaki, fagositoz olayının temel oluşum mekanizmasındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır. Makrofaj hücrelerinin gerçekleştirdiği fagositoz olayı kan hücrelerine göre daha kompleks olaylar zincirini içermektedir. Bu sonuç kan hücrelerinde olduğu gibi fagositozun spesifik bir tanıma işlemiyle gerçekleştiğini bir kez daha kanıtlamakta ve bu araştırma ile makrofaj hücrelerinin vücut savunmasına ne zaman ve nasıl katıldıkları hakkında kan hücrelerinden farklılık gösterdiklerini ortaya koymaktadır. Makrofaj hücrelerinde mikroküre boyut ve biyolojik modifikasyon etkisi Şekil 3 ve 4'de, Yüzeyleri kimyasal olarak modifiye edilmiş mikrokürelerin etkisi Şekil 5'de verilmektedir. Çalışmada kullanılan polistiren bazlı mikroküreler biyoparçalanabilir özelliğe sahip olmadıklarından doku ve kanla temas gerektiren uygulamalarda kullanılmaları sakıncalıdır.

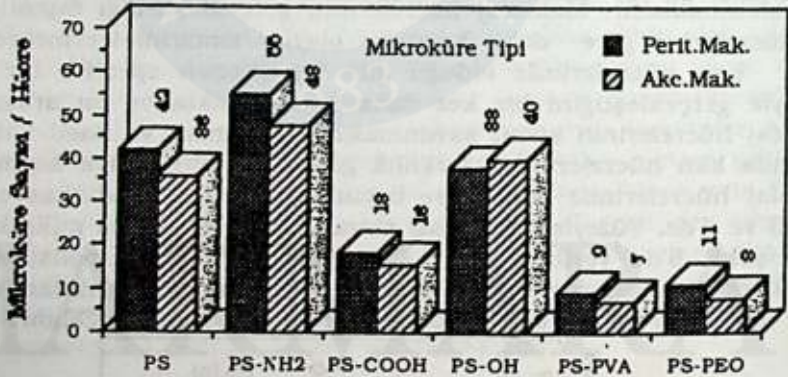


Şekil 3. Peritoneal Makrofaj hücrelerinde boyut ve biyolojik modifikasyon etkisi.

Ancak boy ve yüzey özelliklerinin kolay değiştirilebilir olması nedeniyle fagositoz mekanizmasının aydınlatılmasında model olarak kullanılabilirler. Biyomedikal uygulamalarda kullanılan polimerik mikrokürelerin amaca bağlı olarak fagosite edilmeleri veya edilmemeleri istenebilir. Buna bağlı olarak kanda serbest olarak dolaşım ve/veya tedavisi için kullanılabilirler veya dokulardaki makrofaj hücreleri tarafından tutulup lokal hastalıkların teşhisi ve/veya tedavisi amacı için kullanılabilirler.



Şekil 4. Akciğer Makrofaj hücrelerinde boyut ve biyolojik modifikasyon etkisi.



Şekil 5. Makrofajlarda fonksiyonel grup etkisi

KAYNAKLAR

1. Y. Tabata and Y. Ikada, "Macrophage phagocytosis of biodegradable microspheres composed of L-Lactic acid/glycolic acid homo- and copolymers", J. of Biomedical Mat. Res., Vol. 22, (1988) 837-858.
2. Y. Tabata and Y. Ikada, "Effect of the size and surface charge of polymer microspheres on their phagocytosis by macrophage", Biomaterials., Vol 9, (1988), 356-362.
3. Y. Tabata, Y. Ikada, "Phagocytosis of polymeric microspheres", pharmaceutical applications, 621-646, 1990.
4. Maehara, T., Eda, Y., Mitani, K., Matsuzawa, S., Biomaterials, 11,122- 126, 1990.
5. Bangs L.B., Uniform Latex Particles, pp: 51-58, Seradyn, Inc.,Indianapolis, 1987.

CIBACRON BLUE F3GA BAĞLI MONODİSPERS POLİSTİREN MİKROTAŞIYICILARIN AFİNİTE PERFORMANSLARININ BELİRLENMESİ

A. DENİZLİ, A. TUNCEL, D. PURVIS*, C.R. LOWE*, E. PIŞKIN

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Beştepe, Ankara
* *Cambridge Univ., Inst. of Biotechnology, Cambridge, UK*

DETERMINATION OF AFFINITY PERFORMANCES OF CIBACRON BLUE F3GA ATTACHED MONODISPERSE POLYSTYRENE MICROBEADS

SUMMARY

In this study, albumin adsorption onto Cibacron Blue F3GA attached monodisperse composite microspheres was investigated. Polystyrene (PS) was selected as the base support material. Monodisperse PS microspheres 4 µm in size were produced by phase inversion polymerization of styrene carried out in ethanol-methoxy ethanol medium. In order to prevent non-specific interactions between hydrophobic polystyrene surface and albumin molecule, a hydrophilic layer, namely polyvinylalcohol (PVA), was coated on the surface of polystyrene microspheres. PVA was deposited onto the polystyrene microspheres by a simple adsorption process in an aqueous medium containing different salts (NaCl; Na₂SO₄, CaCl₂) and then cross-linked chemically on the surface. Cibacron Blue F3GA was attached to the hydrophilic layer present on the PS surface by treating the dye and composite microspheres in an aqueous alkaline medium. Normal PS latex, PVA coated latex and Cibacron Blue F3GA attached latex were used as sorbent in albumin adsorption experiments performed in buffer media containing NaCl at different ionic strengths.

ÖZET

Bu çalışmada, Cibacron Blue F3GA takılı monodispers mikrokürelere albumin adsorpsiyonu incelenmiştir. Polistiren temel taşıyıcı matrisi seçilmiş ve faz dönüşüm polimerizasyonu yöntemiyle sentezlenmiştir. Hidrofobik PS lateks yüzeyi, hidrofilik polivinilalkol ile kaplanarak hidrofilité edilmiştir. PVA, hidrofobik PS yüzeyine basit adsorpsiyon yöntemiyle kaplanmıştır. PS lateks yüzeyine PVA adsorpsiyonu üç farklı tuz varlığında (NaCl; Na₂SO₄, CaCl₂) incelenmiştir. PS yüzeyine kaplanan polivinilalkol, teraftalaldehit kullanılarak yüzeyde çapraz bağlanmıştır. Seçici adsorbana ulaşmak amacıyla bu çalışmada albumine ligasi çok yüksek olan inorganik boya Cibacron Blue F3GA ligand olarak kullanılmıştır. PS lateks yüzeyine BSA adsorpsiyonu NaCl varlığında, iyonik güç iki farklı düzeyde değiştirilerek ortam pH'nın etkisi herbir lateks türü için (normal PS, PVA kaplanmış PS, Cibacron Blue F3GA bağlı PS) incelenmiştir.

Giriş

Biyojik moleküllerin, özellikle proteinlerin saflaştırılması için çok değişik yöntemler ileriye sürülmüş, avantaj ve dezavantajları literatürde ayrıntılı olarak tartışılmıştır [1]. Biyomoleküllerin ayrılması ve saflaştırılması için, birçok durumda en spesifik yöntem biyoafinite kromatografisidir [2]. Bu yaklaşımda genellikle çok spesifik biyojik tanıma yeteneğine sahip ligandların takılı olduğu endüstriyel boyutta ligandların yüksek flatı nedeniyle biyoafinite tekniğinin, özellikle endüstriyel boyutta tek başına uygulanması ekonomik değildir. Bu nedenle, saflaştırılması gereken, içinde çok çeşitli moleküllerin bulunduğu karmaşık yapıdaki çözeltiler önce bir seri daha az seçimli ayırma işlemleriyle ön ayırmaya tabi tutulur. Böylece biyoafiniteye gönderilen çözelti hem ayrılması istenen proteine daha zenginleştirilmiş hemde biyosorbentin özelliklerinin kaybına neden olabilecek faktörlerden ayrılmış olur.

Bu çalışmada değerlendirilen "Dye Affinite" yönteminde ise klasik "Afinite" tekniğine alternatif olarak biyoligandların yerine inorganik boyalar ligand olarak kullanılmaktadır [3]. Boyaların ligand olarak kullanılmalarının afinite yöntemine kazandırdığı en önemli avantajlar şöyle sıralanabilir: (1) İnorganik kökenli boyaların maliyeti çok düşüktür; (2) Biyojik kökenli ligandlara göre kararlılıkların son derece yüksektir; (3) İnorganik ligandlı boyalar zamanla biyojik aktivitelerini yitirmezler.

Albumin kan plazmasında en yüksek konsantrasyonda bulunan, bir çok metabolik reaksiyona katılan önemli bir proteindir. Bu protein tıpta değişik amaçlarla en fazla kullanılan, bu nedenle saflaştırılma işlemlerinde üzerinde en çok durulan proteindir. Bu gerekçeyle, sunulan araştırmada da örnek protein olarak seçilmiştir. Bu çalışmada, faz dönüşüm polimerizasyonu yöntemiyle sentezlenen polistiren lateksler, serum değiştirme yöntemiyle ve iyon değiştirici reçineler kullanılarak dönüşmeyen monomer ve yüzey safsızlıklardan arındırılmıştır. Kromatografik taşıyıcılarda aranılan en önemli özellik, taşıyıcı-biyolojik çevre etkileşimi (kan, plazma veya vücut sıvıları) sonucu non-spesifik etkileşimlerin minimum olmasıdır. Bu etkileşimlerin minimum olması için polimerik taşıyıcı yüzeyinin hidrofilik olması gerekmektedir. Bu amaçla hidrofobik karakterli PS lateks yüzeyi hidrofilik polivinilalkol ile kaplanarak hidrofille edilmiştir. PS yüzeyine kaplanan polivinilalkol, teraftalaldehit kullanılarak yüzeyde çapraz bağlanmıştır. Cibacron Blue F3GA ligan olarak kullanılmıştır. PS lateks yüzeyine BSA adsorpsiyonu herbir lateks türü için (normal PS, PVA kaplanmış PS, Cibacron Blue F3GA bağlı PS) incelenmiştir.

DENEL BÖLÜM

MONODISPERS POLİSTİREN PARTİKÜLLERİN HAZIRLANMASI

Monodispers polistiren partiküllerin hazırlanmasında şu yöntem izlenmiştir: Etil alkol/su içeren dağıtma ortamı hazırlanır. Stabilizör olarak kullanılan PAA, dağıtma ortamı içerisinde çözülür. Monomer fazı başlatıcı olarak kullanılan AIBN'nin stirende çözünmesi ile hazırlanır. Stiren/dağıtma ortamı karıştırılarak çözelti polimerizasyon reaktörüne beslenir. Isıtma programı ve karıştırma başlatılır. Bu işlemi takiben reaktörden sabit basınç ve akış hızında azot gazı geçirilerek reaktör ortamının oksijenden arındırılması sağlanır. Polimerizasyon, 250 rpm karıştırma hızı ve 70°C sıcaklık aralığında ısıtma programı uygulanarak gerçekleştirilir. Polimerizasyona monomer dönüşümü tamamlanana kadar (24 saat) devam edilir. Reaksiyon süresi sonunda, monodispers polistiren partikülleri içeren lateks reaktörden alınarak soğumaya bırakılır. Lateks önce 3 kez serum değiştirilerek, sonra bir kez iyon değiştiriciyle etkileştirilerek temizlenir [4]. Polimerizasyon koşulları Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1. Monodispers PS Lateksin Polimerizasyon Koşulları.

AIBN (g)	0,75
Stiren (ml)	35
Etanol (ml)	100
2-metoksietanol (ml)	100
PAA (g)	3,5
Sıcaklık (°C) ve zaman (saat)	75°C 16 saat, 80°C, 8 saat
Karıştırma hızı (rpm)	250

PS LATEKSE PVA ADSORPSİYONU VE ÇAPRAZ BAĞLANMASI

Hidrofobik PS yüzeyini hidrofille etmek amacıyla basit adsorpsiyon yöntemiyle kesikli sistemde PVA ile kaplanmıştır. PVA adsorpsiyon deneylerinde 14.000 MA sahip PVA kullanılmıştır. Maksimum PVA adsorpsiyonuna ulaşabilmek amacıyla üç farklı tuz (NaCl, CaCl₂, Na₂SO₄) ortamında üç farklı iyonik güç düzeyinde çalışılmıştır (0,05, 0,1, 0,2) Adsorpsiyonda izlenen yöntem kısaca şöyledir: Uygun miktarda PVA 25 ml damıtık suda çözülür ve ortamın iyonik gücü uygun miktarda tuz kullanılarak ayarlanır. Hazırlanan PVA çözeltisine belirli miktarda PS lateks eklenerek adsorpsiyon başlatılır. Adsorpsiyon ortamı 200 rpm karıştırma hızı ve oda sıcaklığında 2 saat devam ettirilmiştir. Bu süre sonunda adsorpsiyon ortamından örnek alınarak santrifüjlenmiş ve sıvı fazdaki PVA miktarındaki azalma KI/I₂ yöntemine göre spektrofotometrik olarak 690 nm'de tayin edilmiştir [5].

PVA adsorpsiyon deneyleri ile belirlenen maksimum adsorpsiyon koşullarında (1400 mg PVA/l, 0,2 M Na₂SO₄) çapraz bağlanma deneyleri gerçekleştirilmiştir. Çapraz bağlayıcı olarak teraftalaldehit kullanılmıştır. PVA adsorpsiyonu 1400 mg PVA/l, 0,2 M Na₂SO₄ koşullarında 2 saat devam ettirildikten sonra ortam konsantrasyonu HCl ile 0,1 M olacak şekilde ayarlanmıştır. Çapraz bağlayıcı teraftalaldehit (10 mg) damıtık suda (10 ml) çözülmüş ve çapraz bağlanma ortamına eklenmiştir. Çapraz bağlanma işlemi 500

rpm karıştırma hızında ve oda sıcaklığında 48 saat devam ettirilmiştir. Bu süre sonunda çapraz bağlanma ortam sıcaklığı 80°C'a yükseltılarak sızdırmaz bir sistemde ve 400 rpm'de 4 saat daha sürdürülmüştür.

PVA KAPLANMIŞ PS LATEKSE CİBACRON BLUE F3GA BAĞLANMASI

Cibacron Blue F3GA (300 mg) 10 ml suda çözülür ve 4 g NaOH bu çözeltiliye eklenir. PVA adsorplanmış lateks (3 g) 90 ml suda dağıtılır ve boya çözeltisi eklenir. Cibacron blue F3GA bağlanması, sızdırmaz bir sistemde 80°C'da 400 rpm'de 4 saat devam ettirilir. Bu süre sonunda lateks ortamdan filtrasyonla ayrılır ve birkaç kez yıkanır.

MONODİSPERS POLİSTİREN PARTİKÜLLERDE ALBÜMİN ADSORPSİYONU

Bu çalışmada üretilen monodispers hidrofobik polistiren mikrokürelerden afinite kromatografisinde kullanılmak üzere seçici sorbent üretimi planlanmaktadır. Bu amaçla, PS mikrokürelerin yüzeyi öncelikle hidrofilik PVA ile kaplanarak hidrofilize ve derivatize edilmiş daha sonra albumine ilgisi ve seçiciliği yüksek olan Cibacron Blue F3GA takılarak albumine seçici sorbent hazırlanması amaçlanmıştır.

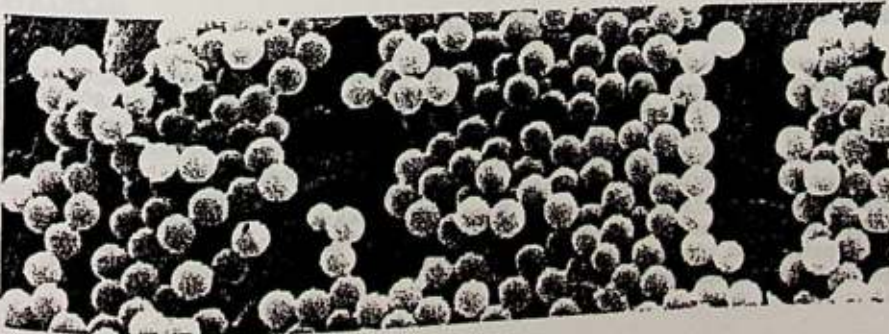
Bu gruptaki denge adsorpsiyon deneylerinde, farklı konsantrasyonlarda albumin içeren çözeltilerdeki adsorpsiyon incelenmiştir. Bu amaçla, önce 0.5-7.00 mg/ml aralığında albumin içeren sulu çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltilerin pH'ı, asetat ($\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$; pH 5.0) tamponu kullanılarak ayarlanmıştır. Ortamın iyonik gücü NaCl ile ayarlanmış ve protein adsorpsiyonuna etkisinin belirlenebilmesi için, iki farklı iyonik güçte çalışılmıştır (0.01, 0.1). Albumin adsorpsiyonuna pH'in etkisini gözlemek amacıyla yapılan deneylerde 5 farklı pH'de (pH 4-8) çalışılmıştır. Adsorpsiyon ortamının pH'ı (pH: 4-6 $\text{CH}_3\text{COONa}/\text{CH}_3\text{COOH}$; pH: 7 fosfat $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$; pH: 8 amonyum $\text{NH}_4\text{OH}/\text{NH}_4\text{Cl}$) tampon sistemleri kullanılarak ayarlanmıştır. Deneyler oda sıcaklığında (20°C) yürütülmüştür. İstenilen başlangıç konsantrasyonunda albumin içeren, pH'ı ve iyonik gücü istenilen değerlere ayarlanmış 25 ml çözeltiliye, santrifüjleme yoluyla serumundan ayrılan 0.2 gram PS partikül ilave edilerek adsorpsiyon incelenmiştir. Çözelti, manyetik karıştırıcı ile sabit karıştırma hızı 20 rpm'de sürekli olarak karıştırılarak, adsorpsiyon dengesinin kurulması sağlanmıştır. Adsorpsiyon denge süresi 2 saat olarak seçilmiştir. Bu süre sonunda çözeltilen alınan örneklerden santrifüjle polimerik partiküller ayrılmış, kalan çözeltilde albumin denge konsantrasyonu bir UV-Spektrofotometre (Hitachi, Model 230, Japonya) ile ölçülmüştür.

Deneylerinde normal PS lateks, PVA kaplanmış PS lateks ve PVA kaplanmış-Cibacron Blue F3GA takılmış PS lateksin albumin adsorpsiyon kapasiteleri belirlenmiştir.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

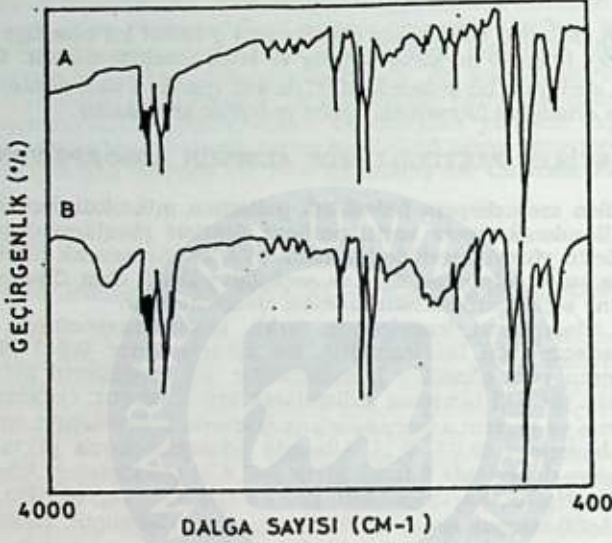
LATEKSLERİN KARAKTERİZASYONU

PS latekslerin boyut ve monodispersitesi Taramalı Elektron Mikroskobu ile kalibre edilmiş optik mikroskop ile ölçülmüştür. 4 μ boyutundaki monodispers PS lateksin optik fotoğrafı Şekil 1'de verilmiştir.



Şekil 1. 4 μ Boyutundaki Monodispers PS lateksin Optik Fotoğrafı.

PS partiküllerinin yüzeyinde çapraz bağlanmadan sonraki PVA'nın varlığı IR spektroskopisi ile belirlenmiştir. Normal PS ve PVA kaplanmış PS lateksler iyice damıtık su ile yıkanıp kurutulduktan sonra IR spektrumları alınmıştır. Bu latekslerin IR spektrumları Şekil 2'de verilmiştir. Şekil 2'den de görüldüğü gibi 3500 cm^{-1} 'deki pik polimerik yapıdaki OH grubunun varlığını göstermektedir.



Şekil 2. (a) Normal PS lateks; (b) PVA kaplanmış PS lateksin IR Spektrumları.

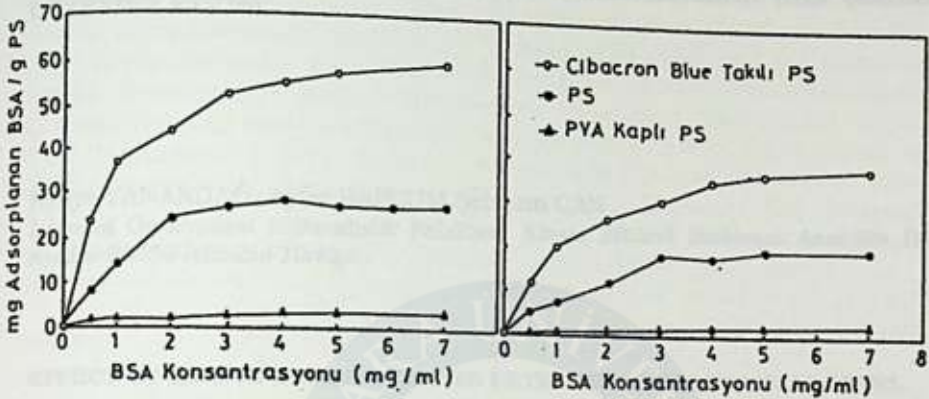
PVA ADSORPSİYONU

Değişik PVA miktarlarında yapılan deneylerde, PVA konsantrasyonunun artması ile adsorpsiyon miktarının arttığı ve 2 saatte denge adsorpsiyon değerine ulaşıldığı görülmektedir.

PS yüzeylere PVA adsorpsiyonunu artırmak için ortama değişik tuzlar eklenmiştir. Adsorpsiyon ortamının iyonik kuvveti 0.05-0.2 arasında bu tuzlarla ayarlanmıştır. Na_2SO_4 varlığında NaCl ve CaCl_2 'e göre daha yüksek adsorpsiyon değerleri elde edilmiştir. Ayrıca herbir tuzun varlığında iyonik kuvvetin artması ile PVA adsorpsiyonu artmaktadır. Maksimum PVA adsorpsiyonuna (19.0 mg PVA/ g PS) 700 mg/l PVA konsantrasyonuna (0.2 iyonik kuvvette Na_2SO_4 içeren) ulaşılmıştır. Konvansiyonel PS latekslerde ulaşılan maksimum PVA adsorpsiyonu 5-6 mg PVA/ m^2 civarındadır [6,7]. Bu çalışmada kullanılan PS latekslerde 12.7 mg PVA/ m^2 (19.0 mg PVA/ g PS) adsorpsiyon değerine ulaşılmıştır.

BSA ADSORPSİYON/DESORPSİYON ÇALIŞMALARI

Proteinler literatürde de belirtildiği gibi izoelektrik noktalarında net olarak yüksüzdürler ve maksimum protein adsorpsiyonu izoelektrik noktada görülür. Bu nedenle normal PS lateks, PVA kaplanmış PS lateks ve Cibacron Blue F3GA takılı PS latekslerin BSA adsorpsiyon izotermeleri, izoelektrik pH 5'de, NaCl varlığında iki farklı iyonik kuvvet değerinde gerçekleştirilmiştir. Şekil 3'den de görüldüğü gibi, PS lateksin yüzeyindeki hidrofilik PVA tabakası non-spesifik albumin adsorpsiyonunu önemli oranda azaltmaktadır. Cibacron Blue F3GA takılı PS latekslerde ise spesifik bağlanmanın önem kazanması nedeniyle normal PS latekse göre daha yüksek albumin adsorpsiyonuna ulaşılmıştır. Her bir latekste albumin adsorpsiyon kapasitesi artan iyonik kuvvet ile azalmaktadır.



Şekil 3. Normal PS Lateks, PVA kaplanmış lateks ve Cibacron Blue F3GA takılı PS lateksin albumin adsorpsiyon izotermi: (a) iyonik kuvvet: 0.01; (b) iyonik kuvvet: 0.1.

Her bir lateks için albumin adsorpsiyon kapasitesinin pH ile değişimi incelendiğinde maksimum adsorpsiyon kapasitelerine izoelektrik pH civarında ulaşılmaktadır. Asidik ve bazık pH bölgelerinde düşük albumin adsorpsiyon kapasiteleri gözlenmiştir. PVA kaplanmış PS latekslerde ise pH 7 ve 8'de her iki iyonik kuvvet değerinde sıfır adsorpsiyona ulaşılmıştır.

Cibacron Blue F3GA takılı PS partiküllere adsorplanan albuminin polimerik yapıdan desorpsiyon deneyleri 0.5 M NaSCN ortamında yapılmıştır. Cibacron Blue F3GA takılı PS partiküllerden albumin desorpsiyon değerleri Çizelge 2'de verilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü gibi desorpsiyon değerleri oldukça yüksek olup tatmin edici düzeydedir.

Çizelge 2. Cibacron Blue F3GA takılı PS latekslerden adsorplanan albuminin desorpsiyon değerleri: İK: 0.01; pH: 5.0; NaCl.

Başlangıç BSA Konsantrasyonu (mg BSA/ml)	Desorpsiyon Oranı (%)
0.5	85
1.0	76
2.0	84
3.0	90
4.0	88
5.0	85

KAYNAKLAR

1. P.D.G Dean, *Affinity Chromatography*, IRL Press, New York (1985).
2. W.H Scouten, *Affinity Chromatography*, John Wiley, New York (1981).
3. C.R. Lowe, *Top. Enzym. Ferment. Biotechnol.*, (1984) 8, 78-161.
4. E. Piskin, A. Tuncel, et.al. *Clinical Materials*, (1991) 8, 159-164.
5. V. D. Boomgard, et.al., *J. Colloid Int. Sci.*, (1978) 66, 68-76.
6. M.J. Garvey, T.F. Tadros, B. Vincent., *J. Coll. Int. Sci.*, (1974) 49, 57.
7. M.J. Garvey, T.F. Tadros, B. Vincent., *J. Coll. Int. Sci.*, (1976) 55, 440.



Şekil 2. ... (Caption text describing the graph's content and axes)

... (Main body text of the document, partially obscured by the watermark)

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

... (Additional text at the bottom of the page, including possibly a footer or page number)

DEFNE YAPRAKLARINDAN ELDE EDİLEN EKSTRELERİN KAN ŞEKERİ DÜZEYİNE ETKİSİ

Refiye YANARDAĞ, Ayfer BAPÇUM, Şebnem CAN

*Istanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi, Kimya Bölümü Blokinya Anabilim Dalı
Avcılar-34850-Istanbul-Türkiye*

EFFECT OF LAURUS NOBILIS L. LEAVES EXTRACTS ON BLOOD SUGAR LEVEL

SUMMARY

In this study, the leaves of *Laurus nobilis* L. used by diabetic people in Turkey have been investigated from the point of view of its action on blood sugar level.

For this purpose, rabbits weighing 2-3 kg were divided into five groups of five animals each. Test groups were given orally either aqueous (2 and 4 g/kg) or ethanolic (200 and 400 mg/kg) extracts and controls saline (1 ml/kg).

Blood samples (0.1 ml) were collected every one hour interval for a period four hours. Blood sugar levels of the rabbits were determined by means of Hagedorn-Jensen method. Differences between various groups and controls were evaluated statistically.

The results indicate *Laurus nobilis* L. aqueous and ethanolic (200 mg/kg) extracts given orally had any effect but ethanolic (400 mg/kg) extract had a hypoglycemic effect on blood sugar in rabbits.

ÖZET

Bu çalışmada, Türkiye'de şeker hastaları tarafından kullanılan defne (*Laurus nobilis* L.) yapraklarının kan şekeri düzeyine etkisi incelenmiştir.

Bu amaçla, 2-3 kg ağırlığındaki tavşanlar beşerlik beş gruba ayrıldı. Test gruplarına defne yapraklarının sulu (2 ve 4 g/kg) veya etanolü ekstresi (200 ve 400 mg/kg), kontrol grubuna ise %0.9 NaCl çözeltisi ağızdan verildi. Kan örnekleri (0.1 ml) birer saat ara ve dört saat süre ile alındı. Tavşanların kan şekeri düzeyleri Hagedorn-Jensen metodu ile tayin edildi. Test ve kontrol grupları arasındaki farklılıklar istatistiksel olarak değerlendirildi.

Elde edilen sonuçlar *Laurus nobilis* L. bitkisinin sulu ve etanolü (200 mg/kg) ekstraktlarının ağızdan verilmesi ile tavşanların kan şekeri düzeyinde herhangi bir değişiklik olmadığını, 400 mg/kg etanol ekstresinin ise hipoglisemik etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

GİRİŞ

Şeker hastalığı (diabetes mellitus) eski çağlardan beri yaygın olarak görülen ve kontrol altına alınmadığı takdirde insan vücudundaki bazı fonksiyonları bozabilen önemli bir hastalıktır.

1922 yılında, Banting ve Best'in insülini keşfetmelerinden sonra (1), şeker hastalığının tedavisinde insülin kullanılmaya başlanmıştır. İnsülinin ağızdan alınmaması, devamlı enjeksiyon yapma gibi kullanım güçlükleri

nedeni ile, bilhassa erişkin diabetinde (Tip II), İnsülin yerine çeşitli bitkiler kan şekerini düşürücü özellikleri nedeni ile kullanılmaktadırlar. Son yıllarda halk arasında bu hastalığın tedavisinde tıbbi bitkilerin kullanımlarının artması nedeni ile kullanılan bu bitki ekstralarının antidiabetik etkilerinin olup olmadığı çeşitli araştırmacılar tarafından incelenmiştir (2-13). Hipoglisemik aktivite saptanan bitkilerden kimyasal yapıları farklı aktif maddeler izole edilmiştir. Bu aktif maddelerin polisakkarid (14-18), polipeptid (19), glikoprotein (15-17), flavanoid (20), steroid (21), terpenoid (22) veya alkaloid (23) yapısında olduğu bildirilmiştir.

Türkiye'deki şeker hastaları da çeşitli bitki ekstralarını kullanmaktadır (24-27). Bu bitkilerin bazıları ile yapılan bilimsel araştırmalarda kan şekerini düşürücü etkisi olan bir madde saptanamamıştır (28-32).

Defne (*Laurus nobilis* L.) ülkemizde Ege, Akdeniz ve Karadeniz bölgelerinin sahil kısımlarında yetişen, kışın yaprağını dökmeyen dioik bir ağaç veya ağaççıktır. Yaprakları terletici, antiseptik ve mideyi etkilere sahiptir. Meyvası ise idrar artırıcı olarak ve romatizmaya karşı dahilen dekoksilyon halinde kullanılır (33). Ayrıca, halk arasında şeker hastalığına karşı da kullanıldığına rastlanmaktadır.

Bu çalışmada, halk arasında kan şekerini düşürmek amacıyla kullanılan defne yapraklarının hipoglisemik etkisinin olup olmadığı araştırılmıştır.

DENEL BÖLÜM

Defne yaprakları, İstanbul Avcılardan 1991 yılı Temmuz ve Ağalık aylarında toplanarak gölgede kurutuldu. Kurutulmuş olan bu defne yaprakları dallarından ayrılarak makasla ince ince kesildi ve 100 g'ına 1 litre distile su ilave edilerek 30 dakika kaynatıldı, süzülde ve evaporatörde suyu uzaklaştırıldı. 100 g kuru yapraktan 16.85 g ekstre elde edildi. Balonda kalan bakiye distile su ile çözülerek hayvanlara kg başına 2 veya 4 g kuru yaprağa tekabül eden miktarda sulu ekstre verildi. Etanollü ekstre için ise 70 g kuru defne yaprağı Soxhlet cihazında %96'lık etanolla ekstre edildi. Etanol evaporatörde buharlaştırıldı. 70 g kuru yapraktan 12.5 g etanollü ekstre elde edildi. Balonda kalan bakiye distile su ile çözülerek tavşanlara kg başına 200 veya 400 mg olacak şekilde verildi.

Çalışmamızda, 2-3 kg ağırlığında tavşanlar kullanıldı. Ticari yem (Yem Sanayii Türk A.Ş.) ve musluk suyu ile beslenen tavşanlar beş gruba ayrıldı. Her grup beşer tavşandan oluşturuldu. 0.1 ml kan örnekleri 18 saat aç bırakılan tavşanların kulağından 0, 1, 2, 3 ve 4 üncü saatlerde alındı. Birinci gruba (kontrol) kg başına 1 ml %0.9 luk NaCl çözeltisi ağızdan verildi. İkinci ve üçüncü grup tavşanlara kg başına 2 g ve 4 g olacak şekilde sulu ekstre, dördüncü ve beşinci gruplara ise kg başına 200 mg ve 400 mg olacak şekilde etanollü ekstre ağızdan verildi. Kan glukoz düzeyleri Hagedorn-Jensen metoduna göre tayin edildi. Test ve kontrol grupları arasındaki farklılıkların değerlendirilmesinde Student-t testi kullanıldı.

Tablo 1: Defne yapraklarının sulu ve etanolü ekstrelerinin tavşanların kan şekeri düzeyine etkisi.

Grup	0h	1h	2h	3h	4h
Kontrol (%0.9NaCl)	99 ± 23,4	98 ± 17,2	98,6 ± 16,2	96,6 ± 14,1	99,6 ± 12,4
Sulu Ekstre (2g/kg)	99,4 ± 4,7	104 ± 11,3	100,8 ± 7,5	111,2 ± 5,5	107,2 ± 10,3 ^(*)
Sulu Ekstre (4g/kg)	106,8 ± 6,8	110 ± 5,8	105,4 ± 9,2	105 ± 7,8	104,8 ± 8,4 ^(**)
Etanolü Ekstre (200mg/kg)	104,2 ± 8,6	105,6 ± 7,2	95,2 ± 7,8	107,8 ± 12,6	103,8 ± 8,3 ^(***)
Etanolü Ekstre (400mg/kg)	111,8 ± 10,7	106,8 ± 8,2	102,6 ± 4,6	103,8 ± 23,4	106 ± 7 ^(****)

(*) 0,05 < p < 0,10

(**) 0,50 < p < 0,90

(***) 0,90 < p

(***) 0,001 < p < 0,01

az anlamlı

anlamsız

anlamsız

anlamlı

SONUÇ VE TARTIŞMA

Yurdumuzdaki örtüsü içinde geniş bir alanda bol olarak yetişen *Laurus nobilis* L. (Lauraceae)'in yaprak ve meyvaları gerek baharat gerekse halk ilacı olarak kullanılmaktadır. Yapraklardan elde edilen uçucu yağ ise parfümeri ve gıda sanayinde geniş bir kullanım alanı bulmaktadır (33). Bu çalışmada, defne yapraklarının hipoglisemik etkisi araştırıldı.

Tavşanlara NaCl çözeltisi (kontrol), sulu ve etanolü bitki ekstraktları verildikten sonra bulunan kan şekeri düzeyleri Tablo 1'de gösterildi. Defne yapraklarının 2 ve 4 g/kg konsantrasyonlardaki sulu ekstraktlarının ve 200 mg/kg etanolü ekstresinin tavşanların kan şekerini düşürmediği, 400 mg/kg konsantrasyonda verilen etanolü ekstrenin ise kontrol grubuna göre yaklaşık olarak %10'luk bir düşüş sağladığı saptandı. İstatistiksel olarak da bu sonucun anlamlı ($0.01 > p > 0.001$) olduğu bulundu.

Hipoglisemik etki gösteren bazı bitkilerde yapılan çalışmalarda aktif maddenin polisakkarid (14-18) veya terpenoid yapısında olduğu bildirilmiştir (22). Defne yapraklarından elde edilen yağın analizinde terpen yapısında maddeleri fazla miktarda içerdiği bildirilmektedir (34,35). 400 mg/kg etanolü ekstre ile yapılan deneylerde hipoglisemik etkiye neden olan maddenin terpenoid veya polisakkarid yapısında olabileceği düşünülmektedir.

Kan şekerinde %10'luk bir azalma klinik açısından çok anlamlı bir düşüş değildir. Kan şekerindeki düşüşün daha fazla miktarlarda verilecek ekstraktlar ile kontrolü ve tespiti gerektiğinden, konu ile ilgili çalışmalarımız devam etmektedir.

KAYNAKLAR

1. F. G. Banting, C. H. Best, "The internal secretion of the pancreas", *J. Lab. Clin. Med.*, 7 (1922) 251-266. Ref: C. H. Best, "The history of insulin", *Diabetes*, 11 (1962) 495-503.
2. H. D. Brahmachari, K. T. Augusti, "Hypoglycaemic agent from onions", *J. Pharm. Pharmacol.*, 13 (1961) 128.
3. H. D. Brahmachari, K. T. Augusti, "Hypoglycaemic agents from Indian Indigenous plants", *J. Pharm. Pharmacol.*, 13 (1961) 381-382.
4. H. D. Brahmachari, K. T. Augusti, "Orally effective hypoglycaemic agents from plants"; *J. Pharmacy Pharmacol.*, 14 (1962) 254-255.
5. N. T. Zacharias, K. L. Sebastian, B. Phillip, K. T. Augusti, "Hypoglycemic and hypolipidaemic effects of garlic in sucrose fed rabbits", *Indian J Physiol. Pharmac.*, 24 (2) (1980) 151-154.
6. M. S. Akhtar, Q. M. Khan, T. Khalig, "Effects of *Euphorbia prostrata* and *Fumaria parviflora* in normoglycaemic and alloxan-treated hyper glycaemic rabbits", *Planta Med.*, 50 (2) (1984) 138-142.
7. D. K. Dubey, A. R. Biswas, J. S. Bapna, S. C. Pradhan, "Hypoglycaemic and antihyperglycaemic effects of *Momordica charantia* seed extracts in albino rats.", *Fitoterapia*, 58(6) (1987) 387-390.
8. H. A. A. Twalji, A. A. Al-Badr, "Hypoglycemic activity of *Artemisia Herba Alba*", *J. Ethnopharmacology*, 24 (1988) 123-126.
9. M. A. Ajabnoor, A. K. Tilmissany, "Effect of *Trigonella Foenum Graceum* on blood glucose levels in normal and alloxan-diabetic mice", *J. Ethnopharmacology*, 22 (1988) 45-49.

10. K. K. Annand, B. Singh, D. Chand, B. K. Chandan, V. N. Gupta, " Effect of *Zizyphus Sativa* leaves on blood glucose levels in normal and alloxan diabetic rats ", **J. Ethnopharmacology**, 27 (1989) 121-127.
11. M. D. Ivorra, M. Paya, A. Villar, " A review of natural products and plants as potential antidiabetic drugs ", **J. Ethnopharmacology**, 27 (1989) 243-275.
12. A. U. Rahman, K. Zaman, " Medicinal plants with hypoglycemic activity ", **J. Ethnopharmacology**, 26 (1989) 1-55.
13. C. Day, T. Cartwright, J. Provost, C. J. Bailey ", Hypoglycaemic effect of *Memordica charantia* extracts ", **Planta Medica**, 56 (1990) 426-429.
14. C. Konno, K. Sugiyama, M. Kano, M. Takashi, H. Hikino ", Isolation and hypoglycaemic activity of Panaxans A, B, C, D, and E, glycans of *Panax ginseng* roots", **Planta Medica**, (1985) 434-436.
15. C. Konno, Y. Suzuki, K. Oishi, E. Munakata, H. Hikino, " Isolation and hypoglycemic activity of Atractants A, B and C, glycans of *Atractylodes Japonica* rhizomes ", **Planta Medica**, (1985) 102-103.
16. C. Konno, T. Mizino, H. Hikino, " Isolation and Hypoglycemic activity of Lithospermans A, B, and C, Glycans of *Lithospermum erythrorhizon* roots ", **Planta Medica**, (1985) 157-158.
17. C. Konno, M. Murayama, K. Sugiyama, M. Arai, M. Murakami, M. Takahashi, H. Hikino, " Isolation and hypoglycemic activity of Acontitans A, B, C, and D, glycans of *Aconitum carmichaeli* roots ", **Planta Medica**, (1985) 160-161.
18. H. Hikino, M. Kobayashi, Y. Suzuki, C. Konno, " Mechanism of hypoglycemic activity of aconitan A, a glycan from *Aconitum carmichaeli* roots ". **J. Ethnopharmacology**, 25 (1989) 295-304.
19. P. Khanna, S. C. Jain, A. Panagariya, V. P. Dixit, " Hypoglycemic activity of polypeptide-p from a plant source ", **J. Nat. Prod**, 44 (6) 648-655.
20. B. K. Chakravathy, K. D. Gode, " Isolation of (-)-epicatechin from *Pterocarpus marsupium* and its pharmacological actions ", **Planta Medica** (1985) 56-59.
21. M. D. Ivorra, M. D. D'Ocon, M. Paya, A. Villar, " Antihyperglycemic and insulin release effects of β -sitosterol 3- β -D-glucoside and its aglycone β -sitosterol ", *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie*, 296 (1988) 224-231. Ref: M. D. Ivorra, M. Paya, A. Villar, **J. Ethnopharmacology**, 27 (1989) 243-275.
22. A. Espada, J. Rodriguez, M. C. Villaderde, R. Riguera, J. A. Otero, R. Cadena, " Hypoglycaemic activity of Triterpenoid Glycosides from *Boussingaultia baselloides* ". **Planta Medica**, 56 (1990) 506.
23. M. S. Karawya, S. M. Wahab, M. M. El-Olemy, N. M. Farrag, " Diphenylamine, an antihyperglycemic agent from Onion and tea ", *Journal of Natural Products*, 47 (1984) 775-80. Ref: M. D. Ivorra, M. Paya, A. Villar, **J. Ethnopharmacology**, 27 (1989) 243.
24. A. Demirhan, " Şeker hastalığının halk hekimliğindeki yeri ", **Türk Folklor Araştırmaları Dergisi**, 16(316) (1975) 7485.
25. S. Yücecan, G. Pekcan, " Diabetli hastaların beslenme alışkanlıkları, kan şekerlerini düşürmek amacıyla kullandıkları otlar ", **Diabet Yıllığı**, 3 (1986) 217-231.

26. B. Akgün, S. Yücecan, " Diabetes mellitüs' de kan şekerini düşürmek amacıyla kullanılan otlar ve yiyecekler ", **Beslenme ve Diyet dergisi**, 16 (1987) 179-190.
27. S. Yücecan, N. Çiftçi, B. Akgün, C. Aksoy, N. Taşçı, M. Tayfur, ", Diabetli hastaların kan şekerlerini düşürmek amacıyla kullandıkları yöresel otlar ", **Diabet ve Endokrinoloji Yılığ**, 6(1988) 104-109.
28. R. Hisar, " *Parietaria officinalis* (yapışkan otu) üzerinde araştırmalar ", **Türk Hijyen ve Tecrübi Biyoloji dergisi**, 11(2) (1951) 172-187.
29. İ. Kuşcu, A. Can, " Action of two drugs from folk medicine on blood sugar level ", **Acta Pharmaceutica Turcica**, 26(3) (1984) 46-48.
30. Z. Yazıcı, " *Sorbus Domestica* L. bitkisinin yapraklarında bulunan aktif maddenin kan şekerine etkisi ", **Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Araştırma Dergisi**, 2(4) (1984) 302-308.
31. A. Can, N. Akev, N. Sütüöpinar, " Effect of rose hips on blood glucose level ", **Acta Pharmaceutica Turcica**, 34 (1992) 17-22.
32. N. Akev, A. Can, N. Sütüöpinar, "Effect of *Prunus mahaleb* seeds on blood glucose level ", IX. **Bitkisel İlaç Hammaddeleri Toplantısı**, Abstracts, Eskişehir (1991) 9.
33. T. Baytop, " Türkiye'de bitkiler ile tedavi ", 218, **İstanbul Üniversitesi Yayınları** No: 3255, İstanbul (1984).
34. T. Yoshida, " On the oil containing tissue, the essential oil contents and chemical composition of essential oil in laurel leaf (*Laurus nobilis* L.), **Nettai Nogyo**, 23(1) (1979) 6-10. Ref: **Chem. Abst.** 91, (1979) 71713 z.
35. T. Yoshida, " Essential oil of *Laurus nobilis* L. ", Koen Yoshishu-Koryo, Terupen oyobi Seiyu Kagaku in Kansuru Toronkal, 23rd (1979) 184-186. **Chem. Soc. Japan**. Tokyo, Japan.

TÜRK ANNELERİNİN KOLOSTRUM YAĞ ASİDİ KOMPOZİSYONU

Ayşe OGAN(*), Refiye YANARDAĞ(**), Nesrin EMEKLİ(*), Ayfer BAPÇUM(**)

(* Marmara Üniv., Dış Hekimliği Fak.Biyokimya Bölümü, Nişantaşı-İstanbul-Türkiye

(**) I.Ü.Müh.Fak.Kimya Bölümü, Biyokimya Anabilim Dalı Avcılar-İstanbul-Türkiye

COLOSTRUM FATTY ACID COMPOSITION OF TURKISH WOMEN

SUMMARY

Fatty acid composition of colostrum of Turkish women was determined by GLC. Milk of Turkish women contained significantly higher percentages of 8:0, 10:0, 12:0, 18:2, 20:4 and 22:1 and lower percentages of 16:0, 16:1 and 18:1 compared to milk of women taking western diets. The PUFA:SFA ratio is 0.76. Increased percentages of medium chain SFA and polyunsaturated fatty acids and analysis of Turkish diet indicated high carbohydrate and polyunsaturated fatty acid intake. Also increased percentages of medium chain SFA suggested increased mammary gland synthesis.

ÖZET

Bu çalışmada, Türk annelerinin kolostrum yağ asidi kompozisyonu, gaz kromatografisi ile tayin edildi. Alman ve Amerikan annelerinin sütlerine göre, Türk annelerinin sütlerinde 8:0, 10:0, 12:0, 18:2, 20:4 ve 22:1 yağ asidi yüzdelerinin fazla, 16:0, 16:1 ve 18:1 yağ asitleri yüzdelerinin ise az olduğu görüldü. Poli doymamış yağ asidi: doymuş yağ asidi oranı 0.76 bulundu. Polidoymamış yağ asitlerinin artmış olması Türk diyetinde çok miktarda polidoymamış yağ asidi içeren yağ tüketildiğinde, orta zincirli doymuş yağ asitlerinin miktarının artmış olmasında, meme bezlerinde bu yağ asitlerinin sentezinin fazla miktarda yapıldığını ve karbonhidrat tüketiminin fazla olduğunu düşündürmektedir.

GİRİŞ

Bebekler için en iyi besinin anne sütü olduğu bilindiğinden son yıllarda anne sütü ile beslenmeye eğilim artmaktadır. Süt lipidlerinin önemli bir bileşeni olan yağ asitleri diyetden, yağ depolarından ve meme bezlerinde meydana gelen üretimden kaynaklanır(1-4). Meme bezleri 10-14 karbonlu yağ asitlerini sentezleyebilir, fakat 16 ve daha uzun zincirli yağ asitleri ise meme bezlerinde sentezlenmeyip annenin plazma lipitlerinden sağlanır(5,6). İnsan organizmasında, polidoymamış yağ asitleri ayrı bir önem taşımakta olup, bu yağ asitleri hücre ve özellikle sinir sisteminin gelişiminde, prostaglandinlerin

sentezinde önemli rol oynamaktadır(1,7,8). Lipidler sütün en değişken bileşenidir, gün içinde, emzirme sırasında oldukça farklılık gösterirler. Lipidlerdeki yağ asitleri kompozisyonu ise kolayca değişmeyip annenin aldığı diyet ve tükettiği yağın cinsine bağlı olarak değişmektedir. Toplumların diyeti ve yağ alışkanlığı sütteki yağ asidi kompozisyonuna yansımaktadır(9,10).

DENEL BÖLÜM

Süt örnekleri miyadında doğum yapan gönüllü annelerden doğumu takip eden 2 ve 3üncü günlerde lipid miktarının en fazla olduğu bildirilen saat 10.00-11.00 arası her 2 memeden elektrikli pompa ile alındı(11,12) ve 2 memenin sütü hemen birleştirildi. Annelere kullandığı yağ türü sorularak, diyetindeki yağ türü değerlendirildi. Dondurma, çözme ve -20°C de saklama lipolize neden olduğundan sütler derhal modifiye Bleigh ve Dyer metoduna göre ekstrakte edildi(13).

Yağ Asitlerinin Analizi

Ekstrakte edilen yağ asitleri metil esterlerine çevrilerek(14) FID dedektörü içeren 1400 Varian Aerograph gaz kromatografisi cihazı ile analiz edildi. Analiz için 2 kolon kullanıldı. Birinci kolon 6 feet uzunluğunda, 1/8 inch çapında paslanmaz çelikten 80/100 chromosorb WAW, üzerinde %15 OV-275 ile doldurulmuştur. 2inci kolon 2 feet uzunluğunda, 1/8 inch çapında paslanmaz çelikten 80/100 supelcoport üzerinde %10 DEGS ile doldurulmuştur. DEGS kolonunda 175°Cde izotermal, OV-275 kolonunda 100→200°C dakikada 2°C arttırılarak programlı olarak çalışıldı. Her 2 kolon ile çalışmada enjeksiyon temperaturü 200°C, dedektör temperaturü 220°Cde tutulmuş ve azot hızı sıra ile 40ml, 20ml/dak olacak şekilde ayarlanmıştır. Pikler Camag 4270 disc integratör sistemi ile ölçülmüş ve yağ asidi bileşenleri % ağırlık olarak verilmiştir. Esterlerin gaz kromatografisi ile analizi sonucu çıkan pikler, standartların verdiği piklerle kıyaslanarak değerlendirildi.

Bulgular

Tablo 1de Türk annelerinin kolostrum yağ asidi kompozisyonu, Tablo 2de ise annelerin diyetindeki yağ türlerinin değerlendirilmesi görülmektedir. Ayçiçek yağı bazlı beslenen anneler grubun %90.5 unu oluşturmaktadır.

Tablo 1. Türk annelerinin doymuş ve doymamış yağ asidi kompozisyonu

Yağ Asitleri	Doymuş Yağ Asitleri % Ağırlık n=21	Yağ A.	Doymamış Y.Asitleri % Ağırlık n=21
6:0	1.77±2.79	16:1	2.68±2.57
8:0	1.74±2.25	18:1	29.54±13.36
10:0	2.88±3.14	18:2	17.42±7.21
12:0	3.61±3.32	18:3	1.52±1.83
14:0	4.39±2.85	20:1	Eser
15:0	Eser	20:2	1.93±1.53
16:0	18.51±6.80	20:3	3.51±3.39
18:0	3.72±3.23	20:4	3.53±3.49
		22:1	10.86±6.89

Tablo 2. Sütlerini aldığımız 21 annenin tükettiği yağ türleri

Yağ Türleri	n (Anne Sayısı)
Ayçiçek yağı bazlı margarin+ Ayçiçek sıvı yağ+çok az tereyağ	14
Ayçiçek yağı bazlı margarin+zeytin yağ +ayçiçek sıvı yağ+çok az tereyağ	5
Sadece tereyağ	2

Doymuş yağ asitleri, kolostrumun toplam yağ asitlerinin %37.22'sini, doymamış yağ asitleri ise %65.66'sını oluşturmaktadır. Yağ asitlerinin çoğunluğu çift karbon sayılı olmasına rağmen, eser miktarda 15:0 yağ asidine rastlanmıştır. Orta zincirli doymuş yağ asitleri 10:0, 12:0 ve 14:0 toplam yağ asitlerinin %11.28'ini oluşturmaktadır.

TARTIŞMA

Sütteki lipid miktarı gün içinde ve emzirme sırasında oldukça farklılıklar göstermesine rağmen, yağ asidi kompozisyonu çok kolay değişmemektedir(1,9,10). Süt yağ asidi kompozisyonu diyetle, alınan yağların cinsine, miktarına, laktasyonun evresine göre değişmektedir(1,4,11). Türk annelerinin kolostrum yağ asidi kompozisyonu birkaç yağ asidi dışında Alman ve Amerikalı annelerin sütlerinden oldukça farklılık göstermektedir(11,12). Tablo 3'de görüldüğü gibi Türk annelerinde, orta zincirli yağ asitleri 8:0, 10:0, 12:0, esansiyel yağ asitleri 18:2, 20:4 ve 22:1 yüzdeleri yüksek, 16:0, 16:1, 18:0 ve 18:1 yüzdeleri düşüktür. Türk diyetine ilişkin veriler alınan kaloringin %64'ünü karbonhidratların, %23.69'unu yağların, %12.31'ini proteinlerin karşıladığını göstermektedir(15). Mevcut istatistiklere göre Amerikalının diyetinde total kaloringin %46'sı karbonhidratlardan, %42'si yağdan ve %12'si proteinlerden sağlanmaktadır(16). Yüksek oranda karbonhidrat ile beslenme 10:0, 12:0 yağ asitlerinin artışına, 18:0 ve 18:1 yağ asitlerinin düşmesine neden olmaktadır(1,7). Diyetle alınan karbonhidratın, meme bezlerinde orta zincirli yağ asitlerinin sentezini artırdığı ve yine diyetle alınan 18:2'nin ise, bu yağ asidinin sütteki miktarını etkilediği bildirilmiştir(2,5,7,17). Bulgularımıza göre polidoymamış yağ asitleri yüzdesinin doymuş yağ asitleri yüzdesine oranı 0.76'dır. Sütlerini aldığımız annelerin %90.5'u polidoymamış yağ asidi içeren ayçiçek yağı bazlı margarin ve ayçiçek sıvı yağı tükettikleri de tespit edilmiştir. Türk annelerinin sütlerinde 18:2 linoleik asid miktarının artması, ayçiçek yağı alımının yüksek olmasına bağlanabilir. Kültürel ve bölgesel olarak da sütteki yağ asidi kompozisyonunun farklılık gösterdiği bildirilmiştir. Read ve arkadaşları(18), dört etnik grupta (Tanzanyalı, Ürdünlü, Bedevi ve Lübnanlı) süt yağ asidi kompozisyonunu incelemişler ve bu gruplardaki kadınların diyetlerinin birbirinden oldukça farklı olduğunu görmüşlerdir. Kalorisinin çoğunluğunu karbonhidratlardan elde edilen Bedevi ve Tanzanyalı kadınların sütlerinde doymuş yağ asitleri oldukça fazla iken, doymamış yağ asitleri ile daha çok beslenen Ürdünlü ve Lübnanlı kadınların sütlerinde doymamış yağ

Tablo 3. Alman ve Amerikalı annelerin kolostrum yağ asidi kompozisyonu (6,9,10) ile bulgularımızın karşılaştırılması.

Yağ Asidi	Doymuş Yağ Asitleri % Ağırlık				Yağ Asidi	Doymamış Yağ Asitleri % Ağırlık			
	Türk n=21(ORT)	Alman n=14(ORT)	Amerikan n=89(ORT)	Amerikan n=6(ORT)		Türk n=21(ORT)	Alman n=14(ORT)	Amerikan n=89(ORT)	Amerikan n=6(ORT)
6:0	1.77	-	0.08	-	14:1	-	0.64	0.30	-
8:0	1.74	-	0.04	-	16:1	2.68	4.12	3.92	4.3
10:0	2.88	0.38	0.4	-	17:1	-	0.19	0.51	-
12:0	3.61	2.93	2.41	2.6	18:1	29.54	37.76	37.18	39.5
13:0	-	-	0.03	-	18:2	17.42	10.30	7.82	12.1
14:0	4.99	5.26	5.09	5.6	18:3	1.52	1.37	0.34	1.2
15:0	eser	0.10	0.44	-	20:1	eser	1.37	1.17	1.3
16:0	18.51	25.66	24.47	23.4	20:2	1.93	0.65	0.65	0.6
17:0	-	-	0.64	-	20:3	3.51	0.35	0.49	0.5
18:0	3.72	8.44	8.24	7.1	20:4	3.53	0.55	0.71	0.8
20:0	-	-	0.71	-	20:5	-	0.43	0.43	-
22:0	-	-	0.24	-	22:1	10.86	0.20	0.08	-
24:0	-	0.19	0.31	-	22:4	-	0.15	0.04	-
					22:5	-	0.13	0.35	-
					22:6	-	0.21	0.64	1.0

asitleri daha fazla yüzdeye sahiptir. Borschel ve ark.(5)da Mısırlı annelerin sütleri ile Amerikalı annelerin sütlerinin yağ asidi kompozisyonunu karşılaştırmış ve Mısırlı kadınların sütlerinde 18:2 yağ asidi yüzdesi Amerikalı annelere göre yüksek, 16:0 ve 18:1 ise düşük bulunmuştur. Düşük sosyoekonomik düzeydeki kadınların 18:1 yağ asidi yüzdesinin düşük, 18:2 ve 18:3 yüzdesinin yüksek olduğu bildirilmiştir(19). Bizim olgularımızda da 18:2 yağ asidi yüzdesi yüksektir, gerçik biz anneleri gelir düzeyine göre ayırmadık, çünkü toplumumuzda kolesterol korkusundan ve medyadan etkilenererek yüksek sosyoekonomik düzeydeki kadınlar da artık polidoymamış yağ asitleri içeren yağlar tüketmektedir, dolayısı ile olguların kullandıkları yağlara göre düşük ya da yüksek sosyoekonomik düzeyde olup olmadığını söylemek güçtür. Ayrıca toplumumuzda bizimde gözlemlerimize göre zeytinyağı tüketim alışkanlığı özellikle doğu kökenli ailelerde fazla yerleşmemiştir. Tablo 2de görüldüğü gibi sadece 5 anne diğer yağların yanısıra zeytinyağı tüketmektedir. Buna bağlı olarak 18:1 yüzdesini düşük bulduk. Zeytinyağının diğer yağlara göre pahalı olması da diğer bir etken olabilir. Esansiyel yağ asitleri (18:2, 18:3 ve 20:4) bebeklerin beslenmesinde hayati önem taşımalarına rağmen 18:2 yüzdesi toplam yağ asidi içinde %18in üzerinde ise aşırı peroksidasyon oluşacak ve E vitaminine gereksinim artacaktır(20,21). 18:2nin yüksek olduğu mısır ve ayçiçek yağına E vitamini takviyesi gerekebilir. E vitaminine gereksinim ne kadardır, bunun ne kadarı süte transfer olabilmektedir, bunlar henüz açıklığa kavuşmuş konular değildir. Ayrıca sütteki 18:2 miktarının artışına bağlı olarak bebeklerin plazma kolesterol seviyesinin düştüğü bildirilmiştir(22,23). Aynı şekilde ticari mamalarda da 18:2 miktarı artırılmaktadır, fakat plazma kolesterolünü azaltmanın, bebeğin ilerki hayatında etkisi henüz tam olarak açıklanmış değildir(23,24).

Sonuçlarımız literatür bilgisi ışığında değerlendirildiğinde Türk

annelerinin sütlerinde beslenme alışkanlığına bağlı olarak polidoymamış yağ asidi yüzdesi yüksektir. Alman annelerinde 0.32 olan P/S oranı, bizim annelerimizde 0.76'dır. Özellikle polidoymamışlardan 18:2 yüzdesi bizim annelerimizde %17.42'dir. Bu değer peroksidasyon sınırına yakın olmakla beraber bu sınırı aşmamıştır. Yüksek oranda, polidoymamış yağ asidi içeren anne sütü ile beslenen bebeklerdeki kolesterol metabolizmasının ne derece etkileneceğine dair çalışmalar henüz yeterli değildir.

KAYNAKLAR

1. R. G. Jensen, M. M. Hargerty and E. K. Mc Mahen, " Lipids of human milk and infant formulas; A review ", *Am.J Clin. Nutr.*, 31 (1978) 990 - 1016.
2. C. J. Lammi Keefe and R. G. Jensen, " Lipids in human milk ", *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.*, 3 (1984) 172 - 198.
3. R. G. Jensen, A. M. Ferris, C. J. Lammi Keefe and R. A. Henderson, " Dairy Foods. Lipids bovine and human milks ". *J. Dairy Scien.*, 73 (1990) 223 -240.
4. P. Pierse, J. V. Aerde and M. T. Clandinin, " Nutritional value of human milk ", *Prog. in food and Nutr. Scien.*, 12 (1988) 421 - 427.
5. M. Borschel, R. G. Elkin, A. Kirksey, J. A. Story, O. Galal, G. G. Harrison and N. W. Jerome, "Fatty acid composition of mature human milk of Egyptian and American women ", *Am. J. Clin. Nutr.*, 44 (3) (1986) 330 - 335.
6. G. Harzer, M. Haug, I. Dietrich and P. R. Gentner, " Changing patterns of human milk lipids in the course of the lactation and during the day ", *Am.J. Clin. Nutr.*, 37(1983) 612 - 621.
7. J. E. Chappel, M. T. Clandinin, M. A. Mcvey and G. W. Change, " Fatty acid content of human milk. Physiologic significance and artifactual Determinants ". *Lipids*, 20(1985) 216 - 221.
8. J. E. Chappel, M. T. Clandinin and G. J. Barbe, " Prostanoid content of human milk. Relation to milk. Relation to milk fatty acid content ", *Endo. Exper.*, 17 (1983) 351 - 358.
9. R. A. Gibson and G. M. Kneebone, " Fatty acid composition of human colostrum and mature breast milk ", *Am. J. Clin. Nutr.*, 34 (1981) 252 - 257.
10. L. Jansoon, B. Akesson and L. Holmberg. " Vitamin E and fatty acid composition of human milk", *Am.J. Clin. Nutr.*, 31 (1976) 193 - 199.
11. K. E. Hundriser, R. Clark, R. G. Jensen and A. M. Ferris, " A comparison of methods for determination of total lipids in human milk ", *Nutr. Research*, 4 (1984) 21 -26.
12. A. M. Ferris and R. G. Jensen, " Lipids in human milk " A review, *J. Pediatr. Gastroenterol Nutr.*, 3 (1984) 108 - 122.
13. P. R. Gentner, M. Bauer and I. Dieperich, " Separation of major phospholipid classes of milk without previous isolation from total lipid extract ", *J.of. chrom.*, 206 (1981) 200 - 204.
14. F. D. Snell, L. S. Etre, **Fatty acid methyl ester**, *Encyclopedia of industrial chemical Analysis*, 12 (1971) 485.

15. Orhan Köksal, "Türkiye'de Beslenme", Türkiye 1974. **Beslenme, sağlık ve gıda tüketimi** H. Ü. yayınları. Ankara (1977) 84.
16. D. W. Martin, P. A. Mayes, V. W. Rodwell, " **Harper's review of Biochemistry** ". Lange yayınevi (1981) 565.
17. B. Hall, "Uniformity of human milk ", **Am.J. Clin. Nutr.**, 32 (1979) 304 - 313.
18. W. W. Read, P. Lutz and A. Tashjian, " Human milk lipids. Short-term effects of dietary carbohydrate and fat ", **Am.J. Clin. Nutr.**, 17 (1965) 180 - 183.
19. M. L. Pita, J. Morakes, A. Pozo, J. Am. Martinez and A. Gil, " Influence of the mother's weight and socioeconomic status on the fatty acid composition of human milk ", **Ann. Nutr. Metab.**, 29 (1985) 366 - 373.
20. American Academy of Pediatrics, " Commatory on breast feeding and infant formulas ", **Pediatric**, 57 (1976) 278 - 379.
21. S. A. Hashim and R. H. Asfour, " Tocoferol in infants fed diet rich in polyunsaturated fatty acids", **Am.J. Clin. Nutr.**, 21 (1968) 7 - 12.
22. L. D. Greenberg and P. Wheeler, " Influence of fatty acid composition of infant formulas on the development of arteriosclerosis and on the lipid composition of blood and tissues. Lipid Studies in ", **Diary Lipids and Lipid Metabolism**. Edited by M. F. Brink and D. Kritchewksy Av. Publication Co. Westport (1968) 149.
23. P. A. Hodgson, R. D. Ellofoon, L. R. Elveback, L. E. Harris, R. H. Nelson and W. H. Weidman, " Comparison of serum cholesterol in children fed high moderate or low cholesterol diets during neonatal period ", **Metabolism**, 25 (1976) 739 - 745.
24. M. J. Mellier, T. T. Ishikawa, P. Gartsile, K. Burton, J. Mac Gee, K. Allen, P. M. Steiner, D. Brady and C. J. Glueck, "Effect of varying maternal deatry cholesterol and phytosterol in lactating women and their infants ", **Am. J. Clin. Nutr.**, 31 (1978) 1347 - 1354.

HANTZSCH TEPKİMESİNİN ÜRE SAPTANMASINA UYGULANMASI

Fatma AYDIN* ve H. Nursevin ÖZTOP**

*Cumhuriyet Üniversitesi Müh. Fak. Çevre Müh. Böl. Sivas - TÜRKİYE

**Cumhuriyet Üniversitesi Fen-Ed. Fak. Kimya Böl. Sivas - TÜRKİYE

DETERMINATION OF UREA BY HANTZSCH REACTION

SUMMARY

Urea is converted ammonia with urease enzyme by analysing potentiometric and spectrophotometric methods. Kjeldahl is the oldest method whereas Nesslerization is the oftenest method of determination ammonia.

In this study ; Hantzsch reaction has been exploited to developed a new spectrophotometric method for the determination of nitrogen in the standart solution of urea and blood serum. The results have been observed that experimental values of urea-nitrogen are suitable for values of the Nesslerization method and theoretical results.

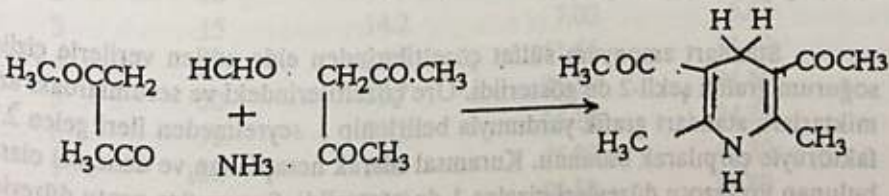
ÖZET

Üre , üreaz enzimiyle amonyağa çevrilerek potansiyometrik veya spektrofotometrik olarak analizlenebilmektedir. Amonyak saptanmasında bilinen en eski yöntem Kjeldahl yöntemidir. En yaygın olarak kullanılan yöntem ise Nesslerizasyon yöntemidir.

Bu çalışmada ; Hantzsch tepkimesi , standart üre çözeltileri ve kan serumundaki azotun saptanması için yeni bir spektrofotometrik yöntemin geliştirilmesinde kullanılmıştır. Sonuçlar , deneysel değerlerle kuramsal değerlerin ve Nesslerizasyon yöntemi değerlerinin uyumlu olduğunu göstermiştir.

GİRİŞ

Amonyanın β -ketoester ve aldehit ile tepkimesi sonucu 1,4-dihidropiridin türevi oluşturan Hantzsch tepkimesi, değişik kaynaklardan elde edilen amonyanın nicel olarak saptanmasında kullanılmaktadır (1).



Şekil-1. Hantzsch Tepkimesi

Amino asitlerin yıkımı sonucu oluşan ve insanlar için toksik olan amonyak, üreye çevrilerek vücuttan atılır. Kandaki üre düzeyindeki artış bazı önemli hastalıkların belirtisidir. Bu nedenle serumdaki üre düzeyinin saptanması oldukça önemlidir (2). Bu amaçla kullanılan pek çok yöntem bulunmaktadır. Ancak çalışma örneği miktarının azlığı yöntem seçiminde spektrofotometrik yöntemi yaygın kullanılır hale getirmiştir.

Bu çalışmada ; en yaygın olarak kullanılan Nesslerizasyon yöntemine (3) , çalışma süresi ve reaktif hazırlanması yönünden alternatif bir yöntem olarak Hantzsch tepkimesi seçilip üre azotu analizine uyarlanmıştır.

DENEL BÖLÜM

Kullanılan Çözeltiler:

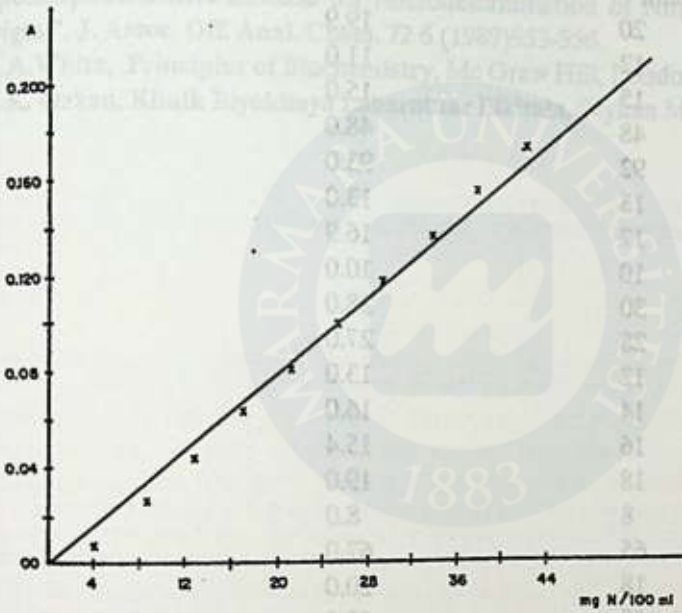
1. Standart amonyum sülfat çözeltisi (20 mg/100 mL)
2. Stok üre çözeltisi (0.857 g/100 mL)
3. Standart üre çözeltisi (4 mL stok üre çözeltisinden alınarak 50 mL 'ye seyreltildi)
4. Üreaz çözeltisi (670 mL gliserin + 330 mL su + 10 g üre)
5. Trikloroasetik asit çözeltisi (%20 w/v)
6. Sodyum asetat çözeltisi (41 g /500 mL)
7. Reaktif çözelti (15 mL formaldehit , 7.8 mL asetilaseton /100 mL)

Çalışma grafiğinin hazırlanması: Değişik derişimlerde standart amonyum sülfat çözeltileri 25 mL'lik balon jodelere alınarak üzerlerine 3 mL sodyum asetat , 4 mL reaktif çözelti eklendi. 95 °C'ta su banyosunda 15 dk bekletildi. Soğutulan örneklerin hacmi damıtık su ile 25 mL'ye tamamlandı. 412 nm dalga boyunda spektrofotometrede soğurumu ölçüldü.

Değişik derişimlerdeki üre standartlarına ve kan serumu örneklerine yeteri kadar üreaz çözeltisi eklenerek oda sıcaklığında 15 dk bekletildi. Üzerine trikloroasetik asit çözeltisi eklenerek proteinlerin çöktürülmesine kadar santrifüjlendi. Üst sıvıdan alınan örneklere standart çalışma işlemleri yapıldı.

TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Standart amonyum sülfat çözeltilerinden elde edilen verilerle çizilen soğurum grafiği şekil-2 de gösterildi. Üre çözeltilerindeki ve serumlardaki azot miktarları; standart grafik yardımıyla belirlenip , seyrelmeden ileri gelen 2.73 faktörüyle çarpılarak bulundu. Kuramsal olarak hesaplanan ve deneysel olarak bulunan üre-azotu düzeyleri çizelge-1 de gösterildi. Serum üre-azotu düzeyleri ise çizelge-2 de verildi.



Şekil-2: Standart çalışma grafiği

Çizelge-1: Kuramsal ve Deneysel Üre-azotu Düzeyleri

Örnek No	Kuramsal Üre (%mg)	Deneysel Üre (%mg)	Kuramsal Azot (%mg)	Deneysel Azot (%mg)
1	5	4.8	2.33	2.24
2	10	10.5	4.66	4.90
3	15	14.2	7.00	6.62
4	25	24.5	11.66	11.43
5	50	52.7	24.60	24.60
6	75	73.2	35.10	34.20
7	100	99.0	46.80	46.20
8	125	126.0	58.50	58.80
9	150	151.0	70.20	70.50
10	200	197.0	93.60	92.50

Çizelge-2: Serumlardaki Üre-azotu Düzeyleri

Örnek No	Nesslerizasyon Yöntemi	Üre-azotu (%mg) Yeni Yöntem
1	20	19.9
2	12	11.0
3	15	15.0
4	48	48.0
5	92	93.0
6	13	13.0
7	17	16.9
8	10	10.0
9	30	28.0
10	28	27.0
11	12	13.0
12	14	16.0
13	16	15.4
14	18	19.0
15	8	8.0
16	65	67.0
17	18	20.0
18	68	68.0
19	16	15.0
20	123	122.0

Hantzsch tepkimesiyle amonyanın nicel tayininde reaktiflerin hazırlanışı ve deneylerin yapılışı kısa sürede gerçekleşmektedir. Tepkime sonucu oluşan renkli ürün oldukça karalıdır. Nesslerizasyon yönteminde amonyum sülfat ile hazırlanan standart çözeltiden oluşan üründe ise çökme sorunu ortaya çıkmaktadır. Çalışmalarımızda çizelgelerden görüldüğü gibi kuramsal ve deneysel değerler uygunluk göstermiştir. Ayrıca serum üre-azotu düzeyleri Nesslerizasyon yöntemi sonuçlarıyla uyumludur. Hantzsch tepkimesi reaktiflerinden olan asetilaseton-formaldehit çözeltisinin kullanıldığı spektrofotometrik yöntemdeki ürünün karalı olması nedeniyle üre analizine uyarladığımız bu yöntem serum ve diğer üre kaynaklarına kolaylıkla uygulanabilir.

İKİNCİ BÖLÜMÜN İKİNCİ BÖLÜMÜNÜNDE YENİ YÖNEMİN
 KULLANILMASI VE NİTROJENİN APOKARBOİK ASİTLERİNİN
 İZLENİMİNE KATKISI

KAYNAKLAR

1. M. B. Devani, C. J. Shishoo, A. S. Shah, N. B. Suhagia, Spectrophotometric Method for Microdetermination of Nitrogen in Kjeldahl Digest", *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 72 6 (1989)953-956.
2. A. White, *Principles of Biochemistry*, Mc Graw Hill, London (1985) 615-619.
3. K. Özkan, *Klinik Biyokimya Laboratuvar Elkitabı*, Seyhan Mat.Bursa, 212-217



MARMARA
 ÜNİVERSİTESİ

RAYANIKAR
 I. M. B. Devani, C. Y. Shinde, A. S. Sane, N. B. Saha
 Spectrophotometric Method for Microdetermination of Lead in Medical
 Digest, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 73 (1990) 22-25
 J. A. Wolfe, Principles of Biochemistry, 4th Edition, London (1985) 413-419
 J. K. Özkan, Klinik Biyokimya I. Ders Kitabı, Sağlık Bakanlığı, 213-217



MARMARA

ÜNİVERSİTESİ

Yayınlar ve Kurumlar Genel Müdürlüğü tarafından hazırlanmış ve yayımlanmıştır. Bu yayının tüm hakları Marmara Üniversitesi Yayinevi'ne aittir. Her hakkı saklıdır. Bu yayının dağıtım ve satış hakları Marmara Üniversitesi Yayinevi'ne aittir. Her hakkı saklıdır. Bu yayının dağıtım ve satış hakları Marmara Üniversitesi Yayinevi'ne aittir. Her hakkı saklıdır.

KRONİK BÖBREK HASTA SERUMLARINDA VE PLEVRA SIVISINDA Zn^{+2} MİKTARININ APOKARBONİK ANHİDRAZIN TEKRAR AKTİVASYONU İLE TAYİNİ

Nazan DEMİR, Ö.İrfan KÜFREYOĞLU ve Ebubekir BAKAN

(*)Atatürk Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, Erzurum-Türkiye

(**)Atatürk Üniversitesi, Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı, Erzurum-Türkiye

DETERMINATION OF Zn^{+2} BY REACTIVATION OF APOCARBONIC ANHYDRASE IN CHRONIC RENALE FAILURE PATIENTS SERA AND PLEURAL FLUIDS

SUMMARY

In study, serum of patients with chronic renale failure and pleural fluid Zn^{+2} determination was made by a new method based on reactivation of apocarbonic anhydrase by Zn^{+2} present in the samples. This reactivation is proportional to the Zn^{+2} concentration. Carbonic anhydrase was purified from bovine erythrocytes by affinity chromatography. The Zn^{+2} present in the enzyme was removed by dialysis against dipicolinic acid, resulting in an apoenzyme of 100 % pure. The activity of the enzyme was determined on the basis of esterase effect of the enzyme on p-nitrophenyl acetate. For this purpose, 35 serum samples (15 patients and 20 healthy subjects) and 10 pleural fluids were used as samples. The Zn^{+2} determination was made by two methods: enzymatic method and atomic absorption method. The correlation between two methods was statistically meaningful ($P < 0.001$).

ÖZET

Bu çalışmada prensip olarak, apokarbonik anhidrazın enzimatik aktivitesini örneklerdeki Zn^{+2} miktarı ile orantılı olarak tekrar kazanmasına dayanan, yeni bir çinko tayin yönteminin uygulanabilirliğinin araştırılması ve genişletilmesi amacıyla kronik böbrek hasta serumlarında ve plevra sıvısında Zn^{+2} tayini yapıldı. Karbonik anhidraz, sığır eritrositlerinden afinite kromatografisi yardımıyla saflaştırıldı. Yapısındaki Zn^{+2} dipikolnik aside karşı diyalizle uzaklaştırılarak % 100 saflıkta apoenzim elde edildi. Enzim aktivitesi, enzimin p-nitrofenilasetat üzerindeki esteraz aktivitesi ile belirlendi. 15 kronik böbrek hastası ile 20 sağlıklı kişinin serumlarında ve 10 plevra sıvısı nümunesinde enzimatik metotla ve atomik absorpsiyon metodu ile Zn^{+2} tayini yapıldı. Enzimatik ve atomik absorpsiyon metodlarıyla Zn^{+2} tayin sonuçları arasında önemli korelasyon görüldü ($P < 0,001$).

GİRİŞ

Karbonik anhidraz enzimi (E.C.4.2.1.1.), hücrelerde CO_2 'nin hidratasyonu ve bikarbonatın dehidratasyonu reaksiyonlarını katalizleyen çinkolu bir metaloenzimidir. Enzimin aktif bölgesinde koordine kovalent bağlanmış Zn^{+2} 'nin uzaklaştırılması ile apokarbonik anhidraz (apoCA) oluşmakta ve oluşan apoCA, enzim aktivitesi göstermemektedir (1).

Bu durumda apoCA'nın ortamdaki Zn^{+2} 'yi bağlayarak tekrar aktifleşmesinden faydalanarak Zn^{+2} tayini yapmak mümkün gözükmemektedir. Bu düşünceden hareketle konuyla ilgili ilk araştırma Kobayashi ve arkadaşları tarafından yapılmıştır (2,3). Bu araştırmacılar, apoCA'nın tekrar aktifleşmesi ile meyva suları ve su nümunelerinde, enzimin esteraz ve hidroliz etkilerinden yararlanarak Zn^{+2} tayini yapmışlardır. Ancak Zn^{+2} 'yi çelatlayıcı olarak 1,10-fenantroline kullanmışlar ve enzimi % 100 apo hale getiremediklerinden yüksek konsantrasyonları deneyememişlerdir. Sonuç olarak vücut sıvılarına hiç girmemişlerdir. Daha sonra Küfrevioğlu ve Keha (4) farklı bir çelatlayıcı kullanarak yöntemi yeniden denemişlerdir. Kullandıkları çelatlayıcı olan dipikolinik asitle (piridin 2,6-dikarboksilik asit), daha kısa sürede (3 saat) daha saf apoenzim elde etmeyi başarmışlar ve yöntemi idrar, beyin omurilik sıvısı ve serum nümunelerinde serumun kaynatılarak CA aktivitesinin uzaklaştırması suretiyle denemişlerdir. Fakat bu çalışmada da % 100 apoenzime ulaşamamış ve yöntem sadece sağlıklı kişilere ait serum nümunelerinde denenmiştir. Konunun devamı olarak Küfrevioğlu ve Demir (5) tarafından dipikolinik asitle yapılan diyaliz süresi uzatılmak suretiyle (5 saat) % 100 saflıkta apoenzime ulaşılmış, yöntem diabetli ve sirozlu hasta serumlarında başarıyla uygulanmış, sonuçların doğruluğu aynı nümunelerde yapılan atomik absorpsiyon ölçümleriyle doğrulanmıştır.

Bu çalışmada, yöntemin her türlü serum nümunesinde uygulanabilirliğinden emin olmak için serum muhtevasının değiştiği bilinen kronik böbrek hastaları seçilmiş ve sonuçları mukayese edebilmek için de sağlıklı kişilerin serum nümuneleri de çalışılmıştır. Ek olarak farklı ve denenmemiş bir vücut sıvısı olan plevra sıvısı seçilerek, aynı yöntemin uygulanıp uygulanamayacağı konusu aydınlatılmak istenmiştir.

DENEYSSEL BÖLÜM

Apokarbonik Anhidrazın Sığır Eritrositlerinden Saflaştırılması

Deneyler için sığır kanı Erzurum Belediyesi Mezbahasından kesim esnasında alındı. Antikoagulant olarak asit-sitrat-dekstroz (ACD) kullanıldı. Günlük kullanılan bu kandan önce eritrositler ayrılarak, % 0,9'luk NaCl çözeltisi ile yıkandıktan sonra destile suda hemoliz edildi. Hemolizat 10.000 rpm'de 30 dakika santrifüjlenerek eritrosit zarları uzaklaştırıldı. Daha önce anlatılan bir yöntemle afinite kolonu kullanılarak (6) karbonik anhidraz enzimi saflaştırıldı. Saflaştırılan karbonik anhidraz Sephadex G-25 ile derişikleştirilerek önce deiyonize suya, daha sonra 0,05 M Tris- SO_4 (pH=7,4)'e karşı diyalizlendi. Daha sonra dipikolinik asit çözeltisine karşı 5 saat süreyle diyaliz edilerek enzim yapısındaki Zn^{+2} 'nin tamamı uzaklaştırıldı.

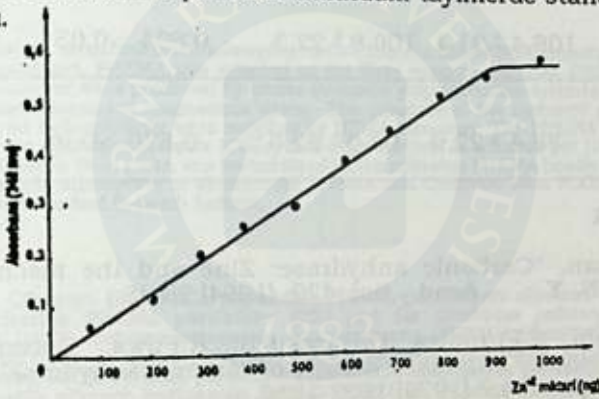
Enzim Aktivitesi Tayini

Karbonik anhidrazın saflaştırılması işlemlerinde elüatlardaki enzim aktivitesi, Rickli ve arkadaşları tarafından modifiye edilen Wilbur-Anderson yöntemiyle belirlendi (7). Standart grafiğin hazırlanmasında ve vücut sıvılarında Zn^{+2} 'nin seviyelerinin belirlenmesi işlemlerinde, CA aktivitesi ölçümleri enzimin esteraz etkisine dayanan bir yöntemle yapıldı (8). Bu yöntemde CA enzimi substrat olarak kullanılan p-nitrofenilasetatı p-nitrofenole hidroliz etmekte ve bunun da 348 nm'de absorpsiyonu ölçülmektedir. Tayin işlemlerinde şu yol takip edildi: Spektrofotometre tüpüne 0,1 ml enzim çözeltisi, 1,4 ml 0,05 M Tris- SO_4 (pH=7,4) ve 1,5 ml substrat konulmasından 3 dakika sonra 25°C'da 348 nm'de absorpsansları enzimsiz kör tüpüne karşı okundu.

Apokarbonik Anhidrazın Tekrar Aktifleşmesinin İncelenmesi ve Standart Grafiklerin Hazırlanması

Stok standart Zn^{+2} çözeltisi, çinko metalinin sıcakta sülfürik asit içinde çözülmesiyle elde edildi. Standart grafiğin hazırlanmasında bu çözelti seyreltilip katı Tris ilavesiyle $pH=7,4$ 'e getirildi.

Apoenzimin standart Zn^{+2} çözeltileriyle ne kadar sürede aktifleştirildiğini belirlemek için farklı inkübasyon sürelerinde aktivite ölçümleri yapıldı. Apoenzimin aktifleşmesi için en uygun süre 3 dakika olarak belirlendi. Tekrar aktifleşmede apoCA konsantrasyonu ile Zn^{+2} miktarları arasındaki ilişkinin incelenmesi amacıyla apoenzim miktarı sabit tutularak ($3,61 \times 10^{-5}$ M) Zn^{+2} konsantrasyonu değiştirildi. Aktifleşme seviyeleri absorbans olarak çinko miktarlarına karşı grafiğe çizildi (Şekil 1). Bu grafik serum örnekleri ve plevra sıvılarındaki tayinlerde standart eğri olarak kullanıldı.



Şekil 1.3,61x10⁻⁵ M'lık sabit apoenzim konsantrasyonunda, Zn⁺² miktarının değiştirilmesiyle apokarbonik anhidrazın aktifleşmesi sonucu elde edilen absorbans değerleri (pH=7,4).

Vücut Sıvılarında Zn⁺² Tayini

Yöntemin kronik böbrek hastaları serumunda ve plevra sıvısında Zn⁺² tayini amacıyla kullanılabilirliğini belirlemek için 20 sağlıklı ve 15 kronik böbrek hastası serumu ile 10 plevra sıvısı örneğinde yukarıda anlatılan şekilde denemeler yapıldı. Serumda ve plevra sıvısında yüksek esterez aktivitesi gözlemlendiğinden, tayin öncesi ağzı kapatılan tüpler kaynar su banyosunda 1 saat süreyle tutuldu ve santrifüjlendi.

Aynı vücut sıvılarında toplam Zn⁺² seviyeleri, atomik absorpsiyonla da belirlendi. Atomik absorpsiyonla Zn⁺² tayini yapılmadan önce serum numunelerinde proteinler % 8'lik TCA ile çöktürüldü (9).

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

20 sağlıklı, 15 kronik böbrek hastası serumu ile 10 plevra sıvısı için elde edilen değerler istatistiksel analizlere tabi tutularak Tablo 1'de topluca gösterildi.

Bu tabloda bütün numunelere ait değerler incelendiği zaman enzimatik yolla elde edilen sonuçlarla atomik absorpsiyonla bulunan değerler arasında tam bir uyum olduğu görülmektedir. Yapılan t testi sonuçlarının önemsiz ($P>0,05$) ve korelasyonun önemli ($P<0,001$) çıkması bunu doğrulamaktadır.

Sonuç olarak, enzimatik yöntemle Zn⁺² tayininin serum muhtevasının değiştiği durumlarda ve plevra sıvısında güvenle kullanılabileceği

anlaşmaktadır. Apoenzim kitlerinin hazırlanması ile uygulanması çok kolay olacak enzimatik yöntemin, alternatif yöntem olan atomik absorpsiyona göre çok daha ucuz olması ve sadece spektrofotometreye ihtiyaç göstermesi kullanım alanını arttıracaktır. Otoanalizer'e adapte edilmesiyle rutin çalışmalara sokulması için çalışmalar devam etmektedir.

Tablo 1. Atomik absorpsiyon ve apoCA yöntemleri ile bulunan Zn^{+2} değerlerine ait korelasyon ve t testi sonuçları ($\mu g / 100ml$).

Numune N	Enz.Yöntem ($\bar{X} \pm SD$)	Atomik Ab. ($\bar{X} \pm SD$)	Student t	t testi P	Korelasyon r	P	
Kontrol grubu	20	123,5 \pm 20,8	129,4 \pm 21,2	1,312	>0,05	0,75	<0,001
Kronik böbrek hastaları	15	106,4 \pm 21,1	106,8 \pm 22,3	0,894	>0,05	0,97	<0,001
Plevra sıvısı	10	88,4 \pm 22,0	90,0 \pm 22,0	0,870	>0,05	0,99	<0,001

KAYNAKLAR

1. J.E.Coleman, "Carbonic anhydrase: Zinc and the mechanism of catalysis", N. Y. Acad. Sci 429 (1984) 26-48.
2. K.Kobayashi, K.Fujiwara, H.Haraguchi, K.Fuwa, "Determination of ultratrace zinc by enzymatic activity of carbonic anhydrase", Bull. Chem. Soc. Jpn., 54,7 (1979) 1932-1936.
3. K.Kobayashi, K.Fujiwara, H.Haraguchi, K.Fuwa, "Determination of ultratrace zinc by enzymatic activity of carbonic anhydrase.II.Use of carbonate hydrolyase activity", Bull. Chem. Soc. Jpn 54.9 (1981) 2700-2704.
4. Ö.I.Küfrevioğlu, E.E.Keha, "Bazı vücut sıvılarında Zn^{+2} miktarının enzimatik yolla tayini", Doğa TU Kim. D., 12,2 (1988) 214-221.
5. N.Demir, Ö.I.Küfrevioğlu, E.Bakan, N.Utlu, "Serum zinc levels inpatients with diabetes mellitus and cirrhosis: A new, enzymatic method, Biyokimya Dergisi XVI, 2 (1991) 272-273.
6. İ.Küfrevioğlu, "Apokarbonik anhidrazın tekraaktivasyonu ile bazı vücut sıvılarında Zn^{+2} tayini", Doktora Tezi, Atatürk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi(1985).
7. E.E.Rickli, S.A.S.Ghazanfar, B.H.Gibbons, J.T.Edsall, "Carbonic anhydrases from human erythrocytes: Preparation and properties of two enzymes" J. Biol. Chem., 239, 4 (1964) 1065-1078.
8. J.A.Verpoorte, S.Mehta, J.T.Edsall, "Esterase activities of human carbonic anhydrases B and C", J. Biol. Chem. 242, 18 (1967) 4221-4229.
9. S.A.Abdulrahman and D.C.Gary, "Flow injection analysis atomic absorption determination of serum zinc", Clin. Chim. Acta 137, 151-157.

CIBACRON BLUE F3GA İMMOBİLİZE PHEMA HİDROJELLERİN AFİNİTE KROMATOGRAFİSİNE UYGULANMASI

A. DENİZLİ, A.TUNCEL, A. KOZLUCA, F. KAYIRHAN, E. PIŞKIN

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Beytepe, Ankara

AFFINITY CHROMATOGRAPHY APPLICATIONS OF CIBACRON BLUE F3GA IMMOBILIZED PHEMA HYDROGELS

SUMMARY

In this study, bovine serum albumin adsorption onto Cibacron Blue F3GA immobilized PHEMA hydrogels was investigated. PHEMA was selected as the base support material. PHEMA particles about 250 μm in diameter were produced by phase inversion polymerization technique carried out in an aqueous phase containing magnesium oxide. The presence of the hydroxyl groups in the structure and desired hydrophilicity were supplied by HEMA monomer. The PHEMA microcarriers were activated by the cyanogen bromide (CNBr) activation method at alkaline pH (11.5). After the CNBr activation, Cibacron Blue F3GA was immobilized to the activated PHEMA beads. The extend of nonspecific and specific adsorption of albumin on PHEMA and Cibacron Blue F3GA immobilized PHEMA particles were studied in batch fashion.

ÖZET

Bu çalışmada, Cibacron Blue F3GA immobilize PHEMA partiküllere albumin adsorpsiyonu incelenmiştir. Hidrofilik PHEMA partiküller (250 μm) faz dönüşüm polimerizasyonu ile magnezyum oksit (MgO) dağıtma ortamında hazırlanmıştır. PHEMA yüzeyindeki hidroksil grupları bazik pH'da CNBr ile aktive edilmiştir. Aktivasyon işleminden sonra, albumine spesifik ligand Cibacron Blue F3GA PHEMA partiküllere bu aktive bölgelerden immobilize edilmiştir. Spesifik ve nonspesifik albumin bağlanması normal PHEMA ve Cibacron Blue F3GA immobilize PHEMA ile test edilmiştir.

GİRİŞ

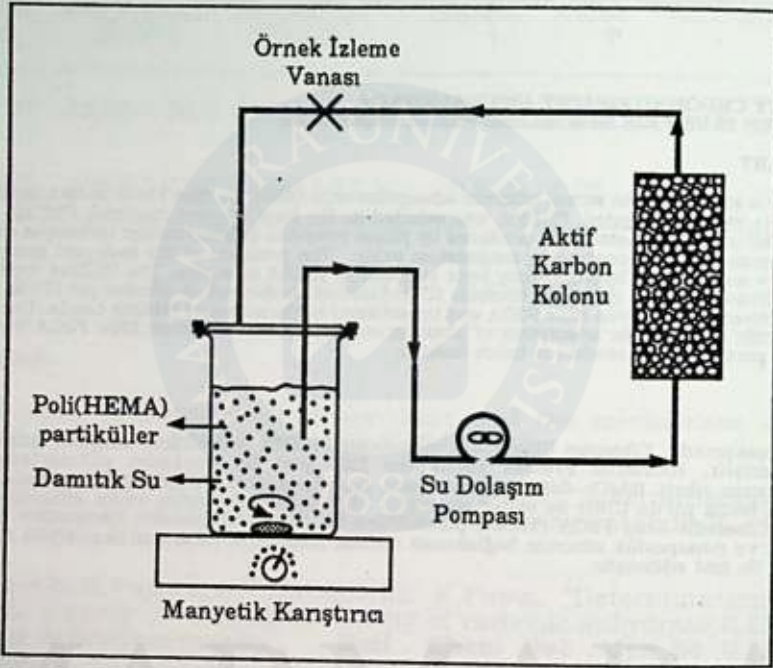
Polimerik partiküller, günümüzde, diagnostik test kitleri; biyoafinite kromatografisi; biyoaktif ajanların (enzim, hücre, vb.) immobilizasyonu gibi bir çok biyolojik uygulamalarda taşıyıcı veya destek maddesi olarak kullanılmaktadır [1,2]. Bu uygulamalardan kromatografik yöntemler ile biyoaktif ajanların buldukları ortamdaki ayrılması genellikle, hidrofobik etkileşimler, iyon değişimi ve biyospesifik etkileşimler üzerine kurulmuştur. Klasik afinite kromatografisinde "ligand" adı verilen biyospesifitesi yüksek ajanlar (enzimler, proteinler, vb) polimerik taşıyıcıya kovalent bağ ile immobilize edilmektedir. Ligand olarak kullanılan bu biyomoleküllerin stabilite, sterilizasyon, tekrar kullanılabilirlik, ve maliyet sorunları vardır. İnorganik sentetik boyaların ucuz ve kararlı olmaları, yüksek spesifiteleri, kolaylıkla sterilenebilmeleri ve sınırsız tekrar kullanımları, bu boyaların kromatografik uygulamalarda alternatif ligand olarak kullanılmalarını gündeme getirmiştir [3]. Bu çalışmada, model ligand Cibacron Blue F3GA immobilize polihidroksietilmetakrilat (PHEMA) partiküllerin kromatografik ayırma proseslerinde (albumin adsorpsiyonu) kullanılabilirliği araştırılmıştır.

DENEL BÖLÜMÜ

PHEMA PARTİKÜLLERİN TEMİZLENMESİ

Yapılan çalışmada iki alternatif yıkama tekniği üzerinde durulmuştur. İlk tekniğin polimerik partiküllerin bir ultrasonik yıkama banyosunda 2 saat süreyle yıkanması esasına dayanmaktadır. İkinci yöntem ise daha etkin bir temizleme tekniği olup, aşağıdaki yöntem izlenmiştir.

Bu yöntemde Şekil 1'de görülen yıkama sistemi kullanılmıştır. Sistem bir aktif karbon kolonu (0.9 cm x 3 cm; 4 gram aktif karbon) içermektedir. 2000 ml hacminde fosfat tamponu (pH 7.4) içeren cam reaktöre 10 gram polimer eklenmiş ve bu çözelti bir pompa yardımı ile kapalı sistemde aktif karbon kolonundan 10 ml/dak akış hızında geçirilmiştir. Kolon çıkışından belirli zaman aralıklarında örnekler alınarak optik yoğunluk tayin edilmiş ve 15 saat'lik işlem süresi sonunda bu değer in sıfıra düştüğü belirlenmiştir. Daha sonra bol miktarda damıtık su ve etanol ile yıkanan polimerik partiküller vakum etüvde (Nüve, Türkiye) 100 mmHg ve 50°C'da 48 saat kurutulmuştur.



Şekil 1. Polimerik Partikülleri Yıkama Sistemi.

PHEMA HİDROJELLERE CIBACRON BLUE F3GA BAĞLANMASI

PHEMA hidrojeller, HEMA monomerinin etilenglikoldimetakrilat monomeri ile çapraz bağlanma/ kopolimerizasyon reaksiyonu sonucu hazırlanmıştır. PHEMA hidrojeller (1 gram) 90 ml su içeren sızdırmaz bir cam balon içine konularak denge şişme değerine ulaşması için 2 saat bekletilmiştir. Cibacron Blue F3GA (500 mg, Polyscience Inc., ABD) 10 ml suda çözülmüş ve 5 gram PHEMA içeren sızdırmaz cam balona aktarılmıştır. Bu ortama 4 gram NaOH eklenmiş ve cam balon 80°C'daki su banyosuna daldırılmıştır. Cibacron Blue F3GA'nın polimerik yapıya bağlanma işlemi 4 saat devam ettirilmiştir. Bu süre sonunda boyanmış PHEMA partiküller filtre edilerek ortamdaki alınmış ve polimerik yapıya bağlanmamış boyaların uzaklaştırılması için bol miktarda su ve metanol ile yıkanmıştır.

CNBr AKTİVE PHEMA HİDROJELLERE CIBACRON BLUE F3GA İMMOBİLİZASYONU

Cibacron Blue F3GA'nın polimerik yapıya kovalent bağlanması için PHEMA hidrojeller CNBr ile aktive edilmiştir. Aktivasyon koşulları kısaca şöyledir: PHEMA hidrojeller 500 ml su ve 1000 ml 0.1 M NaHCO₃ ile yıkanır ve denge şişme değerine ulaşması için 2 saat suda bekletilir. Aktivasyon reaktörüne CNBr çözeltisi (200 mg CNBr/g Polimer) eklenir ve 2 M NaOH ile pH 11.5'e ayarlanır ve 10 dakika bu değerde sabit tutulur. Polimerik partiküller ortama eklenerek aktivasyon başlatılır. Karıştırma

işlemi ise manyetik olarak gerçekleştirilir. Aktivasyon +4°C'da 60 dakika sürdürülür ve soğutma reaktör ceketinden sabit sıcaklıkta su dolaştırılarak sağlanır. Aktivasyon sonunda tepkimeye girmeyen CNBr ve tepkime yan ürünlerinin uzaklaştırılması için polimerik partiküller önce FeCl₃ ve etanolamin daha sonra soğuk su ve 0.1 M NaHCO₃ ile yıkanır.

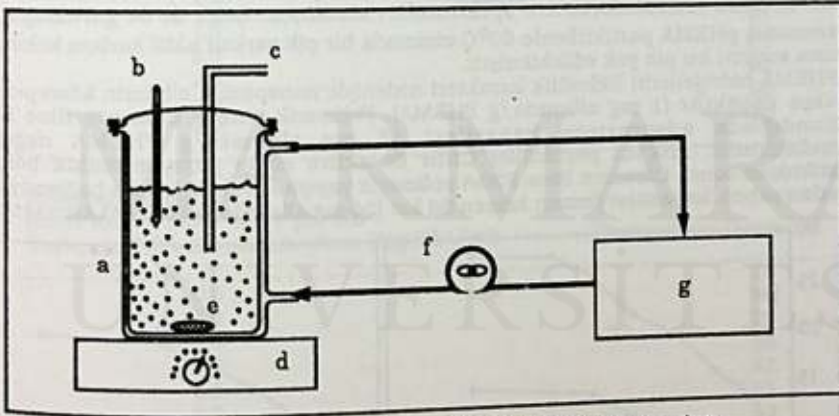
CNBr aktive PHEMA hidrojelere (5 g) aktivasyondan hemen sonra Cibacron Blue F3GA (500 mg boya, 4 gram NaOH içeren 100 ml suda çözülür) çözeltisini içeren sızdırmaz reaktöre eklenerek spesifik boya bağlanması başlatılır. Bağlanma işlemi 4 saat sürdürülür. Bu süre sonunda boyanmış PHEMA partiküller filtre edilir ve polimerik yapıya spesifik bağlanmamış boya ların uzaklaştırılması için bol miktarda su ve metanol ile yıkanır.

ALBÜMİN ADSORPSİYON DESORPSİYON ÇALIŞMALARI

Adsorpsiyon deneylerinde bovine serum albumin (BSA, lıyofiltze, Sigma, ABD) model protein olarak seçilmiş ve 250 µm polimerik partiküller ile çalışılmıştır. Adsorpsiyon deneyleri albuminin izoelektrik noktası olan pH: 5.0 değerinde, kesikli sistemde (25 ml) gerçekleştirilmiştir (Şekil 2). Ortam pH'ını sabit tutmak için asetat (CH₃COOH-CH₃COONa) tamponu kullanılmıştır. Ortamın iyonik kuvveti NaCl ile iki değişik düzeyde ayarlanmıştır (0.01, 0.1). Başlangıç albumin konsantrasyonu 0.5-4.0 mg/ml arasında değiştirilmiştir. Adsorpsiyon işlemi 25°C'da 100 rpm karıştırma hızında 2 saat devam ettirilmiştir. 2 saat sonunda adsorplanan albumin miktarı UV-spektrofotometre ile izlenerek (λ=280 nm) bulunmuştur.

Çalışmanın ikinci bölümünde, adsorpsiyon kapasitesine ortam pH'ının etkisi incelenmiştir. Adsorpsiyon ortamının pH'ı 4-8 arasında değişik tampon sistemleri (CH₃COOH-CH₃COONa, 4-6; K₂HPO₄-KH₂PO₄, 7; NH₄OH- NH₄Cl, 8) ile iyonik kuvvet ise NaCl ile ayarlanmıştır.

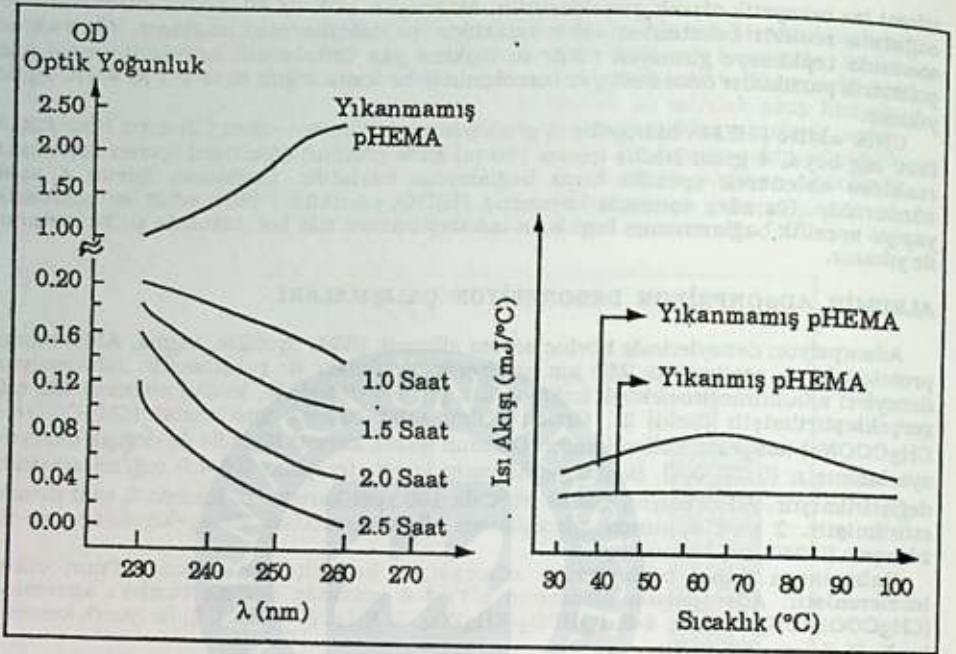
Albumin desorpsiyonu, 2 M NaCl içeren pH 8 tamponunda yapılmıştır. Albumin adsorplanmış polimerik partiküller adsorpsiyon işlemi sonucunda desorpsiyon ortamına aktarılmış ve 1 saat'lik desorpsiyon zamanı sonrasında ortamdaki protein konsantrasyonu spektrofotometrik yöntemle ölçülmüştür.



Şekil 2. Immobilizasyon Sistemi; a: silindirik kap; b: termometre; c: örnek alma yolu; d: manyetik karıştırıcı; e: manyetik balık; f: su dolaşım pompası; g: sabit sıcaklık su banyosu.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

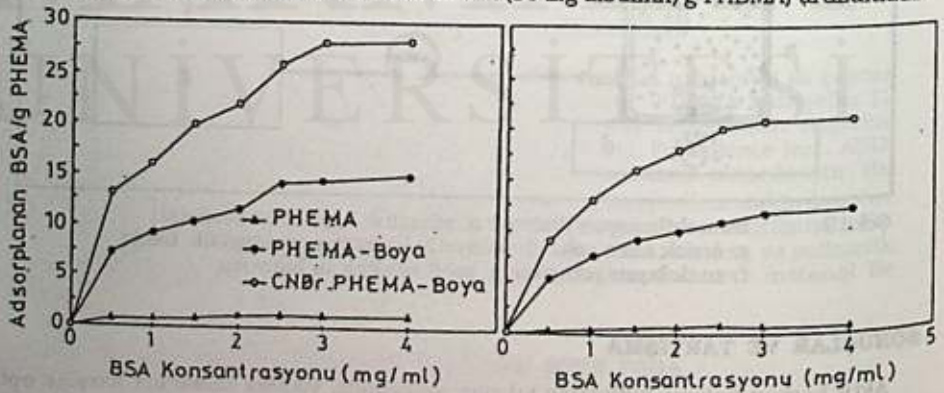
Aktif karbon kolonu kullanılan yıkama sisteminde, yıkama zamanına karşılık optik yoğunluk değerleri belirlenmiş ve Şekil 3'de grafiğe alınmıştır. Şekil 3'den görüldüğü gibi yıkama zamanının artması ile optik yoğunluk değeri önemli oranda azalmaktadır. Yaklaşık 8 saatlik bir yıkama süresi sonunda optik yoğunluk değerinin sıfıra düşürüldüğü gözlenmiştir.



Şekil 3. (a) pHEMA partiküllerin Yıkanabilirlik Özellikleri;
(b) Yıkanmış ve Yıkanmamış pHEMA Partiküllerin Kısmi Taramalı Mikrokalorimetre Spektrumları.

Yıkama verimini test etmek amacıyla yıkanmış ve yıkanmamış pHEMA partiküllerin kısmi taramalı mikrokalorimetre spektrumları alınmıştır. Şekil 3b'de görüldüğü gibi yıkanmamış pHEMA partiküllerde 60°C civarında bir pik varken aktif karbon kolonu ile yıkama sonucu bu pik yok edilebilmiştir.

PHEMA hidrojellerin hidrofilik karakteri nedeniyle nonspesifik albumin adsorpsiyonu oldukça düşüktür (1 mg albumin/g PHEMA). Polimerik yüzeye Cibacron Blue F3GA bağlandığında adsorpsiyon kapasitesi 15 mg albumin/g PHEMA değerine yükselmektedir. PHEMA partiküller CNBr ile aktive edilip yüzeyde reaktif bölgeler yaratıldıktan sonra Cibacron Blue F3GA polimerik yapıya kovalent bağ ile bağlandığında ise adsorpsiyon kapasitesi hemen hemen iki kat (30 mg albumin/g PHEMA) artmaktadır.



Şekil 4. PHEMA, PHEMA-Cibacron Blue F3GA ve CNBr aktive PHEMA-Cibacron Blue F3GA hidrojellerin albumin adsorpsiyon izotermi, Tuz: NaCl; (a) İyonik kuvvet: 0.01; (b) İyonik kuvvet: 0.1.

Adsorpsiyon kapasitesine pH'nin etkisi incelendiğinde ise, albuminin net yükünün olmadığı izoelektrik pH'da (pH: 5.0) her üç durumda da (PHEMA; PHEMA-Cibacron Blue F3GA; CNBr aktive PHEMA-Cibacron Blue F3GA) maksimum adsorpsiyon gözlenmiştir. En yüksek albumin bağlanmasına ise CNBr aktive PHEMA-Cibacron Blue F3GA partiküllerde ulaşılmıştır. Desorpsiyon değerleri incelendiğinde ise PHEMA hidrojellere bağlanan albuminin ortalama % 85'li polimerik yapıdan tersinir olarak geri kazanılabilmektedir. Ulaşılan sonuçlar PHEMA partiküllerin boya afinite kromatografisinde protein saflaştırma amacı için başarı ile kullanılabilceği umudunu vermektedir.

Cibacron Blue F3GA takılı PHEMA partiküllere adsorplanan albuminin polimerik yapıdan desorpsiyon deneyleri 2 M NaCl (pH 8.0) ortamında yapılmıştır. Desorpsiyon oranı aşağıda tanımlandığı gibidir.

$$\text{Desorpsiyon \%} = \frac{\text{Cibacron Blue F3GA-PHEMAYA adsorplanan BSA miktar}}{\text{Desorpsiyon ortamına salınan BSA miktar}} \times 100$$

Cibacron Blue F3GA takılı PHEMA partiküllerden albumin desorpsiyon değerleri Çizelge 1'de verilmiştir. Çizelgeden de görüldüğü gibi desorpsiyon değerleri oldukça yüksek olup tatmin edici düzeydedir.

Çizelge 1. Cibacron Blue F3GA takılı PHEMA partiküllerden adsorplanan albuminin desorpsiyon değerleri.

Adsorpsiyon Ortamı Iyonik Kuvvet : 0.01, NaCl; pH: 5.0 Başlangıç BSA Konsantrasyonu (mg BSA/ml)	Desorpsiyon Oranı (%)
0.5	73
1.0	78
1.5	81
2.0	87
2.5	92
3.0	88
4.0	76

Adsorpsiyon Ortamı Iyonik Kuvvet : 0.1, NaCl; pH: 5.0 Başlangıç BSA Konsantrasyonu (mg BSA/ml)	Desorpsiyon Oranı (%)
0.5	76
1.0	73
1.5	79
2.0	85
2.5	87
3.0	91
4.0	92

KAYNAKLAR

1. D.M. Schulte, *J. Chromatography*, (1990) 510, 115-121.
2. M. Hearn, *Advances in Chromatography*, (1982) 20,1.
3. C.R. Lowe, *Top. Enzym. Ferment. Biotechnol.*, (1984) 8, 78-161.



MARMARA ÜNİVERSİTESİ

250 HASTADAN AMELİYATLA ALINAN BÖBREK TAŞLARININ KALİTATİF ANALİZİ ve SONUÇLARIN İSTATİSTİK DEĞERLENDİRMESİ

Münire HACİBEKİROĞLU ve Nevzat BABAN

İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Biokimya Anabilim Dalı, Cerrahpaşa, İstanbul, Türkiye

THE QUALITATIVE ANALYSIS OF RENAL STONES SURGICALLY REMOVED FROM 250 PATIENTS AND STATISTICALLY EVALUATION OF THE RESULTS

SUMMARY

In this study, the composition of 250 renal stones were chemically analyzed, and the results were statistically evaluated.

As a results it was found out that 86% of the stones contained calcium. This ratio was the highest among the other cations. The most frequently encountered anion was oxalate with 80% ratio. Amonium with 22.4% and Magnesium with 8.4% were other cations except calcium. Phosphate with 72.4% and vicle with 16.8% took the second and third place respectively. Carbonate had the lowest ratio with 0.8%. The ratio of pure uric acid stones were 2.8% and cystine stones were 2%.

Compared with the other studies, all the ions, except carbonate, showed similarity.

ÖZET

Bu çalışmada 250 adet böbrek taşının kimyasal analiz yöntemi ile bileşimi tayin edildi ve sonuçlar istatistik olarak değerlendirildi.

Elde edilen bulgulara göre taşların % 86'sında kalsiyum bulunduğu ve bu oranın aranan katyonlar içinde en yüksek olduğu saptanmıştır. Anyon olarak oksalat % 80 ile birinci sırayı almaktadır. Kalsiyum dışındaki diğer katyonlar: amonyum % 22.4, magnezyum % 8.4 oranındadır. Anyonlardan fosfat % 72.4, ürat % 16.8 oranları ile 2.nci ve 3.üncü sıradadır. Karbonat % 0.8 ile en az rastlanan anyondur. Saf ürik asit tozlarının oranı % 2.8, sistin taşının ise % 2'dir.

Bu bulgular literatür bulguları ile karşılaştırıldığında karbonat ve magnezyum ionlarının dışındaki ionlarda uyum gözlenmektedir.

GİRİŞ

Böbrek taşı şikayeti olan her hastada olumlu bir tedavi planı yapabilmek için taşın bir bütün olarak incelenmesi şarttır. Bu amaçla rutin olarak yapılması gereken 2

analiz vardır:

- 1- Herhangi bir maddenin aşırı atılımını saptayabilmek için idrarın incelenmesi,
- 2- Yapısının belirlenebilmesi için taşın incelenmesi.

Üriner sistem taşları ile idrar kristallerinin çok yakın ilgisi bilinen bir gerçektir. İdrarla çıkartılan birçok madde uygun ortam bulunca kristalleşmekte ve idrarda saptanmaktadır. Özellikle üriner sistem taşı olan hastalarda bu kristaller önem kazanır(6,7,9).

Üriner taşlarda sık olarak rastlanan kristalloid bileşikler, kalsiyum-fosfat, kalsiyum-oksalat, magnezyum-amonyum-fosfat, ürik asittir. Seyrek rastlananlar ise kalsiyum-karbonat, ksantin, ksantin taşlarıdır. Sülfonamid taşına günümüzde pek rastlanmaz. Taşların yapı farklarından yararlanılarak ayırım yapılabilir. Ayırmada spektrografi, x-ışını kristallografisi, x-ışını mikrodifraksyonu, mikro-radyografi, kağıt kromatografisi gibi yöntemler kullanılabilir(2,11).

Üriner sistem taş hastalığı çok çeşitli faktörlerin etkisi altında oluşmaktadır. Taşların oluşmasından coğrafi ve sosyal şartlar gibi epidemiyolojik, böbrek anomalisi gibi anatomik, ürodinamik gibi fonksiyonel ve idrar bileşimini ilgilendiren fizik ve kimyasal olaylar birlikte rol oynamaktadır. Taş oluşmasına neden olan en önemli etkenlerden birisi süphesiz kristalizasyon olayıdır.

İdrarda kristal yapıcı tuzların miktarında meydana gelen artışlar kristalizasyon olayını arttırmaktadır. Buna karşılık yine idrarda bulunan bazı iyonlarda kristalizasyon olayını inhibe etmekte ve taş oluşumunu engellemektedirler(10). Bu maddelerin etkisi kristal yapıcı maddelerin çözünürlüğünü fazlalaştırmak şeklinde olmaktadır. Magnezyum, sodyum, potasyum bu şekilde inhibitör maddelerdir(5,13).

Metabolizmanın artık ürünlerini vücuttan dışarıya atan böbrekler normal vücut homeostazının sürdürülmesinde en önemli organlardır. Renal tübüliler glükoz gibi metabolik yönden önemli bazı maddeleri glomerüler filtrattan geri emerken diğer bazı maddeleri glomerüler filtrat içine salgılar ve bunlara ek olarak hücre duvarı üzerinden iyon alış-verişi yapar. Böbrekteki bu hücrelerin normal işlev görmeleri aşağıda sıralanan şu etkenlere bağlıdır.

- 1- Kendisi ile alış-veriş yapılabilecek glomerüler filtrat hacminin yeterli olması (dolayısı ile glomerüler işlevin normal olması).
- 2- Bir bütün olarak tüm vücut hücrelerini temsil eden tübül hücrelerindeki iyonların konsantrasyonları (örn. potasyum ve hidrojen iyonları).
- 3- Antidiüretik hormon (ADH) ve aldosteron gibi hormonların varlığı.
- 4- Bu hormonları kontrol eden feed-back mekanizmalarının bütünlüklerini koruyabilmeleri.
- 5- İşlevsel olarak sağlam böbrek hücreleri.

Bütün bu etkenlerin normal olması halinde böbrekler her yapı taşını vücutun tam istediği miktarlarda tutar ve saklar.

Üriner sistemde taş oluşması sık görülen, ağrıya neden olan ve belki de renal yetersizliğe yol açan bir olaydır. Kuzey Amerika'da ve Avrupa'da genellikle yetişkinlerde görülür. Çocuklar taş olgularının % 1'den daha az bir kısmını oluşturur. Bunun tersine Güneydoğu Asya'da mesane taşları çocuklarda daha sık görülür(10).

Çeşitli dermografik çalışmaların sonuçlarına göre bir ülke endüstrileştikçe mesane taşları daha az görülür, fakat yukarı üriner bölgede bahsedilen taşlara daha çok rastlanır ve böbrek taşı olayı artar.

İnsanda üriner bölge taşlarının genel bileşimleri mono veya dihidratı şeklinde kalsiyum-oksalat, kalsiyum-fosfat (hidroksi apatit olarak), ürik asit, magnezyum-amonyum-fosfat veya sistin'den meydana gelir. Taşlar saf halde olabildikleri gibi aynı anda birden fazla iyonu da içerebilirler ve genelde taşların 10'undan 9'unun kompozisyonu saf değildir. Kristallere ilaveten taşın brüt ağırlığının % 3 kadarı protein matriksidir. Bu genellikle ortak merkezli ince yaprak düzeninde kristaller arasına yerleşmiştir.

Taş oluşum teorileri:

- a) Çökme ve Kristalleşme Teorisi

- b) Çekirdek Teorisi
c) İnhibitör Eksikliği Teorisi
d) Lenfatik Blokaj Teorisi'dir.

Tablo I. Taşların Kompozisyonları ile İdrar pH'sı Arasındaki İlişki

pH	Taşın Cinsi
<5.5	Ürik asit, Sistin, Ksantin
5.5-6.0	Kalsiyum oksalat, Apatit
>7.0	Magnezyum-amonyum-fosfat, Kalsiyum fosfat

Bu konuda daha evvel yapılan araştırmalardan birkaçına ait sonuçlar aşağıdaki gibidir:

J.Stanton King(10) böbrek taşlarının üçte ikisinin kalsiyum oksalat içerdiğini, çekirdeğin ise % 63'ünün oksalat ve apatit olduğunu bildirmiştir.

Baban N, Akçay T(3,4) 52 üriner sistem taşı ile yaptıkları çalışmalarında kalsiyum ionunu % 92.30, oksalatı % 86.53, fosfatı % 86.53, ürati % 32.69, amonyumu % 46.5, magnezyumu % 29.23 oranında bulmuşlardır.

Yıldırım C, Güney Z, Bodur H(14)'nin sonuçları ise (111 olgu) kalsiyum % 94.2, oksalat % 88, fosfat % 80, urat % 42.8, magnezyum % 49.9, amonyum % 74.2'dir.

E.J.Westbury'nin(12) 1000 olgu üzerinden verdiği değerler: Kalsiyum % 97.4, oksalat % 91.8, fosfor % 78.6, magnezyum % 52.1, karbonat % 24.5, amonyum % 27.1'dir.

Ankara Üniversitesi Üroloji Kliniğinden bir grup araştırmacı taşların % 95.4'ünde kalsiyum bulunduğunu bildirmişlerdir(1).

Bu çalışmada Üroloji Kliniğimize müracaat eden taşlı hastalardan ameliyatla alınan böbrek taşlarının yapısını kimyasal analizle belirleyerek en çok rastlanan taş cinsini saptamak ve klinisyenin hastayı tedavisinde faydalı olmak için taşın cinsini belirlemek amaçlanmıştır.

DENEL BÖLÜM

Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis (1980) cilt 1, s.497'den alınan kimyasal analiz yöntemi uygulandı(8).

Laboratuvara gelen taşın analize hazırlanması:

1- Taşın görünüşü incelenir ve not edilir. Taşın görünüşü önemli ipuçları verir; fakat kimyasal tayin çok daha kesin olduğu için görünüşe bakmak yeterli değildir. Kalsiyum-oksalat taşları; görünüş olarak düzgün oval bir tohum şeklinde, gayri düzgün bir dut şeklide, yansıtıcı, kristal veya granül şeklinde olabilir. Magnezyum-amonyum-fosfat taşları, sık sık yoğun granül şeklinde, krem renginde bir şeker kümesi görünümündedirler. Ürik asit taşları ise genellikle en saf taşlardır ve çoğunlukla yoğun ve düzgün yüzeyli kahverenkli granüllerdir. Karbonat taşları ise tebeşirimsidir.

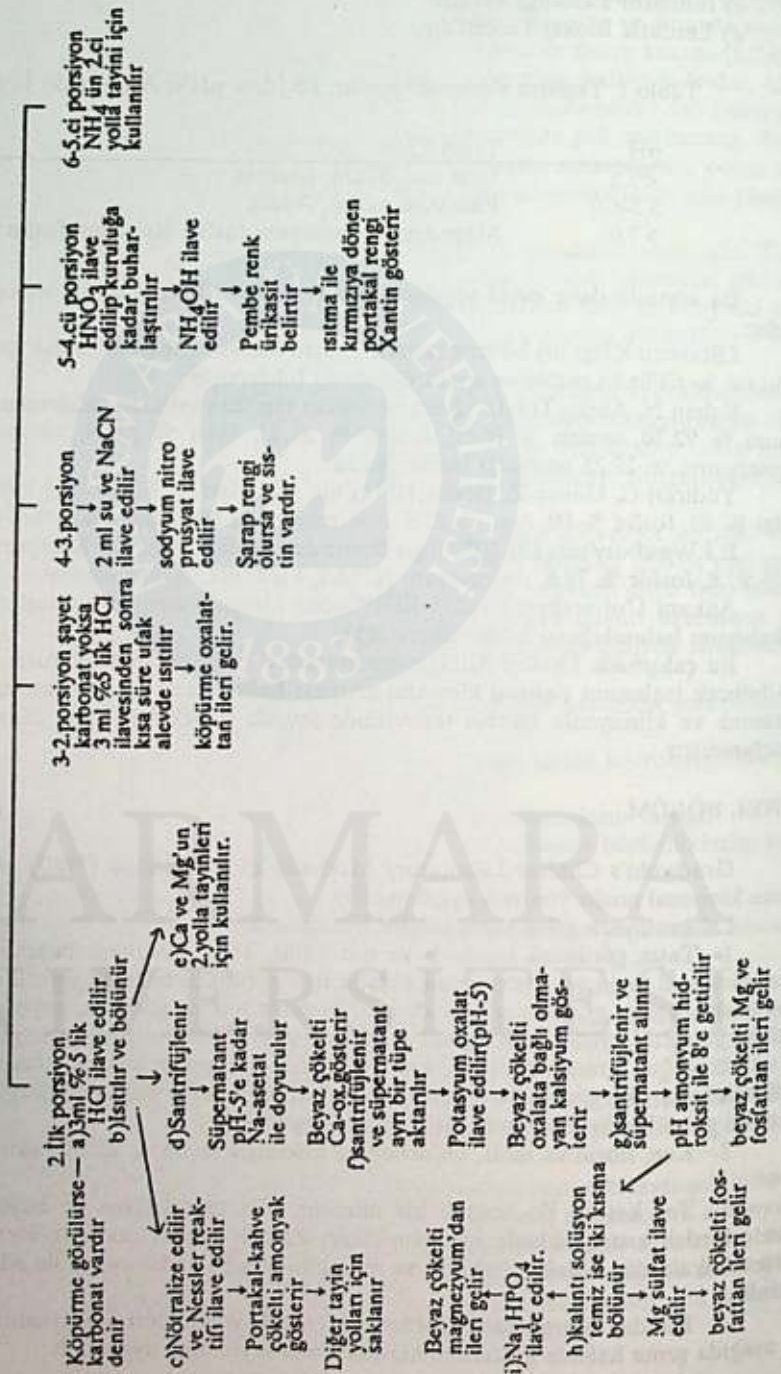
2- Kan, fibrin ve idrar, taşlardan az miktarda su ile ve hafifçe sürterek uzaklaştırılır.

3- Taş kesilir. Bu önemli bir adımdır. Taş teşekkülüne ve büyümesine neden olan çekirdek kısmı dikkatle incelenmelidir. Zaman zaman çekirdek etrafında teşekkül eden tabakalardan oldukça farklıdır ve mümkün olduğu kadar ayrı izole edilip analiz edilmelidir.

4- Bundan sonra numunelerde çeşitli analiz yöntemleri uygulanabilir. Bu çalışmada aşağıda şema halinde gösterilen kimyasal analiz yöntemi uygulandı.

Şema: 1

1. Taş toz haline getirilir
Porsiyonlara bölünür



SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Çalışmamızda elde edilen sonuçlar Tablo 2 ve 3'de gösterildiği gibi idi.

Tablo 2

İon Cinsi	Olgu Sayısı	%
Kalsiyum	217	86.8
Amonyum	56	22.4
Magnezyum	21	8.4
Oxalat	202	80.8
Karbonat	2	0.8
Fosfat	181	72.4
Ürat	42	16.8
Sistin	5	2
Ürik asit	7	2.8

Tablo 3

Taş Kompozisyonu	Olgu Sayısı	%
Saf ürik asit	7	2.8
Sistin	5	2
Kalsiyum-oxalat	44	17.6
Kalsiyum-fosfat	12	4.8
Kalsiyum-oxalat-fosfat	113	45.2
Kalsiyum-amonyum-oxalat-fosfat	14	5.6
Magnezyum-amonyum-fosfat	11	4.4
Kalsiyum-oxalat-fosfat-ürat	6	2.4
Kalsiyum-oxalat-ürat	5	2
Amonyum-fosfat-ürat	3	1.2
Kalsiyum-fosfat-ürat	1	0.4
Kalsiyum-amonyum-fosfat-ürat	1	0.4
Amonyum-ürat	5	2
Magnezyum-ürat	1	0.4
Kalsiyum-oxalat-magnezyum-ürat	1	0.4
Kalsiyum-amonyum-fosfat-karbonat	1	0.4
Kalsiyum-amonyum-magnezyum-fosfat-karbonat	7	2.8
Kalsiyum-amonyum-magnezyum-oxalat-fosfat	1	0.4
Kalsiyum-amonyum-oxalat-fosfat-ürat-magnezyum	11	4.4
Kalsiyum-amonyum-oxalat-fosfat-ürat	250	100.0

Elde edilen sonuçlar diğer araştırmacılarınkiler ile karşılaştırıldığında kalsiyum, oxalat, fosfat için çok yakın değerler bulunduğu görüldü. Amonyum değeri E.J.Westbury'nin(12) sonucuna uyarken Yıldırım C, Güneç Z, Bodur H'nin(14) çalışmalarında bulduklarından çok farklılık gösterdi. Magnezyum için elde edilen sonuç ise diğer araştırmacıların bulgularının hepsinden düşüktü. Karbonat değeri ise E.J.Westbury'nin(12) değerinden

çok farklı idi.

Saf ürik asit taşı oranı Ankara Üniversitesinde yapılan çalışmanın sonucunu(1) doğrularken diğer araştırmacıların sonuçlarından farklıdır. Ürat ionu değeri ise İ.Ü. Tıp Fakültesinde bulunan değer ile paralellik gösterirken Baban N, Akçay T(3,4) ve Yıldırım C, Güncy Z, Bodur H'nin(14) değerlerinin yarısı kadardır.

Sistin değerinin de genelde literatür değerleri ile uygunluk gösterdiği görülmüştür.

Bütün bunlardan çıkarılabilecek sonuç taşlarda en çok katyon olarak kalsiyuma daha sonra amonyum ve magnezyuma, anyon olarak ise sıra ile oksalat, fosfat, ürate rastlanmaktadır. Taşlar genelde birden fazla ion içermektedirler. Saf taşlara karışık taşlardan daha az rastlanmaktadır. Sistin taşı da genellikle az görülen taş cinsidir. Bu bulgularda % 2 oranında rastlandı. Ksantin taşına hiç rastlanılmadı, karbonat içeren taş % si ise 0.8 ile en az idi.

KAYNAKLAR

- 1- Ayder,R.A., Küpeli,S., Gerçel,R.: 300 üriner sistem taşı olguda kan ve idrarda kalsiyum, kanda inorganik fosfor ve ürik asit değerleri. Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, Cilt 33, 1980, s:235-240.
- 2- Aykaç,G., Uysal,M., Sivas,A., Öz,H.: Üriner sistem taşlarının bileşimlerinin infrared spektrofotometresi (IR) yöntemiyle tayini. İ.Ü.Tıp Fakültesi Mecmuası, Sayı 41, 1978, s:585.
- 3- Baban,N., Akçay,T.: Üriner sistem taşlarının bileşimleri ve analiz yöntemleri. İ.Ü.-Cerrahpaşa Tıp Bülteni, Sayı 2, Vol.9, 1976, s:15.
- 4- Baban,N., Akçay,T.: Üriner sistem taşlarının analizi için Winer-Mattice yönteminde yapılan bir değişiklik ve 52 olguda uygulanış sonuçları. İ.Ü.Cerrahpaşa Tıp Bülteni, Vol.10, Sayı 1, 1977, s:29.
- 5- Canbazoglu,N., Kazodo,M., Arcan,N.: Üriner sistem taş hastalığında bazı iyonların inhibitör etkisi. Haseki Tıp Bülteni, Cilt 22, Sayı: 4, 1984, s:273.
- 6- Erhan,Ö., Günel,Ö., Yurtseven,D., Saylam,H., Cüreklibatür,I.: Böbrek taşı olgularında idrar sitolojisi. Türk Üroloji Dergisi, 1979, s,11.
- 7- Günel,Ö., Erhan,Y., Topçuoğlu,N.: İdrar sitolojisinin önemi. Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi dergisi, Cilt 16, 1977, s:238-252.
- 8- Jonnenwirth,C.A, Jaret,L.: Gradwohl's Clinical Laboratory Methods and Diagnosis. 8.baskı, The C.V.Mosby Company, St.Louis, Toronto, London, 1980, s:497.
- 9- Kendi,S., Kedni,E.: İdrar kristallerinin yeni bir yöntemle incelenmesi ve üriner sistem taşı hastaların idrarının bu yöntemle araştırılması. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Dergisi, Cilt 11, 1978, s:449-458.
- 10- King,J.J.: Currents in renal stone research. Clinical Chemistry 17, 1971, 971.
- 11- Özyürek,Y.: Yapısında kalsiyum bulunan taşı hastalarda kalsiyumun diyetle alınışı ve idrarla atılışı arasındaki ilişkiler. Türk Üroloji Dergisi, 1979, :257-264.
- 12- Westbury,E.J.: Some observations on the quantitative analysis of over 1000 urinary calculi. British Journal of Urology, 46, 1974, 215-227.
- 13- Woodwark,H.G.: Dissolution of renal uric acid stones by oral alkalization and large fluid intake in a patient suffering from gout. American Journal of Medicine, 27, 1959, 167.
- 14- Yıldırım,C., Güncy,Z., Bodur,H.: Urolithiasislerdeki statistik özellikler. XII.Türk Cerrahi Kongresi (26-28 Ekim 1960).

REKOMBİNANT *E.coli* KÜLTÜRLERİ İLE ENZİM ÜRETİMİNİN KİNETİK ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

Dilek KAZAN , Amable HORTAÇSU ve Agnes ÇAMURDAN

*Bogaziçi Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü
Bebek, İstanbul, Türkiye*

A STUDY OF KINETIC PARAMETERS OF ENZYME PRODUCTIVITY OF RECOMBINANT *E.coli* CULTURE

SUMMARY

The recent developments in molecular biology open the way to the production of valuable proteins (in bio reactors using genetically engineered microorganisms. In literature, cultured characteristics of recombinant microorganisms and stability of plasmids have been investigated by many authors. However there are only few experimental and theoretical studies to determine kinetic parameters for the cloned gene productivity of recombinant microorganisms and kinetic models.

The objective of this study is experimental investigation of enzyme productivity at different growth rate. Enzyme productivity and total RNA are also determined.

ÖZET

Moleküler biyoloji alanında son yıllardaki gelişmeler ile çok değerli proteinlerin üretimi mümkün olmuştur. Yapılan bir çok çalışmada enzim üretimi için kullanılan rekombinant mikroorganizmaların yapısı, plazmid kararlılığı incelenmiş olmasına rağmen en yüksek enzim üretiminin hangi koşullarda elde edileceği ve kinetik parametrelerin belirlenmesi incelenmemiştir.

Bu çalışmada rekombinant mikroorganizma kullanılarak enzim üretimi deneysel olarak incelenmiş ve değişik büyüme hızlarında enzim verimliliği ve toplam RNA miktarı belirlenmiştir.

GİRİŞ

Moleküler biyoloji alanında son yıllardaki gelişmeler genetik yapısı incelenmiş mikroorganizmalar (genetically engineered microorganisms) kullanılarak çok değerli proteinlerin üretimini mümkün kılmıştır. Bu mikroorganizmalar "rekombinant DNA teknolojisi" ile üretilmektedir. Bununla birlikte bu değerli proteinlerin endüstriyel olarak daha büyük çapta üretimi optimizasyonu gerekli kılmaktadır. Enzim üretiminin verimliliği için ise mikroorganizmanın büyüme hızının ve bunun enzim üretimine etkisinin incelenmesi gerekmektedir. Genetik olarak ise optimizasyon rekombinant mikroorganizmanın kararlılığı ile ilgilidir.

Literatürde, rekombinant mikroorganizmanın özellikleri ve plazmid kararlılığı konusunda bir çok çalışma yapılmıştır. C. Parker (1) ve C.A. Sardonini (2) i şletme şartlarının büyüme hızına etkisini ve büyüme hızının plazmid kararlılığı ile ilişkisini incelemiştir. Siegel ve çalışma arkadaşları (3) iki kademeli sürekli bir sistemde enzim üretimini incelemiş ve bu konuda bir model geliştirmiştir. Bu çalışmaların yanında plazmid kararlılığı deneysel ve teorik olarak bir çok araştırmacı tarafından

incelenmiştir.(4)Bu çalışmalar göstermiştirki enzim üretiminin verimliliği konusunda yok denecek sayıda az çalışma yapılmıştır.Bu çalışmada ise enzim üretiminin verimliliği ve toplam RNA miktarı deneysel olarak incelenmiştir.

DENEL BÖLÜM

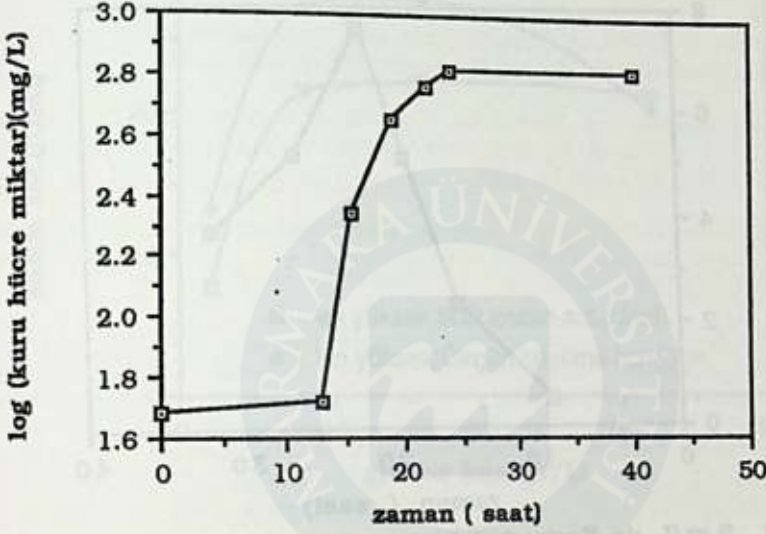
Deneylerde "pUC 13" plazmidli içeren *E.coli* JM109 straini,büyüme ortamı olarak minimal besi yeri "M9" kullanılarak b_{laktamaz} enzimi üretilmiştir.Mikroorganizmanın büyüme hızı glukoz konsantrasyonu değiştirilerek elde edilmiştir.Büyüme hızı absorbansın ve kuru hücre ağırlığının zamanla değişimi ölçülerek saptanmıştır.Glukoz miktarı " Nelson" metodu kullanılarak belirlenmiştir.b_{laktamaz} miktarı "Macro Iodimetrik" yöntem ile ,toplam RNA miktarı ise "Orcinol" metodu ile saptanmıştır.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

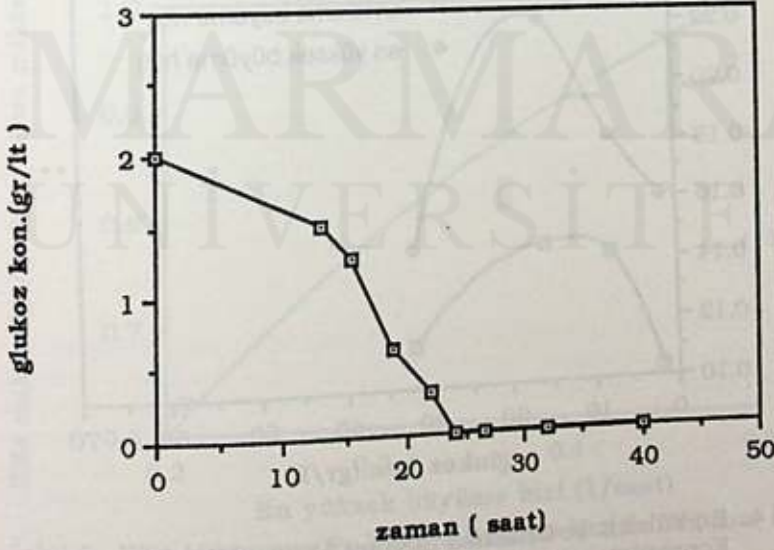
Mikroorganizmanın büyüme hızının enzim üretimine etkisini incelemek amacı ile yapılan deneylerin tümü sabit sıcaklık (37 oC) ve pH (7.2-7.4) değerinde gerçekleştirilmiştir.Büyüme hızının değişimi besi yerinin içerdiği glukoz konsantrasyonu değiştirilerek elde edilmiştir.Deneyler 5 değişik glukoz konsantrasyonunda (2,4,8,16 ve 32 gr/l) gerçekleştirilmiş ve enzim aktivitesi , hücrenin kuru ağırlığı ölçülmüştür."Şekil 1 -3" , 2 gr/L glukoz konsantrasyonunda elde edilen sonuçları göstermektedir. Diğer konsantrasyonlardada aynı değişim gözlenmiştir. Grafiklerden görülmektedir ki en-yüksek enzim miktarı logaritmik büyüme periyodunun sonunda elde edilmekte daha sonra hücre sayısındaki azalmaya bağımlı olarak azalmaktadır

Glukoz miktarının mikroorganizmanın büyüme hızına etkisi incelendiğinde ise " Şekil 4 " maksimum büyüme 16 gr/l glukoz konsantrasyonunda elde edilmiş,daha yüksek konsantrasyonlarda glukozun büyümeyi inhibe etmesinden dolayı azalmıştır.Buna bağımlı olarak spesifik ve bulk enzim aktiviteleri " şekil 5 "de de görüldüğü gibi '16 gr/l' glukoz konsantrasyonunda en yüksek değerine ulaşmıştır.

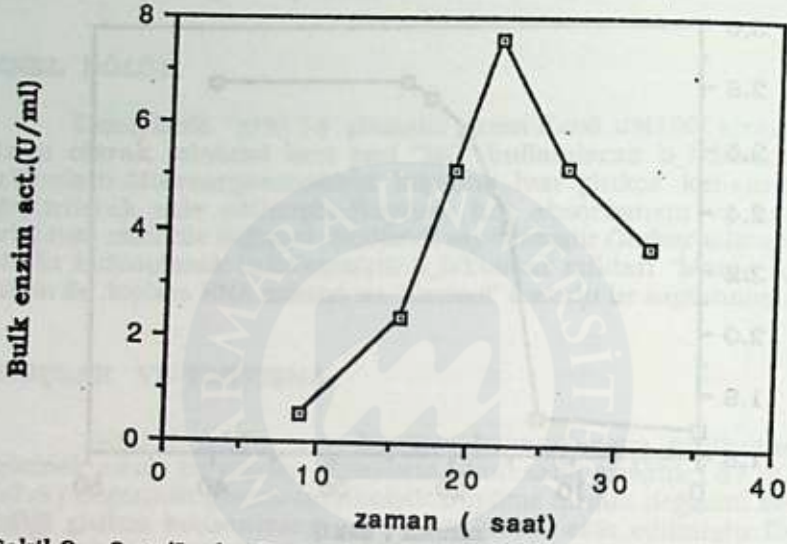
"Şekil 6" değişik büyüme hızlarında RNA konsantrasyonundaki değişimi göstermektedir.Şekilden görüldüğü gibi büyüme hızının artmasına bağımlı olarak RNA konsantrasyonu artmaktadır.Çünkü RNA hücrenin en aktif bölümüdür . Jens Nielsen ve çalışma arkadaşları (6) ,Hander.A. ve çalışma arkadaşlarının elde ettiği sonuçlar incelendiğinde aynı değişim gözlenmiştir.



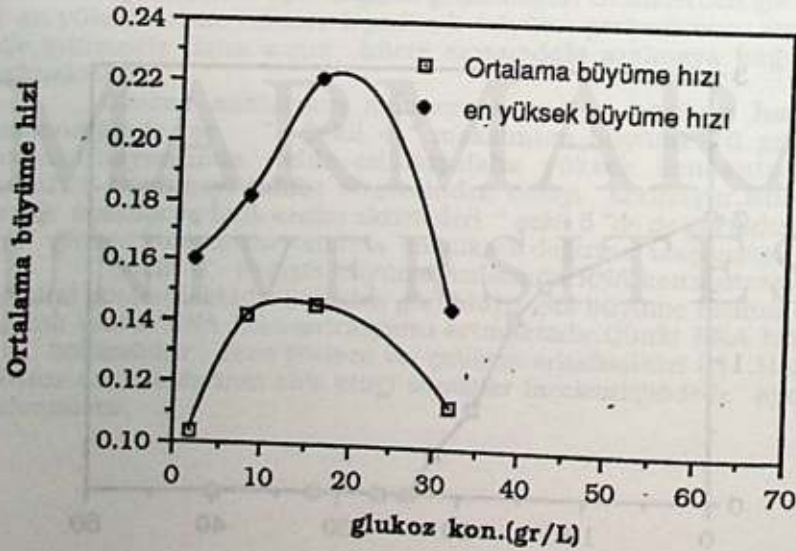
Şekil 1. 2 gr/L de Kuru Hücrenin Zamanla Değişimi



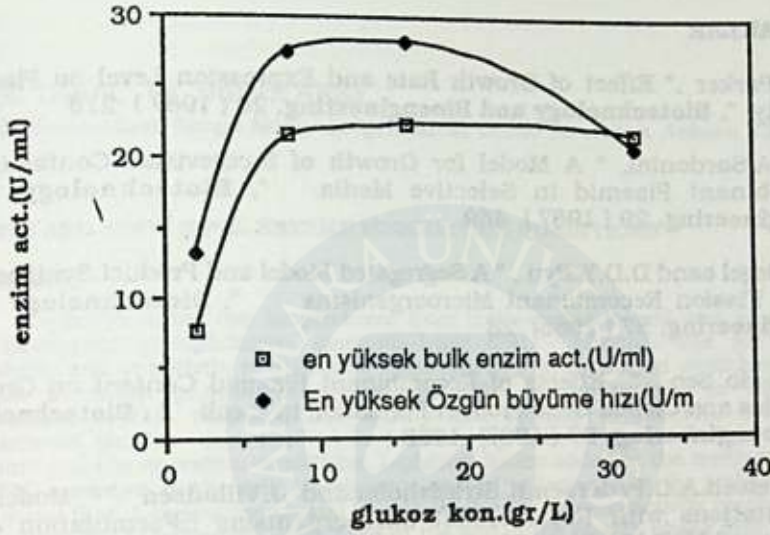
Şekil 2. 2 gr/L de Glukoz Konsantrasyonunun Zamanla Değişimi



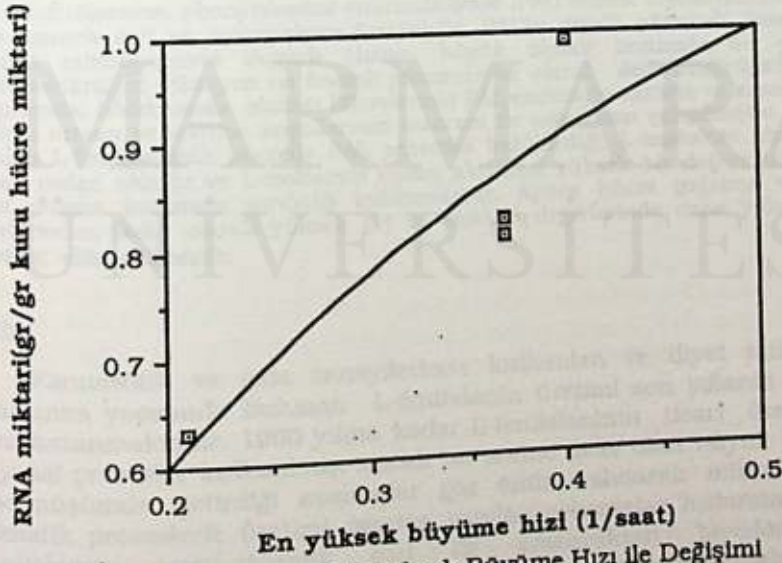
Şekil 3. 2 gr/L de Enzim Activitesinin Zamanla Değişimi



Şekil 4. En Yüksek ve Ortalama Büyüme Hızının Glukoz Konsantrasyonu ile Değişimi



Şekil 5. Enzim Activitesinin Glukoz Konsantrasyonu ile Değişimi



Şekil 6. RNA Miktarının En Yüksek Büyüme Hızı ile Değişimi

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada bizi destekleyen " Boğaziçi Üniversitesi Araştırma Fonu "na teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

- 1 . C.Parker , " Effect of Growth Rate and Expression Level on Plasmid Stability ", **Biotechnology and Bioengineering**. 29 (1987) 215
- 2 . C.A.Sardonini, " A Model for Growth of *S.cerevisiae* Containing a Recombinant Plasmid in Selective Media ", **Biotechnology and Bioengineering**. 29 (1987) 469
- 3 . R.Siegel and D.D.Y.Ryu , " A Segregated Model and Product Synthesis in Binary Fission Recombinant Microorganisms ", **Biotechnology and Bioengineering**. 27 (1985) 28
- 4 . Jin-Ho Seo , " Effects of Recombinant Plasmid Content on Growth Properties and Cloned Gene Product Formation in *E.coli* " , **Biotechnology and Bioengineering**. 27 (1985) 1668
- 5 .J.Nielsen.A.G.Pedersen.K.Strudsholm.and J.Villadsen . " Modelling Fermentations with Recombinant Microorganisms ::Formulation of a Structured Model " , **Biotechnology and Bioengineering**. 37 (1991) 802



AKTİF VE KARARLI PAL ENZİMİ ÜRETİM KOŞULLARININ ARAŞTIRILMASI

Serpil TAKAÇ ve Bülent AKAY

Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 06100 Tandoğan, Ankara, Türkiye

ACTIVE AND STABLE PAL ENZYME PRODUCTION CONDITIONS

SUMMARY

L-phenylalanine can be produced from trans-cinnamic acid and ammonia by the biocatalyst phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzyme. The low activity, instability and sensitivity to substrate inhibition of PAL should be considered as the utmost important parameters on the feasibility of the process in large scale production. In this research, the activity and stability of the PAL enzyme of *Rhodotorula glutinis* was studied to increase by means of the design of growth medium and the operation conditions. L-phenylalanine added in the medium induced the PAL synthesis in the cell; L-isoleucine caused to increase in the stability, and it was found that L-isoleucine should be added after the enzyme activity reached a high value. Transfer to anaerobic conditions at the end of the growth phase also stabilized PAL. Highest PAL activity was observed at higher temperature and pH values, which were sub-optimal for growth.

ÖZET

L-fenilalanin, phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzimi biyokatalizörülüğünde trans-sinamik asit ve amonyaktan üretilebilir. PAL'in düşük aktiviteli, kararsız ve substrat inhibisyonuna duyarlı olması, büyük ölçekli üretimde bu prosesin uygulanabilirliğini etkileyen en önemli parametreler olarak değerlendirilmelidir. Bu araştırmada, *Rhodotorula glutinis* hücrelerinin PAL enziminin aktivite ve kararlılığının artırılması için ortam ve işletme koşullarının tasarımı ile çalışılmıştır. Ortama L-fenilalanin ve L-izolösinin hücrede PAL sentezini indüklediği, L-izolösinin kararlılıkta artışa neden olduğu ve L-izolösinin enzim aktivitesi yüksek bir değere ulaştıktan sonra ortama katılması gerektiği bulunmuştur. Ayrıca hücre çoğalma optimum değerlerinden farklı olarak yüksek pH ve sıcaklık değerlerinde daha yüksek PAL aktivitesi elde edilmiştir.

GİRİŞ

Farmasötik ve gıda sanaylerinde kullanılan ve diyet tatlandırıcı aspartamin yapısında bulunan L-fenilalanin üretimi son yıllarda giderek önem kazanmaktadır. 1990 yılına kadar L-fenilalaninin ticari üretiminde kimyasal prosesler kullanılmış; ancak bu amino asite olan büyük talep ve biyodönüşümün getirdiği avantajlar göz önüne alınarak mikrobiyal ve enzimatik proseslerle üretimi üzerine yapılan çalışmalar hızlandırılmıştır. L-fenilalanin, trans-sinamik asit ile amonyaktan biyodönüşümle phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzimi katalizörülüğünde üretilebilir. PAL enziminin düşük aktiviteli ve kararsız olması, biyokatalizör olarak yer aldığı prosesin verimini etkileyen önemli ve kısıtlayıcı parametrelerden biridir. Bu

nedenle PAL'in aktivite ve kararlılığının artırılması için üretim koşullarının geliştirilmesi gerekmektedir.

Yamada vd. bu konuda yaptıkları ilk yayınlarında PAL üretiminde ortam bileşiminin etkisini incelemişler; karbon kaynağı olarak sorbitolün aktiviteye olumlu, glukozun ise olumsuz etkilerini saptamışlardır [1]. Ortamdaki L-fenilalanin, maya özütü ve pepton derişimlerinin PAL aktivitesi açısından önemli olduğunu ileri süren araştırmacılar, sıvı ortama ekledikleri L-izolösin ile enzim kararlılığını artırmışlardır. PAL aktivite ve kararlılığına çeşitli amino asitlerin etkisinin incelendiği bir başka yayında ise besi ortamına sadece L-fenilalanin ve L-izolösin eklenmesi önerilmiştir[2]. Çeşitli mikroorganizmalardan aktif ve kararlı PAL üretim koşullarının araştırıldığı diğer bir çalışmada ise optimum çoğalma ve PAL üretim sıcaklık ve pH değerleri verilmiş ve bazı şekerler ile NH_4^+ iyonlarının PAL sentezini engellediği D,L-izolösinin ise kararlılık artırdığı ileri sürülmüştür [3].

Bu çalışmanın amacı, trans-sinamik asitten L-fenilalanin üretiminde enzim deposu olarak kullanılacak *Rhodotorula glutinis* için aktif ve kararlı PAL enzim üretim koşullarının bulunmasıdır. Araştırma ile yüksek aktivitede ve kararlı PAL üreten *R. glutinis* 'in çoğalması için en uygun katı ve sıvı besi ortamı tasarlanmış; çevre koşullarının mikroorganizma çoğalmasına ve enzim sentezine etkileri belirlenmiş ve bulunan optimum koşullarda çoğaltılan hücreler ile trans-sinamik asitten L-fenilalanin biyodönüşümü gerçekleştirilmiştir.

DENEL BÖLÜM

Rhodotorula glutinis NRRL Y-1091 mikroorganizmasının ürettiği PAL enziminin aktivite ve kararlılığına besi ortamının etkisi değişik karbon, azot kaynakları ile tuzlar içeren katı ve sıvı besi ortamları ile denenmiş; bulunan en uygun ortamda sıcaklık, pH ve anaerobik koşulların etkisi incelenmiştir. Çoğaltılan mikroorganizma santrifüjlenerek sıvı ortamdan ayrılmış; fizyolojik su ile yıkandıktan sonra 25mM borat tamponunda (pH=9) yaklaşık 100 mg kuru hücre/ml olacak şekilde süspansiyon haline getirilerek +4 °C'da saklanmıştır. *R. glutinis*'in PAL aktivitesi Evans vd'nin geliştirdikleri yöntem ile saptanmıştır. Bu amaçla %1 trans-sinamik asit, %0.05 1-hekzadesilpridinyum klorür, 7.5 M NH_3 ve 25mM borat tamponu (pH=10) içeren substrat çözeltisi hazırlanan hücre süspansiyonu ile 303 K de 2 st süreyle tepkimeye sokulmuş ve aktivite μmol L-fenilalanin/mg kuru hücre/dk olarak tanımlanmıştır. Tepkimelerde oluşan L-fenilalanin analizi Waters Amino Asit Analiz Sisteminde Pico.Tag yöntemi ile yapılmış [4]; mikroorganizma derişimi ise 650 nm'de spektroskopik olarak ölçülmüştür.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Katı besi ortamı tasarımı

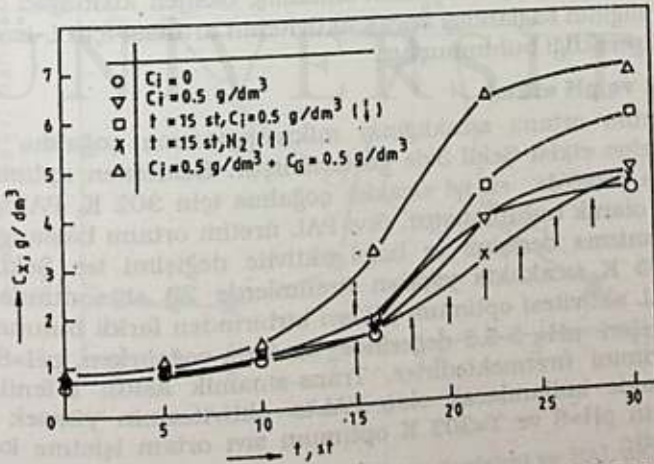
R. glutinis hücreleri farklı bileşimlerde maya özütü, pepton, sorbitol malt özütü, L-fenilalanin, NaCl, KCl, KH_2PO_4 ve agar içeren altı ayrı besi ortamında 303 K sıcaklıkta çoğaltılmış ve her bir ortamdaki hücrelerin PAL enzim aktiviteleri ölçülmüştür. Aktivite ve kararlılık açısından L-fenilalanin,

pepton ve maya özütünün ortamda bulunması gerektiği ve ortamın tuzlarla desteklenmesi gerektiği bulunmuş; %1 maya özütü, %1 pepton, % 0.5 KCl, %0,05 L-fenilalanin ve % 1.5 agar içeren katı besi ortamında en yüksek aktivitede ve kararlı PAL enzimi üretilmiştir. Bulunan en uygun ortamda bile üretilen PAL'ın aktivitesinde 16., 48. ve 96. saatlerde sırasıyla %2.4, %28.8 ve %99.2 azalma gözlenmesi enzimin kararsız bir yapıya sahip olduğu ve biyotekniklerde kullanılmadan önce uzun süre bekletilmemesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

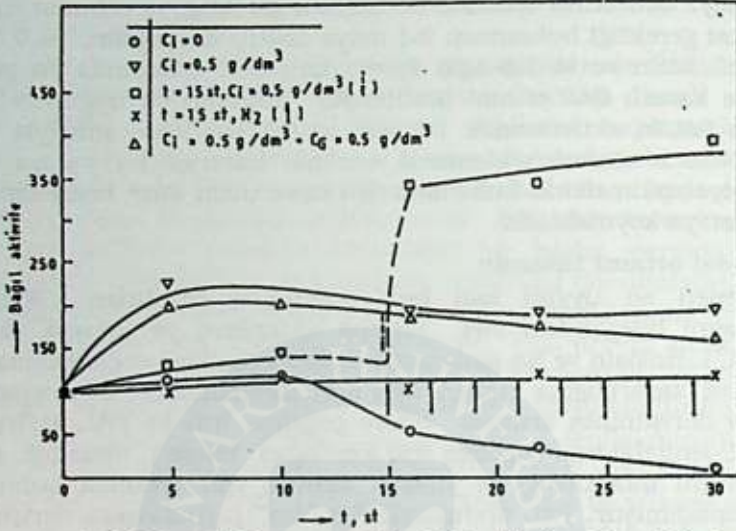
Sıvı besi ortamı tasarımı

Belirlenen en uygun katı besi ortamında çoğaltılan *R.glutinis* hücreleri aynı bileşimdeki sıvı ortama aktarılmış ve ortama eklenen L-fenilalanin, L-izolösin ve Na-glutamatın mikroorganizma çoğalmasına; PAL aktivitesine ve kararlılığına etkileri ayrı ayrı incelenmiştir. Sıvı ortamdaki L-fenilalanin derişiminin artması hücre çoğalma hızı ile PAL aktivitesini artırmış ve L-fenilalaninin çoğalma için kısıtlayıcı bileşen olmadığı, ancak PAL oluşumunu indüklediği ve yüksek aktivite için ortamda bulunması gerektiği saptanmıştır. PAL üretiminde 5 g/dm^3 L-fenilalanin derişimi en uygun değer olarak belirlenmiştir. *R.glutinis*' in çoğalmasına ve PAL aktivitesine diğer bir amino asit L-izolösinin etkisi incelendiğinde ise yüksek derişimlerinde mikroorganizma çoğalmasının çok, ancak enzim aktivitesinin düşük olduğu saptanmış; 0.5 g/dm^3 derişim değerinin optimum olduğu bulunmuştur.

Şekil 1 ve 2'de L-izolösin ve Na-glutamatın hücre çoğalması ile PAL aktivite ve kararlılığına etkileri gösterilmiştir. PAL üretim ortamında aerobik koşullardan anaerobik koşullara geçilmesinin mikroorganizma çoğalma ve aktiviteye etkisi de şekillerde görülmektedir. L-izolösin yalnız ve Na-glutamat ile birlikte hücre çoğalmasını artırmakta, üstel evrenin bitimine yakın 15.st'de ortama azot gönderilerek aerobik koşulların kısıtlanması ise çoğalmaya önemli etki yapmamaktadır. Başlangıçta L-izolösinin bulunmadığı, $C_1 = 0.5 \text{ g/dm}^3$ L-izolösin ve $C_G = 0.5 \text{ g/dm}^3$ Na-glutamatı bulunduğu, bu amino asitleri içermeyen ortama 15.st'de $C_1 = 0.5 \text{ g/dm}^3$



Şekil 1. Kalma süresi ile mikroorganizma derişiminin değişimi

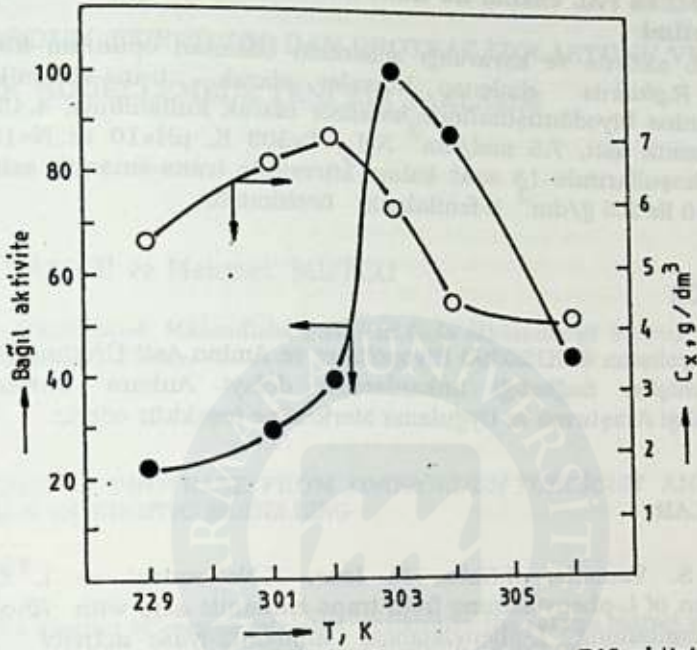


Şekil 2. Kalma süresi ile PAL aktivitesinin değişimi
T=303 K, pH=8, N=100 dk⁻¹

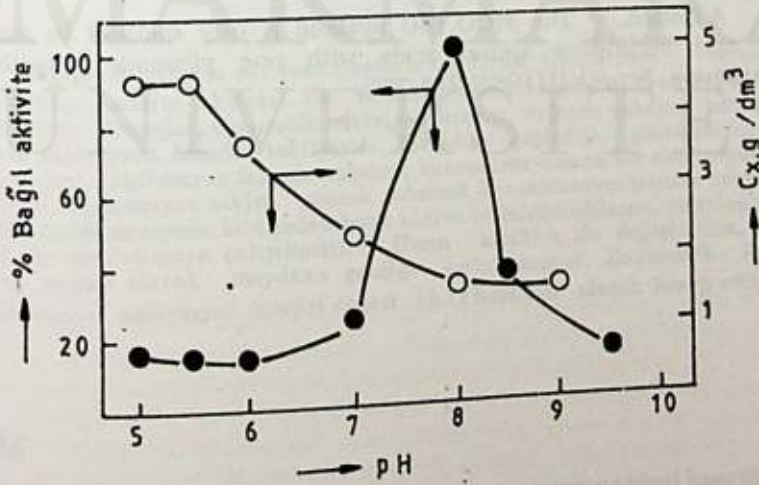
L-izolösin eklendiği ve ayrıca 15.st'den itibaren ortamdaki oksijenin uzaklaştırıldığı çöğalmalardaki PAL aktivitesinin değişimi ise çöğalma eğrilerinden farklılık göstermiştir. Şekil 2'de görüldüğü gibi sıvı besi ortamında L-izolösin yokken aktivite 10.st'den sonra azalmaya başlamakta; L-izolösin ile üretime başlandığında ise başlangıçtan itibaren artış göstererek 5 st'de en yüksek değerine ulaşmakta ve yaklaşık sabit kalarak kararlılığını korumaktadır. L-izolösin ortama başta değil aktivite belli bir değere ulaştıktan sonra katıldığında ise PAL aktivitesi ve kararlılığı artış göstermektedir. Bu sonuç, PAL'in bozunmasına sebep olarak onu kararsız yapan *R.glutinis*'in salgıladığı proteolitik enzimlerin üstel evrenin sonuna doğru üretildiğini ve L-izolösin ile aktivitelerini yitirdiklerini göstermektedir. L-izolösin ile birlikte Na-glutamatın ortamda bulunmasının aktivite ve kararlılığa önemli bir etkisi olmamış; oksijen kısıtlayıcı ortamda ise PAL kararlılığının sağlandığı ancak aktivitenin artması için L-izolösin ile desteklenmesi gerektiği bulunmuştur.

Sıcaklık ve pH etkisi

PAL üretim ortamı sıcaklığının mikroorganizma çöğalma ve PAL enzim aktivitesine etkisi Şekil 3'de gösterilmiştir. Belirlenen optimum sıvı besi ortamında pH=8'de en iyi sıcaklık çöğalma için 302 K, PAL aktivitesi için ise 303 K olarak bulunmuştur. Sıvı PAL üretim ortamı başlangıç pH'ı ile mikroorganizma derişimi ve bağıl aktivite değişimi ise Şekil 4'de verilmiştir. 303 K sıcaklıkta yapılan üretimlerde 20 st sonunda hücre çöğalma ve PAL aktivitesi optimum pH'ları birbirinden farklı bulunmuştur. *R.glutinis* hücreleri pH= 5-5.5 değerinde en fazla çöğalırken, pH=8'de en aktif PAL enzimini üretmektedirler. Trans-sinamik asitin L-fenilalanine biyodönüşümünde kullanılacak olan PAL'in aktivitesinin yüksek olması amaçlandığı için pH=8 ve T=303 K optimum sıvı ortam işletme koşulları olarak seçilmiştir.



Şekil 3. Ortam sıcaklığının hücre derişimi ve PAL aktivitesine etkisi.



Şekil 4. Ortam pH'nın hücre derişimi ve PAL aktivitesine etkisi.

Üretilen PAL enzimi ile trans sinamik asitten L-fenilalanin üretimi:

PAL aktivite ve kararlılığı açısından bulunan optimum koşullarda üretilen *R.glutinis* dinlenen hücreler olarak trans-sinamik asitli L-fenilalanine biyodönüşümünde katalizör olarak kullanılmış; 4.45 g/dm³ trans-sinamik asit, 7.5 mol/dm³ NH₃, T=303 K, pH=10 ve N=100 dk⁻¹ tepkime koşullarında 18 saat kalma süresinde trans-sinamik asitin %50 dönüşümü ile 2.5 g/dm³ L-fenilalanin üretilmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma 89K120390 Biyopolimer ve Amino Asit Üretimi projesi ile desteklenmiştir. Sağladığı imkanlardan dolayı Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. S. Yamada, K.Nabe, N. Izuo, K.Nakamichi ve I. Chibata, "Production of L-phenylalanine from trans-cinnamic acid with *Rhodotorula glutinis* containing L-phenylalanine ammonia-lyase activity " , **Appl. Environ Microbiol.**, 42(1981) 773-778
2. C.T. Evans, D.Conrad, K.Hanna, W. Peterson, C.Choma ve M.Misawa, "Novel stabilization of phenylalanine ammonia-lyase catalyst during bioconversion of trans-cinnamic acid to L-phenylalanine, ", **Appl. Microbiol. Biotechnol.**, 25(1987) 399-405.
3. C.T. Evans, K. Hanna, D.Conrad, W.Peterson ve M.Misawa, "Production of PAL isolation and evaluation of yeast strains suitable for commercial production of L-phenylalanine", **Appl. Microbiol.. Biotechnol.**, 25 (1987) 406-415.
4. A.Cohen., " The PICO.TAG system: A new method to analyze primary and secondary amino acids with one picomole sensitivity", **BioTechniques**, Sep/Oct. (1983) 273-275.

ONOPORDUM TURCICUM' DAN PROTEAZ İZOLASYONU VE KINETİK MODELLEMEDE YENİ BİR YAKLAŞIM

İ.Melih TAMER ve Mehmet MUTLU

Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü
Beytepe - Ankara - Türkiye

ISOLATION OF PROTEASE FROM *ONOPORDUM TURCICUM* AND A NEW APPROACH IN KINETIC MODELLING

SUMMARY

The kinetics of enzyme catalyzed reaction by the enzyme extract isolated from *Onopordum turcicum* in media containing variable proportions of powder milk was studied. The results indicated that rate of enzyme catalyzed reaction underwent both activation and inhibition phases by changing amount of substrate concentration. Substrate depletion rate was proportional to substrate concentration in the activation phase with a saturation term. The effect of inhibition accelerated at higher substrate concentrations. A mathematical model was proposed to enhance the phenomenon of rate activation and inhibition by substrate concentration. The variation of rate with temperature was found to obey Arrhenius law and the energy of activation of enzyme catalyzed reaction was calculated to be 18.12 kcal/mol.

ÖZET

Değişen oranlarda süt tozu içeren ortamlarda, *Onopordum turcicum*' dan izole edilen enzim ekstresi ile katalizlenen enzimatik reaksiyonun kinetiği incelenmiştir. Sonuçlar, enzimatik reaksiyon hızının, değişen substrat konsantrasyonu ile hem aktivasyon hemde inhibisyon fazlarını geçirdiğini göstermiştir. Substrat tüketim hızı, aktivasyon fazında substrat konsantrasyonuna bir saturasyon sabiti ile orantılıdır. İnhibisyon etkisi, yüksek substrat konsantrasyonlarında ivmelenmiştir. Substrat konsantrasyonu tarafından hızın aktive ve inhibe edilmesi, önerilen matematik model ile açıklanmaya çalışılmıştır. Hızın sıcaklık ile değişiminin, Arrhenius kanuna uygun olarak meydana geldiği bulunmuştur. Enzimatik katalizleme reaksiyonunun aktivasyon enerjisi değeri 18.12 kcal/mol olarak hesap edilmiştir.

GİRİŞ

Buzağı kökenli rennet peynir üretimine en uygun ve ideal koagülant olarak kabul edilmektedir (1). Her ne kadar sütü koagüle edebilen bitki orijinli proteaz ekstraheleri bulunmakta isede, sadece mikrobial kaynaklı *Mucor miehei* ve *Mucor*

pusillus, ticari peynir yapımında kullanılmaktadır (2). İçerdikleri gereğinden fazla proteolitik aktivite sebebiyle, bitki kökenli proteazlar ticari peynir üretimi için uygun bulunmamaktadır (3). Ancak bazı ülkelerde organlarında proteolitik enzim içeren bitkilerden elde edilen proteaz ekstratlarının süt koagulanı olarak geleneksel yumuşak peynir yapımında kullanıldığı bilinmektedir (4). Compositae familyasının bir türü olan *Onopordum turcicum*'dan izole edilen koagulan yeni keşfedilmiş olup ticari peynir üretiminde bir önem taşımamaktadır. Bu çalışmada enzim aktivitesine substrat konsantrasyonunun etkisi, 33°C-48°C sıcaklık değerleri arasında kinetik modellemede yeni bir yaklaşım kullanılarak araştırılmıştır. Biyolojik ve biyokimyasal sistemlerin benzer kinetik modeller ile ifade edilmesi daha önceki çalışmalarda mevcuttur (5-7,9). Bu makale içinde yer alan "enzimatik hız" terimi gözle görülebilen kazein protein agregatlarının ilk belirlendiği anı temel almaktadır. İlk agregatların görüldüğü zaman itibarı ile total kazeinin % 10.1'ini içeren (10) K-kazeinin yaklaşık %95-100 civarında ürüne dönüştüğü varsayılmaktadır (10,11). Enzimatik hızın hesaplanmasında pıhtılaşmanın ilk görüldüğü pıhtılaşma zamanı, K-kazeinin tamamının agregat halinde, kararsız toplam kazein içinde yer aldığı an olarak değerlendirilmiştir.

DENEL BÖLÜM

Enzim kompleksi, *Onopordum turcicum* bitkisinin tohum ve çiçeklerinden, ortamda sırasıyla 1/7 (w/v) oranında katı ve sıvı olmak kaydıyla 0.08M fosfat tamponu (pH:7.0) kullanılarak ekstrakte edilmiştir. Söz konusu tampon ayrıca litrede 6.0 g $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$, 1.3 g EDTA, 2.0 g polyvinyl polypyrrolidone ve 0.05 ml β -mercaptoetanol içermektedir. Blending ve homojenizasyon, sırasıyla commercial Waring Blendor ve Virtis 23 ile 2 dakika süre ile yapılmıştır. Ekstrenin kaba filtrasyonu yapılmış ve vakum fırında (Cole Parmer) 25 in Hg ve 35-40 °C'de konsantre edilmiştir. Yağsız sütte %3.67 nem ve %3.4 protein içermektedir. Deneyler sabit sıcaklıktaki su banyosunda (Haake, SWB 20) yapılmıştır. Reaksiyon ortamında % 0.5-20 oranlarında değişen miktarlarda yağsız süt tozu, 0.005g/ml $\text{CaCl}_2\text{H}_2\text{O}$, ve 0.05 ml /ml enzim ekstrakti kullanılmıştır. Süt pıhtılaşma aktivitesi, süt tozunun içerdiği K-kazein (molekül ağırlığı:19000) (12) dikkate alınarak hesaplanmıştır. Süt pıhtılaşma zamanı Berridge metodunun modifikasyonu ile saptanmıştır (8). Sütte toplam protein, ve kazein tayini Rowland metodu ile yapılmıştır (13). Ticari toz rennet Christian Hansen laboratuvarından sağlanmıştır.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Sonuçlar, yağsız süt tozu içeren ortamda enzim aktivitesinin, düşük substrat konsantrasyonlarında arttığını, öte yandan yüksek substrat konsantrasyonlarında düştüğünü göstermektedir. Enzimatik hız agregasyonun ilk görüldüğü anda ürüne dönüşen toplam K-kazein miktarı ile ifade edilmiştir. Şekil 1 'de düşük K-kazein konsantrasyonlarında enzimatik hızdaki artışın K-kazein miktarındaki artış sonucu oluştuğu gözlenmektedir. Yüksek K-kazein konsantrasyonlarında, enzimatik reaksiyon hızı, ortamda bulunan fazlalık K-kazein tarafından düşürülmektedir. Böylece enzimatik hız aşağıdaki şekilde ifade edilebilir :

$$V = V_1 [1 - e^{-K_1 S}] - V_2 [1 - e^{-K_2 S}] \quad (1)$$

Burada V dakikada katalizlenen μmol K-kazein, V_1, V_2, K_1, K_2 parametreler, S ; K-kazein konsantrasyonudur. Parametrelerin sayısal değerleri aşağıdaki sınırlama göz önüne alınarak bulunabilir :

$$[K_1] > [K_2] \quad (2)$$

Bu kısıtlama, başlangıçta enzimatik katalizleme reaksiyonunun, artan S konsantrasyonu eşliğinde inhibisyona baskın çıktığını ima etmektedir. Böylece düşük ve yüksek S konsantrasyonları söz konusu olduğunda (1) numaralı denklem aşağıdaki terimlere indirgenebilir :

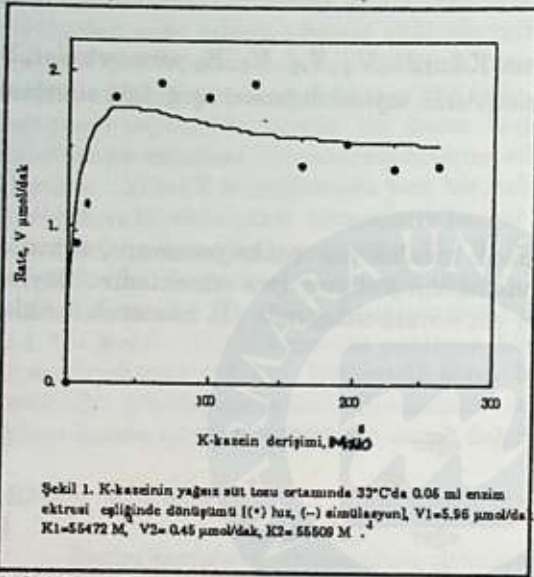
$$V = V_1 [1 - e^{-K_1 S}] \quad \text{eğer} \quad (dV/dS) > 0 \quad (3)$$

$$V = V_1 - V_2 [1 - e^{-K_2 S}] \quad \text{eğer} \quad (dV/dS) \leq 0 \quad (4)$$

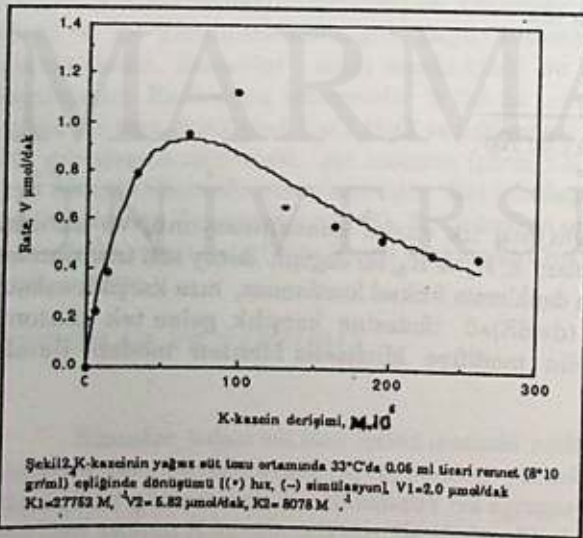
Maksimum aktivasyon hız sabiti; V_1 , aktivasyon sabiti; K_1 , minimum inhibisyon hız sabiti; V_2 , inhibisyon sabiti; K_2 'nin sayısal değerleri $\ln(dV/dS)$ 'e karşılık S grafiklerinin eğim ve interseptlerinden bulunmaktadır. Benzer fiziksel durumlarda; substrat aktivasyon ve inhibisyonu olduğunda Michaelis Menten modifikasyonu aşağıdaki gibidir (9):

$$V = \frac{k x}{1 + (K_1/S) + (S/K_2)} \quad (5)$$

burada V, x , ve S sırasıyla hız, ilk enzim konsantrasyonu, ve substrat konsantrasyonudur. Parametreler; k, K_1 ve K_2 , iki değişik deney seti tasarlanarak bulunabilmektedir. (5) Numaralı denklemin fiziksel kısıtlaması, hıza karşılık substrat konsantrasyonu değişiminde $(dv/dS)=0$ ifadesine karşılık gelen tek platonun varlığıdır. Öte yandan modelin modifiye Michaelis Menten modeli ile olan



Şekil 2). Simülasyonların deneysel verilerle olan uyumu, korelasyon katsayıları ile test edilmiş ve 33, 38, 43, 48 °C, sıcaklıklarda yapılan denemelerde sırasıyla 0.948, 0.944, 0.935, 0.978 olarak bulunmuştur. Ticari rennet ile aynı koşullarda yapılan denemelerde bulunan korelasyon katsayıları sırasıyla 0.903, 0.903, 0.903, 0.900 'dür. Tüm sıcaklık değerlerinde, ve her iki enzim ile ayrı ayrı yapılan

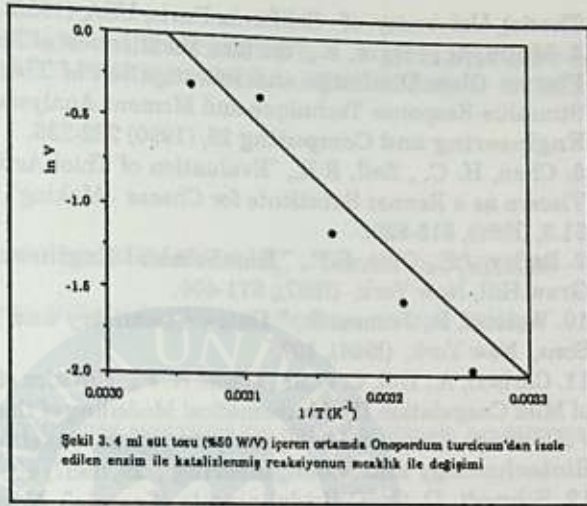


benzerliği hem aktivasyon hemde inhibisyon fazlarının gerekliliğinin dikte edildiği fiziksel fenomenanın tanınmasıdır. *Onopordum turcicum*'dan ekstrakte edilmiş olan enzimin katalizlediği enzimatik hızın substrat ile değiştiği reaksiyon trendleri, 33°C, 38°C, 43°C, 48°C, sıcaklık derecelerinde yapılan deneylerde birbirleri ile uyum içinde olan sonuçlar vermişlerdir. Salt bir deney setinin (T=33°C) simülasyonu Şekil 1 'de grafik olarak verilmiştir. Model, ticari rennet ile yapılan benzer denemelerde de fiziksel durumu ifade edebilmiştir (

Şekil 2). Simülasyonların deneysel verilerle olan uyumu, korelasyon katsayıları ile test edilmiş ve 33, 38, 43, 48 °C, sıcaklıklarda yapılan denemelerde sırasıyla 0.948, 0.944, 0.935, 0.978 olarak bulunmuştur. Ticari rennet ile aynı koşullarda yapılan denemelerde bulunan korelasyon katsayıları sırasıyla 0.903, 0.903, 0.903, 0.900 'dür. Tüm sıcaklık değerlerinde, ve her iki enzim ile ayrı ayrı yapılan denemelerde artan S konsantrasyonu, inhibisyonun etkisi avantajına hızı etkilemektedir. Bu fiziksel durum, (1) ve (5) numaralı denklemler tarafındanda onaylanmaktadır. Enzimatik hızın sıcaklık ile değişimi Arrhenius tipi bir ilişki sergilemiştir (Şekil 3). Bu (1) numaralı denklemin evrensel Arrhenius kanunu ile uyum halinde olduğunu göstermektedir. Aktivasyon enerji değerleri *Onopordum turcicum* ve buzağı renneti ile yapılan deneyler için sırasıyla 18.12 kcal/mol ve 15.40

kcal/mol olarak hesap edilmiştir. Bu değerler diğer benzer çalışmalarda bulunmuş olan değerler ile kıyaslanabilmektedir (9).

Bu çalışmanın amacı enzimatik reaksiyon hızı ile substrat konsantrasyonu arasındaki ilişkiyi *Onopordum turcicum*' dan izole edilen ektsreyi biyolojik katalizör ve süttozundaki toplam K-kazeini substrat olarak kullanarak belirlemektir.



Kazein agregatların oluşma hızını birçok faktör etkilemesine rağmen, agregat oluşma hızı, esas olarak K-kazeinin parçalanmasından etkilenmektedir (10). K-kazein, diğer kazein moleküllerini normal süt ortamında çökmekten koruyan bir kolloid işlevi görmektedir (14). Daha önce yapılmış olan çalışmalarda sütü rennetleme (mayalama) işlemi, K-kazeinin spesifik proteolizi, ve devamla, kararsız kazein misellerinin çökmesi ile tarif edilerek bu iki ardışık reaksiyonun sıcaklık, pH, ve kalsiyum iyonu aktivitesinden farklı eğilimlerle etkilendiği ve sütün pıhtılaşma zamanının bu iki reaksiyondan ayrı ayrı etkilendiği belirtilmektedir (15). Bu çalışmada her deney tasarımında, toplam K-kazein konsantrasyonu dışında tüm etkiyen faktörler (sıcaklık, pH, $[Ca^{2+}]$) sabit tutulmuştur. Ancak toplam kazein miktarının K-kazein hidrolizine olası etkisinin K-kazein proteolizi ile meydana getirilen koagülasyon prosesinin dinamiğinde asimile olacağı varsayılmaktadır. Toplam kazeinin bir parçası olan K-kazein olmadan herhangi enzimatik pıhtılaşma eldesinin, yani agregat oluşumunun imkansızlığı diğer çalışmalar tarafından kabul edilmektedir (16).

KAYNAKLAR

1. Fox, F. F. "Developments in Dairy Chemistry-4", Elsevier Applied Science, London (1989) 27.
2. Aworh, O. C., ve Müller H. G. "Cheese making Properties of Vegetable Rennet from Sodom Apple (*Calotropis procera*)". *Food Chemistry*, 26 (1987) 71-79.
3. Barbosa, M., Corradini, C., Battistotti, B., "Cheese making experiments carried out on some Italian cheeses with vegetable rennet from Cardo (*Cyanara Cardunculus L.*)". *Scienza E Tecnica Lattiero-Casearia*, 32, 4 (1981) 203-221.
4. Feveireiro, P., Cabral, J. M. S., Fonseca, M. M. R., Novaus, J. M., Pais. M. S., "Callus and Suspension Culture of *Silybum marianum*. Biosynthesis of Proteins with clotting Activity", *Biotechnology Letters*, 1, (1986) 19-24.
5. Tamer, I. M., Özilgen, M., Ungan, S., "Kinetics of riboflavin production by brewers yeasts", *Enzyme and Microbial Technology*, 10, (1988) 754-757.
6. Özilgen, M., "Kinetics of Batch Fermentations with *K. Fragilis*", (Ph. D.

- Thesis), University of California Davis, USA, (1985).
7. Mutlu, M., Pişkin, E., "Surface Modification of Polyurethane Biomaterials by Plasma Glow Discharge and Investigation of Their Blood Compatibilities by Stimulus-Response Technique and Moment Analysis", **Medical and Biological Engineering and Computing** 28, (1990) 232-236.
 8. Chen, H. C. , Zall, R.R., "Evaluation of Thiol Activated Proteases from Clam Viscera as a Rennet Substitute for Cheese - Making", **Journal of Food Science**, 51.3, (1986), 815-820.
 9. Bailey, J.E., Ollis, D.F., "**Biochemical Engineering Fundamentals** ", Mc. Graw Hill, New York, (1987), 371-400.
 10. Walstra, P., Jenness R., "**Dairy Chemistry and Physics** ", John Wiley and Sons, New York, (1984), 107.
 11. Carlson, A., Hill, C. G., Jr., Olson. N. F., "Kinetics of milk Coagulation: "Kinetics of Milk Coagulation III: Mathematical Modelling of the Kinetics of Curd Formation Following Enzymatic Hydrolysis of K-Casein-Parameter Estimation", **Biotechnology and Bioengineering** , 29, (1987) 601-611.
 12. Schmidt, D. G., "Colloidal aspects of casein", **Neth.Milk Dairy J.** 34, (1980) 42-64.
 13. Rowland, S.J., " The Determination of the Nitrogen Distribution in Milk" **Journal of Dairy Research**, 9, (1938) 42-46.
 14. Carlson, A., Hill, C. G. Jr., Olson, N. F., "Kinetics of Milk Coagulation: I. The Kinetics of Kappa Casein Hydrolysis in the Presence of Enzyme Deactivation", **Biotechnology and Bioengineering** , 29, (1987) 582-589.
 15. Hooydonk, van, A. C. M., Walstra, P., "Interpretation of the kinetics of the renneting reaction in milk", **Neth.Milk Dairy J.** 41, (1987) 19-47.
 16. Carlson, A., Hill, C. G. Jr., Olson, N. F., "Kinetics of Milk Coagulation: II. Kinetics of the Secondary Phase : Micelle Flocculation" , **Biotechnology and Bioengineering** , 29, (1987) 590-600.

MİKROBİYAL RENNİN ÜRETİMİNDE FERMENTASYON PARAMETRELERİNİN SÜT PIHTILAŞTIRMA AKTİVİTESİNE ETKİSİ

Fatma AYHAN, Abdurrahman TANYOLAÇ, Serdar S. ÇELEBİ

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Beytepe- Ankara- Türkiye

INFLUENCE OF FERMENTATION PARAMETERS ON MILK CLOTTING ACTIVITY IN THE PRODUCTION OF MICROBIAL RENNIN

SUMMARY

In this research, a mesophilic fungi, *Mucor miehei* from ATCC has been studied to produce rennin-like enzyme for milk clotting. In the experiments, growth conditions of the microorganism were examined, optimum conditions were determined and the parameters yielding maximum milk clotting activity were obtained. For this, 77 experimental runs were fixed according to the Box-Wilson experimental design and the influence of six independent growth factors (initial D-glucose and ammonium concentrations, inoculum ratio, pH, agitation rate, and temperature), on milk clotting activity have been investigated.

Since the analysis were simplified and the nutrient assimilation can be monitored easily, synthetic growth media was prepared. All the batch model control experiments were carried out under sterile conditions in 250 ml erlenmeyers using water-bath shakers. For this microorganism, the optimum conditions providing maximum milk clotting activity were found as as; $T=37.6^{\circ}\text{C}$, $\text{pH}=6.8$, Agitation rate=81 spm, initial glucose=29.6 g/lit, initial ammonium=1.25 g/lit and 5.2 % v/v inoculum ratio. Under these conditions the highest milk clotting activity without purification was found as 5.71 U/ml.

In conclusion, the growth of microorganisms was achieved in chemically defined synthetic media and the enzyme product has given high milk clotting activity. With this feature, microbial enzyme produced was found to be compatible with the industrial, purified and animal based rennin enzyme.

ÖZET

Araştırmada, ATCC'nin *Mucor miehei*, mezofilik küf mantarı ile çalışılmış ve sanayi'de peynir mayası olarak bilinen rennin enziminin üretilmesi için öncelikle mikroorganizmanın büyüme koşulları incelenmiştir. Optimum büyüme koşulları bulunduğundan sonra elde edilen asit proteazın maksimum süt pıhtılaştırma aktivitesi verebilmesi için en uygun parametreler saptanmıştır. Bunun için Box-Wilson deneysel tasarımına göre 77 deney belirlenmiş ve birbirinden bağımsız altı büyüme faktörünün (başlangıç glukoz ve amonyum derişimleri, aşılama oranı, pH, çalkalama hızı ve ortam sıcaklığı) süt pıhtılaştırma aktivitesi üzerindeki etkileri araştırılmıştır.

Araştırmada en önemli nokta, analizlere getirdiği kolaylık ve mikroorganizmanın besin tüketimindeki davranışını net bir şekilde izleyebilmek açısından besi ortamında kullanılan tüm maddelerin yapay olarak seçilmesidir.

Model ve kontrol deneylerinin tümü 250 ml'lik erlenlerde steril koşullarda, çalkalayıcı su banyosunda keskin olarak yürütülmüştür. Çalışılan mikroorganizma için, maksimum süt pıhtılaştırma aktivitesi veren enzim derişiminin elde edildiği optimum koşullar: 37.6°C sıcaklık, 6.8 pH, 81 vuru/dk çalkalama hızı, 29.6 g/l glukoz, 1.25 g/l amonyum ve % 5.2 v/v aşılama oranı olarak bulunmuştur. Buna göre maksimum süt pıhtılaştırma aktivitesi olarak saflaştırma yapmaksızın 5.71 U/ml değerine ulaşılmıştır.

Sonuçta; yapay besi ortamında mikroorganizmanın uygun büyümesi sağlanarak üretilen enzim derişiminin yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesine sahip olduğu anlaşılmış ve sanayide kullanılan, şirdenden elde edilen saflaştırılmış ticari peynir mayası ile yarışabilir niteliğe sahip olduğu saptanmıştır.

GİRİŞ

Dünyada her geçen gün artan peynir talebine karşı, kısıtlı olan hayvansal kökenli peynir mayası (rennin) üretimine alternatif kaynaklar aranmaktadır. Bu kaynakların başında, süt pıhtılaştırıcı enzimlerin çok daha ekonomik olarak elde edilebildiği ve doğadaki çeşitliliği sonsuz olan mikroorganizmalar gelmektedir. Mikrobiyal kaynaklı enzimlerin sütü pıhtılaştırıcı özelliğe sahip oldukları bilinmekte ve bunların özellikle endüstriyel boyutta üretilebilmeleri halinde peynir üretiminde önemli olacakları düşünülmektedir. Birçok değişik lif mantarının rennin enzimine benzer özellikte enzimleri üretebildikleri bildirilmektedir [1]. *Mucor miehei* lif mantarının da, pıhtılaştırma gücü oldukça yüksek, buna karşın proteolitik aktivitesi düşük rennin enzimi ürettiği araştırmalar sonucunda bulunmuştur [2,3,4].

Bu çalışmada fermentasyon ortam parametreleri olan sıcaklık, pH, aşılama oranı, karıştırma hızı, azot ve karbon kaynağı derişimlerinin üretilen enzim aktivitesine olan etkileri Box-Wilson deneysel tasarımı ile belirlenen düzende yapılmış ve diğer beş değişkenin sabit tutulduğu koşullarda altıncı değişkenin süt pıhtılaştırma aktivitesine olan etkisi araştırılmıştır [5].

DENEL BÖLÜM

Bu çalışma çerçevesinde yapılan deneylerde mikroorganizmanın karbon ve azot kaynağını hangi hızla tükettiğini belirleyebilmek amacıyla sentetik besi ortamı (Tablo 1) hazırlanmıştır. Karbon kaynağı olarak D-glukoz, azot kaynağı olarak da amonyum klorür seçilmiştir. Bunların yanında mikroorganizmalar için gerekli diğer bileşenler olarak çeşitli metaller ve mineraller içeren kimyasallar eklenmiştir. Vitamin ihtiyacı da maya özütü ile giderilmiştir.

Tablo 1. *Mucor miehei* sentetik besi ortamı bileşimi.

Bileşen	Derişim (g/lit)	Mikrobesi bileşimi	Derişim (g/lit)
D-glucose	değişken	$\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2$	1.000
NH_4Cl	değişken	ZnCl_2	1.000
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.010	MnSO_4	0.500
KH_2PO_4	0.349	CuCl_2	0.080
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	5.600	CoSO_4	0.100
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.001		
KCl	0.050		
Maya özütü	1.000		
Mikrobesi çözeltisi	2.0 ml		
Na_2SO_4	0.019		
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	2.651		

Besi ortamı pH'ı ayarlanıp belirli hacimlerde erlenlere konulmuş ve ağzıları pamukla kapatıldıktan sonra 121°C'de 15 dakika sterillemiştir. Daha önce PDA (Patates dekstroz agarı) içeren tüplerde sporlandırılan *Mucor michelet* suşundan gereken miktarlarda erlenlere ekim yapılarak uygun sıcaklık ve çalkalama hızında üremeye bırakılmışlardır.

Süt pıhtılaştırma aktivitesinin , karbon ve azot kaynaklarının tüketim hızlarının saptanması amacıyla yaklaşık her 24 saatte fermentasyon ortamından steril olarak örnekler alınmış ve çok kısa sürede gerekli analizler yapılmıştır.

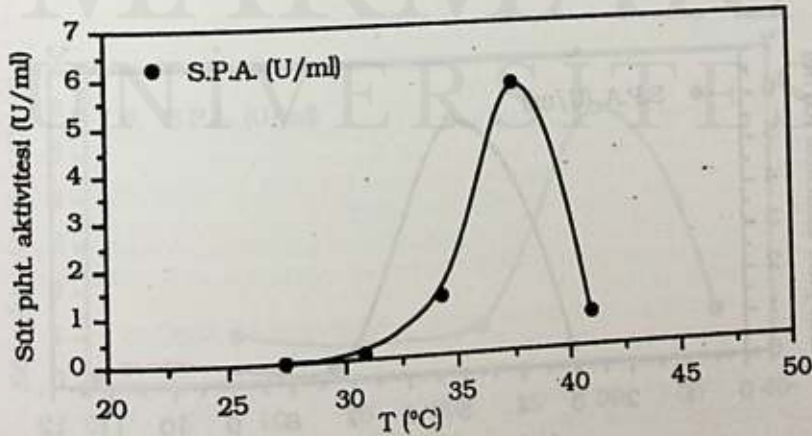
Süt pıhtılaştırma aktivitesi, 10 ml sütü 35°C'de 1 dakikada pıhtılaştırma enzim miktarı olarak tanımlanmıştır. %10'luk yağsız süt tozundan her analiz öncesinde taze olarak hazırlanan sütün Ca^{+2} iyon konsantrasyonu 2 g/lit olacak şekilde $CaCl_2$ ilavesi yapılmış ve pH'ı 6 olarak ölçülmüştür.

Karbon ve azot kaynaklarındaki değişimler sırasıyla YSI® glukoz analizörü ve Orion® amonyum elektrodu ile saptanmıştır.

Peynir mayası üretiminde yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesi yanısıra, peynirde acı tad oluşumuna neden olan proteolitik aktivitenin düşük olması da istenmektedir. Bu nedenle her erleninde en yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesinin görüldüğü zamana karşı gelen örneklerde proteolitik aktivite tayini de yapılmıştır. Ortamdaki protein derişimini tespit amacı ile de yine alınan aynı örnekte toplam protein tayini yapılmıştır.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bu deneyler sonucunda ulaşılan en önemli nokta; mikrobiyal olarak elde edilen rennin enzim aktivitesinin, hayvansal kökenli ticari rennin ile yarışabilecek düzeyde olmasıdır. Endüstriyel düzeyde peynir üretiminde mikrobiyal renninin uygulanması ise lezzet ve koku gibi diğer peynir niteliklerinin de sağlanmasıyla mümkün olabilecektir.

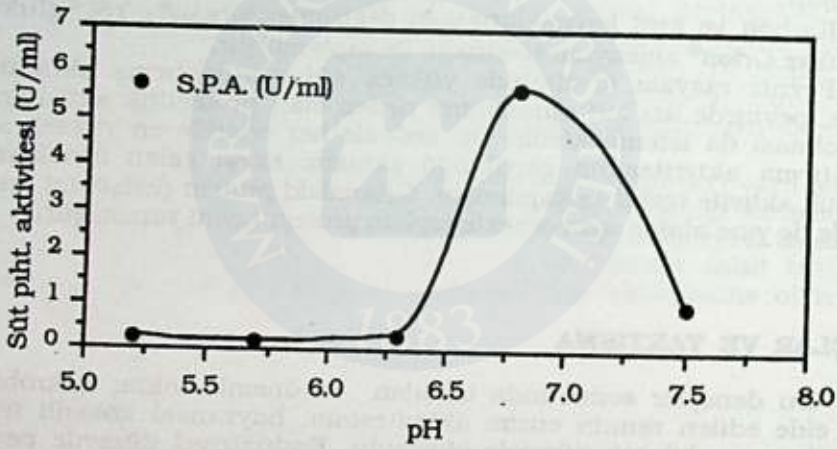


Şekil 1. Süt pıhtılaştırma aktivitesinin sıcaklıkla değişimi.

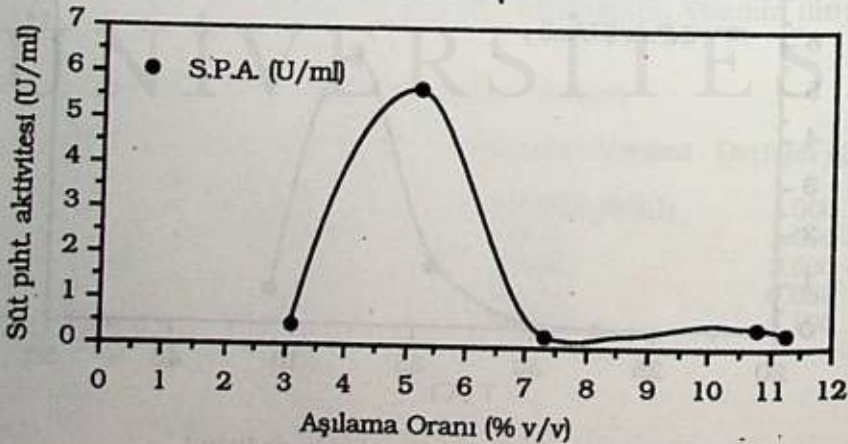
Yapılan deneyler sonucunda elde edilen veriler yukarıda sözü edilen tüm parametrelerin süt pıhtılaştırma aktivitesinde etkili olduğunu ortaya koymuştur [5].

Sıcaklığın mikroorganizmanın üreme kinetiğinin optimum olduğu 37°C (±1°C) civarında süt pıhtılaştırma aktivitesine çok etkili olduğu tespit edilmiştir (Şekil 1). 30-40 °C sıcaklık aralığının dışında kayda değer bir enzim üretimi yoktur ve bu değer literatürle uyum içindedir [1].

pH'in, besi ortamı pH'ının altındaki ve üstündeki değerlerde pıhtılaştırma aktivitesinde bariz değişimler gösterdiği saptanmıştır (Şekil 2). pH 6.75 civarında enzim üretimi maksimum düzeye ulaşmıştır. pH 6.5-7.5 aralığının dışında enzim aktivitesinin hemen hemen hiç olmaması pH'in fermentasyon sırasında duyarlıkla denetlenmesi gerektiğini göstermektedir [5].



Şekil 2. Süt pıhtılaştırma aktivitesinin pH ile değişimi.

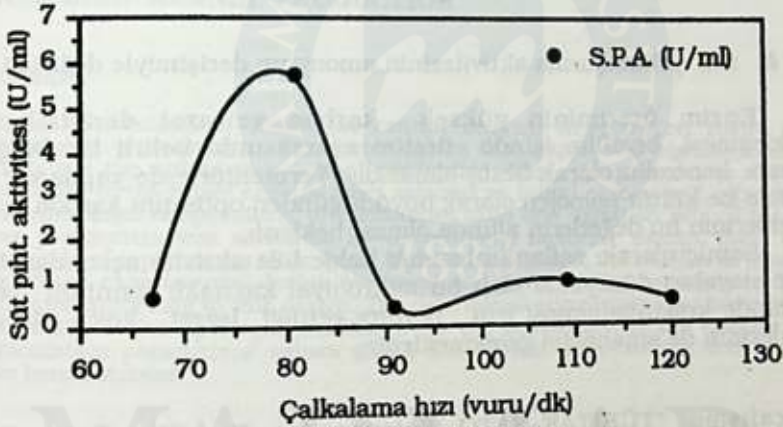


Şekil 3. Süt pıhtılaştırma aktivitesinin aşılama oranı ile değişimi.

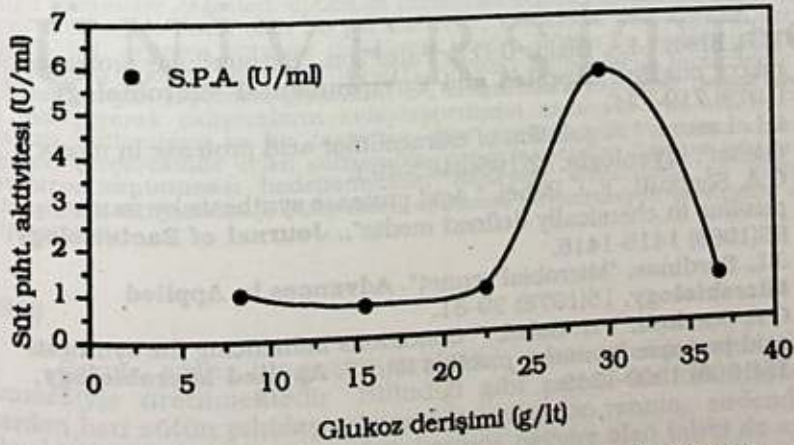
Aşılama oranının ise % 4-7 olan değerlerinde en yüksek aktivite elde edilmiştir (Şekil 3). Ortama yüksek oranlarda aşı ilavesi mikroorganizmaların hızlı bir şekilde büyüyerek besinleri enzim üretim aşamasından önce tüketmesine neden olmaktadır. Bu durumda ölme evresinde enzim üretimi için yeterli besin kalmamaktadır. Düşük aşı oranları ise yeterli büyümeyi sağlayamamaktadır.

Çalkalama hızı için ideal çalışma aralığı olarak 75 - 110 spm bulunmuştur (Şekil 4). Aşırı karıştırmada küresel olarak ortamda büyüyen mikroorganizma parçalanarak, enzim üretimini ölüm evresinde sağlayan kontrollü besi akı ve derişim profili bozulmaktadır. Düşük karışırma hızlarında ise biyofilml için yeterli besin aktarılamamaktadır.

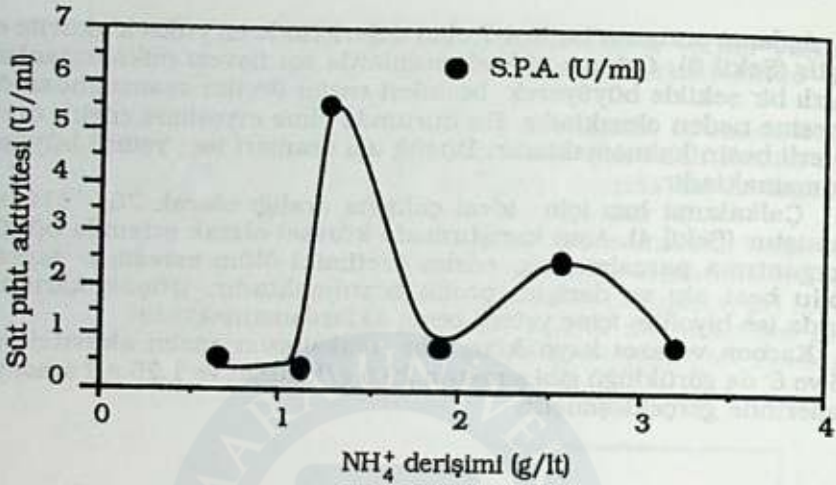
Karbon ve azot kaynakları için maksimum enzim aktiviteleri ise Şekil 5 ve 6' da görüldüğü gibi sırasıyla 29.6 g/l glukoz ve 1.25 g/l amonyum derişimlerinde gerçekleşmiştir.



Şekil 4. Süt pıhtılaştırma aktivitesinin çalkalama hızı ile değişimi.



Şekil 5. Süt pıhtılaştırma aktivitesinin glukoz derişimiyle değişimi.



Şekil 6. Süt pıhtılaştırma aktivitesinin amonyum derişimiyle değişimi

Enzim üretiminin yüksek karbon ve azot derişimlerinde gerçekleşmesi, biyofilm içinde üretim aşamasında belirli bir bölgenin difüzyon kontrollü olarak besin almasıdır. Fermentörlerde yapılacak olan üretimde ise kültür homojen olarak büyüdüğünden optimum karbon ve azot derişimlerinin bu değerlerin altında olması beklenir.

Sonuç olarak, saflandırılmadığı halde bile aktivite açısından ticari peynir mayaları düzeyinde olan bu mikrobiyal kaynaklı renninin peynir üretiminde kullanılabilmesi için, peynire verdiği lezzet, koku gibi diğer niteliklerinin de sınanması gerekmektedir.

(Bu çalışma "TÜBİTAK-NATO Science for Stability Programme-Biotechnology" projesi kapsamında desteklenmektedir.)

KAYNAKLAR

1. M.R. Khan, J.A. Blain, J.D.E. Patterson, "Extracellular proteases of *mucor pusillus*". **Applied and Environmental Microbiology**, 37 (1979) 719-724.
2. L.L. Lasure, "Regulation of extracellular acid protease in *mucor miehe*". **Mycologia**, 72(1980)483-493.
3. G.A. Somkuti, F.J. Babel, "Acid protease synthesis by *mucor pusillus* in chemically defined media". **Journal of Bacteriology**, 95(1968) 1415-1418.
4. J.L. Sardinias, "Microbial rennet". **Advances in Applied Microbiology**, 15(1978) 39-81.
5. G.A. Somkuti, F.J. Babel, "Conditions influencing the synthesis acid protease by *mucor pusillus lindt.*". **Applied Microbiology**, 15(1968) 1309-1312.

MİKROBİYAL RENNİN ÜRETİM OPTİMİZASYONUNDA BOX-WILSON DENEYSEL TASARIMI

Fatma AYHAN, Abdurrahman TANYOLAÇ, Serdar S. ÇELEBİ

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Beytepe-Ankara-Türkiye

BOX-WILSON EXPERIMENTAL DESIGN ON THE OPTIMISATION OF MICROBIAL RENNIN PRODUCTION

SUMMARY

Production of microbial rennin enzyme depends on many different fermentation parameters. Parameter values that supply the highest milk clotting activity are the optimum points of production. Here, the parameters affecting the production of microbial enzyme were selected as initial carbon and nitrogen source concentrations, temperature, pH, inoculum ratio and agitation rate. If the effect of these parameters was examined by conventional factorial design, there would be thousands of experiments to be done. In order to decrease the number of experiments, Box-Wilson experimental design was used and fermentation parameter values were calculated according to this design. The determined erlenmayer runs were carried out to investigate the optimum conditions for the production of the enzyme and the fermentation parameters' values giving the highest milk clotting activity (M.C.A.) have been obtained.

ÖZET

Mikrobiyal rennin enziminin üretimi ve optimizasyonu çok çeşitli fermentasyon parametrelerine bağlıdır. Süt pıhtılaştırma aktivitesinin en yüksek olduğu parametre değerleri, optimum parametre değerlerini vermektedir. Mikrobiyal enzim üretiminde etkili olan bu parametreler; karbon ve azot kaynağı derişimleri, sıcaklık, pH, aşılama oranı ve çalkalama hızıdır. Bütün bu parametrelerin enzim üretimindeki etkileri faktöriyel tasarım yöntemi kullanılarak incelenecek olursa, binlerce deneyin yapılması gereklidir. Bu araştırmada yapılacak deney sayısını en aza indirgeyerek çalışmaların kolaylaştırılması amacıyla Box-Wilson deneysel tasarımı kullanılmış ve bu tasarıma göre saptanan fermentasyon parametre değerleri çerçevesinde erlen çalışmaları yapılarak enzim üretimi için en uygun koşulların saptanması hedeflenmiştir. Deneyler sonucunda en yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesini (S.P.A.) veren optimum fermentasyon parametre değerleri belirlenmiştir.

GİRİŞ

Peynir, sütün bir enzim tarafından pıhtılaştırılıp çeşitli şekillerde işlenmesiyle üretilmektedir. Bilindiği gibi peynir endüstrisinde uzun yıllardan beri sütün pıhtılaştırılmasında kullanılan rennin, şirdenden elde edilmektedir. Hızlı nüfus artışı beraberinde peynire olan talebi de arttırmış ve böylece rennin zaten kısıtlı olan şirdenden üretimi yerine, daha

ekonomik ve daha fazla miktarlarda mikroorganizmalardan üretimi ön plana çıkıştır.

Bu çalışmada, peynir yapımında kullanılan rennin enziminin, mikrobiyal yolla üretiminin fermentasyon parametreleri tarafından nasıl etkilendiği araştırılmıştır. Bilindiği gibi mikroorganizmaların üremeleri ve enzim üretmeleri birçok parametrelere bağlıdır. Bu parametreler her ne kadar birbirlerinden bağımsız görünseler de gerçekte birbirlerine bağlıdır ve bu durum karmaşık bir davranış biçimini ortaya koymaktadır. Ancak araştırmaların yürütülmesi sırasında böyle karmaşık bir davranışın üretime etkisinin anlaşılabilmesi için her bir parametre birer bağımsız değişken olarak kabul edilmektedir. Mikrobiyal rennin üretimindeki altı bağımsız parametre; pH, sıcaklık, aşılama oranı, çalkalama hızı, başlangıç glukoz ve amonyum derişimleri. Her bir parametrenin ayrı ayrı etkileri incelenmek istenirse, diğer parametrelerin sabit tutulup incelenmek istenen parametrenin belirli bir aralıkta farklı düzeylerinde deneyler yapılması gerekir ki; bu da altı parametre gözönüne alındığında binlerce deneye ihtiyaç olduğunu gösterir.

Box-Wilson deneysel tasarımı ile bu deneylerin sayılarının minimuma indirilmesi ve enzim üretimi için optimum şartların en kısa sürede belirlenmesi mümkün olmaktadır. Bu deneysel tasarıma göre, koşulları belirlenen 77 adet deney ATCC'den sağlanan *Mucor miehei* suşu ile gerçekleştirmiştir. Bu deneyler sonucunda en yüksek süt pıhtılaştırma aktivitesini veren koşullar belirlenmiş ve mikrobiyal enzim üretiminde rol oynayan parametreler için en uygun çalışma aralıkları saptanabilmiştir.

DENEL BÖLÜM

Box-Wilson deneysel tasarımı fiziksel bir mekanizmayı karakterize eden bir testler serisidir [1]. Bu amaçla, prosesin matematiksel modelini çıkarmak için verimli bir biçimde kullanılan bir genel deneyler serisi geliştirilmiştir. Bu deneyler özellikle endüstriyel problemlere uygulanabilir. Çünkü oldukça az sayıda deney gerektirir ve uygun hesaplama özelliklerine sahiptir.

Araştırmanın amacı doğrultusunda bağımsız değişkenlerin her biri beş düzeyde belirtilir. Her değişken için bu beş düzeyin değerleri deneydeki değişkenlerin sayısına ve çalışılacak aralığa bağlıdır.

Örneğin, 100°F'lik bir aralığı gösteren 200-300°F sıcaklıklar arasında çalışıldığında; geliştirilecek modele uygunluk için, değişkenlerin işletme düzeyleri yerine kodlanmış değerler kullanılır. Bu amaçla her değişken için yaklaşık \sqrt{p} 'ye (p:değişken sayısı) eşit olan k faktörü kullanılır. Değişkenlerin ana değerleri, orta noktaya aralık/2k değerinin eklenmesi ve çıkarılmasıyla bulunur. Bu örnekte Box-Wilson tasarımı ile belirlenen değişken sıcaklık (X_1) için beş aralık düzeyi Çizelge 1 de verilmiştir.

Çizelge 1. Box-Wilson örnek düzey değerleri.

X_1 Sıcaklık (°F)	Kodlanmış formu
200	-k
250-50/k	-1
250	0
250+50/k	1
300	k

Üç bağımsızdeğişkenle $k=1.73$ ve iki ara noktaya karşı gelen sıcaklıklar $250 \pm 50/1.73$ veya 221 ve 279°F 'tır. Tasarım kuralı üç çeşit diğeri orta nokta değerinde iken her değişkenin uç değerlerini gösterir. Faktöriyel noktalar ara değerlerin tüm kombinasyonlarını içerir (veya çok sayıda değişken için bir m' inci tekrar). Orta nokta, her değişkenin ortalama değeri için tek bir deneydir. Bu örnekte deney sayıları ve deney koşullarının dağılımı aşağıda Çizelge 2 de verilmiştir.

Çizelge 2. Box-Wilson örneği deney koşulları

Eksenel noktalar			Faktöriyel noktalar			Orta nokta		
X1	X2	X3	X1	X2	X3	X1	X2	X3
k	0	0	1	1	1	0	0	0
-k	0	0	1	1	-1			
0	k	0	1	-1	1			
0	-k	0	1	-1	-1			
0	0	k	-1	1	1			
0	0	-k	-1	1	-1			
			-1	-1	1			
			-1	-1	1			

Toplam deney sayısı=15+tekrarlar

Deneyssel hatayı tespit etmek amacı ile orta nokta deneyi genellikle üç-beş kez tekrar edilir. Herhangi bir sayıdaki değişken için deneyssel tasarımıda yukarıdaki benzer yol izlenir.

Deneyssel çalışmaları, ATCC'den sağlanan *Mucor miehei* suşu ile ve 250 ml'lik erlenler kullanılarak çalkalayıcılarda yapılmıştır. Saf kültürün öncelikle agar tüplerinde belli bir süre sporlanması sağlanmıştır. Hazırlanan yapay besi ortamı [2], ağzı pamukla kapalı erlenlerde sterilendikten sonra yine steril koşullarda kültür ekimi yapılarak çalkalayıcıda üremeye bırakılmıştır. Fermentasyon süresince belli aralıklarda ortamdan örnekler alınarak, karbon ve azot kaynaklarının tüketimine, pH değişimine ve süt pıhtılaştırma aktivitesine bakılmıştır. Ayrıca maksimum aktivitenin görüldüğü noktalarda, uygun analiz yöntemleriyle toplam protein derişimi ve proteolitik aktivite de tayin edilmiştir [3].

Yukarıda sözü edilen fermentasyon parametreleri tasarlanan biçimde düzenlenerek bir seri deney gerçekleştirilmiştir. Deneylerde kullanılan parametrelerin çalışma aralıkları aşağıdaki gibi seçilmiştir:

- pH: 4-8,
- Sıcaklık: 20-45°C,
- D-glukoz: 5-40 g/l,
- NH4+: 0.5-3.5 g/l,
- Çalkalama hızı: 60-130 vuru/dk,
- Aşılama oranı: % 1-15 v/v.

Yukarıdaki çalışma aralıkları kullanılarak Box-Wilson deneyssel tasarımına göre parametrelerin değişen değerleri hesaplanmış ve bu

değerlerde 77 adet erlen deneyi gerçekleştirilmiştir. Sonuçta yüksek pıhtılaşma aktivitesi veren deneylerdeki parametre değerleri Çizelge 3 de gösterilmiştir.

Çizelge 3. Box-Wilson yöntemine göre tasarlanmış deneylerde yüksek enzim aktivitesi veren parametre değerleri.

T(°C)	Vuru/dk	pH	%Ası (v/v)	Başlangıç değerleri		
				Glukoz(g/l)	NH ₄ ⁺ (g/l)	SPA (u/ml)
37.6	81	6.8	5.2	29.6	2.55	2.500
37.6	81	6.8	5.2	15.36	2.55	0.174
37.6	81	5.2	5.2	29.6	2.55	0.286
37.6	81	5.2	5.2	15.36	2.55	0.095
27.4	81	6.8	5.2	29.6	2.55	0.000
27.4	81	6.8	5.2	15.36	2.55	0.000
37.6	109	6.8	10.8	29.6	2.55	1.330
37.6	109	6.8	5.2	29.6	2.55	1.000
37.6	109	6.8	10.8	29.6	1.25	2.200
37.6	109	6.8	5.2	29.6	1.25	1.000
37.6	81	6.8	5.2	29.6	1.25	5.710
37.6	81	6.8	5.2	15.36	2.55	1.25

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Box-Wilson yöntemine göre tasarlanan minimum sayıda (77) deneyin sonucunda bağımsız parametrelerin mikrobiyal rennin enzimi üretimi için uygun çalışma aralıkları tespit edilebilmiş ve bu aralıklar için en yüksek süt pıhtılaşma aktivitesini veren parametre değerleri yani en uygun deneysel koşullar saptanabilmektedir.

Deney sonuçlarına göre sıcaklık en önemli parametrelerden biridir. En ideal sıcaklık aralığı 30-45°C olarak saptanmıştır, bu sıcaklık aralığı dışında hem mikroorganizmaların üremeleri hem de enzim üretmeleri mümkün olmamaktadır [4]. Box-Wilson deneysel tasarımına göre yapılan deneylerde 37.6°C de maksimum süt pıhtılaşma aktivitesi elde edilmiştir.

Bir başka önemli etken de pH'tır. Diğer parametrelerin hepsinin sabit tutulduğu durumda, başlangıç pH'nın düşük olması süt pıhtılaşma aktivitesinde önemli bir azalmaya neden olmaktadır. İdeal pH aralığı ise 5-8 olarak bulunmuştur [5]. Tasarıma göre elde edilen 6.8 pH değerinde de maksimum süt pıhtılaşma aktivitesi elde edilmiştir.

Optimum aşılama oranı %5.2 (hacim/hacim) ve optimum çalkalama hızı da 81 vuru/dak. olarak tespit edilmiş ve bu değerlerde çalışıldığında maksimum süt pıhtılaşma aktivitesi elde edilmiştir.

Karbon ve azot kaynakları başlangıç derişimlerinin düşük ve yüksek değerleri aktiviteyi düşürmektedir, bu sonuç bu iki parametrenin mikroorganizmanın beslenmesinde ve enzim üretiminde temel unsurlar olduğunu göstermektedir [6,7]. Karbon ve azot kaynağı derişimlerinin süt pıhtılaşma aktivitesini doğrudan etkilediği açıktır. Deneysel tasarım bu parametrelerin ideal aralığını verdiği gibi 29.6 g/l başlangıç glukoz ve 1.25 g/l amonyak derişimlerinde en yüksek süt pıhtılaşma aktivite değerine ulaşılabilirdiğini göstermektedir. Sözü edilen bütün bu parametrelerin

optimum değerleriyle Çizelge 1'de görüldüğü gibi 5.71 IU/ml'lik süt pıhtılaştırma aktivitesi elde edilebilmektedir.

"Bu çalışma Nato-Science for Stability Programme çerçevesinde TÜBİTAK-Biyoteknoloji projesi olarak desteklenmektedir."

KAYNAKLAR

1. H.R. Perry and C.H. Chilton, "Chemical Engineers' Handbook" 5th ed, New York (1984) 2/74-75.
2. F. Hatipoğlu (Ayhan), E. Mantar, A. Tanyolaç S.S. Çelebi "Rhizomucor miehei ile mikrobiyal rennin (peynir mayası) üretimi". VII. Kimya ve Kimya Müh. Sempozyumu. KKTC Magusa Nisan (1990).
3. M.R. Khan, J.A. Blain, J.D.E. Patterson, "Extracellular proteases of *mucor pusillus*". **Applied and Environmental Microbiology**, 37 (1979) 719-724.
4. L.L. Lasure, "Regulation of extracellular acid protease in *mucor miehei*". **Mycologia**, 72(1980) 483-493.
5. G.A. Somkuti, F.J. Babel, "Acid protease synthesis by *mucor pusillus* in chemically defined media". **Journal of Bacteriology**, 95(1968) 1415-1418.
6. J.L. Sardinias, "Microbial rennet". **Advances in Applied Microbiology**, 15(1978) 39-81.
7. G.A. Somkuti and F.J. Babel, "Conditions influencing the synthesis acid protease by *mucor pusillus lindt.*". **Applied Microbiology**, 15(1968) 1309-1312.

MATERYAL

1. L. J. B. ...
2. ...
3. ...
4. ...
5. ...
6. ...
7. ...

MARMARA
ÜNİVERSİTESİ

BACTERIORHODOPSİNİN SENTETİK BİR ZARA TUTTURULMASI

Vedat SEDİROĞLU (*), Ufuk GÜNDÜZ (**), Meral YÜCEL (**), Lemli TÜRKER (***)
ve İnci EROĞLU (*)

*Orta Doğu Teknik Üniversitesi, 06531, Ankara, Türkiye
(* Kimya Mühendisliği, (**) Biyoloji, (***) Kimya Bölümleri*

IMMOBILIZATION OF BACTERIORHODOPSIN ON SYNTHETIC MEMBRANES

SUMMARY

The photosynthetic bacteria *Halobacterium halobium* which possesses a purple-colored retinal protein within its cell membrane provides photosynthetic capacity in a manner analogous to chlorophyll in green plants. The purple colored protein is called Bacteriorhodopsin (BR) due to its similarity to the visual pigment rhodopsin in the eyes of the high verteberated animals.

In this research, purple membrane fragments with its integrated protein BR were immobilized on lipid impregnated and lipid free cellulose acetate millipore filters (pore size 0.22 μm , 0.15 mm thick). The photoresponse curves of these membranes were obtained by measuring the pH change with time of exposure of light in each compartment of the photoactivity cell. The factors affecting the photoresponse of BR investigated in this research were lipid to BR ratio, the amount of BR immobilized on the membrane, and the temperature. It was observed that $[\text{H}^+]$ ion concentration increased upon exposure of light in the compartment which was in contact with BR attached side of the membrane, but there appeared to be no light driven $[\text{H}^+]$ ion transport from that compartment to the other.

It has been concluded that better orientation of BR was achieved in low lipid to BR ratio by applying electrical field of 25 volt/cm for 30 minutes during the immobilization of BR. It was also observed that the increase in temperature has an inverse effect on photoactivity of BR. However, as the amount of BR inamobilized increases, the photoactivity increases. From the stability experiments it was observed that there was no release of BR, and it was still active on the membrane surface after one month.

ÖZET

Fotosentetik bir bakteri olan *Halobacterium halobium*'ün hücre zarında mor renkli retinal bir protein bulunmaktadır. Bu protein yeşil bitkilerin klorofili gibi fotosentez yapabilme kapasitesine sahiptir. Bu mor renkli protein, omurgalı canlıların gözlerinde bulunan rodopsine benzerliği dolayısıyla Bacteriorhodopsin olarak adlandırılır.

Bu araştırmada Bakteriorhodopsin (BR) entegreli mor zar parçacıkları, lipid emdirilmiş ve lipidsiz gözenekli selüloz asetat zara tutturuldu (gözenek çapı, 0.22 µm, kalınlık 0.15 mm). Bu şekilde hazırlanan zarların fototepki eğrileri fotoaktivite ölçüm hücrelerinin her iki bölümünde aydınlatma süresine göre pH değişimi ölçülerek elde edildi. Bu çalışmada BR'in fototepkisine etki eden faktörler olarak yağın BR'a oranı, zar üzerine tutturulan BR miktarı ve sıcaklık incelendi. BR'in tutturulduğu bölgede ışık etkisiyle $[H^+]$ iyon konsantrasyonunun arttığı gözlenmesine rağmen bir bölmeden diğer bölmeye ışık etkisi ile $[H^+]$ iyonu transferi olmadığı sonucuna varıldı. BR'in zara tutturulması esnasında elektrik alanı (25 volt/cm) uygulanarak yönlendirilmesinin yağın BR'a oranının küçük olduğu durumlarda daha iyi sonuç verdiği kanısına varıldı. Ayrıca sıcaklığın artması BR'in fotoaktivitesini azaltıcı yönde etkiledi. Halbu ki, selüloz asetat zara tutturulan BR miktarının artırılması fotoaktivitenin artmasına neden oldu. Ayrıca 1 ay süresince muhafaza edilen zarlar ile yapılan deneyler sonucunda BR'in zar yüzeyinden ayrılmadığı ve aktif halde olduğu belirlendi.

GİRİŞ

1971 yılında Oesterheit ve Stoickenus [1] tarafından bulunan fotosentetik bir bakteri olan Halobacterium halobium özellikle hücre zarında bulunan proteinleri ile bilim adamlarının dikkatini çekmiştir. Bu proteinlerden bacteriorhodopsin yapısal olarak gözdeki görme olayını gerçekleştiren rodopsine kimyasal bir benzerlik göstermektedir. Ayrıca bu protein bakteride fotosentez fonksiyonunu üstlenmektedir ve bilinen en sade aktif proton transport proteindir. Bacteriorhodopsin biyolojik makromoleküler araştırmalarında görme ve fotosentez konuları yanında biomembranlarda aktif transport mekanizmalarının anlaşılmasına yönelik yapılan çalışmalarda da çok önemli bir yer tutmaktadır. Ayrıca son yıllarda moleküler fonksiyonel düzenekler kurularak teknolojik uygulamaya geçilmeye çalışılmaktadır. Bacteriorhodopsinin fotonik ve fotoelektrik özelliklerinden yararlanılarak ve bacteriorhodopsin yapı blokları oluşturularak bioelektronik düzenek kurulmasına yönelilmiştir. Bunlar biyokrom filmler, optik hafızalar, yüksek hızlı fotosensörler, halografik ortam ve moleküler bilgisayar elemanlarının prototipleridir (Hong [2]). Değişik retinal proteinleri karşılaştırılarak canlı organizmalardaki değişik fonksiyonel düzeneklerdeki DOĞA'nın tasarımını anlamaya çalışmak, bu tür sistemleri kavramaya yönelik daha derin bir görüş kazandıracaktır. Yakın geçmişte Amerika Birleşik Devletleri'nde ve Japonya'da teknolojik uygulamaya yönelik zeki malzemelerin (intelligent material) keşfine ve geliştirilmesine çalışılmaktadır. Bacteriorhodopsin aynı zamanda zeki malzemelere bir örnektir.

Ülkemizde Halobacterium halobium'dan bacteriorhodopsinin biyosentezlenmesi konusundaki araştırmaları gurubumuz 1982 yılında başlatmıştır. 1980'li yıllar bacteriorhodopsinin ışık enerjisini kimyasal enerjiye dönüştürerek fotosentezde rol oynamasını dikkate alan ve bu özelliğinin biyosentetik zarlar oluşturularak güneş enerjisi dönüşüm sistemlerine, güneş pillerinin yapımına yönelilen senelerdir [3,4]. Ancak bu araştırmalar sonucunda böyle bir güneş pilinin yapılabilmesi için pil yapımına uygun bacteriorhodopsin tutturulan biyosentetik zarların oluşturulması ve bu zarların performansını arttırmaya yönelik faktörlerin incelenmesi gerekliliği sonucuna varılmıştır.

Bu araştırmanın amacı bacteriorhodopsin milipor filtreye tutturularak biyosentetik zar oluşturmak ve bu zarların ışıkla uyarıldığında proton pompalama özelliklerini deneysel olarak saptamaktır. Ayrıca, bu zarların oluşturulmasındaki bazı parametrelerin : protein derişiminin, protein lipid oranının, sıcaklığın ve bu membranların saklanma süresinin fotoaktivite üzerine etkisini incelemektir.

Halobacterium halobium Oesterhelt-Stoeckenius (5) yöntemine göre 37°C'de yedi günde üretilmiş, yedinci gün sonunda Bacteriorhodopsin'in (BR) saflaştırma işlemine geçilmiştir. Saflaştırma işlemleri 4°C'da soğuk odada Oesterhelt ve Stoeckenius yönteminde bazı değişiklikler yapılarak gerçekleştirilmiştir (4). Numunedeki BR'in protein miktarı Lowry (6) metodu ile bulunmuştur. Protein tayini spektrofotometrik olarak 570 nm'de absorbans ölçümü ile tekrarlanmış ve molar absorptive katsayısı $63000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ olarak kabul edilmiştir. BR'in molekül ağırlığı Laemli (7) metodu kullanılarak 26000 Dalton olarak bulunmuştur. Bu değer literatürle uyum halindedir (5). Bacteriorhodopsin'in fotoaktivitesi saflaştırıldıktan sonra BR fragmanlar halinde iken herhangi bir yapay zara tutturulmadan Yücel ve arkadaşları [4] yöntemiyle ölçülmüştür.

Bu araştırmada BR 0.15 mm kalınlığında, gözenek çapı 0.22 μm olan selüloz asetat zara tutturulmuştur. Bu zarların oluşturulmasında araştırılan parametreler, asetat zara sürülen lipid'in (Yumurta akı lesitini) BR'a oranı, zar üzerine tutturulan BR miktarıdır. BR'in zara tutturulması esnasında yönlendirme sağlamak amacı ile 30 dakika 25 (v/cm) statik elektrik alanı uygulanmıştır.

Proton pompalama ölçüm düzeneği Sediroğlu [8]'de ayrıntılı olarak verilmektedir. Ölçümler su jekteli iki bölmeli fleksiglasdan yapılan özel bir fotoelektra hücrede gerçekleştirilmiştir. İki bölme arasına BR tutturulmuş yapay zar yerleştirilmiştir. Işık kaynağından gelen ışınlar siyah bir plakadaki delikle odaklandırılarak fotoelektro hücresinin B bölümünün yan duvarındaki cam percereden geçerek 1 cm çapındaki yapay zar üzerine düşürülmüştür. Fotoelektro hücresinin her iki bölümünde de pH değişiklikleri kaydedilmiştir.

Deneylerde 0.15 M KCl içeren stok solüsyonu ve 1000 Watt lık ışık kaynağı kullanılmıştır. Lipid'in BR'a ağırlık oranı 0 ile 48 arasında, zar üzerinde tutturulan BR miktarı 0 ile $1.98 \cdot 10^{-9}$ mol arasında değiştirilmiştir. Deneyler 15,25,37°C'da tekrarlanmıştır. Zarlar 4°C da 1 ay stok solüsyonunda bekletildikten sonra tekrar fotoaktivite ölçümleri yapılmıştır. BR ihtiva etmeyen lipidli ve lipidstz selüloz asetat'la yapılan deneylerde ışığın etkisi gözlenmemiştir. Bütün zarlar hazırlandıktan sonra stok solüsyonunda, hücrede bir gece bekletilmiştir. Deneyler simtem karanlıkta dengeye ulaştıktan sonra yapılmıştır.

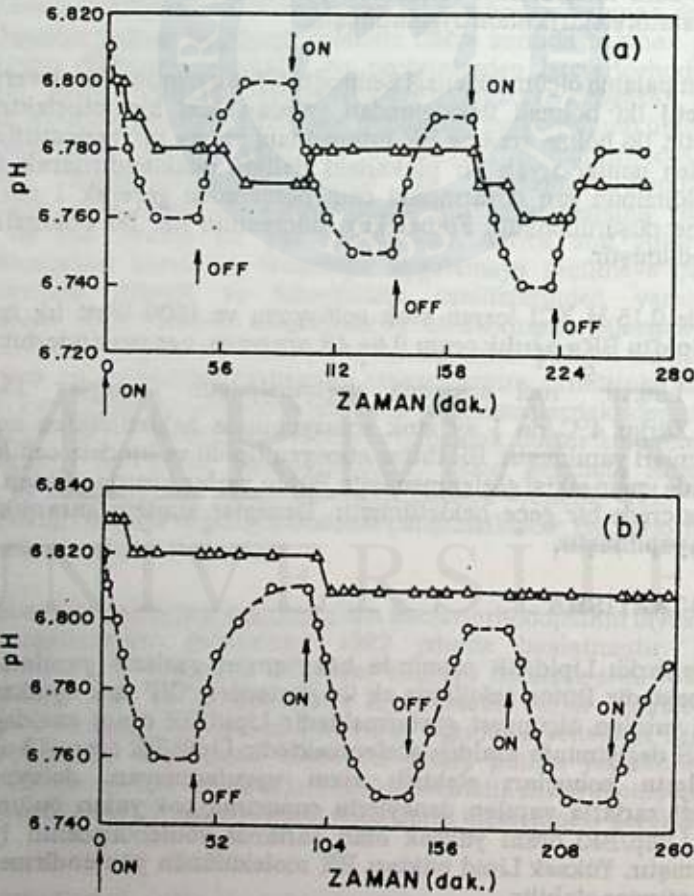
SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Şekil 1'de farklı Lipid/BR oranında hazırlanmış zarlarla yapılan deneylerin sonuçları verilmektedir. Bütün şekillerde ok ile gösterilen 'ON' ışık açıkken, 'OFF' ise ışık kapalı iken yapılan ölçümleri göstermektedir. Lipid/BR oranı azaldığı zaman A bölgesinde'ki pH değişiminin azaldığı gözlenmektedir. Lipid/BR oranı 48 olan zarlarla yapılan deneylerin sonuçları elektrik alanı uygulanmayan, dolayısıyla BR'in yönlendirilmediği zarlarla yapılan deneylerin sonucuna çok yakın bulunmuştur [8]. Bundan dolayı Lipid/BR) oranı yüksek olan zarlarda yönlendirmenin iyi olmadığı sonucuna varılmıştır. Yüksek Lipid miktarı BR molekülünün yönlendirme esnasında dönmesini zorlaştırıyor olabilir.

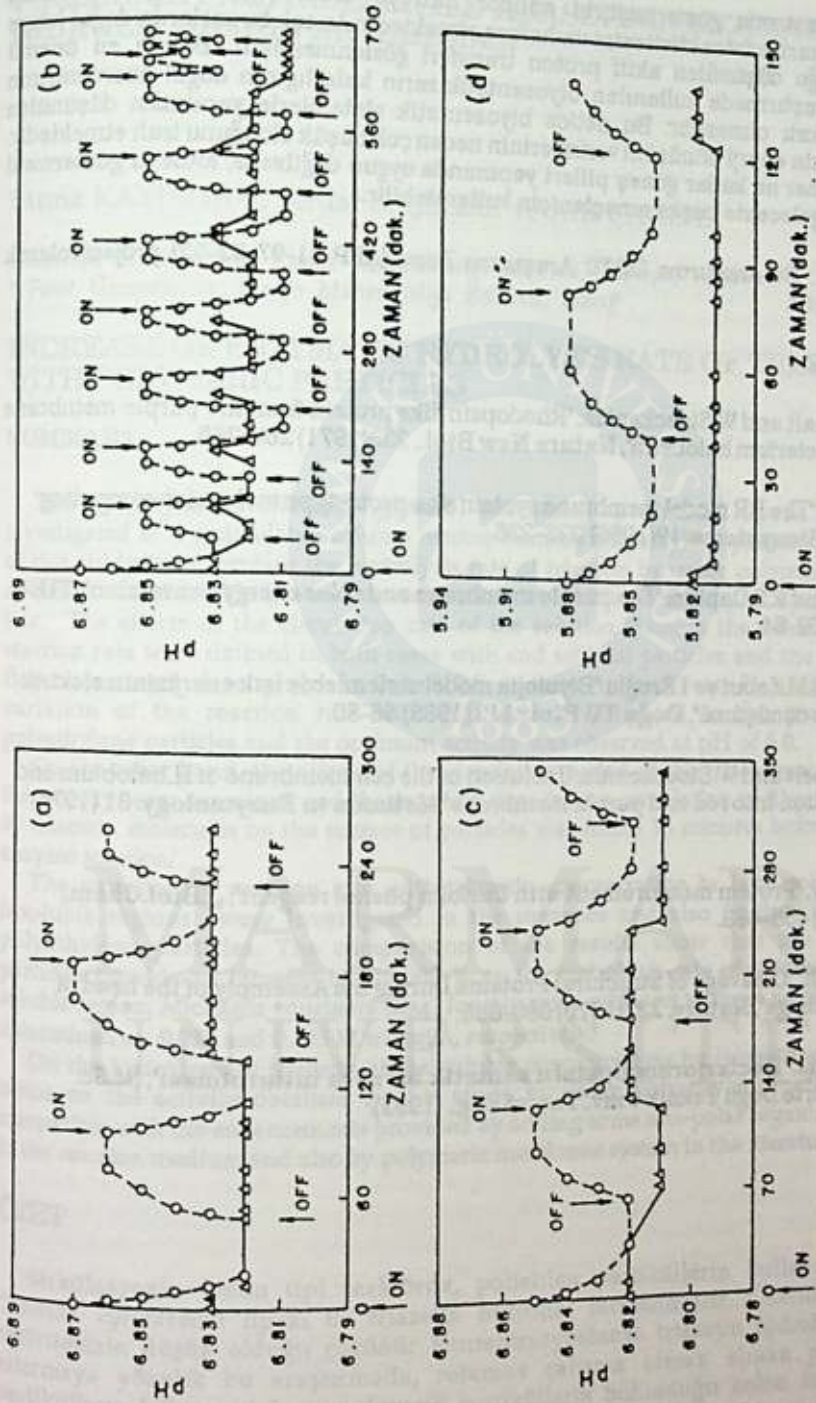
Şekil 2'de Lipid ihtiva etmeyen selüloz asetat BR tutturularak hazırlanan zarlarla yapılan deneylerin sonuçları verilmektedir. Şekil 2(a) ile 2(b) farklı BR miktarı ihtiva eden iki zarın performansının karşılaştırılmasını, Şekil 2(b) ve 2(c) farklı

sıcaklıkta yapılan deneyleri, Şekil 2(b) ile 2(d) ise aynı zarın ilk hazırlığındaki ve 1 ay sonraki performansını vermektedir. Bu deneyler sonucunda B bölümündeki pH'nın ışık ile değişimi hızının BR miktarı arttıkça azaldığı, sıcaklık düştükçe arttığı gözlenmiştir. Ayrıca sıcaklık arttıkça fototepkide azalmaktadır. Bir ay sonra tekrarlanan deneyler sonucunda BR'in fotoaktivitesini muhafaza ettiği görülmüştür. Bu süre zarfında, BR ihtiva eden zarlar stabilize olmaktadır. Farklı Lipid/BR oranı ve farklı BR miktarı ihtiva eden tüm zarlar bir ay sonra aynı fotoetkidi göstererek B bölümüne aynı miktarda, 2×10^{-10} mol proton vermekte veya tutmaktadır.

Şekil 1(a)-(b) ve Şekil 2(a) nin karşılaştırılmasından elde edilen en önemli sonuç zarların ihtiva ettiği lipid miktarına bağlı olarak A ve B bölümleri arasındaki pH farkının ($\Delta pH = pH_A - pH_B$) aydınlıkta ve karanlıktaki karakteristiğinin değişmesidir. Lipid, BR oranı 48 olan zarlarda ΔpH aydınlıkta pozitif, karanlıkta negatif değere ulaşmaktadır. Bu oran 12 olduğu zaman ise ΔpH dalma negatif olmakla beraber aydınlıkta mutlak değeri artmakta ve karanlıkta azalmaktadır. Lipid ihtiva etmeyen zarlarda ΔpH dalma pozitif olmakta aydınlıkta azalmakta karanlıkta artmaktadır.



Şekil 1. pH'nın zamana karşı değişimi, BR- 1.32×10^{-9} mol., T-25°C, a) Lipid/BR - 48, b) Lipid/BR - 12. (-o-B bölümü, -Δ-A bölümü)



Şekil 2. pH'nin zamana karşı değişimi. a) BR- 1.32×10^{-9} mol, T-25°C, b) BR- 0.66×10^{-9} , T-25°C, c) BR- 0.66×10^{-9} , T-37°C, d) b'deki deneyin 1 ay sonra tekrarı, T-25°C(-o-B bölgesi, -A-A bölgesi)

Bu araştırma göstermiştir ki millipor filtreye tutturulan BR ile hazırlanan biyosentetik zarlar fotoaktivitesini muhafaza etmektedir. Ancak bu zarlarda doğal hücre zarında olduğu düşünülen aktif proton transferi gözlenmemiştir. Bunun en önemli nedeni bu çalışmada kullanılan biyosentetik zarın kalınlığının doğal hücre zarının yaklaşık 20 katı olmasıdır. Bu netice biyosentetik sistemlerle yapılması düşünülen güneş pillerinin enerji dönüşüm verimlerinin neden çok düşük olduğunu izah etmektedir. Bu tür zarlar her ne kadar güneş pilleri yapımında uygun değilse de, fotoetik göstermesi bakımından gelecekte başka amaçlar için kullanılabilir.

TEŞEKKÜR : Bu araştırma ODTÜ Araştırma Fonu (AFP 91-07-02-02) projesi olarak desteklenmiştir.

KAYNAKLAR

1. D.Oesterhalt and W.Stoeckenius, 'Rhodopsin-like protein from the purple membrane of Halobacterium halobium', *Nature New Biol.*, 233(1971) 260-265.
2. F.T.Hong, 'The BR model membrane system as a proto-type molecular computing element' *Biosystems*, 19(1986) 223-236.
3. K.Singh and R.S.Caplan, 'The purple membrane and solar energy conversion', *TIBS*, 63(1980) 62-64.
4. M.Yücel, B.M.Zabut ve I.Eroğlu 'Biyolojik model sistemlerde ışık enerjisinin elektrik enerjisine dönüşümü', *Doğa TU Biol.*, 113(1989) 56-60.
5. D.Oesterhalt and W.Stoeckenius, 'Isolation of the cell membrane of H.halobium and fractionation into red and purple membrane' *Methods in Enzymology*, 31 (1974) 453-483.
6. O.H.Lowry, 'Protein measurement with the folin phenol reagent', *J.Biol.Chem.*, 193(1951) 453-483.
7. U.K.Laemli, 'Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the head of bacteriophage', *Nature*, 227(1970) 680-685.
8. V.Sediroğlu, 'Bacteriorhodopsinin sentetik bir zara tutturulması', (M.Sc. Thesis), Orta Doğu Teknik Üniv., Fac. of Eng., (1992).

POLİMERİK PARTİKÜLLER İLE TRIASETİNİN ENZİMATİK HİDROLİZ HIZININ ARTIRILMASI

Fatma KAYIRHAN, Serdar S. ÇELEBİ ve Arif ÇAĞLAR*

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Beytepe, Ankara
* Fırat Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Elazığ

INCREASE OF ENZYMATIC HYDROLYSIS RATE OF TRIACETIN WITH POLYMERIC PARTICLES

SUMMARY

The hydrolysis of triacetin (glycerol triacetate) by candidal lipase has been investigated in a recirculated column reactor contains polyethylene particles. The aim of this study is to increase the hydrolysis rate of triacetin by using polymer particles specially at the soluble triacetin concentrations at which the activity of lipase is very low. The effects of the circulation rate of the solution through the column on the reaction rate were defined in both cases with and without particles and the optimum flow rates were determined as 2 and 0.5 ml/min, respectively. In addition, the variation of the reaction rate with pH were investigated in the presence of polyethylene particles and the optimum activity was observed at pH of 6.0.

On the other hand, the effects of the circulation period of the triacetin solution on the activity were examined and the required time for the completion of film formation by triacetin molecules on the surface of particles was found 15 minutes before adding enzyme solution.

The variation of reaction rate with triacetin concentration in both soluble and insoluble regions were investigated in the presence and also in the absence of polyethylene particles. The comparison of the results show that the polymer particles provide an increase of 118-300 % on the hydrolysis rate of triacetin in the soluble region. Michaelis constants (K_M) for two cases with and without particles were determined as 0.080 and 0.125 M triacetin, respectively.

On the hydrolysis of triacetin at the soluble concentrations by lipase; the increase ratios on the activity obtained in this study by using polyethylene particles are compatible with the enhancements provided by adding some non-polar organic solvents to the reaction medium and also by polymeric membrane system in the literature.

ÖZET

Sirkülasyonlu kolon tipi reaktörde, polietilen partiküllerin kullanılmasıyla *Candida cylindracea* lipazı ile triasetin hidrolizi incelenmiştir. Özellikle lipaz aktivitesinin düşük olduğu konsantrasyonlarda triasetin hidroliz hızını artırmaya yönelik bu çalışmada, referans çalışma olarak alınan polietilen partiküllerin bulunmadığı ve polimerik partiküllerin bulunduğu kolon sisteminde çözelti sirkülasyon hızının reaksiyon hızına etkisi ayrı ayrı incelenmiş ve optimum değerler saptanmıştır. Referans çalışmada en yüksek reaksiyon hızı 0.5 ml/dak sirkülasyon hızında gözlenirken, polietilen partiküllerin bulunduğu sistemde 2 ml/dak'da gözlenmiştir. Ayrıca reaksiyon hızının pH ile değişimi partiküllü durumda incelenmiş ve optimum pH 6.0 olarak bulunmuştur.

Araştırmanın bir bölümünde enzim ilavesinden önce triasetin çözeltisinin polietilenli kolon sisteminde sirkülasyon süresinin reaksiyon hızına etkisi incelenmiş ve triasetin moleküllerinin hidrofobik partiküller yüzeyinde film oluşturması için gerekli süre 15 dakika olarak belirlenmiştir.

Referans ve polietilen partiküller içeren çalışmalarda triasetin konsantrasyonu ile reaksiyon hızı değişimi çözünür ve çözünmez (emülsiyon) bölgelerde incelenmiş, çözünür bölgede partikül kullanımıyla reaksiyon hızında sağlanan artış oranları % 118-300 olarak bulunmuştur. Triasetinin çözünür olduğu konsantrasyonlarda, polietilen partiküllü ve partikülsüz durumlarda Michaelis sabitleri sırasıyla 0.080 M ve 0.125 M triasetin olarak saptanmıştır.

Sonuç olarak, sulu ortamda triasetinin çözünür konsantrasyonlarda lipaz enzimiyle hidrolizinde, polietilen partiküllerin kullanılmasıyla sağlanan reaksiyon hızı artış oranları, literatürde ortama suyla karışmayan organik çözücülerin eklenmesiyle ve polimerik membran sistemlerinin kullanılmasıyla elde edilen artış oranlarıyla karşılaştırılabilir düzeydedir.

GİRİŞ

Lipazlar, hidrofobik arayüzelerde adsorpsiyonla aktif yapı kazandıklarından, yağ-su emülsiyon sistemlerinde yüksek reaksiyon hızı (aktivite) verirler. Ancak, triasetinin lipazla hidrolizinde olduğu gibi basit yağların suda çözünen konsantrasyonlarında düşük aktivite gözlenmektedir. Bu substratın suda çözünür konsantrasyonlarında, lipaz enziminin aktivitesini arttırmaya yönelik önceki çalışmalarda, ortama suyla karışmayan organik çözücüler eklenerek emülsiyon sistemleri oluşturulmuş ve aktivite artışları sağlanmıştır [1].

Bu çalışmada ise triasetinin çözünür konsantrasyonlarında özellikle kritik misel konsantrasyonunun (CMC) altında *Candida cylindracea* lipazı ile hidrolizinde, hidrofobik karakterli polietilen partiküller kullanılarak, partikül yüzeyinde yağ-su arayüzeyi oluşumuyla aktivite artışı amaçlanmıştır.

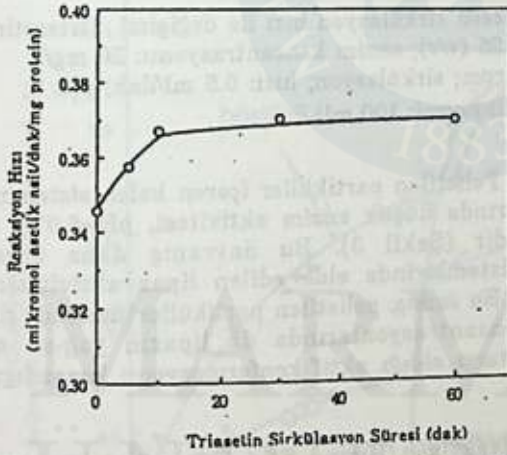
DENEL BÖLÜMÜ

Deney Sistemi: Ön çalışmalar sonucu triasetinde çözünmemesi ve yüksek aktivite sağlaması nedeniyle polietilen partiküller model polimer olarak seçilmiştir. Lipaz ve triasetin içeren sulu reaksiyon ortamı bir peristaltik pompa yardımıyla rezervuardan alınarak polimerik partiküllerin bulunduğu paslanmaz çelik kolondan (D= 0.7 cm; L= 11.2 cm) sirküle edilir. Rezervuar ve kolon sistemi sabit sıcaklık banyosu içindedir. Reaksiyon, pH-metre, pH-kontrol ünitesi ve peristaltik pompadan oluşan pH-stat sistemi ile izlenir. Reaksiyon sırasında yağ asiti oluşumu ortam pH'ını düşürür. Bu nedenle pH kontrolünün yapıldığı rezervuara, oluşan asetik asite eşdeğer miktarda NaOH çözeltisi otomatik olarak eklenir. Zamana karşı alınan NaOH çözeltisi miktarları reaksiyon hızının saptanmasında kullanılır.

Substrat Çözeltisi: Reaksiyon ortamı değişik konsantrasyonlarda (% 0.125-12, v/v) triasetin (Merck, % 99, Almanya) içerir. Sulu çözeltide ayrıca 0.137 M NaCl, 3.75×10^{-3} M CaCl₂. 4 H₂O ve 2.5×10^{-3} M sodyum asetat bulunmaktadır.

Enzim Çözeltisi: % 21.5 protein (w/w) içeren *Candida cylindracea* lipazı (Meito Sangyo, Japonya) pH'ı 6 olan 0.01 M fosfat tamponunda 3 mg protein/l olacak şekilde çözülür.

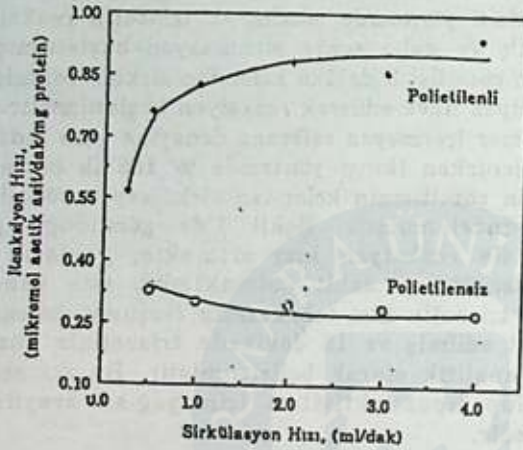
Poliyeten partiküller içeren geri döngülü kolon tipi reaktör ile hidroliz hızını artırmaya yönelik çalışmalarda; triasetinin polimerik partiküller yüzeyindeki adsorpsiyonu (film oluşumu) dikkate alınarak deneyin başlatılmasında iki farklı yöntem kullanılmıştır. Birinci yöntemde, enzim ve triasetin reaksiyon ortamına aynı anda ilave edilmiş ve daha sonra sirkülasyon başlatılmıştır. İkinci yöntemde ise, önce triasetin çözeltisi 3 dakika kolondan sirküle edilmiş ve daha sonra rezervuar çözeltisine lipaz ilave edilerek reaksiyon başlatılmıştır. Bu deneylerde, birinci yöntemde polimer içermeyen referans deneyine göre hidroliz hızında % 99.7'lik bir artış gözlenirken ikinci yöntemde % 165'lik bir artış saptanmıştır. Bu nedenle triasetin çözeltisinin kolondan sirkülasyon süresi ile reaksiyon hızındaki değişimi incelenmiştir. Şekil 1'de görüldüğü gibi sirkülasyon süresinin artması ile reaksiyon hızı artmakta, yaklaşık 15 dakikalık sirkülasyon süresinden sonra sabit kalmaktadır. Öte yandan poliyeten partiküllerin yüzeyinde triasetin film tabakasının oluşumu, kolondan triasetin çözeltisi geçirilerek test edilmiş ve 15 dakikada triasetinin yüzeye adsorpsiyonunun tamamlandığı analitik olarak belirlenmiştir. Bu iki sonuç birbirini destekler nitelikte olup lipaz aktivitesi için yağ-su arayüzeyi oluşumunun önemini göstermektedir.



Şekil 1. Triasetin çözeltisinin kolondan sirkülasyon süresinin reaksiyon hızına etkisi (triasetin konsantrasyonu % 0.25 (v/v); enzim konsantrasyonu: 20 mg/l; karıştırma hızı: 500 rpm; sirkülasyon hızı: 0.5 ml/dak; pH: 6; T: 35°C; toplam çözelti hacmi: 100 ml).

Cözelti Sirkülasyon Hızının Reaksiyon Hızına Etkisi: Sirkülasyonlu kolon tipi reaktörde, poliyeten partiküllerin bulunmadığı referans çalışmalarda, sirkülasyon hızının artmasıyla reaksiyon hızında hafif bir azalma gözlenmektedir. Akış hızının artışıyla kolon içerisinde ve bağlantı borularındaki kayma kuvvetleri artmakta, bu durum azda olsa enzimin aktivite kaybına yol açmaktadır. Poliyetenli kolon sisteminde ise sirkülasyon hızı ile reaksiyon hızında artış görülmekte, 2 ml/dak'dan sonra reaksiyon hızı sabit kalmaktadır (Şekil 2). Kolonda pH kontrolü yapılamadığından düşük sirkülasyon hızlarında alıkonma süresi fazla olduğundan kolon içindeki pH 4.4'e kadar düşmektedir. Bu pH değerinde lipaz aktivitesi düşük olduğundan düşük reaksiyon hızları gözlenmektedir. Sirkülasyon hızının artmasıyla kolondaki alıkonma süresi kısaldığından geçiş sırasında fazla bir pH değişimi

olmamakta, optimum pH 6.0 civarında yüksek aktivite elde edilmektedir. Ayrıca yüksek sirkülasyon hızlarında kolon içerisindeki kayma kuvvetleri etkisinin boş kolona göre çok daha fazla olmasına rağmen reaksiyon hızında azalma gözlenmemesi, lipaz enziminin partikül üzerindeki triasetin filmine adsorplanması sonucu yapısını korumasıyla açıklanabilir.



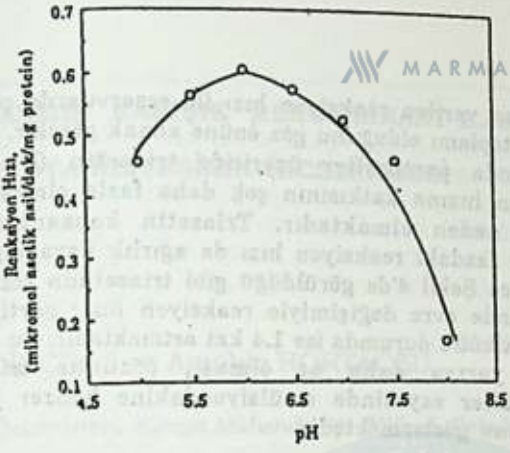
Şekil 2. Reaksiyon hızının çözelti sirkülasyon hızı ile değişimi (triasetin konsantrasyonu % 0.25 (v/v); enzim konsantrasyonu: 20 mg/l; karıştırma hızı: 500 rpm; sirkülasyon hızı: 0.5 ml/dak; pH: 6; T: 35°C; toplam çözelti hacmi: 100 ml).

pH'nin Reaksiyon Hızına Etkisi: Polietilen partiküller içeren kolon sisteminde düşük ve yüksek rezervuar pH'larında düşük enzim aktivitesi, pH=6.0'da ise maksimum aktivite görülmektedir (Şekil 3). Bu davranış daha önceki çalışmalarda yağ-su emülsiyon sistemlerinde elde edilen lipaz aktivitesinin pH'la değişimine çok benzerdir [1]. Bu sonuç, polietilen partiküller üzerinde film oluşumuyla çözünür triasetin konsantrasyonlarında da lipazın yağ-su ara yüzeyinde çözünmez substratlara karşı aldığı aktif konformasyonu kazandığını göstermektedir.

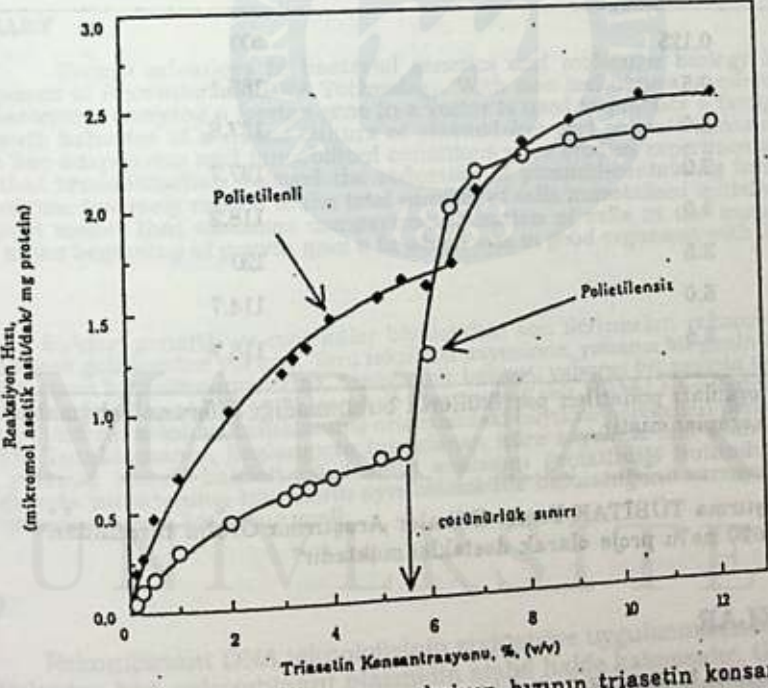
Triasetin Konsantrasyonunun Reaksiyon Hızına Etkisi: Partikül içermeyen kolon sistemindeki referans deneylerde, hidroliz hızının triasetin konsantrasyonu ile değişimi Şekil 4'de verilmiştir. Çözünür ve çözünmez bölgelerde reaksiyon hızındaki değişim klasik Michaelis-Menten kinetiğine uymaktadır.

Triasetinin çalışılan koşullarda kritik misel konsantrasyonu (CMC) % 3.5-3.7 (v/v)'dir. Bu konsantrasyon civarında reaksiyon hızında ani bir artış gözlenmemiştir. Verilerin değerlendirilmesiyle kritik misel konsantrasyonlarında Michaelis-Menten sabitleri sırasıyla 0.124 ve 0.126 M triasetin olarak bulunmuştur. Bu değerlerin çok yakın olması misel oluşumuyla lipazın substratı triasetine karşı ilgisinin değişmediğini ortaya koymaktadır.

Polietilen partiküller içeren kolon sisteminde, triasetin konsantrasyonu artışıyla hidroliz hızında gözlenen artış, aynı koşullarda partikülsüz durumda gözlenenden çok farklıdır (Şekil 4). Bu veriler Lineweaver-Burk çizimiyle değerlendirilmiş ve çözünür bölgedeki Michaelis sabiti 0.080 M triasetin olarak bulunmuştur. Bu değer partikülsüz durumdaki K_M değerine göre daha küçük olması lipazın yağ-su arayüzeyinde adsorpsiyonuyla aldığı konformasyonun



Şekil 3. Reaksiyon hızının pH ile değişimi (triasetin konsantrasyonu % 1 (v/v); enzim konsantrasyonu: 20 mg/l; karıştırma hızı: 500 rpm; sirkülasyon hızı: 0.5 ml/dak; pH: 6; T: 35°C).



Şekil 4. Triasetin hidrolizinde reaksiyon hızının triasetin konsantrasyonu ile değişimi : enzim konsantrasyonu: 20 mg/l; karıştırma hızı: 500 rpm; sirkülasyon hızı: 0.5 ml/dak; pH: 6; T: 35°C).

reaksiyon vermek için daha uygun olduğu görüşünü desteklemektedir. Çizelge l'de görüldüğü gibi reaksiyon hızında bu yolla özellikle triasetin çözünür konsantrasyonlarda % 118-300 oranında artış sağlanmaktadır. Polietilen partiküllerin kullanılmasıyla sağlanan artış oranları, literatürde ortama suyla karışmayan organik çözücülerin eklenmesiyle (% 250-360) ve polimerik membran sistemlerinin kullanılmasıyla elde edilen artış oranlarıyla karşılaştırılabilir düzeydedir [1-3]. Artış oranlarını tartışabilmek için, partiküllü durumda gözlenen reaksiyon hızının, kolon içinde partikül yüzeyindeki filmde

adsorplanmış enzim tarafından verilen reaksiyon hızı ile rezervuarda çözünür fazda yürüyen reaksiyon hızı toplamı olduğunu göz önüne almak gerekir. Düşük triasetin konsantrasyonlarında partiküller üzerinde triasetin filmindeki reaksiyonun toplam reaksiyon hızına katkısının çok daha fazla olması artış oranının yüksek olmasına neden olmaktadır. Triasetin konsantrasyonu artışıyla rezervuarda çözünür fazdaki reaksiyon hızı da ağırlık kazandığından artış oranı düşmektedir. Ayrıca Şekil 4'de görüldüğü gibi triasetinin çözünmez konsantrasyonlarına geçildiğinde evre değişimiyle reaksiyon hızı; partikülsüz durumda 2.8 kat artarken, partiküllü durumda ise 1.4 kat artmaktadır. Bu artışın partiküllü sistemde yarı yarıya daha az olması, çözünür triasetin konsantrasyonlarında partiküller sayesinde emülsiyondakine benzer yağ-su arayüzeylerinin oluşturulduğunu göstermektedir.

Çizelge 1. Triasetin Konsantrasyonunun Hidroliz Hızındaki Artışa Etkisi.

Triasetin Konsantrasyonu (% , v/v)	Hidroliz Hızındaki Artış (%)*
0.125	300
0.5	188.1
1.0	127.8
2.0	127.7
3.0	118.2
3.5	120
5.0	114.7
5.5	118.7

* Artış oranları polietilen partiküllerin bulunmadığı referans çalışmalara göre hesaplanmıştır.

"Bu araştırma TÜBİTAK-Temel Bilimler Araştırma Grubu tarafından TBAG-1020 no'lu proje olarak desteklenmektedir"

KAYNAKLAR

1. T. Uçar, H.İ. Ekiz, S.S. Çelebi, A. Çağlar, The Effects of Solvents on the Kinetics of Free and Immobilized Lipase, Biocatalysis in Organic Media (Ed. C. Laane, J. Tramper and M.D. Lilly), Elsevier, Science Publishers B.V., Amsterdam (1987) 381-386.
2. R.P. Guit, et.al., Lipase Kinetics: Hydrolysis of Triacetin by Lipase from Candida cylindracea in a Hollow Fiber Membrane Reactor, Biotech. and Bioeng., 38 (1991) 727.
3. T. Hageshi, Y. Ikada, Lipoprotein Lipase Immobilization onto Polyacrolein Microspheres, Biotech. and Bioeng., 36 (1990) 593.

TUTUKLANMIŞ KARIŞIK REKOMBİNANT *E.coli* KÜLTÜRLERİNDE PLAZMİD STABİLİTESİNİN İNCELENMESİ

Vıldan DİNÇBAŞ ve Amable HORTAÇSU

Boğaziçi Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Bebek-İstanbul-Türkiye.

A STUDY OF PLASMID STABILITY IN IMMOBILIZED MIXED CULTURES OF RECOMBINANT *E.coli*

SUMMARY

Recent advances in bacterial genetics and molecular biology led to the development of Recombinant DNA Technology. With new techniques, a microorganism like a bacterium carrying a foreign gene in a vector is used to produce a foreign protein. The growth behavior of a mixed culture of plasmid-free and plasmid-containing *E.coli* cells in free suspension and immobilized conditions were studied experimentally. It was found that immobilization delayed the reduction of plasmid-containing fraction for a period of time inversely related to the total number of cells immobilized initially. A simple structured model that assumes compartmentalization of cells in the immobilization matrix at the beginning of growth gave a fit which was in good argument with the data.

ÖZET

Bakteri genetiği ve moleküler biyolojideki son ilerlemeler, rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesine yol açtı. Yeni teknikler sayesinde, yabancı bir genin bulunduğu vektörü taşıyan bir mikroorganizma, örneğin bir bakteri, yabancı bir protein üretmek için kullanılmaktadır. Plazmid YE_p352 içeren ve içermeyen *E.coli* HB101 hücrelerinden oluşan karışık kültürlerin askılı ve tutuklanmış ortamlardaki büyüme hareketleri deneysel olarak incelendi. Tutuklamanın, başlangıçta tutuklanan hücre sayısı ile ters orantılı bir süre içinde plazmid içeren bakteri yüzdesinin azalmasını geciktirdiği bulundu. Büyüme başlangıcında tutuklanmış hücrelerin ayrı bölmelerde bulunduğunu varsayan basit bir model verilerle uyumlu bir sonuç verdi.

GİRİŞ

Rekombinant DNA teknolojisinin endüstriye uygulanmasındaki başlıca problemlerden biri, rekombinant plazmidin stabil halde kalmasıdır. Uzun süreli fermentasyonlarda plazmid içeren mikroorganizma yüzdesi azalmaktadır. Bu durumun şimdilik bilinen iki sebebi vardır: spesifik bir genin klonlandığı plazmid zamanla hücrelerden kaybolmaktadır, veya, plazmid içermeyen hücreler, diğerlerine oranla daha hızlı büyümekte, böylece ortamda çoğalmaktadırlar. Rekombinant plazmidlerin stabilitelerinin artırılması için bazı yöntemler önerilmektedir (1). Bununla birlikte, bu yaklaşımların çoğu ya plazmidin yapısında bazı değişiklikler yaptırmayı gerektirir, veya endüstriyel kullanımda bazı sakıncaları olabilir; fermentasyon ortamına, plazmid-içeren bakteri seçimi için antibiyotik ilave edilmesi gibi.

Rekombinant plazmid içeren hücrelerin matrisler içine tutuklanması, stabiliteyi artırıcı bir method olarak kullanılabilir (2,3,4,5). Tutuklanmanın plazmid stabilitesine olan bu etkisini anlamak için, YEp 352 plazmid vektörünü içeren ve içermeyen *E.coli* HB101 hücrelerinden oluşan karışık kültür, besi ortamında, askıda ve ayrıca immobilize edilmiş olarak büyütüldü. Deneylerde gözlenen stabiliteyi açıklayacak basit bir model kullanıldı.

DENEL BÖLÜM

Organizma ve plazmid

Plazmid vektör YEp352 içeren ve içermeyen *Escherichia coli* HB101 suşu, Manchester Üniversitesinden Prof. Ferda Mavituna'nın hediyesidir. YEp352 plazmid, 5.2 kb büyüklüğündedir. Ampisiline dayanıklılık geni (Amp^R) ve *lac* operonunun promotör ve *lacZa* bölgeleri bulunmaktadır.

Besi Kültürü

E.coli hücreleri, $-70^{\circ}C$ deki gliserin solüsyonunda saklandı. Deneylerde kullanılan besi ortamı M9 Minimal Medium'dur. Bir litre distile ve deionize suda: 1ml 1M $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1ml 1M $CaCl_2$, 10 ml 20%lik glukoz, 20mg L-leucine, 20 mg L-proline, 1ml 1M Thiamine-HCl, 6g Na_2HPO_4 , 3g KH_2PO_4 , 1g NH_4Cl , 0.5g NaCl bulunmaktadır. Hücrelerin büyüme hızlarını arttırmak için glukoz ve aminoasitlerin miktarı iki katına çıkarıldı (M9+).

Askıda Hücre Kültürleri

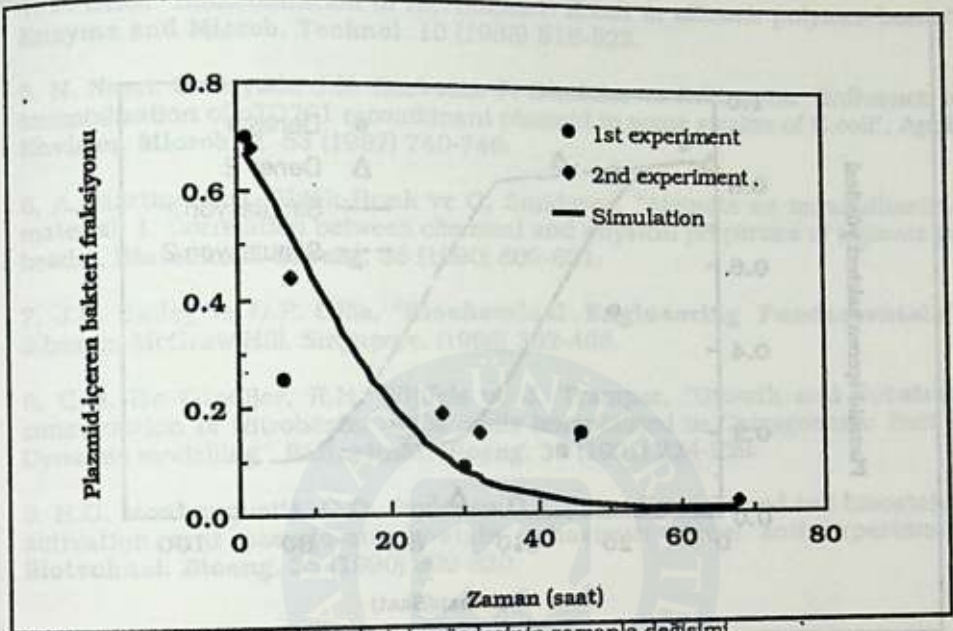
50 ml lik sıvı ortam içeren iki erlene, paralel olarak 0.1 ml lik ekim yapıldı. Her iki erlen $38.5^{\circ}C$ de , çalkalayıcıda bırakıldı. Belli zamanlarda alınan numuneler , 0.85% lik steril saline ile seyreltikten sonra petri kaplarına ekildi. Minimum 150 koloni, kadife bir bez ile ampisilinsiz LB ağardan, ampisilinliye transfer edildi. Plazmid-içeren bakteri yüzdesi böyle bulunmuştur.

Immobilize Olmuş Hücre Kültürleri

Immobilizasyon, Ca-aljinat jel topları içine yapılmıştır. Kullanılan method Martinsen tarafından tarif edilene benzemektedir(6). Yaklaşık 1000 top içeren iki erlen $38.5^{\circ}C$ de , çalkalayıcıda bırakıldı. Her numune için 10 top alınmıştır. 50mM lik Na-citrate solüsyonu, Ca-aljinatı ağını çözmek için kullanılmıştır. Plazmid içeren bakteri yüzdesi yukarıda belirtildiği gibi yapılmıştır.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Bakteriler askılı ve kesikli ortamda büyütüldüklerinde, her iki bakteri aynı sübstrat için yarışmaktadır. Bu durumda plazmidsiz bakteriler, büyüme hızları daha yüksek olduğundan, daha çabuk çoğalmakta, böylece de popülasyondaki yüzdeleri zamanla artmaktadır. Şekil 1 de deney verileri gösterilmiştir.



Şekil 1. Askılı ortamda P+ hücrelerinin yüzdesinin zamanla değişimi.

Karışık kültürün Ca-aljinat ağ yapısı içine immobilize olması, kesikli ortamda büyüdüklerinde, bakteri popülasyonunun kinetik özelliklerinde gözle görülür bir farklılık yaratmıştır. Şekil 2 de görüldüğü gibi, başlangıçta tutuklanan hücre sayısına göre 10-40 saatlik süreler boyunca plazmid-içeren bakteri yüzdesi hemen hemen sabit kalmıştır. Hücrelerin ayrı bölmelerde büyümeleri (compartmentalization), askılı ortamda hemen başlayan besi için yarışmalarını geçiktirmektedir. Böylece iki tür bakteri birbirlerinden etkilenmeden büyüebilecekleri bir ortam bulmaktadır. Hücre sayısı belli bir miktarda geçtikten sonra ağın içindeki boşluklar genişlemekte, böylece bu ayrılma ortadan kalkmaktadır. Bu zamandan sonra immobilize sistem, askılı sistem gibi davranır ve popülasyon karışık bir kültür olarak devam eder.

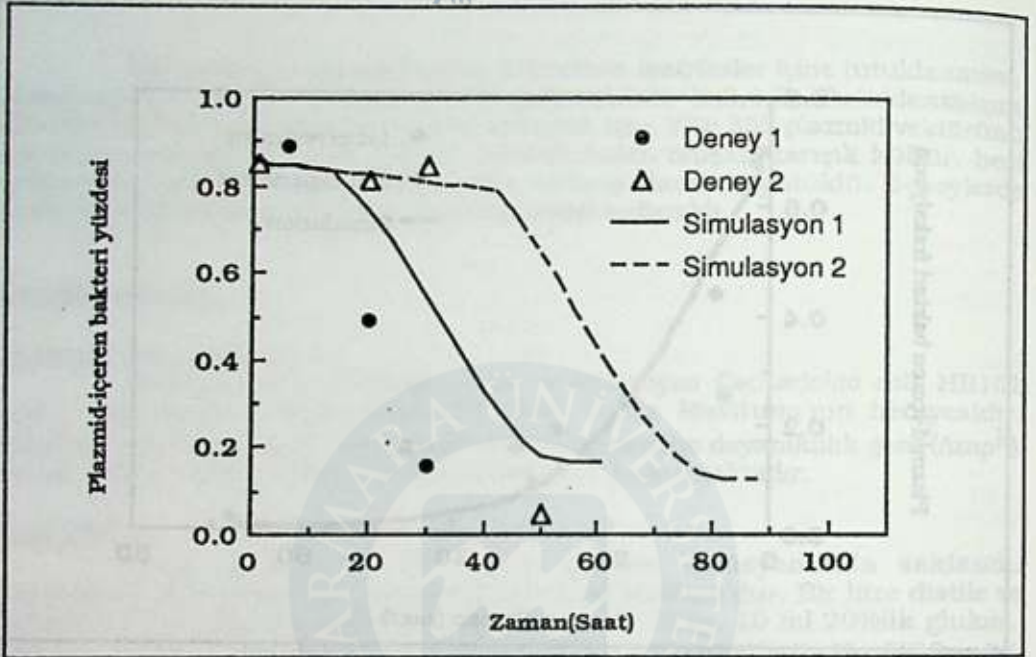
Tablo 1

a. Plazmid içeren ve içermeyen hücrelerin askılı sistemdeki bazı özellikleri

bakteri türü	μ_{max} (hr ⁻¹)	K_s (g/l)	Y_x (hücre sayısı/gr)
P+	0.187	0.3	1×10^{10}
P-	0.288	0.7	1.2×10^{11}

b. Plazmid içeren ve içermeyen hücrelerin immobilize sistemdeki bazı özellikleri

bakteri türü	μ_{max} (hr ⁻¹)	K_s (g/l)	Y_x (hücre sayısı/gr)
P+	0.187	0.5	1×10^{10}
P-	0.288	1.0	1.2×10^{11}



Şekil 2. İmmobilize olmuş bakteri popülasyonunun plazmid yüzdesinin zamanla değişimi. Başlangıçtaki hücre miktarı ; deney 1: 10^8 hücre/mL; deney2: 10^6 hücre/mL.

Benzeştirme (Simulation) için kullanılan model Monod'un büyüme kinetiği modelinin aynıdır (7). Sadece plazmid-içeren ve içermeyen iki tür için ayrı ayrı yazılmıştır. Modelde kullanılan değişkenler Tablo 1 de verilmiştir. İmmobilizasyon yapıldığında hücrelerin birbirlerinden ayrı büyümeleri, hücre sayısı 5×10^8 hücre/mL ye ulaşıncaya kadar sürmektedir. De Gooijer, K-carrageenan toplarına yapılan immobilizasyondaki hücre taşmasına sebep olan maksimum hücre miktarını 10×10^9 hücre/mL olarak (8), Monbouquette ise 5×10^{10} olarak bildirmiştir(9). Glukozun difzyonu taşıyıcı matriks içinde daha zor olduğundan kütle transferini limitlemektedir. Doymuşluk sabiti K_s tutuklanmış ortamın modellenmesi sırasında daha yüksek değer almaktadır.

KAYNAKLAR

1. D.D.Y. Ryu ve S.B. Lee, "Development and optimization of recombinant fermentation processes", *Horizons of Biochemical Engineering*, 11 (1987) 56-68.
2. S. Sayadlı, N. Nasrî, J.N. Barbotin ve D.Thomas. "Effect of enviromental growth conditions on plasmid stability, plasmid copy number and cathocol 2,3-dioxygenase activity in free and immobilized E.coli cells." *Biotechnol. Bioeng.* 33 (1989) 801-806.
3. T.K. Walls ve J.L. Gainer. "Retention of plasmid bearing cells by immobilization" *Biotechnol. Bioeng.* 34 (1989) 717-722.

4. P. Oriol. "Immobilization of recombinant E.coli in silicone polymer beads", **Enzyme and Microb. Technol.** 10 (1988) 518-523.

5. N. Nasri, S. Sayadi, J.N. Barbotin, P. Dhulster ve D.Thomas. "Influence of immobilization of pTG201 recombinant plasmid in some strains of E.coli", **Appl. Environ. Microbiol.** 53 (1987) 740-746.

6. A. Martinsen, G. Skjåk-Bræk ve O. Smidsrød, "Alginate as immobilization material: 1. Correlation between chemical and physical properties of alginate gel beads", **Biotechnol. Bioeng.** 35 (1990) 609-621.

7. J.E. Bailey ve D.F. Ollis, "**Biochemical Engineering Fundamentals**", 2.basım, McGraw Hill, Singapore. (1986) 382-403.

8. C.D. De Grootjer, R.H. Wijffels ve J. Tramper, "Growth and substrate consumption of *Nitrobacter agilis* cells immobilized in Carrageenan: Part 1. Dynamic modelling", **Biotechnol. Bioeng.** 38 (1991) 224-229.

9. H.G. Monbouquette, G.D. Sayles ve D.F. Ollis, "Immobilized cell biocatalyst activation and pseudo-steady-state behaviour: Model and experiment" **Biotechnol. Bioeng.** 35 (1990) 609-820.

4. P. ÖZEL, Immobilization of *Aspergillus niger* cells in silicone polymer beads. *Enzyme and Microb. Technol.* 10 (1989) 515-523.

5. M. NARİT, S. ÖZAYDIN, A.İ. BAKIÖZ, P. BAKIÖZ ve D. İZGÖR, Influence of immobilization of *Aspergillus niger* cells on the production of α -glucosidase. *Environ. Microbiol.* 23 (1991) 740-745.

6. A. MURRAY, O. SAKIÖZ, S. ÖZAYDIN ve G. SAKIÖZ, Influence of immobilization on the activity of α -glucosidase and physical properties of alginate gel beads. *Environ. Microbiol.* 23 (1991) 609-611.

7. J.E. BARRY ve D.P. O'FLYNN, *Biocatalytic Engineering Fundamentals*. Chapman and Hall, Singapore (1988) 382-403.

8. G.D. DE GROOT, R.H. WOLFFS ve A. TERPSTRA, Growth and substrate consumption of *Aspergillus niger* cells immobilized in Carboxymethyl-Dextran in defined. *Biotechnol. Bioeng.* 25 (1983) 225-230.

9. H.G. KONDOPOLAKIS, S. ÖZAYDIN ve D.P. O'FLYNN, Immobilized cell biocatalysis: activation and performance of a *Aspergillus niger* model and experimental. *Biotechnol. Bioeng.* 25 (1983) 605-620.



MARMARA ÜNİVERSİTESİ

ZOOGLOEA RAMİGERA'NIN BÜYÜME KİNETİĞİNİN MODELENMESİ

Haluk BEYENAL ve Abdurrahman TANYOLAÇ

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Beytepe-Akara-Türkiye

MODELLING OF GROWTH KINETICS OF ZOOGLOEA RAMİGERA

SUMMARY

Zoogloea ramigera is used for production of several enzymes (thiolase, alpha-chytrypsin), biodegradable polymers (polybeta-hydroxibutyrate) and recovery of heavy metals in wastewaters. *Zoogloea ramigera* is increase performance of wastewater treatment in activated sludge process by agglomeration by the way of adhesion to suspended solids.

In this study, growth kinetics of *zoogloea ramigera* modelled with nonlinear regression by using limiting substrates. The model gives effects of limiting substrates on growth of *zoogloea ramigera*.

ÖZET

Zoogloea ramigera çeşitli enzimlerin (thiolase, alpha-chytrypsin), biyolojik olarak indirgenebilen polimerlerin (poly-beta-hydroxibutyrate) üretiminde ve atıksularda metal gideriminde kullanılmaktadır. Bunlara ek olarak, *zoogloea ramigera* atık su arıtımında kullanılan aktif çamurda topaklaşarak çamurun çökelme niteliğini artırmakta ve çözünmeyen asılı katılara çok hızlı bir şekilde yapışarak sistemin arıtım performansını yükseltmektedir.

Bu çalışmada *zoogloea ramigera* nın büyümesinde etkin olan substratlar belirlenerek, bu substrat derişimlerinin fonksiyonu olan bir biyokinetik model nonlincer regrasyon yapılarak oluşturulmuştur. Model, kültürün büyümesinde kısıtlayıcı olan karbon, azot ve oksijen kaynaklarına ait substrat derişimlerinin kültürün özgül büyüme hızına etkilerini vermektedir.

GİRİŞ

Mikroorganizmalar büyümede temel olarak karbon azot ve oksijen elementleri kullanılmaktadır[1]. Bu elementleri içeren substratlar büyümede etkindir. Literatürde bu güne kadar mevcut çalışmaların bir çoğunda bu etki tek bir substrat için (diğer substrat derişimleri kısıtlama yapmıyacak kadar büyük tutularak) verilmiştir [1,2]. Oysa mikroorganizmanın biyofilm halinde büyütüldüğü durumlarda film içinde büyümede etkin tüm substratlar kısıtlayıcı hale gelebilmektedir[3].

Sürekli sistemde kinetik çalışmada temel substratların birinin derişiminin değiştirilip diğerinin sabit kalması mümkün değildir. Çalışmalarda zamanla oldukça farklılaşan substrat derişimleri olmaktadır. Bu derişim sonucu birden fazla substrat derişimi kısıtlayıcı hale gelmektedir. Bu durumlarda büyümenin doğru olarak ifade edilebilmesi için tüm kısıtlayıcı substratların büyümeye olan etkisinin verildiği bir biyokinetik ifade oluşturulmalıdır.

Büyümede kısıtlayıcı olan substratların ortamda olmadığı durumlarda mikroorganizma büyüyemez. Fakat bazı substratlar mikroorganizmanın büyümesini artırmaktadır[1]. Bu substratların ortamda bulunmadığı durumda mikroorganizma büyüyememekte fakat bulunduğu durumda büyüme hızı üzerinde artırıcı etkiye bulunmaktadır.

Zoogloea ramigera için karbon azot ve oksijen kaynakları büyümeyi kısıtlayıcı olmaktadır. Bu substratların besi ortamında bulunmaları büyümeyi arttırmakta ve ortamda bulunmadıkları durumda kültür üreyememektedir.

Bu çalışmada saf bir kültür olan *Zoogloea ramigera* kullanılarak, büyümeyi kısıtlayıcı karbon azot ve oksijen kaynakları olan substrat derişimlerinin fonksiyonu olan nonlineer bir biyokinetik model türetilmiştir.

DENEYSSEL ÇALIŞMA

Deneylerde kültür için hazırlanan besi ortamında karbon kaynağı olarak glukoz, azot kaynağı olarak amonyum klorür ve oksijen kaynağı olarak da besin ortamına aktarılan çözünmüş oksijen kullanılmıştır. Büyüme için gerekli olan, fakat kısıtlayıcı olmayacak miktarlarda fosfat ve içerisinde birçok mineralin bulunduğu maya özütü ve bakteriyolojik pepton da besi ortamına eklenmiştir.

Öncelikle kültürün çalkalayıcılı su banyosundaki erlenlerde büyütülmesi tasarlanmıştır. Bu amaçla sıcaklık, pH, glukoz, amonyumklorür ve çalkalama hızları değişken alınarak Box-Wilson deney modellemesi[4] yapılmış ve belirlenen koşullarda 44 erlen deneyi zamanla pH, glukoz, amonyum klorür, çözünmüş oksijen ve mikroorganizma derişimleri ölçülerek tamamlanmıştır. Analizlerde glukoz YSI® glukoz analizörü (± 10 mg/lt) , amonyum klorür CRISON® amonyum elektrodu (± 10 mg/lt) ve çözünmüş oksijen BECKMAN® (± 0.1 ppm) çözünmüş oksijen metre ve pH Gallenkamp (± 0.1 birim) pH metre ile saptanmıştır. Bu bölümde mikroorganizma derişimi absorbands ölçümü ile önceden hazırlanan kalibrasyon doğrusu kullanılarak değerlendirilmiştir.

Erlen deneylerinde *zoogloea ramigera* topraklar halinde büyüdüğünden ve bu da difüzyon kısıtlaması getirdiğinden, glukoz, amonyumklorür ve oksijen değişkenlerini içeren uygun bir kinetik model elde edilememiş ancak büyüme için optimum pH ve sıcaklık saptanmıştır. Bu optimum değerler sürekli karıştırılmalı reaktör (CSTR) deney sonuçları ile uyumlu bulunmuştur. Deneylerde kullanılan besin ortamı Tablo 1 de verilmiştir.

Tablo 1. Mikroorganizma besi ortam bileşimi.

Besi ortamı	Derişim (g/lt)
Glukoz (monohidrat)	30
K_2HPO_4	1
KH_2PO_4	0.5
NH_4Cl	0.5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5
Maya özütü	1
Bakteriyolojik pepton	1
pH = 7.0	

Ortam sıcaklığı = 25 °C

(Deneylerde glukoz ve amonyumklorür derişimleri karbon/azot oranları 1-20 arasında olacak şekilde Box-Wilson deney modellemesine göre değiştirilmiştir[4].)

Kesikli erlen deneyleri istenen sonucu vermediğinden belirlenen değişkenlerin büyüme etkisi daha uzun zaman alan CSTR deneyleri ile

incelenmiştir. Bu çalışma için 5 lt lik Biotech marka pH(± 0.01 birim), karıştırma hızı (± 1 rpm) ve çözünmüş oksijen ($\pm \%1$ doygunluk değeri) kontrollü fermentör kullanılmıştır. CSTR deneyleri, erlen deneylerinde belirlenen optimum sıcaklık 25°C , pH=7.0 ve kültürün topaklaşmadan karıştırma hızı kültürün farklı büyüme evrelerinde ve karıştırma hızlarında mikroskop altında yapılan inceleme sonucunda seçilmiştir. Erlen deneylerinde önlenemeyen bu topaklaşma, reaktör içindeki engellemekte ve topak içinde derişim profillerine neden olmaktadır. Bu nedenle erlen deneyleri ile bir biyokinetik model oluşturulamamıştır.

Sürekli CSTR deneylerinde sistem yataşkın duruma gelene kadar beklenmiş ve mikroorganizma derişimi, glukoz, amonyum klorür ve çözünmüş oksijen derişimleri farklı seyrelme hızları ve deney koşullarında ölçülmüştür. Uygulanan seyrelme hızları kültürün üstel üreme bölgesinde seçilmiştir.

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Özgül üreme hızı büyümeyi birden çok besinin kontrol ettiği durumda her bir besine ait özgül üreme hızlarının çarpımı olarak verilebilir[1]. Yapılan çalışmada temel besinler olan glukoz, amonyum klorür ve oksijen için genel özgül üreme hız ifadesi aşağıdaki gibi verilir,

$$\mu = \mu_{\text{Glükoz}} \mu_{\text{Amonyum klorür}} \mu_{\text{Oksijen}} \quad (1)$$

Eşitlik 1 deki özgül üreme hızları için literatürde[1] yalnız tek besinin büyümeyi kısıtladığı durumda yazılmış olan Monod, Teissier, Mozer, Contis, Andrews, Luong, Tseng ve Woyman'ın hız ifadeleri yer alabilir.

Çalışmada herbir besin için 12 farklı büyüme modeli farklı kombinasyonlarda eşitlik 1 de yerine konmuş ve ilgili biokinetik sabitler hesaplanmıştır. Çözümlemlerde nonlineer denklemler için katsayıları hesaplayabilen SYSTAT® [5] paket programı kullanılmıştır. Önerilen özgül üreme hız ifadesindeki biokinetik sabitler anlamlı ise model olumlu kabul edilmiştir. En iyi uyumu veren model olarak da en küçük kareler farkını Σ model özgül üreme hızı - deneysel üreme hızı² değerini veren eşitlik seçilmiştir.

En uyumlu model yapılan analizler sonucunda aşağıda verilmiştir.

$$\mu = \mu_{\text{max}} \frac{C_G}{K_{SG} + C_G} \left[1 - \exp\left(-\frac{C_{DO}}{K_{SDO}}\right) \right] \left[1 - \exp\left(-\frac{C_N}{K_{SN}}\right) \right] \quad (2)$$

Eşitlikte C_G : glukoz derişimi, K_{SG} : glukozla ait doygunluk sabiti, C_{DO} : çözünmüş oksijen derişimi, K_{SDO} : oksijene ait doygunluk sabiti, C_N : amonyum klorür derişimi, K_{SN} : amonyum klorüre ait doygunluk sabiti ve

μ_{max} : maksimum özgül üreme hızıdır.

Mikroorganizmanın glukoz tüketim hızı yaşam faktörü ile birlikte aşağıdaki eşitlik ile verilebilir[1].

$$-\frac{dC_G}{dt} = \frac{\mu X}{Y_{X/G}} - mX \quad (3)$$

Eşitlikte X : reaktördeki mikroorganizma derişimi, $Y_{X/G}$: verim faktörü (mikroorganizma üreyen/glukoz tüketilen), ve m: glukozu ait yaşam faktörü (g glukoz/g mikroorganizma/sa) dır. Sürekli karıştırılmalı fermentör için besin denkliği eşitlik 4 ile ifade edilir.

$$D(C_{FG} - C_G) = \frac{\mu X}{Y_{X/G}} - mX \quad (4)$$

Eşitlikte C_{FG} : Besleme glukoz derişimi (g/lit), C_G : CSTR içindeki glukoz derişimi ve D: seyrelme hızı (sa^{-1}) (besleme hacimsel akış hızı/reaktör hacmi).

Deney sonuçları analiz edildiğinde, eşitlik 2 ve 4 için aşağıdaki biyokinetik sabitler bulunmuştur. Ayrıca 4 nolu eşitlik amonyumklorür ve oksijen içinde çözülmüş bu substratlara ait yaşam ve verim faktörleri hesaplanmıştır.

$$K_{SDO} = 2.2 \cdot 10^{-5} \text{ (g/lit)}$$

$$K_{SG} = .037 \text{ (g/lit)}$$

$$K_{SN} = .129 \text{ (g/lit)}$$

$$\mu_{max} = .248 \text{ (g/lit)}$$

$$m = 0.156 \text{ g glukoz/g mikroorganizma/sa}$$

$$Y_{X/G} = 0.22 \text{ g kuru mikroorganizma üreyen/g tüketilen glukoz}$$

$$Y_{X/N} = 0.682 \text{ g kuru mikroorganizma üreyen/g tüketilen amonyumklorür}$$

$$Y_{X/O} = 0.38 \text{ g kuru mikroorganizma üreyen/g tüketilen oksijen}$$

Eşitlik 1 de pH etkisi çarpan olarak aşağıdaki şekilde ifade edilebilir[1],

$$\mu = \mu_{glukoz} \mu_{amonyumklorür} \mu_{oksijen} f(\text{pH}) \quad (5)$$

Farklı pH değerlerinde yapılan deney verileri lineer regresyon neticesinde,

$$f(\text{pH}) = A + B + C \text{ pH}^2 \quad (6)$$

eşitliği bulunur. Eşitlikte $A=0.873$, $B=0.156$ ve $C=0.019$ olarak bulunmuştur. Sonuçta *zoogloea ramigera* için 25 °C optimum sıcaklıkta büyümede en genel ifade olarak,

$$\mu = \mu_{max} \frac{C_G}{K_{SG} + C_G} \left[1 - \exp\left(-\frac{C_{DO}}{K_{SDO}}\right) \right] \left[1 - \exp\left(-\frac{C_N}{K_{SN}}\right) \right] (A + B \text{ pH} + C \text{ pH}^2) \quad (7)$$

olarak bulunmuştur. Türetilen ifadede en küçük kareler farkı $\Sigma | \text{model} - \text{ölgöl} \text{ üreme hızı} - \text{deneysel üreme hızı} |^2 = 0.033$ dır.

Yapılan çalışma ile *zoogloea ramigera* ya ait çok bileşenli besin ortamı ve pH etkisini içeren genel bir biyokinetik ifade türetilmiştir.

Yüksek çözünmüş oksijen ve amonyum klorür derişimlerinde mikroorganizma üzerindeki sıvı filme rağmen besini istediği kadar alabilmektedir. Elde edilen bu sonuç ifadede, yüksek oksijen ve amonyum klorür derişimlerinde, bağıntının sadece glukozu bağımlı olduğu gözükmeğdir. Çözünmüş oksijen veya amonyum klorür derişimleri azaldıkça mikroorganizma filmindeki sıvı film direnci bu substratlar için önem kazanmakta ve kütle aktarım kısıtlaması olmaktadır. Bu durumda kısıtlamalı besin yani çözünmüş oksijen ve/veya amonyum klorür derişimleri de mikroorganizmanın büyümesini kontrol etmektedir.

* Bu çalışma TÜBİTAK tarafından KTÇAG 30 [MAG 823] nolu proje olarak desteklenmektedir.

REFERANSLAR

1. J. E. Bally, D. F. Ollis., "Biochemical Engineering Fundamentals", 2nd ed, McGraw Hill, New York (1986) 228-305, 382-388, 447, 392, 382-392, 392-394
2. J. S. Cech, J. Chudoba and P. Grau, "Determination of kinetic constants of activated sludge microorganisms", *Wat. Sci. Tech.*, 17 (1984) 259-272.
3. K. Williamson and P. L. McCarty, "Verification studies of the biofilm model for bacterial substrat utilization", *Journal of WPCF*, 48 (1976) 281-296.
4. R. H. Perry and C. H. Chilton "Chemical Engineers' Handbook" 5th ed, McGraw Hill, Tokyo, 2,74-75 (1982)
5. Systat Version 3. by Systat Inc., The system for statistics (1987) 2902 Central Sentral Street, IL 60201 USA.

Yüksek öğrenim için öğrencilerin bilimsel ve teknik eğitimlerini sürdürebilmeleri için gerekli olan bilimsel ve teknik yayınların yayımlanması amacıyla Marmara Üniversitesi Yayinevi kurulmuştur. Bu yayinevin amacı, bilimsel ve teknik yayınların yayımlanmasını sağlamak ve bu yayınların bilimsel ve teknik eğitim için kullanılmasını sağlamaktır. Bu yayinevin yayımladığı eserler, bilimsel ve teknik eğitim için kullanılmaktadır.

Yayinevin yayımladığı eserlerin listesi aşağıdaki gibidir:

1. Dr. H. H. Perry and G. H. Griffin, "Journal of Applied Mechanics", Band 57, No. 2, 1950.
2. R. Williamson and T. J. G. Carr, "Journal of Applied Mechanics", Band 57, No. 2, 1950.
3. J. S. G. Carr, "Journal of Applied Mechanics", Band 57, No. 2, 1950.
4. Dr. H. H. Perry and G. H. Griffin, "Journal of Applied Mechanics", Band 57, No. 2, 1950.
5. R. Williamson and T. J. G. Carr, "Journal of Applied Mechanics", Band 57, No. 2, 1950.

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

$$A + B + C = D + E + F$$

Catharanthus roseus'un BÜYÜME KİNETİĞİ

H. İbrahim EKİZ*, Ferda MAVİTUNA** ve Paul WILLIAMS**

*Fırat Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 23279 Elazığ-Türkiye

**UMIST ,Chemical Engineering Department, M60 1QD, Manchester-England

GROWTH KINETICS of *Catharanthus roseus*

SUMMARY

Growth kinetics of *Catharanthus roseus* was investigated in 0.1, 2.0 and 10.0 volume bioreactors. Growth rates were found by monitoring dry weight. Sugar concentrations in media were measured by using HPLC. According to the results from using experiments of the growth kinetics of *Catharanthus roseus* in the bioreactor at different conditions, it was found that growth rates are higher in 0.100-L bioreactor than the others.

ÖZET

Catharanthus roseus'un büyüme kinetiği 0.1, 2.0 ve 10.0 L hacimli bioreaktörlerde incelendi. Büyüme hızı kuru hücre ağırlığı izlenerek bulundu. Ortamdaki şeker derişimleri HPLC kullanılarak ölçüldü. Farklı özellikteki bioreaktördeki *Catharanthus roseus*'un büyümesi ile ilgili yapılan deneylerde en büyük büyüme hızı 0.100 L'lik reaktörde elde edildi.

GİRİŞ

Bitki hücre kültürleri, boyalar, ilaçlar ve güzel kokular gibi bir çok kimyasal çok düşük maliyetle sentezleyebilecek potansiyele sahiptirler. Bu ikincil ürünlerin yavaş üretmesi, düşük ürün derişimi ve hücre içi ürünlerin depolanması problemleri vardır (1). Immobilize hücre reaktörlerinde suspansiye hücre reaktörlerine göre birim hacimde daha fazla hücre elde edilebilir. Son yıllarda bitki hücrelerinin üretilmesi ve immobilizasyonu konularında çok sayıda çalışma yapılmaktadır(2 ve 3). Bu çalışmada *C. roseus*'un büyüme kinetiği değişik özellikteki reaktörlerde araştırılmıştır.

DENEL BÖLÜM

Media Hazırlama

Deneylerde 4.71 g/l Murashige-Skoog (MS), 0.4 mg/l 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic asit) ve 30 g/l sakkaroz kullanılarak besi yeri hazırlandı. Gerekli reaktör hacmi için verilen derişimlerde MS, sakkaroz ve 2,4-D alınarak gerekli miktar kadar destile su eklendi, daha sonra 1 M'lık NaOH ile pH=5.8'e ayarlanarak 121 C de 18 dk. süre için otoklavlandı.

Aşılama

%90'ı hazırlanan besi yeri ile dolu reaktöre, 7 günlük kültürden reaktör hacminin %10 olacak şekilde aseptik koşullarda aşılama yapıldı.

Deney Şartları

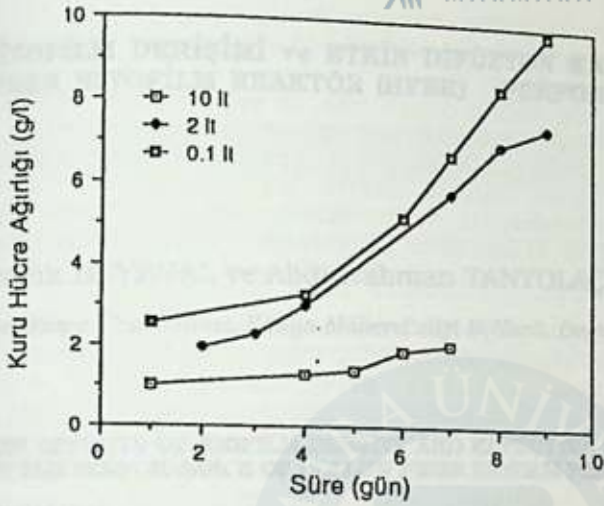
Bütün deneyler, 25 C, 100 rpm karıştırma hızında, 0.5 vvm havalandırma hızında ve çalkalayıcının kullanıldığı deneylerde 115 rpm çalkalama hızında yapıldı.

Kuru Hücre Ağırlığı

Önceden tartılmış filtre kağıdı ve üretilen *C. roseus* hücresi 100°C'lik bir etüve yerleştirildi. 24 saat sonra tartılarak kuru hücre ağırlığı g/l olarak bulundu.

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

C. roseus'un üreme kinetiği 0.100 lt'lik, 115 rpm çalkalama hızında çalışan reaktörde incelendi. Daha sonra, 2 lt hacmindeki reaktörde karıştırma, havalandırma ve ayrıca havalandırmanın yanı sıra mekanik olarak yapılarak üretildi; ayrıca 10 lt hacmindeki reaktörde karıştırma havalandırma ile yapılarak üretildi. Bioreaktörlerdeki üreme kinetiği sonuçları Şekil-1 de görülmektedir. Bu sonuçlardan *C. roseus*'un en hızlı 0.100 lt'lik reaktörde ürettiği ve karıştırmanın mekanik olarak yapılmasının üreme hızını artırdığı saptandı. Farklı şartlarda üretilen *C. roseus* un kuru hücre ağırlıkları 7.gün için karşılaştırıldığında 0.100 lt lik reaktörde en fazla büyüme hızı saptandı.



Şekil-1. *Catharanthus roseus*'un değişik özellikteki reaktörde büyümesi.

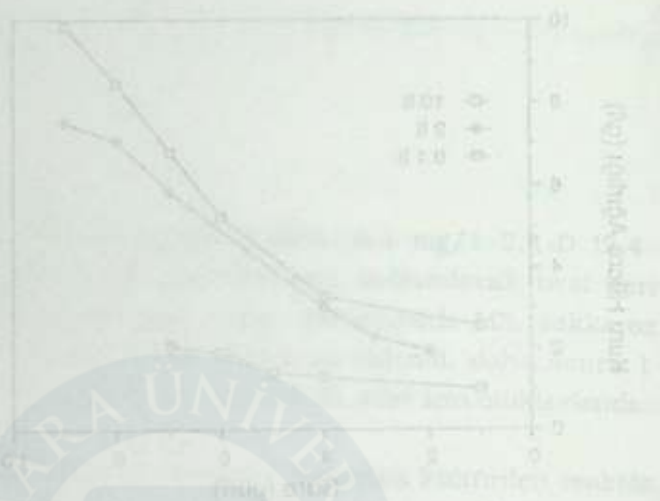
Tablo-1: Bioreaktörlerde *C. roseus*' un büyümesinin 7.gün kuru hücre ağırlıkları

Bioreaktör	Kuru Hücre Ağırlığı (g/l)
10 lt	2.06
2 lt	2.28
2 lt*	5.85
0.1 lt	8.43

*Mekanik karıştırma yapıldı

KAYNAKLAR

1. D. Drapeau, H. W. Blanch, C. R. Wilke, Growth Kinetics of *Dioscorea deltoidea* and *Catharanthus roseus* in Batch Culture, *Biotech. Bioeng.*, 28, (1986), 1555-1563
2. B. Martinez, C. H. Park, Immobilized Plant Cell Culture in a Trickle Bed Reactor, *Proc. APBioChEC'90*, (1990) 177-179, Kyungju, Korea
3. F. Mavituna, J. M. Park, Growth of Immobilized Plant Cells in Reticulate Polyurethane Foam Matrices, *Biotech. Letters*, 7, (1985), 637-640.



Tablo 1.5. Çözümlenmiş ve çözülmemiş polimerlerin çözünürlük hızları için grafikler.

Tablo 1.6. Çözümlenmiş ve çözülmemiş polimerlerin çözünürlük hızları için grafikler.

Yükseklik (mm)	Zaman (min)
10	0
8	2
6	4
4	6
3	8
2	10

KAYNAKLAR

1. D. J. Worsfold, N. W. Bland, G. H. R. Hoyle, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, **18**, 1555-1563 (1980).
2. B. Mariani, G. H. R. Hoyle, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, **18**, 1565-1573 (1980).
3. N. Mavroun, J. M. Leck, *Journal of Polymer Science: Part A: Polymer Chemistry*, **18**, 1575-1583 (1980).

BİYOFİLM DERİŞİMİ ve ETKİN DİFÜZYON KATSAYISININ HOLLOW FİBER BİYOFİLM REAKTÖR (HFBR) PERFORMANSINA ETKİLERİ

Haluk BEYENAL ve Abdurrahman TANYOLAÇ

Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Beytepe - Ankara - Türkiye

THE EFFECTS OF BIOFILM DENSITY AND EFFECTIVE DIFFUSION COEFFICIENT ON THE PERFORMANCE OF HOLLOW FIBER BIOFILM REACTOR (HFBR)

SUMMARY

Microorganisms are grown on hollow fiber membranes for different applications. The required substrates for microorganisms are transferred through the wall of the hollow fiber by convection and diffusion. In the paper, given model evaluates the performance and biofilm thickness of hollow fiber biofilm reactor for possible cell densities and desired lumen substrate concentration. In the solution; variable diffusion coefficient with biofilm densities, minimum substrate concentration under which microorganisms can not grow and nonlinear Monod equation including maintenance factor to define substrate utilization are used. This study is essentially different from the literature in the substrate utilization rate and minimum substrate concentration used for microorganism growth and in the way that the performance of the hollow fiber bioreactor is assessed using variable effective diffusion coefficient.

ÖZET

Mikroorganizmalar hollow fiber membranlar üzerinde farklı uygulamalar için biyofilm halinde büyütülmektedir. Boru şeklindeki hollow fiberin dış yüzeyine tutunan mikroorganizma yaşamı için gerekli besini lümen içinde akan besinin, membran radyal yönde difüzyonu ve yığın akışı ile alır. Bu çalışmada önerilen modelle, hollow fiber bioreactor performansı ve biyofilm kalınlıkları, olası biyofilm yoğunluklarında, istenilen lümen substrat derişimleri için hesaplanmıştır. Model çözümünde biyofilm yoğunluğu ile değişen etkin difüzyon katsayısı, mikroorganizmanın büyüebileceği minimum substrat derişimi ve substrat tüketim ifadesinde yaşam faktörü içeren nonlinear Monod eşitliği kullanılmıştır. Bu çalışmada; hollow fiber biyofilm reaktörün performansını belirleyen etkin difüzyon katsayısı, substrat tüketim ifadesi ve mikroorganizmanın aktif kalacağı minimum substrat derişimi tanımı ile literatüre orjinal katkıda bulunmuştur.

GİRİŞ

Son yıllarda endüstriyel ve evsel atıksuların çevreye olan zararlarının artması üzerine, bu suların arıtılmasına yönelik araştırmalar hızlanmıştır. Atıksu arıtım teknolojilerinde biyolojik arıtım, çevre için zararlı bir kimyasal, zararsız bir ürüne dönüştürdüğünden en çok tercih edilendir. Atıksuların biyolojik arıtımında mikroorganizmaların destek materyallerine yapışarak büyüdükleri biyofilm reaktörler de kullanılmaktadır. Bu destek materyalleri kum, aktif karbon, seramik

halkaları ve cam [1] olabilmekte ve bu sistemlerde mikroorganizmalar çok yüksek derişimlere ulaşabilmektedir [2].

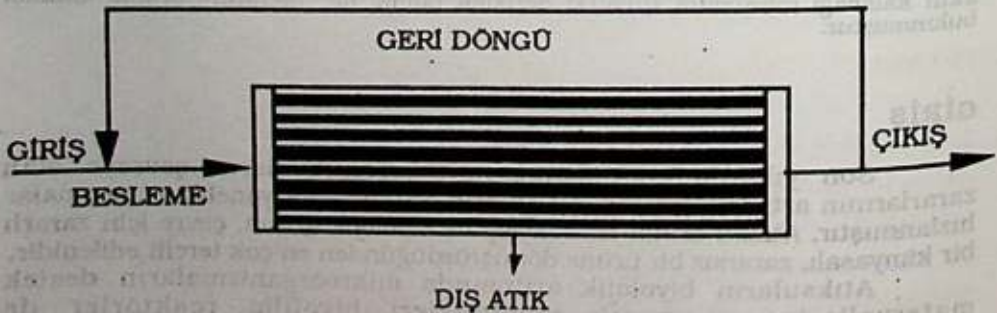
Literatürde akışkan yatak, dönen disk ve sabit yataklı biyofilm reaktörler için önerilmiş birçok model üzerinde çalışmalar vardır [3,4,5]. Bu makalede, hollow fiber membranın biyofilm için geçirgen bir destek olarak kullanılması öngörülmüştür. Hollow fiberin dış yüzeyinde çeşitli mikroorganizmalar büyütülebilmekte ve bu mikroorganizmalar yaşamları için gerekli substratları fiber lümeninden almaktadır [6,7]. Bu substratlar lümeninden biyofilme doğru radyal yönde difüzyon ve yığın akışla aktarılmaktadır [6,8,9].

Hollow fiber üzerinde büyüyen mikroorganizmalar, substratları filmin iç tarafından alır ve burada büyürler [7]. Film iç taraftan büyüdüğü için dışa doğru azalan substrat derişiminden dolayı ölen mikroorganizmalar dış yüzeyden atılır ve film sürekli olarak (yatışkın durum değerine ulaştığında) aktif olur. Hollow fiber biyorektör'ün (HFBR) performansı; lümendeki substrat derişimi, radyal yöndeki yığın akış hızı, biyofilm ve membran üzerindeki etkin difüzyon katsayıları ve mikroorganizmalara ait biyokinetik ifade ile belirlenir [6,10].

Literatürde HFBR performansı üzerine yapılan çalışmalarda, biyofilm yoğunluğu ile etkin difüzyon katsayısının değişeceği düşünülmemiştir, oysa biyofilm yoğunluğu ile etkin difüzyon katsayısı değişmektedir [11]. Keza mikroorganizma filmi hollow fiber üzerinde minimum bir substrat derişimin altında büyüyemeyecektir [12]. Daha önce yapılan çalışmalarda [2,4,6,7,9] mikroorganizmanın sıfır substrat derişime kadar aktif kalacağı ve biyofilm derişim değişimlerinde de aynı etkin difüzyon katsayısının geçerli olduğu kabul edilerek çözüm yapılmıştır. Bu makalede mikroorganizmanın yaşamı için kullanacağı substrat miktarları da biyokinetik ifadeye yaşam faktörü olarak dahil edilmiştir. Çalışma biyokinetik ifadeye yaşam faktörünü içermesi, mikroorganizmanın büyüyebileceği minimum substrat derişimini kullanması ve biyofilm yoğunluğu ile değişen etkin difüzyon katsayısı içermesi açısından orjinaldir.

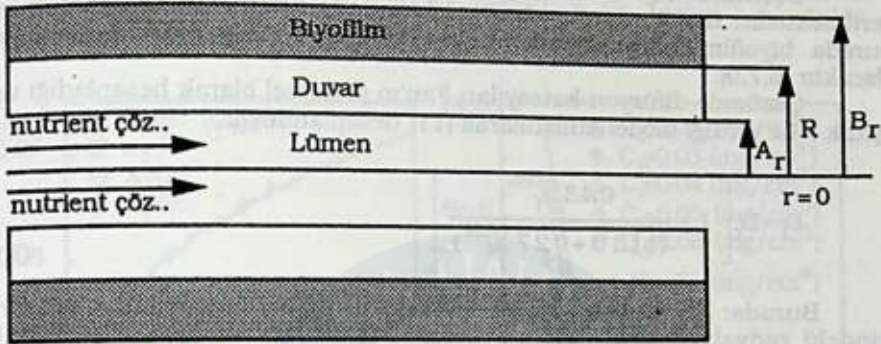
MATEMATİKSEL MODEL

Modelde atıksu arıtımı için, hollow fiber üzerinde aktif çamur bakterisinin büyütülmesi önerilmiştir. Biyofilm içinde büyümeyi kısıtlayıcı substrat glüköz olduğu ve diğer substratların limit değerinin üstünde olduğu varsayılmıştır. Şekil 1 de N tane hollow fiber modülün birleşmesinden oluşan HFBR'in şematik görünümü verilmiştir.



Şekil 1. Hollow fiber biyofilm reaktörün şematik görünümü.

Tek bir fiber için oluşturulan modelde fiber; lümen, fiber membranı ve biyofilm olmak üzere üç bölgeden oluşmaktadır. Şekil 2 de hollow fiberin kesit görünümünü verilmektedir.



Şekil 2. Hollow fiberin kesit görünümü .

Fiber lümeninde yüksek akış hızlarında ve geri döngü oranlarında çalışıldığında lümen içinde karıştırmalı reaktör davranışı sağlandığından lümen içinde sabit derişim kabul edilebilir [13]. Fiber duvarında ve biyofilm için substrat süreklilik eşitlikleri yazılırsa;

$$V_r \frac{dC}{dr} = D_r \left[\frac{d^2C}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{dC}{dr} \right] \quad (1)$$

$$V_r \frac{dS}{dr} = D_f \left[\frac{d^2S}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{dS}{dr} \right] - \frac{\mu_{max} X_f S}{Y_{X/S} (K_S + S)} - m X_f \quad (2)$$

Eşitliklerde V_r : radyal yönde akış hızı (cm/s), C : substrat derişimi (mg/cm^3), D_r : fiber duvarı içindeki etkin difüzyon katsayısı (cm^2/s)-duvar içindeki gözeneklilik büyük olduğundan su içindekine eşit alınmıştır [8]-, r : radyal yöndeki uzaklık (cm), μ_{max} : maksimum özgül üreme hızı (s^{-1}), D_f : biyofilm içindeki etkin difüzyon katsayısı (cm^2/s), X_f : biyofilm derişimi (mg/cm^3), $Y_{X/S}$: verim faktörü (mg mikroorganizma üreyen/ mg substrat tüketilen), m : yaşam faktörü (mg substrat/ mg mikroorganizma/s), K_S : Monod doygunluk sabiti olarak tanımlanmıştır.

1 ve 2 nolu eşitliklerin çözümünde sınır şartları olarak,

$$r = A_r \quad C = C_o \quad (3)$$

$$r = B_r \quad C = C_{min} \quad (4)$$

$$r = B_r \quad \frac{dC}{dr} = 0 \quad (5)$$

olarak alınmıştır. Lümen içinde iyi bir karışma olduğundan substrat derişimi her yerde aynıdır ve C_o olarak tanımlanmıştır. Biyofilmin büyüyebileceği minimum substrat derişimi Rittmann tarafından eşitlik 6 ile verilmiş ve deneysel olarak ispatlanmıştır (4).

$$C_{\min} = \frac{K_d K_S}{\mu_{\max} - K_d} \quad (6)$$

Eşitlikte K_d : mikroorganizma ölüm hız sabiti (s^{-1}) olarak verilmektedir. Biyofilmin dış yüzeyindeki substrat derişimi C_{\min} olacak ve burada biyofilm olmayacağından dolayı difüzyonla kütle aktarım hızı sıfır olacaktır [6,7,9].

Çözümde difüzyon katsayıları Fan'ın deneysel olarak hesapladığı ve eşitlik 7 ile verdiği model kullanılarak [11] hesaplanmıştır.

$$D_r = D_r \left[1 - \frac{0.43 X_r^{0.92}}{(11.19 + 0.27 X_r^{0.99})} \right] \quad (7)$$

Burada; D_r : substratın su içindeki difüzyon katsayısıdır. Duvar içindeki radyal yöndeki akışın biyofilm içinde de devam ettiği kabul edilmiştir. Bu radyal hız biyofilmin büyümesini engellemeyecek kadar küçüktür [8]. Radyal hızın uzaklık ile değışimi eşitlik 8 ile verilmiştir.

$$V_r = \frac{V_w A_r}{r} \quad (8)$$

Burada; V_w ; $r = A_r$ daki radyal hız olarak tanımlanmaktadır.

Çözümde amaç; istenilen lümen derişimi için hollow fiberin performansını ve biyofilm kalınlığını hesaplamaktır. Çözüme, önerilen bir biyofilm kalınlığı (B_r) kullanılarak 4 ve 5 nolu eşitliklerde verilen sınır şartlarından başlanmakta ve fiber biyofilm ara yüzeyindeki substrat derişimi ile akısı 4. derece duyarlı Runge Kutta Gill algoritması ile eşitlik 2 çözümlenerek [15] hesaplanmaktadır. Ara yüzey değeri ile 1 nolu eşitlik analitik olarak çözümlenerek lümen derişimi hesaplanmaktadır. Bu hesaplanan lümen derişimi istenilen değere eşit oluncaya kadar biyofilm kalınlığı önerme işlemine devam edilmektedir.

Çözümde kullanılan parametreler ve değeri Tablo 1 de verilmiştir.

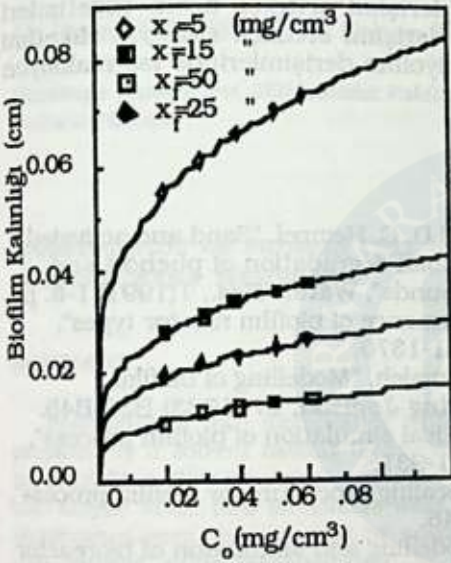
Tablo 1. Model çözümünde kullanılan değışken değeri ve referansları.

<u>Değişken</u>	<u>Değer</u>	<u>Referans</u>
V_w	$2.54 \cdot 10^{-4}$ cm/s	8
A_r	0.0183 cm	8
μ_{\max}	$4.18 \cdot 10^{-4}$ s $^{-1}$	16
m	$8.1 \cdot 10^{-4}$ s $^{-1}$	16
K_S	0.022 mg/cm 3	16
$Y_{X/C}$	0.67	16
R	0.0321 cm	8
K_d	$2.926 \cdot 10^{-7}$ s $^{-1}$	16

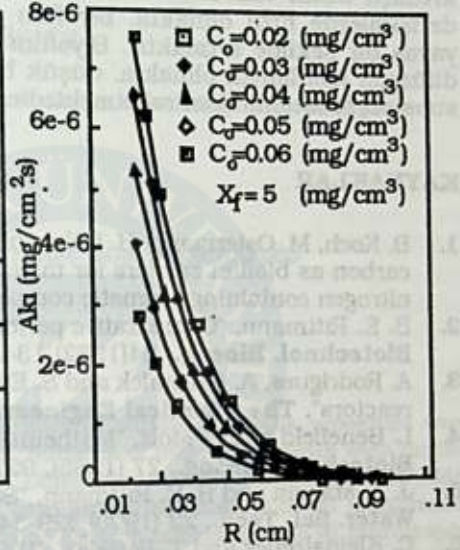
SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Model, hollow fiber üzerinde büyüyen mikroorganizmaların ulaşabilecekleri farklı derişimler için çözülmüştür(8). Şekil 1 de lümen

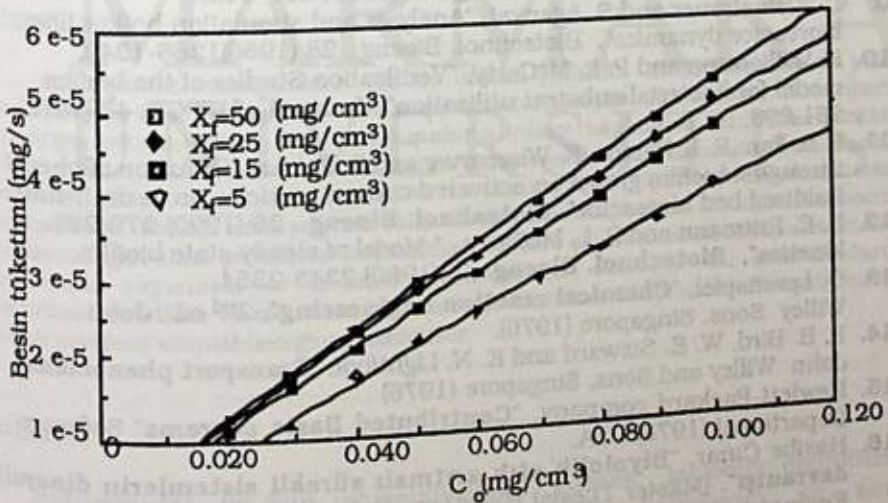
İçindeki C_0 derişimi ile farklı biyofilm derişim değerlerinde biyofilm kalınlığının değişimi verilmiştir. Düşük biyofilm yoğunluklarında, biyofilm kalınlığı, difüzyon kısıtlaması etkin olmadığından lümen derişiminden etkilenmemektedir. Biyofilm yoğunluğu arttıkça difüzyon kısıtlaması önem kazandığından, lümen derişimi ile biyofilm kalınlığı etkin bir şekilde artmaktadır.



Şekil 1. Lümen içindeki C_0 derişimi ile değişik X_f değerleri için biyofilm kalınlığı değişimi.



Şekil 2. $X_f = 5$ (mg/cm³) için farklı C_0 değerlerinde radyal yönde substrat akı değişimi



Şekil 3. Lümen içi C_0 derişimi ile değişik X_f ler için besin tüketim hızları.

Şekil 2 de $X_f = 5 \text{ mg/cm}^3$ için farklı lümen derişimlerinde radyal yönde akı değişimi verilmiştir. Şekilde lümen derişimi arttıkça substrat akı değerinin arttığı gözlenmiştir. Yüksek lümen derişimlerinde akı değişiminin daha fazla olması reaksiyon hızının arttığını göstermektedir.

Şekil 3 de farklı biyofilm derişimleri için C_0 ile biyofilm performansı (substrat tüketim hızı) verilmiştir. Burada biyofilm derişimi arttıkça besin tüketimi artmaktadır. Fakat bu değişim düşük biyofilm derişimlerde hızlı olmakta, biyofilm derişimi arttıkça besin tüketimleri yavaş bir şekilde artmaktadır. Biyofilm derişimi arttıkça substrat tüketimi difüzyon kısıtlamalı olmakta, düşük biyofilm derişimlerinde ise reaksiyon substrat tüketimini kontrol etmektedir.

KAYNAKLAR

1. B. Koch, M. Ostermann, H. Höke and D. C. Hempel, "Sand and activated carbon as biofilm carriers for microbial degradation of phenols and nitrogen containing aromatic compounds", **Water. Res.**, 1(1991) 1-8. pp.
2. B. E. Rittmann, "Comparative performance of biofilm reactor types", **Biotechnol. Bioeng.**, 24(1982) 1341-1370.
3. A. Rodrigues, A. Grasmick and S. Elmaleh, "Modelling of biofilm reactors", **The Chemical Engineering Journal**, 27 (1983) B39-B48.
4. L. Benefield and F. Molz, "Mathematical simulation of biofilm process", **Biotechnol. Bioeng.**, 27 (1985), 921-931.
5. J. A. Manem and B. E. Rittmann, "Scaling procedure for biofilm process", **Water. Sci. Tech.**, 22 (1990) 329-346.
6. C. Kleinstreuer and T. Poweiga, "Modelling and simulation of bioreactor process dynamics", **Advances in Biotechnology**, 52 (1992) 91-147.
7. C. R. Robertson and I. H. Kim, "Dual aerobic hollow fiber bioreactor for cultivation of *streptomyces aureofaciens*", **Biotechnol. Bioeng.**, 27(1985)1012-1020.
8. L.Dall-Bauman, S. Ilias and R. Govind, "Analysis of hollow fiber bioreactors", **Biotechnol. Bioeng.**, 35(1990) 837-846.
9. C. Kleinstreuer and S. Agarwal, "Analysis and simulation hollow fiber bioreactor dynamics", **Biotechnol. Bioeng.**, 28 (1986)1266-1240.
10. K. Williamson and P. L. McCarty, "Verification Studies of the biofilm model for bacterial substrat utilization", **Journal of WPCF**, 48 (1976) 281-296.
11. L. S. Fan ,R. L. Ramos, K. Wisecarver and B. Zehner, "Diffusion of phenol through a biofilm grown on activated carbon particles in a draft-tube fluidized bed bioreactor", **Biotechnol. Bioeng.**, 35 (1990) 279-286.
12. B. E. Rittmann and P. L. McCarty , " Model of steady-state biofilm kinetics", **Biotechnol. Bioeng.** ,22(1980) 2343-2354.
13. O. Levenspiel, "**Chemical reaction engineering**", 2nd ed., John Willey Sons, Singapore (1976).
14. R. B. Bird, W. E. Steward and E. N. Lightfoot, "**Transport phenomena**", John Willey and Sons, Singapore (1976) .
15. Hewlett-Packard company, "Contributed Basic pograms" Software Department (1978) USA.
16. Hasibe Çınar, "**Biyolojik atık arıtmalı sürekli sistemlerin dinamik davranışı**". (Master Thesis) Hacettepe University, Chemical Engineering Department (1988).

MODİFİYE POLİÜRETAN MEMBRANLARDA PROTEİN VE HÜCRE ETKİLEŞMESİNİN İNCELENMESİ

Ali İhsan ŞERBETÇİ ve Erhan PİŞKİN

Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kırnya Mühendisliği Bölümü, Beytepe, Ankara-Türkiye

INVESTIGATION OF PROTEIN CELL INTERACTION ON MODIFIED POLYURETHANE MEMBRANS

SUMMARY

Polyurethane (PU) membranes with different surface and bulk properties were prepared by a solvent casting technique. Surfaces of these membranes were further modified by a glow-discharge apparatus. Dimethylaminoethylmethacrylate (DMAEMA) and acrylic acide (AA) monomers were used for surface coating of PU membranes. Membranes were characterized by scanning electron microscopy (SEM) micrographs and contact angle measurments. In protein adsorption studies, human serum albumine, fibronectin and immunoglobulinG proteins were used. In cell studies human endothelial cell adhesion and proliferation were examined. The results demonstrate that it is possible to achive different protein adsorption and cel response by changing the preparation or modification conditions of the PU membranes.

ÖZET

Poliüretan membranlar, çözücü döküm yöntemi ile farklı yüzey ve yoğun özelliklerinde hazırlanmışlardır. Bu membranların yüzeyleri yük boşalım düzeneğinde modifiye edilmişlerdir. PU membranların yüzey kaplaması için dimetilamino etilmetakrilat (DMAEMA) ve akrilik asit(AA) monomerleri kullanılmıştır. Membranlar taramalı elektron mikroskopu (SEM) ve temas açısı ölçümleri ile karakterize edilmişlerdir. Protein adsorpsiyonu çalışmalarında human serum albumin, fibronectin ve immunoglobulinG proteinleri kullanılmıştır. Hücre çalışmalarında Human endotelial hücrelerin yapışması ve üremesi araştırılmıştır. Sonuçlar PU membranların hazırlama koşulları ve modifikasyonuna bağlı olarak farklı protein adsorpsiyonu ve hücre cevabına ulaşılabilceğini göstermiştir.

GİRİŞ

Poliüretanlar, iyi kan uyusabilirlikleri, yüksek mekanik özellikleri, yüzeydeki hidrofilitik grupların varlığı, fabrikasyon ve son şekillendirmedeki kolaylıkları, toksik ve pirojen olmaması, kolaylıkla

sterilize edilebilmesi özellikleri ile, günümüz biyomedikal uygulamalarında en çok kullanılan biyomateryallerin başında gelmektedir[1,2]. Yapılan araştırmalar, poliüretanın diğer polimerlere göre trombus oluşumuna çok daha yüksek direnç gösterdiğini belirlemiştir. Bu özellik, diğer kimyasal, fiziksel ve mekanik özelliklerle birlikte kanla temas eden biyomateryallerin yapımında, poliüretanın daha çok tercih edilmesini sağlamıştır [3].

Bir biyomateryalin kullanımında temel parametre materyalin biyokompatibilitesidir. Bu ise materyalin yüzey kimyası ve fiziksel yapısı ile yakından ilişkilidir. Biyomateryal yüzeylere protein ve hücre yapışmasının materyalin kan ve doku uyumunda önemli bir rol oynadığına inanılmaktadır. Bir çok deneysel çalışma, protein/hücre-polimerik materyal etkileşmesi ile biyomateryal karakterizasyonunun yapılabildiğini göstermiştir. Bu çalışmalar protein/hücre-polimerik materyal etkileşmesinin temel olarak materyalin; fiziksel ve kimyasal özellikleri, kimyasal bileşimi, yükü, yüzey serbest enerjisi, ıslanabilirliği gibi özelliklerine bağlı olduğunu göstermiştir[4,5].

Bu çalışmanın amacı, çözücü döküm yöntemi ile farklı özelliklerde hazırlanan poliüretan membranların plazma polimerizasyonu ile yüzeylerini modifiye etmek ve bu membranların farklı protein ve hücrelerle olan etkileşimini incelemektir.

DENEL BÖLÜM

P.U Membranların Çözücü Döküm Yöntemiyle Üretilmesi

Bu çalışmada kullanılan poliüretan membranlar aşağıda temel adımları verilen çözücü döküm yöntemiyle hazırlanmıştır.

Granül halindeki poliüretan (Pellethane® 2363-80A Up John, İsveç) 1.4 Dİoksan (BDH, İngiltere), veya Tetrahidrafuran (THF, Merck, B.Almanya) çözücüsünde % 8 (gram polimer / 100 ml çözelti) konsantrasyonda çözülür. Hazırlanan polimer çözeltisi düzgün yüzeyli cam levha (15 cm x 30 cm yüzey alanlı) üzerine istenilen kalınlıkta, bir film çekme cihazı ile yayılır. Cam yüzey üzerindeki film gözenekli membran hazırlanırken, sıvı halindeki çöktürme ortamına (% 10-20 hacim gliserin/hacim su), homojen membran hazırlanırken ise sabit sıcaklıktaki hava ortamında kurutulur. Çökerek katılaşan polimerik membran saf su ile birkaç kez yıkanır ve daha sonra 60°C sabit sıcaklık odasında sabit tartıma gelene kadar kurutulur.

P.U Membranların Plazma Polimerizasyonu ile Modifikasyonu

P.U Membranların yüzey özelliklerinin değiştirilmesi ve yapay organlarda kullanılabilirliğini artırılabilmesi için membranlar plazma polimerizasyonu tekniği kullanılarak iki farklı monomer, Akrilik Asit (AA) ve dimetilaminoetilmetakrilat (DMAEMA) ile kaplanmışlardır. İzlenilen deneysel yöntem aşağıda özetlenmiştir;

Kaplama işleminde kullanılacak P.U. Membranlar 11x11 cm boyutlarında kesilerek reaktörün tam ortasına yerleştirilir. Ortamdaki reaksiyona girebilecek oksijen reaktörden inert azot gazı geçirilerek

uzaklaştırılır. Vakum pompası çalıştırılır ve 10^{-3} bar basınç değerine düşülür. Sistemden istenilen hızda monomer akışı (60 ml/dk) ayarlanarak RF jeneratörü açılır ve boşalım gücü 10 W'a ayarlanarak elektriksel boşalım sağlanır. Oluşan plazma içinde kaplamanın sağlanması için 30 dakika beklenir.

P.U Membranların Yüzey Yapılarının Belirlenmesi

Çözücü döküm yöntemiyle üretilen P.U. membranların ve bu membranların plazma polimerizasyonu ile kaplanması sonucu elde edilen kompozitlerin kaplanmış yüzeylerinin fotoğrafları bir taramalı elektron mikroskopu ile (SEM, "Scanning Electron Microscope", Jeol, JSM-T-20, Japonya) çekilmiştir. Bu amaçla önce incelenen örneklerin yüzeyleri kaplama cihazında ("Fine Coat", Jeol, Japonya) yaklaşık 200 Å kalınlığında altın ile kaplanarak iletken hale getirilmiş ve daha sonra mikroskopik fotoğraflar alınmıştır.

P.U. membranların yüzey ıslanabilirliklerinin belirlenmesi amacıyla yapılan çalışmalarda hazırlanan sentetik P.U. membranların yüzey enerjisi "Temas Açısı" yöntemiyle ölçülmüştür.

P.U Membranlarda Protein Adsorpsiyonu Çalışmaları

Farklı yüzey özelliklerine sahip poliüretan membranların protein adsorpsiyon kapasiteleri incelenmesi amacıyla, Albumin (Alb), Fibronektin (Fn) ve İmmüoglobulin G (IgG) proteinleri ile çalışılmıştır. Protein adsorpsiyon değerleri Enzim İmmüno Assay (EİÜ) diye adlandırılan yöntemle belirlenmiştir.

Deneylerde üst tarafı teflon ve alt tarafı paslanmaz çelik iki levhadan oluşan bir deney düzeneği kullanılmıştır. Teflon parça herbiri 10 mm olan 24 silindirik boşluktan oluşmaktadır. Deneylerde kullanılan membranlar %1 (v/v) deterjan çözeltisinde (RBS 25, Hicol, Hollanda) ultrasonik banyoda 15 dakika temizlenmiş ve daha sonra distile su ve etanol ile yıkanmıştır.

Membranlar test düzeneğine yerleştirildikten sonra teflon parçadaki boşluklara 200 ml PBS ile doldurulur. Bunların üzerine 200 ml %20 lik İnsan plazma serumu eklenerek 1 saat beklenir. 1 saat sonra boşluklardaki PBS-serum uzaklaştırılarak boşluklar PBS-Tween 20 ile 4 kez yıkanır. Yıkama işleminden sonra boşluklara birinci antibody çözeltisi (FAS) eklenir. Bu işlem; ilk sekiz boşluğa 200 ml 1/100 seyrelmiş Albumin-FAS, ikinci sekizlik kısmına Fn-FAS ve son sekizlik kısmına da IgG-FAS doldurulur. 1 saat beklendikten sonra yine PBS-Tween 20 ile 4 kez yıkama yapılarak ikinci antibody çözeltisi (SAS) tüm boşluklara doldurulur (200 ml). Yine 1 saat beklenerek boşluklardaki çözelti boşaltılır ve yıkama işlemi uygulanır. Bu aşamada boşluklara 200 ml substrata/leuko dye çözeltisi eklenerek 1/2 saat karanlıkta bekletilir. Yarım saat sonra boşluklardaki çözeltinin üzerine 100 ml 4 N H₂SO₄ eklenerek tepkime durdurulur ve oluşan renkli çözeltilerin 250 ml 96 boşluklu tablalara alınarak 450 nm'de absorbanları spektrometrik olarak ölçülür.

P.U Membranlarda Hücre Çalışmaları

Hücre kültür çalışmaları Willems metodu[6] ile umbilical cord veins'den izole edilen insan endotel hücreleri gerçekleştirilmiştir.

Bu hücreler Van Wachem tarafından tanımlanan yöntem ile kültürlenerek hücre yoğunluğu 1×10^5 hücre/ml yoğunluğuna getirilmiştir.

Çalışmanın bu kısmında kullanılacak poliüretan membranlar etilen oksit ile sterilize edilerek bu membranlar üzerinde endotel hücre büyüme deneyleri yapılmıştır.

Membran yüzeyinde protein kaplanmasının hücre büyümesine etkisinin incelenmesi amacıyla herbir membran tipi 4 boşluklu test düzeneğine yerleştirilmiş ve bu düzeneğin iki boşluğuna % 20 plazma serumu konarak protein ile kaplanması sağlanmıştır. Diğer iki boşluk ise PBS (pH 7.4) ile doldurularak 1 saat beklenmiştir. 1 saat sonra tüm boşluklar boşaltılarak hücre kültür ortamı eklenmiştir. Ekim yapılan membranlar CO₂ incubatörüne yerleştirilmiştir. 2 saat beklendikten sonra membranlar üzerindeki kültür ortamı uzaklaştırılarak boşluklara besi ortamı doldurulmuştur. Bu çalışma herbir membran için iki test düzeneği hazırlanarak yapılmıştır. Bu test düzeneklerinden birincisi 2 gün sonra ikincisi ise 5 gün sonra CO₂ incubatöründen alınarak sayım yapılmış ve membran yüzeyinde üreyen Endotel hücre sayısı tespit edilmiştir.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

PU Membranların Yapısal ve Kimyasal Analizi

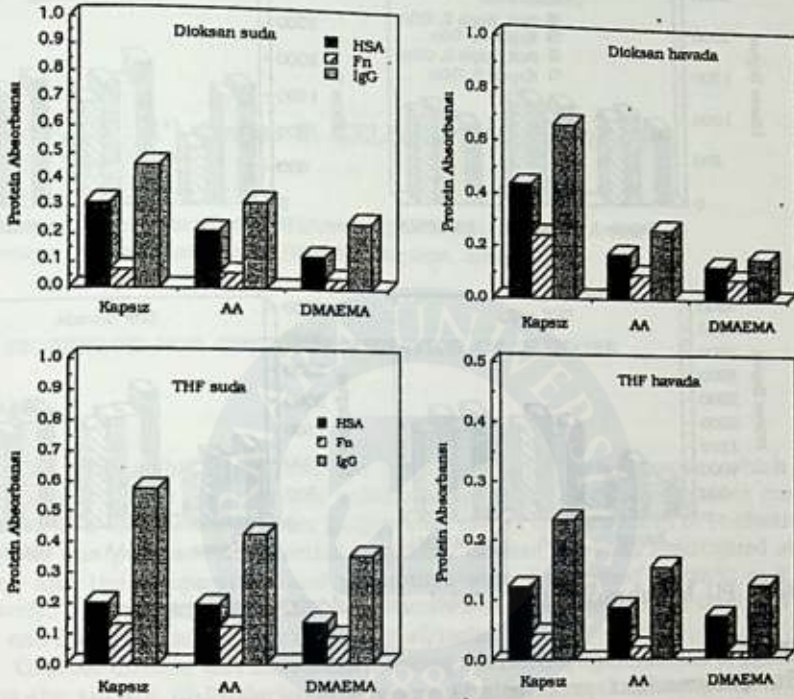
Çözücü döküm yöntemiyle hazırlanan PU membranların elektron mikroskopu ile incelenmesi sonucu, membranların yapısının, çözücü tipine, çöktürme ortamına ve plazma polimerizasyonu ile kaplanmasına bağlı olarak değiştiği bulunmuştur. Çöktürme ortamı olarak su-gliserin kullanıldığı durumda gözenekli heterojen yapıya ulaşıldığı, havada kurutulmuş çöktürüldüğü zaman ise gözeneksiz homojen membranların elde edildiği bulunmuştur. Yüzeylerin plazma polimerizasyonu ile modifiye edilen PU membranların kaplama sonucu tamamen kaplandığı ve gözenekli membranlarda tüm gözeneklerin kapandığı gözlenmiştir.

Protein Adsorpsiyon Sonuçları

Adsorpsiyonu incelenen Albumin, Fibronektin ve ImminoglobulinG proteinleri, biomateryal yüzeylerinin modifikasyonu amacıyla yaygın olarak kullanılmaktadır.

% 20 serum içeren kültür ortamından P.U. membranlar üzerine Albumin, Fibronektin ve ImminoglobulinG adsorpsiyon sonuçları Şekil 1'de verilmiştir.

Şekil 1'de görüldüğü gibi plazma polimerizasyonu ile modifiye edilen yüzeylerde Albumin, Fibronektin ve ImminoglobulinG adsorpsiyonu önemli ölçüde değişmektedir. ImminoglobulinG'nin bütün PU yüzeylerde en yüksek adsorpsiyon değerine ulaştığı, plazma ile modifiye yüzeylerde ise her üç proteinin düşük adsorpsiyon gösterdiği görülmektedir. Bu modifiye yüzeylerin yüksek hidrofilitateye sahip olmalarına bağlanabilir.



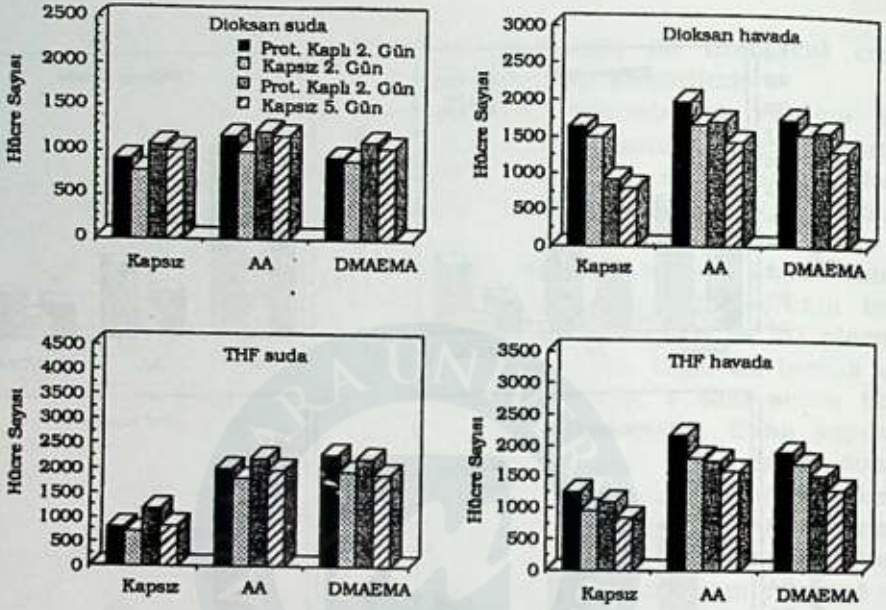
Şekil 1. PU membranlarda HSA, Fn ve IgG adsorpsiyonu

Endotel Hücre Çalışmaları Sonuçları

Endotel hücrelerin poliüretan membranlar üzerine yapışma deneylerinde elde edilen sonuçlar Şekil 2'de verilmiştir.

Şekilden görüldüğü gibi insan plazma proteinleri ile kaplanan yüzeylerde hücre büyümesi daha fazladır. Membran tipine bağlı olarak Endotel hücre yapışma ve büyüme değerlerinin değiştiği THF (suda) ve Dioksan (suda) grafiklerinde belirgin olarak görülmektedir. Bu farklılık membranların yapısal özelliklerine bağlanabilir. Yapılan çalışmalarda ayrıca protein ile kaplı membran yüzeylerinde hücre yapışmasının ikinci gün değerlerinde pek fazla değişmediği gözlenmiştir. Fakat Beşinci gün hücre sayımlarında protein ile kaplı yüzeylerdeki hücre sayısının daha çok olduğu bulunmuştur. Plazma polimerizasyonu ile modifiye olan tüm membran tiplerinde hücre büyümesinin fazla olduğuna dikkat edilmelidir. PU yüzeyler modifikasyon sonucu hidrofobik yapıdan hidrofilik yapıya kaymaktadır. Bunun sonucu, hücre yapışmasına ve büyümesine uygun yüzey elde edilmektedir.

Sonuç olarak; çözücü döküm yöntemiyle membran hazırlanmasında, çözücü tipinin veya çöktürme ortamının değiştirilmesi veya yüzeylerin plazma polimerizasyonu ile modifikasyonu ile protein ve hücre etkileşmesi değiştirilebilmektedir.



Şekil 2. PU Membranlarda Endotel hücrelerin Profilasyonu

TEŞEKKÜR

Bu çalışmadaki protein adsorpsiyonu ve endotel hücre deneyleri Twente Üniversitesi Kimyasal Teknoloji Fakültesinde (Enschede, Hollanda) gerçekleştirilmiştir. Deneylerin yapılmasında destek olan A.Poot, P.van Wachem, T. Beugeling ve diğer çalışma arkadaşlarına nazik yardımlarından ötürü teşekkürler.

KAYNAKLAR

1. Ferdinand Rodriguez "Principles of Polymer Systems", (1983), 25:2. ed.
2. Şerbetçi, A.İ., M.Sc. Thesis, H.Ü., Ankara, (1988).
3. R. E. Kesting., A Novel Technique for the study of Dry process membranes during their Nascent Phases, Ion Exch. Membranes, (1974),1: 197-204.
4. Kiremitçi, M., Pulat, M., Şenvar, C., Şerbetçi, A.İ., Pişkin, E., Attachment and growth on polyurethane surfaces, **Artificial Organs**, (1990), vol.14:3, 106-109
5. Klein-Soyer C, Hemmendinger Sand Jean-Pierre Cazenave S JP. Culture of human vascular endothelial cells on a positively charged polystyrene surface, primaria: comparison with fibronectin-coated tissue culture grade polystyrene. **Biomaterials**, (1989);10: 85-90.
6. Van Wachem P B, Hogt A H et. al. Adhesion of cultured human endothelial cells onto methacrylate polymers with varying surface wettability and charge, **Biomaterials**, (1987); 8:323-8.

GLİKOZ TAYİNİ İÇİN YENİ BİR BİYOSENSÖR

Pınar ERDOĞDU (*), Serdar S. ÇELEBİ (*), Meral ARCA (**)
ve Attila YILDIZ (**)

(* Hacettepe Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, Beytepe, Ankara

(**) Hacettepe Üniversitesi, Kimya Bölümü, Beytepe, Ankara

A NEW BIOSENSOR FOR THE DETERMINATION OF GLUCOSE

SUMMARY

The aim of this study was the preparation of a new biosensor which can analyze the glucose in the aqueous solutions by means of glucose oxidase enzyme immobilized in a conductive polymer (polypyrrole) matrix on the surface of Pt-electrode.

For this purpose, the kinetics of glucose oxidase has been investigated at the first step and the temperature and pH optima were determined as 25°C and 5.5, respectively. It was found that Michaelis constant (K_m) of free enzyme was 23.3 mM glucose and the activation energy was 3.5 kcal/mole.

Glucose oxidase was immobilized during the electropolymerization of pyrrole at 0.8 V on the surface of Pt-electrode versus saturated calomel electrode (SCE). The maximum current of 30 μ A has been measured amperometrically at 0.7 V by this enzyme electrode in a 100 mM buffered glucose solution at pH of 7 and the temperature of 25°C. The linearity of this biosensor was in the range of 1-10 mM glucose concentrations and the response time of it was 45-60 s. It was determined that the activity lifetime of the enzyme electrode was app. 50 days in 52 assays. With these characteristics, this biosensor is better than the other biosensors in the literature.

In addition, apparent K_m and the activation energy values of immobilized glucose oxidase in polypyrrole film were 40.5 mM glucose and 5.3 kcal/mole, respectively. The higher values of these kinetic parameters for immobilized enzyme show that the internal diffusion limitations in polypyrrole matrix and some conformational changes on the enzyme molecule with immobilization are possible.

ÖZET

Bu çalışmada, glüköz oksidaz enziminin Pt elektrot yüzeyinde iletken bir polimer olan polipirrol matrisi içinde immobilize edilmesiyle sulu çözeltide glüköze duyarlı bir biyosensörün hazırlanması amaçlanmıştır.

Bu amaçla öncelikle glüköz oksidaz enziminin serbest haldeki kinetik özellikleri incelenmiş ve optimum pH 5.5, optimum sıcaklık 25°C olarak saptanmıştır. Serbest enzimin Michaelis sabitinin 23.3 mM glüköz ve aktivasyon enerjisinin de 3.5 kkal/mol olduğu bulunmuştur.

Çalışmada doygun kalomel elektroda karşı 0.8 V sabit potansiyelde, Pt elektrot yüzeyinde pirrolün elektropolimerizasyonu ile glüköz oksidaz enzimi immobilize edilmiştir. Hazırlanan elektrodun pH 7.0, 0.1 M K_3PO_4 - H_3PO_4 tampon sisteminde, 25°C sıcaklıkta, 0.7 V'da amperometrik olarak çalıştırılmasıyla 100 mM glüköz derişimi için 30 μ A maksimum akım elde edilmiştir. Elektrodun doğrusal çalışma aralığı 1-10

mM glikoz olup, cevap süresi 45-60 s aralığında değişmektedir. Ayrıca hazırlanan elektrot 50 gün süreyle toplam 52 ölçümde aktivitesini korumaktadır. Geliştirilen biyosensör bu özellikleriyle literatürdeki diğer biyosensörlerden daha ileri düzeydedir.

Polipirol filmi içinde immobilize edilmiş glikoz oksidaz için görünür Michaelis sabiti $K_{mg} = 40.47$ mM glikoz ve aktivasyon enerjisi $E_A = 5.3$ kkal/mol olarak saptanmıştır. Bu değerlerin serbest enzimin değerlerine göre yüksek olması polipirol-enzim sisteminde difüzyon kısıtlamalarını ve enzimde bazı konformasyonel değişimler olduğunu göstermektedir.

GİRİŞ

1962 yılında ilk enzim elektrot fikrinin ortaya atılmasıyla başlayan ve sonraki yıllarda hızla gelişen biyosensörler, enzim, doku, biyolojik membran komponentleri gibi biyoajanları immobilize halde kullanan sistemlerdir. Özellikle temel ve klinik amaçlı teşhis ve tayinlerde, çevre kirliliğinin izlenmesinde, endüstriyel gaz ve sıvıların analizinde, biyoteknolojide fermentasyon analiz ve kontrolünde kullanılabilen biyosensörler, son yılların en çok araştırılan konularından olmuştur.

Bu çalışmada, özellikle diabetik hastalar için ve fermentasyon, gıda endüstrilerinde önemli olan glikozu tayin etmekte yeni bir biyosensörün geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu amaçla glikoz oksidaz enzimi elektropolimerizasyon ile iletken özelliğe sahip polipirol matrisi içinde immobilize edilmiştir.

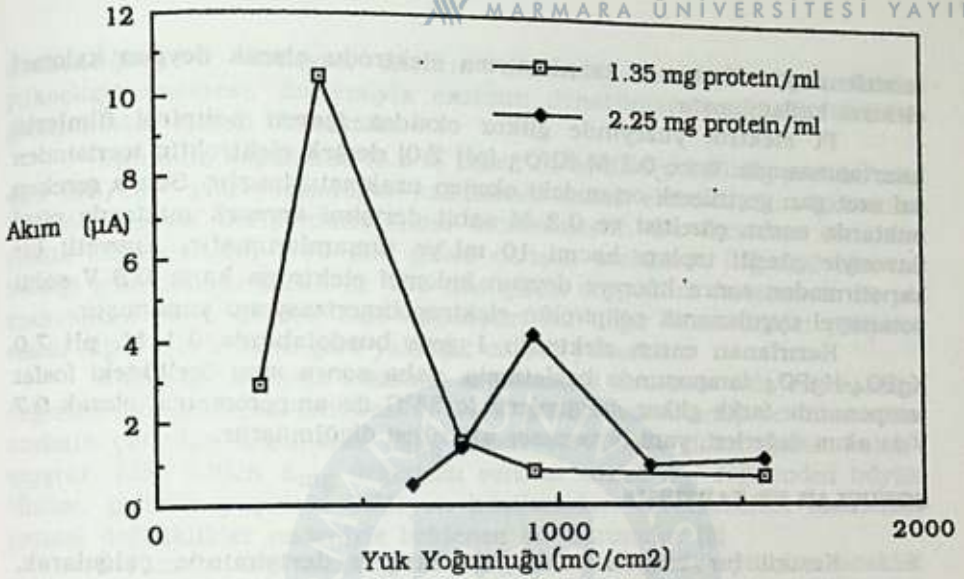
Immobilize glikoz oksidaz elektrodunun hazırlanması sırasında, enzimlerin ortamın pH'na bağlı olarak farklı yük kazanmasından ve pirolün polimerizasyon mekanizmasından yararlanılmıştır. Dört pirol monomeri, elektropolimerizasyon sırasında, bir (+) yük oluşturmaktadır. Glikoz oksidaz enziminin izoelektirik noktası pH 4.2 olduğundan bu değer in üstündeki pH'larda (-) yüklenen ortamdaki enzimin, pirolün elektropolimerizasyonu sırasında yapıya girmesiyle immobilizasyonu sağlanmıştır.

Biyosensörlerin karşılaştırılmasında dört önemli kriter vardır: Elektrot aktivitesi, aktif ömrü, doğrusallık aralığı ve cevap süresi. Bu çalışmada, polimerik destek olarak seçilen polipirolun iletkenliğinden yararlanılarak yüksek aktivite veren ve yukarıdaki özellikleri de literatürle kıyaslanabilir düzeyde olan bir biyosensörün geliştirilmesine çalışılmıştır.

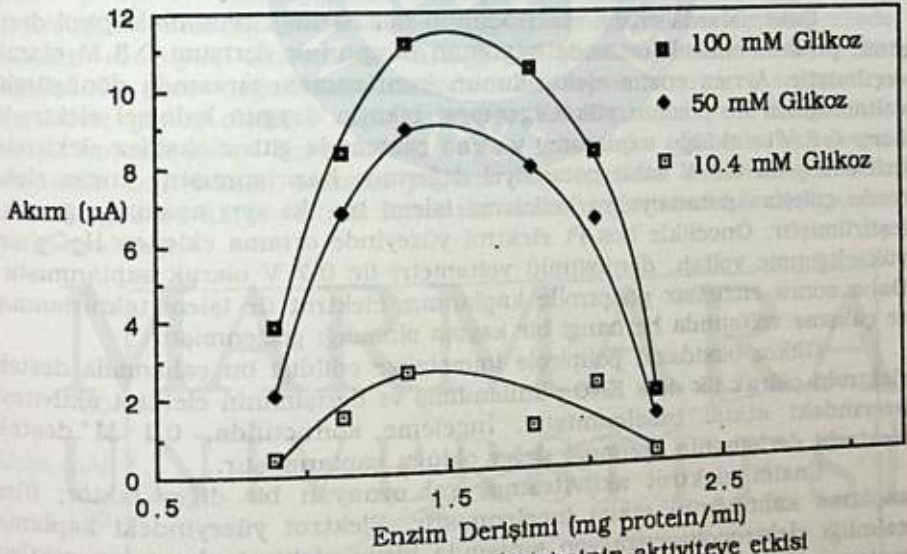
DENEL BÖLÜM

Biyosensör hazırlanmasında kullanılan serbest glikoz oksidaz enziminin kinetiği, karıştırma hızı, sıcaklığı ve ortam pH'sı kontrol edilebilen kesikli bir reaktörde incelenmiştir. Reaksiyon, oluşan glukonik asitin pH-stat sistemiyle nötralizasyonu ile izlenmiştir.

Enzim elektrodunun hazırlanmasında ve aktivitesinin belirlenmesinde potansiyostat/galvanostat cihazına bağlı üç elektrot sistemi kullanılmıştır. Çalışma elektrodu olarak 0.32 cm^2 ve karşılaştırma elektrodu olarak 1.5 cm^2 alana sahip Pt levha elektrotlar kullanılmıştır. Çalışma elektrodu her kullanımdan önce yakulmuş, sonra su ile bulamaç haline getirilmiş Cr_2O_3 ile ovularak ve sonikasyona tabi tutularak su ile



Şekil 1. Yük yoğunluğunun (film kalınlığının) aktiviteye etkisi



Şekil 2. Kaplama ortamı enzim derişiminin aktiviteye etkisi

Elektropolimerizasyon ortamındaki enzim derişiminin aktiviteye etkisi incelenmiş ve ilginç sonuçlar elde edilmiştir. Enzim derişiminin 0.9-1.35 mg protein/ml değerleri arasında artırılmasıyla elektrot aktivitelerinde bir artış olmakta, ancak daha yüksek enzim derişimlerinde (1.35-2.25 mg protein/ml.) aktivitede azalma görülmektedir (Şekil 2). Derişim artışıyla film içine giren enzim miktarının arttığı floresans ölçümleriyle saptanmıştır. Buna rağmen aktivitede gözlenen bu azalma büyük ölçüde poliprol yapısındaki değişmelerden ileri gelebilir. Bu değişmeler sonucu: 1. Glüközün difüzyonuna karşı gösterilen direncin artması, 2. Başlangıçta yüksek hızda oluşan H_2O_2 'in poliprol yapısındaki enzim miktarı artışıyla,

temizlenmiştir. Sistemde karşılaştırma elektrodu olarak doygun kalomel elektrot kullanılmıştır.

Pt elektrot yüzeyinde glikoz oksidaz içeren polipirol filmlerin hazırlanmasında; önce 0.1 M KNO_3 (pH 7.0) destek elektrolitün içerisinden saf azot gazı geçirilerek ortamdaki oksijen uzaklaştırılmıştır. Sonra gereken miktarda enzim çözeltisi ve 0.3 M sabit derişimi verecek miktarda pirol ilavesiyle çözelti toplam hacmi 10 ml.'ye tamamlanmıştır. Kuvvetli bir karıştırmadan sonra hücreye doygun kalomel elektroda karşı 0.8 V sabit potansiyel uygulanarak polipirolün elektropolimerizasyonu yapılmıştır.

Hazırlanan enzim elektrodu 1 gece buzdolabında 0.1 M, pH 7.0 $K_3PO_4-H_3PO_4$ tamponunda bekletilmiş, daha sonra aynı özellikteki fosfat tamponunda farklı glikoz derişimlerinde 25°C de amperometrik olarak 0.7 V'da akım değerleri, yani biyosensör aktivitesi ölçülmüştür.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Kesikli bir reaktörde doygun oksijen derişiminde çalışılarak, serbest glikoz oksidaz için optimum sıcaklık 25°C, optimum pH 5.5 ve K_m 23.3 mM glikoz olarak saptanmıştır.

Çalışmalarda enzim elektrodunun hazırlandığı ortamdaki pirol derişimi, pirolun enzimli ortamda saptanan doygunluk derişimi 0.3 M olarak seçilmiştir. Ayrıca enzim elektrodunun hazırlanması sırasında dönüşümlü voltamogram ile pirolun yükseltgenmesi pikinin doygun kalomel elektroda karşı 0.8 V'ta olduğu saptanmış ve tüm çalışmada glikoz oksidaz elektrodu belirlenen bu 0.8 V sabit potansiyel değerinde hazırlanmıştır. Enzim elektrodu çalışma potansiyelini belirleme işlemi ise iki ayrı aşamada gerçekleştirilmiştir. Öncelikle boş Pt elektrot yüzeyinde ortama eklenen H_2O_2 'nin yükseltgenme voltajı, dönüşümlü voltametri ile 0.7 V olarak saptanmıştır. Daha sonra enzimsiz polipirolle kaplanmış elektrot ile işlem tekrarlanmış ve çalışma voltajında herhangi bir kayma olmadığı gözlenmiştir.

Glikoz oksidazın polipirole immobilize edildiği bu çalışmada destek elektrolit olarak ilk defa KNO_3 kullanılmış ve derişiminin elektrot aktivitesi üzerindeki etkisi incelenmiştir. İnceleme sonucunda, 0.1 M destek elektrolit derişiminin optimum değer olduğu saptanmıştır.

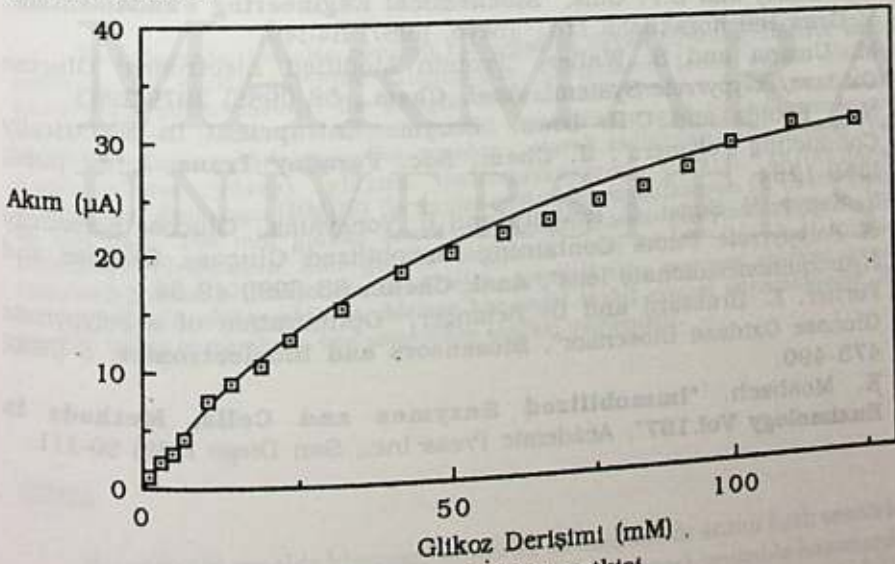
Enzim elektrot aktivitesinde rol oynayan bir diğer faktör; film kaplama kalınlığının etkisi incelenmiştir. Elektrot yüzeyindeki kaplama kalınlığı elektropolimerizasyon sırasında birim elektrot alanından çekilen toplam yük miktarıyla (yük yoğunluğu, mC/cm^2) orantılı olmaktadır [1]. Farklı iki enzim derişiminde değişik kalınlıklarda hazırlanan elektrotlardan alınan aktivitenin değerlendirilmesiyle farklı optimum kalınlıklar saptanmıştır. 1.35 mg protein/ml enzim derişiminde $460 mC/cm^2$ yük yoğunluğu, 2.25 mg protein/ml derişiminde ise $938 mC/cm^2$ yük yoğunluğu ile optimum kalınlıklar elde edilmiştir (Şekil 1). Öte yandan çeşitli film kalınlıklarında, değişik glikoz derişimlerinde ölçülen aktivitelerin değerlendirilmesiyle immobilize enzim görünür Michaelis sabitleri (K_{mg}) bulunmuştur. Polipirol film kalınlığı artışıyla K_{mg} değerlerinin de arttığı saptanmıştır. Bu sonuç polipirol-enzim sisteminde difüzyon kısıtlamalarının önemli olduğunu gösterir.

iletkenliğin ve difüzyon hızının düşmesi nedeniyle aynı hızda yükseltgenememesi, dolayısıyla enzimin denatürasyonu düşük aktivite gözlenmesine neden olmaktadır.

Optimum koşullarda (0.3 M pürol, 0.1 M KNO_3 , 1.35 mg protein/ml., 406 mC/cm^2 yük yoğunluğu) hazırlanan enzim elektrodunun aktivitesi üzerinde glikoz derişiminin etkisi incelenmiştir. Bu inceleme sonunda enzim elektrodunun 1-10 mM glikoz derişim aralığında doğrusal aktivite verdiği gözlenmiştir (Şekil 3). 100 mM glikoz doygunluk derişiminde 30 μA maksimum akım şiddeti elde edilmiştir. Bu değer literatürdeki polipirol esaslı diğer elektrotlara göre yaklaşık on kez yüksektir.

Glikoz derişiminin etkisinin incelenmesi sırasında elde edilen akım değerleri kullanılarak Lineweaver-Burk grafiği hazırlanmış ve immobilize enzimin çalışılan koşullarda K_{mg} değeri 40.47 mM glikoz olarak bulunmuştur. Elde edilen K_{mg} değerinin serbest enzim K_m değerinden büyük olması, polimer yapıdaki difüzyon kısıtlamaları ve enzimdeki muhtemel yapısal değişiklikler nedeniyle beklenen bir durumdur [2].

Ölçüm ortamı sıcaklığının etkisi incelendiğinde optimum sıcaklık hem serbest hem de immobilize glikoz oksidaz için 25°C olarak bulunmuş, ancak polipirol filmde immobilizasyonla termal kararlılığın arttığı görülmüştür. Enzimin substratına doymun olduğu glikoz derişimlerinde, sıcaklık artışıyla aktivitenin arttığı bölgedeki verilerin Arrhenius bağıntısına göre değerlendirilmesiyle aktivasyon enerjileri serbest ve immobilize glikoz oksidaz için sırasıyla 3.5 kkal/mol ve 5.3 kkal/mol olarak bulunmuştur. Immobilize enzim için daha yüksek aktivasyon enerjisinin bulunması, enzimin polimer yapı içindeki konformasyonunun substratı glikozu karşı serbest formdaki kadar uygun olmadığı düşüncesini uyandırmaktadır.



Şekil 3. Glikoz derişiminin aktiviteye etkisi

Hazırlanan enzim elektrodu aktivitesi kadar, bu aktivitenin sürçkliliği de elektrodun pratik kullanımı açısından önemlidir. Optimum

koşullarda hazırlanan enzim elektrodunun 50 gün süreyle 52 ölçümde aktivitesini koruması önemli bir sonuç olarak karşımıza çıkmaktadır. Genel olarak literatürde glikoz biyosensörleri için aktif çalışma süreleri 15-20 gün olarak verilmektedir [3,4,5]. Sadece Fortier ve arkadaşlarının hazırladığı elektrodun aktif ömrü 80 gündür [6]. Ancak sözkonusu çalışmada ölçüm sayısı verilmediğinden tam bir karşılaştırma yapılamamaktadır.

Ayrıca optimum koşullarda hazırlanan enzim elektrodu için optimum ölçüm koşullarında alınan cevap süresi 45-60 s. aralığında değişmektedir. Bu değer literatürdeki diğer örneklerin cevap süreleriyle uyum içerisindedir [7].

Biyosensörün hazırlanmasında glikoz oksidaz immobilizasyonunda destek maddesi olarak kullanılan iletken polimer polipirrolun enzimsiz durumdaki iletkenliği "Four Probe" yöntemi ile 2.5 S/cm olarak saptanmıştır. Optimum koşullarda hazırlanmış glikoz oksidaz içeren polipirrol filmin iletkenliği ise, 12 kez azalarak 0.21 S/cm değerine düşmektedir. Beklentilerimize uymayan bu derece bir düşüş, özellikle yüksek enzim derişimlerinde hazırlanan elektrotlarda gözlenen düşük aktivitenin nedeni olarak gözükmektedir. Oluşan H_2O_2 'nin difüzyon kısıtlaması ve düşük iletkenlik nedeniyle aynı hızla yükseltgenememesi, enzimde denatürasyona yol açmaktadır.

KAYNAKLAR

1. S. Holdcroft and B.L. Font, "Preparation and Electrocatalytic Properties of Conducting Films of Polypyrrole", *J. Electroanal. Chem.*, 240 (1988) 89-103.
2. J.E. Bailey and D.F. Ollis, "Biochemical Engineering Fundamentals", McGraw-Hill Kogakusha Ltd., Tokyo, (1987) 84-149.
3. M. Umana and S. Waller, "Protein Modified Electrodes: Glucose Oxidase/Polypyrrole System", *Anal. Chem.*, 58 (1986) 2979-2983.
4. N.C. Foulds and C.R. Lowe, "Enzyme Entrapment in Electrically Conducting Polymers", *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, 82 (1986) 1259-1264.
5. Y. Kajiya, H. Sugai, C. Iwakura and H. Yoneyama, "Glucose Sensitivity of Polypyrrole Films Containing Immobilized Glucose Oxidase and Hydroquinonesulfonate Ions", *Anal. Chem.*, 63 (1991) 49-54.
6. Fortier, E. Brassard and D. Belanger, "Optimization of a Polypyrrole Glucose Oxidase Biosensor", *Biosensors and Bioelectronics*, 5 (1990) 473-490.
7. K. Mosbach, "Immobilized Enzymes and Cells, Methods in Enzymology Vol.137", Academic Press Inc., San Diego 1988) 90-111.

YÜZEYİ MODİFİYE EDİLEN POLİKARBONAT MEMBRAN İLE GELİŞTİRİLEN ENZİM ELEKTRODU

Selma MUTLU ve Erhan PIŞKIN

*Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü
Beştepe - Ankara - Türkiye*

A SURFACE MODIFIED POLYCARBONATE MEMBRANE FOR ENZYME ELECTRODES

SUMMARY

In this study, glucose determination have been studied by the amperometric enzyme electrode based on dedection of the hydrogen peroxide. The main purpose of the study is to improve the linearity of the electrode. The modification of the outer membrane limiting the substrate difusion in the membrane-enzyme-membrane combination is aimed. The surface of the polycarbonate (PC) membranes that was using as an outer membrane were treated with hydroxymetyldisiloxane (HMDS) by plasma polymerization technique. The lineer range was extended from 40 mM to 100 mM of glucose concentration. The selectivity test were also performed for inner membrane to avoid interferences during native blood contact.

ÖZET

Bu çalışmada, hidrojen peroksit tanınmasına dayalı bir amperometrik enzim elektrodu ile glukoz tayinine çalışılmıştır. Çalışmanın temel amacı elektrot lineeritesini geliştirmektir. Bu amaçla substrat difüzyonunu kısıtlayıcı tabaka olarak bilinen membran-enzim-membran kombinasyonundaki dış membranın modifikasyonuna çalışılmıştır. Dış membran olarak kullanılan polikarbonat (PC) membranların yüzeyi plazma polimerizasyonu tekniği kullanılarak hidroksimetildisiloksan (HMDS) ile kaplanmıştır. Bu modifikasyon ile lineer aralık 40 mM dan 100 mM glukoz konsantrasyonuna kadar genişletilmiştir. Ayrıca hazırlanan elektrodun kan glukoz seviyesini test etmek için kullanılması amaçlandığından alt membranın hidrojen peroksit için geçirgen olurken kanda mevcut organik elektroaktif maddelere bir engel teşkil etmesi istenmektedir. Bu düşünce ile de iç membran için selektivite testleri yapılmıştır.

GİRİŞ

Son yıllarda genelde kimyasal sensörler ve özellikle de enzim bazı sensörler hızlı bir teknolojik gelişim göstermiştir(1). Metabolik olarak unstable hastalarda, hem metabolitlerin real-time analizi ve hem de bed-side taki in-vitro analizlerin hızlı olmasının gerçekleştirilmesinde diagnostik tıbbın sensör teknolojisine

duyduğu ticari ilgi doğal olarak bu yöndeki gelişimi hızlandırmıştır(2).

İlk fonksiyonel enzim elektrot, enzim tutturulmuş bir jel tabakası ile kaplı bir oksijen sensöründen oluşmaktaydı. Böylesi klasik sistemlerde dış membrandan enzim tabakasına diffüze olan analit, enzim tabakasında elektrokimyasal olarak tanınan birimlerin harcanması ya da üretimi ile enzimle reaksiyona girer(3).

Elektrot üzerinde yer alan üç tabakalı membran-enzim-membran kombinasyonu, elektrodu karakterize etmektedir. Elektrot, çalışma amacına göre bir lineer substrat konsantrasyonu-cevap ilişkisini vermelidir. Kombinasyonda yer alan dış membran substrat diffüzyonunu kısıtlayıcı bir kabaka oluşturmaktadır(4). Substrat difüzyonunun kontrolü ile ürün oluşum hızı kontrol edilmekte ve bu şekilde elektrodun cevabına gidilmektedir. Bu çalışmada kandaki glukoz tayinini sağlayan glukoz elektrodu geliştirilmeye çalışılmıştır. Burada membran/enzim kombinasyonda yer alan alt membranın enzimatik reaksiyon sonucu oluşan hidrojen peroksit için geçirgen, ancak kanda bulunan organik elektroaktif interferantlara bir engel olarak çalışması gerekmektedir.

Bu çalışmada dış membran, plazma polimerizasyonu kullanılarak hidroksimetildisiloksan ile modifiye edilmiş ve bu modifiye membranlar ile elektrodun lineer çalışma aralığı genişletilmiştir. Çalışmanın diğer bir kısmında ise yarı geçirgen alt membran seçimi için elektroaktif maddeler ile membran örneklerinde selektivite testleri yapılmıştır.

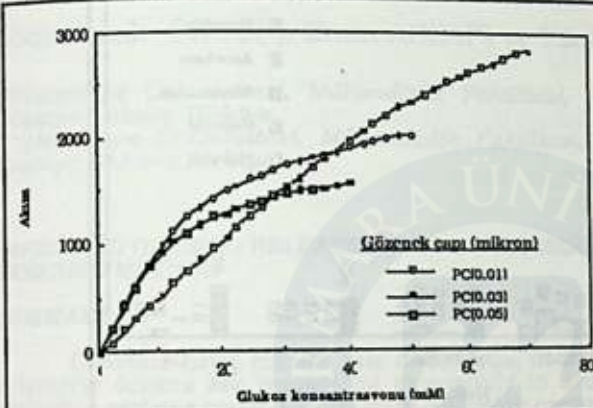
DENEL BÖLÜM

Araştırma, kandaki glukoz analizine yönelik yapılan çalışmaları kapsamaktadır. Bu amaçla bir Rank oksijen elektrodu kullanılmıştır (5). Elektrot, referans olarak 12 mm çaplı bir dış gümüş halkası ile merkezde 2 mm çaplı bir platin çalışma elektrodundan oluşmaktadır. Elektrot, peroksit tanımlanması için 650 mV da polarize edilmiştir. Elektrodan alınan sinyaller bir potensiyostatta gözlenirken buna bağlı bir yazıcıda alınan sinyaller kayıt edilmektedir.

Çalışmanın ilk kısmında polikarbonat membran, enzim tabakası ve diffüzyon kısıtlayıcı tabaka olarak bir polikarbonat membrandan oluşan kombinasyonlar kullanıldı. Polikarbonat membranlar Poretics firmasından temin edildi. Membran/enzim kombinasyonlarının hazırlanmasında iki membran arasına ilave edilen enzim çözeltisi iki mikroskop camı arasında 5 dakika kadar sıkıştırıldı. Enzim bağlama, enzim çözeltisine sığır serum albumin katkısı ile glutaraldehit varlığında ikili çapraz bağlanma olarak gerçekleştirilmiştir. İkinci aşamada, polikarbonat membranın yüzey modifikasyonuna çalışıldı. Bunun için plazma polimerizasyon tekniği kullanılarak membran yüzeyleri hidroksimetildisiloksan ile kaplandı. Önceki aşamada olduğu gibi membran-enzim-modifiye membran kombinasyonları hazırlandı. Değişen substrat konsantrasyonu ile elektrodun cevabı kaydedildi.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

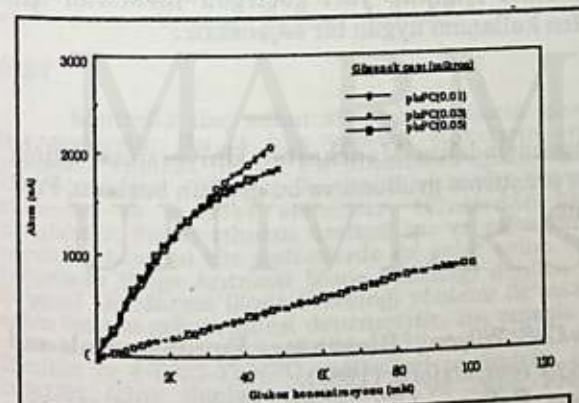
Yapılan iki kısımlı çalışma ile substrat konsantrasyonuna karşı elektrot cevabının değerlendirilmesini veren kalibrasyon eğrileri elde edilmiştir. Şekil 1. de üç farklı gözenek çapına sahip polikarbonat membranlar ile hazırlanan



Şekil 1. Membran/Enzim/Membran Kombinasyonu ile hazırlanan elektrodun lineeritesi

membranların daha geniş bir lineer substrat konsantrasyonu-cevab ilişkisi göstermesini sağlamaktadır.

Plazma polimerizasyonu ile yüzeyi modifiye edilen polikarbonat membranların varlığında oluşturulan elektrot



Şekil 2. Membran/Enzim/Modifiye membran Kombinasyonu ile hazırlanan elektrodun lineeritesi

Yüzeyin modifikasyonu ile her kademedeki response düşmekte ve elektrodun doygunluk değerine geç ulaşmakta dolayısıyla lineer aralık artmaktadır.

Bu elektrotların hazırlanmasında yalnız yüzey modifikasyonunun etkisinin gözlenmesi ve artan lineer aralığa ulaşmak amacıyla üst membran modifikasyonuna gidilmiş ve alt membran olarak her iki kombinasyonlarda da

membran /enzim kombinasyonlarını

içeren elektrodun glukoz konsantrasyonu-cevab ilişkisi görülmektedir.

Grafikten görüldüğü gibi gözenek çapının

küçülmesi ile difüzyon kısıtlaması artmakta ve

belirli bir glukoz konsantrasyonuna

karşı elektrottan alınan sinyalin boyutu

düşmektedir. Bu sonuç,

0.01 mm gözenek çaplı polikarbonat

cevapları ise Şekil 2. de

görülmektedir. Yüzeje ince

hidroksimetildisi-loksan

kaplanması ile yüzey

modifikasyonu, substrat

difüzyonunu kısıtlayıcı bir

etki yaparak elektrodun

gözlenen lineer

konsantrasyon - cevab

ilişkisini genişletmiştir.

Elektrot üzerine kademe

kademe yapılan substrat

yüklemesi ile elektrodun

cevabı alınmakta ve bu

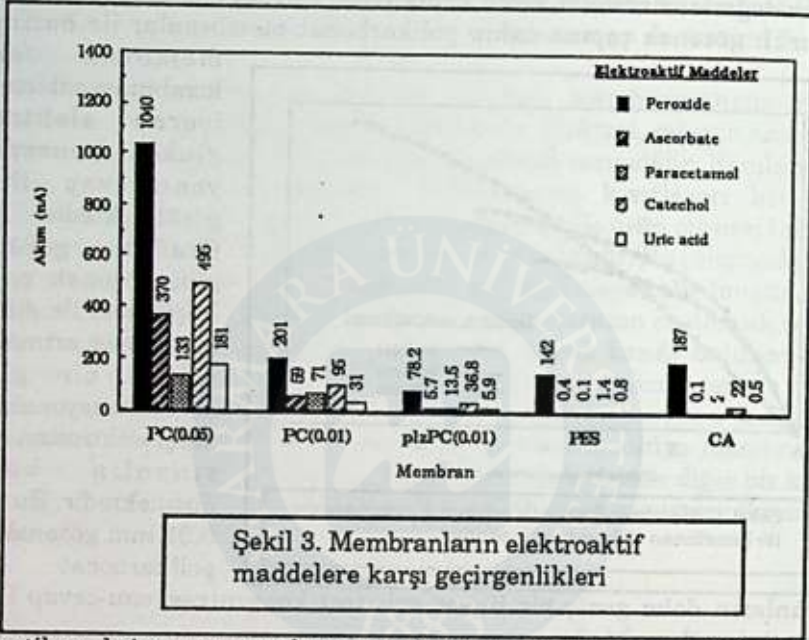
veriler yukarıda verilen

grafikler şeklinde

değerlendirilmektedir. -

polikarbonat membran kullanılmıştır. Polikarbonat membran kan çalışmalarında peroksit için selektif özellik gösteren bir yapıya sahip değildir.

Yarıgeçirgen membran seçimi için elektroaktif interferantlar ile yapılan deney sonuçları Şekil 3. de görülmektedir. Elektrodun çalışmasında istenen,



enzimatik reaksiyon sonucu oluşan peroksitin tanımlanmasıdır. Polietersulfonun diğer elektroaktif maddeler yanında peroksit için seçici bir geçirgenliğe sahip olduğu görülmektedir. Bu analiz ışığında yarı geçirgen membran için kombinasyonlarda polietersulfon kullanımı uygun bir seçenektir.

TEŞEKKÜR

Bu konuda ilk çalışmalarına başladığım Manchester Üniversitesi Klinik Biyokimya Bölümü Biyosensor araştırma grubuna ve bu grubun başkanı, Prof. P. Vadgama'ya teşekkür ederim.

KAYNAKLAR

1. A. P. F. Turner, I. Karube ve G. S. Wilson, "Biosensors Fundamentals and Applications", Oxford university Press, Oxford, (1987).
2. D. R. Matthews, R. R. Holman, E. Bown, J. Steemson, A. Watson, S. Hughes, ve D. Scott, "Lancet", 1 (1987) 778.
3. S. J. Updick ve G. P. Hicks, "Nature", London, 214 (1967) 986.
4. P. Vadgama, "Diffusion Limited Enzyme Electrodes" in Analytical Uses of Immobilized Biological Compounds for Detection, Medical and Industrial Uses, G. G. Guilbault and M. Mascini (eds.), D. Reidel Publishing Company, (1988) 359-377.
5. L. X. Tang, Z. B. Koochaki ve P. Vadgama, "Composite liquid membrane for enzyme electrode construction", Analytica Chimica Acta, 232 (1990) 357-365.

POLİMERİK MATRİKS TİPİ TAŞIYICILARIN İLAÇ SALIM HIZININ "ZONE FREEZING" YÖNTEMİ İLE GELİŞTİRİLMESİ

Abdurrezak ÖNCÜ(*), Emin ARCA(*) ve Yılmaz KAPTAN(**)

(*)Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü,
Beytepe-Ankara-Türkiye

(**)Hacettepe Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Fizik Mühendisliği Bölümü,
Beytepe-Ankara-Türkiye

IMPROVING OF DRUG RELEASE RATE OF POLYMERIC MATRIX DEVICES BY ZONE FREEZING METHOD

SUMMARY

Constant drug release rate is essential in controlled drug release systems. Polymeric devices are researched extensively in drug release, in which diffusion controlled systems cover most of them. Diffusion controlled systems can be divided by two as membrane controlled systems and matrix systems. It can be reached to constant release rate in former systems, but devices are hard to fabricate and expensive. On the contrary, it is easy and cheaply to produce matrix devices but mostly one cannot have constant release rate. In this study, it is tried to develop constant release in matrix systems by Zone Freezing method which is part of Zone Refining. In experiments A hydrophilic polymer, polyhydroxyethylmethacrylate, (pHEMA) and Theophylline and 4-OXO-TEMPO radicals are used as polymer matrix and sample drugs respectively. Drugs are impregnated in cylindrical pHEMA devices. After that, release rates are experimented from both zone-frozen devices and non-frozen devices. As a result, it is proved that it is possible to change the release from the same type of matrix devices by zone -freezing method.

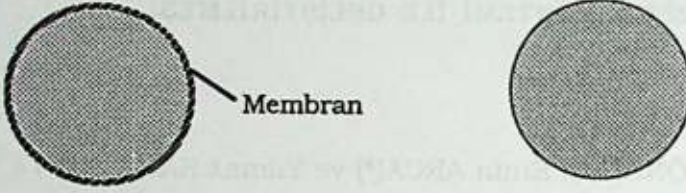
ÖZET

Kontrollü ilaç salın sistemlerde ilacın cihazdan sabit bir hızla salınması istenmektedir. Bu iş için yapılan cihazların en yaygın olarak araştırılanları polimerik cihazlar ve bu tür cihazların içinde de önemli yeri difüzyon kontrollü sistemler tutar. Difüzyon kontrollü sistemler ikiye ayrılabilir. Membran kontrollü sistemler ve matris sistemler. Bunlardan birincisinde sabit salım hızına ulaşılabilir. Fakat cihazın üretimi zor ve pahalıdır. İkinci tür sistemler ise kolay yapılırlar ama bu tür sistemlerde de sabit salım hızına ulaşılması zordur. Yapılan çalışmada Bölge Arıtması (Zone Refining) denilen yöntemin, bir uygulaması olan Bölgesel Dondurma (Zone Freezing) yöntemi ile matris tipi sistemlerde cihazın ilaç salım hızının geliştirilmesi denenmiştir. Bu amaçla yapılan deneylerde hidrofilik bir polimer olan poliHidroksiEtilMetakrilat pHEMA kullanılmış, örnek ilaç olarak da Teofillin ve 4-OXO-TEMPO radikalleri seçilmiştir. pHEMA'dan hazırlanan silindirik cihazlar içine ilaçlar emdirilmiş ve Zone Freezing yöntemi uygulanan ve uygulanmayan cihazlardan salım incelenmiştir. Deneyler sonucunda Zone Freezing yöntemi ile aynı matris tipi cihazdan ilacın salım hızının değiştirilebileceği saptanmıştır.

GİRİŞ

Şekil 1.a'da görülen sistemde etrafı polimerik membranla kaplanmış bir depoda doymuş ilaç çözeltisi ve fazladan katı ilaç bulunmaktadır. Bu sayede

İç derişim daima sabit kaldığından ilacın salım hızını membrandan

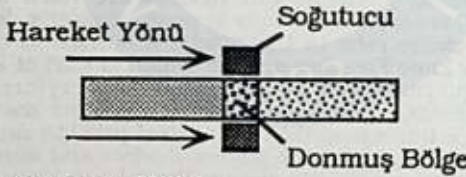


a. Membran tipi cihaz

b. Matriks tipi cihaz

Şekil 1. Difüzyon kontrollü polimerik ilaç salım cihazlarının şematik görünümü

difüzyon hızı belirler. Böylece uzun süreler için sabit salım hızı elde edilebilir. Şekil 1.b'de görülen matriks tipi cihazda ise ilaç başlangıçta polimerik matriks içinde homojen olarak dağıtılmış ya da çözülmüştür. Burada da ilacın salım hızını kontrol eden basamak ilacın polimer içindeki difüzyonudur. Önce cihazın dış kısmındaki ilaç molekülleri dışarıya difüzyonlanır. Sonra, matriks içinde gitmesi gereken yol daha uzun olduğu için, iç kısımdaki ilaç molekülleri daha geç sürelerde difüzyonlanır. Böylece birim zamanda salınan ilaç miktarı azalır ve sabit bir hıza ulaşamaz. Bunun yanısıra matriks sistemlerin üretimi kolay ve ucuzdur.⁽¹⁾



Şekil 2. Zone Freezing yöntemi

Zone Freezing yöntemi kabaca şöyle tarif edilebilir. İçine çözelti doldurulmuş bir tüp etrafına çözeltiyi donduracak şekilde tasarlanmış bir aygıt (örneğin sıvı azot doldurulmuş yüksük şeklinde bir kap) tüp boyunca yavaş yavaş hareket ettirilir. Ya da basitçe, tüp, içindeki çözeltiyi donduracak bir ortama yavaş yavaş daldırılır. Bu sırada çözünen maddenin ya katı-sıvı ara yüzeyine doğru hareket etmeye, ya da bu yüzeyden uzaklaşmaya eğilimi vardır. Bu eğilim şöyle belirlenir. Eğer çözünen madde çözeltinin donma noktasını düşürüyorsa donmuş bölgeden uzaklaşma eğilimi vardır, başka bir deyişle donmuş bölge ile aynı yönde ilerler. Çözünen madde çözeltinin donma noktasını yükseltiyorsa, donmuş bölgeye yaklaşma eğilimi vardır.^(2,3) Pratikte bir çok çözücü-çözünen sistemi için birinci durum geçerlidir.

Zone Freezing prensiplerinden yola çıkılarak aşağıdaki varsayımlar yapılmıştır.

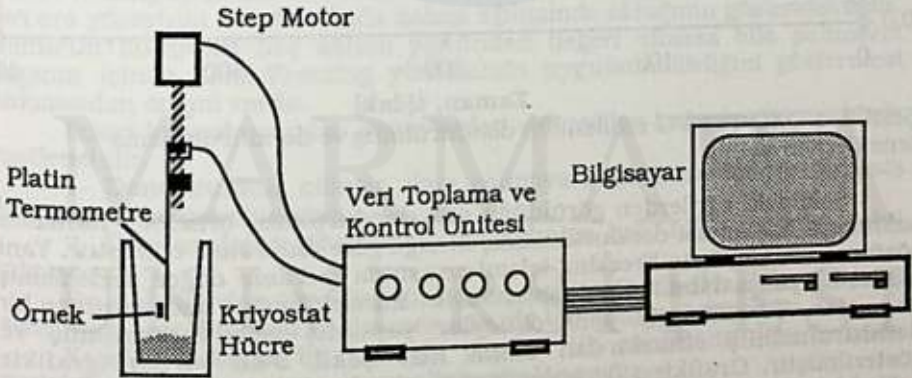
Eğer içine çözünmüş halde ilaç emdirilmiş bir cihaz sıcaklığı çözeltinin donma noktasında olan bir ortamda bekletilirse donmuş bölge ya da katı-sıvı ara yüzeyi cihazın içlerine doğru ilerledikçe çözünmüş halde bulunan ilaç cihazın iç bölgelerine doğru gidecektir. Bu cihaz silindirik ya da küresel bir formda yapılırsa ilaç merkezde toplanacaktır. Daha sonra cihaz ilacın salınacağı ortama konduğunda ilaç moleküllerinin çoğu merkeze yakın bulunduğundan dışarı doğru gidecekleri yol aynı olacak ve belli bir süre için dışarı sabit hızda ilaç salınabilecektir.

DENEL BÖLÜM

Deneylerde, HEMA monomerinin silindirik kalıplara dökülerek 60°C'ta polimerleştirilmesiyle elde edilmiş silindirik cihazlar kullanılmıştır. Deneyler iki ayrı kısımda yürütülmüştür.

Birinci kısımda 2 mm çapında 11 mm boyunda polimer örnekler hazırlanmıştır. Bu örnekler 10^{-3} M 4-OXO-TEMPO radikali içeren % 99 Etil Alkol çözeltisi içine atılarak sabit tartıma gelene kadar bekletilmişlerdir. Burada örnek ilaç olarak 4-OXO-TEMPO'nun seçilmesi analiz yöntemi ile ilgilidir. Sözü geçen organik nitroksid radikali ESR spektrometresinde kolaylıkla gözlenebilmektedir. Burada ilaç yerine kullanılan maddenin sadece sıvı içinde çözünmüş bir örnek olması yeterlidir. Hazırlanan örnekler dibinde sıvı azot bulunan bir kriyostat içine sarkıtılarak -117°C'ta 6 saat bekletilmişlerdir. Sistem Şekil 3'te görülmektedir.

Şekildeki sistemde örnek platin termometreye tutturulmuştur. Veri toplama ve kontrol ünitesi sıcaklığı sürekli okumakta ve sıcaklığın ayarlanan sıcaklıktan az veya çok olmasına göre step motora kumanda etmekte, termometreyi aşağı yukarı hareket ettirerek örneği sabit sıcaklıkta tutmaktadır. Bu suretle Zone-Freezing işleminin uygulandığı örnek, dondurma işleminden hemen sonra ve 10^{-3} torr vakum hücre sine konularak hızla kurutulmuştur. Bu örneğin yanısıra dondurulma işlemine tabi tutulmayan diğer bir örnekte kurutulmuştur. Kurutulan örnekler ESR hücresine konulmuş ve üzerlerine yeniden Alkol konularak ESR spektrometresinde (Varian E9) salım hızları incelenmiştir.



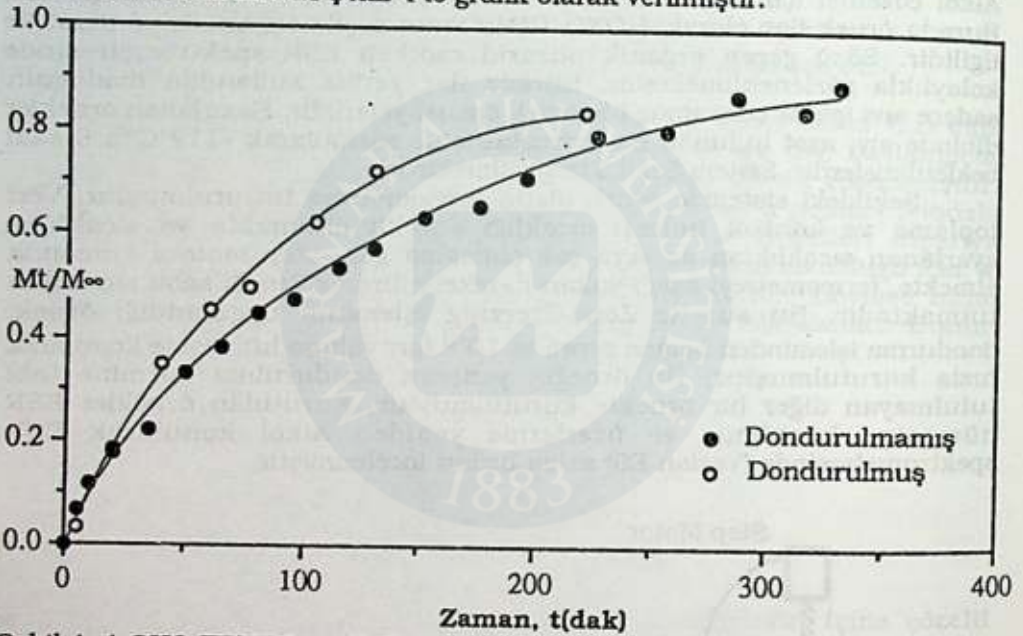
Şekil 3. Sabit sıcaklık sistemi

İkinci kısım deneylerde 5 mm çapında ve 20 mm boyunda silindirik cihazlar Tiyofilin isimli bir örnek ilacın sudaki 0.2 gr/lt çözeltisine atılmış ve sabit tartıma gelene kadar bekletilmiştir. Bu örneklerden bir tanesi 0°C sabit sıcaklıkta 12 saat bekletilerek dondurulmuş ve diğer örnekle birlikte vakumda hızla kurutulmuştur. Sonra bu örnekler 100 ml su içeren ve düşük karıştırma hızında karıştırılan bir erlen içine sarkıtılmış ve cihazın tiyofilin salım hızı belli zamanlarda örnekler alınarak UV spektrometresinde incelenmiştir.

Her iki kısımda da deneyler salım duruncaya kadar devam ettirilmiştir.

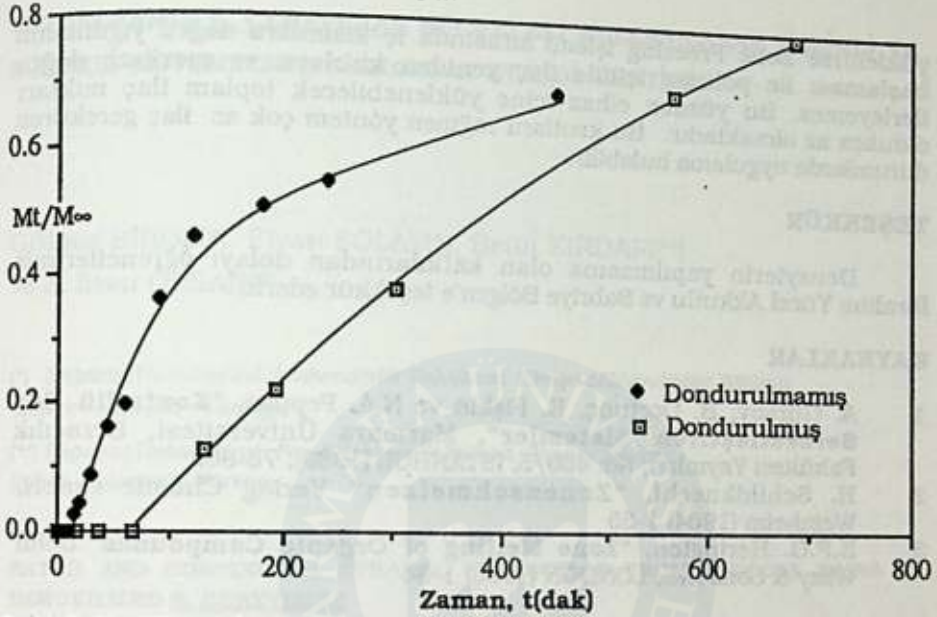
SONUÇLAR

Sonuçların değerlendirilmesi zamana karşı M_t/M_∞ değerlerinin grafiğe geçirilmesi yapılmıştır. M_t değeri belli bir zamana kadar toplam salınan miktarı, M_∞ değeri ise ilacın dışarı salınabilecek maksimum değerini göstermektedir. Grafikler $M_t/M_\infty=1$ olduğu zamana kadar gösterilmemiş böylece başlangıçta iki tip cihaz arasındaki fark daha açık olarak belirtilebilmiştir. 4-OXO-TEMPO radikali emdirilmiş ve etanol içinde radikalin salımı incelenmiş örneklerde dondurulmuş ve dondurulmamış örneklerin salım hızları Şekil 4'te grafik olarak verilmiştir.



Şekil 4. 4-OXO-TEMPO radikalinin dondurulmuş ve dondurulmamış örneklerden salımı

Şekildeki eğrilerden görüldüğü gibi dondurulmuş örnekte radikalin salınmaya başlaması dondurulmamış örneğe göre daha hızlı olmuştur. Yani çözünen madde Zone Freezing işlemi sırasında merkeze doğru ilerlememiş aksine bir parça daha kenara toplanmıştır. Bunun üzerine suda çözünen bir ilaç olan Tiyofilin ile yeni deneyler yapılmış ve dondurulmuş ve dondurulmamış cihazlardan salım hızı Şekil 5'de verilen grafikte gösterilmiştir. Grafikten de anlaşılacağı gibi dondurulmuş örnekte ilacın salınmaya başlamasının dondurulmamış örneğe göre daha geç olması ilacın Zone Freezing işlemi sırasında merkeze doğru toplandığını göstermektedir. Ayrıca grafikten ilacın uzun süre sabit hızda salındığı gözlenmektedir.



Şekil 5. Tiyosflinin dondurulmuş ve dondurulmamış örneklerden salımı

TARTIŞMA

İlk kısımda yapılan deneylerde 4-OXO-TEMPO radikalının alkol içinde Zone Freezing işlemine tabi tutulması ile elde edilen sonuçlar radikalın katı-sıvı ara yüzeyinin katı tarafında kalma eğiliminde olduğunu göstermektedir. Sonucun kontrollü ilaç salımı yönünden değeri olmasa bile polimerik yapının içinde Zone-Freezing yönteminin uygulanabilirliğini göstermesi bakımından önemlidir.

İkinci kısımda yapılan deneylerden elde edilen bulgular iki maddede özetlenebilir.

1- Dondurulmuş cihazın ilacı salmaya başlaması dondurulmamış ilaca göre daha geç olmuştur.

2- Dondurulmuş cihazdan ilacın salınma hızı, uzun bir süre sabit kalmıştır.

Bu bulgulardan Tiyosflin yüklenmiş polimerik cihazda Zone-Freezing yönteminin uygulanması ile ilacın merkezde toplandığı söylenebilir.

Yapılan çalışma bu konuda yapılan ilk çalışmadır. Bu konuda yapılabilecek bazı araştırmalar aşağıda sıralanmıştır.

1. Deneylerin sonucunda sistemin difüzyon kontrollü olduğu söylenebilir. Şişme kontrollü sistemler içinde deneyler uygun bir polimerle tekrarlanabilir.

2. Polimerin yapısal özellikleri değiştirilerek bir dizi deney yapılabilir.

3. Yapılan deneylerde cihaz çözücünün donma noktasına yakın sıcaklıklarda bekletilmiştir. Daha düşük sıcaklıklarda daha hızlı bir dondurma işlemi uygulanarak aynı sonuçların elde edilip edilmeyeceğine bakılmalıdır.

Sistemin kontrollü ilaç salımında kullanılması, ilacın polimer içine her zaman çözünmüş olarak yüklenmesinin gerekmesinden dolayı kısıtlıdır. Hatta ilaç polimer içine başlangıçta doyumluk derişimine yakın değerlerde

yüklenirse Zone Freezing işlemi sırasında iç kısımlara doğru yükün başlanması ile polimer içinde ilaç yeniden katılaştır ve merkeze doğru ilerleyemez. Bu yüzden cihaz içine yüklenebilecek toplam ilaç miktarı oldukça az olmaktadır. Bu kısıtlara rağmen yöntem çok az ilaç gerektiren durumlarda uygulama bulabilir.

TEŞEKKÜR

Deneylerin yapılmasına olan katkılarından dolayı öğrencilerimiz İbrahim Yücel Akkutlu ve Sabriye Bölgen'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. A. Gürsoy, B. Dortunç, E. Pişkin ve N.A. Peppas, "Kontrollü İlaç Serbestleştirilen Sistemler", Marmara Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Yayınları, No: 469/5, İSTANBUL (1989), 75-86.
2. H. Schildknecht, "Zonenschmelzen" Verlag Chemie GmbH, Weinheim (1964) 1-35
3. E.F.G. Herington, "Zone Melting of Organic Compounds" John Wiley & Sons Inc., LONDON (1963) 1-34

TUTUKLANMIŞ S. CEREVISIAE HÜCRELERİ KULLANILARAK KESİKLİ VE SÜREKLİ SİSTEMLERDE GLİKOZDAN ETANOL ÜRETİMİ

Gülnur BİROL(*), Elvan SOLAY(*), Betül KIRDAR(**)
ve Z. İlsen ÖNSAN(*)

(*) Boğaziçi Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Konya Mühendisliği Bölümü,
Bebek - İstanbul - Türkiye.

(**) Boğaziçi Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü,
Bebek - İstanbul - Türkiye.

BATCH AND CONTINUOUS ETHANOL PRODUCTION FROM GLUCOSE USING IMMOBILIZED S. CEREVISIAE

SUMMARY

Flocculating S. cerevisiae cells were immobilized on highly porous particles of non-woven polymeric material with an open network structure in order to determine the effect of passive immobilization and mode of operation on the growth and ethanol production characteristics of the cells. Experiments were carried out in an immobilized cell reactor under batch operation with nutrient recirculation and under continuous operation, using various substrate concentrations.

ÖZET

Yumaklaşan S. cerevisiae hücreleri çok gözenekli ve karmaşık bir ağ yapısına sahip polimerik malzemeden yapılmış taşıyıcı parçacıklar üzerinde tutuklanarak, pasif tutuklanmanın ve reaktör tipinin hücrelerin çoğalma ve etanol üretme özelliklerine etkisi araştırılmıştır. Deneyler tutuklanmış hücre reaktöründe kesikli/geri-beslemeli ve sürekli düzeylerde çeşitli glükoz derişimleri kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

GİRİŞ

Yüksek hacimsal üretkenliğe sahip fermentör tiplerinin geliştirilmesi konusunda yapılan çalışmalar, tutuklanmış hücre sistemlerini uygulama bakımından önemli bir seçenek haline getirmiştir. Bu sistemlerde gerçekleşen hücre yoğunluklarının yüksek olması ve reaktör dışına hücre kaybının önlenmesi, gerek üretim gerekse ürün ayırma ve saflaştırma sorunları açısından proses tasarımı kolaylaştırmaktadır. Tutuklanmış hücre sistemlerinin başlıca özelliği, hücrelerin reaktörün belirli bir bölümünde kalmalarının sağlanması için hücreleri tutucu veya bağlayıcı bir yapının kullanılmasıdır. Mevcut yöntemler arasında da "pasif tutuklama" yöntemi, hücrelerin yumak oluşturma veya gözenekleri doldurma yeteneğine dayanmakta olup hücre doğasını ve yapısını değiştirmesi bakımından çekici görünmektedir (1-3).

Yumaklaşan S. cerevisiae hücrelerinin çok gözenekli ve gevşek örgülü bir

taşıyıcı yapı içerisinde tutuklanmasını sağlayacak bir pasif tutuklama tekniğinin geliştirilmesine ilişkin çalışmalar daha önce başlatılmış olup glikozdan etanol üretimi model sistem olarak ele alınmış ve tutuklanmanın etkileri incelenmiştir (4). Reaktör içerisinde çoğalmayı sürdüren tutuklanmış maya hücrelerinin davranışının incelenbilmesi ve kinetik çalışmalar yapılabilmesi için gerekli deneysel yöntemler geliştirilmiştir (5). Bu çalışmada, kesikli/geri-beslemeli ve sürekli olmak üzere iki ayrı deney sisteminde aynı *S. cerevisiae* türünün kullanıldığı deneyler paralel olarak yürütülmüş ve geliştirilen yöntemler çeşitli glikoz derişimlerinde irdelenmiştir (6,7).

DENEL BÖLÜM

Mikroorganizma ve Besi Ortamı

Çalışmalarda UMIST (İngiltere) tarafından verilen yumaklaşan bir *S. cerevisiae* (URA 3-251, 372, 328, SOD-(ALEU 2)) türü kullanılmıştır. Fermantasyon deneylerinde kullanılan sıvı besi ortamı için, çeşitli miktarlarda D+glikoz.H₂O ile maya özütü, amonyum sülfat, magnezyum sülfat, potasyum dihidrojen fosfat ve kalsiyum klorür içeren çözeltiler hazırlanmıştır.

Biyomas Taşıyıcı Parçacıklar

Çalışmada her biri 0.7 cm³ (1x1x0.7 cm) olan çok gözenekli, karmaşık bir ağ yapısına sahip ve polimerik malzemeden yapılmış taşıyıcı parçacıklar kullanılmıştır. Parçacıkların yoğunluğu 0.10 g/cm³, boşluk oranı ise 0.95 olarak belirlenmiştir.

Deney Düzenegi

Deneyler iki ayrı düzenekte gerçekleştirilmiştir. Birinci deney düzenegi kesikli/geri-beslemeli fermantasyon deneylerinde kullanılmış olup besi ortamı kabı, termostatlı banyo ve karıştırıcı, peristaltik pompa ve reaktörden oluşmaktadır. Deneylerde 3 cm iç çapında ve 11 cm efektif yüksekliği olan ceketli cam reaktörler kullanılmıştır. Reaktör kolonunun konik olan alt bölümünden buharla sterilize edilmiş besi ortamı pompalanarak reaktörün üst bölümünden alınıp besleme kabına geri döndürülmektedir. İkinci deney düzenegi birinci düzenek ile aynı birimlerden oluşturulmuş, 11 ve 22 cm yüksekliğinde reaktörler kullanılmıştır. Besi ortamı dolgu reaktör kolonundan farklı akış hızlarında sürekli olarak geçirilmiştir.

Tutuklama Tekniği

Taşıyıcı parçacıkları sterilize edilerek kurutulmuş, tartılmış ve paslanmaz çelik tellere dizilerek erlenlere yerleştirilmiştir. Tekrar otoklavlandıktan sonra besi ortamı eklenmiş ve daha önce 30°C de hazırlanmış olan önkültür ile aşılanmıştır. Tutuklama işlemi 30°C deki orbital çalkalayıcı içerisinde 18 saatte gerçekleştirilmiştir.

Deney ve Analiz Yöntemi

Tutuklanmış hücreleri taşıyan parçacıklar aseptik olarak paslanmaz çelik tellerden sıyrılmış, reaktör kolonuna doldurulmuş ve taze besi ortamı geçirilmeye başlanarak kesikli/geri-beslemeli veya sürekli deneyler yapılmıştır. Reaktör dolgusu olarak kullanılan taşıyıcı parçacıklar içerisinde hücre çoğalmasını izlemek amacıyla her glikoz derişiminde 3 saatten 15 saate kadar değişen sürelerle fermantasyon deneyleri yapılmış ve başlangıçtaki hücre miktarını yaklaşık olarak benzer tutabilmek için deneyler birkaç kez tekrarlanmıştır. Her deney sonunda, kullanılan dolgulu kolon boşaltılarak çıkarılan parçacıklar kurutulmuş ve tartılmıştır.

Deneyler sırasında ve sonunda alınan sıvı örnekler santrifüjlenerek 4°C de bekletilmiş, etanol miktarları gaz kromatografisi, glikoz miktarları ise Nelson yöntemi ve UV-görünür spektrofotometri kullanılarak saptanmıştır.

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Fermantasyon deneylerinde kullanılan besi ortamının pH değeri kaynaklarda verilen optimum pH aralığında tutulmuş (8,9) ve belirli aralıklarla alınan ölçümler pH düzeyinin deneyler süresince 4.0 ± 0.2 değerinde kaldığını göstermiştir. Fermantasyon sıcaklığı tüm deneylerde 30°C de sabit tutulmuş, glikoz derişimi kesikli/geri-beslemeli deneylerde 60-140 g/L, sürekli deneylerde ise 60-100 g/L arasında değiştirilerek bir dizi deney yapılmıştır.

Kesikli sistemde uzun fermantasyon sürelerini ve difüzyon etkilerini en aza indirmek amacıyla geri-beslemeli olarak çalışılmış ve 15 mL/dak dolaşım hızı kullanılmıştır (4). Sürekli deneylerde seyreltme hızı 0.2-3.8 saat⁻¹ aralığında değiştirilmiş ve en yüksek glikoz tüketimlerinin elde edildiği 0.2 saat⁻¹ sabit tutularak glikoz derişimi değiştirilmiştir.

Kesikli/geri-beslemeli düzeneğe gerçekleştirilen çeşitli deneylerden 15 saatlik deney süresi sonunda elde edilen hücre miktarları, glikoz dönüşme yüzdeleri ve etanol derişimleri ile hücrelerin reaktör kolonu içerisinde çoğalmalarının eksponansiyel fazına ilişkin spesifik çoğalma hızları Tablo 1. de sunulmuştur. Başlangıç glikoz derişiminin 60-120 g/L aralığında artmasıyla spesifik çoğalma hızının düştüğü, en yüksek etanol üretiminin ise 100 g/L glikoz derişiminde elde edildiği görülmektedir. 140 g/L glikoz derişiminde bu değerlerde belirli bir artış görülmekle birlikte *S. cerevisiae* hücrelerinin yumaklaşma özelliklerinin de değişmeye başladığı gözlenmiştir. 100 g/L başlangıç glikoz derişimi kullanılarak yapılan uzun süreli deneyler, glikoz tüketiminin yaklaşık 21 saatte tamamlandığını, spesifik çoğalma hızının değişmediğini ancak 50 g/L'yi aşan etanol derişimleri elde edildiğini göstermektedir (6).

TABLO 1. Kesikli/Geri Beslemeli Sistemde Fermantasyon Deneyleri

Glikoz Derişimi (g/L)	Başlangıçtaki Tutuklanmış Hücre Miktarı (g)	Deney Bitimindeki Tutuklanmış Hücre Miktarı (g)	Dönüşme Yüzdesi (%)	Etanol Derişimi (g/L)	Spesifik Çoğalma Hızı (Saat ⁻¹)
60	1.86	3.22	87.5	27.2	0.200
80	-	-	-	-	-
100	2.03	3.81	66.5	39.5	0.124
120	2.30	3.05	64.4	26.9	0.079
140	2.48	3.48	57.8	32.5	0.088

Sürekli fermantasyon deneylerinde 0.2 saat⁻¹ seyreltme hızı kullanılarak 15 saatlik deney süresi sonunda elde edilen hücre miktarları, glikoz dönüşme yüzdeleri ve etanol derişimleri ile hücrelerin reaktör içerisinde çoğalmalarının eksponansiyel fazına ilişkin spesifik çoğalma hızları Tablo 2. de sunulmuştur. 15 saatlik deney süresi sonunda eksponansiyel çoğalma fazından henüz çıkmamış olan hücrelerin spesifik çoğalma hızları glikoz derişimi ile artış göstermektedir. Bu deneylerde glikoz tüketimi tamamlanincaya kadar deney süresini uzatarak etanol derişimlerini karşılaştırmak yerinde olacaktır (7).

TABLO 2. Sürekli Sistemde Fermantasyon Deneyleri

Glikoz Derişimi (g/L)	Başlangıçtaki Tutuklanmış Hücre Miktarı (g)	Deney Bitimindeki Tutuklanmış Hücre Miktarı (g)	Dönüşme Yüzdesi (%)	Etanol Derişimi (g/L)	Spesifik Çoğalma Hızı (Saat ⁻¹)
60	2.07	2.51	93.7	30.3	0.029
80	1.92	3.15	82.1	45.2	0.057
100	1.82	3.25	65.5	28.9	0.083
120	-	-	-	-	-
140	-	-	-	-	-

TEŞEKKÜR

Bu araştırmayı 89EA0556 ve 91A0518 kodlu projeler çerçevesinde destekleyen Boğaziçi Üniversitesi Araştırma Fonuna ve araştırmamın başlatılmasındaki katkılarından dolayı Dr. Ferda Mavituna'ya teşekkürlerimizi sunarız.

KAYNAKLAR:

1. C. Webb, G.M. Black and B. Atkinson, "**Process Engineering Aspects of Immobilized Cell Systems**", Academic Press, UK (1986).
2. F. Godia, C. Casas and C. Sola, "A Survey of Continuous Ethanol Fermentation Systems Using Immobilized Cells", **Process Biochemistry**, (April 1987) 43 - 48.
3. G. M. Black, C. Webb, T. M. Matthews and B. Atkinson, "Practical Reactor systems For Yeast Cell Immobilization Using Biomass Support Particles", **Biotech. Bioeng.**, 26 (1984) 134 - 141.
4. Ş.K. Özergin, "**Studies on Ethanol Production by Fermentation**", (M.S. Thesis), Boğaziçi Univ., İstanbul (1989).
5. Y. Khoury, "**Ethanol Production from Glucose by Immobilized S. cerevisiae**", (M. S. Thesis), Boğaziçi Univ., İstanbul (1991).
6. G. Bırol, "**Cell Growth and Ethanol Production Characteristics of Immobilized S. cerevisiae in a Batch System with Nutrient Recirculation**", (M.S. Thesis), Boğaziçi Univ. İstanbul (1992).
7. E. Solay, "**Experimental Studies on Continuous Ethanol Production by Immobilized Growing S. cerevisiae**", (M. S. Thesis), Boğaziçi Üniv., İstanbul (1992).
8. Ü. Mehmetoğlu ve A. Çağlar, "Kalsiyum Aljinat Jelinde Tutuklanmış S. cerevisiae ile Dolgulu Kolonda Etil Alkol Üretimi", **Doğa T.Ü. Müh. ve Çevre D.**, 12 (1988) 223-232.
9. D. Williams and D. M. Munnecke, "The Production of Ethanol by Immobilized Yeast Cells", **Biotech. Bioeng.**, 23 (1981) 1813 - 1825.

SERBEST VE TUTUKLANMIŞ *Rhodotorula glutinis* İLE L-FENİLALANİN ÜRETİMİNDE PAL ENZİM AKTİVİTE VE KARARLIĞININ ARAŞTIRILMASI

Serpil TAKAÇ*, Bülent AKAY*, Pınar ÇALIK*, İlknur KARADAĞ*
ve Tunçer H. ÖZDAMAR**

(*) Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 06100 Tandoğan - Ankara - Türkiye

(**) Ankara Üniversitesi, Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi, Endüstriyel Biyoteknoloji Bölümü, 06100 Tandoğan, Ankara, Türkiye.

PAL ENZYME ACTIVITY AND STABILITY IN L-PHENYLALANINE PRODUCTION BY FREE AND IMMOBILIZED *Rhodotorula glutinis*

SUMMARY

L-Phenylalanine is important as an essential amino acid for human nutrition and is widely used in pharmaceutical and food industries. In this study, the activity and stability of phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzyme of *Rhodotorula glutinis* which catalyzed the bioconversion of trans-cinnamic acid and ammonia to L-phenylalanine were investigated. The activity variations of free and Ca-alginate immobilized *R. glutinis* cells show that PAL has an unstable structure and should not be kept for a long time before employing in the bioreactor. Na-glutamate and penicillin added to the bioreaction medium have positive effects on PAL activity and stability in the reactions carried out with free cells. The immobilized *R. glutinis* pellets performed approximately the same L-phenylalanine yield as the free cells; and the decrease in the activity was not considerably low when the same pellets were used subsequently in the bioconversions.

ÖZET

L-fenilalanin farmasötik ve gıda sanayilerinde çokça kullanılan ve canlıların temel gereksinimlerinden olan önemli bir amino asittir. Bu çalışmada trans-sinamik asit ve amonyaktan *Rhodotorula glutinis* mikroorganizması ile L-fenilalanin üretiminde biyoteknikmeyi katalizleyen phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enziminin aktivite ve kararlılığı araştırılmıştır. Serbest ve Ca-alginat jelinde tutuklanmış *R. glutinis* ile yapılan aktivite ölçümlerinde PAL'in kararsız bir yapıya sahip olduğu ve üretilen PAL enziminin biyoteknikmelerde kullanılmadan önce fazla bekletilmemesi gerektiği bulunmuştur. Serbest hücre ile gerçekleştirilen biyoteknikmelerde ortama katılan Na-glutamat ve penisilin PAL aktivite ve kararlılığı üzerine olumlu etkiler yaptığı belirlenmiştir. Tutuklanmış *R. glutinis* ile yapılan biyodönüşümlerde ise, serbest hücre ile elde edilen L-fenilalanin derişimine yakın bir değere ulaşılarak, aynı pelletlerin çok kullanımdaki aktivite düşüşünün tek kullanıma kıyasla fazla değişmediği saptanmıştır.

GİRİŞ

L-fenilalanin farmasötik ve gıda sanayilerinde kullanılan ve özellikle son yıllarda geliştirilen diyet tatlandırıcı aspartamin yapısında bulunduğu için endüstriyel önemi olan, birim fiyatı yüksek bir amino asittir. Değişik kimyasal ve biyokimyasal yollarla elde edilmesi mümkün olan L-fenilalaninin trans-sinamik asit ve amonyaktan biyokatalizör phenylalanine ammonia-lyase (PAL) enzimi ile üretimi ilgi çekmektedir. Bu prosesle L-fenilalaninin üretiminde verimliliği etkileyen önemli

parametrelerden ikisi PAL kararsızlığı ve düşük PAL aktivitesidir. Bu nedenle PAL enziminin aktivite ve kararlılığını artırma çalışmaları önem kazanmaktadır.

Nakamichi vd. *Rhodotorula glutinis* mayasının sıvı çoğalma ortamına ekledikleri çeşitli amino asitler ile PAL enziminin aktivite ve kararlılığını artırmaya çalışmışlar ve ortamda bulunan L-fenilalaninin aktiviteyi, L-izolösinin de kararlılığı artırdığını bulmuşlardır [1]. Evans vd. yaptıkları çalışmalarda ise trans-sinamik asitin L-fenilalanine biyodönüşümü sırasında PAL katalizörünü daha aktif ve kararlı hale getirmeye çalışmışlardır. Araştırmacılar bir yayınlarda toluen ve ksilen gibi geçirgenlik artırıcı maddelerin L-fenilalanin üretimini artırdığını, ancak katalizör PAL kararlılığını azalttığını ileri sürmüşlerdir [2]. Aynı çalışmada birçok katkı maddesi ile biyodönüşüm artırılmaya çalışılmış ; bunlardan sadece sorbitol, alginat, glutaraldehit, polietilenglikol ve gliserol ile PAL kararlılığı sağlanabilmiştir. Aynı araştırma grubu *Rhodotorula rubra* mayasını Ca-alginat jelinde tutuklayarak gerçekleştirdiği geri döngülü biyoreaktördeki L-fenilalanin üretimini, serbest hücre kullanarak yaptığı yarı-kesikli biyoreaktördeki üretim sonuçlarıyla karşılaştırmış ve her iki koşulda da aynı verimliliği (0.8 g/L/st) elde etmiştir [3]. Ancak tutuklanmış *R.rubra*'nın ikinci kez kullanımında verimlilik yarıya düşmektedir.

Bu çalışmada, belirlenen en iyi koşullarda çoğaltılan *Rhodotorula glutinis* serbest ve Ca-alginat jelinde tutuklanarak PAL enzim deposu olarak kullanılmış ve her iki biyokatalizörün aktivitesinin bekleme süresi ile değişimi incelenerek PAL kararlılığı araştırılmıştır. *R. glutinis* pellet çapının ve tekrar kullanımının PAL aktivitesine etkisi incelenmiş ve biyoteknik ortamına eklenen katkı maddeleri ve geçirgenlik artırıcı maddelerin L-fenilalanin oluşumuna ve PAL kararlılığına etkisi de serbest hücreler ile yapılan biyodönüşümlerde belirlenmiştir.

DENEL BÖLÜM

PAL enzim kaynağı olarak *Rhodotorula glutinis* NRRL Y-1091 kullanılmıştır. % 1 maya özütü, % 1 pepton, % 0.5 KCl, % 0.05 L-fenilalanin ve % 1.5 agar içeren eğik agar üzerinde çoğaltılan hücreler, L-izolösin ile desteklenen benzer sıvı ortamda PAL enzimi üretecek şekilde indüklenerek 30°C'da 20 st süre ile çoğaltılmıştır. Santrifüjlenerek sıvı ortamdan ayrılan *R.glutinis* pH=9 borat tamponunda yaklaşık 100 mg kuru hücre/ml olacak şekilde süspansiyon haline getirilerek saklanmıştır.

Hücrelerin tutuklanmasında ise % 2.3 kuru hücre, % 5 gliserol, % 0.2 glutamat, % 1.5 sorbitol, % 0.1 glutaraldehit içeren süspansiyon, içinden azot geçirilerek karıştırılmış ve santrifüjlenek hücreler çöktürülmüştür. Çöken hücreler borat tamponu ile yıkandıktan sonra % 5 gliserol, % 0.2 glutaraldehit, % 1.5 sorbitol ve % 10 PEG çözeltisine eklenmiş ve Na-alginat çözeltisi ile karıştırılmıştır. Bu karışım farklı boyutlarda iğneler yardımı ile 0.2 M CaCl₂ içine damlatılarak lyon değişimi ile PAL pelletleri oluşturulmuştur.

R. glutinis hücrelerinin PAL aktiviteleri Evans vd tarafından verilen yöntem ile ölçülmüş [2] ve µmol L-fenilalanin/mg kuru hücre/dk olarak verilmiştir. Aktivite ve biyodönüşüm deneylerinde üretilen L-fenilalanin derişimi Waters Amino Asit Analiz Sisteminde Pico.Tag yöntemi ile analizlenmiş [4] ; hücre derişimleri ise spektroskopik olarak absorbanans ölçümü ile belirlenmiştir.

Serbest ve tutuklanmış *R. glutinis* ile trans-sinamik asitin L-fenilalanine biyodönüşüm tepkimeleri 50 mmol/dm³ trans-sinamik asit, 7.5 mol/dm³ NH₃ içeren 20 ml hacimli kesikli tepkime kaplarında pH=10, T=30°C ve 100 dk⁻¹ karıştırma hızında dinamik koşullarda

gerçekleştirilmiştir. Belli zaman aralıkları ile biyoreaktörden alınan örneklerdeki L-fenilalanin miktarları analizlenmiştir.

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

PAL aktivitesinin bekleme süresi ile değişimi :

Serbest ve tutuklanmış *R.glutinis* pelletlerinin PAL aktivitelerinin bekleme süresi (t_B) ile değişimi, + 4°C'da saklanan biyokatalizörlerin belli zamanlardaki aktiviteleri ölçülerek incelenmiş ve sonuçlar Tablo 1'de verilmiştir. PAL pelletlerinin başlangıçta daha aktif olması tutuklanmış *R.glutinis* hücrelerinin mikro çevrelerindeki değişimin aktiviteye olumlu etki yapması ile açıklanabilir. Ancak serbest hücre gibi PAL pelletleri de bekleme süresiyle aktivitelerini kaybetmekte ve 2. günün sonunda serbest hücrelerin aktivitesindeki azalma % 22, PAL pelletlerindeki azalma % 30 iken, 7. günün sonunda bu değerler sırasıyla % 67 ve 80'e düşmektedir. Aktivitedeki bu hızlı düşüş PAL enziminin kararsız bir yapıya sahip olduğunu göstermektedir.

PAL pelletlerinin tekrar kullanımı :

PAL pelletlerinin tekrar kullanımı pellet çapının aktiviteye etkisi ile birlikte incelenmiş ve $D_p=3$ ve 5 mm çaplı pelletlerde bekleme süresi ve tekrar kullanım ile aktivitelerin azaldığı gözlenmiştir (Tablo 2). Başlangıçta 3 mm çaplı pelletlerin aktivitesi 5 mm çaplı pelletlerden beklenildiği gibi - yaklaşık 5 kat - daha fazladır. Aktivite deneylerinde kullanıldıktan sonra + 4°C'da bekletilen pelletlerin aktivitelerine belli zaman aralıklarında tekrar bakılmış ve 302.st'de 3 mm pelletlerin aktivitesinde başlangıca göre % 95.5, 6 mm çaplı pelletlerin aktivitesinde ise % 80 azalma belirlenmiştir.

Tek ve ardışık çok kullanımın 3 mm çaplı PAL pelletlerinin aktivitesine etkisi ayrıca incelenmiş ve belli zamanlarda pellet deposundan

Tablo 1 : Serbest ve tutuklanmış PAL aktivitesinin bekleme süresi ile değişimi

Bekleme Süresi t_B .st	PAL aktivitesi, $\mu\text{mol}/\text{mg kh}/\text{dk}$	
	Serbest <i>R.glutinis</i>	Tutuklanmış <i>R.glutinis</i>
0	0.0137	-
19	-	0.01875
49	0.0107	-
75	0.0067	-
134	-	0.0005
167	0.0046	-
302	-	0.00083

Tablo 2. Aynı pelletlerin tekrar kullanılmasıyla, PAL pelletlerinin aktivitesinin pellet çapı ve bekleme süresi ile değişimi

Bekleme Süresi t_B .st	PAL pellet aktivitesi, $\mu\text{mol}/\text{mg kh}/\text{dk}$	
	D_p 3mm	D_p 5 mm
19	0.01875	0.00416
41	0.00870	0.00416
86	-	0.00200
134	0.00680	0.00083
302	0.00091	0.00083

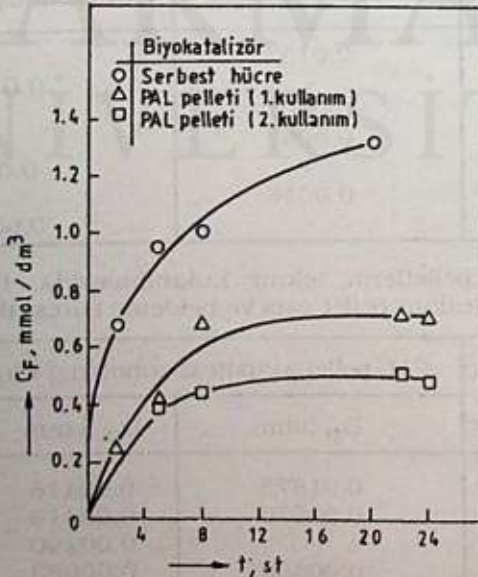
alınan yeni pelletlerin aktiviteleri tek kullanımın, aktivite deneylerinde kullanılmış olan pelletlerin tekrar ölçülen aktiviteleri de çok kullanımın sonuçları olarak değerlendirilerek kullanım sayısı ile PAL aktivitesinin değişimi gözlenmiştir. Pelletlerin tek kullanımında 302.st'deki azalma % 95.5 iken çok kullanımda aktivite azalması % 95'dir. Tek ve çok kullanımlarda aktivitelerdeki düşüşün farklı olmaması, pelletlerin kısa sürelerle devamlı kullanımının aktiviteye olumsuz etki yapmadığını göstermektedir.

PAL pelletleri ile L-fenilalanin üretimi :

PAL pelletleri ile L-fenilalanin üretimi gerçekleştirilmiş ve 3 mm çaplı PAL pelletlerinin biyotekniklerde tekrar kullanımı araştırılmıştır. Şekil 1'de görüldüğü gibi her iki biyokatalizörle de L-fenilalanin derişimi (C_F) özellikle ilk 8 saatte hızlı bir artış göstererek artmaktadır. 24 st sürdürülen biyotekniklerde serbest hücre ile daha yüksek L-fenilalanin derişimine ulaşılmasının nedeni, PAL pelletlerinde ek yayılım kısıtlamalarının olmasından başka kullanılan biyokatalizörlerin aktivitelerinin farklılığıdır. Serbest hücre aktivitesi başlangıçta 0.0137 $\mu\text{mol}/\text{mgkh}/\text{dk}$ iken tutuklanmış hücre aktivitesi 1. kullanımda 0.0065 ve 2. kullanımda ise 0.005 $\mu\text{mol}/\text{mgkh}/\text{dk}$ 'dir. Böylece serbest hücre ile 20 st kalma süresinde 1.32 mmol/dm^3 L-fenilalanin derişimine ulaşırken, PAL pelletleri ile 24 st'de 1. ve 2. kullanımlarda 0.7 ve 0.43 mmol/dm^3 derişimi elde edilmiştir. PAL pelletlerinin ardarda iki kez $t=24$ st kalma süresinde biyodönüşümlerde kullanılması ile L-fenilalanin derişimindeki gözlenen % 38 azalma, PAL enziminin kararsız bir yapısı olduğunu göstermektedir.

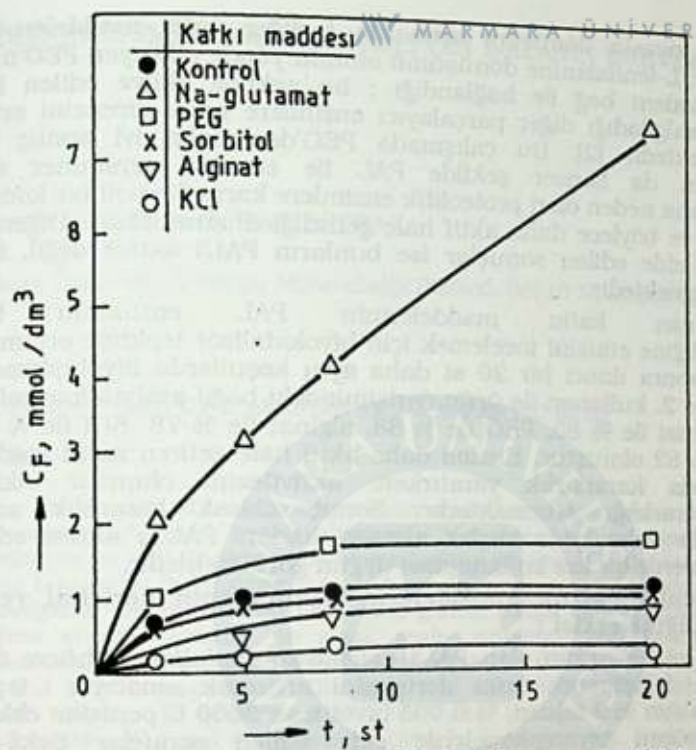
Katkı maddelerinin L-fenilalanin oluşumuna ve PAL kararlılığına etkisi :

Trans-sinamik asitin L-fenilalanine biyodönüşümünde, ortama eklenen katkı maddelerinin ürün derişimi ve PAL kararlılığına etkisi $t=20$ st kalma süreli biyotekniklerde incelenmiş ; bu amaçla tepkime ortamına ayrı ayrı % 5 Na-glutamat, % 0.5 polietilenglikol (PEG) % 0.5 alginat, % 0.5 sorbitol ve 1M KCl eklenmiş ve ortandan belli zamanlarda örnekler alınarak sonuçlar kalma süresine karşı L-fenilalanin derişimi olarak Şekil 2'de verilmiştir. Şekilden görüldüğü gibi Na-glutamat ve PEG katkılarıyla kontrol

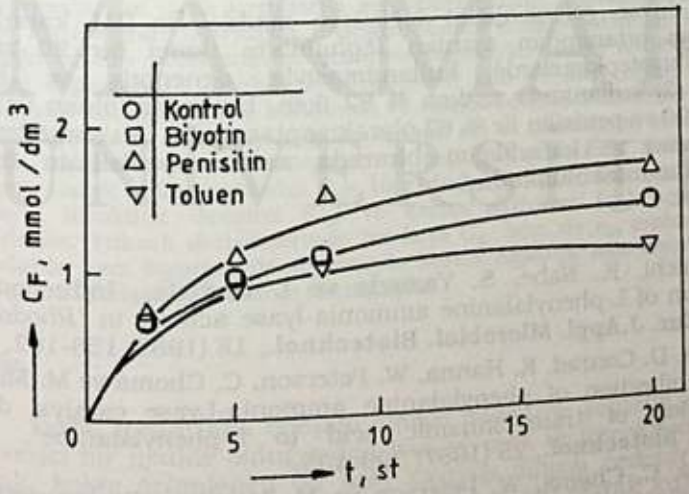


Şekil 1 : Serbest hücre ve PAL pelletleri ile dinamik koşullarda L-fenilalanin üretimi

$T = 30^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 10$, $C_{T0} = 50 \text{ mmol}/\text{dm}^3$, $C_{A0} = 7.5 \text{ mol}/\text{dm}^3$



Şekil 2 : Katkı maddelerinin L-fenilalanin oluşumuna etkisi
 T = 30°C, pH = 10, C_{T0} = 50 mmol/dm³, C_{A0} = 7.5 mol/dm³



Şekil 3 : Hücre duvarı geçirgenliğini etkileyen maddelerin L-fenilalanin oluşumuna etkisi
 T = 30°C, pH = 10, C_{T0} = 50 mmol/dm³, C_{A0} = 7.5 mol/dm³

tepkimesine kıyasla dönüşüm artmakta ; diğer katkı maddeleriyle ise azalmaktadır. L-fenilalanine dönüşümü olumlu yönde etkileyen PEG'ün PAL enzimine kovalent bağ ile bağlandığı ; bu şekilde aktive edilen PAL'in *R.glutinis*'in salgıladığı diğer parçalayıcı enzimlere karşı direncini artırdığı öne sürülmektedir [2]. Bu çalışmada PEG'den daha iyi sonuç veren Na-glutamatın da benzer şekilde PAL ile enzimin tersinmez olarak parçalanmasına neden olan proteolitik enzimlere karşı dirençli bir kompleks oluşturduğu ve böylece daha aktif hale getirdiği düşünülebilir. Diğer katkı maddeleriyle elde edilen sonuçlar ise bunların PAL'i aktive değil, inhibe ettiğini göstermektedir.

Kullanılan katkı maddelerinin PAL enziminin tekrar kullanılabilirliğine etkisini incelemek için biyokatalizör tepkime ortamından ayırıldıktan sonra ikinci bir 20 st daha aynı koşullarda biyotepkimelerde kullanılmış ve 2. kullanım ile ürün derişimindeki bağıl azalma kontrol ile % 83, Na-glutamat ile % 80, PEG ile % 88, alginat ile % 78, KCl ile % 66 ve sorbitol ile % 82 olmuştur. Enzimi daha aktif hale getiren katkı maddeleri aynı zamanda kararsızlık yaratırken, aktivitesini olumsuz etkileyen maddeler kararlılığı artırmaktadır. Sonuç olarak kararlılık artırma çalışmalarında daha iyi sonuçlar alınana kadar, PAL'in aktive edilerek biyodönüşümlerde bir kez kullanılması uygun görülmektedir.

Geçirgenlik artırıcı maddelerin L-fenilalanin derişimi ve PAL kararlılığına etkisi :

Hücre içi bir enzim olan PAL'i salgılayan *R.glutinis*'in hücre duvarı geçirgenliğini değiştirerek ürün derişimini artırmak amacıyla tepkime ortamına ayrı ayrı % 2 toluen, % 0.005 biyotin ve 3000 U penisilin eklenmiş ve 20 st süren biyotepkimelerde elde edilen sonuçlar Şekil 3'de gösterilmiştir. Ortama eklenen biyotinin herhangi bir etkisi olmazken, toluenli ortamda 20 st sonunda L-fenilalanin derişiminde kontrol tepkimesine göre % 23 azalma gözlenmiş ; penisilin ile ise % 16 daha fazla üretim sağlanmıştır. Substrat trans-sinamik asitün hücre içine yayınığını ve oluşan L-fenilalaninin tepkime sıvı ortamına yayınığını hücre duvarı geçirgenliğini artırarak kolaylaştıran penisilin tepkime ortamında bulunması ile daha yüksek verim elde edilmektedir.

Hücre duvarı geçirgenliğini değiştiren maddelerin PAL kararlılığına etkisi tepkime ortamından ayrılan *R.glutinis*'in ikinci bir 20 st aynı koşullarda biyotepkimelerde kullanılmasıyla denenmiş ve kontrol tepkimesinde 2. kullanımda azalma % 82 iken, bu değer toluen ile % 78, biyotin ile % 90 ve penisilin ile % 62 olarak saptanmıştır. Bu sonuçlara göre PAL aktivitesini ve kararlılığını birarada artıran penisilin tepkime ortamında bulunması olumludur.

KAYNAKLAR

1. K. Nakamichi, K. Nabe, S. Yamada ve I. Chibata, "Induction and stabilization of L-phenylalanine ammonia-lyase activity in *Rhodotorula glutinis*", *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 18 (1983) 158-162.
2. C.T. Evans, D. Conrad, K. Hanna, W. Peterson, C. Choma ve M. Misawa, "Novel stabilization of phenylalanine ammonia-Lyase catalyst during bioconversion of trans-cinnamic acid to L-phenylalanine", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25 (1987) 399-405.
3. C.T. Evans, C. Choma, W. Peterson ve M. Misawa, "Bioconversion of trans-cinnamic acid to L-phenylalanine in an immobilized whole cell reactor", *Biotechnol. Bioeng.*, 30 (1987) 1067-1072.
4. S.A. Cohen, "The PICO. TAG System : A new method to analyze primary and secondary amino acids with one picomole sensitivity", *BioTechniques*, Sept/Oct (1984) 273-275.

BİYODÖNÜŞÜMLE ASPARTİK ASİTTEN L-ALANİN ÜRETİMİ

Güzide ÇALIK ve İ. Halil VURAL

Ankara Üniversitesi, Kimya Mühendisliği Bölümü, 06010 Tandoğan-Ankara-Türkiye

BIOPRODUCTION OF L-ALANINE FROM ASPARTIC ACID

SUMMARY

Production of L-alanine by means of biochemical processes can be achieved not only with high yield but it eliminates the side products under mild operation conditions, as well. In this work, bioproduction process of L-alanine from aspartic acid using L-aspartat β -decarboxylase activity of *Pseudomonas dacunhae* (DSM 1455) was investigated. Optimum solid and liquid growth media were designed, considering the highest enzyme activity, in small scale, agitation- and heating rate-controlled bioreactors, and optimum pH and temperature for the enzyme activity were found as 7.5 and 299 K, respectively. Glutamic acid was used as the carbon source for the growth and $C_0 = 10 \text{ g/dm}^3$ and 15 g/dm^3 were the optimum values for the biomass concentration (C_x) and the enzyme activity (r_0), respectively. Higher concentrations of glutamic acid inhibited the growth and the enzyme activity. Under optimum conditions, $C_0 = 72.5 \text{ g/dm}^3$ L-alanine was produced by 81.5% conversion of the aspartic acid.

ÖZET

Biyodönüşüm prosesleriyle L-alanin üretimi yüksek dönüşümle, yan ürün oluşturmadan ve ılımlı koşullarda gerçekleştirilmektedir. *Pseudomonas dacunhae* (DSM 1455) hücrelerinin L-aspartat β -dekarboksilaz enzimi kullanılarak aspartik asitten L-alanin üretim prosesinin araştırılması amacıyla, enzim aktivitesi kriter alınarak üretim sağlayan *P. dacunhae* hücrelerinin katı ve sıvı çoğalma ortamı tasarımı yapılmıştır. Küçük ölçekte karıştırma ve ısıtma kontrollü sistemlerde gerçekleştirilen biyodönüşümlerle en uygun çoğalma ortamı pH ve sıcaklığının sırasıyla 7.5 ve 299 K olduğu bulunmuştur. Mikroorganizma, çoğalma ortamında glutamik asiti karbon kaynağı olarak kullanmaktadır. $C_0 = 10 \text{ g/dm}^3$ ve 15 g/dm^3 derişimlerde glutamik asit sırasıyla biyokütle derişimi (C_x) ve enzim aktivitesi (r_0) açısından en uygun değerlerdir. Yüksek derişimlerinde ise hem C_x , hem de r_0 azalmaktadır. Optimum koşullarda aynı biyoreaktör sisteminde %81.5 aspartik asit biyodönüşümü ile $C_0 = 72.5 \text{ g/dm}^3$ derişimde L-alanin üretilmiştir.

GİRİŞ

Doğal ipeğin ana bileşeni olması nedeniyle sentetik elyaf üretiminde, tad verici bir madde olduğundan bazı yiyecek ve içeceklerde katkı maddesi olarak, kolay özümlenen bir azot kaynağı olması nedeniyle de damardan yapılan beslemelerde serum bileşenlerinden biri olarak kullanılan L-alanin, üretimi ve kullanım alanları gün geçtikçe artan bir amino asittir.

Sürel yaygın literatüründe, kimyasal üretimle kıyaslandığında yüksek dönüşümle, yan ürün oluşturmadan ve ılımlı koşullarda L-alanin üretimini

mümkün kulan biyodönüşüm ile üretim prosesleri hakkında detaylı bilgi mevcut değildir. Bulunan az sayıda bilgi, patent literatürü ile kıyaslandığında ise çelişen sonuçlarla karşılaşmaktadır.

Chibata vd (1965), *Pseudomonas dacunhae* hücrelerinin L-aspartat β -dekarboksilaz enzimi kullanarak L-aspartik asitten L-alanin üretimini incelemiş ve 37°C sıcaklıkta 72 st'de küçük ölçekte yüksek dönüşümle L-alanin ürettiğini bildirmişlerdir (1). Chibata vd (1987) ise K-Carrageenan'a tutuklanmış hücreler ile fumarik asitten L-alanin üretiminde enzim kararlılığını artırma çalışmaları yapmışlardır (2). Furui ve Yamashita (1983) yüksek basınçlı sistemde piston akış düzeninde, karışmalı ve atmosfer basıncında çalışan sisteme kıyasla daha yüksek dönüşüm elde edildiğini bildirmişlerdir (3).

Pseudomonas dacunhae hücrelerinin L-aspartat β -dekarboksilaz enzimi ile L-aspartik asitten L-alanin üretimi prosesinin literatürde yer almayan işletme koşullarını belirlemek amacıyla ele alınan bu çalışmada, enzim aktivitesini en yüksek kulan mikroorganizma katı ve sıvı çoğalma ortamı tasarımı yapılmış, çoğalma ve aktivite için en uygun işletme koşulları belirlenmiştir. Mikroorganizmanın karbon kaynağı olarak tükettiği glutamik asitin optimum derişimi bulunmuş en uygun koşullarda L-alanin üretimi küçük ölçekte gerçekleştirilmiştir.

DENEL BÖLÜM

Enzim kaynağı olarak kullanılan *P. dacunhae* (DSM 1455) mikroorganizması, %0.3 et özütü, %1.25 maya özütü, %0.5 pepton %0.5 KH_2PO_4 ve %1.5 agar içeren ve pH değeri 4M KOH ile 7.0'a ayarlanan eğik agar ortamında 303 K sıcaklıkta 18 st inkübe edilerek katı ortamda çoğaltılmış, bu ortamdan %2.78 L-glutamik asit, %0.5 maya özütü, %0.05 KH_2PO_4 ve %0.01 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ içeren, pH değeri 7.5 olan 20 ml hacmindeki sıvı çoğalma ortamlarına ekilmiş; 303 K sıcaklıkta 105 dk⁻¹ hızda çalıştırılan çalkalamalı su banyosunda 24 st kalma süresinde tutularak mikroorganizma derişimi artırılmıştır.

Enzim aktivitesini belirlemek amacıyla, 1M L-aspartik asit, 1mM pirüvik asit, 0.1mM piridoksal 5-fosfat (PLP) ve %0.1 Tween 20 içeren çözeltinin pH'ı %25 NH_4OH çözeltisi ile 5.5 değerine ayarlanmış; bu karışımın 5 ml'sine belirlenen derişimlerde mikroorganizma eklenmiş, çalkalamalı su-banyosunda, 310 K sıcaklıkta 2 st süre ile tepkime gerçekleştirilerek oluşan L-alanin miktarı belirlenmiştir. Enzim aktivitesi ya da L-alanin başlangıç üretim hızı (r_0), $\mu\text{mol/ml st}$ ya da $\mu\text{mol/mg st}$ olarak tanımlanmıştır.

Değişik koşullarda gerçekleştirilen biyodönüşümlerde L-alanin derişimi Waters Pico-Tag Amino Asit Analiz Sisteminde ölçülmüş; farklı çoğalma koşullarındaki mikroorganizma derişimleri ise Shimadzu UV-160 A Spektrofotometresinde 500 nm'de hazırlanmış olan kalibrasyon eğrisi kullanılarak bulunmuştur.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Pseudomonas dacunhae hücrelerinin ilk çoğalma basamağı olan katı ortam bileşimini belirlemek amacıyla yedi ayrı katı ortam tasarlanarak mikroorganizma çoğalma ve enzim aktivitesi açısından en uygun katı ortam belirlenmiştir. Buna göre yukarıda bileşimi verilen katı ortamın en uygun

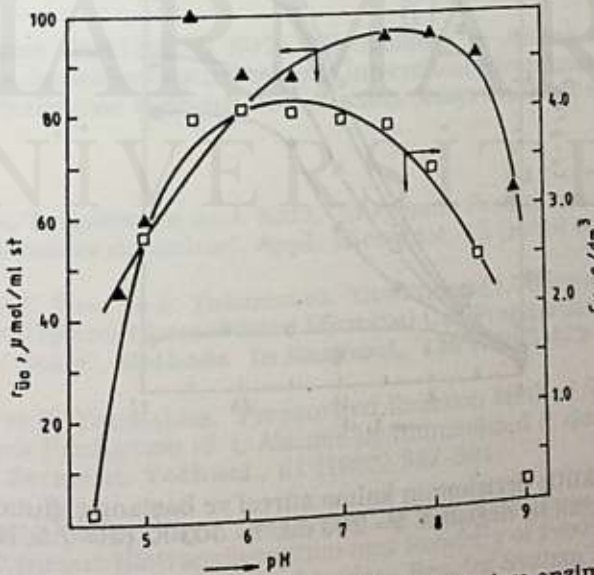
olduğu bulunmuştur.

En uygun sıvı çoğalma ortamını belirlemek amacıyla ise dört ayrı ortam denenmiş ve içinde literatürde verilenler ve onların içinde yine bileşimi yukarıda verilen sıvı çoğalma ortamının enzim aktivitesi açısından en uygun olduğu bulunmuştur.

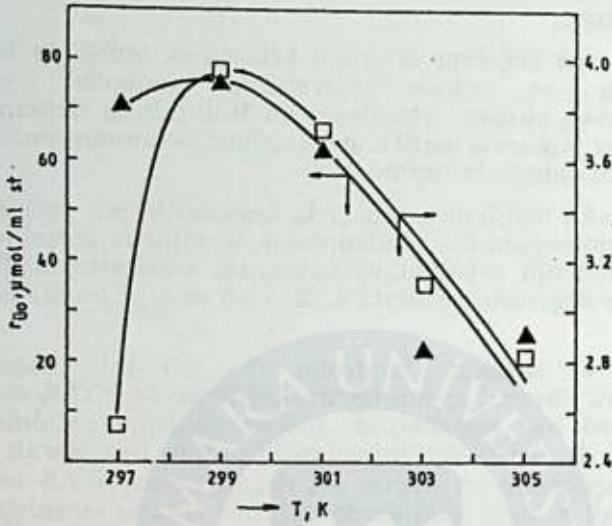
Kasyon etkisini belirlemek amacıyla L-aspartik asit yerine L-aspartik asitin sodyum ve potasyum tuzu kullanılarak tepkimeler gerçekleştirilmiştir. L-Aspartik asit, sodyum aspartat ve potasyum aspartatın kullanılmasıyla elde edilen aktivite değerinin sırasıyla 4.72, 1.40 ve 4.37 $\mu\text{mol}/\text{mg st}$ olduğu bulunmuştur.

Karıştırma ve sıcaklık kontrollü, $V=20$ ml çalışma hacimli mikrobiyolojik hava filtreleri içeren biyoreaktörlerde $T=303$ K sıcaklık ve $N=105$ dk^{-1} karıştırma hızı koşullarında mikroorganizma çoğalma ortamının biyokütle derişimi, C_x , ve L-alanin başlangıç üretim hızı olarak tanımlanan enzim aktivitesi açısından en uygun pH değeri sırasıyla 7.5 ve 6.5 olarak bulunmuştur, Şekil 1. Aynı koşullarda çoğalma ortamı sıcaklığının etkisini belirlemek amacıyla yapılan deneyler sonucu ise $T=299$ K değerinin hem mikroorganizma derişimi hem de enzim aktivitesi açısından en uygun olduğu bulunmuştur, Şekil 2.

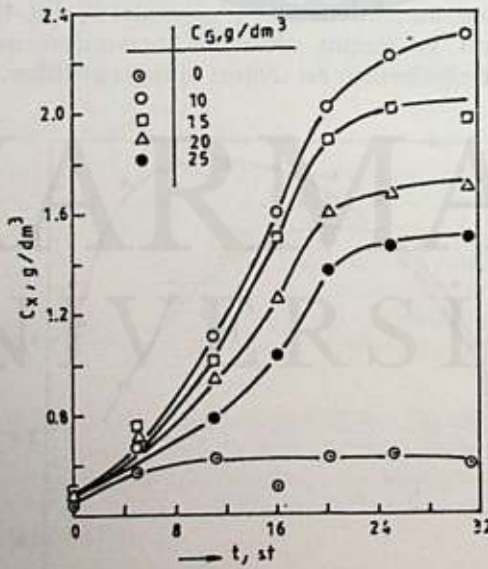
Çoğalma ve enzim üretim ortamında karbon kaynağı olarak bulunan glutamik asitin en uygun derişimini belirlemek ve literatürde verilen (4) 27.8 g/dm^3 değeri ile kıyaslamak amacıyla, $\text{pH}=7.5$, $T=303$ K, $N=105$ dk^{-1} koşullarında $V=20$ ml'den ölçek büyütme ile $V=200$ ml'ye geçilerek glutamik asit derişiminin, kalma süresi (t) ile mikroorganizma derişiminin (C_x) değişimine (Şekil 3) ve enzim aktivitesine (r_{00}) etkisi (Şekil 4) araştırılmış ve mikroorganizma derişimi ve enzim aktivitesi açısından sırasıyla $C_0=10$ g/dm^3 ve $C_0=15$ g/dm^3 değerlerinin en uygun olduğu görülmüştür, Şekil 4.



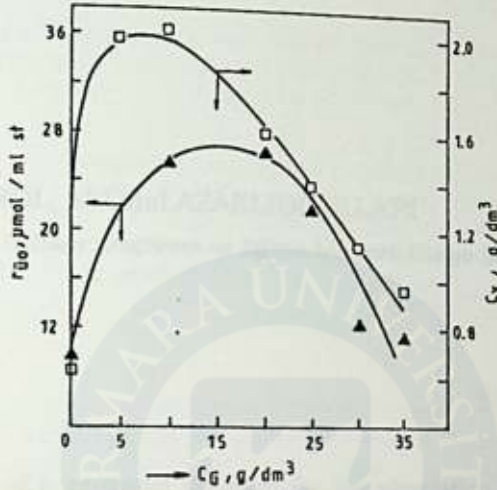
Şekil 1. Çoğalma ortamı pH'nın biyokütle derişimi ve enzim aktivitesine etkisi. $V=20$ ml, $T=303$ K, $N=105$ dk^{-1} , $t=2$ st.



Şekil 2. Çoğalma ortamı sıcaklığının biyokütle derişimi ve enzim aktivitesine etkisi. V= 20 ml, pH= 7.5, N= 105 dk⁻¹, t= 2 st.



Şekil 3. Biyokütle derişiminin kalma süresi ve başlangıç glutamik asit derişimi ile değişimi. V= 200 ml, T= 303 K, pH= 7.5, N= 105 dk⁻¹.



Şekil 4. Glutamik asit derişiminin biyokütle derişimi ve enzim aktivitesine etkisi. $V=200$ ml, $T=303$ K, $pH=7.5$, $N=105$ dk⁻¹, $t=25$ st.

Aynı biyoteknik sisteminde, $V=50$ ml hacimli reaktörlerde $C_{A0}=1$ M L-aspartik asit, 0.1 mM pirüvik asit, %0.1 Tween-20 içeren girdi karışımı ve 0.421 g yaş biyokütle kullanılarak, $T=310$ K, $pH=5.5$ ve $N=105$ dk⁻¹ koşullarında, $t=29$ st kalma süresinde L-aspartik asitin %81.5 dönüşümü ile $C_0=72.5$ g/dm³ derişimde L-alanin üretilmiştir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma 89K120390 No'lu "Biyopolimer ve Amino Asit Üretimi" konulu proje ile desteklenmiştir. Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Araştırma ve Uygulama Merkezi'ne sağladığı desteklerden dolayı teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. I. Chibata, T. Kakimoto ve J. Kato, "Enzymatic Production of L-Alanine by *Pseudomonas dacrnhae*", **Appl. Microbiol.** 13 (1965) 638-645.
2. I. Chibata T. Tosa ve S. Takamatsu, "Continuous L-Alanine Production Using Two Different Immobilized Microbial Cell Preparations on Industrial Scale", **Methods in Enzymol.**, 136 (1987) 472-479.
3. M. Furui ve K. Yamashita, "Pressurized Reaction Method for Continuous Production of L-Alanine by Immobilized *P. dacrnhae* Cells", **J. Ferment. Technol.**, 61 (1983) 587-591.
4. S. Takamatsu ve D.Y. Ryu, "Recirculating Bioreactor-Separator System for Simultaneous Biotransformation and Recovery of Product: Immobilized L-Aspartate β -Decarboxylase Reactor System", **Biotechnol. Bioeng.** 32 (1988) 184-191.



Şekil 4. Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değişimi.

Aynı prosedürün uygulanmasıyla elde edilen sonuçlar aşağıdaki gibidir. Dondurma için pH değeri 7.5'ten 7.0'a düşmüştür. Dondurulan dondurma için pH değeri 7.0'tan 6.5'e düşmüştür. Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri 6.5'ten 6.0'a düşmüştür. Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri 6.0'tan 5.5'e düşmüştür.

TEKİSTİRME
Bu çalışma, dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır. Çalışma, dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır. Çalışma, dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır.

KAYNAKLAR

1. Çelikkaya, T. (2007). Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır. *Journal of Food Science and Technology*, 30(1), 1-5.
2. Çelikkaya, T. (2008). Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır. *Journal of Food Science and Technology*, 31(1), 1-5.
3. Çelikkaya, T. (2009). Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır. *Journal of Food Science and Technology*, 32(1), 1-5.
4. Çelikkaya, T. (2010). Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır. *Journal of Food Science and Technology*, 33(1), 1-5.
5. Çelikkaya, T. (2011). Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır. *Journal of Food Science and Technology*, 34(1), 1-5.
6. Çelikkaya, T. (2012). Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır. *Journal of Food Science and Technology*, 35(1), 1-5.
7. Çelikkaya, T. (2013). Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır. *Journal of Food Science and Technology*, 36(1), 1-5.
8. Çelikkaya, T. (2014). Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır. *Journal of Food Science and Technology*, 37(1), 1-5.
9. Çelikkaya, T. (2015). Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır. *Journal of Food Science and Technology*, 38(1), 1-5.
10. Çelikkaya, T. (2016). Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır. *Journal of Food Science and Technology*, 39(1), 1-5.
11. Çelikkaya, T. (2017). Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır. *Journal of Food Science and Technology*, 40(1), 1-5.
12. Çelikkaya, T. (2018). Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır. *Journal of Food Science and Technology*, 41(1), 1-5.
13. Çelikkaya, T. (2019). Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır. *Journal of Food Science and Technology*, 42(1), 1-5.
14. Çelikkaya, T. (2020). Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır. *Journal of Food Science and Technology*, 43(1), 1-5.
15. Çelikkaya, T. (2021). Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır. *Journal of Food Science and Technology*, 44(1), 1-5.
16. Çelikkaya, T. (2022). Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır. *Journal of Food Science and Technology*, 45(1), 1-5.
17. Çelikkaya, T. (2023). Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır. *Journal of Food Science and Technology*, 46(1), 1-5.
18. Çelikkaya, T. (2024). Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır. *Journal of Food Science and Technology*, 47(1), 1-5.
19. Çelikkaya, T. (2025). Dondurma ve dondurulmuş dondurma için pH değeri ve pH değeri ile ilgili olarak yapılmıştır. *Journal of Food Science and Technology*, 48(1), 1-5.

RADYASYON PROSES DOZİMETRİSİNDE DOZHES PROGRAMININ KULLANIMI

A. Yılmaz ERKOL, M. Ünal AZAKLIOĞULLARI

TAEK, Çekmece Nükleer Araştırma ve Eğitim Merkezi, Kimya Bölümü, P.K.1, Havaalanı-
İSTANBUL

SUMMARY

The use of a computer program for the simulation, planning, design and evaluation of a industrial irradiation plant minimizes the time losses for the dosimetric measurements and also provides better understanding of the plant operation.

A computer program, named DOZHES, has already been developed in FORTRAN language by using of DSKMF2 code which was written in PL-1 language. The program is capable to calculate the dose rate distribution in an irradiation plant in which Co-60 source racks are housed.

ÖZET

Endüstriyel ışınlama tesislerinin tasarımı, planlanması, simülasyonu, teknik ve güvenlik yönlerinden değerlendirilmesinde ve de doz hızı dağılımlarının hesaplanmasında bilgisayar programlarının kullanılması, hem yapılması gerekli dozimetrik ölçümler için zaman ve iş kaybını en alt düzeye indirmekte hem de tesis işletme programında yapılacak değişiklikleri başlangıçta önlemektedir.

Bu maksatla, PL-1 dilinde yazılmış DSKMF2 programından yararlanılarak FORTRAN dilinde DOZHES kodu geliştirilmiştir. DOZHES programı yardımı ile Co-60 radyoaktif kaynağını barındıran bir ışınlama ünitesindeki doz hızı dağılımı hesaplanabilmektedir.

Bu çalışmada; DOZHES programı vasıtasıyla 3 MCl ışınlama kapasiteli bir Co-60 kaynağını barındıran bir tesiste, çalışma esnasında maruz kalınacak maksimum dozlar çeşitli program koşulları ile hesaplanmış ve tesisin farklı bölgeleri için öngörülen biyolojik zırh kalınlıklarının, maruz kalınacak doz miktarları üzerindeki etkileri incelenmiştir.

GİRİŞ

Radyasyonun çeşitli alanlardaki uygulamaları; istendiğinde kimyasal etkileşimleri başlatmak, biyolojik değişiklikler oluşturmak ve malzemelerin fiziksel ve kimyasal özelliklerini değiştirmek için radyasyon enerjisinin bilinçli kullanımına dayanmaktadır. Endüstriyel ışınlama tesislerinin kurulması bu amaçların gerçekleştirilmesine yönelik temel araçtır.

Bu tür tesislerin tasarımı, planlanması, simülasyonu, teknik ve güvenlik yönlerinden değerlendirilmesinde ve de doz hızı dağılımlarının hesaplanmasında bilgisayar programlarının kullanılması, hem yapılması gerekli dozimetrik ölçümler için zaman ve iş kaybını en alt düzeye

İndirmekte, hem de tesis işletme programında yapılacak değişiklikleri başlangıçta önlemektedir(1).

Bir ışınlama tesisi içinde, radyasyon alanlarının belirlenmesi için alanın birçok noktasındaki doz hızlarının bulunması gerekmektedir. Bu da tesisin içindeki kaynağın yarattığı alanın herbir noktadaki etkilerinin hesaplanmasını içermektedir.

Yakın gelecekte ülkemizde de kurulması planlanan ışınlama tesisinin daha verimli çalışması amacı ile ilk olarak PL/1 dilinde yazılmış DOSKMF2(2) programından yararlanılarak FORTRAN dilinde DOZHES(3,4) adıyla yeni bir program geliştirilmiştir(5). DOZHES programı yardımı ile Cobalt radyoaktif kaynağını barındıran bir ışınlama ünitesindeki doz hızı dağılımı hesaplanabilmektedir.

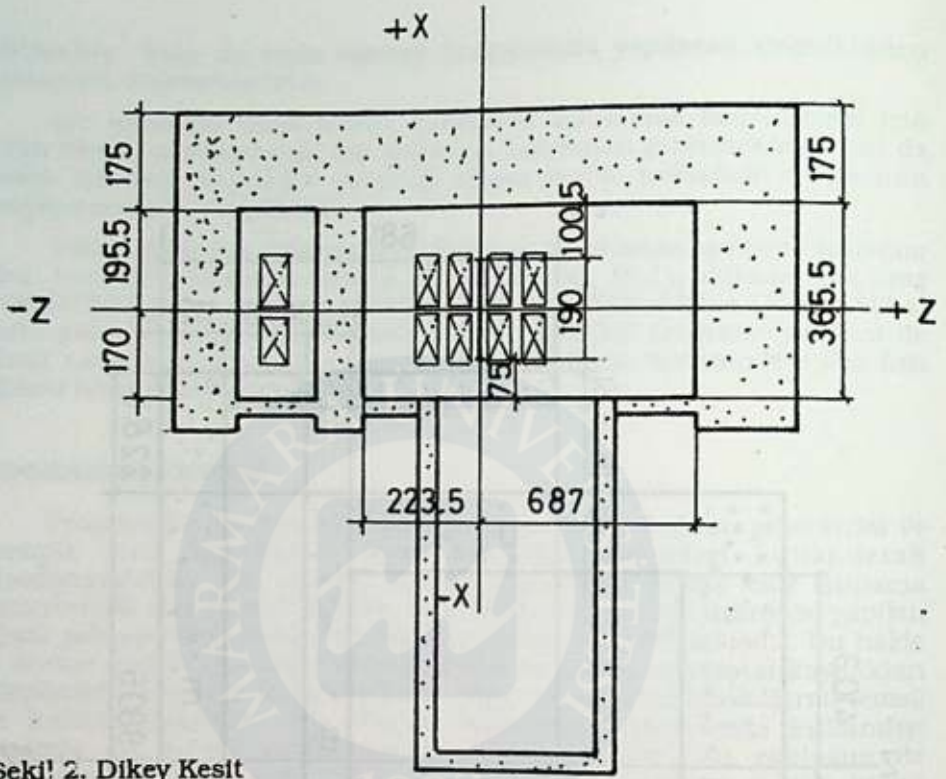
PROGRAM HAKKINDA

Programda doz hızı hesaplarında ışınlama kaynağının geometrisi ve biyolojik zırh kalınlıkları farklı koordinat sistemleri kullanılarak tanımlanmaktadır. Bu suretle, karmaşık geometrik yapıya haiz ışınlama alanlarındaki doz hızının hesabı, ana hesaplama modeli üzerinde yapılan değişik yaklaşımlarla kolay ve hassas bir tarzda yapılabilmektedir. Bu halde göz önüne alınan koordinat sistemlerinden bir tanesi radyasyon kaynakları ve tüplerini temsil için kullanıldığında, diğer biri zırhlama tabakalarını temsil için kullanılmaktadır. Doz oluşum faktörlerinin programda kullanılışı sırasında da Taylor yaklaşımından faydalanılmıştır. Bu yaklaşım ile yutucunun sonsuza dek uzanan bir tabakadan meydana geldiği kabul edilmekte olup bu sayede doz oluşum faktörü, iki eksponensiyel fonksiyonun toplamı şeklinde ifade edilebilmektedir. Benzer şekilde, birden fazla tabakadan oluşan bir yutucu söz konusu olduğunda, tabakaların çok kalın olması koşuluyla, eksponensiyel fonksiyonların sayısı, tabaka sayısına bağlı olarak artmaktadır.

DENEL BÖLÜM

DOZHES programı yardımı ile tıbbi gereçlerin sterilizasyonu için kurulması öngörülen ve maksimum 3 MCi kaynak (Co-60) kapasiteli bir ışınlama tesisinde, çalışma esnasında maruz kalınacak maksimum dozlar, programla yapılan çeşitli koşullar ile hesaplanmış ve tesisin muhtelif bölgeleri için öngörülen biyolojik zırh kalınlıklarının, maruz kalınacak doz miktarları üzerindeki etkileri incelenmiştir.

Işınlama odasının, giricilik gücü yüksek Co-60 gama ışınlarına karşı biyolojik zırhının, 2.35 g/cm^3 yoğunluklu betondan yapıldığı ve 1.5-1.9 m duvar ve tavan kalınlıklarına haiz olduğu düşünülmüştür. Labirentin de aynı düşünce ile 0.5-1.5 m kalınlıklı duvarlardan oluştuğu kabul edilmiştir. Öngörülen tesiste, ışınlanacak ürünler taşıma sistemi ile labirente alınmakta, radyasyon kaynağı çevresined önceden belirlenen hızda dolaştırılarak istenen gama ışınlama dozu verildikten sonra ışınlama alanı dışına çıkarılmaktadır. Işınlama yapılmadığı zaman radyasyon kaynağı, biyolojik zırh görevi yapan demineralize su ile dolu 6 m derinlikteki bir havuzda bekletilmektedir. Öngörülen ışınlama odasının yatay ve dikey kesitleri Şekil 1-2 de verilmektedir.



Şekil 2. Dikey Kesit

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

3 MCl kaynak aktivitesi için dış duvarlar, tavan, personel ve malzeme kapılarındaki radyasyon doz şiddetleri DOZHES programı ile hesaplanmış olup elde edilen sonuçlar Tablo 1'de gösterilmektedir.

Tablo 1. Çeşitli Konumlardaki Doz Şiddetleri

Konum	Beton Kalınlığı (cm)	Doz Şiddeti (mR/h)
A Duvarı	193	0.2384
B Duvarı	91.5	1.683
C Duvarı	175	0.518
D Duvarı	175	1.0456
E Duvarı	103.5	0.01755
F Duvarı	236	0.6066E-03
Pers. Kapısı	175	0.539
Tavan	199	0.1694

Kaynak Şekli: 60 adet paralel çubuk.

IAEA (Uluslararası Atom Enerjisi Ajansı)'nın müsaade ettiği maksimum doz şiddeti, ışınlama odasının dışındaki alanlarda 0.25 mR/h.

İNİVERSİTESİ YAYINEVİ
içinde ise 2.5 mR/h'dir. Bu ise tesiste çalışanların 10 mrem/yıl maksimum dozu aşmadan haftada 40 saat çalışmalarını mümkün kılmaktadır.

DOZHES ile hesaplanan doz şiddetleri, tesisin biyolojik zırhının dışındaki her yerde müsaade edilen seviyenin çok altında kaldığından, 3 MCl dizayn edilen zırhın radyasyon açısından güvenilir olduğu gözlenmektedir.

Sonuç olarak, geliştirilen DOZHES bilgisayar programının yeni ışınlama tesislerinin planlama ve dizayn edilme aşamalarında kullanılabileceği ve zırhlama için sarfedilen çabaların ve zırh maliyetlerinin en düşük düzeye indirilmesinin mümkün olabileceği anlaşılmaktadır.

KAYNAKLAR

1. M.K. Sinha, S.K. Kulkarni, "Computer Code for Dose Distribution in a Multi Element Gamma Irradiation Cell", **Appl.Radiat.Isot.** Vol.42, No.1 (1991).
2. M. Remer "DOSKMF2 - Dosisleistungsberechnung für eine Kombinierte Bestrahlungsanlage mit Aufbereitung für Graphische Ausgabe", **AdW, ZfI, IRZw, Archivnr. 6J34J1**, (Dec. 1982).
3. M.Ü. Azaklıoğulları, A.Y. Erkol, "Design and Shield Evaluation of the Sarayköy Irradiation Facility", **Proceedings of the 1. General Conference of the Balkan Physical Union, 26-28/09/1991, Thessaloniki-Greece.**
4. A.Y. Erkol, M.Ü. Azaklıoğulları, "Radyasyon Proses Dozimetrisi", **III. Ulusal Medikal Fizik Kongresi, 19-21/09/1991, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.**
5. **VAX-11 Fortran Language Reference Manual** (Apr. 1982).

MARMARA
ÜNİVERSİTESİ

...the
... ..
... ..
... ..
... ..

-
... ..
... ..
... ..
... ..
... ..

MARMARA
ÜNİVERSİTESİ

**BIYOPROSESLERDE BİYOREAKTÖR PERFORMANSININ SİMÜLASYONU**

Ahmet ÖZEMRE ve Fazilet VARDAR SUKAN

*Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, Kimya Mühendisliği Bölümü 35100, İzmir***SIMULATION OF BIOREACTOR PERFORMANCE IN BIOPROCESSES****SUMMARY**

In large scale stirred tank bioreactors limitations in transport phenomena coupled with high hydrostatic pressures create significant spatial and temporal variations in dissolved gas concentrations, depending on the efficiency of mixing. The model developed here provides a simple means for the prediction of the final productivity in production scale bioreactors, when the mixing time is known. Simulation of dissolved gas fluctuations by imposing sinusoidal pressure changes, leads to each point on the sine curve describing a change in pressure and hence in DOT as a function of time, representing the conditions a discrete element of culture is exposed to in its circulation through the different regions in a mechanically agitated bioreactor. The proposed model can be adapted to different bioprocesses with available data facilitating the work of design and process engineers in biindustries.

ÖZET

Büyük çaplı karıştırılmalı tank reaktörlerde, transport olaylarındaki kısıtlamalar yüksek hidrostatik basınç ile birleştiğinde reaktörün karıştırma verimliliğine bağlı olarak, reaktör içi gaz konsantrasyonlarında yerel ve zamana bağlı farklılıklar yaratır. Bu çalışmada, gözlenen bu heterojen ortamsal koşulların verim üzerindeki etkilerini tahminlemek için bir model geliştirilmiştir. Bu modelde, proses verimliliği yönünden en etkin parametrelerden biri olan çözünmüş oksijen konsantrasyonu temel değişken olarak alınmış ve sistemin toplam basıncı sinusoidal olarak değiştirilerek, çözünmüş oksijen konsantrasyonundaki heterojeniteler simüle edilmiştir. Bu durumda sinüs eğrisindeki her nokta, reaktör içindeki mikroorganizmaların sirkülasyonu sırasında karşılaştıkları farklı basınç, dolayısı ile farklı çözünmüş oksijen konsantrasyonlarına karşı gelmektedir. Geliştirilen bu model gerekli verilere sahip farklı biyoreaktörlere uyarlandığında tasarım ve proses mühendislerine yardımcı olacaktır.

GİRİŞ

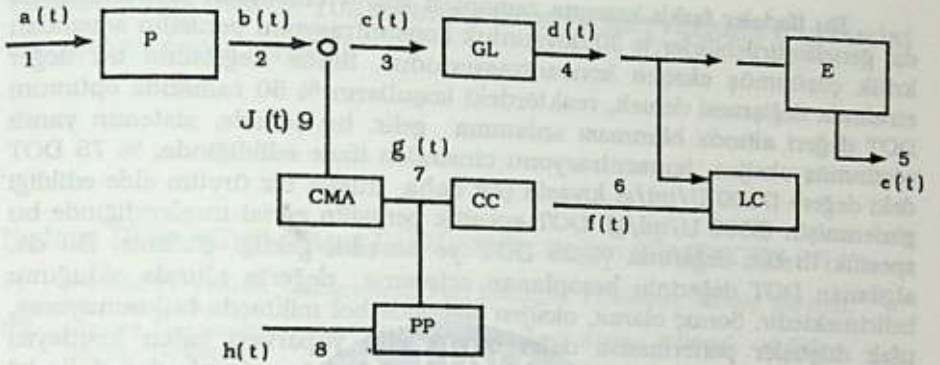
Karıştırılmalı tank tipi biyoreaktörlerde transport olaylarındaki kısıtlamalar, yüksek hidrostatik basınçla birleştiğinde reaktörün karıştırma verimliliğine bağlı olarak reaktör içi gaz konsantrasyonlarında yerel ve zamana bağlı farklılıklar yaratır. Benzer heterojeniteler, yeni geliştirilmekte olan ve giderek önem kazanan hava-kaldırmalı veya kule tipi biyoreaktörlerde de gözlenir. Bu farklılık, özellikle ölçek büyüdükçe daha belirgin hal alır. Biyoprosesler, kimyasal proseslere oranla ortamsal koşullardaki en küçük değişikliğe daha duyarlı olduğundan, sözü geçen heterojeniteler, endüstriyel çaplı biyoreaktörlerde laboratuvar çapındakilere kıyasla gözlenen verim düşüşlerinin başlıca nedenidir. Yapılan deneysel çalışmalar tasarım ve ölçek büyütme aşamalarında ortamsal koşullardaki bu farklılıkların mutlaka dikkate alınması gerektiğini göstermektedir (1-3). Bu çalışmada, büyük çaplı reaktörlerde gözlenen bu etkilerin ürün verimi ile ilişkileri, olayın matematiksel modellenmesi ile yorumlanmaya çalışılmıştır.

DENEL BÖLÜM

Bu modellemede temel değişken olarak biyoreaktörlerin verimliliklerinden en önemli para metrelerden biri olan çözünmüş oksijen konsantrasyonu (DOT) alınmıştır. DOT nin reaktör içindeki hidrostatik basınca ve mikrobiyal solunuma bağlı olarak dikey boyutta, karıştırma verimliliğine ve karıştırıcı dispersiyon kapasitesine bağlı olarak yatay düzlemde değiştiği düşünülerek, herhangi bir hacim elemanının reaktör içinde izleyebileceği yol zamana bağlı olarak bir sinüs fonksiyonu ile tanımlanmıştır. Laboratuvar çapında bir reaktörde basıncın sinüsoidal olarak 1-2 atm arasında 2 dakikalık bir periyotta değiştirildiği deneysel çalışma verileri esas alınmıştır (3,4). Örnek sistem olarak seçilen penisilin üretim prosesi, ortamsal koşulların çok etkin olduğu ve önemli ölçek büyütme sorunları olan tipik bir biyoprosesdir (5). Endüstride ulaşılabilen ürün konsantrasyonları, biyoreaktörde karşılaşılan farklı koşulların bir fonksiyonudur. Yapılan deneysel çalışmalar, sistemde çözünmüş oksijen konsantrasyonunun %23 ile %37 ve %10 ile %15 doyunluk konsantrasyonu arasında değiştiği durumlarda ürün oluşum hızlarında sıra ile %30 ve %75 mertebelerinde düşüşler olduğunu göstermiştir. Bu veriler kullanılarak, toplam sürecin her kademesi matematiksel bir ifade ile gösterilmiştir.

SONUÇLAR ve TARTIŞMA

Toplam süreç, uygulanan basınç, reaktör içi basınç, gaz-sıvı kütle transferi, oksijen elektrodu yanıtı, sıvı-hücre kütle transferi, hücre içi kütle transferi, hücresel metabolik faaliyet ve penisilin üretim mekanizması şeklinde 8 aşamalı, geri döngülü bir sistem olarak düşünülmüştür. (Şekil 1) Reaktör toplam basıncındaki sinüsoidal değişiklik oksijenin kısmi basıncı cinsinden $a(t)$ fonksiyonu ile tanımlanmış, bu toplam basınç değişikliğinin reaktördeki hava kabarcıklarındaki etkisi ise $b(t)$ fonksiyonu ile ifade edilmiştir (Tablo). Buna göre toplam basınçta 2 dakikalık periyotlar içinde meydana gelen değişiklikler, bir genlik farkı ile gaz kabarcıklarına yansımaktadır. Çalışılan oksijen elektrodun ölü zamanı 6 saniye, yanıt süresi 10 saniye şeklinde deneysel olarak belirlendiği koşullarda, standart penisilin üretim reaktöründe kuru hücre ağırlığı konsantrasyonu (20 g/l) dir. Bu koşullar altında gaz - sıvı kütle transfer basamağının 1. dereceden bir transfer fonksiyonuna sahip olduğu varsayılarak belirlenen zaman sabiti 15.1 saniyedir. Kabarcık içi gaz basıncının sinüsoidal değişimi, sıvı fazında çözünmüş oksijen konsantrasyonunda sinüsoidal bir değişime neden olmaktadır. Bunun doğruluğu da oksijen elektrodunda gözlenen sinüsoidal sinyal ile irdelenmektedir. Deneysel olarak gözlenen fonksiyon $e(t)$ şeklindedir. 2. kütle transfer basamağında (LC) hücre içi oksijen konsantrasyonunu deneysel olarak belirleyecek doğrulukta ölçüm elemanının bulunmaması nedeniyle bu transfer basamağına benzer şekilde 1. derece kabul edilmiş ve aynı zaman sabitine sahip olduğu varsayılmıştır. Buna göre hücre yüzeyindeki oksijen konsantrasyonunun, yine aynı periyotlu bir sinüs eğrisi cinsinden değişimi $f(t)$ şeklindedir.



Şekil : Endüstriyel çapta bir üretim prosesinin veriminde etkin olduğu düşünülen sekiz aşama

Hücre içi transfer ise diğerlerine göre bir merteye daha yavaş olduğundan ve hücre içi bazı reaksiyonların da etkin olması nedeniyle bu basamakta sinüsoidal sinyalin doğrusal sinyale dönüştüğü düşünülmektedir. Bu durumda fonksiyon $g(t)$ = sabit şeklini alır. Hücrenin penisilin üretimi ise yine deneysel verilere göre $h(t)$ = sabit şeklinde ifade edilebilen bir fonksiyon şeklindedir. Hücre içi metabolik faaliyet ise oluşan hücreleri reaktör sıvısının reolojisini etkilemeleri nedeni ile bir geri döngü sistemi sayesinde $j(t)$ = sabit gibi fonksiyon ile gaz-sıvı kütle transfer fonksiyonunu etkilemektedir. Sistemdeki etkileşimlerin, üretim mekanizmasının farklılaşmalarına nasıl yansıdığını belirten bağıntılar zamanın ve DOT' nin fonksiyonu olarak ifade edilmiştir. buna göre reaktördeki karışma süresinin periyot olarak kabul edildiği $w = \pi/60$ durumu için aşağıdaki ifadeler kullanılmıştır (6).

$$a(t) = 0.095 \sin \frac{\pi}{60} t + 0.32$$

$$b(t) = 0.071 \sin \frac{\pi}{60} t + 0.32$$

$$c(t) = (0.003 x + 0.065) \sin \left(\frac{\pi}{60} t - (0.004 x + 0.0514) \right) + 0.32 x$$

$$d(t) = (0.003 x + 0.054) \sin \left(\frac{\pi}{60} t - 0.665 \right) + 0.32 x$$

$$e(t) = (0.003 x + 0.047) \sin \left(\frac{\pi}{60} t - 1.465 \right)$$

$$f(t) = 0.04 \sin \left(\frac{\pi}{60} t - 1.33 \right) + 0.32 x$$

$$g(t) = 0.2609 x^{2.3} + 0.08 x^{1.3} + 0.05$$

$$h(t) = -2.395 x^{-0.63} + 0.012 x^{-1.63} + 10.357$$

$$j(t) = 0.463 x + 0.592$$

Bu ifadeler farklı karışma zamanları için w cinsinden yazılarak daha da genelleştirilebilirler. % 30 doygunluk konsantrasyonu penisilin açısından kritik çözünmüş oksijen konsantrasyonudur. Sinüs eğrisinin bu değer etrafında değişmesi demek, reaktördeki koşulların % 50 zamanda optimum DOT değeri altında bulunması anlamına gelir. Bu şekilde, sistemin yanıtı çözünmüş oksijen konsantrasyonu cinsinden ifade edildiğinde, % 75 DOT deki değere (7500 U/ml/g) kıyasla çok daha düşük bir üretim elde edildiği gözlenmiştir (5300 U/ml/g). DOT-spesifik penisilin eğrisi incelendiğinde bu spesifik üretim değerinin % 26 DOT'ye karşılık geldiği gözlenir. Bu da, algılanan DOT değerinin hesaplanan ortalama değerinin altında olduğunu belirtmektedir. Sonuç olarak, oksijen sistemde bol miktarda bulunmuyorsa, ufak düşüşler performansa daha büyük etki yaparken zaten kısıtlayıcı konsantrasyonsa çalışıldığında, ufak artışlar bile hücre tarafından daha iyi değerlendirilmekte, bu da performansa yansımaktadır. Bu geliştirilen modelin büyük çaplı üretim reaktörlerinde performans ve verimlilik tahminlemesi için uygulanabilmesi mümkündür. Ancak aynı sistemde daha başka periyotlarda yapılan deneysel çalışmalar ve başka üretim sistemlerinde elde edilen deneysel bulgular ile irdelenmesi ilginç olacaktır. Bu model söz konusu sistem için uyarlanabilir ve özellikle tasarım ve proses kontrol aşamalarında verim yönünden kritik parametrelerin reaktörlerde kaçınılmaz olan heterojenitelerden nasıl etkilenecekleri ve bunun proses verimine nasıl yansıtacağı konusunda yol gösterici olacaktır.

KAYNAKLAR

1. F. Vardar and M.D. Lilly, "Effects of Cycling Dissolved Oxygen Concentration on Product Fermentation in Penicillin Fermentations" in **Appl Microbiology and Biotechnology**, 14 (1982), 200-211.
2. F. Vardar, "Problems Mass and Momentum Transfer in Large Scale Fermenters" in **Process Biochem**, 18(5) (1983), 21-23.
3. N.M.G Osterhuis, N.M. Grosbeek, A.P.C. Oliver, and N.W.F. Kossen, "**Biotechnol Lett**", 5(3) (1983) 141-144.
4. F. Vardar, M.D. Lilly, "The measurement of Oxygen Transfer Coefficient in Fermenters by Frequency Response Techniques", **Biotech Bioeng**, 24 (1982) 1711-1719.
5. G. Larsson, S.O. Enfors, "Studies of Insufficient Mixing in Bioreactors Effects of Limiting Oxygen Concentration and Short Term Oxygen Saturation on Penicillin Chrysogenum", **Bioprocess Eng** 3 (1988) 123-127
6. A. Özemre "**Biyoproseslerde Biyoreaktör Performansının Simülasyonu**", (Yüksek Lisans Tezi), Ege Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, İzmir, (1991).

TRABZON YÖRESİNDE TÜKETİLEN SEBZE VE MEYVELERİN C VİTAMİNİ YÖNÜNDEN İNCELENMESİ

Nedime DÜRÜST (*), Yaşar DÜRÜST (*), Doğan SÜMENGEN (**)

(* Karadeniz Teknik Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Trabzon, Türkiye

(** Uludağ Üniversitesi, Fen-Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, Görükle Bursa, Türkiye

DETERMINATION OF VITAMIN C CONTENT OF THE VEGETABLES AND FRUITS CONSUMED IN THE DISTRICT OF TRABZON

SUMMARY

The vitamin C content of the vegetables and fruits grown and consumed in the Eastern Black Sea (Trabzon, Turkey) was determined by UV spectrophotometry and dye-titration method. Fe, Cu and Zn contents of the same material were measured by atomic absorption spectrophotometry and a comparison was made between the values obtained for the local and external produces.

ÖZET

Doğu Karadeniz Bölgesinde (Trabzon) yetiştirilen ve tüketilen sebze ve meyvelerin C vitamini içeriği UV spektrofotometresi ve boya-titrasyon yöntemi ile belirlendi. Aynı örneklerin Fe, Cu ve Zn içerikleri ise atomik absorpsiyon spektrofotometresi ile ölçüldü ve bölgede yetiştirilen ürünler ile dışarıdan getirilen ürünler için elde edilen değerler arasında bir karşılaştırma yapıldı.

GİRİŞ

İnsan vücudunun en çok gereksinim duyduğu vitaminlerden biri olan askorbik asit veya C vitamini taze sebze ve meyvelerde bulunmaktadır. (1,2,3). Bu çalışmada Trabzon yöresinde yetiştirilen ve Trabzon'a dışarıdan gelen sebze ve meyvelerin C vitamini ile bazı eser element içeriklerinin belirlenmesi, değerlerin karşılaştırılması amaçlandı.

DENEL BÖLÜM

Sebze ve meyve örneklerinde C vitamininin belirlenmesi-Bitki dokusundan askorbik asit % 0.4 lük okzalik asit çözeltisi ile ekstrakte edildi. Saf L-askorbik asidin % 0.4 lük okzalik asit çözeltisi içindeki 1000 µg/ml lik stok çözeltisinden 10, 20, 30, 40 ve 50 µg/ml lik standardlar hazırlandı. Derişimi 12 mg/L olan 2,6-diklorfenolindofenol sodyum (DKFl) tuzu çözeltisi kullanıldı.

İşlem-Deiyonize su ile spektrofotometrenin sıfır ayarı yapıldı. % 0.4 lük okzalik asit çözeltisi, asetat tamponu ve boya (DKF1) çözeltisi belli oranlarda karıştırılıp cihazda L_1 absorbens değeri kaydedildi. Sonra okzalik asit çözeltisi yerine aynı miktar standart ve diğer çözeltiler aynı oranlarda katılarak L_2 absorbens değeri okundu. Aynı işlem diğer standartlar için de tekrarlandı. L_2 değerlerinden L_1 değerleri çıkarılarak herbir çalışma standardının absorbens değerleri bulundu ve bir kalibrasyon grafiği hazırlandı. Sebze ve meyve örneklerinden elde edilen çözeltiler için de L_1 ve L_2 değerleri kaydedilerek kalibrasyon grafiğinden askorbik asit derişimleri bulundu. Elde edilen değerler sebze ve meyvelerin yenilebilir 100 gramlarında bulunan mg askorbik asit olarak verilmiştir. Askorbik asit derişimlerinin belirlenmesinde absorbens ölçümleri Carl-Zeiss PM4 spektrofotometrede 520 nm de yapıldı. Cu ve Fe ölçümleri Perkin-Elmer 403 model atomik absorpsiyon spektrofotometresinde gerçekleştirildi. Örneklerin analize hazırlanması kuru küllendirme yöntemiyle yapıldı (4). Sebze ve meyve örneklerinde belirlenen askorbik asit ve Cu, Fe içerikleri Çizelge 1 de verilmiştir.

Çizelge 1. Sebze ve meyvelerin yenilebilir kısımlarında belirlenen askorbik asit ve Fe, Cu miktarları (mg/100 g).

Besin Maddesi	L-Askorbik asit		Demir		Bakır	
	D	Y	D	Y	D	Y
Sivri acı biber	145	85	0.45	0.93	-	-
Dolmalık biber	104	95	0.55	1.17	0.01	0.05
Taze fasulye	20	15	1.14	1.29	0.16	0.16
Dolmalık kabak	14	9	0.50	0.61	0.07	0.22
Şeftali	12	8	0.32	0.54	0.06	0.15
Armut	6	3	0.29	0.36	0.11	0.18
Mısır	6	4	0.56	0.91	0.14	0.49
Üzüm	6	4.5	0.55	0.74	0.10	0.10
Havuç	6	4	0.38	0.78	0.14	0.14
Sivri tatlı biber	100	112	0.80	0.57	-	-
Domates	20	28	0.73	0.62	0.17	0.09
Elma	4	7.5	0.67	0.57	-	-
İncir	1	2	0.87	0.78	0.25	0.14
Beyaz turp	24	18	-	-	-	-
Kiraz	5	3	-	-	-	-
Yeni dünya	4	2	-	-	-	-

D Trabzon'a diğer bölgelerden gelen ürünler
Y Trabzon yöresinde yetiştirilen ürünler

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Askorbik asit belirleme yönteminin esası L-askorbik asidin indirgeyici özelliğine dayanmaktadır (5,6). Askorbik asit 2,6-diklorfenolindofenolü indirgerken kendisi yükseltgenip dehidro türevine dönüşmektedir. Çalışılan

ürünlerin yarısında yerli ve diğer bölgelerden gelenler arasında karşılaştırma yapıldı. 17 örnekte yerli olanlarda C vitamini miktarı diğer bölgelerden gelenlere oranla daha düşük bulundu. Ayrıca eser element içeriği için çalışılan yerli ürünlerden sivri acı biber, dolmalık biber, taze fasulye, dolmalık kabak, şeftali, armut, mısır, üzüm ve havuçta demir miktarı diğer bölgelerden gelen ürünler için bulunan değerlerden daha yüksektir. Söz konusu yerli ürünlerde, genel olarak bakır miktarının da yüksek olduğu gözlemlendi (Çizelge 1). Bu durum; dünya ortalaması olarak topraktaki bakır miktarının 15 ppm olmasına karşılık Trabzon yöresinde, çalışılan bölgeye göre bu değer 2.0, 2.7 ve 6.3 katı olarak bulunduğu bir araştırma (7) ile uyum halinde gözükmektedir. Diğer bölgelerden gelen sivri tatlı biber, domates, elma ve incirde demir içerikleri yani yerli ürünleri için elde edilen değerlerden daha yüksek, C vitamini miktarları da diğer bölgelerden getirilen ürünlerde daha düşük bulundu. Birkaç ürün için elde edilen değerlerin bu genellemeye uymadığı gözlemlendi. Ancak, genel olarak bakır ve demir miktarının artmasıyla birlikte sebze ve meyvelerde C vitamini azaldığı görüldü. Bu azalışta demirin daha etkili olduğu hem besinlerde bulunan demir miktarlarından hem de çeşitli örneklerde dışardan Fe^{3+} çözeltileri katılması sonucunda azalmanın hızından anlaşıldı.

KAYNAKLAR

1. J.J. Burns, "Metabolism of Ascorbic acid", **Sec. Conf. on Vitamin C, Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 258 (1975) 5-6.
2. O. Pelletier, "Vitamin C and Cigarette Smokers", **Sec. Conf. on Vitamin C, Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 258 (1975) 156-167.
3. J.W. Erdman, B.P. Klein, **Adv. Chem.**, 200 (1982) 499-532.
4. C. A. Rowan, O. T. Zajicek, E. J. Calibro, "Dry ashing vegetables for the determination of sodium and potassium by atomic absorption spectrometry", **Anal. Chem.**, 54 (1982) 149-151.
5. W. H. Sebrell, R. S. Harris, **The Vitamins**, 2nd Ed. Vol.1. Academic Press, New York, (1954) 307-369.
6. D. Pearson, **The Chemical Analysis of Foods**, Seventh Ed., Churchill Livingstone, New York, (1976) 160-184.
7. S. Tokel, Z. Mocan, "Doğu Karadeniz Bölgesinde görülen endemik guatrın bölge jeokimyası ve diğer etiyolojik faktörlerle ilişkisinin incelenmesi", **TÜBİTAK TAG-498** (1984)

Semiha ÇAKIR

Ondokuz Mayıs Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü 55139
Samsun-TÜRKİYE

IDENTIFICATION OF UV-IRRADIATED FOODSTUFFS BY ESR

SUMMARY

In this work 40 kinds of foodstuffs either exposed to UV-radiation or not have been investigated using ESR technique. The ESR signals, generated following the UV-exposure, whether to be used or not in identification of the foodstuffs were searched. It is clearly shown that the life-time of the observed signals is not long enough and the increase in signal intensities with the irradiation period does not exhibit a stability which may also be affected by the storage conditions. It was concluded that one can not rely on the ESR signals in determination of the UV-irradiated foodstuffs.

ÖZET

40 çeşit gıda UV ışınları ile ışınlanmadan önce ve ışınlanarak ESR ile incelenmiş ve ışınlama sonucu oluşan rezonans sinyalleri belirlenerek, bu sinyallerin UV ışınları ile ışınlanmış gıdaların tanınmasında kullanılıp kullanılmayacağı araştırılmıştır. Yapılan çalışmalarda gözlenen sinyallerin ömürlerinin yeterince uzun olmadığı, ışınlama süresine bağlı olarak sinyal şiddetindeki artışların kararlı olmadığı ve depolama koşullarından etkilendiği belirlenmiştir. Bu tür ESR sinyallerinin ışınlanmış gıdaların tanınmasında kullanılmayacağı sonucuna varılmıştır.

GİRİŞ

Gıdaların raf ömürlerinin uzatılması amacı ile kullanılan ışınlar (gamma, röntgen, ultraviyole, x-ışınları) enerjilerini gıdanın atom ve moleküllerine aktararak uyarılma ve primer iyonlaşma meydana getirmekte, atomlar arasındaki kimyasal bağları parçalayarak moleküllerde meydana gelen değişimler sonucunda serbest radikalleri oluşturmaktadırlar (1). Gıdalarda serbest radikaller ışınlar ile oluştuğu gibi, termoliz ve metal iyon katalizi, enzim katalizi, öğütme, depolama, oksijen ve hidrojen peroksitlerle etkileşme sonucunda da meydana gelebilir (2). Işınlamayla gıdalarda oluşan radyolitik ürünler ve bunların toksikolojik özellikleri henüz tam olarak incelenmemiştir. Bundan başka gıdanın ışınlanmış olup olmadığının teşhisi ve ışınlama dozunun ölçülmesi için uluslararası kabul görmüş bir yöntem de bulunamamıştır. Işınların gıdalarda yaptığı biyolojik, fiziksel ve kimyasal değişiklikler araştırılarak ışınlanmış gıdanın tanınması için yöntem geliştirilebilir. Hızlı, basit ve duyarlı bir teknik olan Elektron Spin Rezonans (ESR)

spektroskopisinin ışınlanmış gıdanın incelenmesinde önemli bir yer vardır. ESR ışınlanmış gıdaların tanınması ve ışınlama dozunun ölçülmesi için yöntem geliştirme çalışmalarında (3-5), gıda bileşenlerine etkisi (6,7), radyolitik ürünlerin (8) belirlenmesi vb. çalışmalarda kullanılmıştır. UV ışınları ile ışınlanmış gıdalar pek fazla incelenmediğinden, bu çalışmada UV ışınları ile ışınlanmış gıdaların ESR ile tanınabilirliklerinin araştırılması amaçlandı.

DENEL BÖLÜM

Araştırmada 8 çeşit tahıl ve baklagil (çavdar, arpa, buğday, mısır, yulaf, fasulye, nohut, mercimek), 5 çeşit kuru yemiş (kayısı çekirdeği, fındık, badem, ceviz, kestane), 12 çeşit meyve (erik, karayemiş, malta eriği, kiraz, elma, armut, üzüm, şeftali, çilek, böğürtlen, yaş incir, greylfurt) ve 15 çeşit sebze (domates, salatalık, kereviz, patlıcan, semizotu, soğan, sarmısak, kırmızı turp, pırasa, patates, havuç, maydanoz, beyaz turp, dereotu, yeşil biber) olmak üzere toplam 40 çeşit gıda incelenmiştir. Gıda örnekleri Samsun yöresinde yetiştirilen ve üretildikleri mevsimlere ait taze ürünler olup pazarlardan temin edilmişlerdir. Bu örneklerin 10-50 mg. arasında değişen, 2x5 mm boyutundaki küçük parçaları ESR'nin 3 mm. çapındaki silindirik kuvarz tüplerine konmuştur. ESR spektrometresinin (Varian EC 109) kavitesine yerleştirilerek 6-31 mW arasındaki dalga gücü, 2-4 gauss'luk modülasyon genliği, 3250 gauss'luk manyetik alanda 200-2000 gauss aralığında taranarak oda sıcaklığında (baklagil, tahıl, kuru yemişler) ve alçak sıcaklıkta (113-243 K, meyve ve sebzeler) UV ışınları ile ışınlanmadan ve ışınlanarak (5-30 dakika) spektrumları alınmıştır. Işın kaynağı (Conrad Hanovia 1 kW) lambanın kaviteye uzaklığı 1 metredir. İzotropik g faktörünün tayini için DPPH (difenil betapikril hidrazin) örneği ($g=2,0036$) kullanılmıştır.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Yapılan çalışmaların sonuçları aşağıda verilen iki bölüm altında değerlendirilerek tartışılmıştır.

Işınlanmamış Gıdaların ESR Spektrumları:

İncelenen 40 örnekten 26 tanesi UV ışınlarıyla ışınlamadan önceki ESR spektrumlarında g değeri yaklaşık 2,00 olan tam ortada tek bir sinyal vermişlerdir (Tablo 1). Gıdalarda doğal olarak bulunan bu sinyal başka araştırmacılar tarafından da gözlenmiştir (9,10). Işınlamadan önce sinyal gözlenmiş olması şaşırtıcı değildir. Bitki dokularında serbest radikal üreten çeşitli bileşiklerin bulunması veya depolama, kesme, ezme vb. nedenlerle serbest radikaller oluşabilmektedir (2).

Işınlanmamış patates ve havuç kompleks bir ESR spektrumu vermişlerdir. Örneklerin kompleks birer matris olmaları nedeni ile bu spektrumlardan kesin sonuçlar elde edilememiştir. Gıdaların bazılarında (Tablo 1) paramanyetik geçiş elementlerinden Mn^{+2} ve Cu^{+2} ye ait rezonans sinyalleri gözlenmiştir. Diğer örneklerin ESR spektrumlarında ise belirgin bir rezonans sinyali gözlenememiştir.

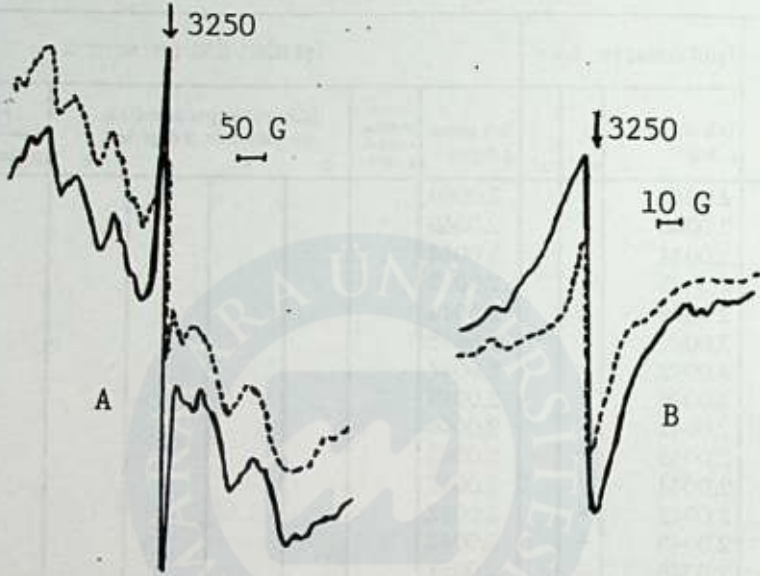
Işınlanmış (UV) Gıdaların ESR Spektrumları:

Işınlamadan önce tek sinyal veren 26 çeşit gıda ışınlandığında var olan bu sinyalin ($g=2,00$) şiddetinin artmasının dışında başka bir sinyal

Tablo 1. Çeşitli gıdaların ESR analiz sonuçlarının değerlendirilmesi ve ESR parametrelerine ait değerler

Gıdalar	Işınlanmadan önce			Işınlandıktan sonra									
	Tek sinyal g değeri	Mn ²⁺	Cu ²⁺	Tek sinyal g değeri	Elektron kopması a sinyali g değeri	Kükürtlü organik radikal sinyallerinin g değerleri				Dublet		Singlet g	
						b	c	d	e	a gauss	g		
Çavdar	2,0044	+		2,0046									
Arpa	2,0046	+		2,0046									
Buğday	2,0044	+		2,0044									
Mısır	2,0045			2,0052									
Yulaf	2,0044	+		2,0049									
Fasulye	2,0042		+	2,0045									
Nohut	2,0042			2,0047									
Mercimek	2,0046	+		2,0049									
Kayısı çekirdeği	2,0042			2,0046									
Fındık	2,0045			2,0045									
Badem	2,0044			2,0047									
Ceviz	2,0042	+		2,0042									
Kestane	2,0043	+		2,0043									
Erk	2,0048			2,0051									
Karayemiş	2,0044			2,0048									
Malta eriği	2,0001			2,0001									
Kiraz	2,0060			2,0060									
Elma	2,0032			2,0035									
Armut	2,0028			2,0028									
Üzüm	2,0056			2,0056									
Şeftali	2,0030			2,0035									
Çilek	2,0016	+		2,0016									
Böğürtlen	2,0040	+		2,0041									
Yaş incir	2,0040		+	2,0041									
Greyfurt	-			-	1,999								
Domates	2,0030			2,0030									
Salatalık	2,0035			2,0035									
Kereviz	-			2,0051									
Palıcan	-			2,0044									
Semizotu	-			2,0050									
Soğan	-			-	1,999	2,014	2,009	2,004					
Sarımsak	-			-		2,012	2,008	2,004	2,024				
Kırmızı turp	-			-		2,014	2,008	2,004	2,024				
Pırasa	-			-	1,999	2,012	2,009	2,004					
Patates	Kompleks Spekt.			-						120,0	1,999	2,003	
Havuç	Kompleks Spekt.			-						122,0	2,002	2,003	
Maydanoz	-			-						125,0	1,999	2,003	
Beyaz turp	-			-						125,0	1,999	2,003	
Dereotu	-			-						120,0	1,999	2,003	
Yeşil biber	-			-						122,0	1,999	2,003	

vermişlerdir (Şekil 1). Sinyalin şiddeti ışınlama süresine bağlı olarak artmaktadır.

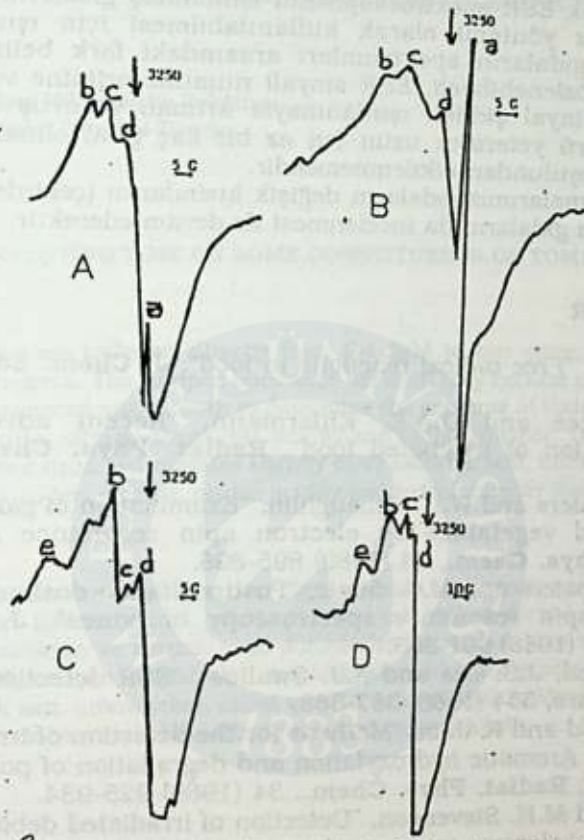


Şekil 1. Çavdar (A) ve eriğin (B) ışınlamadan önce (.....) ve ışınıldıktan sonra alınan ESR spektrumları.

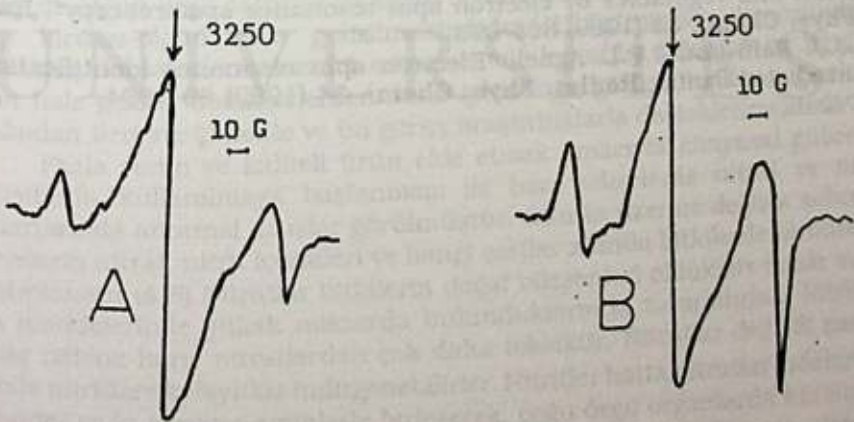
Bunun nedeni UV ışınlarının bu örneklerde doğal olarak bulunan radikallere benzer radikaller oluşturduğu şeklinde açıklanabilir. Sinyal şiddetindeki artışlar kararlı olmadığı gibi ışınlamanın kesilmesi ile de kısa zamanda eski sinyal şiddetine inmektedir. Değişik şartlarda depolam da sinyal şiddetinde etkili olmaktadır. Işınlanmış gıdanın tanınmasında bu tür ESR sinyallerinin kullanılmayacağı sonucuna varılmıştır.

Işınlanmış kereviz, patlıcan ve semizotu için elde edilen sinyal ($g=2,00$) ışınlama kesildikten sonra 1 saat içinde yok olmaktadır. ESR spektrumları Şekil 2'de verilen gıdalarda UV ışınlarının olmuşturduğu a, b, c, d ve e sinyallerinde radikaller rastgele yönlendiklerinden ayrılma çok az olmuştur ve sinyaller kolaylıkla gözlenememektedir.

Dublet ve singlet sinyalleri (Şekil 3) veren gıdaların (Tablo 1) tanınmasında da bu sinyallerin yararlı olamayacağı ortaya konmuştur.



Şekil 2. Pırasa (A), soğan (B), sarmısak (C) ve kırmızı turpun (D) UV ışınları ile ışınlanarak alınan ESR spektrumları.



Şekil 3. Işınlanmış patates (A) ve havucun (B) ESR spektrumları

Sonuç olarak ESR spektroskopisinin ışınlanmış gıdaların tanınmasında rutin analiz yöntemi olarak kullanılabilmesi için ışınlanmamış ve ışınlanmış gıdaların spektrumları arasındaki fark belirgin olmalı ve kolaylıkla gözlenebilmeli, ESR sinyali numune orjinine ve cinsine bağlı olmamalı, sinyal şiddeti ışınlanmayla artmalı ve artış kararlı olmalı, sinyalin ömrü yeterince uzun (en az bir kaç gün) olmalı ve her türlü depolama koşulundan etkilenmemelidir.

Bu tür çalışmalarımız gıdaların değişik kısımlarını (çekirdeği, sapı, derisi vb.) ve başka gıdaların da incelenmesi ile devam edecektir.

KAYNAKLAR

1. I.A. Taub, "Free radical reactions in food", *J. Chem. Educ.*, 61 (1984) 313-324.
2. H. Delincee and D.A.E. Ehlermann, "Recent advances in the identification of irradiated food", *Radiat. Phys. Chem.*, 34 (1989) 877-890.
3. M.F. Desrosiers and W.L. McLaughlin, "Examination of gamma-irradiated fruits and vegetables by electron spin resonance spectroscopy", *Radiat. Phys. Chem.*, 34 (1989) 895-898.
4. M.F. Desrosiers and M.G. Simic, "Postirradiation dosimetry of meat by electron spin resonance spectroscopy of bones", *J. Agric. Food Chem.*, 36 (1988) 601-603.
5. N.J.F. Dood, J.S. Lea and A.J. Swallow, "ESR detection of irradiated food", *Nature*, 334 (1988) 387-388.
6. M. Groolveld and R. Jain, "Methods for the detection of irradiated foodstuffs: Aromatic hydroxylation and degradation of polyunsaturated fatty acids", *Radiat. Phys. Chem.*, 34 (1989) 925-934.
7. R. Gray and M.H. Stevenson, "Detection of irradiated deboned turkey meat using electron spin resonance spectroscopy", *Radiat. Phys. Chem.*, 34 (1989) 899-902.
8. M.G. Simic, M. Dizdaroğlu and E. DeGraff, "Radiation Chemistry extravaganza or an integral component of radiation processing of food", *Radiat. Phys. Chem.*, 22 (1983) 233-336.
9. M.F. Desrosiers, W.L. Mc Laughlin, "Examination of gamma-irradiated fruits and vegetables by electron spin resonance spectroscopy", *Radiat Phys. Chem.*, 34 (1989) 895-898.
10. J.J. Raffi and J.P.L. Agnel, "Electron spin resonance identification of irradiated fruits", *Radiat. Phys. Chem.*, 34 (1989) 891-894.

HASAT ZAMANININ DOMATESLERİN BAZI BİLEŞENLERİNE ETKİSİ

Hacı ORAK

*Istanbul Üniversitesi Mühendislik Fakültesi
Kimya Bölümü Avcılar-Istanbul-Türkiye***EFFECT OF HARVESTING TIME ON SOME CONSTITUENTS OF TOMATOES****SUMMARY**

Tomatoes were collected directly from the field in two stage, ripen-red and unripen yellowish-green. The unripen ones were left until they became mature red. The experiments were carried out on both to determine the contents of their ascorbic acid, invert sugar, glucose, nitrate, nitrite, pH, acidity and formol number. The result shows that, those collected ripen-red contains slightly more ascorbic acid, invert sugar, nitrate and pH, but contains less glucose, nitrite, acidity and formol number than unripen ones.

ÖZET

Fidesinden sarımsı-yeşil ve kırmızı-olgun safhada toplanan domateslerin askorbik asit, invert şeker, glukoz, nitrat, nitrit, pH, serbest asit ve formol sayısı içerikleri domatesler toplandıktan ve sarımsı-yeşil domatesler kırmızılaştıktan sonra belirlendi. Bitki üzerinde olgunlaşan domatesler, koparıldıktan sonra olgunlaşan domateslere nazaran askorbik asit, invert şeker, nitrat ve pH ı daha yüksek miktarda glukoz, nitrit, serbest asit ve formol sayısını daha düşük miktarda içermektedir.

GİRİŞ

Birçok meyve ve sebzede olduğu gibi domateslerde de tüketilebilir süreyi uzatmak, kayıpların önüne geçmek ve özellikle mevsiminden önce piyasaya çıkıp iyi fiyatla satılabilmek amacıyla fidesinde tam kızarmadan toplanmaktadır. Bu şekilde toplanmış domatesler genellikle ambalajlama ve tüketim merkezlerine ulaştıkları süre içinde kırmızı-olgun hale gelmektedirler. Bazen de olgun-yeşil safhada toplanıp olgunlaşmayı hızlandırıcı işlemlerden geçip kırmızı-olgun hale getirilmektedirler.(1) Fidesinden kırmızı-olgun koparılmış domateslerin lezzeti, erken evrede koparılıp bekleme ile kırmızı-olgun hale gelmiş domateslerden daha iyi olduğu görüşü halkın çoğunluğu tarafından ileri sürülmekte ve bu görüş araştırmalarla desteklenmektedir.(2)

Fazla verim ve kaliteli ürün elde etmek amacıyla kimyasal gübre ve pestisitlerin kullanılmaya başlanması ile bazı sebzelerde nitrat ve nitrit miktarlarında anormal artışlar görülmüştür. Bunun üzerine değişik sebze ve meyvelerin nitrat, nitrit içerikleri ve hangi şartlar altında bitkilerde biriktikleri araştırılmıştır.(4-8) Nitratlar bitkilerin doğal bileşenleri oldukları halde su ve gıda maddelerinde yüksek miktarda bulduklarında zararlıdır. Nitritler, birkaç istisna hariç nitratlardan çok daha toksiktir. Nitratlar değişik şartlar altında nitritlere kolaylıkla indirgenebilirler. Nitritler hatta nitratlar gıdalardaki sekonder yada tersiyer aminlerle birleşerek, çoğu özgü organlarda karsinojen aktivite gösteren N-nitroso bileşiklerini oluştururlar (5). Bunun yanında nitritler hemoglobini methemoglobine dönüştürmek suretiyle kanın oksijen taşıma işlevini bozarlar. Bu etki özellikle bebeklerde çok önemlidir. (6) Askorbik

asidin (C-vitamini) beslenmedeki öneminden dolayı domateslerdeki miktarı, olgunlaşma ve bekletme ile değişimi, cins, yetiştiriliş şekli ve toplandığı mevsimin miktarı üzerine etkisini araştıran çalışmalar yapılmıştır.(9,10,11) Domatesler olgunlaştıkça askorbik asit, indirgen şekerler (invert şeker) ve serbest amino asitler özellikle glutamik asit artar sitrik asit ise azalır ve böylece domateslerin lezzeti artar. Serada yetişen domatesler tarlada yetişenlerden daha yüksek pH ya, düşük asiditeye ve serbest amino asitlere sahiptir.(10)

Bu çalışmada erken hasat edilmiş domateslerle fidesinde tam kızarıktan sonra hasat edilen domateslerin bazı bileşenlerinin miktarlarında değişme olup olmadığının saptanması amaç edinmiştir.

DENEL BÖLÜM

Çalışmada fidelerin herbirinden kırmızı ve sarımsı-yeşil evrede hasat edilen domatesler kullanıldı. Domatesler İstanbul Küçükçekmece ilçesine bağlı Şamlar köyünün doğal gübre kullanan bir bahçesinden tarafımdan toplandı.

Kırmızı domatesler koparıldıktan sonraki ilk üç gün içinde ve 10-13 gün oda şartlarında bekletildikten sonra, sarımsı yeşil domatesler koparıldıktan sonraki ilk üç gün içinde ve tamamen kırmızılaştıktan sonra analizleri yapıldı. Domateslerde askorbik asit (C-vitamini), invert şeker (indirgen şekerler), glukoz, pH, serbest asidite ve formol sayısı değerleri belirlendi.

Askorbik asit: 2,6-Diklorofenol-indofenol ile titrimetrik olarak (12).

İndirgen şekerler (invert şeker): Lane-Eynon yöntemi, glukoz ise hipoyodür yöntemi ile (12),

Nitrat ve nitrit: Berraklaştırılmış ekstraktaki nitrat kadmiyum kolonla nitrite indirgendikten sonra, nitrit ise doğrudan berraklaştırılmış ekstrakt çözeltisinden kolorimetrik yöntemle (12),

pH, serbest asidite ve formol sayısı: PH-metre kullanılarak titrimetrik olarak (13) belirlendi.

Değerler yaş domates üzerinden; askorbik asit mg/100g, invert şeker, glukoz, serbest asidite (sitrik asit cinsinden) g/100g, nitrat ve nitrit mg/kg ve formol sayısı meq/kg cinsinden hesaplandı.

SONUÇLAR VE TARTIŞMA

Fidesinden kırmızı-olgun ve sarımsı-yeşil evrede hasat edilen domates meyvelerinin analiz sonuçları tablo'ya çıkarılmıştır.

Tablo

Domates Cinsi	Askorbik asit mg/kg	Invert şeker %	Glukoz %	Nitrat mg/kg	Nitrit mg/kg	pH	Serbest Asidite %	Formol sayısı meq/kg
K	23.96	2.34	1.04	10.16	0.10	4.03	0.379	31.47
Y	13.25	2.02	0.88	11.65	0.28	3.80	0.426	27.03
KBK	25.43	2.56	1.48	8.75	0.40	4.00	0.418	41.25
YBK	19.68	2.13	1.23	8.25	0.52	3.88	0.506	52.06

K: Hasattan sonra üç-gün içinde analiz edilen kırmızı-olgun domatesler

Y: Hasattan sonra üç gün içinde analiz edilen sarımsı-yeşil domatesler

KBK: Hasattan sonra 10-13 gün bekletilen kırmızı-olgun domatesler

YBK: Bekletme ile tam kızardıktan sonra analiz edilen sarımsı-yeşil domatesler

K, KBK ve YBK domateslerinde askorbik asit sıra ile 23.96, 25.43 ve 19.68 mg/kg, invert şeker %2.34, %2.56 ve %2.13 olarak bulundu (Tablo). Bu değerler Ege bölgesi salçalık domateslerinde (11) belirlenen 8.35-16.83 mg/kg C-vitamini ve %1.65-2.14 invert şeker değerlerinden daha yüksek, Davies ve Winsor'un (14) bildirdiği şeker değerleri ile uyum halindedir.

Fidesinden kırmızı-olgun evrede toplanan domateslerin (K) askorbik asit ve invert şeker değerleri sarımsı-yeşil evrede toplanan ve bekletme ile kırmızılaşan domateslerin (YBK) değerlerine nazaran biraz daha yüksek, glukoz değerleri ise daha düşük bulundu. Domateslerde belirlenen invert şeker değeri içinde başlıca glukoz ve fruktoz bulunduğu bilindiğine göre domateslerin invert şeker ve glukoz değerlerinden fruktoz miktarı bulunabilir. Fruktoz glukozu nazaran 2.5-3 kez daha fazla tatlı olan bir şekerdir. En yüksek miktarda K domateslerinde bulunan fruktozun, bu domateslerde tad artırıcı etkiye sahip olması gerekir.

Sarımsı-yaşıl evrede toplanan domatesler (Y) olgunlaşmadan yapılan analizlerinde 13.25 mg/kg askorbik asit ve %2.02 invert şeker içerdikleri bulundu. Bu değerler bekleme ile domatesler olgunlaştıkça 19.68 mg/kg askorbik asit ve %2.13 invert şeker değerlerine ulaşmışlardır.

Kırmızı-olgun evrede toplanan domatesler 10-13 gün oda şartlarında bekletildikten sonra askorbik asit, invert şeker, nitrit ve serbest asit miktarlarında az da olsa (K domateslerine nazaran) bir artış olmuştur. Askorbik asit ve invert şeker miktarlarındaki artış domatesin kalitesini olumlu, nitrit ve serbest asiditedeki artış ise olumsuz yönde etkilemektedir.

Her iki olgunluk evresinde hasat edilen domateslerin nitrat içerikleri literatürdeki (4,7) değerlerden düşük bulundu. Bu durumun domateslerin doğal gübre kullanan bir tarlada yetişmiş olmalarından ileri geldiği sanılmaktadır. Domateslerin nitrat içerikleri kullanılan suni gübre miktarı ile orantılı olarak arttığı ancak bu artışın yüksek değerlere ulaşmadığı bildirilmektedir.(7)

YBK ve KBK domateslerinin K domateslerine nazaran nitrat miktarları biraz düşük, nitrit miktarları ise az yüksek bulundu (tablo). Bu bulgu bekleme ile olgunlaşan ve bekletilen olgun domateslerde nitratin az da olsa nitrite dönüştüğünü teyit etmektedir.(5)

Araştırmada kullanılan domateslerde pH 3.80-4.03, sitrit asit cinsinden serbest asidite %0.379-0.506, formol sayısı 27.03-52.06 meq/kg değerleri arasında bulundu. pH ve asidite değerleri literatürde (11) bulunanlarla uyumludur. En düşük serbest asitlik K domateslerinde, en yüksek miktarlar ise YBK domateslerinde bulundu. Asitliğin artması tadı olumsuz yönde etkilemektedir. Formol sayısının değeri domateslerde bulunan serbest amino asitleri ile orantılıdır. Domateslerde en çok bulunan amino asit glutamik asitidir. Miktarı arttıkça tad iyileşmektedir (10). Formol sayısı en düşük Y en yüksek YBK domateslerindedir.

Sonuç olarak, domatesleri iki farklı evrede toplamak bileşenlerinin miktarında büyük farklar meydana getirmemektedir. Fidesinden kırmızı-olgun toplanan domatesler askorbik asidi, invert şekeri biraz fazla, serbest asitleri ve nitriti daha az miktarda içerdiklerine göre besin değerleri daha yüksektir. Bu yüzden domateslerin mümkün olduğu kadar kırmızı-olgun evrede toplanmaları gerekir.

KAYNAKLAR

1. A.A.Kader, L.L.Morris, M.A.Stevens, M.Albright-Holton, "Composition and flavor quality of fresh market tomatoes as influenced by some postharvest handling procedures", *J.Am.Soc.Hortic.Sci.*, 103(1978)6-13.
2. A.A.Kader, M.A.Stevens, M.Albright-Holton, L.L.Morris, M.Algazi, "Effect of fruit ripeness when picked on flavor and composition in fresh market tomatoes", *J.Am.Soc.Hortic.Sci.*, 102(1977)724-31.
3. J.Siciliano, S.Krulick, E.G.Heisler, J.H.Schwartz, J.W.White, "Nitrate and nitrite content of some fresh and processed market vegetables", *J.Agric.Food Chem.*, 23(1975)461-64
4. G.Erkmen, H.Orak, S.Şaturoğlu, "Nitrate and nitrite content of fresh vegetables of Turkish origin", *Doğa Tr.J.of Chemistry*, 14(1990)196-200
5. E.G.Heisler, J.Siciliano, S.Krulick, J.Fein-Berg, J.H.Schwartz, "Changes in nitrate and nitrite content and search for nitrosamines in storage-abused spinach and beets", *J.Agric.Food Chem.*, 22(1974)1029-32
6. D.H.K.Lee, "Nitrates, nitrites and methemoglobinemia", *Environ.Rev.No.2*, Nat.Inst.of Environ. Washington, D.C., 1970
7. S.Zabunoğlu, İ.Karaçal, "Gübrelemenin çevre kirlenmesine etkisi", *Doğa Bilim Dergisi, Müh./Çev.*, 7(1983)79-87
8. G.Sudraud, P.Sudraud, B.Declereq, R.Maillard, "Nitrate contents of different plants", *Ann.Nutr.Aliment*, 34(1980)909-14
9. B.P.Klein, A.K.Perry, "Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the USA.", *J.Food Sci.*, 47(1982)941-45
10. S.Fujiwara, Y.Sakai, M.Koshimizu, M.Negishi, "Studies on quality of tomato. Effect of ripeness and cultivation types on chemical compositions", *Kanagawa-Ken Nogyo Sogo Kenkyusho Kenkyu Hokoku*, 120(1978)63-72
11. İ.Kovancı, D.Anaç "Salçalık domates çeşitlerinin kimi kalite ve fiziksel özellikleri üzerine bir araştırma", *Ege Ünl.Ziraat Fak.Derg.*, 18(1981)211-25
12. S.Williams ed. "Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists", 14.th Ed.(1984). 1111 North 19.th Street Suite 210 Arlington-Virginia 22209-USA
13. H.Keskin, G.Erkmen, "Besin Kimyası", İstanbul Üniversitesi yayınları (1987)584-5
14. J.W.Davies, G.W.Winsor, "Some effects of variety of the composition and quality of tomato fruit", *J.Am.Hortic.Sci.*, 94(1969)331-42

CİLT II

VOLUME II

YAZAR
İNDEKSİAUTHORS'
INDEX

A. Dinçer BEDÜK	185
A. KOZLUCA.....	277
A.DENİZLİ.....	249
A.DENİZLİ.....	277
A.TUNCEL.....	249
A.TUNCEL.....	277
A.Yılmaz ERKOL.....	393
Abdullah MENZEK.....	49
Abdurrahman TANYOLAÇ.....	337
Abdurrahman TANYOLAÇ.....	307
Abdurrahman TANYOLAÇ.....	313
Abdurrahman TANYOLAÇ.....	347
Abdurrezak ÖNCÜ.....	369
Adil DENİZLİ.....	237
Adnan BULUT.....	77
Agnes ÇAMURDAN ..	289
Ahmet AKAR.....	109
Ahmet MARAŞ.....	1
Ahmet ÖZEMRE.....	399
Alberto BRAND.....	45
Ali İhsan ŞERBETÇİ.....	353
Amable HORTAÇSU ..	331
Amable HORTAÇSU ..	289
Arif ÇAĞLAR.....	223
Arif ÇAĞLAR.....	325
Arif DAŞTAN.....	21
Attila YILDIZ.....	359
Ayfer BAPÇUM.....	255
Ayfer BAPÇUM.....	261
Ayşe ERÇAĞ	97
Ayşe OGAN.....	261
Ayşegül TUNCA.....	109
Ayten SAĞIROĞLU.....	227
Ayten SAĞIROĞLU.....	203
Azmi TELEFONCU.....	227
Betül KIRDAR	375
Beytiye ÖZGÜN	7
Bilgehan GÜZEL.....	125
Bilgehan GÜZEL.....	131
Bircan DİNDAR.....	147
Bülent AKAY.....	381
Bülent AKAY.....	295
C.R.LOWE	249
C.ÜNALEROĞLU	175
Cemil ÖĞRETİR.....	153
Cemil ÖĞRETİR.....	163

Ö. İrfan KÜFREVİOĞLU.....	219
Ö.İRFAN KÜFREVİOĞLU.....	213
Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU.....	273
Ö.İrfan KÜFREVİOĞLU.....	233
Paul WILLIAMS.....	343
Pınar ÇALIK.....	381
Pınar ERDOĞDU.....	359
Ramazan ALTUNDAŞ.....	71
Refiye YANARDAĞ.....	255
Refiye YANARDAĞ.....	261
S.Ali TUNCEL.....	243
Safiye ERDEM.....	169
Salih YAŞLAK.....	89
Selahattin SERİN.....	125
Selahattin SERİN.....	131
Selami ŞAŞMAZ.....	137
Selma MUTLU.....	365
Semiha ÇAKIR.....	407
Serdar GÜLTEKİN.....	1
Serdar S. ÇELEBİ.....	359
Serdar S. ÇELEBİ.....	307
Serdar S.ÇELEBİ.....	313
Serdar S.ÇELEBİ.....	325
Serpil TAKAÇ.....	295
Serpil TAKAÇ.....	381
Sevim BİLGİÇ.....	101
Siddik İÇLİ.....	77
Siddik İÇLİ.....	147
Siddik İÇLİ.....	143
Süheyla KIRMIZIGÖL.....	113
Süleyman YILDIRIR.....	41
Süleyman YILDIRIR.....	37
Şebnem CAN.....	255
Şeniz KABAN.....	65
Temel ÖZEK.....	119
Tereza VARNALI.....	169
Tereza VARNALI.....	179
Tunçer H. ÖZDAMAR.....	381
Ufuk GÜNDÜZ.....	319
Ölkü OYMAN.....	11
Ümit DEMİR.....	21
Valeh ISMAYILOV.....	191
Vedat SEDİROĞLU.....	319
Viktorya AVİYENTE.....	169
Viktorya AVİYENTE.....	179
Vildan DİNÇBAŞ.....	331
Yaşar DÜRÖST.....	45
Yaşar DÜRÖST.....	403
Yaşar Kemal YILDIZ.....	27
Yaşar SÜTBEYAZ.....	1
Yavuz ENSARI.....	207
Yavuz TAŞKESENİGİL.....	15
Yeşim YEŞİLOĞLU.....	203
Yılmaz KAPTAN.....	369



MARMARA ÜNİVERSİTESİ YAYINEVİ

Yüksel AVCIBAŞI GÜVENİLİR	195
Yüksel AVCIBAŞI GÜVENİLİR	199
Z.İlsen ÖNSAN.....	375



MARMARA
ÜNİVERSİTESİ



MARMARA
ÜNİVERSİTESİ