

**T.C.**  
**SELÇUK ÜNİVERSİTESİ**  
**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI ADE İNHİBİTÖRLERİ İLE**  
**HİDROKLOROTİAZİDİN İKİLİ**  
**KARIŞIMLARININ BİRLİKTE TAYİNİ İÇİN**  
**SPEKTROFLORİMETRİK YÖNTEM**  
**GELİŞTİRİLMESİ VE ORGANİK ÇÖZÜCÜ SU**  
**ORTAMLARINDA pKa' LARININ TAYİNİ**

**Eda EDİZ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KİMYA ANABİLİM DALI**

**Temmuz-2010**  
**KONYA**

## ÖZET

### YÜKSEK LİSANS TEZİ

# BAZI ADE İNHİBİTÖRLERİ İLE HİDROKLOROTİAZİDİN İKİLİ KARIŞIMLARININ BİRLİKTE TAYİNİ İÇİN SPEKTROFLORİMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ VE ORGANİK ÇÖZÜCÜ SU ORTAMLARINDA pKa' LARININ TAYİNİ

Eda EDİZ

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doc. Dr. S. Beniz GÜNDÜZ

2010, 130 Sayfa

Jüri

Yrd. Doc. Dr. S. Beniz GÜNDÜZ

Prof. Dr. Güleren ALSANCAK

Prof. Dr. Hüseyin KARA

Silazapril, enalapril, kinapril, ramipril ve lisinopril gibi anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörleri (antihipertansif ajanlar), hipertansiyon ve kalp yetmezliği hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. ADE inhibitörleri, diüretik tedavisi uygulanan bazı hastalarda, bir tiazid diüretik olan hidroklorotiazid (HKT) ile kombine edilerek uygulanmaktadır.

Bu tezde, silazapril, enalapril, quinapril (kinapril), ramipril ve lisinopril gibi anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörlerinin (antihipertansif maddeler) farklı yüzdelerdeki asetonitril-su ve metanol-su ortamlarında floresans özellikleri incelenmiştir. Ayrıca, zayıf asidik ve bazik gruplar içeren ADE inhibitörlerinin % 10-50 asetonitril-su ve metanol-su ikili çözücü ortamlarında spektrofotometrik yöntem ile pKa' ları da tayin edilerek, SPARC on-line programı ile hesaplanan pKa değerleriyle karşılaştırılmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Antihipertansif maddeler, anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörleri, hidroklorotiazid, spektrofotometrik analiz, pKa

## ABSTRACT

### MS. THESIS

# DEVELOPMENT OF A SPECTROFLUORIMETRIC METHOD FOR SIMULTANEOUS DETERMINATION OF BINARY MIXTURES OF SOME ACE INHIBITORS WITH HYDROCHLOROTHIAZIDE AND DETERMINATION OF THEIR pKa IN ORGANIC SOLVENT-WATER MEDIA

Eda EDİZ

Graduate School of Natural and Applied Sciences  
SELÇUK UNIVERSITY  
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE  
IN CHEMISTRY

Advisor: Asst. Prof. Dr. S. Beniz GÜNDÜZ

2010, 130 Pages

Jury

Asst. Prof. Dr. S. Beniz GÜNDÜZ

Prof. Dr. Güleren ALSANCAK

Prof. Dr. Hüseyin KARA

Angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors (antihypertensive agents) such as cilazapril, enalaril, guinapril, ramipril and lisinopril are pharmaceutical preparations widely used in the treatment of hypertension and heart failure. ACE inhibitors, in some patients treated with diuretic drugs, are administered in combination with hydrochlorothiazide (HCT) which is a thiazide diuretic.

In this study, the investigation of fluorimetric properties of the binary mixtures of some angiotensin-converting enzyme inhibitors (antihypertensive agents) such as cilazapril, enalaril, quinapril, ramipril and lisinopril in acetonitrile-water and methanol-water media which have different percentage has been performed. In addition, the pKa values of the some ACE inhibitors which have weak acidic and basic group, have been determined in 10-50 % acetonitrile-water and methanol-water solvent media by using spectrofluorimetric method. The pKa values obtained by experimentally have been compared with the values predicted by the SPARC on-line pKa calculator.

**Keywords:** Antihypertensive agents, angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitors, hydrochlorothiazide, spectrofluorimetric analysis, pKa

## ÖNSÖZ

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Yrd. Doc. Dr. S. Beniz GÜNDÜZ danışmanlığında tamamlanarak Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü' ne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.

Bu çalışma aynı zamanda S.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından FBE 09201059 no' lu proje olarak desteklenmiştir.

Yüksek lisans eğitiminin ve çalışmamın her aşamasında beni destekleyen, hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini büyük bir hoşgörülle bana aktaran kendisiyle çalışmaktan mutluluk duyduğum değerli hocam Yrd. Doc. Dr. Beniz GÜNDÜZ' e, tez hazırlama sürecinde her konuda yardımını gördüğüm, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan sevgili hocam Yrd. Doc. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI' na, ilaç analizleri konusundaki engin bilgi ve deneyimlerini bizimle paylaşan, bu konuda yardımlarını esirgemeyen sayın Prof. Dr. Sibel ÖZKAN' a ve iyonlaşma sabitlerinin tayini konusunda büyük bilgi desteğiyle, bu tezin yapılmasında sonsuz katkıları bulunan sayın Prof. Dr. Güleren ALSANCAK' a sonsuz şükran ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca bana laboratuvar imkanı sağlayan Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. İbrahim KARATAŞ' a ve Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü' nde görev yapan çok değerli hocalarıma teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarım boyunca beni yalnız bırakmayan çalışma arkadaşlarım Şükran KÜÇÜKKARTALLAR' a ve Zeynep ALTINORDU' ya, yaşamım boyunca hep yanımda olan; sevgi ve desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Eda EDİZ  
KONYA-2010

## İÇİNDEKİLER

ÖZET.....	i
ABSTRACT .....	ii
ÖNSÖZ.....	iii
İÇİNDEKİLER .....	iv
1. GİRİŞ .....	1
2. TEORİK KISIM .....	3
2.1. Işığın Absorplanması .....	3
2.1.1. Atomik Absorpsiyon .....	4
2.1.2. Moleküler Absorpsiyon.....	4
2.1.3. Absorpsiyon Kanunları .....	6
2.1.4. Beer Kanunu .....	7
2.1.5. Lambert Kanunu.....	8
2.1.6. Lambert-Beer Kanunu.....	8
2.2. Lüminesans Olayı .....	10
2.3. Fotolüminesans Olayının Elektronik Geçişinin Kaynağı.....	11
2.3.1. Floresans .....	12
2.3.2. Floresans yapan türler .....	22
2.4. Lüminesans Spektrofotometreleri .....	23
2.5. Floresansı Etkileyen Faktörler .....	26
2.5.1. Elektronik Geçişlere Çevre Etkisi.....	26
2.6. Fotolüminesans Teorisi .....	35
2.7. Florimetri ve Uygulama Alanları .....	38
3. İYONLAŞMA SABİTİ .....	41
3.1. Spektrofotometrik Yöntemle pKa Tayini.....	41
3.2. Florimetrik Yöntemle pKa Tayini.....	44
4. ANTİHIPERTANSİFLER .....	47
4.1. Anjiotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörleri' nin Etki Mekanizmaları .....	49
4.2. Diüretiklerin Antihipertansif Amaçla Kullanımı .....	50
4.3. ADE İnhibitörleri Kimyasal yapı ve Özellikleri .....	50
4.4. ADE inhibitörlerinin SPARC Programı ile Hesaplanan İyonlaşma Sabitleri. 54	
4.4.1. Enalaprilin İyonlaşma Sabitleri.....	54
4.4.2. Kinaprilin İyonlaşma Sabitleri .....	57
4.4.3. Ramiprilin İyonlaşma Sabitleri .....	60
4.4.4. Lisinoprilin İyonlaşma Sabitleri.....	63

<b>5. LİTERATÜR ÖZETİ .....</b>	<b>66</b>
<b>6. MATERYAL VE YÖNTEM.....</b>	<b>77</b>
6.1. Kullanılan Cihazlar .....	77
6.2. Kimyasal Maddeler .....	77
6.2.1. Antihipertansifler .....	77
6.2.2. Çözücüler .....	77
6.2.3. Çözeltiler .....	78
6.3. Deneysel İşlem.....	80
6.3.1. ADE İnhibitörlerinin Floresans Özelliklerinin İncelenmesi .....	80
6.3.2. pH Çalışması .....	82
6.3.3. Tabletlerde Tayin .....	82
<b>7. DENEY SONUÇLARI VE TARTIŞMA.....</b>	<b>83</b>
7.1. Floresans Şiddetine Çözücü Etkisi.....	83
7.1.1. ADE İnhibitörlerinin Spektroflorimetrideki Emisyon Spektrumları .....	83
7.2. Floresans Şiddetine % Çözücü Etkisi .....	90
7.2.1. ADE İnhibitörlerinin Farklı Çözücü Yüzdelerinde Alınan Emisyon Spektrumları.....	90
7.2.2. ADE İnhibitörlerinin % Çözücü-Floresans Şiddeti Grafikleri.....	96
7.3. Floresans Şiddetine pH Etkisi .....	97
7.3.1. ADE İnhibitörlerinin Farklı pH' lardaki Emisyon Spektrumları .....	97
7.3.2. ADE İnhibitörlerinin Farklı pH' lardaki Absorpsiyon Spektrumları.....	111
7.3.3. ADE İnhibitörlerinin pH-Floresans Şiddeti Grafikleri .....	118
7.4. Tabletlerde Kinapril Tayini.....	122
<b>8. SONUÇLAR VE ÖNERİLER .....</b>	<b>124</b>
<b>9. KAYNAKLAR .....</b>	<b>126</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>130</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil-2.1. Bir atomun uyarılmış halleri.....	3
Şekil-2.2. Enerji seviyeleri arasındaki geçişler.....	5
Şekil-2.3. $I_0$ şiddetindeki bir ışın demetinin geçirgen yüzey ve çözelti üzerine düşmesi.....	6
Şekil-2.4. Beer Kanununun şematik olarak gösterilişi.....	7
Şekil-2.5. Lambert kanununun şematik olarak gösterilişi .....	8
Şekil-2.6. Floresans emisyonunun şematik diyagramı (Jablonski diyagramı) .....	12
Şekil-2.7. Bir molekülden floresans ve fosforesans ışınların yayılma mekanizmaları. ....	15
Şekil-2.8. Fotolüminesans ölçümleri için kullanılan cihaz.....	23
Şekil-2.9. Antrasenin uyarma, lüminesans ve senkron lüminesans spektrumları.....	25
Şekil -2.10. Polar çözücülerin ve ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) geçişlerini etkilemeleri .....	26
Şekil-3.1. Asidik ve bazik formun enerji seviyeleri .....	44
Şekil-3.2. Asidik ve bazik formun floresans şiddeti .....	45
Şekil-4.1. ADE İnhibitörlerinin Etki Mekanizması .....	48
Şekil-4.2. Enalapril maleat.....	51
Şekil-4.3. Kinapril.....	51
Şekil-4.4. Ramipril.....	52
Şekil-4.5. Lisinopril .....	53
Şekil-4.6. Hidrokloro tiazid .....	53
Şekil-4.7. Enalapril için $\alpha$ - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi .....	56
Şekil-4.8. Enalapril için $\alpha$ - pH ilişkisi ve 2. türev eğrisi .....	56
Şekil-4.9. Kinapril için $\alpha$ - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi.....	59
Şekil-4.10. Kinapril için $\alpha$ - pH ilişkisi ve 2. türev eğrisi.....	59
Şekil-4.11. Ramipril için $\alpha$ - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi.....	62
Şekil-4.12. Ramipril için $\alpha$ - pH ilişkisi ve 2. türev eğrisi.....	62
Şekil-4.13. Lisinopril için $\alpha$ - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi .....	65
Şekil-4.14. Lisinopril için $\alpha$ - pH ilişkisi ve 2. türev eğri.....	65
Şekil-5.1. Anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörlerinin molekül şekilleri	66
Şekil-5.2. Losartan ve Irbesartan için örnek pH-floresans şiddeti grafiği .....	67
Şekil-5.3. Kafeik asidin % 30 MeCN ortamındaki pH-absorbans değerlerinin ..... PKPOT grafiği. ....	74
Şekil-5.4. Kafeik asidin LC piklerinin maksimumunun alındığı UV spektrumu .....	74
Şekil-7.1. Enalaprilin Asetonitrildeki emisyon spektrumu.....	83
Şekil-7.2. Enalaprilin metanoldeki emisyon spektrumu .....	84
Şekil-7.3. Enalaprilin sudaki emisyon spektrumu .....	84
Şekil-7.4. Kinaprilin asetonitrildeki emisyon spektrumu .....	85
Şekil-7.5. Kinaprilin metanoldeki emisyon spektrumu .....	85
Şekil-7.6. Kinaprilin sudaki emisyon spektrumu.....	86
Şekil-7.7. Ramiprilin asetonitrildeki emisyon spektrumu .....	86
Şekil-7.8. Ramiprilin metanoldeki emisyon spektrumu .....	87
Şekil-7.9. Ramiprilin sudaki emisyon spektrumu.....	87
Şekil-7.10. Lisinoprilin metanoldeki emisyon spektrumu.....	88
Şekil-7.11. Lisinoprilin sudaki emisyon spektrumu .....	88

<b>Şekil-7.12.</b> Enalaprilin %10-40 asetonitril-su karışımlarındaki emisyon.....	90
spektrumları .....	90
<b>Şekil-7.13.</b> Enalaprilin%10-40 metanol-su karışımlarındaki emisyon.....	91
spektrumları .....	91
<b>Şekil-7.14.</b> Kinapriline %10-40 asetonitril-su karışımlarındaki emisyon .....	91
spektrumları .....	91
<b>Şekil-7.15.</b> Kinapriline %10-40 metanol-su karışımlarındaki emisyon .....	92
spektrumları .....	92
<b>Şekil-7.16.</b> Ramiprilin %10-40 asetonitril-su karışımlarındaki emisyon .....	92
spektrumları .....	92
<b>Şekil-7.17.</b> Ramiprilin %10-40 metanol-su karışımlarındaki emisyon .....	93
spektrumları .....	93
<b>Şekil-7.18.</b> Lisinoprilin %10-40 metanol-su karışımlarındaki emisyon.....	93
spektrumları .....	93
<b>Şekil-7.19.</b> Enalapril, Kinapril ve Ramiprilin asetonitril-su ortamındaki % çözücü- floresans şiddeti grafiği.....	96
<b>Şekil-7.20.</b> Enalapril, Kinapril, Ramipril ve Lisinoprilin metanol-su ortamındaki % çözücü-floresans şiddeti grafiği .....	97
<b>Şekil-7.21.</b> Enalaprilin % 10 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları .....	97
<b>Şekil-7.22.</b> Enalaprilin % 20 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları .....	98
<b>Şekil-7.23.</b> Enalaprilin % 30 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları .....	98
<b>Şekil-7.24.</b> Enalaprilin % 40 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları .....	99
<b>Şekil-7.25.</b> Enalaprilin % 10 metanol-su ortamındaki pH spektrumları.....	99
<b>Şekil-7.26.</b> Enalaprilin % 20 metanol-su ortamındaki pH spektrumları.....	100
<b>Şekil-7.27.</b> Enalaprilin % 30 metanol-su ortamındaki pH spektrumları.....	100
<b>Şekil-7.28.</b> Enalaprilin % 40 metanol-su ortamındaki pH spektrumları.....	101
<b>Şekil-7.29.</b> Kinapriline % 10 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları.....	101
<b>Şekil-7.30.</b> Kinapriline % 20 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları.....	102
<b>Şekil-7.31.</b> Kinapriline % 30 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları.....	102
<b>Şekil-7.32.</b> Kinapriline % 40 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları.....	103
<b>Şekil-7.33.</b> Kinapriline % 10 metanol-su ortamındaki pH spektrumları .....	103
<b>Şekil-7.34.</b> Kinapriline % 20 metanol-su ortamındaki pH spektrumları .....	104
<b>Şekil-7.35.</b> Kinapriline % 30 metanol-su ortamındaki pH spektrumları.....	104
<b>Şekil-7.36.</b> Kinapriline % 40 metanol-su ortamındaki pH spektrumları.....	105
<b>Şekil-7.37.</b> Ramiprilin % 10 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları.....	105
<b>Şekil-7.38.</b> Ramiprilin % 20 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları.....	106
<b>Şekil-7.39.</b> Ramiprilin % 30 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları.....	106
<b>Şekil-7.40.</b> Ramiprilin % 40 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları.....	107
<b>Şekil-7.41.</b> Ramiprilin % 10 metanol-su ortamındaki pH spektrumları .....	107
<b>Şekil-7.42.</b> Ramiprilin % 20 metanol-su ortamındaki pH spektrumları .....	108
<b>Şekil-7.43.</b> Ramiprilin % 30 metanol-su ortamındaki pH spektrumları .....	108
<b>Şekil-7.44.</b> Ramiprilin % 40 Metanol-su ortamındaki pH spektrumları.....	109
<b>Şekil-7.45.</b> Lisinoprilin % 10 metanol-su ortamındaki pH spektrumları.....	109
<b>Şekil-7.46.</b> Lisinoprilin % 20 metanol-su ortamındaki pH spektrumları.....	110
<b>Şekil-7.47.</b> Lisinoprilin % 30 metanol-su ortamındaki pH spektrumları.....	110
<b>Şekil-7.48.</b> Lisinoprilin % 40 metanol-su ortamındaki pH spektrumları.....	111
<b>Şekil-7.49.</b> Kinapriline % 10 metanol-su ortamındaki UV spektrumları .....	112
<b>Şekil-7.50.</b> Kinapriline % 20 metanol-su ortamındaki UV spektrumları .....	112



<b>Şekil-7.51.</b> Kinaprilin % 30 metanol-su ortamındaki UV spektrumları .....	113
<b>Şekil-7.52.</b> Kinaprilin % 40 metanol-su ortamındaki UV spektrumları .....	113
<b>Şekil-7.53.</b> Ramiprilin % 10 asetonitril-su ortamındaki UV spektrumları .....	114
<b>Şekil-7.54.</b> Ramiprilin % 20 asetonitril-su ortamındaki UV spektrumları .....	114
<b>Şekil-7.55.</b> Ramiprilin % 30 asetonitril-su ortamındaki UV spektrumları .....	115
<b>Şekil-7.56.</b> Ramiprilin % 40 asetonitril-su ortamındaki UV spektrumları .....	115
<b>Şekil-7.57.</b> Lisinoprilin % 10 metanol-su ortamındaki UV spektrumları.....	116
<b>Şekil-7.58.</b> Lisinoprilin % 20 metanol-su ortamındaki UV spektrumları.....	116
<b>Şekil-7.59.</b> Lisinoprilin % 30 metanol-su ortamındaki UV spektrumları.....	117
<b>Şekil-7.60.</b> Lisinoprilin % 40 metanol-su ortamındaki UV spektrumları.....	117
<b>Şekil-7.61.</b> Enalaprilin % asetonitril-su ortamında pH-floresans şiddeti grafiği....	118
<b>Şekil-7.62.</b> Enalaprilin % metanol-su ortamında pH-floresans şiddeti grafiği.....	118
<b>Şekil-7.63.</b> Kinaprilin % asetonitril-Su ortamında pH-floresans şiddeti grafiği ....	119
<b>Şekil-7.64.</b> Kinaprilin % metanol-Su ortamında pH-floresans şiddeti grafiği.....	119
<b>Şekil-7.65.</b> Ramiprilin % asetonitril-su ortamında pH-floresans şiddeti grafiği ....	120
<b>Şekil-7.66.</b> Ramiprilin % metanol-su ortamında pH-floresans şiddeti grafiği .....	120
<b>Şekil-7.67.</b> Lisinoprilin % metanol-su ortamında pH-floresans şiddeti grafiği.....	121
<b>Şekil-7.68.</b> 270 nm' de uyarılan örneklerin emisyon spektrumları.....	122
<b>Şekil-7.69.</b> 200 nm' de uyarılan örneklerin emisyon spektrumları.....	123

## TABLolar DİZİNİ

<b>Tablo-2.1.</b> Emisyon dalgaboyu ve floresans ışın şiddetine birkaç süstitüentin etkilerinin listesi.....	28
<b>Tablo-2.2.</b> Benzenin floresans dalga boyu ve ışın şiddetine bazı süstitüentlerin etkisi.....	32
<b>Tablo-2.3.</b> Florimetrimin Bazı Uygulama Alanları.....	39
<b>Tablo-6.1.</b> Çalışmalarda Kullanılan Çözücüler.....	77
<b>Tablo-6.2.</b> Kullanılan çözücülerin özellikleri ve solvatokromik parametreleri ( $\alpha$ , $\beta$ , $\pi^*$ , DN, AN).....	80
<b>Tablo-7.1.</b> Enalaprilin asetonytril, metanol ve sudaki $\lambda_{ekz}$ , $\lambda_{em}$ ve floresans şiddeti değerleri.....	89
<b>Tablo-7.2.</b> Kinaprilin asetonytril, metanol ve sudaki $\lambda_{ekz}$ , $\lambda_{em}$ ve floresans şiddeti değerleri.....	89
<b>Tablo-7.3.</b> Ramiprilin asetonytril, metanol ve sudaki $\lambda_{ekz}$ , $\lambda_{em}$ ve floresans şiddeti değerleri.....	89
<b>Tablo-7.4.</b> Lisinoprilin asetonytril, metanol ve sudaki $\lambda_{ekz}$ , $\lambda_{em}$ ve floresans şiddeti değerleri.....	90
<b>Tablo-7.5.</b> Enalapril ve Asetonytrilin $\lambda_{ekz}$ , $\lambda_{em}$ ve floresans şiddeti değerleri.....	94
<b>Tablo-7.6.</b> Enalapril ve Metanolün $\lambda_{ekz}$ , $\lambda_{em}$ ve floresans şiddeti değerleri.....	94
<b>Tablo-7.7.</b> Kinapril ve Asetonytrilin $\lambda_{ekz}$ , $\lambda_{em}$ ve floresans şiddeti değerleri.....	94
<b>Tablo-7.8.</b> Kinapril ve Metanolün $\lambda_{ekz}$ , $\lambda_{em}$ ve floresans şiddeti değerleri.....	95
<b>Tablo-7.9.</b> Ramipril ve Asetonytrilin $\lambda_{ekz}$ , $\lambda_{em}$ ve floresans şiddeti değerleri.....	95
<b>Tablo-7.10.</b> Ramipril ve Metanolün $\lambda_{ekz}$ , $\lambda_{em}$ ve floresans şiddeti değerleri.....	95
<b>Tablo-7.11.</b> Lisinopril ve Metanolün $\lambda_{ekz}$ , $\lambda_{em}$ ve floresans şiddeti değerleri.....	96
<b>Tablo-7.12.</b> ADE inhibitörlerinin % 10-40 metanol-su ortamlarındaki SPARC teorik pKa değerleri ile karşılaştırmalı pKa değerleri.....	121
<b>Tablo-7.13.</b> ADE inhibitörlerinin % 10-40 asetonytril-su ortamlarındaki SPARC teorik pKa değerleri ile karşılaştırmalı pKa değerleri.....	122

## 1. GİRİŞ

Enalapril, kinapril, ramipril ve lisinopril gibi anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörleri (antihipertansif ajanlar), hipertansiyon ve kalp yetmezliği hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. Bu ilaçlar özellikle de insüline bağımlı diyabetiklerdeki nefropati gelişmiş hipertansiyonun tedavisinde kullanılmaktadır. ADE inhibitörleri, diüretik tedavisi uygulanan bazı hastalarda, bir tiazid diüretik olan hidroklorotiazid (HKT) ile kombine edilerek uygulanmaktadır. Bu şekilde hidroklorotiazid-ADE inhibitörlerinin ikili karışımlarının diüretik ve antihipertansif ilaç formülasyonlarında geniş şekilde kullanımı söz konusudur. Hidroklorotiazid, primer olarak böbreklerde sodyum ve klorürün tübüler geri emilimini azaltarak ve renal tüplere suyun ozmotik taşınımını arttırarak, böbrekler tarafından salgılanan idrar oranını arttırır. Tiazid diüretikler, hafif ve orta derecede kalp yetmezliğini ve bununla birlikte gelişen ödemi tedavi etmek için çok faydalıdır. Ayrıca, bu diüretikler ya tek başlarına ya da ADE inhibitörleri gibi diğer ilaçlarla hipertansiyonun kontrolünde de kullanılan başlıca maddelerdir. Bunların hipotansif etkilerinin, ilk olarak sodyum iyonlarının tükenmesiyle ve daha sonra atar damar düz kasının direkt gevşemesiyle kan hacminin azalmasından dolayı olduğuna inanılmaktadır.

Floresans spektroskopisi, optik bir yöntem olarak gittikçe artan önem kazanmaktadır ve yöntemin duyarlı ve seçimli olması, uygulama alanını genişletmiştir. Aynı zamanda florimetri, numunelerde çok düşük derişimlerdeki türlerin tayinine olanak sağladığı; biyokimyada, besin endüstrisinde, nadir toprak elementlerinin analizinde, son yıllarda büyük önem kazanan çevre kimyasında, hava ve çevre kirliliğine yol açan bazı zehirli gazların, atık organik bileşiklerin ve eser metal atıklarının tayininde, farmakolojide, klinik numunelerin analizinde, tarım kimyasında ve pek çok organik ve inorganik bileşiğin analizinde oldukça tercih edilen bir bileşiktir. Florimetri yöntemi, derişimleri  $10^{-9}$ - $10^{-6}$  M olan maddeleri çok büyük bir kesinlik, doğruluk ve seçicilikle tayin etmesi özelliğinden dolayı, ultraviyole spektroskopisi ve atomik absorpsiyon spektroskopisi gibi diğer bazı enstrümental yöntemlere göre bazı üstün özelliklere sahip olduğu görülmektedir.

Floresans ve fosforesans spektrumları, absorpsiyon spektrumları gibi deneysel şartları verilen bir madde için karakteristiktir. Bu spektrumlar maddelerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde kullanılabilir. Lüminesans metodlar diğer absorpsiyometrik tekniklerden yaklaşık 103 defa daha duyarlıdır. Lüminesans teknikler organik ve mineral katıların molekül yapılarının incelenmesi ile fotokimya ve moleküler biyoloji alanlarında geniş bir uygulama alanı bulmuştur.

Bu çalışmada öncelikle, hipertansiyon ve kalp yetmezliği tedavisinde büyük bir öneme sahip olan, enalapril, kinapril, ramipril ve lisinopril gibi anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörleri (antihipertansif ajanlar) ile hidroklorotiazidden (HKT) oluşan ikili ilaç etken maddelerinin metanol-su ve asetonitril-su ortamlarında florimetrik özellikleri incelenmiş, pH çalışması ile ilaç etken maddelerinin pKa sabitleri hesaplanmış ve daha sonra bu ikili karışımların spektroflorimetrik tayini için bir yöntem geliştirilmiş ve geliştirilen yöntem ikili etken madde içeren tabletlere uygulanarak farmakopilerdeki standart analiz yöntemlerinden biri olan UV ile karşılaştırılmıştır. Geliştirilmiş spektroflorimetrik analiz yönteminin, kısa sürede, daha az çözücü ve kimyasal maddeyle yapılmasından dolayı farmakopilerdeki standart analiz yöntemlerine bir alternatif olabileceği düşünülmektedir.

## 2. TEORİK KISIM

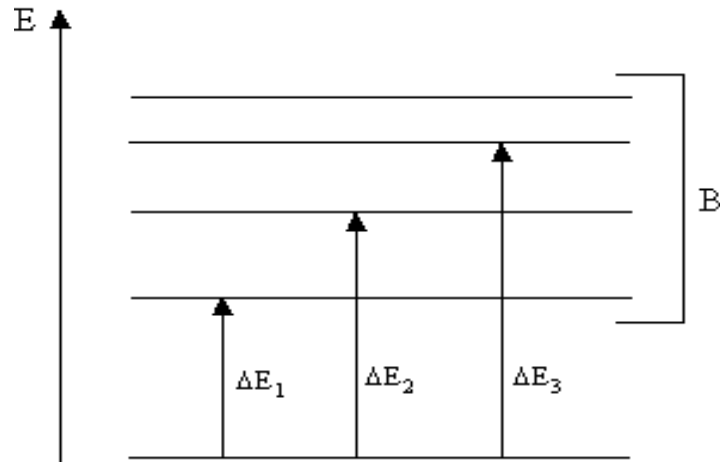
### 2.1. Işığın Absorplanması

Çeşitli dalga boylarında ışın içeren bir demet, şeffaf bir ortamdan geçirilirse, içinden bazı dalga boylarının kaybolduğu görülür. Buna ışının absorplanması denir. Absorpsiyonla ışın enerjisi maddenin iyon, atom veya moleküllerine aktarılır. Böyle ışın enerjisini absorplamış olan atom, iyon veya moleküller uyarılmış hale geçerler. Uyarılmış bir atom veya molekül  $10^{-8}$  sn kadar yaşayabilir. Sonra absorpladığı ışın enerjisini geri vererek tekrar eski haline veya temel haline döner. Madde tarafından absorplanan ışın enerjisinin geri verilmesi, genellikle ısı şeklinde olur ve madde çok az ısınır. Maddenin titreşim enerjisi artar.

Bazı maddeler ise absorpladığı ışın enerjisini kısa süreli olmak üzere, daha uzun dalga boylu ışınlar halinde yayar. Buna fotolüminesans olayı denir. Bu olayın çok kısa süreli olmasına floresans, daha uzun süreli olanına fosforesans adı verilir.

Atomların ve iyonların sınırlı sayıda uyarılmış halleri vardır. Bu nedenle sınırlı sayıda ışın enerjisini veya sınırlı sayıda ışın dalgalarını absorplarlar. İki türlü absorpsiyon vardır.

1. Atomik absorpsiyon
2. Moleküler absorpsiyon



Şekil-2.1. Bir atomun uyarılmış halleri

Bir maddenin temel haliyle uyarılmış halleri arasındaki enerji farkları başka bir maddeninkinden farklı olduğundan, her maddenin kendine özgü bir absorpsiyon spektrumu vardır.

### 2.1.1. Atomik Absorpsiyon

Sodyum buharından beyaz ışın demeti geçirilirse, demetten sarı ışının absorplandığı diğer bir ifadeyle kaybolduğu görülür. Sarı ışının sodyum atomları tarafından absorplanması, sodyum atomlarında 3s enerji seviyesinde bulunan bir elektronun sarı ışını absorplayarak 3p enerji seviyesine çıkmasıyla açıklanabilir. Bu sodyum atomunda 3s orbitaliyle 3p orbitali arasındaki enerji farkının sarı ışının ( $\lambda=5893 \text{ \AA}$ ) enerjisi kadar olduğunu söyler. Buna şekildeki  $\Delta E_1$  enerjisi denebilir.

Atomların en dış tabaka elektronları ultraviyole ve görünür ışınlarla uyarılmış hale getirildikleri halde, iç tabaka elektronlarını uyarılmış hale getirmek için X-ışınları kullanılır.

Atomların en dış tabaka elektronlarının uyarılması (rezonans ışınlaması) üzerine kurulmuş olan spektroskopi dalına atomik absorpsiyon, en iç tabaka elektronlarının uyarılması üzerine kurulmuş olan spektroskopi dalına da X-ışınları spektroskopisi denir.

### 2.1.2. Moleküler Absorpsiyon

Moleküllerde enerji seviyesi atomlardakine göre daha çoktur. Bir molekülün toplam enerjisi E olduğuna göre;

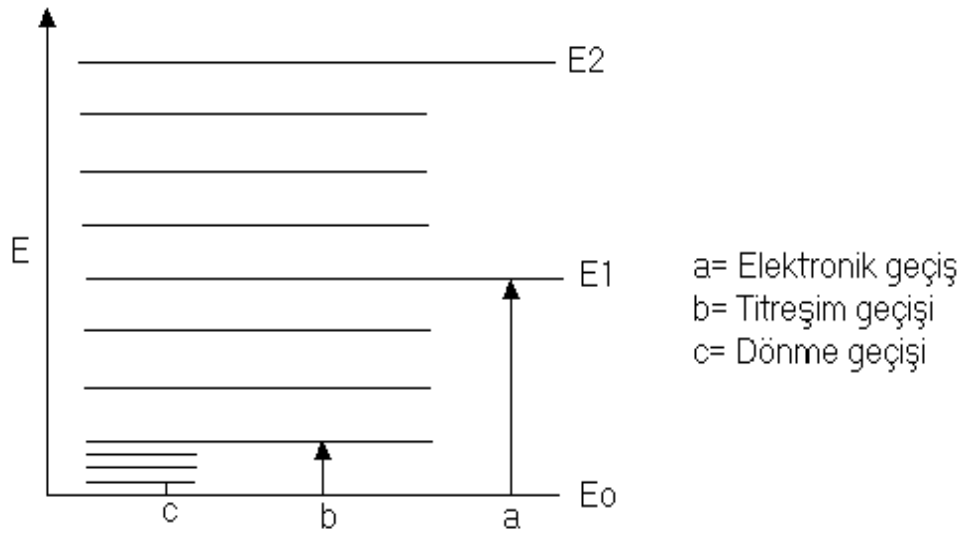
$$E = E_e + E_t + E_r \quad \text{dir.}$$

$E_e$  elektronik enerjisini,  $E_t$  titreşim enerjisini,  $E_r$  rotasyon veya molekülün ağırlık merkezi etrafında dönme enerjisini gösterir.  $E_e$  enerji terimi diğer enerji terimlerinden ( $E_t$  ve  $E_r$ ) daha büyüktür. Bu nedenle elektronik geçişler dalga boyları 200-800 nm arasında olan UV ve görünür alan ışınlarıyla gerçekleşir.

$E_t$ , titreşim geçişleri daha düşük enerjilidir. Bunlar için dalga boyları 1000-1500 nm olan IR ışınları kullanılır.

Er, rotasyon enerji seviyeleri enerjice, titreşim enerji seviyelerinden de daha düşük olduklarından, bu geçişler için dalga boyları 10000-100000 nm arasında olan ışınlar gereklidir.

Bir molekülün UV ve görünür alan spektrumu, molekülün bağ elektronlarından birinin, bir foton enerjisini absorplayarak bir üst elektronik seviyeye geçmesi şeklinde açıklanabilir. Elektronik seviyedeki geçişler daima titreşim ve rotasyon seviyelerindeki geçişlerle birlikte meydana gelir.



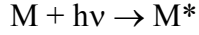
**Şekil-2.2.** Enerji seviyeleri arasındaki geçişler

Organik ve inorganik maddeler UV ve görünür alanda absorpsiyon yaparlar. Her iki grup maddede de elektron geçişinin temeli aynı olmasına rağmen açıklanma metotları farklıdır. Organik maddelerin absorpsiyonları molekül orbital teorisine göre, inorganik maddelerin ki ise kristal alan teorisine göre yapılır. Molekül orbital teorisi molekül orbitalleri kabulüne dayanır

### 2.1.3. Absorpsiyon Kanunları

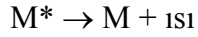
Bir maddenin ışık veya elektromagnetik enerji absorplaması olayı iki basamaklıdır.

Birinci basamak;



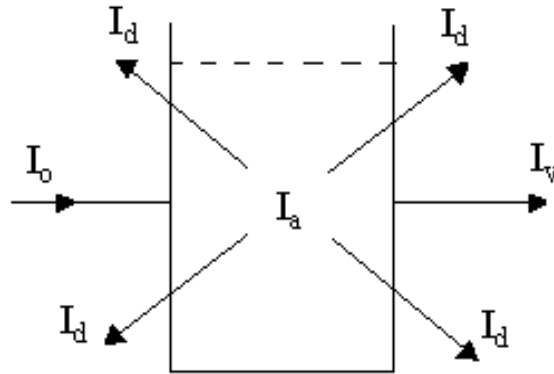
dır.  $M^*$  ışın absorplayarak uyarılmış olan atom, iyon veya moleküldür. Absorpsiyonla uyarılmış olan taneciğin ömrü  $10^{-8}$  saniye kadardır.

İkinci basamakta ;



olayı meydana gelir. Ortalama ömürleri çok kısa olduğundan, ortamdaki  $M^*$  konsantrasyonu oldukça düşüktür.

Şeffaf bir kap içinde bulunan bir çözelti üzerine bir ışın demeti düşürülürse;  $I_0$  şiddetindeki ışın demetinin bir kısmı çözültide absorplanır ( $I_a$ ), bir kısmı çözelti tarafından dağıtılır ( $I_d$ ), bir kısmı yansır ( $I_y$ ).



**Şekil-2.3.**  $I_0$  şiddetindeki bir ışın demetinin geçirgen yüzey ve çözelti üzerine düşmesi

Buna göre,

$$I_0 = I + I_a + I_d + I_y$$

olur. Bunlardan  $I_d$  ve  $I_y$  ihmal edilecek kadar az olduğundan;



$$I_0 = I + I_a \text{ olur.}$$

Bu bağıntıyla ilk ilgilenen bilim adamları Beer ve Lambert-Bouger olmuştur.

#### 2.1.4. Beer Kanunu

Beer'e göre (1852) aynı derinlikte bir çözeltilerden geçen ve çözelti tarafından absorplanan monokromatik bir ışın demetinin şiddeti çözeltinin konsantrasyonu ile logaritmik veya üstel olarak azalır.

Bu gerçek logaritmik olarak;

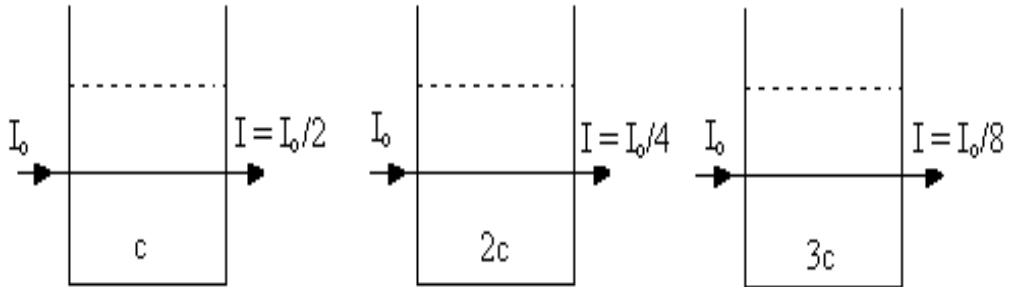
$$I = I_0 e^{-bc}$$

$$\ln I = \ln I_0 - bc$$

veya

$$I = I_0 10^{-ac} \quad (a=b/2,303)$$

$$\log I = \log I_0 - ac \quad \text{şeklinde verilir.}$$



Şekil-2.4. Beer Kanununun şematik olarak gösterilişi

$I_0$  gelen ışının şiddeti,  $I$  çözeltiyi terkeden ışının şiddeti,  $a$  çözeltinin türüne ve monokromatik ışının dalga boyuna bağlı bir sabit,  $C$  ise çözeltinin konsantrasyonudur.

### 2.1.5. Lambert Kanunu

Lambert'e göre (1760), bir çözeltilerden geçen monokromatik bir ışın demetinin şiddeti çözeltinin derinliğiyle (çözelti içinde aldığı yolla) logaritmik veya üstel olarak azalır. Bu gerçek logaritmik olarak,

$$I = I_0 e^{-bl}$$

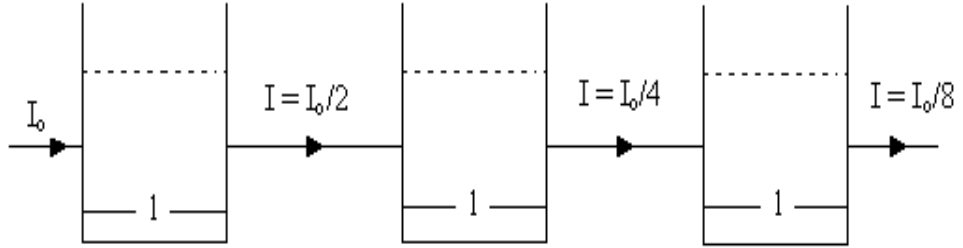
$$\ln I = \ln I_0 - bl$$

veya

$$I = I_0 10^{-al} \quad (a = b/2,303)$$

$$\log I = \log I_0 - al$$

şeklinde gösterilir.  $I_0$  gelen ışın demetinin şiddeti,  $a$  çözeltilerden geçen ışın demetinin dalga boyuna bağlı bir sabit,  $l$  çözeltinin derinliğidir.



Şekil-2.5. Lambert kanununun şematik olarak gösterilişi

### 2.1.6. Lambert-Beer Kanunu

Yukarıda açıklanan iki kanun birleştirilirse, bir çözeltilerden geçen monokromatik ışın şiddeti, çözeltinin derinliği (ışının çözelti içinde aldığı yol) ve konsantrasyonu ile logaritmik ve üstel olarak azalır. Buna göre;

$$I = I_0 10^{-\epsilon l C}$$

ifadesi yazılır. Bu eşitliğe Lambert-Beer kanunu denir. Eşitlikte  $I_0$  gelen ışının şiddeti,  $I$  çözeltilerden çıkan ışın demetinin şiddeti,  $\epsilon$  çözeltinin absorplama katsayısı,  $l$

çözeltinin kalınlığı, C ise çözeltinin konsantrasyonudur. Eşitliğin eksi logaritması alınır;

$$\log I_0/I = \epsilon lC$$

olur.  $\log I_0/I$  ye absorbans denir ve A ile gösterilir. Eşitliklerden anlaşılacağı gibi  $\epsilon$  sabiti çözelti konsantrasyonunun ve ışın yolunun veriliş birimine göre değişir. Bunu sabit hale getirmek için konsantrasyon molarite, ışın demetinin geçtiği yol da cm olarak alınır. Böylece bulunan  $\epsilon$  (L/mol.cm) molar absorplamadır. Buna göre yukarıdaki eşitlik

$$A = \epsilon lC$$

şeklinde verilir.

Ölçme yapılırken  $I_0$  ve I şiddetleri ayrı ayrı ölçülmez. Onun yerine söz konusu dalga boyundaki çözelti ve saf çözücünden geçen ışın demeti şiddetleri ölçülür. Saf çözücünden geçen ışın demetinin şiddeti  $I_0$  olarak kabul edilir. Buna göre

$$A = \log \frac{I_0}{I} = \log \frac{I_{(\text{çözücü})}}{I_{(\text{çözelti})}}$$

eşitliği yazılır.

Bir ışın demetinin çözücünden geçen kısmının çözücünden geçen kısmına oranına **geçirgenlik (transmitans)** denir ve T ile gösterilir.

$$T = \frac{I}{I_0}$$

ve

$$A = \log I_0/I = \epsilon lC \text{ yazılır.}$$

Bu eşitlik

$$A = - \log T$$

şeklinde de yazılabilir.

## 2.2. Lüminesans Olayı

Soğurdukları ışık enerjisini tekrar ışık enerjisi olarak yayma özelliğine sahip olan maddelere “fotolüminesans maddeler”, bu olaya da “fotolüminesans olayı” adı verilir.

Lüminesans spektrumları normal olarak ultraviyole ve görünür bölgededir ve daima karşılık geldikleri soğurma spektrumlarına göre daha uzun dalga boylarına kaymışlardır. Maddenin kimyasal yapısına, fiziksel durumuna ve sıcaklığına bağlı olarak farklı lüminesans olayları gözlenebilir.

- 1- Floresans (normal ve hızlı)
- 2- Fosforesans
- 3- Geciktirilmiş floresans

Bu farklı lüminesans olayları birbirinden, emisyon dalga boyları veya absorpsiyon ve emisyon arasında geçen zaman (lifetime = ömür) ile ayırt edilir. Normal floresans, bir madde için, herhangi bir fiziksel durumda ve hem adi hem de düşük sıcaklıklarda gözlenebilir. Floresansın ömrü genellikle çok kısadır.  $10^{-10} - 10^{-8}$  sn arasındadır.

Maddeler genellikle katı veya katı çözelti halinde iken çok düşük sıcaklıkta fosforesans özellik gösterirler. Fosforesans, floresanstan öncelikle spektrumlarının durumuyla ayırt edilir. Fosforesans spektrumları daha uzun dalga boylarına kaymıştır. Aynı zamanda fosforesans ömrü oldukça uzundur ( $10^{-4}$  saniyeden dakikalara hatta saatlere kadar değişir). Bir molekülün absorbtivitesi ne kadar büyük ise ( $10^{-4}$ - $10^{-5}$  gibi) ömrü o kadar kısadır. Bu gibi hallerde fosforesansın meydana gelme ihtimali çok azdır.

Geciktirilmiş floresans olayına birkaç maddede rastlanmıştır ve genellikle fosforesans yayan maddelerle aynı fiziksel haldedirler. Emisyon spektrumları hızlı floresans için verilenler gibidir. Yalnız uyarılma ve yayılma arasında geçen zaman fosforesans ömrü mertebesindedir.

Yukarıda izah edilen floresans ve fosforesans spektrumları, absorpsiyon spektrumları gibi deneysel şartları verilen bir madde için karakteristiktir. Bu spektrumlar maddelerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde kullanılabilir. Lüminesans metotlar diğer absorpsiyometrik tekniklerden yaklaşık  $10^3$  defa daha duyarlıdır.

Lüminesans teknikler organik ve mineral katıların molekül yapılarının incelenmesi ile fotokimya ve moleküler biyoloji alanlarında geniş bir uygulama alanı bulmuştur.

### 2.3. Fotolüminesans Olayının Elektronik Geçişinin Kaynağı

Bir molekül, UV veya görünen ışığı absorpladığı zaman, elektronlardan biri daha yüksek enerji seviyesine çıkar. Elektron temel seviyesine döndüğü zaman ise floresans veya bir başka lüminesans olayı meydana gelir. Moleküllerdeki elektronlar karakterize ettikleri bağa göre;  $\sigma$  ve  $\pi$  elektronları olarak sınıflandırılır. Sigma ( $\sigma$ ) elektronları tek bağ oluşturan elektronlardır. Pi ( $\pi$ ) elektronları ise ikili, üçlü bağların ve aromatik sistemlerin bağını oluşturan elektronlardır.

Bir molekül uygun dalga boyunda bir ışık absorpladığı zaman absorplanan ışık enerjisi ya dönme enerjisine çevrilir ( $30\mu$  dan büyük dalga boyları için) veya titreşim enerjisine çevrilir ( $1-30\mu$  dalga boyları için ) ya da daha büyük bir enerji absorplanmışsa ( $1\mu$  dan daha küçük dalga boyları için ) molekülün elektronik yapısının değişimine harcanır. Lüminesans olayları, molekül içindeki elektronik dağılımdaki değişimin görünür veya mor ötesi ışık yayması sonucudur.

Lüminesans olayını molekülsele enerji seviyeleri diyagramıyla açıklamaya çalışalım :

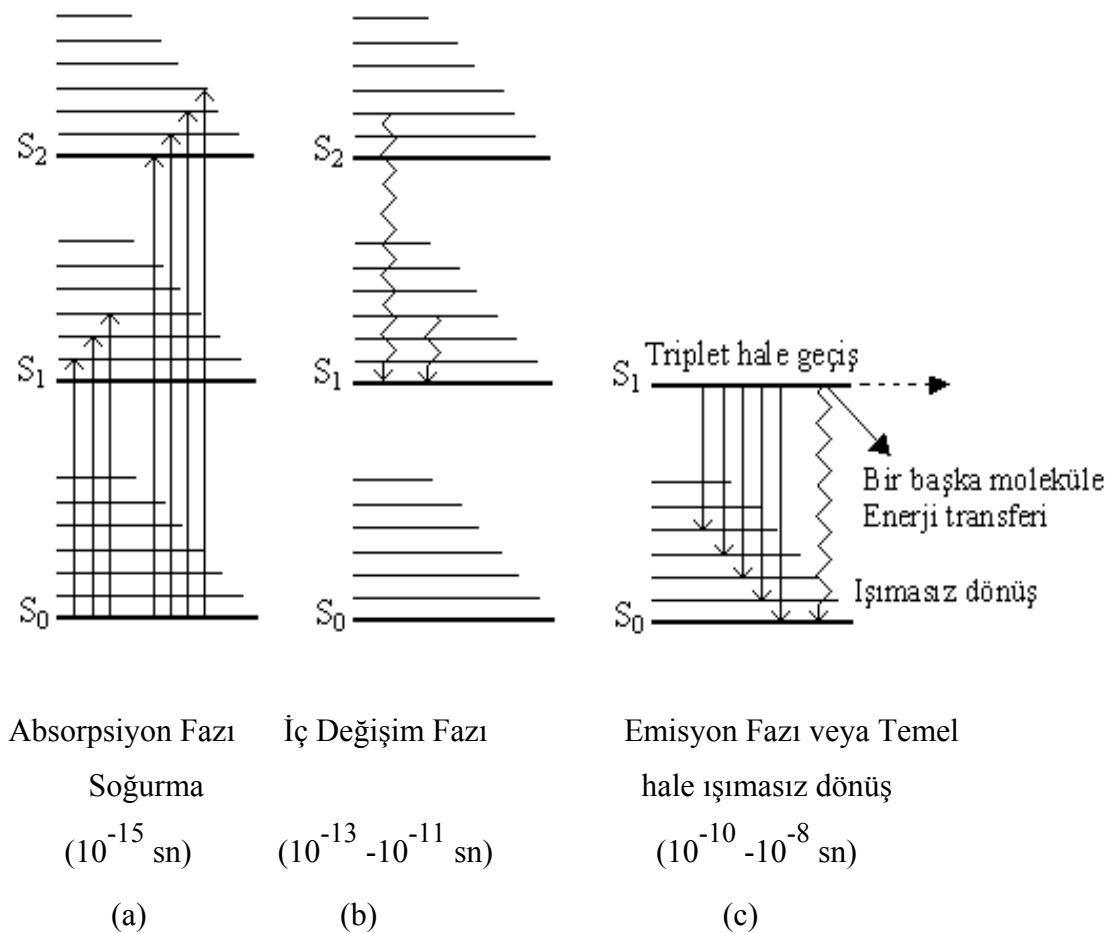
Molekülün en düşük enerji seviyesi temel hal denilen uyarılmamış halidir. Diğer enerji seviyeleri uyarılmış hallerdir. Bunlar da birli (singlet) haller ve üçlü (triplet) haller olarak ikiye ayrılır.

Uygun bir dalga boyundaki ışığın absorplanmasıyla molekülün temel halden singlet durumlara doğrudan doğruya geçmesi sağlanır. Halbuki triplet hallere temel halden doğrudan geçiş mümkün değildir. İlgili elektron, molekül içerisinde singlet uyarılmış bir durumdan başlayarak triplet hale geçebilir.

### 2.3.1. Floresans

Şekildeki molekül enerji diyagramında singlet enerji seviyesi diyagramını göz önüne alalım. Bu durumda molekül, temel halin sıfırıncı titreşim seviyesinde kabul edilmiştir. Uygun enerjili bir fotonun absorpsiyonu, molekülü uyarılmış bir halin titreşim seviyelerinden birine uyarır. Böyle bir geçiş için gerekli zaman  $10^{-15}$  sn mertebesindedir.

Genellikle molekül bir uyarılmış durumda veya daha üst bir titreşim seviyesinde kalmaz, molekül içi bir enerji dönüşüm işlemi, onu uyarılmış birinci singlet halin en düşük titreşim düzeyine geri getirir. Bu dönüşüm,  $10^{-13} - 10^{-11}$  saniyelik bir sürede oluşur.



Şekil-2.6. Floresans emisyonunun şematik diyagramı (Jablonski diyagramı)

Bu şekilde birinci uyarılmış halin titreşim düzeyine getirilen molekül şartlara bağımlı olarak bu durumda  $10^{-10} - 10^{-8}$  sn arasında kalabilecek kararlılıktadır. Temel halin en düşük titreşim düzeyine dönüş üç yolla olabilir ;

- 1- Molekülün temel halin titreşim düzeylerinden birine, daha sonra da bir enerji dönüşümüyle en düşük titreşim düzeyine geri dönmesi ile ışığın emisyonu floresans olayının meydana gelmesine yol açar.
- 2- Molekül içerisindeki enerji dönüşümü veya çevredeki diğer moleküller ile enerji değişimi, dönme veya titreşim enerjisi şeklinde olur (Şekil b). Bu geçişler ışın yayıcı değildir.
- 3- Bir molekül, bir titreşim seviyesine uyarıldıktan sonra, temel hale, bir başka moleküle enerji transferi ile döner (Şekil c).

Bu diyagramdaki açıklamalardan da görüldüğü gibi verilen bir emisyon spektrumu; bir miktar enerjinin iç dönüşümlerde harcanması veya ışısız dönüşümlerle harcanması nedeniyle daima uyarıcı olarak görev yapan absorpsiyon spektrumlarından daha düşük frekans bölgesinde (veya daha uzun dalga boyu bölgesinde) meydana gelir.

Floresans emisyonunun diğer mümkün yöntemlere göre üstünlüğü kuantum verimi nicel olarak belirlenebilir. Kuantum verimi; yayılan floresans fotonlarının sayısının absorplanmış fotonların sayısına oranı olarak tanımlanır.

### **2.3.1.1. Moleküler Floresans ve Fosforesans**

Floresans ve fosforesansın her ikisi de, ışın enerjisi (genellikle ultraviyole ışınları) absorplayarak uyarılmış hale gelen bir molekül, iyon veya atom tarafından, absorplanan bu ışın enerjisinin (genellikle görünür ışın; fakat bazen de ultraviyole veya infrared ışını) ışık yayılması şeklinde geri verilmesi anlamına gelen *fotoluminesansın* (basitçe lüminesans olarak ifade edilir) çeşitleridir:

Floresans veya fosforesansın enerjisi (hv), uyarma için kullanılan ultraviyole ışınkinden genellikle çok daha düşüktür. Dalga boyu enerjiyle ters orantılı olduğundan, floresans veya fosforesans, ultraviyolede (>300nm), görünür bölgede

(380-750 nm) veya yakın infraredde bile (<750nm) daha uzun dalga boylarında yer alır.

Genelde, türler uyarılmış hale eriştikten sonra, floresans emisyonu çok çabuk ( $10^{-9}$ – $10^{-6}$  sn) meydana gelir. Bunun için ultraviyole ışımalarının kaynağı uzaklaştırıldığı anda floresent bir maddeyi gözle sezmek (anlamak) imkansızdır. Fosforesans emisyonu çok daha yavaş ( $>10^{-4}$  sn) ve fosforesans emisyonunun ömründe daha büyük bir değişimle meydana gelir. Böylece, çoğunlukla organik molekülleri kapsayan birçok fosforesant madde, ultraviyole kaynağı uzaklaştırıldığı anda gözle sezilmezken, ultraviyole uyarılması durduktan sonra floresans ışması devam eden inorganik minerallerin sayısı oldukça fazladır. Kaydedilmiş en uzun olaya, Willemite ( $ZnSiO_4$ ) minerali 340 saatlik fosforesansından dolayı özel bir örnektir.

Katıların fosforesansı oda sıcaklığında kolaylıkla gözlenirken çözeltilerin fosforesansını oda sıcaklığında gözlemek çoğunlukla imkansızdır; çünkü uyarılmış türlerle çarpışmalarda absorplanan enerjiyi içeren oksijen molekülleri, fosforesansı söndürmektedir. Bundan sakınmak için çözeltiler sıvı azotta ( $77^{\circ}K$ ) soğutulur ve donmaya bırakılır; böyle çözeltiler “*rijit çözeltiler* (bükülmez, katı)” olarak ifade edilirler. Böyle çözeltileri hazırlamak için çoğunlukla kullanılan iki organik çözücü etanol ve etil eter- izopentan- etanol karışımı olan EPA’dır.

### 2.3.1.2. Ekzitasyon (uyarma) ve Emisyon (yayma)

Türlerin, uyarılmış hale erişmesi için birçok yol olmasına rağmen, tanım olarak fotoluminesans, aşağıdaki ışın enerjisi formlarından birinin absorplanmasıyla oluşan fotouyarmayla meydana gelir:

- (1) Güneş ışığı,
- (2) Oda ışığını da kapsayan görünür ışık,
- (3) Ultraviyole ışık,
- (4) X-ışınları.

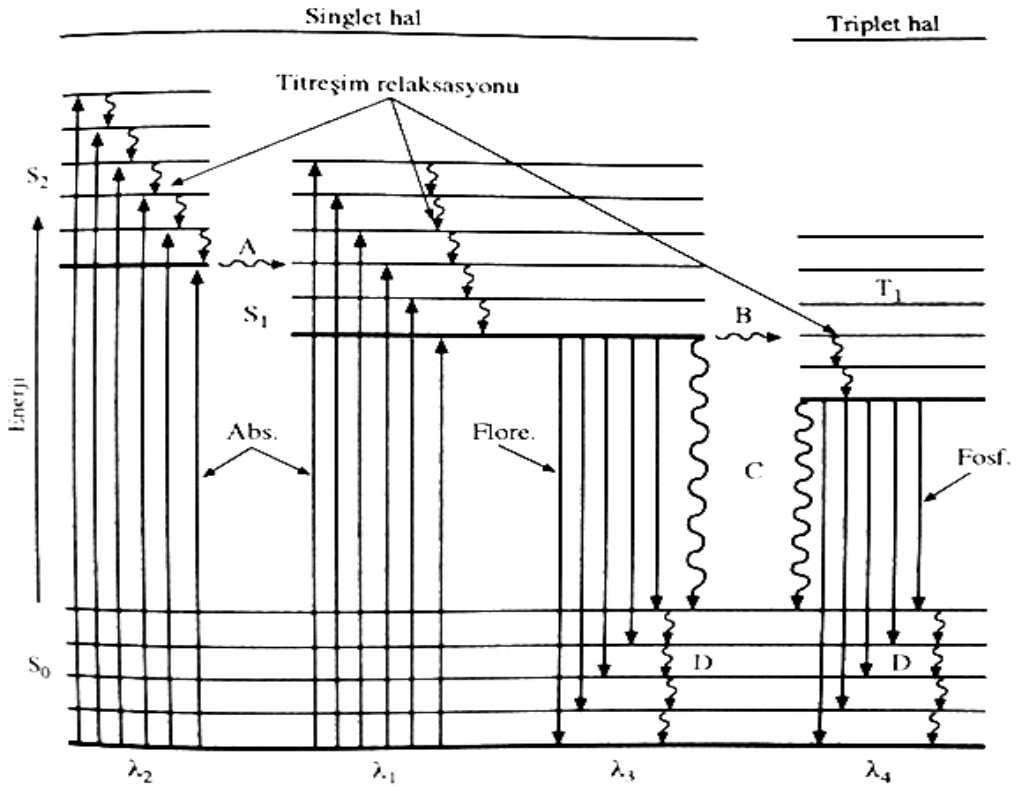
Fotoluminesansda emisyon prosesi, uyarılmış bir elektronik düzeyden ışık enerjisinin yayılması şeklindedir. Fotouyarılmış türlerde, uyarılmış elektronun spini değişmeksizin, uyarılmış halden temel hale bir geçiş olduğunda fotoluminesans



*floresans* olarak adlandırılır. Eğer spinde bir değişim varsa, o zaman fotolüminesansa *fosforesans* adı verilir.

Organik moleküller için floresans terimi çoğunlukla,  $S_1$ , en düşük uyarılmış singlet düzeyden,  $S_0$  temel singlet düzeyine bir geçiş boyunca yayılan ışık enerjisi anlamına gelir. Organik moleküllerin fosforesansı ise genellikle en düşük  $T_1$  triplet düzeyden,  $S_0$ , temel singlet düzeyine geçiş boyunca oluşan bir ışık emisyonudur. İnorganik türlerde uyarılmış elektronun spininde bir değişim meydana geliyorsa emisyon fosforesans olarak tanımlanır.

Absorpsiyon spektrofotometrisinin aksine, floresans ve fosforesans spektrometrisi uyarma ve emisyon spektrumunun her ikisini de içermektedir. Kullanılan cihazlar ise spektroflorimetre veya spektrofosforimetre olarak adlandırılır.



**Şekil-2.7.** Bir molekülden floresans ve fosforesans ışınların yayılma mekanizmaları.  $S_0$ ) Temel hal ve üzerindeki titreşim seviyeleri,  $S_1$ ) Birinci uyarılmış hal ve üzerindeki titreşim seviyeleri,  $S_2$ ) İkinci uyarılmış hal ve üzerindeki titreşim halleri, A) İç geçiş, B) Sistemler arası geçiş, C) İç ve dış geçiş, D) Titreşim relyonu.

Oda sıcaklığında  $S_1$  hali deaktivasyonu verebilen yani, fazla elektronik enerjisini kaybetmek için  $S_1$  düzeyini bırakıp  $S_0$  düzeyine geri dönen dört önemli proses vardır. Bunlar:

1. Floresans emisyonu (yayma):  $1S_1^* \longrightarrow 1S_0 + h\nu$
2. İç dönüşüm :  $1S_1^* \longrightarrow 1S_0 + 1S_1$
3. Sistemler arası geçiş:  $1S_1^* \longrightarrow 3T^*$
4. Çarpışmalı söndürme:  $1S_1^* + Q \longrightarrow 1S_0 + 1S_1$

Bir molekülün uyarılması ve temel haline dönmesi mekanizmaları basitleştirilmiş olarak Şekil-2.7.' de verilmiştir. Şekilde de görüldüğü gibi bir molekülün  $S_0$  ile gösterilen bir temel hali, bunun üstünde  $S_1$ ,  $S_2$  ile gösterilen uyarılmış halleri vardır. Her halin en altında bulunan kalın çizgiye, o halin *elektronik seviyesi* üstündeki ince çizgilere de o halin *titreşim seviyeleri* denir. Temel halin en alt (elektronik) seviyesinde bulunan bir molekül üzerine, dalga boyları  $\lambda_1$  ve  $\lambda_2$  etrafında toplanan dar ve iki ayrı ışın bandı gönderilecek olursa,  $\lambda_1$  grubu ışınlarla uyarılan (eksite edilen) molekülün bağ elektronlarından biri şekilde görüldüğü gibi uyarıcı ışının dalga boyuna bağlı olarak  $S_1$  uyarılma halinin titreşim seviyelerinden birine fırlar. Dalga boyu en küçük olan ışınla fırlayan elektron, bu halin en üst titreşim seviyesine, dalga boyu en büyük olan ışınla fırlayan elektron da bu halin kalın çizgiyle gösterilen en alt veya elektronik seviyesine çıkar. Molekül dalga boyları daha kısa, enerjileri daha büyük olan  $\lambda_2$  grubu ışınlarla uyarıldığı zaman  $S_2$  uyarılma halindeki durum elde edilir. Bu halin de gene yatay çizgiyle gösterilen elektronik seviyesi, onun üstünde de titreşim seviyeleri vardır. Şimdi tekrar  $\lambda_1$  ışın bandıyla uyarılan  $S_1$  haline dönelim. Uyarılan elektron bu halin, elektronik seviyesinden (en alt seviyesi) doğrudan temel halin ( $S_0$ ) en alt titreşim seviyesine geçebileceği gibi, öteki titreşim seviyelerinin herhangi birine de geçebilir. Buna  $S_1 \rightarrow S_0$  geçişi denir. Böyle bir geçiş sonucu bir ışın yayılır. Buna *temel hale dönme* denir. Temel hale dönmede birçok ihtimaller vardır. Elektron temel halin ( $S_0$ ) herhangi bir titreşim seviyesine geçebilir. Bunun sonucu da etrafa farklı dalga boylarında ışınlar yayılır. Bunlara floresans ışınları ( $\lambda_3$  demeti) denir. Uyarılan bir elektronun floresans ışınları yayarak temel hale dönebilmesi için, önce birinci uyarılma halinin ( $S_1$ ) en alt titreşim seviyesine veya elektronik seviyesine gelmesi gerekir. Bunun için elektron dalgalı oklarla gösterildiği gibi uyarılmış halin üst titreşim seviyelerinden basamak

basamak aşağıya iner ve en alt titreşim seviyesine veya elektronik seviyesine gelmesi gerekir. Bunun için elektron dalgalı oklarla gösterildiği gibi uyarılmış halin üst titreşim seviyelerinden basamak basamak aşağıya iner ve en alt titreşim seviyesine gelince ışın yayarak temel halin bir seviyesine geçer. Elektronun temel hale geçmesi, temel halin herhangi bir titreşim seviyesine geçmesiyle mümkün olduğu halde, elektronun uyarılmış halin ( $S_1$ ) herhangi bir üst titreşim seviyesinden, ışın yayarak temel hale geçmesi mümkün olmaz. Ancak, temel halin herhangi bir titreşim seviyesine geçen elektron titreşim seviyelerinden ışın yaymaksızın basamak basamak, aşağıya inebilir (dalgalı oklar). Bu şekilde titreşim seviyelerinden basamak basamak inme sonucu, elektron veya elektronun sahibi olan molekül, enerjisini çözücüye (ortama) verir ve çözücü çok az da olsa ısınır.

$\lambda_2$  Grubu ışınlarla ikinci uyarılma seviyesine ( $S_2$ ) geçen bir elektron verilen mekanizmayla direkt olarak  $S_2$  seviyesinden temel hale geçemez. Bu elektron önce ikinci halin en alt titreşim seviyesine gelir. Oradan *iç geçiş* denen bir olayla, birinci uyarılmış halin üst titreşim seviyelerinden birine geçer. Oradan gene titreşim seviyelerinden basamak basamak inerek, birinci halin ( $S_1$ ) en alt titreşim veya elektronik seviyesine gelir. Buradan da daha önce söylendiği gibi ışın yayarak temel halin herhangi bir titreşim seviyesine, oradan da basamak basamak temel halin en alt enerji seviyesine iner.  $S_2$  halinde de olsa, elektronun geri dönüşü ancak  $S_1 \rightarrow S_0$  geçişiyle tamamlanır. Bunu kinin sülfatın floresansı üzerinde göstermek mümkündür. Bu madde hem 250 nm lik bir ışın demetiyle, hem de 350 nm lik bir ışın demetiyle uyarılabilir. Ancak, her iki uyardan da 450 nm dalga boyunda floresans ışını elde edilir. Böyle örnekler daha çoğaltılabilir. Bir molekülün uyarılması hangi dalga boyundaki ışınla yapılırsa yapılsın, floresans ışını  $S_1 \rightarrow S_0$  geçişinden meydana gelir. Özet olarak uyarılma  $\lambda_2$  ( $S_0 \rightarrow S_2$ ) geçişiyle olmasına rağmen temel hale dönme,  $\lambda_3$  ( $S_1 \rightarrow S_0$ ) geçişle gerçekleşir.

Fosforesans, daha önce de söylendiği gibi daha da az görülen bir olaydır. Çünkü, bu olayda uyarılan elektronun spininin ters dönmesi gerekir. Spinin ters dönmesiyle molekülün *multiplesitesi* değişir. Multiplesitenin değişmesi, yasaklanmış bir olaydır. Buna rağmen maddede fosforesans olayı da görülür; Şekil 2.7. Fosforesans olayında da uyarılan elektron ister birinci ( $S_1$ ), isterse ikinci ( $S_2$ ) halde olsun, birinci halin ( $S_1$ ) elektronik seviyesine gelir. Bu  $S_1$  seviyesi, molekülün

fosforesans uyarılma halinin üst titreşim seviyelerinden birisiyle çakışırsa, elektron fosforesans titreşim seviyelerinden birine geçer. Bu esnada spini de değişir. Singlet halden triplet hale geçer, Şekil-2.7. Fosforesans olayının titreşim seviyelerinden birine geçen elektron, tıpkı floresans olayında olduğu gibi buradan titreşim basamaklarından fosforesans basamağına, fosforesans basamağından da temel halin titreşim seviyelerinden birine iner bunun sonucu fosforesans ışınları yayılır ( $\lambda_4$  ışınları).

Şekil-2.7.' de birinci uyarılma halinin en alt seviyesiyle, temel halin en üst titreşim seviyesi arasında ve triplet halin ( $T_1$ ) en alt seviyesiyle temel halin en üst seviyesi arasında görülen dalgalı oklar, elektronun titreşim seviyeleri arasında olduğu gibi elektronun *ışınmasız temel hale* geçişlerini gösterir (relaksasyon). Bunların mekanizmaları pek iyi bilinmemektedir.

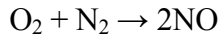
Uyarılan bir molekül fazladan bir enerji yüklenir. Bu enerjiyi: a) titreşim enerjisi, b) elektronik enerji halinde geri verir. Molekül hangi enerji seviyesine uyarılırsa uyarılsın ( $S_2$ ,  $S_3$  gibi) önce enerjisinin bir kısmını titreşim enerjisi halinde geri verir ve ilk uyarılma seviyesi olan  $S_1$  seviyesinin *elektronik enerji seviyesine* gelir. Buradan temel hale geçmek için üç yol izleyebilir. Genelde bu yollardan hangisi daha hızlıysa onu izler. Bu yollar şöyledir:

- a) Temel hale oklarla gösterildiği gibi, floresans ışını yayarak iner (elektronik hareketle enerji atılması),
- b) Temel hale dalgalı okla gösterildiği gibi titreşim yaparak iner (titreşim hareketiyle enerji atılması C),
- c) Temel hale, spin değişikliği yaparak iner.

Bu sonuncu yolda molekülde önce bir spin değişikliği olur ve ondan sonra molekül fosforesans elektronik seviyesine gelir. Buradan itibaren ya fosforesan ışın yayarak ( $\lambda_4$  grubu) veya gene titreşim yaparak temel hale iner. Titreşimle inişi eğri okla (C) gösterilmiştir.

Temel hale geçişte izlenebilecek bu üç yoldan en uzun olanı, fosforesan ışın yayarak temel hale geçiştir. Bu nedenle, genelde daha kısa olan öteki iki yol izlenir. Bunun sonucu da fosforesan ışın yayan maddelerin sayısı, floresan ışın yayanların sayısından daha az olur.

Floresans olayı olsun, fosforesans olayı olsun genel olarak söz konusu molekülün yapısal ve çevresel özellikleri uygun olduğu zaman meydana gelir. Bundan dolayı da bu olayları gösteren moleküllerin sayısı çok azdır. Sonuç olarak moleküllerin çok büyük yüzdesi temel hale titreşim yoluyla dönerler (ısılarını çözücüye aktarırlar). Temel hale geçişte en hızlısı genel olarak bu yoldur. Hızlı olduğundan dolayı da tercih edilir. Bilindiği gibi bir olayın veya reaksiyonun cereyanında hız çok önemli bir faktördür. Termodinamik olarak çok tercih edilen bir reaksiyon, hızının çok düşük olması nedeniyle cereyan edemez. Buna tipik örnek havadaki O<sub>2</sub> ile N<sub>2</sub> arasındaki reaksiyondur. Bu reaksiyonun hızı büyük olsaydı, belki de havada oksijen kalmaz,



olurdu.

Floresans ve fosforesans olaylarını daha iyi anlayabilmek için bu olaylara rekabet eden olayları biraz daha yakından incelemek gerekir. Bunlar başlıca:

- 1) Titreşim relaksasyonu (temel hale yönelme),
  - 2) İç geçiş,
  - 3) Dış geçiş,
  - 4) Sistemler arası çapraz geçiş,
- dir.

### 1-) Titreşim Relaksasyonu

Titreşim relaksasyonu (titreşim yoluyla enerji atma) floresans olayına rekabet eden, onu ortadan kaldırmaya çalışan olaylardan birisidir. Molekül üzerine düşen ışının enerjisine göre titreşim seviyelerinden birine yükselir. Ancak uyarılmış moleküldeki titreşim enerjisi hemen atılır. Atılma uyarılmış molekülün çözücü molekülleriyle çarpışması sonucu çözücü moleküllerine geçmesi suretiyle olur. Bu şekilde bir enerji atılması 10<sup>-14</sup> saniye gibi çok kısa bir zamanda gerçekleşir ve molekül uyarılmış halin en altında bulunan elektronik geçiş seviyesine gelir, Şekil 2.7. Geldiği elektronik seviye örneğin S<sub>2</sub> ise gene titreşim yoluyla enerji atar ve S<sub>1</sub> elektronik seviyesine gelir. S<sub>2</sub> elektronik seviyesinden S<sub>1</sub> elektronik seviyesine geliş

gene  $10^{-14}$  saniye gibi çok kısa zamanda olur. Ancak,  $S_1$  den temel hale geçme zamanı titreşim zamanına göre çok uzun,  $10^{-7}$ – $10^{-9}$  saniyedir. Molekül bu sürenin sonunda floresan ışın yayarak temel halin titreşim seviyelerinden birine iner. Bu iniş rastgele kuralına göre gerçekleşir. Buradan da temel halin en alt seviyesine geçer. Bu geçiş de gene titreşim yoluyla gerçekleşir. Böyle olduğu molekülün spektrumunda bir birine çok yakın emisyon piklerinin görülmesinden anlaşılır. Çözeltide, ısı haline dönüşen titreşim enerjisi absorplanan enerjinin oldukça büyük bir yüzdesi olduğundan, floresans (fosforesans) ışınlarının dalga boyları uzun olur. Buna *uzun dalga boylarına kayma* veya *Stokes kayması* denir.

## 2-) İç Geçiş

Bir molekül, hangi elektronik hale uyarılırsa uyarılsın ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$  gibi) en düşük enerjili halin ( $S_1$ ) elektronik enerji seviyesinden floresans ışım yayarak (Şekil 2.7,  $\lambda_3$  ışınları) temel hale geçmesi olayına *iç geçiş* denir. Daha önce de söylendiği gibi kinin sülfat molekülü ister 250 nm'lik bir ışınla, isterse 350 nm'lik bir ışınla uyarılsın, yaydığı floresan ışının dalga boyu daima 450 nm dir. Bir iç geçişin olabilmesi için, bir molekülde bulunan  $S_3$  uyarılma halinin titreşim enerji seviyeleriyle,  $S_2$  uyarılma halinin titreşim enerji seviyelerinin, keza  $S_2$  uyarılma halinin titreşim enerji seviyeleriyle,  $S_1$  uyarılma halinin titreşim enerji seviyelerinin, hiç değilse bir kaç enerji seviyesinde çakışması gerekir. Bu şartları yerine getiren bir maddenin iki molekülü çarpıştığı zaman,  $S_3$  halinin alt titreşim enerji seviyelerinin birinde bulunan bir molekül, enerjini  $S_2$  halinin üst titreşim enerji seviyelerinde bulunan bir moleküle aktarır.  $S_2$  halin, üst titreşim enerji seviyelerinde olan bu molekül titreşim yoluyla enerji yaparak,  $S_1$  halinin üst titreşim enerji seviyelerinden birine geçer. Buradan da titreşim enerjisi yayarak en düşük enerjili  $S_1$  halinin elektronik geçiş seviyesine, oradan da floresan ışın yayarak temel hale gelir (Şekil 2.7,  $\lambda_3$  ışınları).

$S_3$  haline uyarıldığı halde bir molekülün  $S_1$  halinden floresan ışın yaymasının nedeni, elektronik geçişlerin titreşim geçişlerine göre çok daha uzun sürede, elektronik geçişlerin  $10^{-7}$ - $10^{-9}$  saniyede, titreşim geçişlerininse  $10^{-13}$ - $10^{-14}$  saniyede gerçekleşmeleridir.

Ancak, yukarıda verilen uyarılma şartlarını yerine getiren moleküllerin sayısı oldukça sınırlı olduğundan, floresan ışın yayan moleküllerin sayısı da sınırlıdır.

Bunlardan başka, *bir molekülün floresan ışın yayması için, temel halinin ( $S_0$ ) üst titreşim, enerji seviyesinin,  $S_1$  halinin elektronik enerji seviyesinden çok düşük olması gerekir*. Aksi halde molekül titreşim yoluyla enerji yayar ve ışın yaymaksızın temel hale gelir. *Alifatik moleküllerde temel halin üst titreşim seviyeleri,  $S_1$  halinin elektronik seviyesine çok yakın olduğundan bunlarda floresans ışınması nadiren görülür*.

İç geçiş olmasaydı, bir kromofor için dalga boyları bir birinden çok farklı floresan ışınlar elde edilmiş olurdu. Bu da görülen bir durum değildir.

Dissosiyasyon olayı da predissosiyasyon olayından farklıdır ve maddenin floresansını azaltma yönünde cereyan eder. Böyle bir olayda, molekülün bir bağı üzerine düşen çok yüksek enerjili bir ışın bağı bir elektronunu molekülden doğrudan dışarı fırlatır. Bu da bağı kopması anlamına gelir. Maddenin gün ışığında eskimesinde bu olayın büyük etkisinin olduğu zannedilmektedir.

### 3-) Sistemler Arası Çapraz Geçişler

Sistemler arası çapraz geçişlerde, uyarılmış molekülde bulunan bir elektronun spinini değiştirir ve molekül *singlet* halden *triplet* hale geçer. Bu da kısaca şöyle açıklanabilir. Bir molekülün birinci uyarılma halinin elektronik seviyesi, kendisinin uyarılmış fosforesans halinin titreşim seviyelerinden biriyle çakışırsa (aynı enerji seviyesindeyse) uyarılmış molekülün elektronu, spin değiştirerek çapraz olarak bu titreşim seviyesine geçer. Titreşim yoluyla fosforesans halinin elektronik seviyesine gelir ve oradan ışın yayar. Bu söylenenler, gözetlenen olayları açıklamak için düşünülen yollardır. Aksi takdirde bu yolları söylendiği şekilde izlemek mümkün değildir.

Böyle geçişler, iyot, brom, klor, kükürt gibi ağır element ihtiva eden moleküllerde daha çok görülür. Buna *ağır atom etkisi* denir. Bunlarda spin/orbital etkileşmelerinin çok fazla olduğu zannedilmektedir. Örneğin, naftalinin fosforesans etkisi, *halojenli benzen çözücüler* içinde en fazla *iyodobenzende*, en az da *florobenzende* görülür. Ayrıca bir çözeltide bulunan oksijen gibi paramanyetik bir madde de fosforesansı artırır (sistemler arası çapraz geçişleri kolaylaştırır).

#### 4-) Dış Geçiş

Bir molekülün üzerinde bulunan uyarılma enerjisini ortamda bulunan safsızlık moleküllerine aktararak temel hale dönmesine, *dış geçiş* denir. Molekülün uyarılma enerjisini diğer moleküllere aktarması, onlarla çarpışması suretiyle gerçekleşir. Buna göre çarpışma azaltılırsa, dış geçişin azalması ve floresansın (fosforesansın) artması gerekir. Böyle olduğu denel olarak gösterilebilir. Şöyleki, çözelti soğutulduğu (çarpışma azaltıldığı) zaman bir maddenin fosforesansı azalır ve floresansı artar. Bu da çarpışmanın azalması demektir. Çünkü, bunlar bir birine rakip olan iki olaydır. Birinin azalması, ötekinin artması anlamına gelir. Aynı olay floresans madde, daha viskoz çözücülerde çözüldüğü zaman da görülür ve maddenin floresansı artar. En düşük enerjili singlet veya tripletin uyarılmış halden ışın yaymaksızın temel hale geçişleri belki de iç ve dış geçişlerin bir sonucudur, Şekil 2.7 (uzun dalgalı oklar).

#### 2.3.2. Floresans yapan türler

Yüksek enerjili bir ışımının absorplanması sonucu uyarılan bir molekülün türlü mekanizmalarla ışına ile temel hale dönmesine floresans adı verilir. Buna göre, ışına absorplayan tüm moleküller floresans özelliği gösterebilir. Bununla birlikte çoğu moleküller bu davranışı göstermez; çünkü yapıları gereği olarak ışımsız yollarla durulma, floresesans ışımına göre daha büyük hızla olabilir.

Floresans gösteren molekül sayısının toplam uyarılmış molekül sayısına oranı veya salınan foton sayısının absorplanan foton sayısına oranı, moleküler floresansın kuantum verimi olarak adlandırılır. Uyarılmış moleküller titreşim enerjilerini atarak, ışın yayarak en alt elektronik enerji seviyesine geldiklerinde bile, bunların hepsi ışın yaymaz. Ancak belirli bir yüzdesi yayar. Bu yüzdeye *kuvantum verimi* denir. Bazı maddelerin kuvantum verimleri şöyledir:

Flören yaklaşık	%100
Floressein	%85
Kinin sülfat	%55

Kuantum verimi,  $\Phi$  (fi) ile gösterilir ve



$$\phi = \frac{k_f}{k_f + k_{sa} + k_i + k_d}$$

şeklinde ifade edilir.

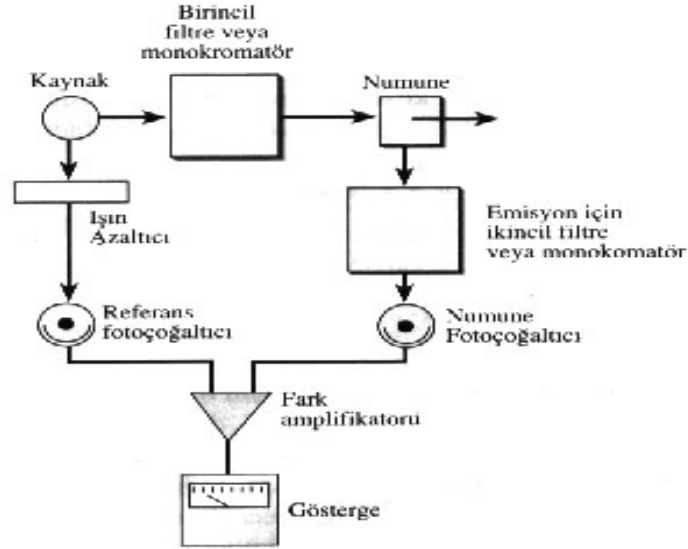
Burada:

- $k_f$ , floresans,
- $k_{sa}$ , sistemler arası çapraz geçiş,
- $k_i$ , iç değişme,
- $k_d$ , dış değişme ve dissosyasyon,

dur. Bunlardan  $k_f$  ve  $k_d$  büyük ölçüde maddenin iç yapısıyla ilgilidir. Bağlantıda geçen  $k$  değerleri her olayın meydana geliş hızını gösterir.

Floresin gibi güçlü floresans yayan moleküller, bazı durumlarda birime yaklaşan kuantum verimliliğine sahiptirler. Floresans olmayan türler, sıfıra yakın verimlilik gösterirler.

#### 2.4. Lüminesans Spektrofotometreleri



Şekil-2.8. Fotoluminesans ölçümleri için kullanılan cihaz.

Ultraviyole (UV) ve görünür bölgede ışık yayan bir ışık kaynağından gelen ışık bir monokromatörden (uyarma monokromatörü) geçtikten sonra örneğe gönderilir.

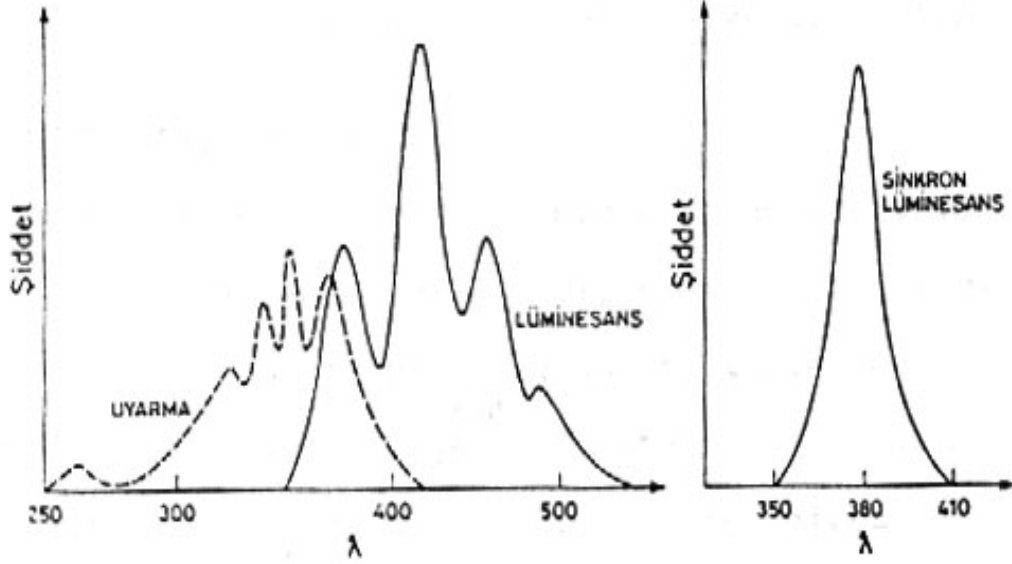
Örnekten kaynaklanan lüminesans genellikle uyaran ışığa göre 90° lik bir açıdan toplanarak dedektöre ulaşır. Böylece örneği uyaran ışığın dedektöre ulaşması önlenir. Lüminesans spektrumunun elde edilmesi için ikinci bir monokromatörün (emisyon monokromatörü) örnek ile dedektör arasına yerleştirilmesi gerekir. Daha basit aletlerle monokromatörler yerine uygun filtreler kullanılır. Filtreli aletlere, kullanıldığı amaca göre florimetre veya fosforimetre, monokromatörlü aletlere ise spektroflorimetre veya spektrofosforimetre adı verilir. Lüminesans ölçümü yapan aletlerin tek kanallısı olduğu gibi, çift kanallı türleri de vardır.

Civa ark lambası hat şeklinde ışık yaydığından çok filtreli aletlerde kullanılır. Ölçümlerin UV bölgesi yerine görünür bölgede yapıldığı durumlarda, tungsten lambası veya çeşitli lazerler de ışık kaynağı olarak kullanılabilir. Fotolüminesans ölçümlerinde kullanılan örnek kapları absorpsiyon ölçümleri için kullanılanların aynısıdır. 320 nm'den daha kısa dalgaboylu emisyon ölçümlerinde pireks kaplar yerine kuartz veya silika kaplar kullanılmalıdır. Fosforesans ölçümleri genellikle sıvı azot sıcaklığında (77 °K) yapıldığından örnek kabı azot içeren bir Dewar kabına yerleştirilir. Kullanılan Dewar kabının uyaran ve yayılan ışığı geçiren pencereleri olması gerekir. Fotolüminesans ölçümlerinde kullanılan dedektör, fotoçoğaltıcı tür dedektördür.

Lüminesansın ölçüldüğü dalgaboyu sabit tutulup, uyarma monokromatöründeki dalgaboyu ayarı değiştirildiğinde, bu lüminesansa yol açan uyarıcı ışığın spektrumu elde edilir. Bu spektruma, uyarma spektrumu adı verilir. Uyarma spektrumu, spektroflorimetre ile elde edilmesine yani yayılan ışığın ölçümüne dayanmasına rağmen, molekülün absorpsiyon spektrumu ile aynı dalgaboyu aralığında elde edilir ve bir bakıma molekülün düzeltilmemiş absorpsiyon spektrumu gibidir.

Uyarma dalgaboyu sabit tutulup emisyon monokromatöründeki dalgaboyu ayarı değiştirilirse, örnek için lüminesans spektrumu elde edilir. Lüminesans spektrumu, uyarma spektrumundan daha uzun dalgaboyu bölgesindedir. Hem uyarma hem de emisyon monokromatöründeki dalgaboyu ayarları aralarında belli bir dalgaboyu farkı,  $\Delta\lambda$ , uygulanarak ve aynı hızda birlikte değiştirilerek lüminesans ölçümü yapılabilir. Bu tür spektrum elde etme yöntemine senkron spektroflorimetri

yöntemi denir ve bu yöntem özellikle birden fazla floresent madde içeren karışımların nicel analizinde kullanılır.



**Şekil-2.9.** Antrasenin uyarma, lüminesans ve senkron lüminesans spektrumları

Özellikle fosforesans ölçümlerinde birden fazla bileşenin birarada nicel analizini gerçekleştirebilecek bir başka yöntem de ışık kaynağı belli bir süre kapatıp fosforesans şiddetini zamanla azalmasını ölçmektir. Işık kaynağının önüne bir ışık bölücü konarak veya ışığı örneğe pulslar halinde gönderip lüminesansı pulstan belli bir süre sonra ölçerek fosforesansın zamanla değişimi incelenebilir. İkili bir fosforesant karışımında bileşenlerden birinin fosforesansı daha çabuk sönüyorsa, fosforesans kısa sürelerde her iki bileşenden, uzun sürelerde ise sadece bir bileşenden kaynaklanır.

Fotolüminesans ölçümlerinden önce, uyarma ve emisyon spektrumu ve lüminesans kuantum verimi bilinen bir madde ile (örneğin kinin sülfat çözeltisi) ölçüm yapılarak, aletin kalibre edilmesi gerekir.

Görünür bölge ve mor ötesinde lüminesans gösterdiği bilinen yaklaşık 3000 organik bileşik için kabaca tayin alt sınırı 1 ppm olarak verilmektedir.

## 2.5. Floresansı Etkileyen Faktörler

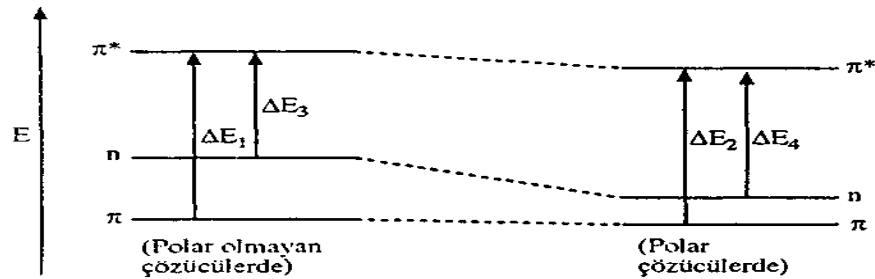
### 2.5.1. Elektronik Geçişlere Çevre Etkisi

Elektronik geçişler üzerine çevrenin etkisi, çözücü ve sterik olmak üzere ikiye ayrılır.

#### 2.5.1.1. Çözücü Etkisi

Çözücünün polarlığının artmasıyla  $\pi \rightarrow \pi^*$  geçişi uzun dalga boyunu kayar. Bu kayma, şöyle açıklanabilir. Çözücünün dipol momenti çözünen madde üzerinde etkiyle bir dipol moment meydana getirir.  $\pi$  orbitalinin oldukça az polarizlenen bir orbital olmasına karşılık,  $\pi^*$  orbitali dağınmış kolay polarizlenen veya etkilenen bir orbitaldir ve enerji seviyesi daha çok düşer (sağlamlaşır). Ancak, polar çözücülerden en çok etkilenen  $\pi^*$  orbitali olur, Şekil-2.10. Bunun sonucu  $\pi \rightarrow \pi^*$  geçişinin enerjisi düşer ve bu geçişin absorpsiyonu daha uzun dalga boylarına kayar (batokromik etki veya kırmızıya kayma). Absorpsiyonun bu şekilde daha uzun dalga boylarına kayması, genellikle azdır. Bu kayma polarbğm azalmasıyla daha da azalır. Çözücünün polarlığının etkisi esas  $n \rightarrow \pi^*$  geçişi üzerinde görülür.

Çünkü  $n$  orbitali çözücülerden  $\pi^*$  orbitalinden daha çok etkilenir ve enerji seviyesi düşer. Böylece  $n \rightarrow \pi^*$  geçişi (buhar fazı absorpsiyonlarına göre) daha kısa dalga boylarına kayar (maviye kayma). Örneğin, aseton buhar fazında 277 nm de su fazında 264 nm'de, kloroform fazında ise 277 nm'de absorpsiyon yapar. Kayma, hidroksilli çözücülerde hidrojen bağları nedeniyle daha da belirgin hale gelir. Üzerinde  $n$  orbitali bulunan atomlar oksijen, halojenler, azot gibi elektronegativiteleri yüksek olan elementlerdir.

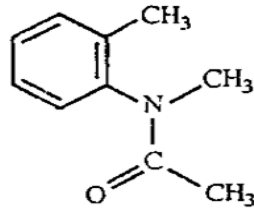


Şekil -2.10. Polar çözücülerin ve ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ) geçişlerini etkilemeleri

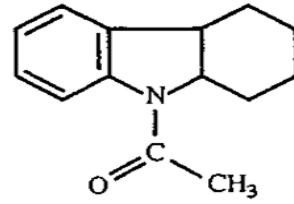
$\Delta E_1 > \Delta E_2$  ve  $\Delta E_4 > \Delta E_3$  meydana gelmiyorsa, bu defa kuvvetli dipol-dipol etkileşmeleri olur. Bu da gene n orbitalinin enerjisini  $\pi^*$  orbitalininkine göre daha çok düşürür ve absorpsiyon dalga boyu daha küçük dalga boylarında görülür. ( $\Delta E_4 > \Delta E_3$ )

### 2.5.1.2. Sterik Etki

Bazı maddelerin spektrumlarının beklenenden farklı olduğu görülür. Buna N-metil-N-aseto-o-toluidinle N-asetil-heksahidrokarbazol örnek verilebilir. Bunların spektrumlarının çok benzer olması beklenirken, bunun aksi gözlenmiştir. N-asetil-heksahidrokarbazol 257 nm ( $\epsilon=16000$ ), 281 nm ( $\epsilon=3400$ ) ve 290 nm ( $\epsilon=4200$ ) dalga boylarında absorpsiyon yaparken, N-metil-N-aseto-o-toluidin sadece 300 nm'de ( $\epsilon=300$ ) absorpsiyon yapar.



N-metil-N-aseto-o-toluidin



N-asetilheksahidrokarbazol

Hem maddenin çevresi, hem de yapısı floresans özelliğini (floresans verimi, emisyon dalga boyu ve ısın şiddetini) büyük ölçüde etkiler. Bunlardan başlıcaları şöyledir:

- 1- Maddenin yapısının etkisi,
- 2- Sıcaklık ve çözelti etkisi
- 3- pH etkisi,
- 4- Çözünmüş oksijen etkisi,
- 5- Gelen ışının dalga boyunun ve şiddetinin etkisi,
- 6- Konsantrasyonun etkisi.

### 2.5.1.2.1. Maddenin yapısının etkisi

Moleküllerde düzlemsellik, dönmenin engellenmiş olması, konjugasyon ve halka sayısının artması genellikle floresans verimini artırır. Halkalı bir Organik molekülde halkanın elektron yoğunluğunu arttıran sübstitüentler molekülün floresans veriminin artmasını sağlar.

Floresans verimine sübstitüentlerin etkisini benzen halkası ve benzer halkasına bağlanan bazı sübstitüentler üzerinde incelenecek olursa, benzen halkasının sübstitüsyona uğradığı zaman hem absorpsiyon, hem de floresans bandında bir değişimin olduğu ve floresans şiddetinin de çoğu kez değiştiği görülür, Buna bazı örnekler Tablo 2.1'de verilmiştir.

Lüminesent bir bileşikteki, bileşiğin pi ( $\pi$ ) elektronlarını delokalize edebilen sübstitüentler genellikle, uyarılmış singlet hal ve temel hal arasında oluşan muhtemel bir ışık geçişini artırır. Bu sonuç floresansı da artırır. Genellikle orto-para-pozisyonundaki sübstitüentler halkaya elektron verirler ve muhtemelen oluşacak floresansı arttırırlar. Meta-pozisyonundaki; sübstitüentler halkadan elektron çekerler ve muhtemel floresansı azaltırlar. Aromatik bileşiklerin floresansına bilinen bazı sübstitüentlerin etkileri Tablo 2.1' de verilmiştir.

**Tablo-2.1.** Emisyon dalgaboyu ve floresans ışın şiddetine birkaç sübstitüentin etkilerinin listesi.

Sübstitüent	Dalga Boyuna Etkisi	Işın şiddetine etkisi
Alkil	Etkilenmez	Önemsiz ölçüde artar
COOH,CHO	Artar	Azalı
COOR,CRO	Artar	Azalı
OH,OMe,OEt	Etkilenmez	Artar
CN	Artar	Artar
NH <sub>2</sub> ,NHR,NR <sub>2</sub>	Büyük ölçüde artar	Büyük ölçüde artar veya tam söndürme (quenching)
NO <sub>2</sub> ,NO	Artar	Azalı
SH	Etkilenmez	Etkilenmez
SO <sub>3</sub> H, F,Cl,Br,I	Artar	Azalı

Molekül yapısının floresansa etkisi;

- Çift bağ konjügasyonunun geniş bir şekilde delokalize olmasına,
- Molekülün rijitliğine, düzlemsel olmasına ve
- Bağlı bulunan süstitüentlere bağlıdır.

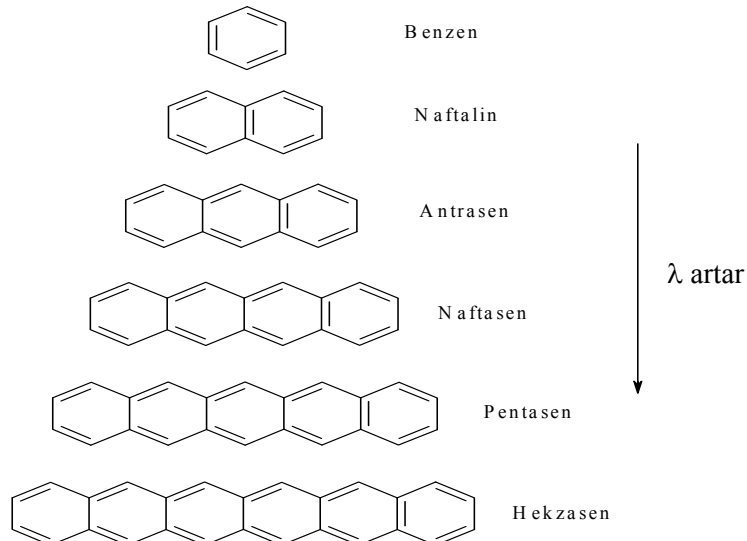
#### a) Konjügasyon etkisi

Konjügasyona hem aromatik hem de alifatik bileşiklerde rastlanır. Bu iki bileşik türü karşılaştırıldığı zaman; aromatik konjügasyonda  $\pi$  elektronları delokalize durumda, alifatik konjügasyonda ise lokalize durumda olduğu görülür. Yani  $\pi$  elektronları aromatik bileşiklerde düşük bir enerjiyle uyarılabilirken alifatik bileşiklerde molekül yapısını bozmadan uyarılabilecek kadar gevşek bağlı değildirler.

Ancak alifatik karbonil bileşikleri floresans kuantum verimini çok düşük olacak şekilde bir floresans yapabilirler. Çünkü karbonil oksijeni üzerindeki bağ yapmamış elektron çifti  $\pi^*$  orbitaline düşük bir enerji ile uyarılabilir.

Yukarıda belirtildiği gibi aromatik bileşiklerde konjüge durumdaki çift bağların  $\pi$  elektronları delokalize durumdadır. Halka sayısı arttıkça delokalizasyon da artar. Bunun sonucu olarak da halka sayısı arttıkça floresans şiddeti artar.

Benzende floresans yüksek enerjili fotonlarla gerçekleştirilirken pentasende düşük enerjili fotonlarla olmaktadır. Benzendeki floresans daha yüksek enerjili olan UV bölgede olurken, pentasendeki floresans görünür bölgede olur.

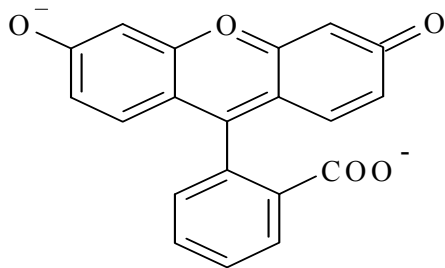


## b) Molekölün rijitliğinin ve düzlemselliğinin etkisi

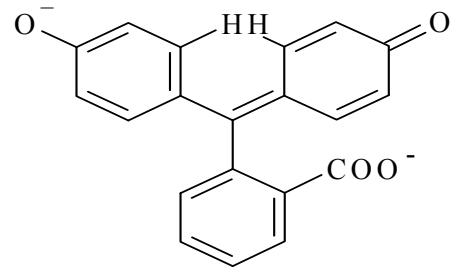
Yapısal rijiditenin etkisi: Bir molekülün yapısının rijid (Sabit, hareketsiz) olması onun floresans özelliğini arttırır, örneğin, flörenin floresans bifenilden 5 defa daha şiddetlidir. Rijitlik, molekülün esnek olmama özelliği olarak ifade edilebilir. Rijit bir molekül üzerine düşen fotonun enerjisi titreşim enerjisine dönüştürülemez ve geriye yansıtılır. Bu sert ve parlak bir metal blok üzerine düşürülen ışığın geriye yansımaya benzetilebilir.

Rijid olmayan molekülde iç dönüşme daha kolay olduğundan, ışınlanmasız enerji kaybı olasılığı çok daha fazladır. Bu hal, bilindiği gibi floresans şiddetini azaltır. Bundan başka rijid olmayan bir molekülün bir tarafı, Öteki tarafına göre daha zayıf enerjiyle uyarılmış olabilir. Bu da floresans emisyonunu azaltan bir etkidir. Yapabilen molekülde çözülmüş oksijen ile molekülün yaydığı ışığı absorplayabilecek bir başka madde, lüminesans verimini önemli ölçüde azaltır. Özellikle fosforesans çalışmalarında çözülmüş oksijenin ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Çözülmüş oksijen genellikle floresans ışımalarının şiddetini azaltır. Moleküler oksijen paramagnetik olduğundan, singlet halin triplet hale dönüşmesini kolaylaştırıp floresansı azaltır teki paramagnetik maddeler de benzer şekilde davranırlar.

Örnek olarak, yapıları birbirine çok benzeyen floressein ve fenolftalein molekülünü ele alalım. Floresseinin alkol-su karışımındaki çözeltisi çok kuvvetli floresans olduğu halde, fenolftaleinin çözeltisi floresans özellik göstermez.



Fluoressein

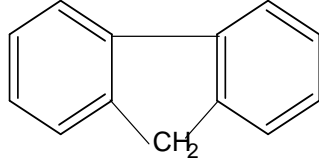


Fenolftalein

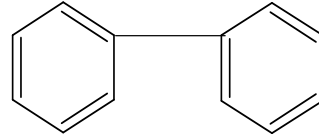


Floressein molekülü rijit bir yapıya sahip olduğu halde fenolftalein molekülü rijit değildir. Bu nedenle fenolftalein uyarıldığı zaman temel hale, ışmasız olarak dönüş söz konusudur

Florenin floresansı bifenilden 5 defa daha şiddetlidir.



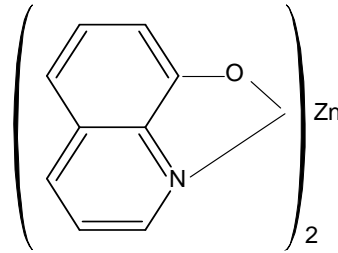
Floren



Bifenil

Floresans özelliği gösteren boya bir yüzeyde adsorbe edilince emisyon şiddeti daha da artar. Bunun nedeni boyanın tutulduğu yüzeyde rijiditesinin artmasıdır.

Şelat kompleksi veren bir ligand bir katyonla kompleks verdiği zaman rijiditesi artar ve dolayısıyla floresans emisyonu artar. Örneğin, çinko katyonuyla 8-hidroksikinolinin verdiği kompleks şiddetli floresanstır.



#### d) Moleküldeki süstitüentlerin etkisi

Lüminesent bir bileşikteki, bileşğin pi ( $\pi$ ) elektronlarını delokalize edebilen süstitüentler genellikle, uyarılmış singlet hal ve temel hal arasında oluşan muhtemel bir ışık geçişini artırır. Bu sonuç floresansı da artırır. Genellikle orto- ve para-pozisyonundaki süstitüentler halkaya elektron verirler ve muhtemelen oluşacak floresansı arttırırlar. Meta-pozisyonundaki süstitüentler halkadan elektron çekerler ve muhtemel floresansı azaltırlar. Halkalı bir organik molekülde halkanın elektron yoğunluğunu arttıran süstitüentler de molekülün floresans veriminin artmasını sağlar.

Molekülün bünyesinde veya molekülün çözündüğü çözücüde bulunan ağır bir atom (I veya Br gibi) molekülün floresans verimini azaltır, triplet oluşumu verimini artırır ve bu nedenle genellikle fosforesans verimi artar.  $-\text{NO}_2$  gibi  $\pi$  elektronunu delokalize eden (gevşeten) süstitüentler, floresansı ya azaltırlar ya da tamamen yok ederler. Örneğin, benzen UV bölgede floresans yapar. Bu moleküle ( $-\text{NH}_2$ ) grubu süstitüe edilirse floresansı artar ve yüksek dalga boyuna kayar. ( $-\text{NO}_2$ ) ile süstitüe edilirse floresans özelliği tamamen kaybolur. Bunun nedeni, anilinde ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{-NH}_2$ ) bağ yapmamış elektron çifti bulunması, nitrobenzende ( $\text{C}_6\text{H}_5\text{-NO}_2$ ) bu halin görülmemesidir.

Bağ yapmamış elektron çiftleri düşük enerjili ışık fotonlarıyla molekül yapısını bozmadan bir üst enerji seviyesine uyarılabilirler.

**Tablo-2.2.** Benzenin floresans dalga boyu ve ışın şiddetine bazı süstitüentlerin etkisi.

Bileşik	Formül	Floresans Dalga Boyu, nm	Floresansın Bağlı Şiddeti
Benzen	$\text{C}_6\text{H}_6$	270-310	10
Toluen	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CH}_3$	270-320	17
Propilbenzen	$\text{C}_6\text{H}_5\text{C}_3\text{H}_7$	270-320	17
Florobenzen	$\text{C}_6\text{H}_5\text{F}$	270-320	10
Klorobenzen	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Cl}$	275-345	7
Bromobenzen	$\text{C}_6\text{H}_5\text{Br}$	290-380	5
İyodobenzen	$\text{C}_6\text{H}_5\text{I}$	-	0
Fenol	$\text{C}_6\text{H}_5\text{OH}$	285-365	18
Fenolat iyonu	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}^-$	310-400	10
Anisol	$\text{C}_6\text{H}_5\text{OCH}_3$	285-345	20
Anilin	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_2$	310-405	20
Anilinyum iyonu	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NH}_3^+$	-	0
Benzoik asit	$\text{C}_6\text{H}_5\text{COOH}$	310-390	3
Benzonitril	$\text{C}_6\text{H}_5\text{CN}$	280-360	20
Nitrobenzen	$\text{C}_6\text{H}_5\text{NO}_2$	-	0

### 2.5.1.2.2. Sıcaklık ve çözücünün etkisi

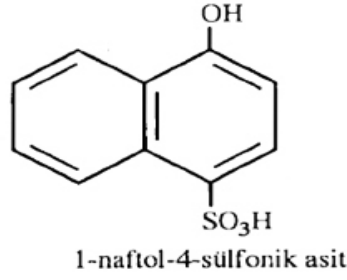
Uyarılmış molekül, temel haline oranla daha polar ise, çözücünün polaritesinin artması ile uyarılmış enerji düzeyi daha kararlı hale geleceği için, uyarılmış ve temel enerji düzeyleri arasındaki enerji farkı azalır ve floresans dalga boyu artar. Bu durum, uyarılma ve emisyon olaylarının  $\pi$  ve  $\pi^*$  orbitalleri arasında gerçekleştiğinde ortaya çıkar.  $n \rightarrow \pi^*$  türü bir uyarılma için ise, çözücünün polaritesinin artması ile  $n$  orbitalinin daha kararlı hale gelmesi, yani enerjisinin azalması söz konusudur. Böylece, bu tür moleküllerde çözücü polaritesi arttıkça uyarılmış ve temel enerji düzeyleri arasındaki enerji farkı artar ve floresans dalga boyu azalır.

Sıcaklığın artması ile uyarılmış moleküllerin çarpışma olasılığı da artacağından iç dönüşüm olayının verimi artar ve floresans verimi azalır. E-türü gecikmiş floresansın gözlemlendiği sistemlerde sıcaklığın artması ile iç dönüşüm olayını çok daha verimli hale getirir. Fosforesans verimi, sıcaklık azalması ile önemli ölçüde artar.

### 2.5.1.2.3. pH etkisi

Proton aktarımı tepkimeleri çok hızlı tepkimeler olduğundan proton aktarımının temel durumdaki moleküllerde olduğu gibi, uyarılmış moleküllerle de gerçekleşme olasılığı çok yüksektir. Ortamın pH'sındaki değişimler, hem temel hem de uyarılmış molekülleri etkileyeceği için pH, bir molekülün floresans verimini etkileyen bir faktör olabilir. Asit veya baz grubu içeren maddelerin iyonlaşmış ve iyonlaşmamış hallerinin floresans ışımalarının dalga boyları ve şiddetleri birbirlerinden farklıdır.

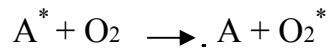
Bazı maddeler, floresansın pH'a bağımlılığından yararlanılarak tayin edilebilir. Örneğin, 1-naftol-4-sülfonik asidin fenolik halinin (sadece sülfonik asit grubundaki protonun verilmiş hali) floresansı, ultraviyole bölgesinde olduğundan gözle görülemez. Buna karşılık fenolat halinin (fenol protonu da verilmiş) floresansı gözle görülebilir. Bu özelliğinden yararlanılarak madde ayarlı bir hazla titre edilebilir. Bazla maddenin sülfonik asit grubunun titrasyonu sona erip de fenol grubu titre edilmeye başlanınca, floresans görülür ve bu anda titrasyona son verilir. Bu titrasyonun dönüm noktasıdır. Ancak, bu şekilde bulunan dönüm



noktasının pH'sı, maddenin asitlik sabitinden hesaplanandan farklıdır. Bunun nedeni *maddenin uyarılmış halinin asitlik sabitinin temel halinin asitlik sabitinden farklı olmasıdır*. Maddelerin uyarılmış hallerinin asit ve baz sabitleriyle uyarılmamış hallerinin asit ve hız sabitleri arasında büyüklük bakımından 4-5 mertebesinde (104-105 katı) farklılıklar görülür. Bu nedenle floresanstan analitik amaçlarla yararlanmak gerekiyorsa, çok iyi pH ayarlaması yapmak gerekir.

#### 2.5.1.2.4. Çözünmüş oksijen etkisi

Çözücü ile hidrojen bağı yapabilen moleküllerde çözünmüş oksijen ile molekülün yaydığı ışığı absorplayabilecek bir başka madde, lüminesans verimini önemli ölçüde azaltır. Özellikle fosforesans çalışmalarında çözünmüş oksijenin ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. Çözünmüş oksijen genellikle floresans ışımalarının şiddetini azaltır. Moleküler oksijen paramagnetik olduğundan, singlet halin triplet hale dönüşmesini kolaylaştırıp floresansı azaltır. Öteki paramagnetik maddeler de benzer şekilde davranırlar.



#### 2.5.1.2.5. Gelen ışığın dalga boyunun ve şiddetinin etkisi

Lüminesans verimi, sadece iç dönüşüm, sistemler arası geçiş ve enerji aktarımı gibi fiziksel olaylarla değil, uyarılmış düzeylerde ortaya çıkabilecek bağ kopması (fotodissosyasyon) ve ürün oluşması (fotokimyasal tepkime) gibi olaylar yüzünden de azalabilir. Ayrıca gelen ışımın şiddetinin (yoğunluğunun) artması floresansı artırır.

### 2.5.1.2.6. Konsantrasyonun etkisi

Floresans radyasyonunun şiddeti, maddenin konsantrasyonu ile orantılıdır. Floresans, konsantrasyon arttıkça artar, ancak belli bir noktada konsantrasyon çok fazla arttırıldığında artık konsantrasyonla orantılı olarak artmaz ve hemen hemen sabit kalır.

## 2.6. Fotolüminesans Teorisi

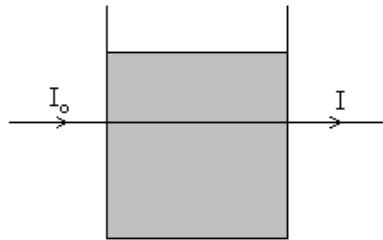
Fotolüminesans boyunca yayılan radyasyonun miktarı, absorblanan radyasyonun (ışığın) miktarına bağlıdır. Mümkün olan uyarılmış bir molekül radyasyonsuz bir enerji kaybıyla temel enerji düzeyine geri döndüğü için, yayılan radyasyonun fotonlarının sayısı genellikle absorblanan radyasyonun fotonlarının sayısından daha az olur. Kuantum ürünü, kuantum verimini veya lüminesans verimini  $\Phi$ , absorblanan fotonların sayısının yayılan fotonların sayısına oranı olarak verilebilir. Kuantum verimini, floresansın normal formları boyunca biri geçmemelidir. Belirlenen deney şartlarında belli bir maddenin kuantum verimi sabittir. Yayılan radyasyonun ışık şiddeti  $F$ , kuantum veriminin ve absorblanan radyasyonun şiddeti cinsinden şöyle yazılabilir.

$$F = \Phi(I_0 - I) \quad (1)$$

Absorblanan radyasyonun ışık şiddeti  $I_a$ , gelen uyarıcı radyasyonun (ışığın)  $I_0$  ve geçen radyasyonun (ışığın)  $I$  arasındaki farka eşittir. Buradan,

$$I_a = I_0 - I \quad (2)$$

elde edilir.



Geçen ışığın (radyasyonun) şiddeti Beer yasasından hesaplanabilir.

$$A = \epsilon l C = - \log \frac{I}{I_0} \quad (3)$$

Burada,

$\varepsilon$  : Maddenin molar absorblanma katsayısı

$C$  : Çözültideki çözünen maddenin molar konsantrasyonu

$l$ : optik ışık yolu

Geçen ışık şiddetine göre Beer yasasının çözümü verilirse:

$$I = I_o 10^{-\varepsilon l C} = I_o e^{-2,303 \varepsilon l C} \quad (4)$$

Eşitlik 1' de  $I$  yerine yukarıdaki eşitlikteki değeri yazılırsa

$$F = \phi [I_o - I e^{-2,303 \varepsilon l C}] \quad (5)$$

şeklini alır.

Yukarıdaki eşitlikteki üstel ifadeler sonsuz seriler şeklinde yazılırsa;

$$e^x = 1 + X + \frac{X^2}{2!} + \frac{X^3}{3!} + \dots + \frac{X^n}{n!} \quad (6)$$

Eşitlik (5)' deki üstel ifadeler yerine seriler konursa şu denklem ortaya çıkar:

$$F = \phi I_o \left[ 1 - 1 + 2,303 \varepsilon l C - \frac{2,303 \varepsilon l C}{2} + \frac{2,303 \varepsilon l C}{6} - \dots \right] \quad (7)$$

$$F = \phi I_o \left[ 2,303 \varepsilon l C - \frac{2,303 \varepsilon l C}{2} + \frac{2,303 \varepsilon l C}{6} - \dots \right] \quad (8)$$

Seyreltik çözültüler için absorbands ( $\varepsilon l C$ ) küçüktür. ( $\varepsilon l C$ ), 0,05 e eşitse Eşitlik 2.25 deki serilerin ikinci terimi, birinci terimin % 2,5'u kadardır ve bunu takip eden terimler daha küçük veya eşittir. Analitin konsantrasyonu sabit alınmak suretiyle absorbands 0,05'den küçük tutulursa birinci terim hariç serilerdeki terimlerin tümü, ihmal edilir ve Eşitlik (8) şu şekilde basitleştirilir.

$$F = \phi I_o 2,303 \varepsilon l C \quad (9)$$

Eşitlik (9)' dan görüldüğü gibi seyreltik çözeltiler için ( $10^{-8}$ – $10^{-5}$ M) yayılan fotoluminesansın şiddeti kuantum verimi, gelen veya absorblanan ışığın şiddeti ve analitin konsantrasyonu ile orantılıdır. Çoğu laboratuvar cihazlarında yalnızca dedektöre gelen toplam lüminesansın sabit bir kesri,  $f$ , ölçülür ve bu denkleme, dedektörün cevabı için de bir değerin “R” ilave edilmesi gerekir. Bu iki faktörün ilavesi ile Eşitlik (9) şöyle verilir:

$$F = 2,303 fR \phi I_0 \epsilon l C \quad (10)$$

Belirli bir analit, hücre ve cihaz için sabitlerin bileşimi, basitçe şu eşitlikle verilir:

$$F = KI_0 C \quad (11)$$

Veya eşitlik (11)'de  $I_0$  da sabit yapılırsa, C'den başka hepsi sabit olacağından tümü K' sabitiyle gösterilebilir. Sonuç olarak, floresans ışın şiddetiyle konsantrasyon arasında:

$$F = K' C$$

bağıntısı kurulur. K' sabiti konsantrasyonu düşük ve belli bir takım çözeltilerin F floresansı ölçmek suratiyle hesaplanır. Absorbansı küçük ( $A < 0.05$ ) çözeltilerde floresans şiddeti konsantrasyonla doğru orantılıdır ve doğrunun eğimi K' yı verir. Ama konsantrasyon arttıkça doğru sağa doğru bir bükülme olur.

Yani floresans konsantrasyonla orantılı olarak artmaz. Bunun nedeni:

- 1) Self-söndürme ve
- 2) Self absorpsiyondur.

**Self-söndürme**, floresant moleküllerin birbirlerine çarparak enerjilerini birbirlerinin enerjice daha düşük olan taraflarına aktarmaları ve böylece radyasyonsuz bir enerji kaybı olmasıdır. Bu floresant taneciklerle çözücü molekülleri arasında meydana gelen dış dönüşmeye benzer. Bu olay konsantrasyonun artmasıyla artar.

**Self-absorpsiyon**, fuloresant moleküllerin yaydıkları ışının dalga boyu, bu moleküllerin absorbladıkları ışının dalga boyunun aynıysa, floresant bir molekülün yaydığı ışın çözelti içinden geçerken öteki floresant moleküller tarafından absorplanır.

Absorbans yaklaşık 0,05'den çok daha büyük olduğunda Eşitlik (8) deki parantez içerisinde olan ilk terim dışındaki terimler bir anlam taşır ve lüminesans şiddeti ile konsantrasyon arasında doğrusal (lineer) olmayan bir bağıntı söz konusudur. Absorbans çok büyük olduğu zaman Eşitlik (8) basit bir şekilde

$$F = \phi I_0 \quad (12)$$

ile verilir. Ve lüminesans şiddeti böyle konsantrasyondan bağımsız olmaktadır. Eşitlik (12)'nin esası, gelen ışın şiddetinin hücrenin her yerinde aynı olduğunu kabul eder.

Seyreltik çözeltiler için bu kabul uygundur, ancak yüksek konsantrasyonlarda absorpsiyon (absorbans 2'den daha büyük) hücrenin içerisinden geçen ışığın şiddetini büyük ölçüde azaltır ve gözlenen lüminesans da bir azalmaya sebep olur.

Sonuç olarak seyreltik çözeltilerde nicel analiz, kalibrasyon eğrisi oluşturularak veya standart ekleme yöntemine göre gerçekleştirilir. Çözeltide bulunan bir madde, lüminesant bir maddenin yaydığı ışığı söndürüyor yani azaltıyorsa, lüminesansı önleyen bu maddenin de nicel analizi yapılabilir. Lüminesanstaki azalma, genellikle, bu önleyici maddenin miktarı ile doğru orantılıdır. Burada da, lüminesans şiddetinin azalmasının lüminesansı önleyici madde derişimine karşı ölçülmesi ile bir kalibrasyon eğrisi çıkarılabilir veya standart ekleme yönteminden yararlanılabilir.

## 2.7. Florimetri ve Uygulama Alanları

Florimetri, çok düşük konsantrasyonlardaki numunelerin tayinine olanak sağladığı için besin endüstrisinde, farmakolojide, klinik numunelerde, biyokimyasal bileşiklerin analizinde, hava ve çevre kirliliği tayinlerinde, tarım kimyasında ve pekçok organik ve inorganik bileşiğin analizinde tercih edilen bir enstrümental metottur. Bütün bu uygulama alanları ve florimetrik olarak tayin edilen bazı maddeler Tablo-2.3'de verilmiştir



Tablo-2.3. Florimetrimin Bazı Uygulama Alanları

KULLANIM ALANI	ANALİT TÜRÜ	ÖRNEKLER
İnorganik bileşiklerin analizi	Anyonlar	Siyanür, florür, sülfat, iyodür, bromür, klorür, nitrat, fosfat
	Katyonlar	Alüminyum, arsenik, berilyum, bor, kadmiyum, seryum, kalsiyum, galyum, demir, lityum, magnezyum, nadir toprak elementleri, selenyum, kalay, tungsten, silisyum, çinko, zirkonyum
Organik bileşiklerin analizi	Aromatik Hidrokarbonlar	Benzen, toluen, <i>o</i> -, <i>m</i> -, <i>p</i> -ksilenler, mesitilen, fenol, krezol, <i>o</i> -, <i>m</i> -, <i>p</i> -hidrobenzoik asitler, anilin, <i>o</i> -, <i>m</i> -, <i>p</i> -anisidinler, bifenil, benzenil, difenilamin, bibenziletillen, difenilmetan, floren, naftalen, antrasen, fenantren ve benzeri halkalı bileşikler
	Heterosiklik bileşikler	Piridin, pirol, diazin, piron, kinolin, akridin, karbazol, alloksazin, lumazin, kumarin ve benzerleri
	Organik boyalar	Fluoran, floresein, eosin, eritrosin, rodamin-B, akridin, reomin-A, magdala kırmızısı, safranin, tionin, metilen mavisi
	Asit, alkol, aldehit ve ketonlar	Etandikarbosilik asit, antranilik asit, umbelliferon-4-karbosilik asit, 1,3-dihidroksibenzen (rezorsinol), 1,2-diformilbenzen (ftalaldehit), 3,5-diasetil-1, 4-dihidroksi-2, 6-lutidin, 2-difenilasetil-1, 3-indandion-1-monohidrazon
Tarım kimyası	İnorganik tarımsal bileşikler	Selenyum, magnezyum, bor florürler, alüminyum ve kalay bileşikleri
	Organik tarımsal bileşikler	İnsektisit ve pestisitler
	Tabii ürünler	Klorofiller, pigmentler
	Vitaminler	A <sub>1</sub> , B <sub>1</sub> , B <sub>2</sub> , B <sub>6</sub> , C, D ve E
	Proteinler	Süt proteinleri (kazein, laktik asit)
Sağlık hizmeti sektörü ve çevre kimyası	Çevre kirliliği yapan bileşikler	İnsektisit kirlilik ürünleri, su ve hava kirlilik ürünleri (azot bileşikleri, sülfür bileşikleri, ozon ve bazı kanserojen aromatik hidrokarbonlar
	Zehirli metal Bileşikleri	Berilyum, bor, kurşun, uranyum, kadmiyum ve bileşikleri

Tablo-2.3. Devamı

KULLANIM ALANI	ANALİT TÜRÜ	ÖRNEKLER
<b>Besin kimyası</b>	Karbonhidratlar	Glukoz, fruktoz, maltoz, laktoz, sellobiyozun rezorsinol ve ksantenon ile türevleri
<b>Farmakoloji</b>	İlaçlar	Barbitüratlar, salisilatlar, aspirinden salisilik asit, indol, prokain penisilin, alkaloidler, LSD (lizerjik asit dietilamid), tetrasiklinler, N-asetil sistein
<b>Bakteriyoloji</b>	Bakteri	Çeşitli bakteri teşhis ve sayımları
<b>İmmünoloji</b>	Kan numuneleri	Floresant antikor ve antijenler
<b>Klinik patoloji</b>	Elektrolit	Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> , inorganik sülfat ve fosfatlar
	Steroidler	Kortikosteroidler, östrojen, projesteron, androjen, testosteron, adrenalin
	Lipidler	Lipoproteinler, fosfolipitler, kolesterol, trigliseritler
	Plazma proteinleri, aminoasitler ve metabolitler	Serum albümini, adenin, sistein, guanidin, triptofan, serotonin, fenilalanin, tirozin, katekolaminler, tiramin, 3-OH tiramin, histidin, histamin, kreatinin, arjinin, homovanilik asit, kinurenik asit, folik asit (nikotinamid), kan glikozu, porfirinler, karbositik asitler ve ketonlar, kandaki üre azotu, NH <sub>3</sub> , hippurik asit, hemoglobin demiri, kolesterol, kortizon
	Enzimler	Dehidrojenazlar, transaminaz, fosfataz, lipaz, kreatinkinaz, LDH-izoenzimler, peroksidazlar
	Alkaloidler	Kodein, morfin, papaverin, nikotin

### 3. İYONLAŞMA SABİTİ

İyonlaşma sabiti, bir molekülün iyonlaşma davranışını belirlememizi sağlayan temel parametredir. İyonlaşma sabitlerinin sudaki tayinleri, bileşiğin sudaki çözünürlüğünün az olması durumunda su-organik çözücü ikili karışımlarının kullanılmasını zorunlu kılar. Günümüzde su-organik çözücü karışımları, sıvı kromatografik ve kapiler elektroforetik ayırmalarda kullanılması nedeniyle tercih edilmektedir. Ayrıca bu ortamlarda suyun kendi hidrojen bağlı sistemini oluşturabildiği koşulda pH aynen sudaki gibi belirlenebilmektedir. Bu nedenle suda çözünmesi yeterli olmayan ve su ortamında iyonlaşma sabitleri tayin edilemeyen bileşiklerin bu sabitlerinin tayinlerinde sıklıkla su-organik çözücü ikili karışımları kullanılırlar. İyonlaşma sabitlerinin tayininde;

- Potansiyometrik yöntemler
- Spektroskopik yöntemler
- Sıvı kromatografik yöntemler
- Elektroforetik yöntemler
- Florimetrik yöntemler kullanılmaktadır.

#### 3.1. Spektrofotometrik Yöntemle pKa Tayini

Bilindiği gibi iyonlaşma sabitlerinin tayininde ilk yöntem potansiyometridir. Bu yöntem 3 mM derişimi gerektirir. Bu derişimin sağlanamadığı durumlarda potansiyometrik yöntemden yararlanmak mümkün değildir. Bu durumda sıklıkla spektrofotometrik yöntemden yararlanır.  $10^{-5}$ - $10^{-6}$  M derişim pH etkisinde absorbanstaki farklılığı belirleyebilmemizi sağlar.

Spektroskopik yöntemlerde, moleküler ve iyonik hallerin farklı absorpsiyon özelliklerinden yararlanır. Su-organik çözücü karışımlarında spektroskopik yöntemle iyonlaşma sabiti tayininde önceleri tamponlar kullanılarak elektrot kalibre

edilmekte takiben farklı pH değerlerinde moleküler ve iyonik formların absorbands değerleri kaydedilmektedir.

Günümüzde elektrot standardizasyonu yapılarak işleme başlanmaktadır. Bu tip bir çalışma akış hücreli bir spektrofotometre gerektirir.

Moleküler absorpsiyonun uygulama alanlarından birisi, denge sabitlerinin tayinidir. Bir zayıf asitte iyonlaşan ve iyonlaşmayan türlerin kendilerine özel dalga boylarında absorpsiyon yaptığını biliyoruz. Her iki türün de her bir dalga boyundaki absorbandsa katkı verdikleri bilinmektedir. Bu durumda

$$A = \epsilon_{HA} \cdot I \cdot [HA] + \epsilon_A \cdot I \cdot [A^-]$$

bağıntısı geçerlidir.

Kütle denkleğini ifade edelim ;

$$C = [HA] + [A^-]$$

İlk ifadede HA yerine kütle denkleğinden gelen değerini koyalım;

$$A = \epsilon_{HA} \cdot I \cdot (C - [A^-]) + \epsilon_A \cdot I \cdot [A^-] = \epsilon_{HA} \cdot I \cdot C - \epsilon_{HA} \cdot I \cdot [A^-] + \epsilon_A \cdot I \cdot [A^-]$$

$$A = A_{HA} + I \cdot [A^-] (\epsilon_A - \epsilon_{HA})$$

$$A - A_{HA}$$

$$[A^-] = \frac{A - A_{HA}}{I \cdot (\epsilon_A - \epsilon_{HA})}$$

$$I \cdot (\epsilon_A - \epsilon_{HA})$$

Benzer şekilde hareketle HA için bağıntı türetilir.

$$A_A - A$$

$$[HA] = \frac{A_A - A}{I \cdot (\epsilon_A - \epsilon_{HA})}$$

$$I \cdot (\epsilon_A - \epsilon_{HA})$$

Bu bağıntılar  $K_a$  ifadesinde yerine konularak asitlik sabiti ile ortamın hidronyum derişimi ve absorbandslar arasındaki farktan iyonlaşma sabitine geçilir.

$$A - A_{HA}$$

$$K_a = [H_3O^+] \cdot \frac{A - A_{HA}}{A_A - A}$$

$$A_A - A$$

Spektrofotometrik titrasyonlarda en basit yaklaşım 3 çözelti ile gerçekleştirilir:

- Öncelikle bileşiğin çözeltisi asidik yapılarak  $A^-$  oluşması önlenir. Ölçülen absorbands iyonlaşmamış türle ilgilidir ( $A_{HA}$ ).

- İkinci çözeltilde pH iyice bazik bölgeye getirilir. Bu koşulda ölçülen absorbans iyonlaşmış türle ilgilidir ( $A_A$ ).
- Üçüncü çözeltilde pH ara değerde tutulur. Buradaki absorbansa hem iyonlaşmış hem de iyonlaşmamış türlerin katkısı vardır (A). Yukarıdaki bağıntıda ara pH değerine ait hidronyum derişimi için değerler yerine konarak sabit hesaplanır.

İkinci yaklaşımda bir seri çözeltiler hazırlanır ve farklı pH larda absorbansları ölçülerek aşağıdaki bağıntıya ait veriler oluşturulur.

$$\log \frac{A - A_{HA}}{A_A - A} = \text{pH} - \text{pKa}$$

$\log (A - A_{HA}) / (A_A - A)$  y ekseninde ve pH, x ekseninde kullanılarak hazırlanan doğrusal grafiğin x eksenini kestiği değer, -pKa dır.

Günümüzde ise bu teorik yaklaşım bilgisayar programları ile desteklenerek kullanılmaktadır. Asitlerin pKa değerleri su ortamına organik çözücü ilavesinde artar. pKa değerlerinin büyümesi bir diğer deyimle asitlerin daha zayıf davranması su-organik çözücü karışımlarında dielektrik sabitindeki azalmanın bir sonucudur. Bazlarda ise protonasyon sabitlerinin organik çözücü derişiminden fazla etkilenmediği bilinmektedir.

Elde edilen sonuçların güvenilirliği için 50-150 pH değerinde spektrum taraması yapılır. Sonuçların değerlendirilmesi, bu amaç için hazırlanmış bilgisayar programı ile gerçekleştirilir. Potansiyometriden daha düşük derişimde analit yeterlidir.

Çözücünün absorbansının analitin absorbansını etkilememesi için uygun bir koşul hazırlanır. Spektrum taramasının bazik bölgeyi de kapsayacak genişlikte alınması durumunda ikinci ve üçüncü iyonlaşma sabitlerinin tayinlerine de imkan tanır.

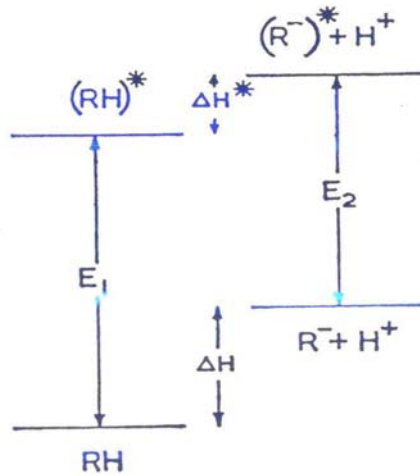
### 3.2. Florimetrik Yöntemle pKa Tayini

Bir molekül, absorpsiyonda 0-0 geçişlerinden hemen sonra daha az enerjiyle biraz dinlenir. Buna karşılık en aşağı enerjiyle uyarılmış hale geçer. 0-0 geçişiyle floresans emisyonundan sonra, hemen aynı relaksasyon oluşur (Polster 1989).

Bu relaksasyonların sonucunda temel durumda kararlı konfigürasyon ve ilk uyarılan durum arasında enerji farklılıkları oluşur. İlk uyarılma halinde enerji absorpsiyon için  $h\nu$ 'den daha az, fakat emisyon için  $h\nu$ 'den daha fazladır.

$$E_s = 1/2(h\nu_{\text{abs}} + h\nu_{\text{em}})$$

Absorpsiyon ve emisyon bantları hiç titreşimsel bir yapı göstermediklerinde, 0-0 geçişlerinin konumunu bulmak mümkün değildir.  $E_s$  için en iyi ölçüm, yukarıdaki eşitliğin  $h\nu_{\text{abs}}$  ve  $h\nu_{\text{em}}$  maksimum spektrumlarından elde edildi.  $E_s$ 'nin kullanılan bu değerlerini gösteren şekildeki enerji diyagramından temel hal ile uyarılmış hal arası enerji geçişlerini bulabiliriz.



**Şekil-3.1.** Asidik ve bazik formun enerji seviyeleri

Örneğin β-naftol gibi bileşiklerde uyarılmış halindeki molar entalpi değeri ( $\Delta H^*$ ), temel haldeki molar entalpi ( $\Delta H$ ) değerinden daha azdır.

Bu durumda ;  $E_1 - E_2 = \Delta H - \Delta H^*$  elde edilir.

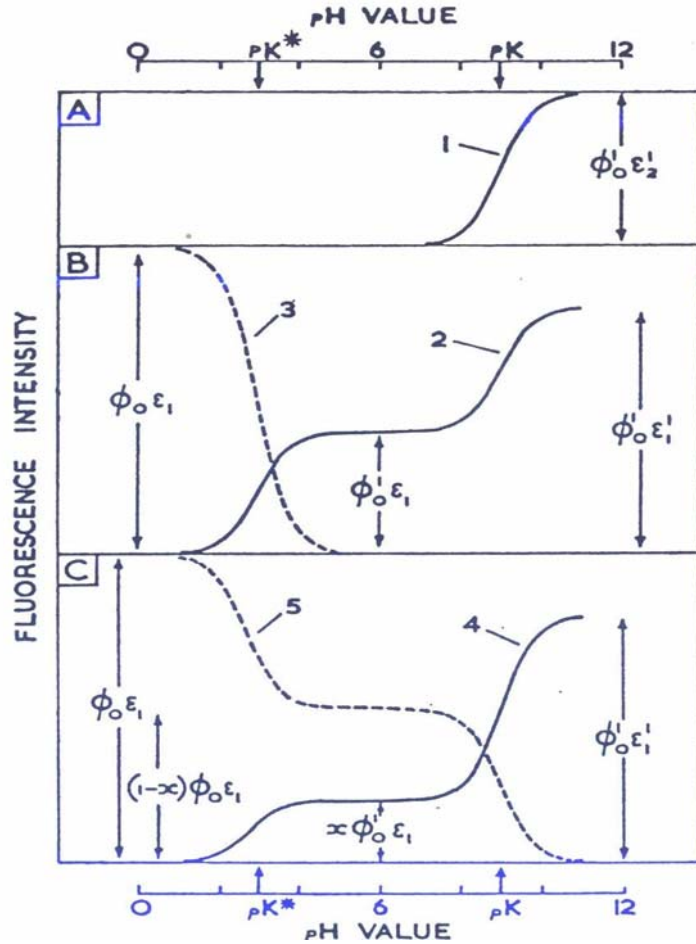
Bu uygulamalar  $\Delta H$  ve  $\Delta H^*$  ' in kesin değerlerinin pozitif, nötr ve negatif olduğu durumlarda uygulanır. Biz temel ve uyarılmış halde bir reaksiyon entropisinin varlığını varsayarsak, (elde edilen gerçek değerleri doğrulayan bir varsayım);  
 $\Delta G = \Delta H - T \Delta S = - RT \ln K$

$$\log\left(\frac{K^*}{K}\right) = \frac{E_1 - E_2}{2.3 RT} = \frac{Nh(\Delta v)}{2.3 RT}$$

burada ; Planck sabitini yerine koyar , mikrona çevirirsek;

$$pK^* = pK - \frac{6,25 \times 10^3}{T} (\Delta \bar{v})$$

$$pK^* = pK - 21,4 (\Delta \bar{v})$$



Şekil-3.2. Asidik ve bazik formun floresans siddeti

Şekilde asidik ve bazik formda floresans şiddetinin eğrileri görülmektedir.

- $R^-$  bazik formunun (düz çizgiyle gösterilmiş eğriler) en düşük singlet uyarılmış düzeye sahip olduğu farzedilir ve RH asidik formunun (kesik çizgiyle gösterilmiş eğriler) absorpsiyon yapmadığı (ışığı tamamen geçirdiği),  $\lambda_2$  dalga boyunda absorpsiyon yaptığı görülür.

- $\epsilon_2'$ ,  $R^-$  anyonunun  $\lambda_2$ 'deki sönüm katsayısıdır.

- $\epsilon_1'$  ve  $\epsilon_1$  daha kısa dalga boyu  $\lambda_1'$  de  $R^-$  ve RH'n sönüm katsayılarıdır.

- $\Phi_0'$  ve  $\Phi_0$  'ın dalga boyundan bağımsız olduğu farzedilir.

- Grafikteki eğriler;  $\epsilon_1' = 1.6 \epsilon_2' = 2 \epsilon_1$  ve  $\Phi_0 = 2.5 \Phi_0'$  olan bir sistem için çizilmiştir.

- Blok A,  $\lambda_2$  'deki uyarımla ilgilidir.

- Blok B ve C ise  $\lambda_1$  'deki uyarımla ilgilidir.

- B 'de floresans dikkata değer ölçüde oluşmadan önce bütün pH değerlerinde denge kurulur.

- C 'de floresans oluşmadan önce, pH 6'da ayrışan asitin oranı  $\chi$ 'in 0.5 olduğu farzedilir.

Bu eğrilerin şekli aşağıdaki faktörlere bağlıdır;

a) pK ve pK\* değerlerine,

b) Asitik ( $\epsilon_1$ ) ve bazik ( $\epsilon_2$ ) formun kısa dalga boyu ekzitasyonundaki sönüm katsayıları ile bazik formun uzun dalga boyu ekzitasyonundaki sönüm katsayısına ( $\epsilon_2'$ ),

c) Uyarılan türün ömrüyle karşılaştırılarak elde edilen uyarılmış haldeki dengenin elde edilme oranına,

d) Asitik ve bazik formun floresans verimlerine  $\Phi_0$  ve  $\Phi_0'$  bağlıdır.

Floresans etkileri ve ömürleri güçlü asitlerde ya da güçlü alkali çözeltilerde ışın yayılmasıyla gözlemlenir. Bu yüzden aşağıdaki gibi bir eşitlik elde edilir.



$$\Phi_0 = kf / (kf + kg + kn) = kft$$

Uyarılmış haldeki seyreltilmiş çözeltilerde de disosiyasyon ya da asosiyasyon yokluğunda floresans şiddeti gözlemlenir.

$$F = \omega I_0 \epsilon \Phi_0 c$$

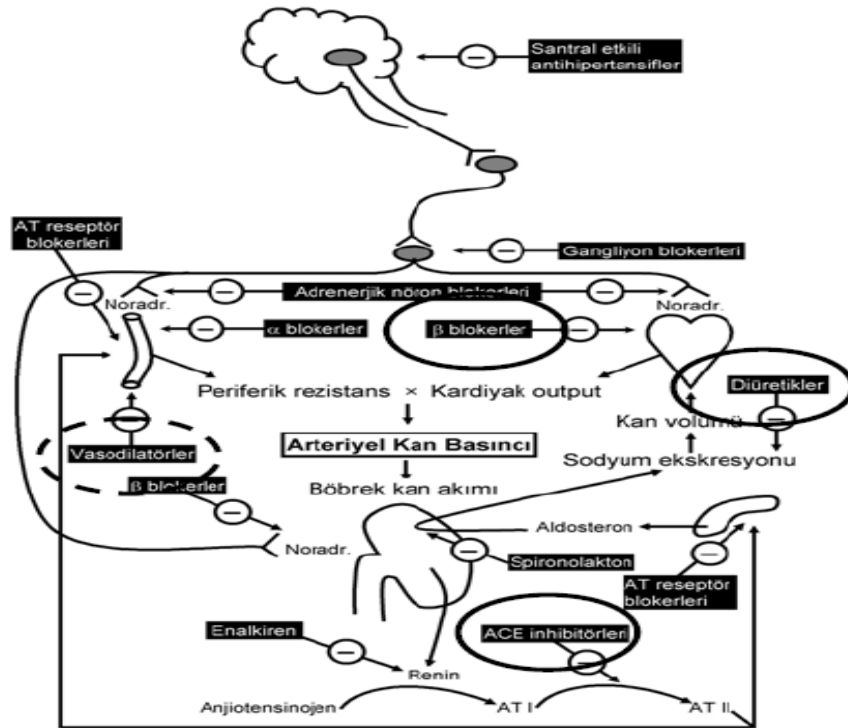
Burada  $\omega$ : enstrümental sabit,  $c$ : konsantrasyon,  $I_0$ : uyarıcı ışın şiddeti ve  $\Phi_0$  floresans verimidir.

#### 4. ANTİHİPERTANSİFLER

Hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçlar 5 ana grupta toplanabilir. Bunlar, diüretikler, sempatikolitikler ya da adrenerjik sinir sistemi antagonistleri, renin-angiotensin sistemini (RAS) etkileyen ilaçlar, damar düz kasında etkili ilaçlardır (Türk Kardiyoloji Derneği web sitesi).

- I. Diüretikler
- II. Adrenerjik sinir sistemi antagonistleri
  - A. Merkezi etkililer
  - B. Periferik etkililer
    - a) Adrenerjik nöron blokerleri
    - b) Ganglion blokerleri
  - C. Adrenerjik reseptör blokerleri
    1.  $\alpha$  reseptör blokerleri
    2.  $\beta$  reseptör blokerleri
    3.  $\alpha$  ve  $\beta$  reseptör blokerleri (mikst etkililer)
- III. Renin-angiotensin sistemini etkileyen ilaçlar
  - A. ADE inhibitörleri
  - B. Angiotensin II tip 1 reseptör antagonistleri
- IV. Damar düz kasında etkili ilaçlar
  - A. Kalsiyum kanal blokerleri
  - B. Potasyum kanal açıcılar
  - C. Doğrudan damar düz kasını gevşetici ilaçlar
- V. Yeni geliştirilmekte olan ilaçlar
  - A. Nötral endopeptidaz peptid(NEP) inhibitörleri

- B. Endotelin I reseptör antagonistleri  
C. Renin inhibitörleri ve diğerleri



Şekil.4.1. ADE İnhibitörlerinin Etki Mekanizması

### İlk Seçenek İlaçlar

- ADE İnhibitörleri ( Benazepril, Enalapril, Fosinopril, Kaptopril, Kinapril, Lisinopril, Moeksipril, Perindopril, Ramipril, Silazapril, Trandolapril)
- Beta blokerler ( Asebutolol, Atenolol, Karvedilol, Labetalol, Metoprolol, Nadolol, Propranolol)
- $Ca^{+2}$  kanal blokerleri ( Amlodipin, Diltiazem, Felodipin, İsradipin, Lerkadipin, Nifedipin, Nizoldipin, Verapamil)
- Diüretikler
  - Tiyazidler ve ilgili ajanlar (hidroklorotiyazid, klortalidon)
  - Loop ajanları (furosemid)
  - Potasyum tutucu ajanlar (spironolakton, triamteren)

#### 4.1. Anjiotensin Dönüştürücü Enzim İnhibitörleri' nin Etki Mekanizmaları

Kaptopril ve bu gruptaki diğer ilaçlar anjiotensin I' i anjiotensin II' ye hidrolize eden dipeptidil dipeptidazı (diğer isimleri anjiotensin dönüştürücü enzim, kininaz 2, plazma kininazı) inhibe eder. Aynı enzim potent bir vazodilatör olan bradikininin inaktive ettiği için ADE inhibitörlerinin etkilerinin bir kısmı da nitrik oksit ve prostasiklin stimülasyonuna bağlıdır. Oluşumu engelleyen anjiotensin II vazokonstriktördür ve sodyum tutucu aktiviteye (aldosteron sekresyonu üzerinden) sahiptir.

Kaptopril ve lisinopril oral yoldan aktif ilaçlardır. Enalapril bir ön ilaçtır, karaciğerde aktif formu olan enalaprilata dönüşür. Enalaprilat sadece hipertansif acil durumlar için intravenöz yolla uygulanır. Benazepril, fosinopril, moeksipril, kinapril, perindopril, silazapril, ve ramipril de ön ilaçlardır ve karaciğerde hidrolizle aktif formlarına dönüşürler.

ADE inhibitörleri kan basıncını periferik vasküler rezistansı azaltarak düşürürler. Kardiyak output ve kalp hızı belirgin olarak değişmez. Refleks sempatik aktivasyon yapmadıkları için iskemik kalp hastalığı olanlarda güvenlidirler. Refleks taşikardiye yol açmamaları, baroreseptörleri daha aşağıda bir seviyeye ayarlamalarına bağlı olabilir.

ADE inhibitörleri diabetik nefropatili hastalarda proteinüriyi azaltarak ve böbrek fonksiyonlarını stabilize ederek etkili olurlar. ACE inhibitörleri aynı zamanda konjestif kalp yetmezliğinde sol ventrikül hipertrofisini geriletebilirler. Miyokard infarktüsü sonrasında kullanımlarının faydalı etkileri kanıtlanmıştır. Fosinopril, moeksipril, ramipril ve trandolapril dışındaki tüm ADE inhibitörleri böbreklerle atılır.

Hipovolemik hastalarda (örn. Diüretik kullanma, tuz kısıtlaması, gastrointestinal sıvı kaybı nedeniyle), ADE inhibitörlerinin ilk dozlarında şiddetli hipotansiyon görülebilir. Kuru öksürük, bazen wheezing ve anjiödem, hiperkalemi, özellikle bilateral renal arter stenozlu hastalarda akut böbrek yetmezliği yapabilirler. Kuru öksürük ve anjiödem bradikinin etkilerinin artmasına bağlıdır.

## 4.2. Diüretiklerin Antihipertansif Amaçla Kullanımı

Diyetle sodyum kısıtlamasının, hipertansif hastalarda kan basıncını düşürdüğü uzun yıllardır bilinmektedir. Sodyum kısıtlaması rölatif olarak nontoksik bir tedavidir hatta önleyici olduğu da söylenebilir. Diüretikler primer olarak sodyum depolarını azaltarak etki gösterirler. Başlangıçta kan hacmi ve kardiyak output azalır; periferik vasküler rezistans artabilir. 6-8 hafta sonra kardiyak output normale dönerken periferik vazküler rezistans düşer. Sodyum,  $Na^+/Ca^{+2}$  değişimi vasıtasıyla intraselüler kalsiyumu artırır. Bu etkiler diüretikler veya sodyum kısıtlamasıyla önlenebilir.

Diüretikler çoğu hastada kan basıncını 10-15 mm Hg düşürürler. Bu şekilde orta ve hafif hipertansiyonda tek başlarına etkili olabilirler. Daha şiddetli hipertansiyonda, sempatojejik ve vazodilatör ilaçlarla kombine kullanılırlar ve onların sodyum retansiyonu yapma eğilimine karşı koyarlar. Pek çok hasta için tiazit grubu diüretikler uygundur. Ancak kalp veya böbrek yetmezliği olan hastalarda (glomerüler filtrasyon 50 mL/dakikanın altındaysa), şiddetli hipertansiyonda ve sirozda belirgin miktarda sodyum retansiyonu olabilir. Bu durumlarda bir loop diüretiği kullanılmalıdır. Potasyum-kouruyucu diüretikler hem aşırı potasyum kaybını önlemek hem de natriürece katkıda bulunmak için kullanılırlar.

## 4.3. ADE İnhibitörleri Kimyasal yapı ve Özellikleri

Kimyasal olarak farklı üç tane ADE inhibitörü sınıfı geliştirilmiştir. Bunlar çinko iyonunun ligandı olan sülfidril, karboksil ya da fosforile göre sınıflandırılmaktadır. Değişik yapıda olmaları, dokulardaki dağılımlarını ve atılım yollarını etkiler.

- a) Sülfür içerenler (kaptopril, alasepril, phentiapril, pivalopril, zofenopril).
- b) Karboksil grubu içerenler (enalapril, perindopril, trandolapril, ramipril, kinapril, delapril, silazapril, benazepril, lisinopril, pentopril)
- c) Fosforil grubu içerenler (fosinopril)

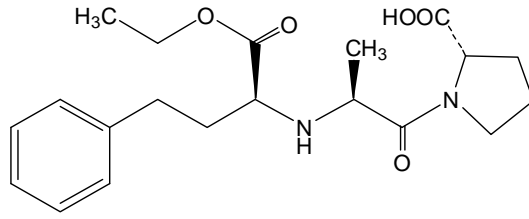
### 4.3.1. ENALAPRİL

**CAS numarası :** 76095-16-4

**Kimyasal Adı :** (2S)-1-[(2S)-2-[[[(2R)-1-etoksi-1-oxo-4-fenilbütan-2-yl]amino]propanol]pirolidin-2-karboksilik asit

**Kapalı Formülü :** C<sub>20</sub>H<sub>28</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

**Açık Formülü :**



**Şekil-4.2.** Enalapril maleat

**Molekül Ağırlığı :** 492.5 g/mol

**Erime Noktası :** 143-144.5°C

**Suda Çözünürlüğü :** 0,025 g/mL

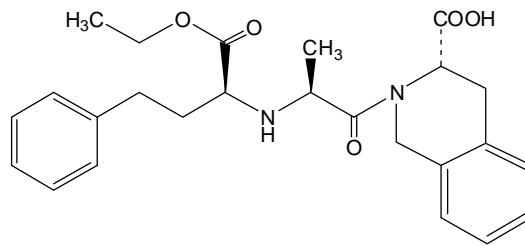
### 4.3.2. KİNAPRİL

**CAS numarası :** 82586-55-8

**Kimyasal Adı:** (3S)-2-[(2S)-2-[[[(2S)-1-etoksi-1-oxo-4-fenilbütan-2-yl]amino]propanol]-3,4-di hidro-1H-izokinolin-3-karboksilik asit

**Kapalı Formülü :** C<sub>25</sub>H<sub>30</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

**Açık Formülü :**



**Şekil-4.3.** Kinapril

**Molekül Ağırlığı :** 474.98 g/mol

**Erime Noktası :** 120-130 °C

**Suda Çözünürlüğü :** 1 mg/L

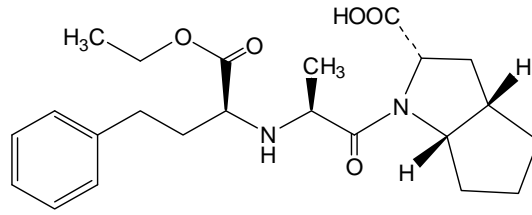
### 4.3.3. RAMİPRİL

**CAS numarası :** 87333-19-5

**Kimyasal Adı :** (2S,3aS,6aS)-1-[(2S)-2-[[[(2S)-1-etoksi-1-oxo-4-fenilbütan-2-yl]amino]propanol]-3,3a,4,5,6,6a-hekza hidro-2H-siklo penta[d]pirol-2-karboksilik asit

**Kapalı Formülü :** C<sub>23</sub>H<sub>32</sub>N<sub>2</sub>O<sub>5</sub>

**Açık Formülü :**



**Şekil-4.4.** Ramipril

**Molekül Ağırlığı :** 416.52 g/mol

**Erime Noktası :** 109 °C

**Suda Çözünürlüğü :** 3.5mg/L

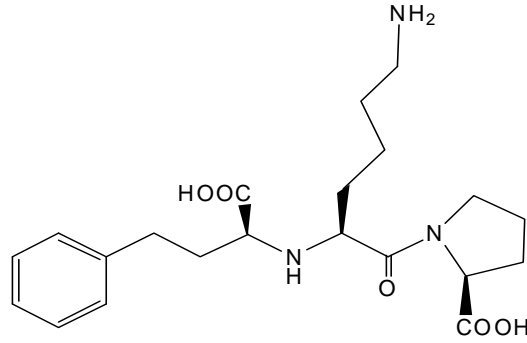
### 4.3.4. LİSİNOPRİL

**CAS numarası :** 83.915-83-7

**Kimyasal Adı :** (2S)-1-[(2S)-6-amino-2-[[[(2S)-1-hidroksi-1-oxo-4-fenilbütan-2-yl]amino]hekzanol]pirolidin-2-karboksilik asit

**Kapalı Formülü :** C<sub>21</sub>H<sub>31</sub>N<sub>3</sub>O<sub>5</sub>

**Açık Formülü :**



**Şekil-4.5.** Lisinopril

**Molekül Ağırlığı :** 441.52 g/mol

**Suda Çözünürlüğü :** 13 mg/L

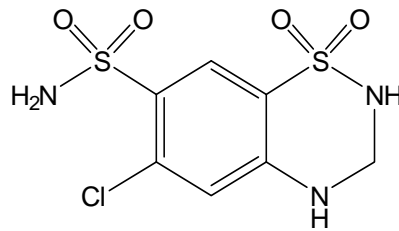
#### 4.3.5. Hidroklorotiyazid (HKT)

**CAS numarası :** 58-93-5

**Kimyasal Adı:** 6-kloro-1,1-dioxo-3,4-dihidro-2H-benzo[e][1,2,4]tiadizin-7-sulfonamid

**Kapalı Formülü :** C<sub>7</sub>H<sub>8</sub>ClN<sub>3</sub>O<sub>4</sub>S<sub>2</sub>

**Açık Formülü :**



**Şekil-4.6.** Hidrokloro tiazid

**Molekül Ağırlığı :** 297.7 g/mol

**Erime Noktası :** 274 °C

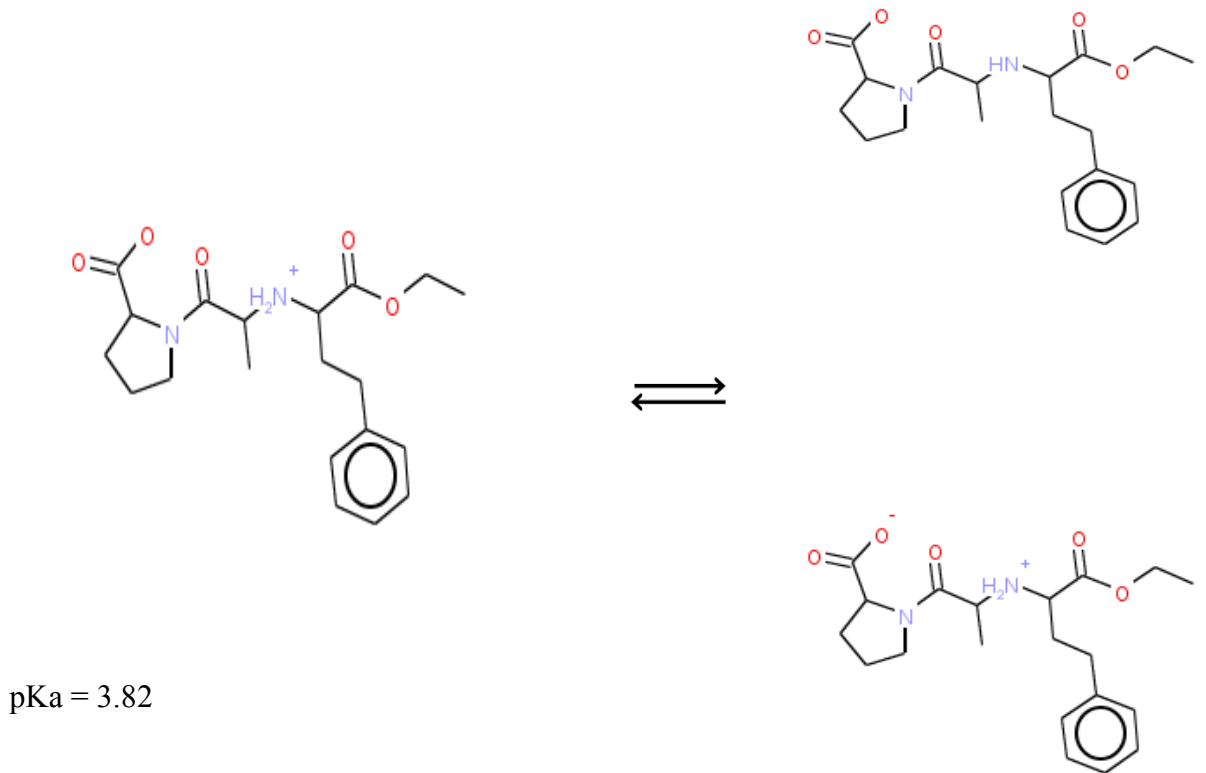
**Suda Çözünürlüğü :** 0.7 mg/mL

#### 4.4. ADE inhibitörlerinin SPARC Programı ile Hesaplanan İyonlaşma Sabitleri

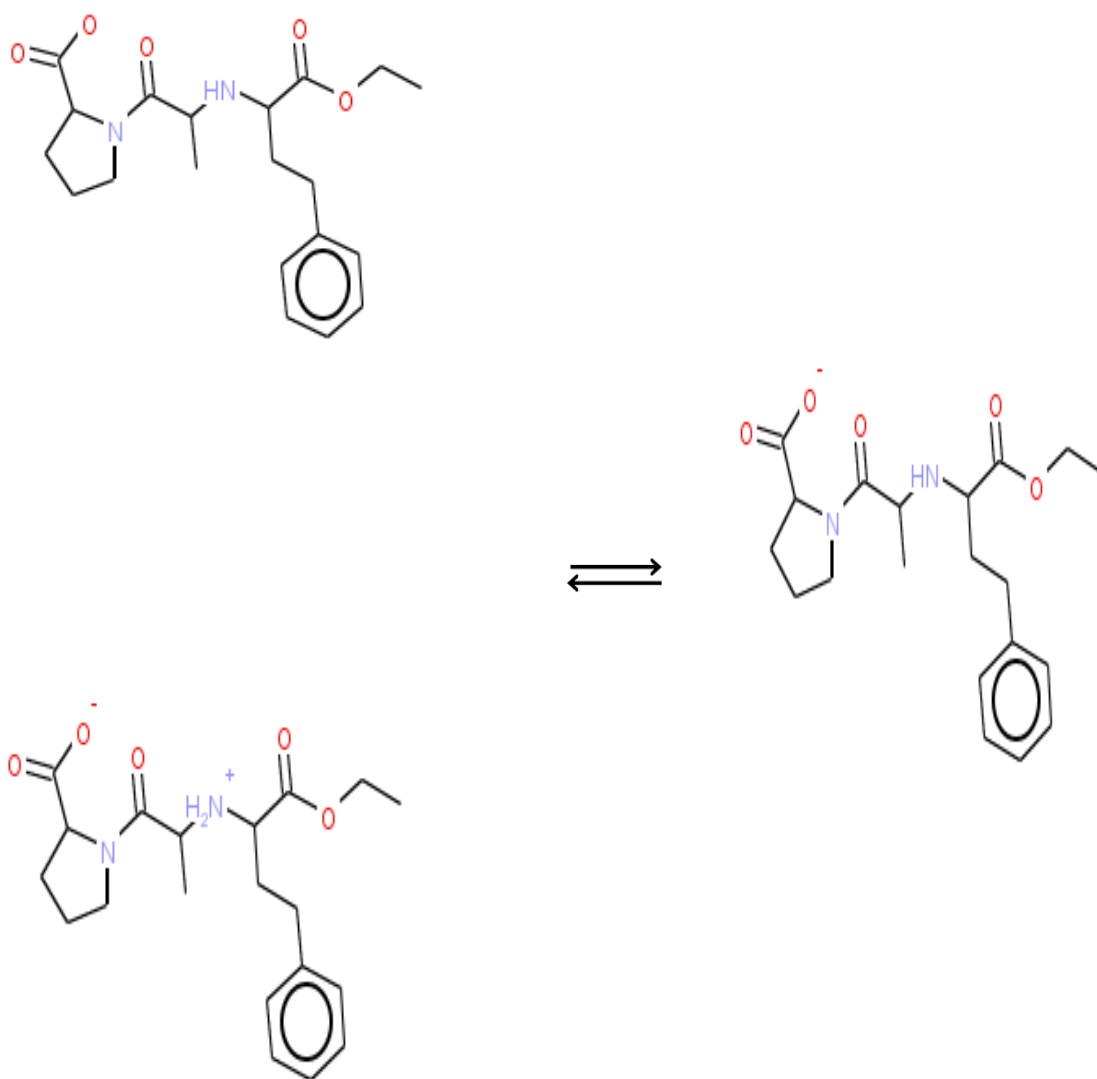
ADE inhibitörleri, molekül yapılarından da görüleceği gibi, asidik ve bazik özelliğe sahip karboksil ve amino fonksiyonlu gruplarına sahiplerdir. Bu özelliklerinden dolayı da iyonlaşan grubun özelliğine bağlı pKa değerlerine sahiplardir. Bu bileşiklerin teorik pKa değerleri SPARC (Performs Automated Reasoning in Chemistry) on-line pKa hesaplama programı ile kolaylıkla hesaplanabilmektedir.

##### 4.4.1. Enalaprilin İyonlaşma Sabitleri

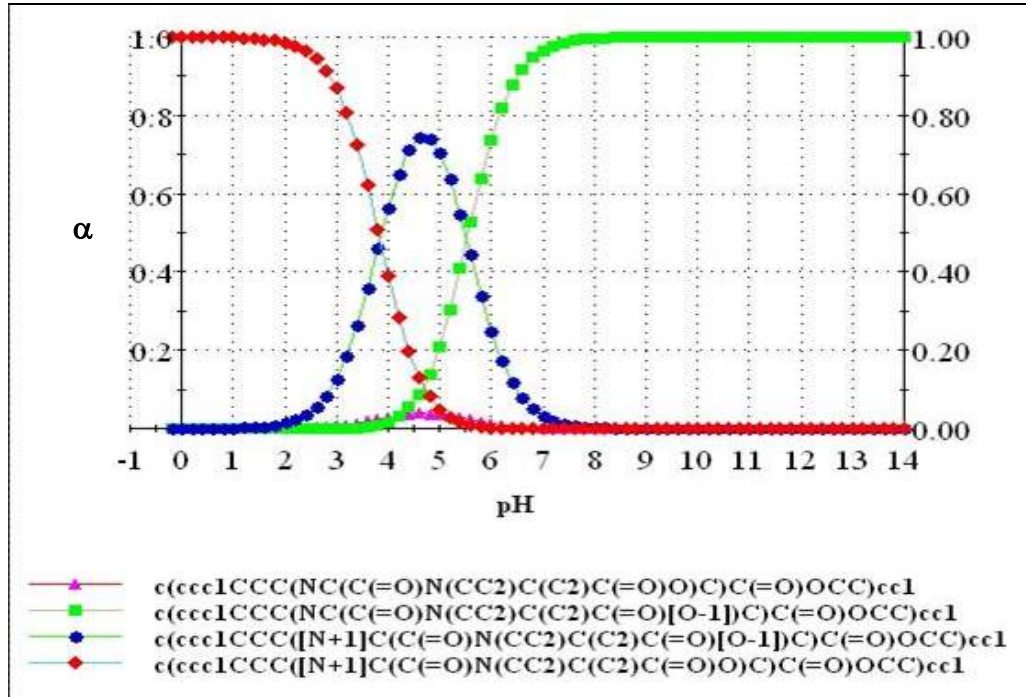
Enalaprilin iyonlaşma dengeleri ve bu dengelerden hesaplanan pKa değerleri;



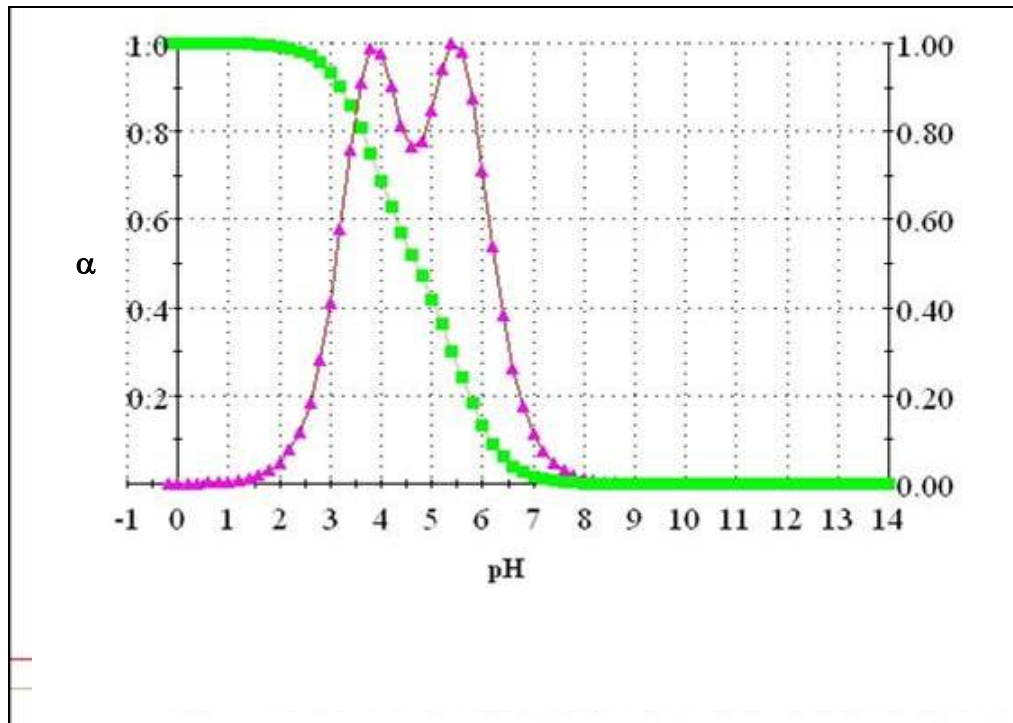




pKa = 5.55



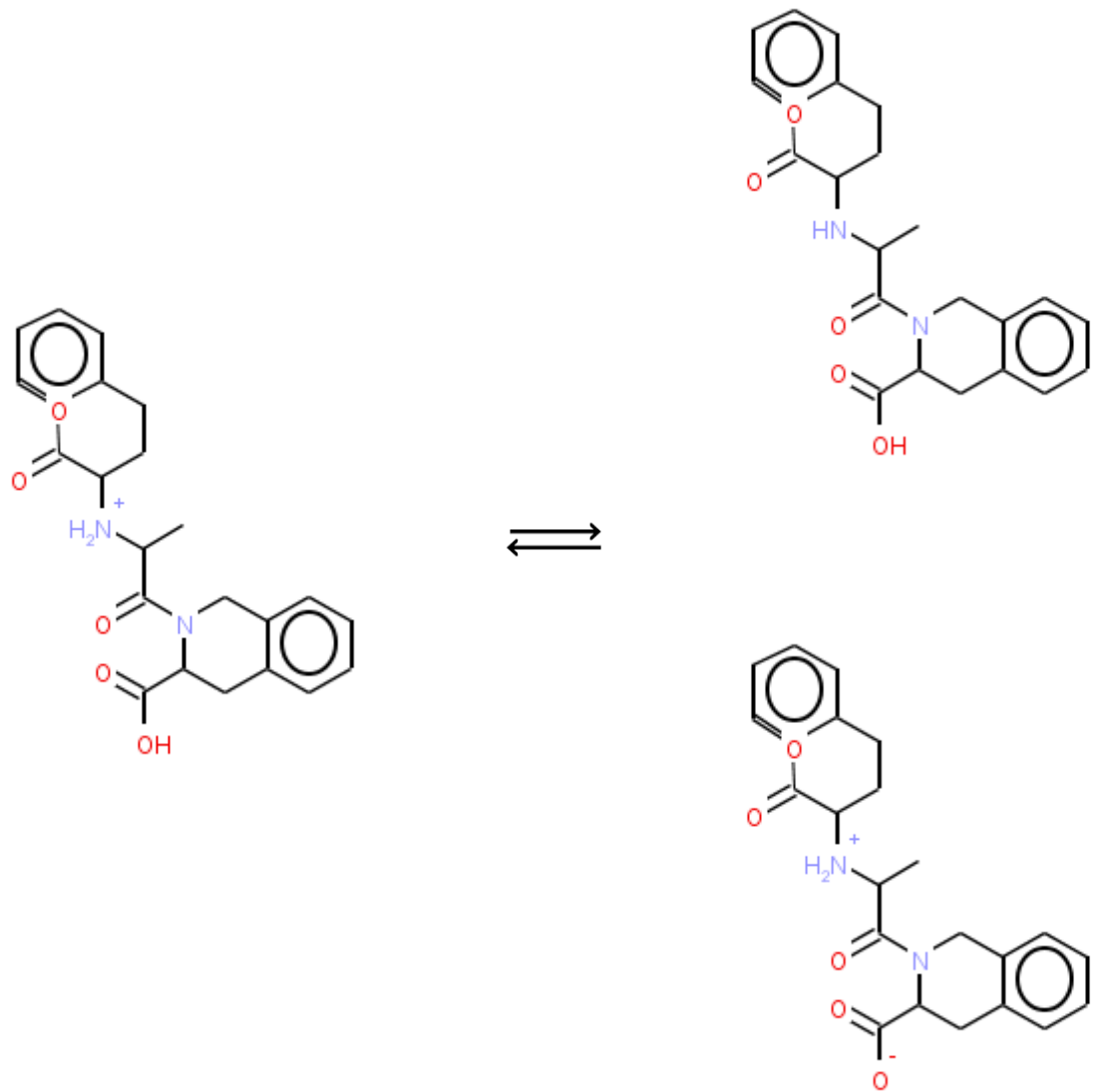
Şekil-4.7. Enalapril için  $\alpha$ - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi



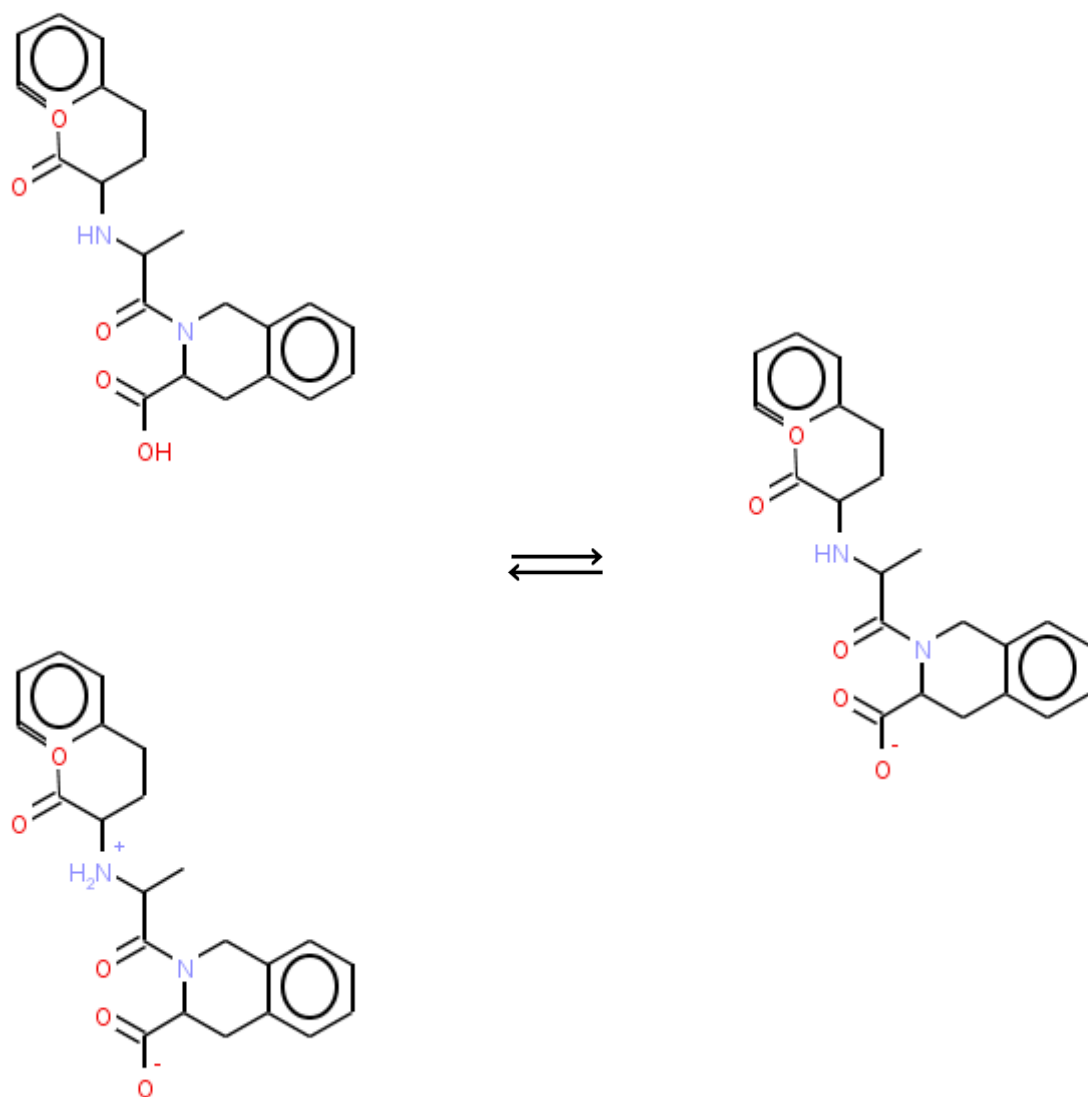
Şekil-4.8. Enalapril için  $\alpha$ - pH ilişkisi ve 2. türev eğrisi

#### 4.4.2. Kinaprilin İyonlaşma Sabitleri

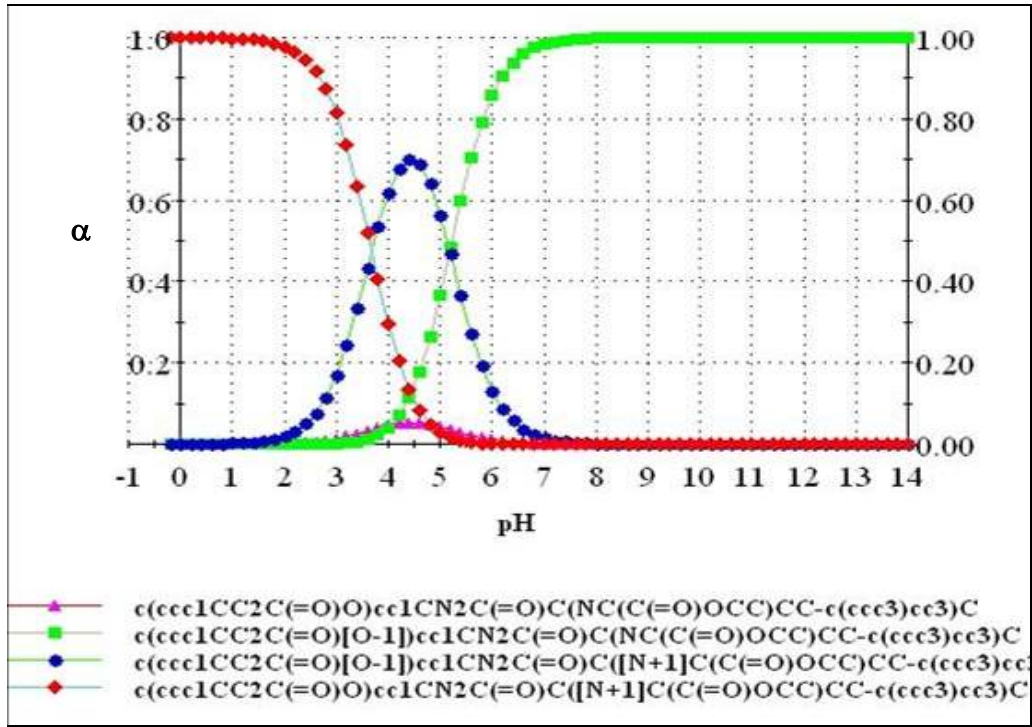
##### Makroskopik pKa Değerleri



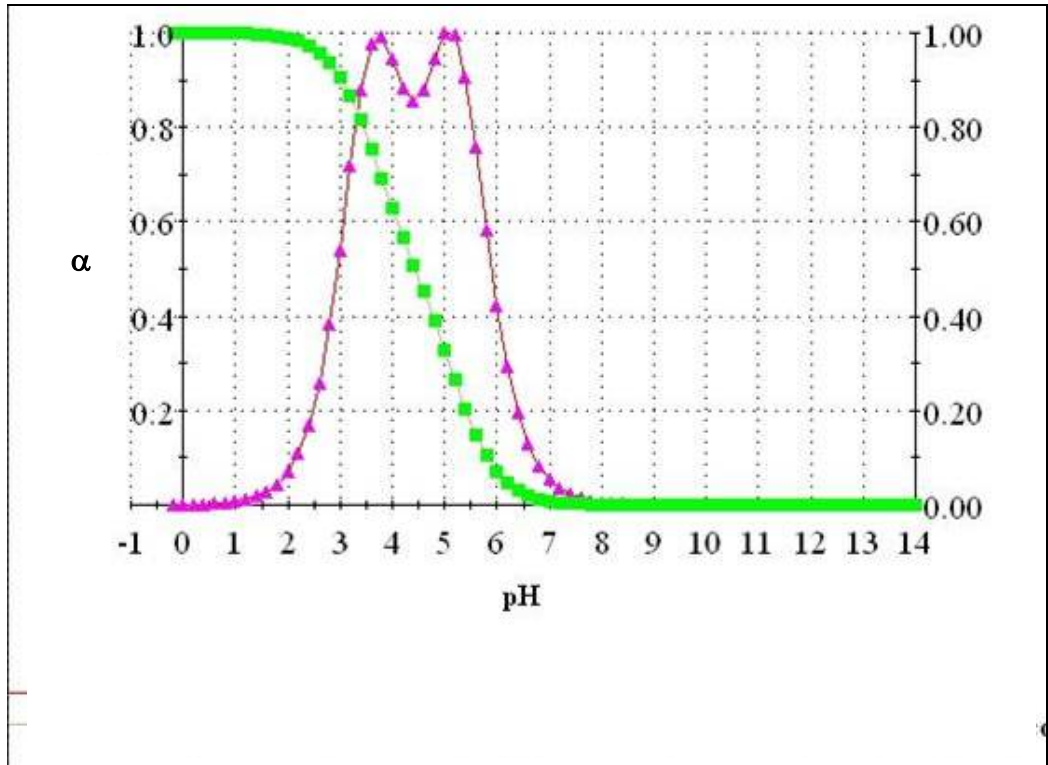
pKa = 3.65



pKa = 5.22



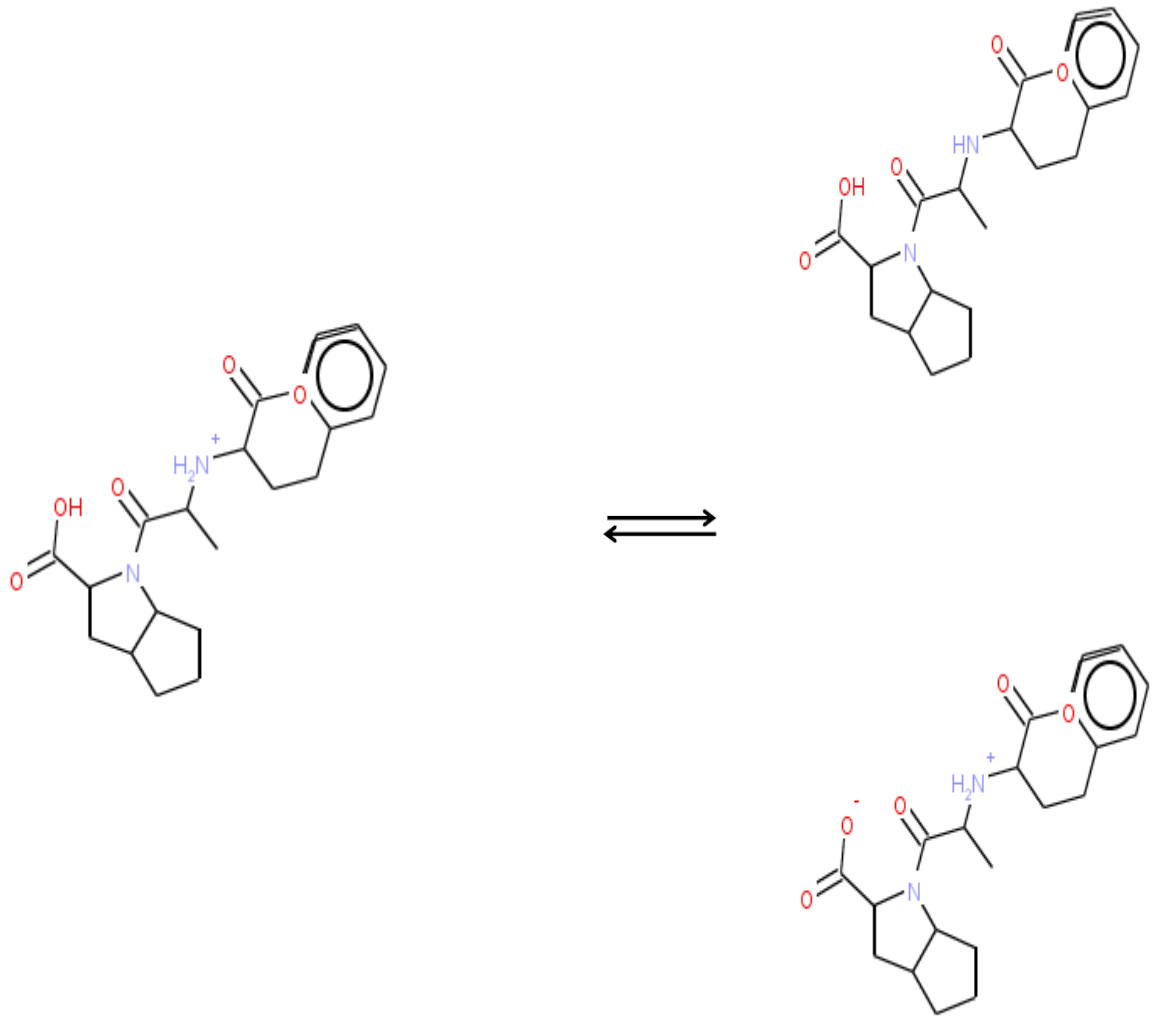
Şekil-4.9. Kinapril için  $\alpha$ - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi



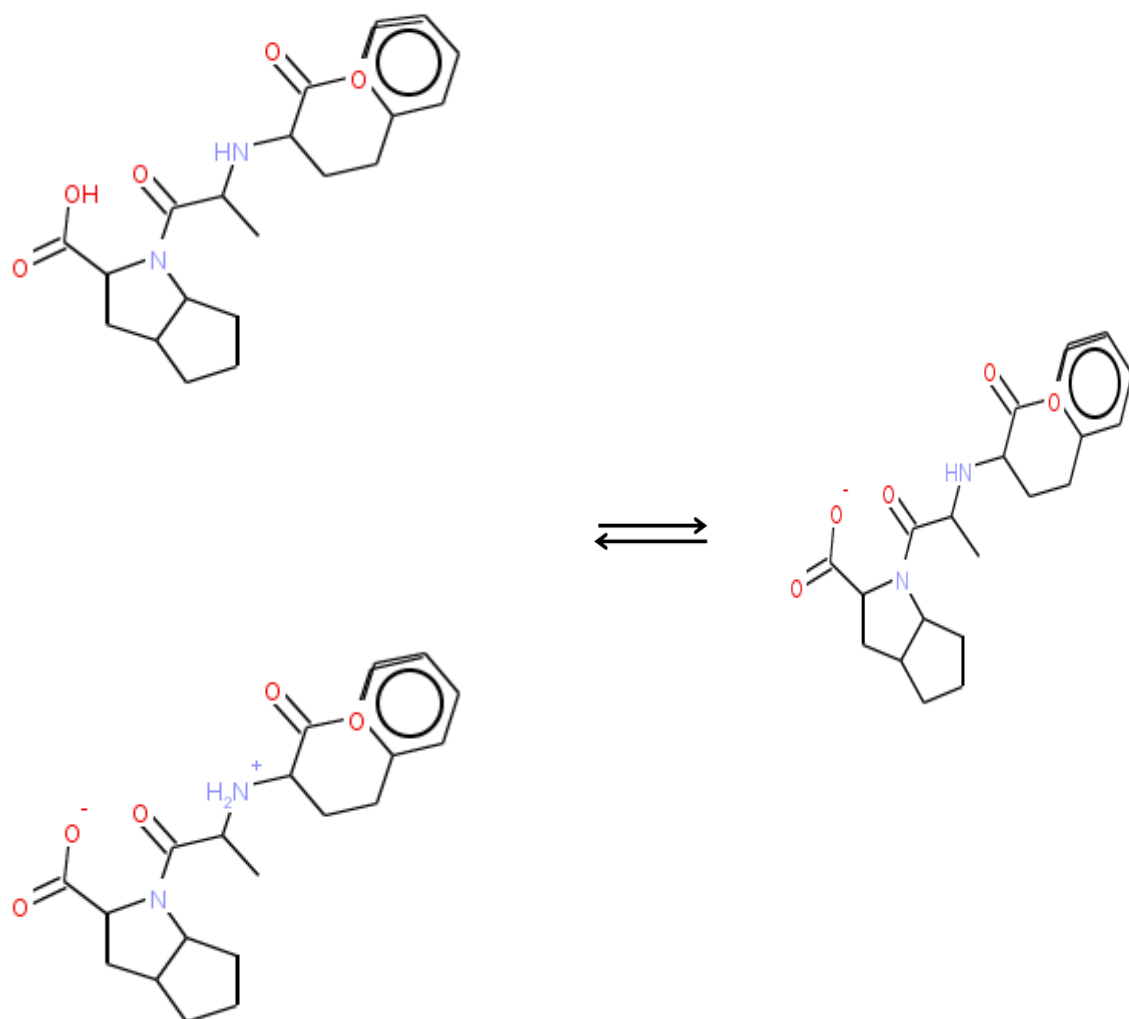
Şekil-4.10. Kinapril için  $\alpha$ - pH ilişkisi ve 2. türev eğrisi

### 4.4.3. Ramiprilin İyonlaşma Sabitleri

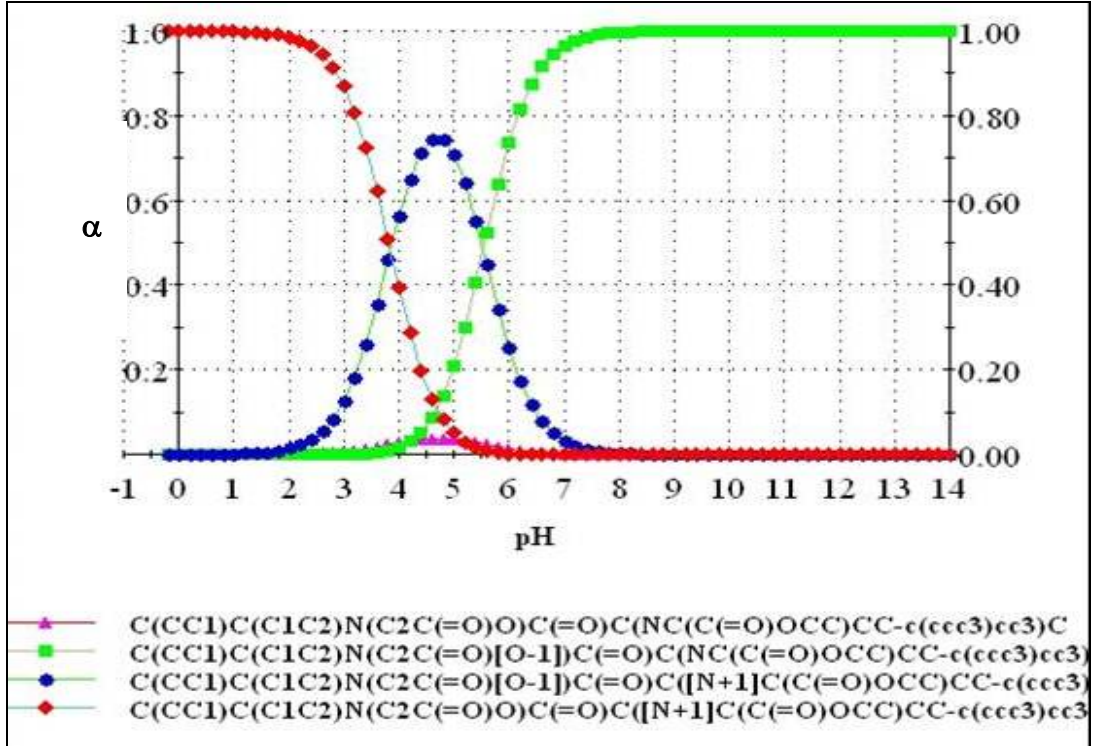
#### Makroskopik pKa Değerleri



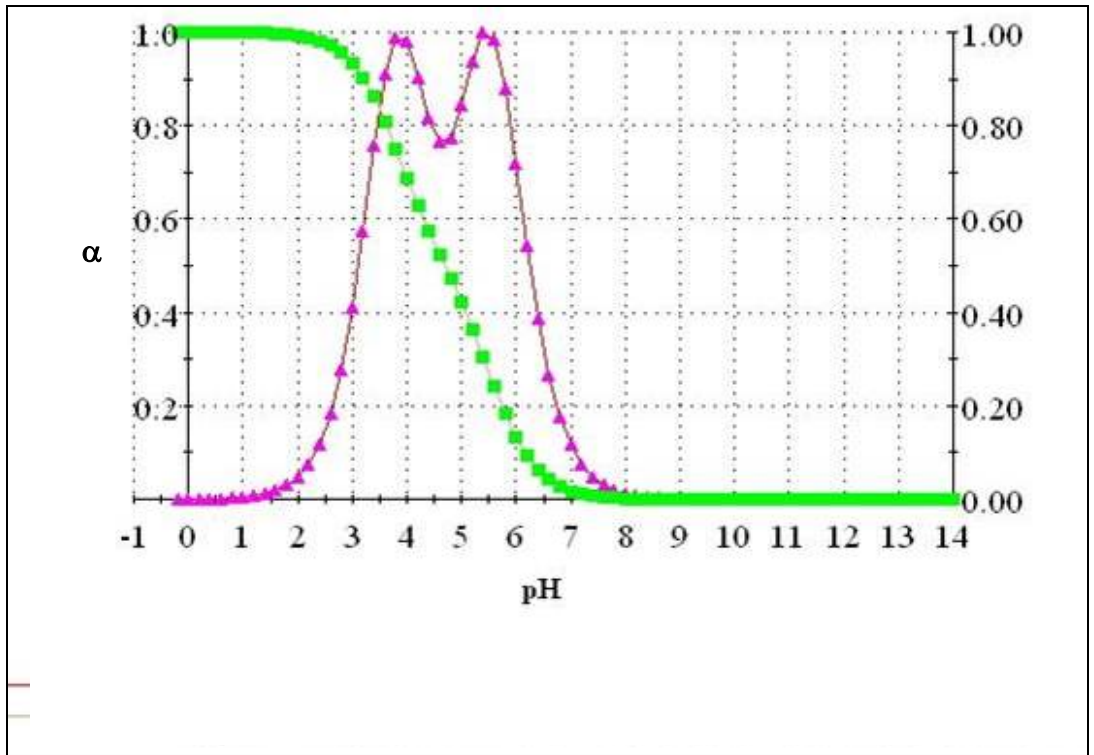
pKa = 3.82



pKa = 5.55



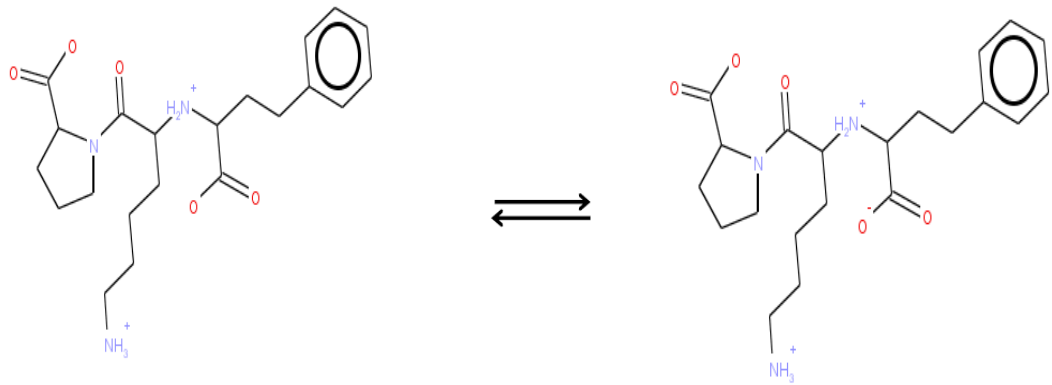
Şekil-4.11. Ramipril için  $\alpha$ - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi



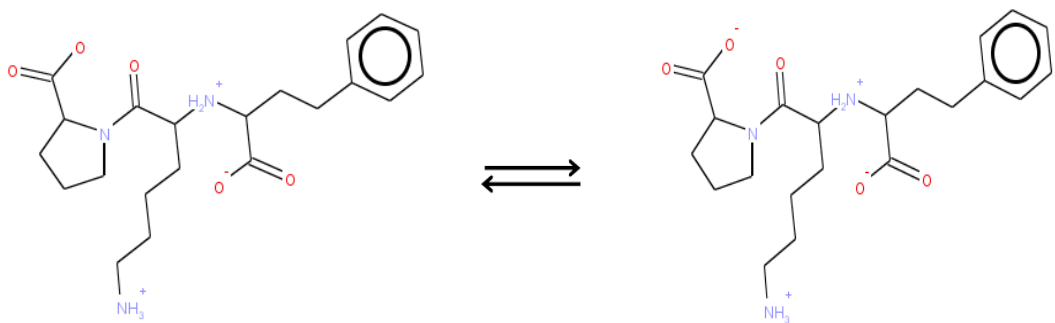
Şekil-4.12. Ramipril için  $\alpha$ - pH ilişkisi ve 2. türev eğrisi



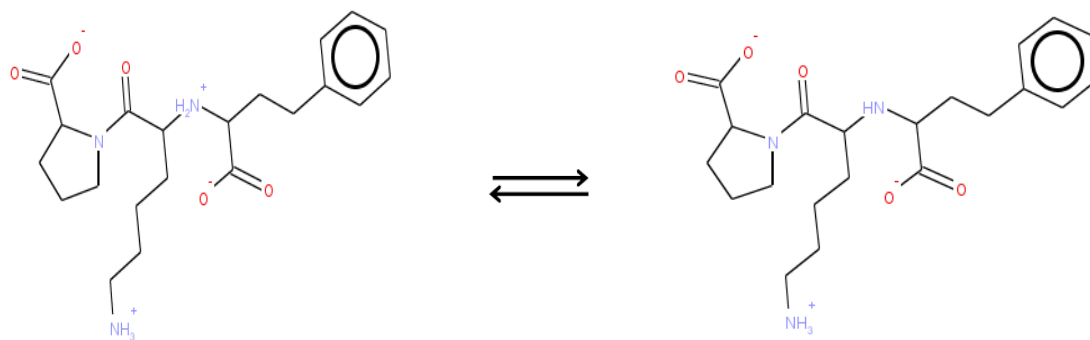
#### 4.4.4. Lisinoprilin İyonlaşma Sabitleri Makroskopik pKa Değerleri



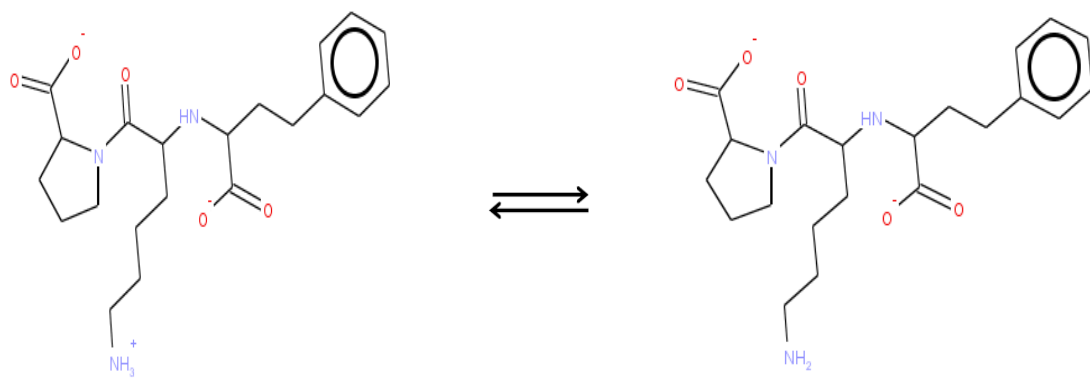
pKa = 1.91



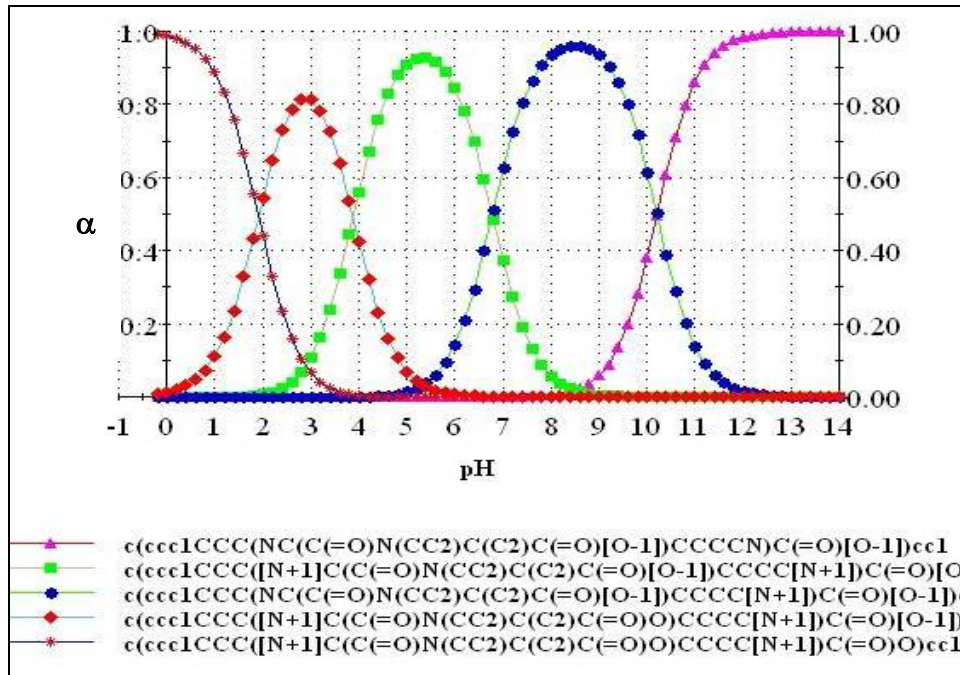
pKa = 3.88



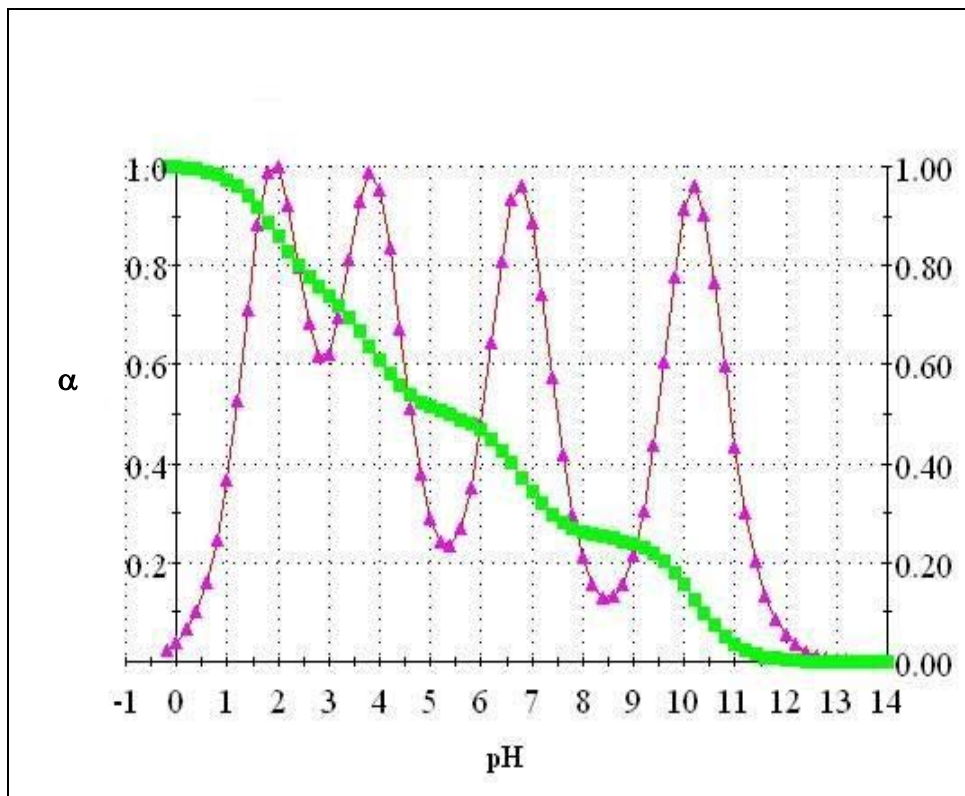
pKa = 6.77



pKa = 10.21



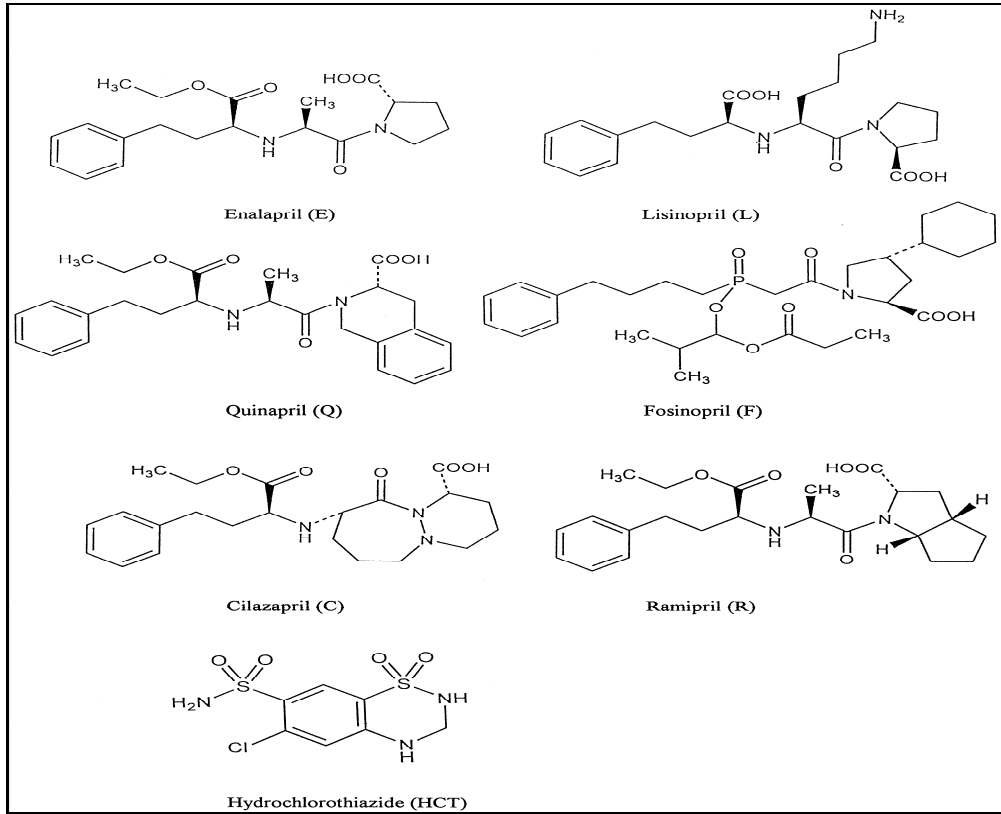
Şekil-4.13. Lisinopril için  $\alpha$ - pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi



Şekil-4.14. Lisinopril için  $\alpha$ - pH ilişkisi ve 2. türev eğrisi

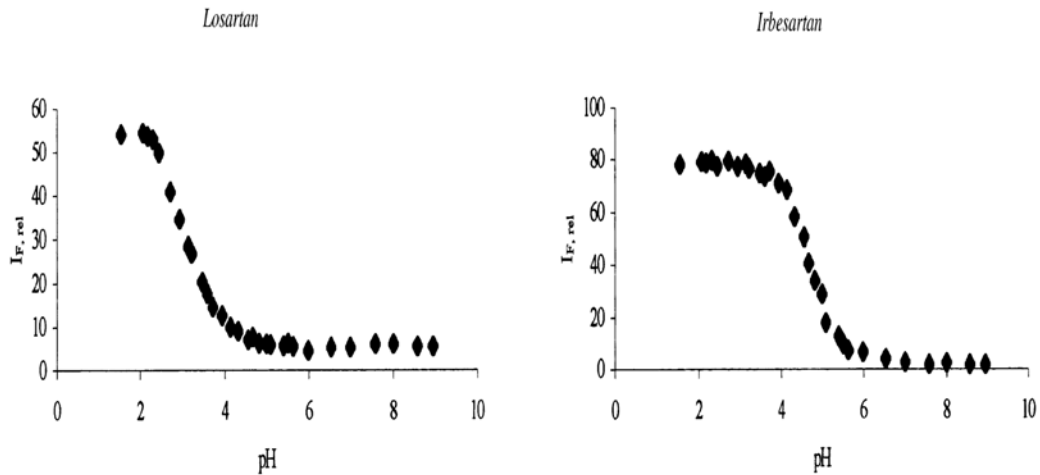
## 5. LİTERATÜR ÖZETİ

Anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörleri, ya tek olarak ya da bir tiazid diüretik olan hidroklorotiazid (Şekil-5.1) ile birlikte hipertansiyon ve kalp yetmezliği tedavilerinde geniş ölçüde kullanılmaktadır .



**Şekil-5.1.** Anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörlerinin molekül şekilleri

E. Cagigal ve ark.' ları (2001) tarafından yapılan bir çalışmada (2), antihipertansif ilaçların yeni bir ailesi olan anjiyotensin II reseptör antagonistleri (ARA II), Losartan, Irbesartan, Valsartan, Telmisartan, Kandesartan sileksetil ve bunun metaboliti Kandesartan M1'in asit-baz denge sabitleri spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Bağlı floresans şiddeti (IF, bağlı)-pH verileri, grafiksel (türevler ve eğri-uydurma) ve sayısal yöntemlerle (LETAGROP SPEFO) muamele edilmiştir. 0,5 M iyonik şiddette sonuç pKa değerleri, Losartan için (3,15±0,07), İrbesartan için (4,70±0,06), Valsartan için (4,90±0,09), Kandesartan sileksetil için (6,0±0,1), Kandesartan M1 için (3,9±0,1) ve Telmisartan için (4,45±0,09) olarak bulunmuştur.



**Şekil-5.2.** Losartan ve Irbesartan için örnek pH-floresans şiddeti grafiği

Hipertansiyon, kalp yetmezliği ve akut miyokardiyal enfaktüs tedavisinde çok sıklıkla kullanılan bir anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörü olan lisinoprilin farmasötik tabletlerde tayini için, 2-merkaptoetanol varlığında (borat tampon ortamı, pH=10.6) o-ftalaldehit ile lisinoprilin reaksiyonuna dayanan, ardışık enjeksiyon analizi kullanılarak tayinin gerçekleştirildiği hızlı spektrofotometrik yöntem; sodyum hipoklorit ve fenil hidrazin ile lisinoprilin kondenzasyon reaksiyonuna dayanan spektrofotometrik, yine 2-merkaptoetanol varlığında (borat tampon ortamı, pH=9.5) o-ftalaldehit ile lisinoprilin reaksiyonuna dayanan spektrofotometrik ve hareketli fazı metanol-su-trietilamin (50:50:0.1 v/v/v) olan ve pH=2.6' de Hypersil silika kolonun kullanıldığı HPLC yöntemlerinin karşılaştırılmalı uygulaması ve 7-kloro-4-nitrobenzofurazan ile lisinoprilin bir türevinin oluşturulmasına (türevlendirme reaksiyonu, pH= 8.5-9.0' da, 60°C'da ve 70 dakikada gerçekleştirilmiş) dayanan bir spektrofotometrik tayin yöntemi geliştirilmiştir. Tek ve çok bileşenli farmasötik dozaj formlarında, lisinoprilin spektrofotometrik ve spektrofotometrik tayini için dört yöntemin uygulandığı diğer bir çalışmada ; ilk yöntem (A), 346 nm' de ölçülen sarı rengi vermek için, pH 9.5' de sulu çözeltide kloranil ile lisinoprilin reaksiyonuna; ikinci yöntem (B), 580 nm' de yoğun mor rengin oluşumuyla sonuçlanan diklon ile lisinoprilin etkileşimine; üçüncü yöntemde (C), 356 nm' de ölçülen ve 475 nm' de ( $\lambda_{uy}$  410 nm) güçlü floresansa da sahip olan renkli bir kondenzasyon ürünü oluşturmak için asetilaseton ve formaldehit ile lisinoprilin reaksiyonuna (ayrıca bu yöntem, hidroklorotiazid ile ikili karışımında lisinoprilin spektrofotometrik olarak tayin etmek için

genişletilmiştir) ve son yöntem (D) ise, lisinoprilin birinci ve ikinci türev spektrumlarının alınmasına dayanmaktadır. Ancak bu çalışmada, başlığında belirtildiği gibi ticari dozaj formlarında lisinoprilin tayini için ve hidroklorotiazid ile lisinoprilin ikili karışımlarının aynı anda tayini için detaylı bir spektrofotometrik analiz yöntemi geliştirilmemiştir. Ayrıca, bu yayında herhangi bir floresans spektrumuna ve spektrofotometrik yöntem verilerinin değerlendirilmesine de rastlanamamıştır.

şimdiye kadar, hidroklorotiazid, benazepril hidroklorür, triamteren ve silazaprilin, bunların diğer ilaçlarla karışımlarında birlikte tayinleri için spektrofotometriyi ve farmasötik preparatların ya ayrılarak ya da diğer ilaçlarla birlikte HPLC ile aynı anda tayini içeren pek çok yönteme literatürde yer verilmiştir. İkili farmasötik preparatların aynı anda spektrofotometrik tayinlerinde, spektrumların birinci türevlerinin kullanımına dayanan bazı yöntemlerden yararlanılmıştır. Örneğin, hidroklorotiazid-benazepril hidroklorür, hidroklorotiazid-triamteren ve hidroklorotiazid-silazapril ikili karışımlarının, birinci türev spektrumlarını kullanarak spektrofotometriyle ve Vierordt yöntemiyle aynı anda tayini için bir işlem geliştirilmiş ve üç farmasötik formülasyona aktif içeriklerini belirlemek amacıyla uygulanmıştır. Ayrıca, hidroklorotiazid ile bazı anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörlerinin; enalapril maleat, lisinopril ve benazepril gibi, ikili karışımlarının varlığının ve derişimlerinin tayini için kullanılan başlıca teknik olarak HPLC verilmektedir. ADE inhibitörlerinin tek olarak kapiler elektroforez yöntemiyle tayinine literatürde daha çok yer verildiği halde, hidroklorotiazid ile farklı ADE inhibitörlerinin (enalapril, lisinopril, silazapril, kinapril, fosinopril ve ramipril) ikili karışımlarının kapiler elektroforez yöntemiyle birlikte tayinlerine ait sadece birkaç çalışma yapılmıştır . Yüksek kardiyovasküler riskli hastaların aspirin, antihipertansif ajan, lipid düşürücü ilaçlar ve olasılıkla folik asit kombinasyonundan daha iyi yararlandıkları ifade edilmektedir. Böyle birden fazla ilaç etken madde içeren ilaçların (polihaplar), örneğin kardiyovasküler hastalıkların tedavisi ve önlenmesi amacıyla kullanılan, lisinopril, aspirin ve atenolol/ hidroklorotiazid ve atorvastatin/ simvastatin/ pravastatin arasından herhangi birini içeren polihapların tayinleri de çoğunlukla HPLC yöntemiyle yapılmakta olup, son yıllarda gelişen kombine analiz yöntemlerinden biri olan LC-MS kullanılarak yapılan çalışmalar da mevcuttur . Bu

yöntem kullanılarak polihapları oluşturan her bir aktif bileşenin ayırımı yapılabildiği gibi, bunların etkileşim ve / veya bozunma ürünlerinin sınıflandırılması da yapılabilmektedir .

Bhushan ve ark.'nın (2005) yaptığı çalışmada ise, üç antihipertansif ajanın ticari formülasyonlardan ekstraksiyonu ve izolasyonu yapılmış, bunlar saflaştırılarak, erime noktası ve IR spektrumları alınmak suretiyle karakterizasyonu yapılmış ve daha sonra metanol-su (50:50 v/v) kullanılarak RP-HPLC ile ve hareketli faz olarak kloroform-metanol (6:1 v/v) kullanılarak TLC ile amlodipin-ramipril ve amlodipin-enalapril ikili formülasyonlarından aktif bileşenlerin ayırımı gerçekleştirilmiştir. Bu maddelerin kantitatif tayininde UV spektrofotometrisi ile desteklenmiş TLC ve kolon kromatografisi kullanılmıştır. Bu yöntemlerle geri kazanım yüzdeleri %81-91 olarak belirlenmiştir.

Farmasötik fomülasyonlarda, yine bir anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörü olan ramiprilin tek olarak ya da ikili karışımlarda tayini için literatürde çoğunlukla spektrofotometrik ve HPLC yöntemlerine, Çok az olarak da spektroflorimetrik ve voltametrik yöntem uygulamalarına rastlanmaktadır. Farmasötik fomülasyonlarda, ramipril ve felodipin ikili karışımının, spektrofotometrik, spektroflorimetrik ve HPLC yöntemleriyle karşılaştırmalı kantitatif tayininin konu alındığı bir çalışmada (26); spektrofotometrik yöntem, girişim spektrumlarıyla ikili karışımların tayini için birinci ve ikinci türev yöntemi ve türev karşılaştırma tekniğini içerirken, spektroflorimetrik yöntem ise emisyon spektrumlarının birinci ve ikinci türevine dayanmaktadır. HPLC yönteminde, bir tars faz Adsorbosil DS analitik kolonu ve metanol-asetonitril-su (50:30:20 v/v/v) hareketli fazı kullanılmıştır. Üç yöntem ile elde edilen sonuçlar ANOVA varyans testi kullanılarak karşılaştırıldığında, spektrofotometrik ve spektroflorimetrik yöntemler ile elde edilen sonuçların, HPLC yöntemiyle edilenlerle yarışabilir olduğu ifade edilmiştir.

Rontogianni ve ark.'larının (2006) yaptığı kombine hipertansiyon tedavisinde kullanılan iki ikili karışımın birlikte tayini için HPLC ve kemometrik olarak-yardımcı spektrofotometrik hesaplam konulu çalışmada, felodipinin ya metoprolol tartarat tuzu ya da ramipril ile birlikte tayini için üç farklı yöntem geliştirilmiştir. HPLC yöntemi, 258°C' de bir ters faz Hypersil BDS C18 3 mm kolonunda her bir

ilacın aynı anda ayırımına dayanmaktadır. Elüsyon (yıkayarak ayırma), 0.015 M 1-heptan sülfonik asidin sodyum tuzu-metanol-asetonitril ((35:40:25 v/v/v, pH 2.5) hareketli fazıyla yapılmıştır. Hareketli faz bileşimi bakımından ayırmanın optimizasyonunun yöntem geliştirmek için çok önemli olduğu, kantitatif analizin 210 nm’de UV dedeksiyon ile yapıldığı, ayrıca ayrı ayrı iki ikili karışımın ayırımının, felodipinin ya metoprololun tayini için 0.015 M sodyum dihidrojen fosfat mono hidrat-metanol-asetonitril 40:30:30 v/v/v kullanılarak pH 6.5’ de (230 nm’ de) ve felodipin-ramipril için ise pH 2.5’de (210 nm) gerçekleştirildiği ifade edilmiştir. Diğer iki kemometrik olarak-yardımcı spektrofotometrik yöntemin “türev-oranı” ve “kısmi en küçük kareler” (PLS) olduğu, bu yaklaşımların 210-240 nm arasında sıfıncı mertebe UV spektrumlarının bilgisi kullanılarak karışımdaki her bir ilacın miktarını belirlemek için uygulanabildiği ve her iki yöntemin, ramipril için 1.56-15.6 mg/ml, metoprolol için 4.82-80.40 mg/ml, felodipin için ise 1.61-17.69 mg/ml aralıklarında lineerlikle tayin edilebildiği belirtilmektedir. Bunlar, ticari tabletlerde iki ikili kombinasyonun “doz eşitlik” (dose uniformity) testi için uygulanmıştır.

Elshanawane ve ark.’larının (2008) yaptığı ADE inhibitörleriyle ilgili başka bir çalışmada, ramipril ve moeksipril hidroklorürün, hidroliz, fotoliz ve termal işlemler uygulanarak zorla bozunma çalışmasıyla oluşturulan parçalanma ürünlerinin varlığında analizi için, siyanopropil kolonda hareketli fazın sulu 0.001 M amonyum asetat tamponu ( pH 6)-metanol (40:60 v/v) olduğu ters faz sıvı kromatografisi (RPLC) yöntemi kullanılmıştır. Dedeksiyon 210 nm’ de UV absorpsiyonuyla yapılmıştır. Yöntemin, spesifiklik, seçicilik, çözelti kararlılığı, doğruluk, tekrarlanabilirlik ve kesinlik bakımlarından geçerliliği denetlenmiştir. Aynı zaman da yöntem farmasötik preparatlara uygulanmış ve parçalanma ürünlerinden ilaçların etkin bir şekilde ayrıldığı da bu çalışmada belirtilmiştir.

Ramiprilin dozaj formlarında, özelliklede tabletlerde tayini için; enalapril maleat ve ramiprilin, p-kloroanilik asit ile ve pikrik asit ile reaksiyonuna ve bromokrezol yeşili ile iyon-çifti tuzu oluşumuna dayanan üç farklı spektrofotometrik yöntemin, bazik ortamda potasyum permanganat ile reaksiyonuna dayanan ve ramiprilin tek başına ya da hidroklorotiazid ile birlikte olup olmadığının da test edildiği bir spektrofotometrik yöntemin, yine kuvvetli bazik ortamda 1-klorobenzotriazol ile ilacı oksidasyonuna dayanan bir spektrofotometrik ve bakır



(II), eosin ve ramipril arasındaki üçlü kompleks oluşumuna dayanan spektrofotometrik yöntemlerin ve ramiprilin yanı sıra silazapril ve kinaprilin farmasötik preparatlarda hem tek olarak hem de hidroklorotiazid ile karışımlarında tayini için, kare dalga voltametik yöntemin geliştirildiği çalışmalar da literatürde yer almaktadır.

Erdal Dinç'in 2002 ve 2005 yıllarında yaptığı iki çalışmasında tabletlerdeki iki bileşenli ilaç etken madde karışımlarının, silazapril-hidroklorotiazid ve enalapril maleat-hidroklorotiazid (losartan varlığında), kantitatif analizi için çok değişkenli kromatografik kalibrasyon tekniği geliştirilmiştir. Tabletlerde silazapril-hidroklorotiazid karışımının aynı anda tayini için dört kemometrik yöntem uygulanmıştır. Bunların; klasik en küçük kareler (CLS), ters en küçük kareler (ILS), ana bileşen regresyonu (PCR) ve kısmi en küçük kareler (PLS) metotları olduğu ve bu metotlarda, ikili ilaç etken madde karışımının girişim spektrumlarına önceden herhangi bir grafiksel işlem yapılmasına gerek olmadığı ifade edilmiştir. Bütün kemometrik kalibrasyonlar için, 0.1 M HCl ve metanolde (1:1) iki ilaç etken maddesi içeren rastgele karışımların bir derişim seti hazırlanmış ve 210-290 nm spektral bölgede 4'er nm aralıklar düşünülerek (222'den 276 nm'ye kadar) 15 dalga boyu noktası için UV-Görünür bölge spektrumlarında absorbans verileri ölçülmüştür. Bu çalışmada, geliştirilen kalibrasyonlar iki ilaç etken maddesi içeren sentetik karışımlarda test edilmiş ve kemometrik hesaplamalar Maple V software programı kullanılarak yapılmıştır. Metotların sonuçlarının diğer bir HPLC metoduyla karşılaştırıldığı ve sonuçların birbiriyle iyi bir uyum gösterdiği belirtilmiştir.

Losartan potasyum varlığında, tabletlerde enalapril maleat-hidroklorotiazid ikili karışımlarının kantitatif analizi için çok değişkenli kromatografik kalibrasyon tekniğinin geliştirildiği diğer bir yayında ise, çok değişkenli kromatografik kalibrasyon tekniğinin matematiksel algoritminin, beş dalga boyu setinde konsantrasyon ve pik alanı arasındaki bağıntı kullanılarak oluşturulan lineer regresyon eşitliklerinin kullanımına dayandığı ifade edilmiştir. Bu matematiksel kalibrasyon modelinin algoritminin basit bir matematiksel içeriğe sahip olduğu, bu yaklaşımın, bir optimum kromatografik çok değişkenli kalibrasyon ve cihazdan ve deneysel şartlardan kaynaklanan dalgalanmaların elimine edilmesi için güçlü bir matematiksel araç olduğu, bu çok değişkenli kromatografik kalibrasyonun, çok

değişkenli lineer regresyonun tek değişkenli veri setine indirgenmesini içerdiği ve modelin validasyonunun ise çeşitli sentetik ikili karışımlar analiz edilerek ve standart ekleme tekniği kullanılarak gerçekleştirildiği belirtilmiştir. Bu çalışmada, geliştirilen kalibrasyon tekniği, enalapril maleat ve hidroklorotiazid içeren gerçek farmasötik tabletlere uygulanmış, elde edilen sonuçlar klasik HPLC yöntemiyle karşılaştırılmış ve önerilen çok değişkenli kromatografik kalibrasyon yöntemiyle, klasik HPLC yönteminden daha iyi sonuçlar elde edildiği gözlenmiştir.

Kin Y. Tam ve ark.'larının (2000) yaptığı bir çalışmada yapısal farklılık gösteren mono-, di-, tri- protik molekül içeren 25 tane ilacın pKa değerlerini geliştirdikleri çok dalga boylu spektrofotometrik teknikle hesaplamışlardır. Geliştirilen teknik ise dip-prob absorpsiyon tekniği olarak adlandırılmıştır ( D-PAS) . Aynı zamanda hesaplamalar geleneksel spektrofotometrik titrasyonla yapılmıştır. İki metot ile elde edilen veriler ve literatürdeki veriler karşılaştırılmıştır. Örneğin ibuprofenin D-PAS tekniği ile saptanan pKa değeri 4,24 olup, spektrofotometrik titrasyonla saptanan değer 4,45 , literatürdeki değer ise 4,51' dir.

Bosch ve ark.'larının (1997) yaptıkları çalışmada ise farklı uygulamalarla birkaç non-steroid anti-inflamatuvar ilacın tahmini pKa değerleri suda belirlenmiş ve karşılaştırılmıştır. İki farklı uygulama geliştirilmiştir. Organik veya organik-su karışımı ortamlarda saptanan pKa değerlerinin karşılaştırılması için SPARC programı kullanılmıştır. İlk uygulamada izopropil alkol iyi bir çözücü olması dolayısı ile uygun çözücü olarak görülmüştür. Tercih edilen çözücülerde ikili çözücüler ilaçları farklı derecelerde etkilemiştir. Sonuç olarak izopropil alkol kullanılmış ve iyi sonuçlar elde edilmiştir .

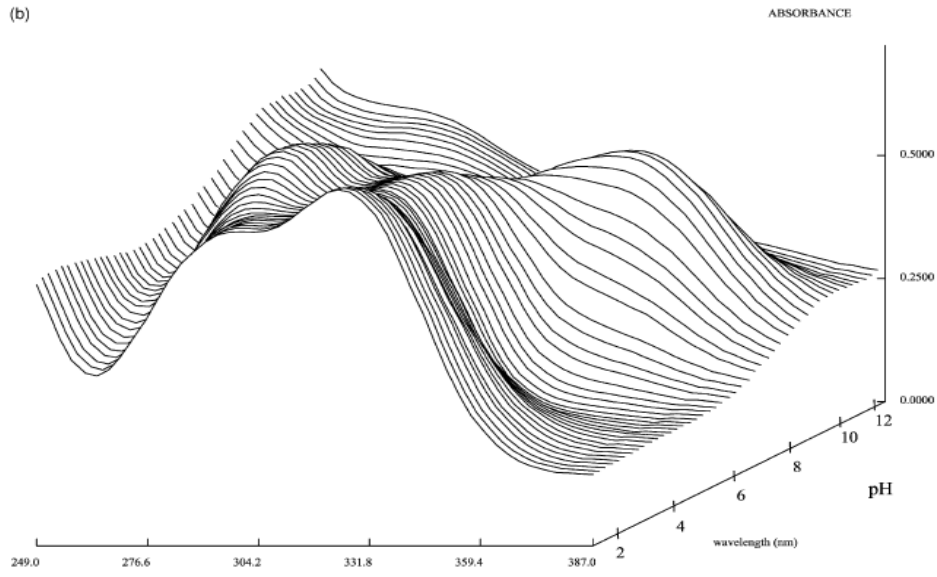
F.Z. Erdemgil ve ark.'nın (2007) yaptığı bir çalışmada, bazı hidroksi benzoik asitlerin pKa değerleri metanol-su ikili karışımında LC metodu ve potansiyometrik yöntemle hesaplanmıştır. Polifenolik asitler bitkilerde oluşan biyoaktif ürünlerin arasında geniş bir yelpazeye sahip olduklarından son zamanlarda önemli çalışmalarda kullanılmıştır. 11 polifenolik asidin pKa değerleri %10, %20, %30 (v/v) metanol-su karışımında potansiyometri, LC ve LC-DAD yöntemleriyle saptanmış olup literatürde verilen değerlerle ve online pKa değeri hesaplayan bir program olan SPARC sonuçları ile de karşılaştırılmıştır. Çalışmanın potansiyometrik kısmı ise

Gran Metoduna göre yapılmış ve yine pKa değerlerinin hesaplanmasında PKPOT (Potansiyometrik pKa) programı kullanılmıştır.

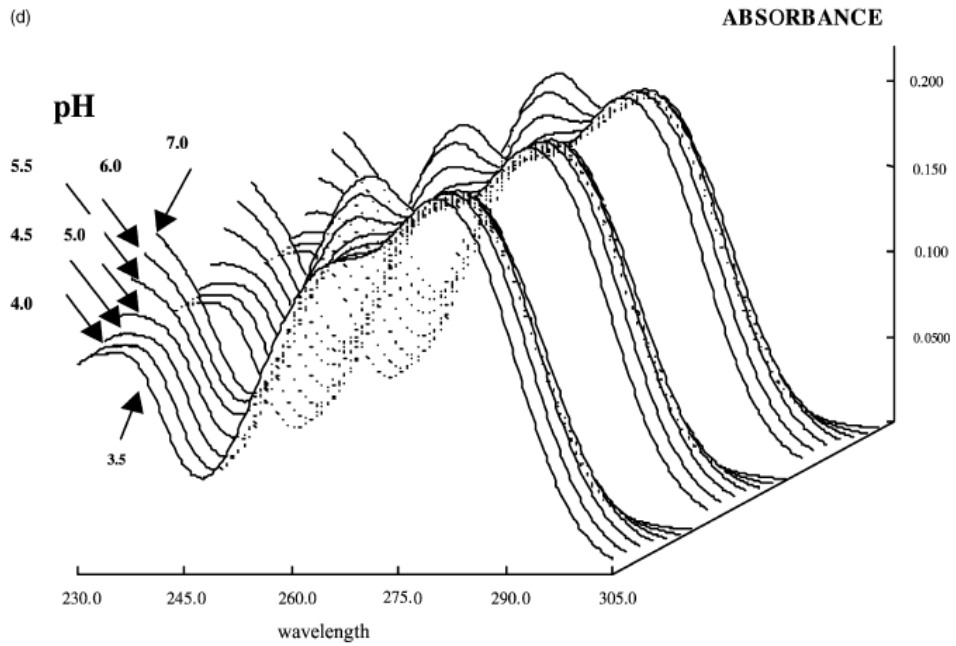
Öğretir ve ark.'nın (2001) yaptığı bir çalışmada ise bazı imidazol türevlerinin asitlik sabitleri spektrofotometrik olarak belirlenmiştir. Çalışmada sekiz tane biyolojik olarak aktif imidazol türevinin pKa' ları sepektrofotometrik yöntemle belirlenmiş ve elde edilen asitlik sabitleri ile bu türevlerin protanosyan mekanizmaları belirlenmiştir.

Barbosa ve ark.'nın (2001) yaptığı bir çalışmada ise zwitterik yapıdaki bazı kinolonların % 50 asetonitril-su ortamında farklı metotlarla pKa değerleri tayin edilmiştir. Kapiler elektroforez, sıvı kromatografi, potansiyometrik ve spektrofotometrik metotları kullanılmış elde edilen sonuçlar birbiriyle karşılaştırılmıştır. pKa sabitleri belirlenen bazı kinolonlar şöyledir : ofloksasin pKa2 değeri 8,76 , enoksasin pKa2 değeri 8,95 , siprofloksasinin pKa2 değeri 8,95 olarak bulunmuştur .

J.L. Beltrán ve ark.'nın (2003) yaptığı bir çalışmada polifenolik asitlerin pKa değerleri su ve asetonitril-su ortamlarında spektrofotometrik, potansiyometrik ve kromatografik yöntemlerle hesaplanmıştır. Ayrıca yeni geliştirilen metotla daha önce elde edilen kromatografik piklerin maksimumları absorbans piklerine uyarlanmıştır. Bu metot LC-UV ( diode array dedektör–DAD)'den elde edilen örneklere uygulanabileceği gibi, LC ve spektrofotometrik metotlarda saf olmayan örneklerde kullanılması avantajlıdır. Sonuç olarak, farklı metotların avantajları, dokuz polifenolik asidin su ve asetonitril-su ortamında pKa' larının tayininde kullanılması ve uygulanabilirliği belirtilmiştir. pKa hesaplamaları PKPOT programı ile yapılmış olup literatürdeki sonuçlarla karşılaştırılmıştır .



**Şekil-5.3.** Kafeik asidin % 30 MeCN ortamındaki pH-absorbans değerlerinin PKPOT grafiği.



**Şekil-5.4.** Kafeik asidin LC piklerinin maksimumunun alındığı UV spektrumu

N. Şanlı ve ark.'nın (2002) yaptığı bir çalışmada ise son zamanlarda biyolojik özelliklerinden dolayı ilgi gören polifenolik asitlerin çileklerde ayırımının optimizasyonu yapılmış, kromatografik alıkonma ve pKa değerleri hesaplanmıştır. Bu çalışmada hareketleri faz olarak kullanılan asetonitril-su karışımının pH'ı bir seri polifenolik bileşiği ayırmak için optimize edilmiştir. Lineer solvasyon enerjisi, tek

çözücü polarite parametresine dayalı formüle edilmiş ve  $E_T^N$  bağıntısı eluentteki asetonitril yüzdesinin fonksiyonu olarak kromatografik davranışlarını tahmin etmek için kullanılmıştır. Ayrıca alıkonma ve su-organik fazın arasında kurulan ilişki mobil fazın pH'ını optimize etmek için kullanılmıştır. Optimize mobil fazın (% 12 asetonitril) pH'ı formik asit tamponuyla pH 4,25'e ayarlanmıştır. Ayrıca, asetonitril-su karışımındaki polifenolik asitlerin pKa değerleri kromatografik verilerle saptanmış ve optimize edilen koşulları valide etmek için bir seri polifenolik bileşik çileklerde çalışılmıştır .

N. Şanlı ve ark.'nın (2005) yaptığı “ Polifenolik Asitlerin Sıvı Kromatografisinde Alıkonmaları Modellenerek Çözücü Bileşimi ve Hareketli Fazın pH'nın Tahmini” başlıklı çalışmada, , bir seri polifenolik asidin alıkonma davranışı, bu bileşikler arasındaki kromatografik rezolüsyonu (ayırimsal çözünürlük) optimize etmek için su-asetonitril hareketli fazlarında modellenmiştir. Alıkonma modelinin, pH ile çözünenlerin alıkonma faktörleri ve hareketli fazın solvatokromik parametresi ( $E_T^N$ ) arasındaki ve bileşiklerin çözünürlük çarpımları ve organik modifiyerin (değiştiricinin) mol kesri (fraksiyonu) arasındaki bağıntıya dayandığı ifade edilmiştir. Bu iyonlaşabilen bileşiklerin alıkonması, 3,5-7,0 arasında değişen altı farklı pH'da ve üç farklı asetonitril yüzdesinde (%10, 20 ve 30) çalışılmıştır. Çalışmada, üç farklı uydurma (tasarlanmış, kurgulanmış) işlem uygulanmıştır: model I, bütün veri noktaları için doğrusal olmayan bir regresyon içerir, halbuki model II ve III sırasıyla yalnızca aşırı pH /  $E_T^N$  değerlerinden alınan dört ve iki veri noktası kullanır. Bu modellerden elde edilen sonuçlar, model I için yaklaşık % 5 ve model II ve III için de yaklaşık % 10 hata ile her bir bileşik için gerçek ve tahmini alıkonma faktörleri için bir uyum göstermiştir. Bağlı olarak geniş bir pH ve asetonitril aralıklarının yüzdesinde alıkonma davranışını anlatmak üzere , her bir bileşik için yalnızca iki deneye ihtiyaç duyulduğundan dolayı model III'ün sonuçlarının özel ilgiye sahip olduğu; bunun özellikle de çeşitli bileşiğin kromatografik ayırımı için hareketli fazın optimizasyonunda değerli olduğu belirtilmiştir .

Wan H. ve ark.'nın (2002) yaptığı “ Kısa-son Enjeksiyon ile Birleştirilmiş Basınç-destekli Kapiler Elektroferezle İlaçların pKa Değerlerinin Hızlı Görüntülenmesi” başlıklı çalışmada, kısa-son enjeksiyon ile birleştirilmiş basınç-destekli kapiler elektroferez uygulanarak bir yöntem, ilaçların pKa değerlerinin hızlı

görüntülenmesi için geliştirilmiştir. Elektroforetik ayırma, uygulanan basınç altında kısa-son enjeksiyon ile kısa bir kapiler uzunluğunda yapılmıştır ve etkin hareketlilik, sabit iyonik şiddetle ( $I = 50.05$ ) 10 farklı tamponun bir serisinde ölçülmüştür. Basınç uygulanmasının yalnızca, göç zamanını özellikle daha düşük pH tamponlarında azaltmadığı, aynı zamanda etkin hareketlilik ölçümlerinin tekrarlanabilirliğini düzelttiği belirtilmiştir. Etkin hareketlilik üzerine basıncın etkisi çeşitli pH değerlerinde incelenmiştir. İlk önce pH asidik analitler için  $pK'$ 'nin üzerinde olduğunda, basınçtaki bir artışı etkin hareketlilik üzerinde az bir azalmaya sebep olduğu, ayrıca pH  $pK'$ 'nin altındayken basıncın arttırılmasıyla etkin hareketlilik artışı gözlenmiştir. Bununla birlikte, basınç uygulamasıyla gözlenen etkin hareketlilik kaymasının,  $pK_a$  değerlerinin tayininde önemli ölçüde etkin olmadığı ifade edilmektedir. Tayin edilen  $pK_a$  değerlerinin, yayınlanan verilerle iyi bir uyum içinde olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bir yığıma (istif) koşulu, duyarlılığı arttırmak için uygulanmış ve iç çapı  $50 \mu m$  olan bir kapiler kullanarak UV dedeksiyonu ile  $2 \mu M$ 'ın altındaki derişim kolaylıkla saptanabilmiştir. Bu teknik, özellikle suda az çözünen bileşiklerin  $pK_a$  değerlerinin ölçülmesi için uygundur. Yöntem, genel olarak kullanılan sodyum hidroksit ve suyla ön şartlandırma basamaklarını da yapmamaktadır (ihmal etmektedir). Aşırı ön şartlandırma basamaklarının dışlanması ve basınç kullanımı toplam çevrimsel analiz süresini azaltır ve doğruluğu kaybetmeksizin bileşik başına 40 dakikadan az bir sürede  $pK_a$  tayinini mümkün kılar.

## 6. MATERYAL VE YÖNTEM

### 6.1. Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada floresans ölçümleri Perkin Elmer LS/55 floresans spektrofotometresi kullanıldı. Uyarma monokromotorunun slit aralığı 10 nm emisyon monokromotorunun slit aralığı ise 10 nm olarak ayarlandı ve tüm ölçümler bu aralıkta yapıldı. Spektrofotometrik ölçümler için ise Perkin Elmer marka UV-görünür bölge spektrofotometre kullanıldı.

Deney çözeltilerinin pH' larını ayarlamak amacıyla ORION 520 A(+) marka pH-metre ve Orion marka kombine cam-pH elektrodu kullanıldı. pH-metrenin kalibrasyonu, Merck firmasından temin edilen pH 4 ve pH 7 tampon çözeltileri kullanılarak yapıldı.

Çözeltilerimizi hazırlamak için kullanılan ultra saf su Pure Lab Option-Q ELGA DV25 marka cihazdan elde edilmiştir.

### 6.2. Kimyasal Maddeler

#### 6.2.1. Antihipertansifler

Çalışmada kullanılan Enalapril, Quinapril, Ramipril, Lisinopril ve Hidroklorotiazid Sigma-Aldrich firmasından temin edildi.

#### 6.2.2. Çözücüler

Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan metanol, asetonitril Merck firmasından temin edildi. Tüm deneysel çalışma boyunca çözeltilerin hazırlanmasında, ultra saf su kullanıldı.

**Tablo-6.1.** Çalışmalarda Kullanılan Çözücüler

Çözücü	Firma	Saflık Derecesi
<i>Asetonitril</i>	Merck	99,5
<i>Metanol</i>	Merck	99,9

### 6.2.3. Çözeltiler

Kullanılan antihipertansiflerin metanol, asetonitril ve ultra saf suda  $10^{-3}$  M derişimde stok çözeltileri hazırlandı. Floresans özelliklerinin incelenmesinde, pH çalışmalarında bu çözeltiler kullanıldı. pH çalışmasında ayrıca tampon çözeltiler ve ortamın iyonik şiddetini dengede tutmak için 0,5 M KCl çözeltisi kullanıldı.

#### 6.2.3.1. Tampon Çözeltiler

**pH 2.0 tamponu ;** 8.95 g Disodyum hidrojen ortofosfat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) ve 3.40 g Potasyum dihidrojen ortofosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) çözeltisi 1000 mL ultra saf su ile hazırlandı. Çözeltinin pH' ı ortofosforik asit ile ayarlandı.

**pH 3.0 tamponu ;** 34 g Potasyum dihidrojen ortofosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) çözeltisi 250 mL ultra saf su ile hazırlandı ve pH 3.0' e ortofosforik asit ile ayarlandı.

**pH 4.0 tamponu ;** 6.8 g Potasyum dihidrojen ortofosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 700 mL suda çözüldü pH için % 10 (v/v) ortofosforik asit çözeltisi eklenip yeteri miktarda su ile 1000 mL' ye tamamlandı.

**pH 5.0 tamponu ;** 40 g Sodyum dihidrojen ortofosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) ve 1.2 g sodyum hidroksit ( $\text{NaOH}$ ) yeteri miktarda suda çözülüp 100 mL' ye tamamlandı. pH değeri 1 M NaOH ile 5.0' e ayarlandı.

**pH 6.0 tamponu ;** 6.8 g Sodyum dihidrojen ortofosfat ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ) çözeltisi 1000 mL suda hazırlanıp, 10 M NaOH ile pH 6.0' ya ayarlandı.

#### **pH 7.0 tamponu ;**

A çözeltisi : 0.908 g potasyum dihidrojen ortofosfat suda çözülerek 100 mL' ye tamamlandı.

B çözeltisi : 2.38 g disodyum hidrojen ortofosfat suda çözülerek 100 mL' ye tamamlandı.

38.9 mL A çözeltisinden, 61.1 mL B çözeltisinden alınıp karıştırıldı.



**pH 8.0 tamponu** ; 136.1 g potasyum dihidrojen ortofosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) çözeltisi hazırlanıp 1M NaOH ile pH 8.0' e ayarlandı ve yeteri miktarda su ile 1000 mL' ye tamamlandı.

**pH 9.0 tamponu** ; 1.74 g potasyum dihidrojen ortofosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 80 mL suda çözüldü ve 1 M KOH ile pH 9.0' a ayarlanarak 100 mL' ye tamamlandı .

### 6.2.3.2 Yüzde Çalışması İçin Çözeltilerin Hazırlanması

Yüzde çalışması yapmak için maddelerin  $1 \times 10^{-3}$  M metanol veya asetonitril stok çözeltisinden 10 mL' lik balon jöjeye 1 mL alındı.

**% 10' luk çözelti için** ; Alınan 1 mL numune üzerine 9 mL su ilave edildi.

**% 20' lik çözelti için** ; Alınan 1 mL numune üzerine, 1 mL çözücü eklenip 8 mL su ilavesiyle hacim 10 mL' ye tamamlandı.

**%30' luk çözelti için** ; Alınan 1 mL numune üzerine, 2 mL çözücü eklenip 7 mL su ilavesiyle hacim 10 mL' ye tamamlandı.

**% 40'lik çözelti için** ; Alınan 1 mL numune üzerine 3 mL çözücü eklenip 6 mL su ilavesiyle hacim 10 mL' ye tamamlandı.

### 6.2.3.3. pH Çalışması İçin Çözeltilerin Hazırlanması

pH 2 ile pH 9 arasında tampon çözeltiler hazırlandıktan sonra pKa çalışması için gerekli olan çözeltiler hazırlanmıştır. Çözeltilerin hazırlanmasında şu yol takip edilmiştir;

25 mL beher içerisine 1 mL stok çözelti, 1 mL tampon çözelti , 1 mL KCl çözeltisi konulduktan sonra yaklaşık 5-6 mL % organik çözücü-su karışımı eklendi. Kalan 1 mL hacim ile pH istenilen değere 1 M HCl ve 1 M NaOH yardımıyla getirildi.

### 6.2.3.4. Tabletlerde Tayin için Çözeltilerin Hazırlanması

Tabletlerde tayin için kinapril, 25 mg kinapril ve 12,5 mg HCT içeren ticari tablet ve yine kinapril ve HCT' den oluşan kendi hazırladığımız karışımın % 40 organik çözücü-su ortamında  $1 \times 10^{-4}$  M olacak şekilde çözeltileri hazırlanmıştır. Kinapril çözeltisi  $1 \times 10^{-4}$  M olacak şekilde tartılıp 25 mL' lik balon jodede % 40 metanol-su karışımıyla hazırlandı.

Ticari tablet çözeltisi için ise 5 adet tablet alınıp havanda dövüldü, tamamen toz haline geldikten sonra yaklaşık bir tablet ağırlığında bir kısım tartıldı ve % 40 metanol-su ortamında yarım saat manyetik karıştırıcı yardımıyla karıştırıldı. Daha sonra süzme işlemi yapılarak süzüntü 25 mL' lik balon jodaye aktarıldı.

Sentetik karışım ise yine  $1 \times 10^{-4}$  M olacak şekilde kinapril ve HCT tartılıp % 40 metanol-su ortamında çözüldü.

## 6.3. Deneysel İşlem

### 6.3.1. ADE İnhibitörlerinin Floresans Özelliklerinin İncelenmesi

Enalapril, Quinapril, Ramipril ve Lisinoprilin floresans özelliklerini belirlemek için şu yol izlendi ;

Bir ACE inhibitörü olan enalapril, kinapril, ramipril ve lisinoprilin floresans özelliğinin incelenmesi için başlangıç olarak  $1 \times 10^{-3}$  M olacak şekilde tartım alındı. Asetonitril, metanol ve ultra saf suda maddelerin çözeltileri hazırlandı.

**Tablo-6.2.** Kullanılan çözücülerin özellikleri ve solvatokromik parametreleri ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\pi^*$ , DN, AN)

Çözücü	D <sup>a</sup>	$\mu^b$	$\eta^c$	$\alpha$	$\beta$	$\pi^*$	DN <sup>d</sup>	AN <sup>e</sup>	E <sub>T</sub> <sup>(30)</sup>	$\lambda_{ex}, nm$	$\lambda_{em}, nm$	F.I. (A.U)
Su	78.39	1.84	0.89	1.17	0.47	1.09	18.0	54.8	63.1	260	285	27.77
Metanol	38.70	1.66	0.54	0.98	0.66	0.60	30.0	41.3	55.4	260	404	120.92
Asetonitril	37.50	3.37	0.34	0.19	0.40	0.66	14.1	18.9	45.6	260	405	99.2

<sup>a</sup> Çözücünün dielektrik sabiti (20-25°C)

<sup>b</sup> Çözücünün dipol moment (debye biriminde)

<sup>c</sup> Çözücünün viskozitesi (centipoise biriminde)

<sup>d</sup> Gutman'ın donör sayısı

<sup>e</sup> Gutman-Mayer akseptör sayısı

$\alpha$  = Kamlet-Taft Lewis-asitlik (hidrojen bağı donörü) parametresi  
 $\beta$  = Kamlet-Taft Lewis-bazlık parametresi  
 $\pi^*$  =Kamlet-Taft polarlık /polarizlenebilirlik parametresi

**Tablo-6.3.** Enalaprilin çözünme özellikleri

ÇÖZÜCÜLER	ÇÖZÜNME ÖZELLİKLERİ (Oda Sıcaklığında)
<i>Asetonitril</i>	✓ Çözündü
<i>Metanol</i>	✓ Çözündü
<i>Su</i>	✓ Çözündü

**Tablo-6.4.** Kinapriline çözünme özellikleri

ÇÖZÜCÜLER	ÇÖZÜNME ÖZELLİKLERİ (Oda Sıcaklığında)
<i>Asetonitril</i>	✓ Çözündü
<i>Metanol</i>	✓ Çözündü
<i>Su</i>	✓ Çözündü

**Tablo-6.5.** Ramiprilin çözünme özellikleri

ÇÖZÜCÜLER	ÇÖZÜNME ÖZELLİKLERİ (Oda Sıcaklığında)
<i>Asetonitril</i>	✓ Çözündü
<i>Metanol</i>	✓ Çözündü
<i>Su</i>	✓ Çözündü

**Tablo-6.6.** Lisinoprilin çözünme özellikleri

ÇÖZÜCÜLER	ÇÖZÜNME ÖZELLİKLERİ	
	Oda Sıcaklığında	50 °C
<i>Asetonitril</i>	— Çözünmedi	— Çözünmedi
<i>Metanol</i>	✓ Çözündü	
<i>Su</i>	✓ Çözündü	

Tablolardan da görüldüğü gibi bütün maddeler seçilen çözücülerde çözünmüş sadece lisinopril asetonitrilde çözünmemiştir. Bu çözücülerdeki floresans özelliklerini incelemek amacıyla sırasıyla her maddenin spektrofotometride 200-800 nm arasında 10

nm aralıklarla çoklu spektrumları alındı. Daha sonra kullanılan çözücülerin de aynı aralıkta çoklu spektrumları alınıp çözücünün en düşük maddenin en yüksek floresans şiddeti verdiği en uygun uyarma dalga boyu ( $\lambda_{ekz}$ ) ve emisyon dalga boyu ( $\lambda_{em}$ ) belirlendi.

Dalga boyu belirlenen her çözelti için yüzde çalışması yapıldı. Stok çözelti kullanılarak maddelerin % 10-40 arasında organik çözücü-su karışımı hazırlanıp belirlenen dalga boyunda tekli taratma yapıldı.

### **6.3.2. pH Çalışması**

Her madde için stok çözelti, tampon ve KCl alınarak %10-40 arasında organik çözücü-su karışımı ile 10 mL' ye tamamlanan sırasıyla pH 2, , pH 3.0, pH 4.0, pH 5.0, pH 6.0, pH 7.0, pH 8.0, pH 9.0 değerlerinde çözeltiler hazırlandı.

Hazırlanan çözeltiler önce spektrofotometride belirlenen dalga boylarında ölçüldü, daha sonra aynı gün içinde UV spektrofotometrede absorbans değerleri okutuldu.

### **6.3.3. Tabletlerde Tayin**

Hazırlanan çözeltiler spektrofotometrede daha önceden belirlenmiş dalga boyları dikkate alınarak taratıldı.

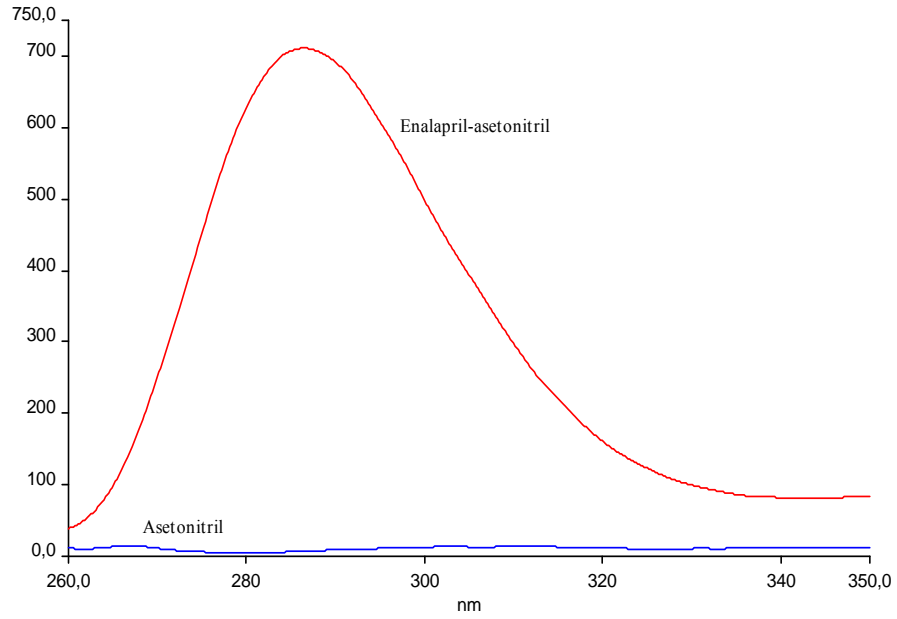
Ticari tablet ve kendi hazırladığımız karışım ilk önce kinaprilin uyarma dalga boyuyla daha sonra HKT' in uyarma dalga boyuyla uyarıldı. Pikler üst üste karşılaştırılıp karşılaştırıldı. Ayrıca her bir çözeltinin  $5 \times 10^{-5}$ ,  $1 \times 10^{-5}$ ,  $5 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-4}$ ,  $1 \times 10^{-3}$  konsantrasyon aralığında konsantrasyona karşı floresans şiddeti ölçüldü.

## 7. DENEY SONUÇLARI VE TARTIŞMA

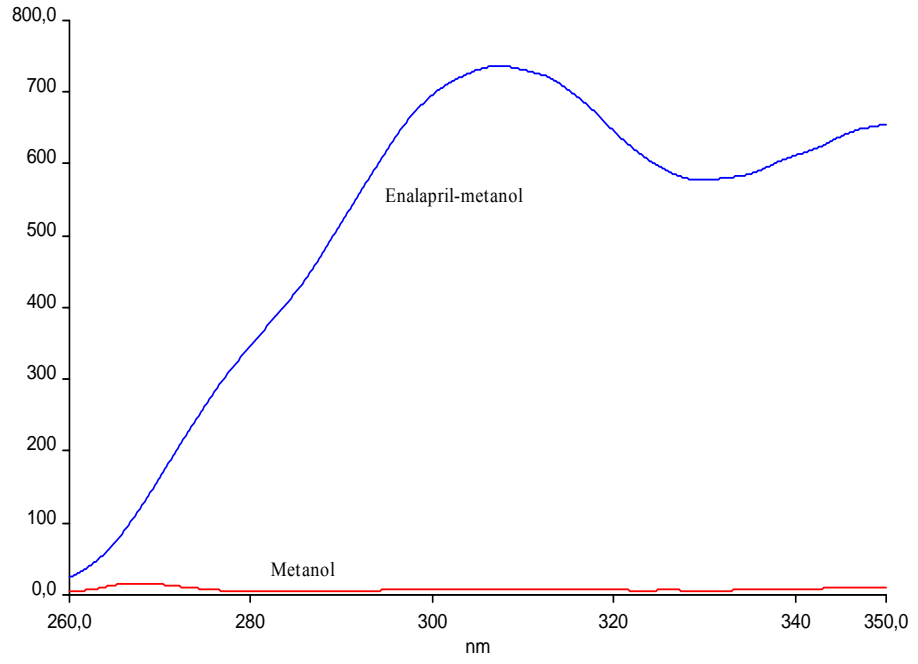
### 7.1. Floresans Şiddetine Çözücü Etkisi

#### 7.1.1. ADE İnhibitörlerinin Spektroflorimetrideki Emisyon Spektrumları

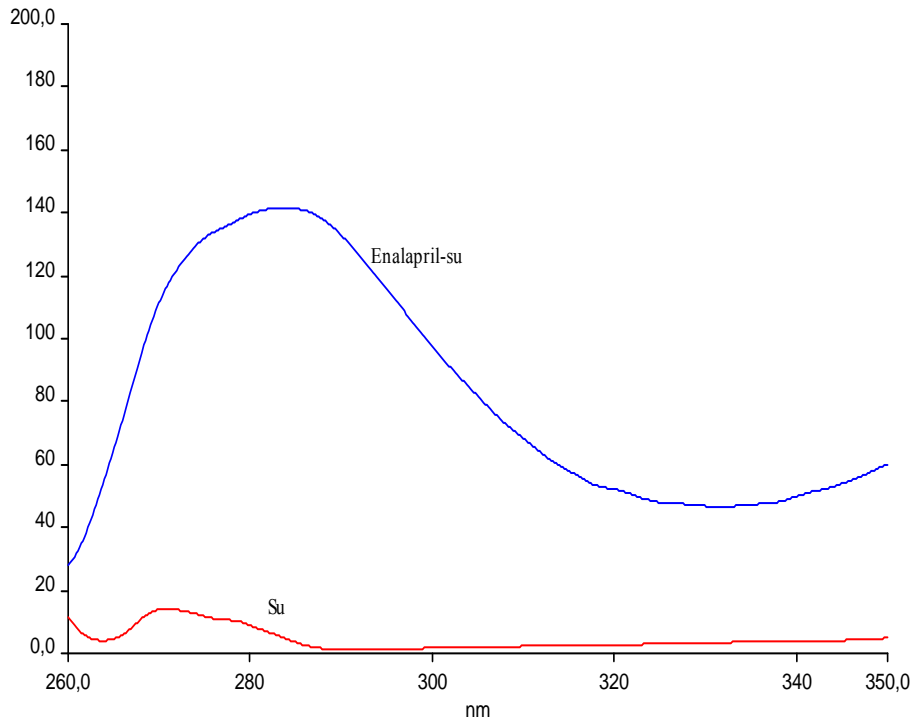
ADE inhibitörlerinin, asetonitril, metanol ve su ortamlarında 200-400 nm aralığında 10' ar nm aralıklarla değiştirilen uyarma dalga boylarında çoklu emisyon spektrum taramaları yapılmış, bu çoklu spektrum taramalarından yararlanılarak maksimum floresans şiddeti elde edilen uyarma ve emisyon dalga boyları belirlenmiştir. Aynı işlemler %10-%40 asetonitril ve %10-%40 metanol içeren sulu çözeltilere uygulanarak optimum dalga boyları belirlenmiştir.



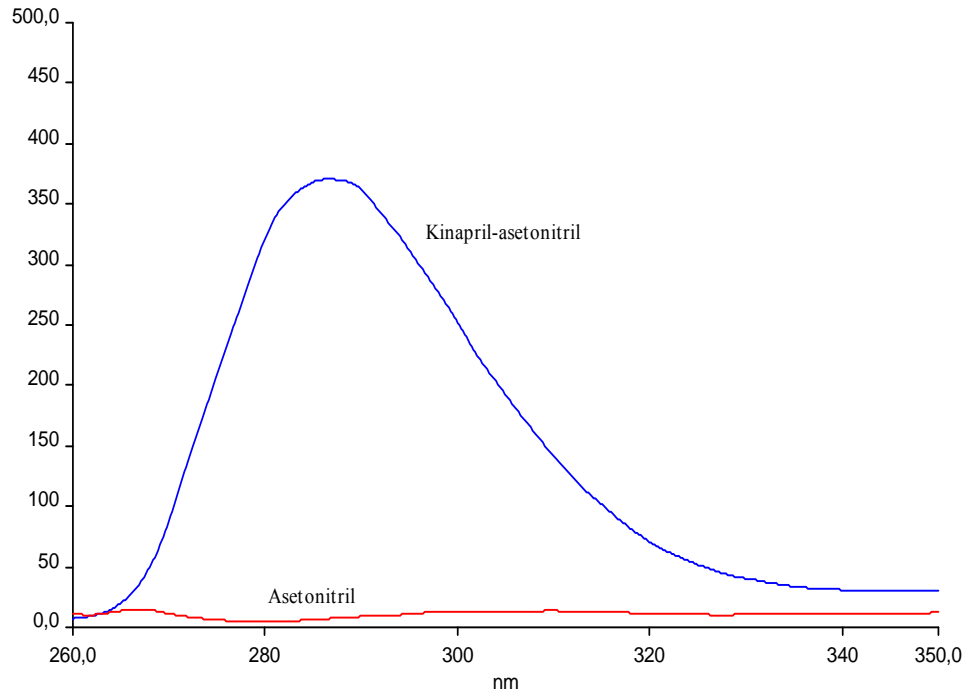
Şekil-7.1. Enalaprilin Asetonitrildeki emisyon spektrumu



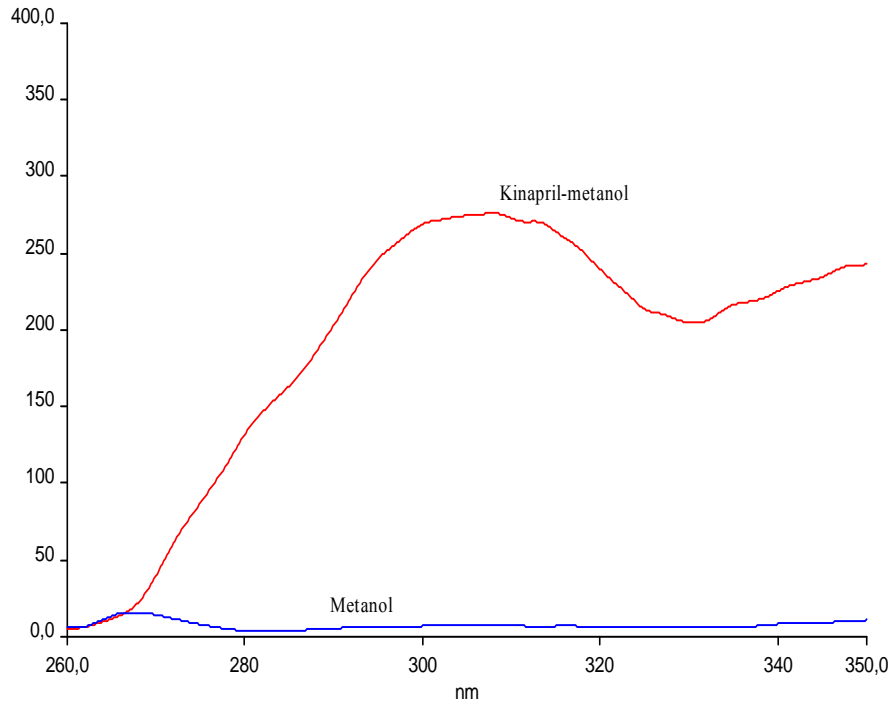
Şekil-7.2. Enalaprilin metanoldeki emisyon spektrumu



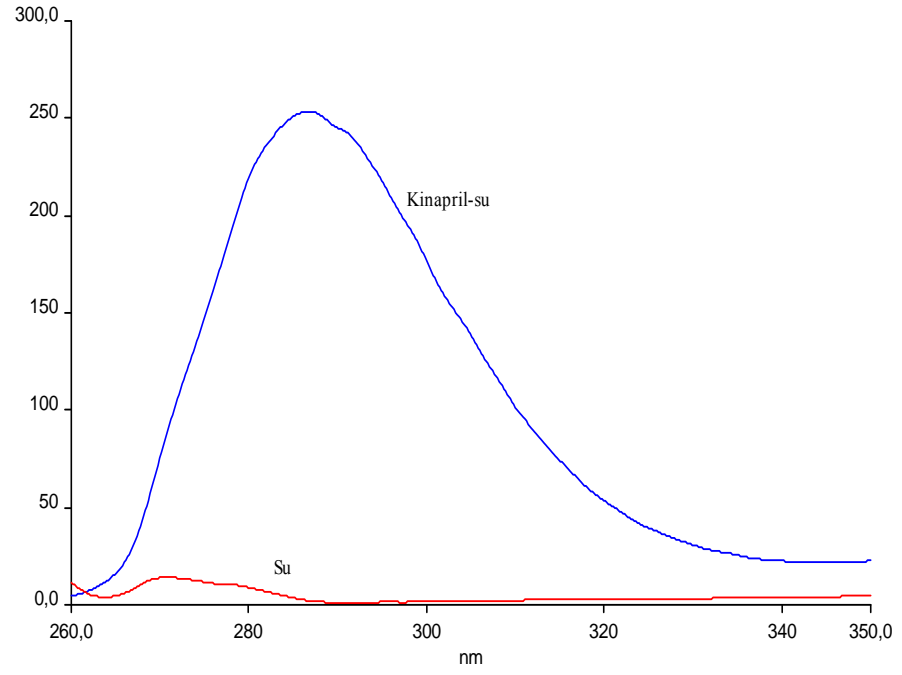
Şekil-7.3. Enalaprilin sudaki emisyon spektrumu



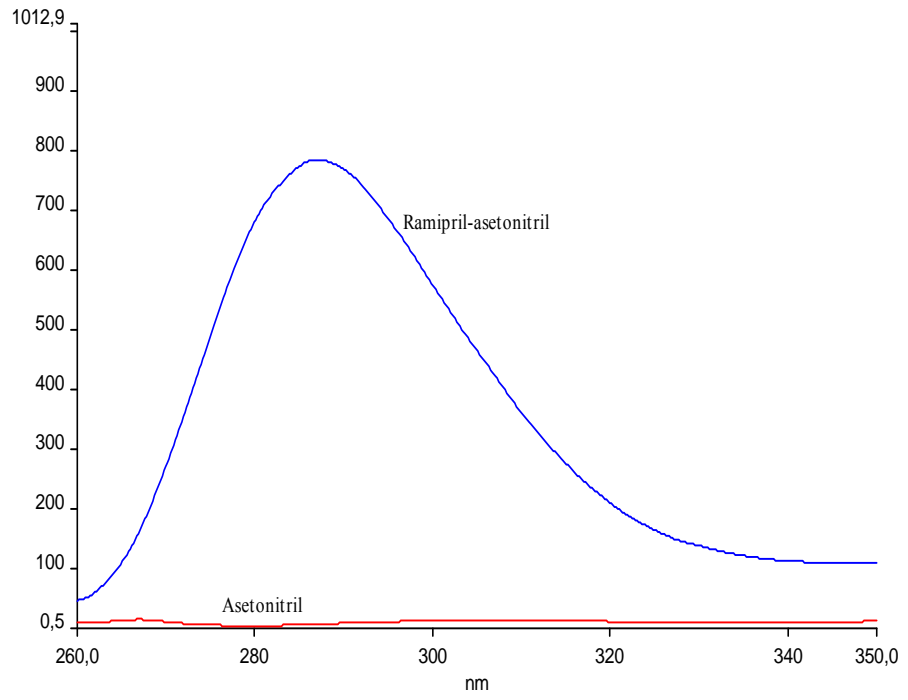
Şekil-7.4. Kinaprilin asetonitrildeki emisyon spektrumu



Şekil-7.5. Kinaprilin metanoldeki emisyon spektrumu

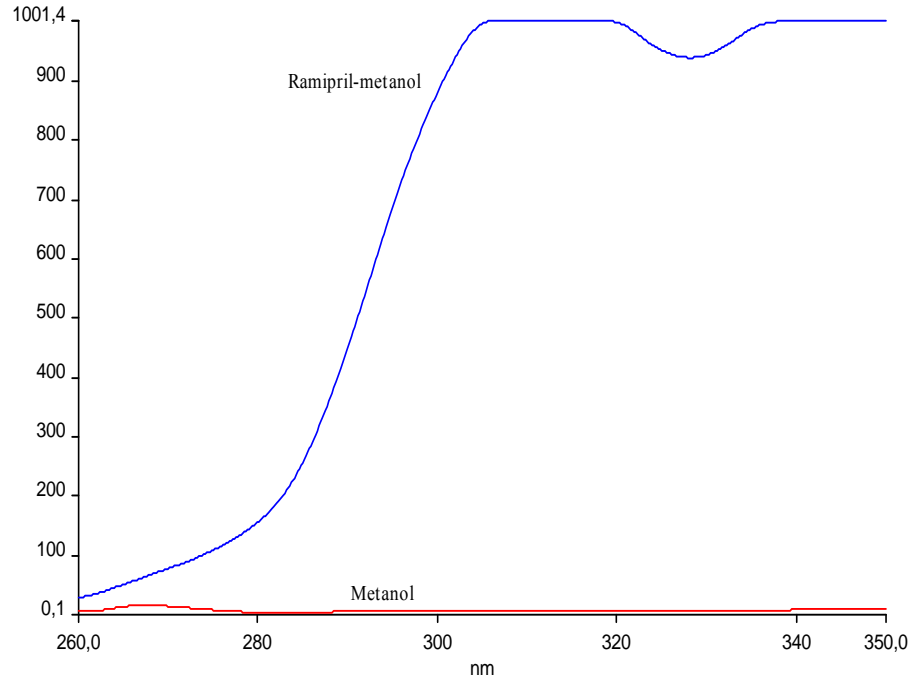


**Şekil-7.6.** Kinaprilin sudaki emisyon spektrumu

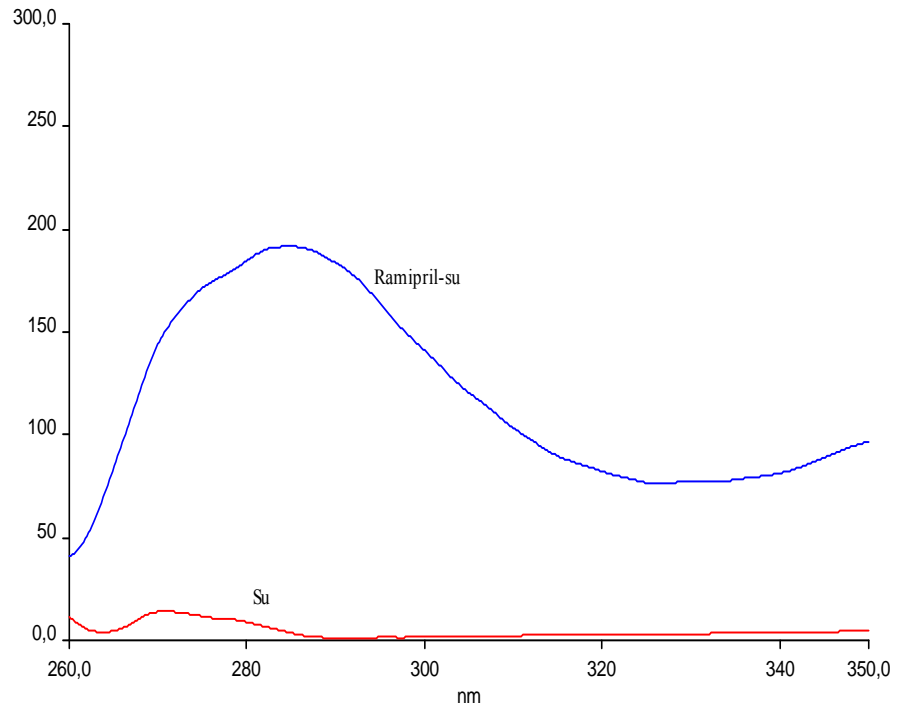


**Şekil-7.7.** Ramiprilin asetonitrildeki emisyon spektrumu

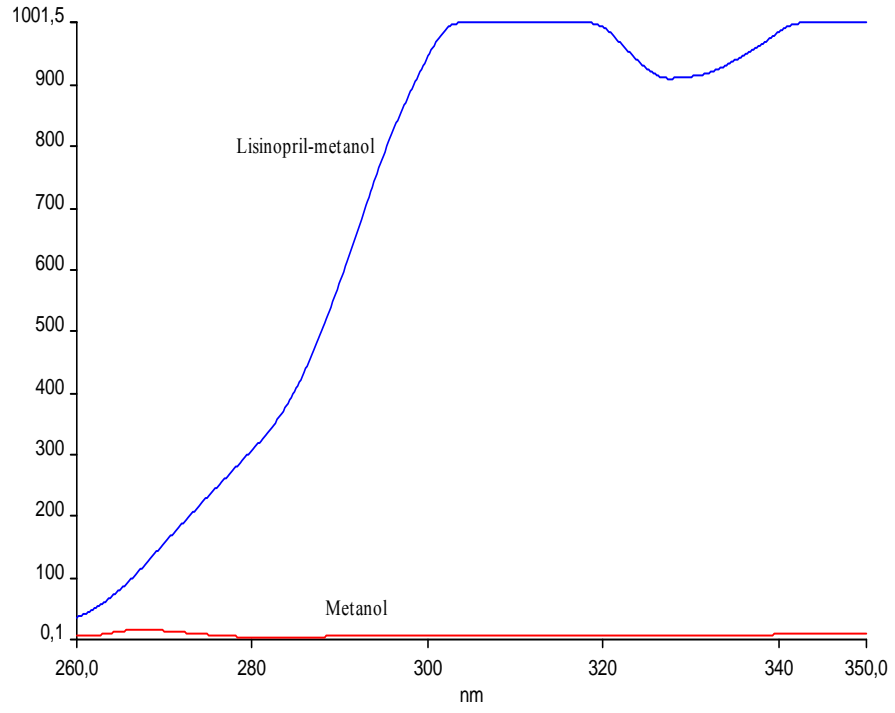




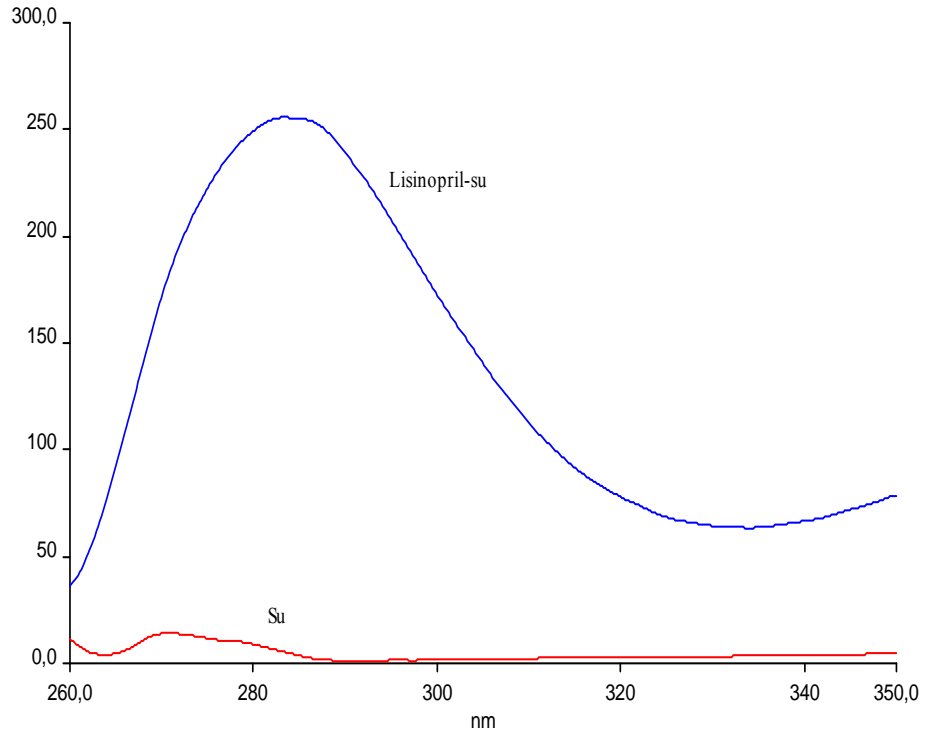
Şekil-7.8. Ramiprilin metanoldeki emisyon spektrumu



Şekil-7.9. Ramiprilin sudaki emisyon spektrumu



**Şekil-7.10.** Lisinoprilin metanoldeki emisyon spektrumu



**Şekil-7.11.** Lisinoprilin sudaki emisyon spektrumu

**Tablo-7.1.** Enalaprilin asetonitril, metanol ve sudaki  $\lambda_{ekz}$ ,  $\lambda_{em}$  ve floresans şiddeti değerleri

	Enalapril			Çözücü		
	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{em}$	Floresans Şiddeti	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{ems}$	Floresans Şiddeti
<b>Asetonitril</b>	248.23	286.80	710.64	248.23	286.80	7.26
<b>Metanol</b>	248.23	306.53	736.44	248.23	306.53	7.33
<b>Su</b>	248.23	283.90	141.58	248.23	283.90	4.72

**Tablo-7.2.** Kinapriline asetonitril, metanol ve sudaki  $\lambda_{ekz}$ ,  $\lambda_{em}$  ve floresans şiddeti değerleri

	Kinapril			Çözücü		
	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{em}$	Floresans Şiddeti	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{ems}$	Floresans Şiddeti
<b>Asetonitril</b>	248.47	286.98	370.42	248.47	286.98	7.36
<b>Metanol</b>	248.47	305.81	275.23	248.47	305.81	7.48
<b>Su</b>	248.08	286.98	253.63	248.08	286.98	1.96

**Tablo-7.3.** Ramiprilin asetonitril, metanol ve sudaki  $\lambda_{ekz}$ ,  $\lambda_{em}$  ve floresans şiddeti değerleri

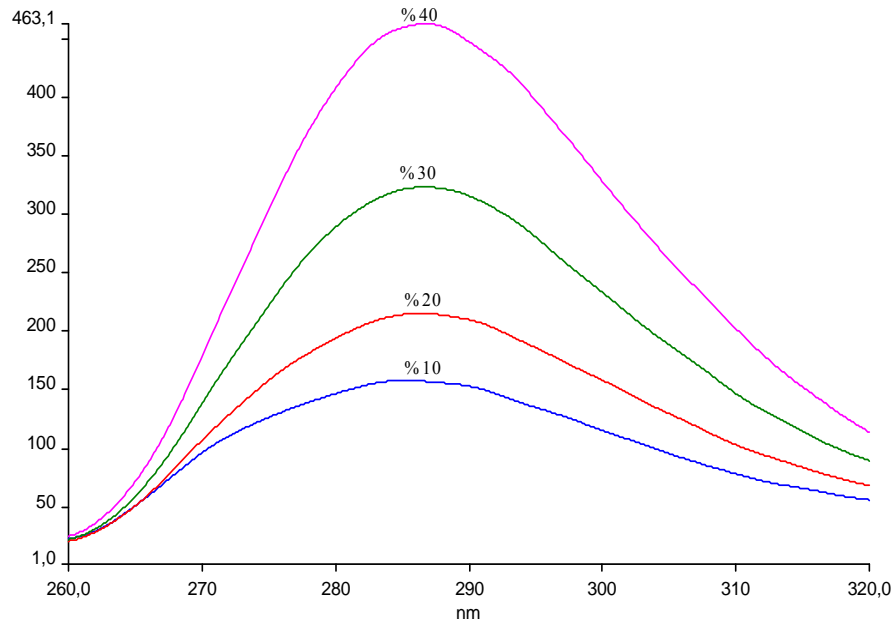
	Ramipril			Çözücü		
	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{em}$	Floresans Şiddeti	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{ems}$	Floresans Şiddeti
<b>Asetonitril</b>	248.23	287.16	785.03	248.23	287.16	7.45
<b>Metanol</b>	248.23	307.98	1000,42	248.23	307.98	7.22
<b>Su</b>	248.47	284.80	191.68	248.47	284.80	3.72

**Tablo-7.4.** Lisinoprilin asetonitril, metanol ve sudaki  $\lambda_{ekz}$ ,  $\lambda_{em}$  ve floresans şiddeti değerleri

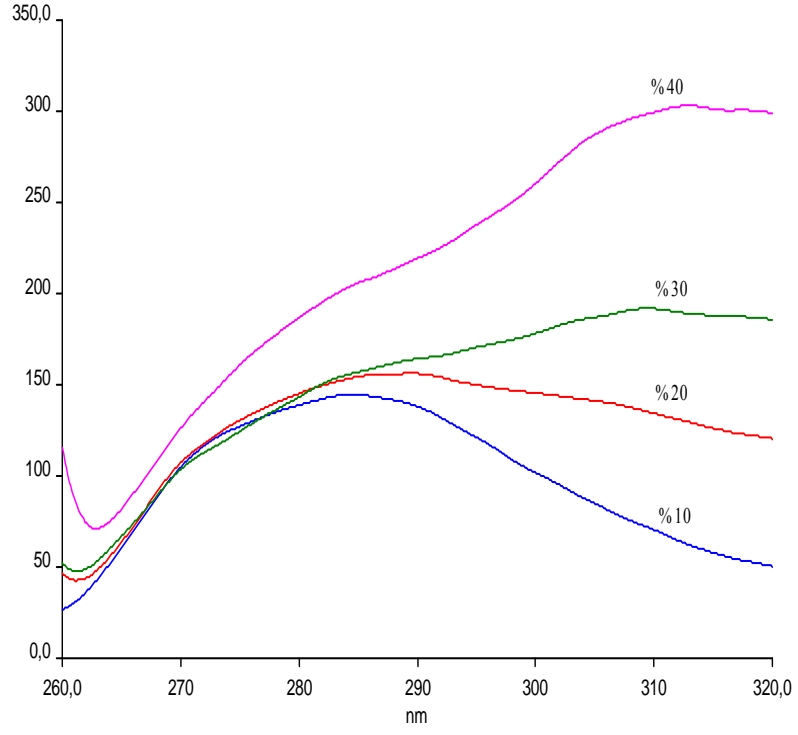
	Lisinopril			Çözücü		
	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{em}$	Floresans Şiddeti	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{ems}$	Floresans Şiddeti
<b>Metanol</b>	248.47	306.72	1000,03	248.47	307.98	7.29
<b>Su</b>	248.47	284.26	255.42	248.47	284.26	4.31

## 7.2. Floresans Şiddetine % Çözücü Etkisi

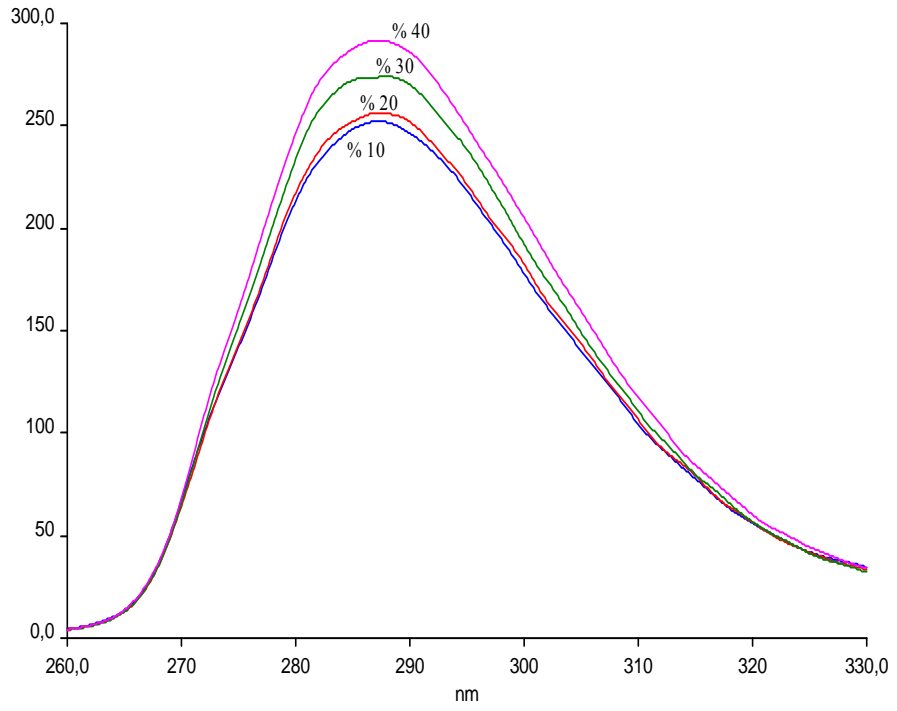
### 7.2.1. ADE İnhibitörlerinin Farklı Çözücü Yüzdelerinde Alınan Emisyon Spektrumları



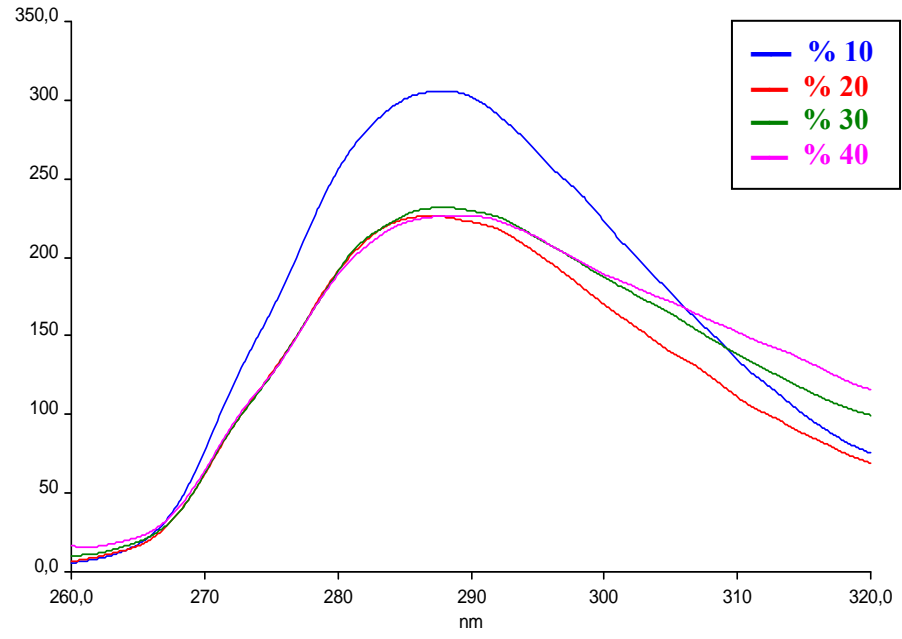
**Şekil-7.12.** Enalaprilin %10-40 asetonitril-su karışımlarındaki emisyon spektrumları



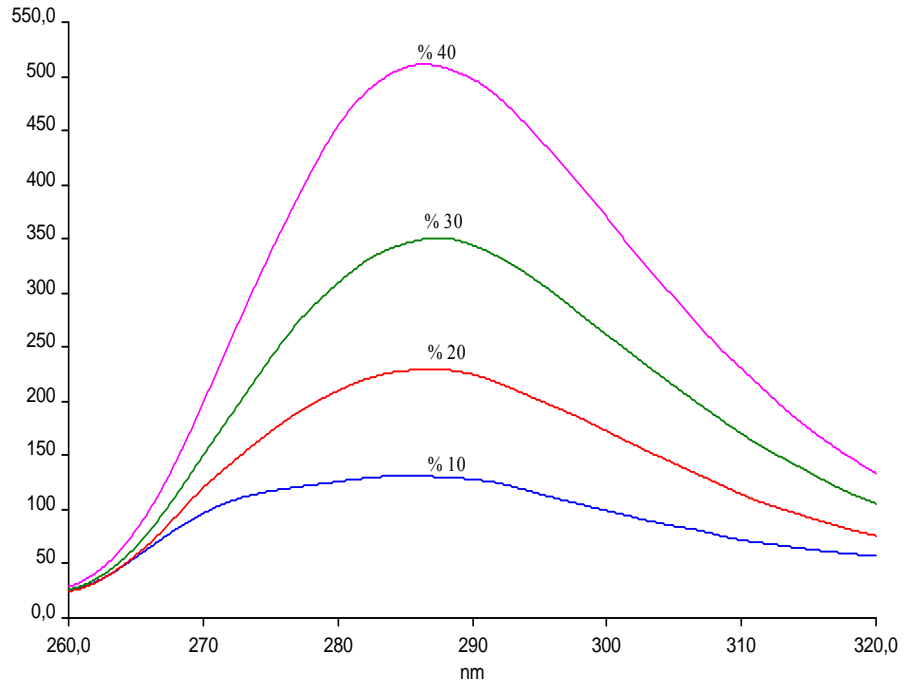
**Şekil-7.13.** Enalaprilin %10-40 metanol-su karışımlarındaki emisyon spektrumları



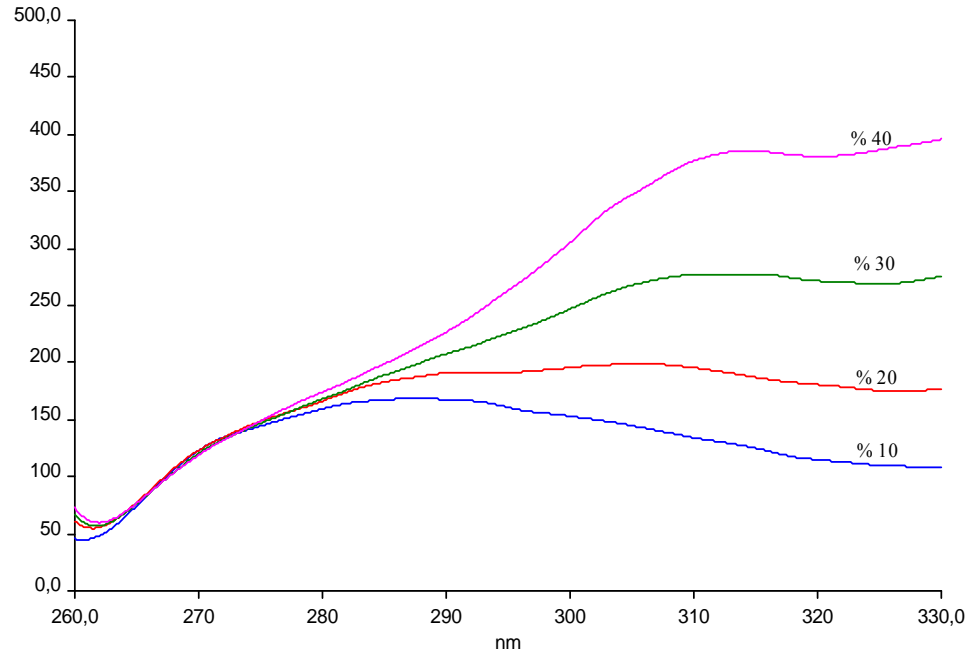
**Şekil-7.14.** Kinapriline %10-40 asetonitril-su karışımlarındaki emisyon spektrumları



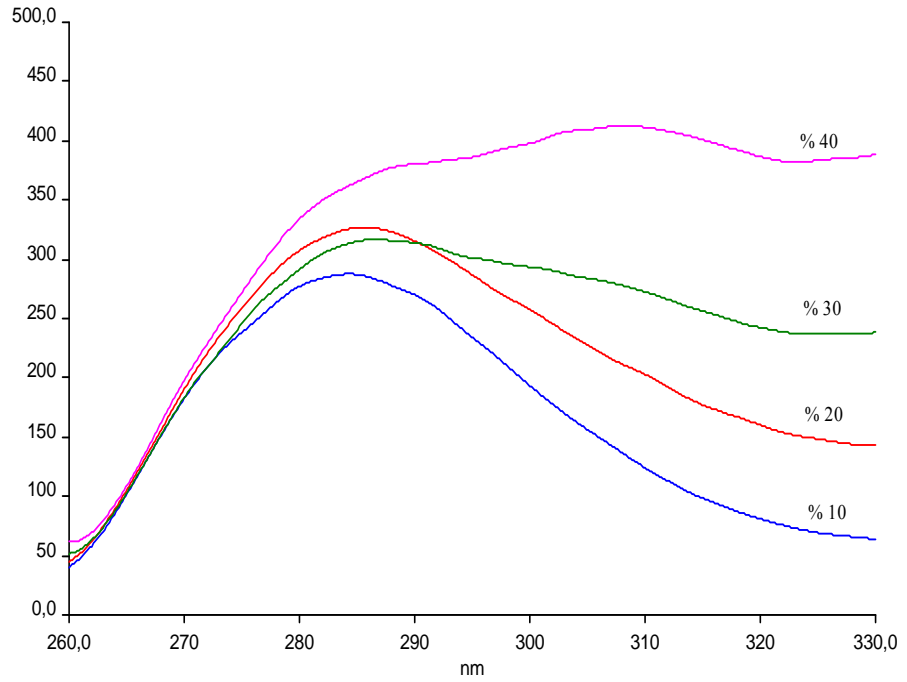
Şekil-7.15. Kinaprilin %10-40 metanol-su karışımlarındaki emisyon spektrumları



Şekil-7.16. Ramiprilin %10-40 asetonitril-su karışımlarındaki emisyon spektrumları



**Şekil-7.17.** Ramiprilin %10-40 metanol-su karışımlarındaki emisyon spektrumları



**Şekil-7.18.** Lisinoprilin %10-40 metanol-su karışımlarındaki emisyon spektrumları

**Tablo-7.5.** Enalapril ve Asetonitrilin  $\lambda_{ekz}$ ,  $\lambda_{em}$  ve floresans şiddeti değerleri

	Enalapril			Asetonitril		
	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{em}$	Floresans Şiddeti	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{ems}$	Floresans Şiddeti
% 10	248.43	285.63	158.01	248.43	248.43	2.23
% 20	248.43	286.33	215.55	248.43	248.43	2.36
% 30	247.79	286.90	323.42	248.43	247.79	3.06
% 40	248.43	286.90	463.10	248.43	248.43	3.06

**Tablo-7.6.** Enalapril ve Metanolün  $\lambda_{ekz}$ ,  $\lambda_{em}$  ve floresans şiddeti değerleri

	Enalapril			Metanol		
	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{em}$	Floresans Şiddeti	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{ems}$	Floresans Şiddeti
% 10	248.43	284.22	144.57	248.43	284.22	2.74
% 20	248.43	289.88	156.18	248.43	289.88	4.18
% 30	247.79	291.26	165.22	247.79	291.26	3.16
% 40	248.43	291.40	223.33	248.43	291.40	1.76

**Tablo-7.7.** Kinapril ve Asetonitrilin  $\lambda_{ekz}$ ,  $\lambda_{em}$  ve floresans şiddeti değerleri

	Kinapril			Asetonitril		
	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{em}$	Floresans Şiddeti	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{ems}$	Floresans Şiddeti
% 10	247.79	287.46	252.09	247.79	287.46	2.36
% 20	247.79	287.60	256.10	247.79	287.60	2.72
% 30	247.79	287.60	273.86	247.79	287.60	3.12
% 40	248.43	287.60	291.70	248.43	287.60	3.67



**Tablo-7.8.** Kinapril ve Metanolün  $\lambda_{ekz}$ ,  $\lambda_{em}$  ve floresans şiddeti değerleri

	Kinapril			Metanol		
	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{em}$	Floresans Şiddeti	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{ems}$	Floresans Şiddeti
% 10	248.43	288.02	305.77	248.43	288.02	2.97
% 20	248.43	287.60	226.22	248.43	287.60	3.71
% 30	247.79	288.30	231.66	247.79	288.30	2.97
% 40	248.43	289.43	226.29	248.43	289.43	1.78

**Tablo-7.9.** Ramipril ve Asetonitrilin  $\lambda_{ekz}$ ,  $\lambda_{em}$  ve floresans şiddeti değerleri

	Ramipril			Asetonitril		
	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{em}$	Floresans Şiddeti	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{ems}$	Floresans Şiddeti
% 10	248.00	285.35	167.60	248.00	285.35	2.70
% 20	248.43	287.32	187.07	248.43	287.32	3.71
% 30	248.43	285.96	192.39	248.43	285.96	2.59
% 40	248.43	286.50	206.73	248.43	286.50	1.64

**Tablo-7.10.** Ramipril ve Metanolün  $\lambda_{ekz}$ ,  $\lambda_{em}$  ve floresans şiddeti değerleri

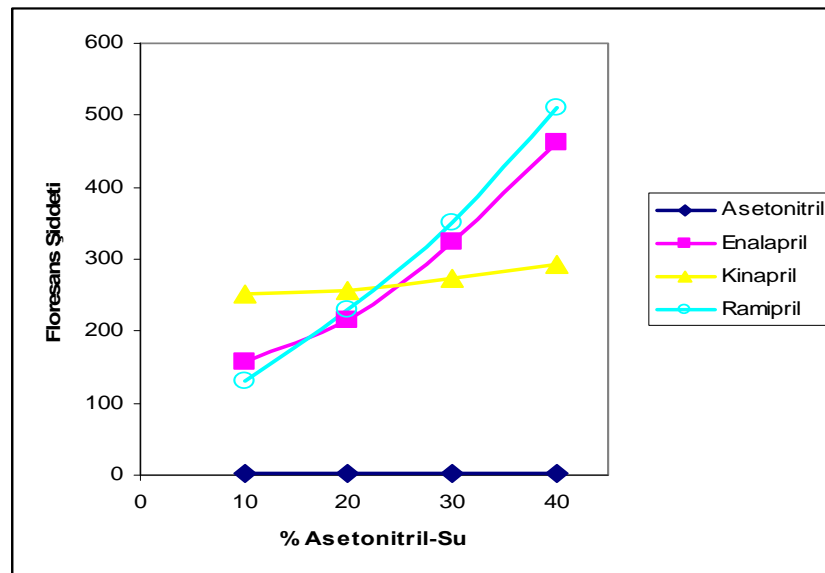
	Ramipril			Metanol		
	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{em}$	Floresans Şiddeti	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{ems}$	Floresans Şiddeti
% 10	248,43	286.33	130.89	248,43	286.33	2.33
% 20	248,43	286.90	229.49	248,43	286.90	2.57
% 30	247,79	287.46	350.85	247,79	287.46	3.12
% 40	248,43	286.76	510.83	248,43	286.76	3.55

**Tablo-7.11.** Lisinopril ve Metanolün  $\lambda_{ekz}$ ,  $\lambda_{em}$  ve floresans şiddeti değerleri

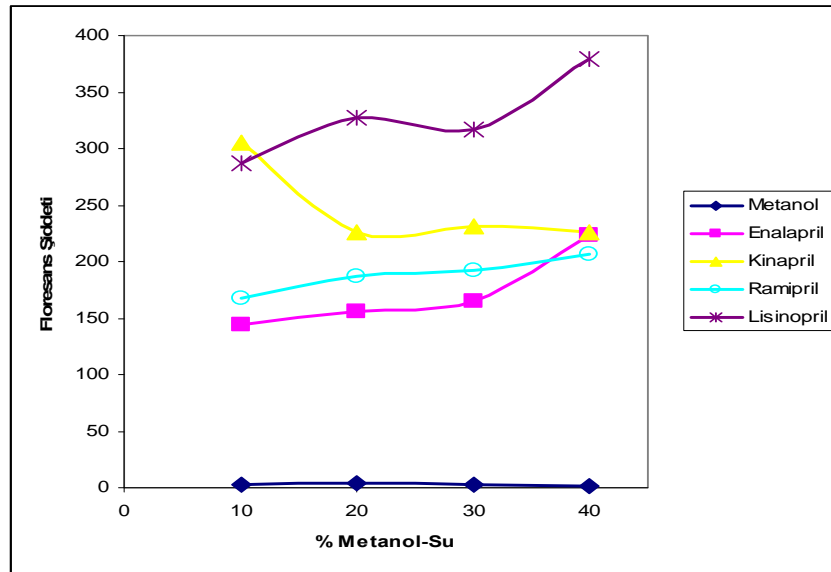
	Lisinopril			Metanol		
	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{em}$	Floresans Şiddeti	$\lambda_{ekz}$	$\lambda_{ems}$	Floresans Şiddeti
% 10	247.79	284.50	287.58	247.79	284.50	2.71
% 20	247.79	285.63	327.14	247.79	285.63	3.52
% 30	247.79	286.61	316.59	247.79	286,61	2.59
% 40	248.43	288.59	378.60	248.43	288.59	1.74

### 7.2.2. ADE İnhibitörlerinin % Çözücü-Floresans Şiddeti Grafikleri

ADE inhibitörlerinin %10-%40 asetonitril ve %10-%40 metanol içeren sulu çözeltilerinin floresans şiddetleri ölçülerek % çözücü ortamına karşı grafikleri çizilmiştir. Böylelikle farklı yüzdedeki organik çözücü-su karışım ortamlarında ADE inhibitörlerinin florimetrik davranışları incelenmiştir. Oluşturulan organik çözücü-su karışımlarında maddenin floresans şiddetinin değiştiği gözlemlendi.



**Şekil-7.19.** Enalapril, Kinapril ve Ramiprilin asetonitril-su ortamındaki % çözücü-floresans şiddeti grafiği

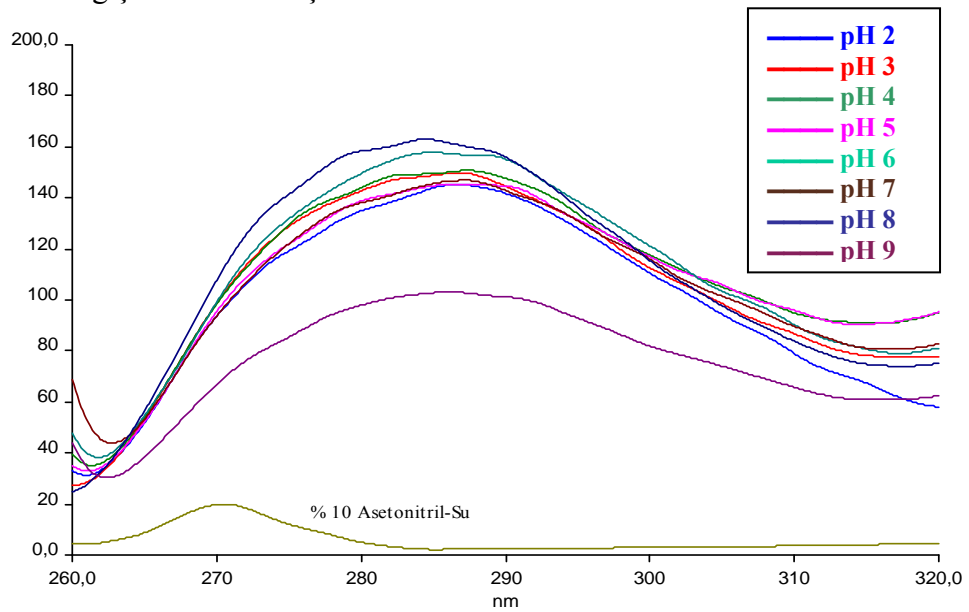


Şekil-7.20. Enalapril, Kinapril, Ramipril ve Lisinoprilin metanol-su ortamındaki % çözücü-floresans şiddeti grafiği

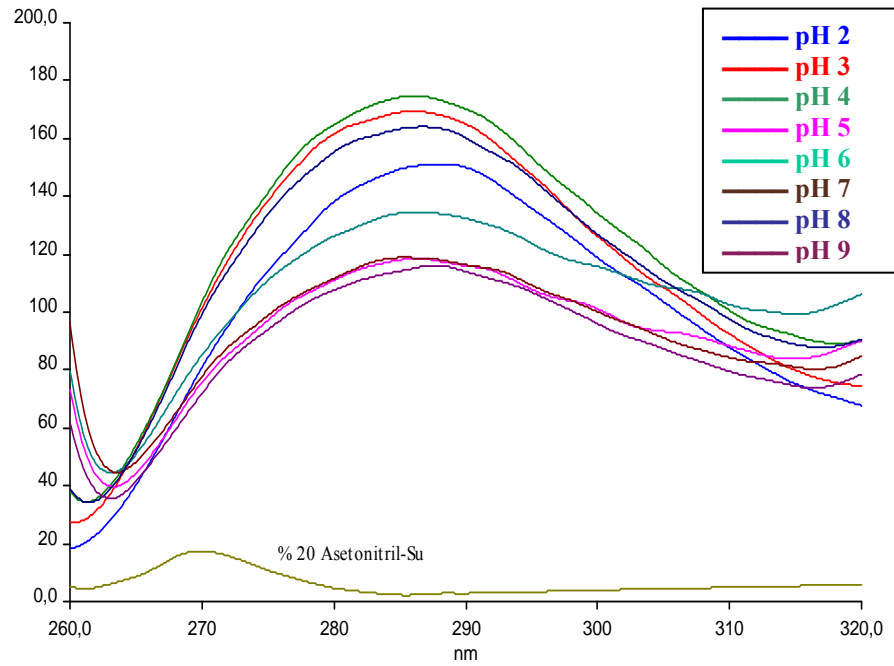
### 7.3. Floresans Şiddetine pH Etkisi

#### 7.3.1. ADE İnhibitörlerinin Farklı pH' lardaki Emisyon Spektrumları

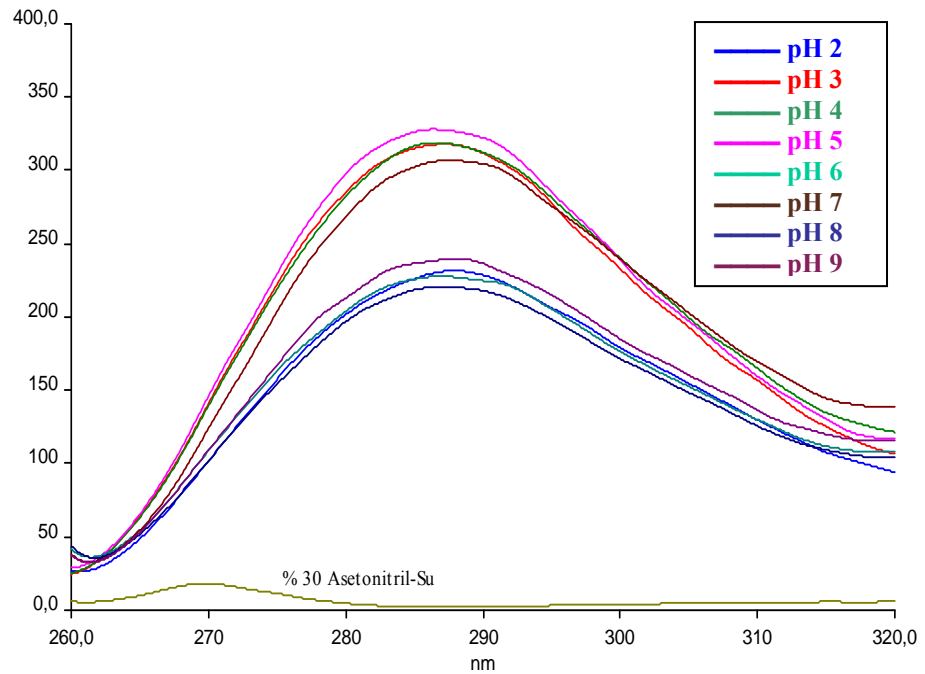
ADE inhibitörlerinin %10-40 asetonitril ve metanol sulu karışımlarında, pH 2-9 arasında emisyon spektrumları alınarak asidik ve bazik iyonik türlerin floresans özelliklerinin değişimi incelenmiştir.



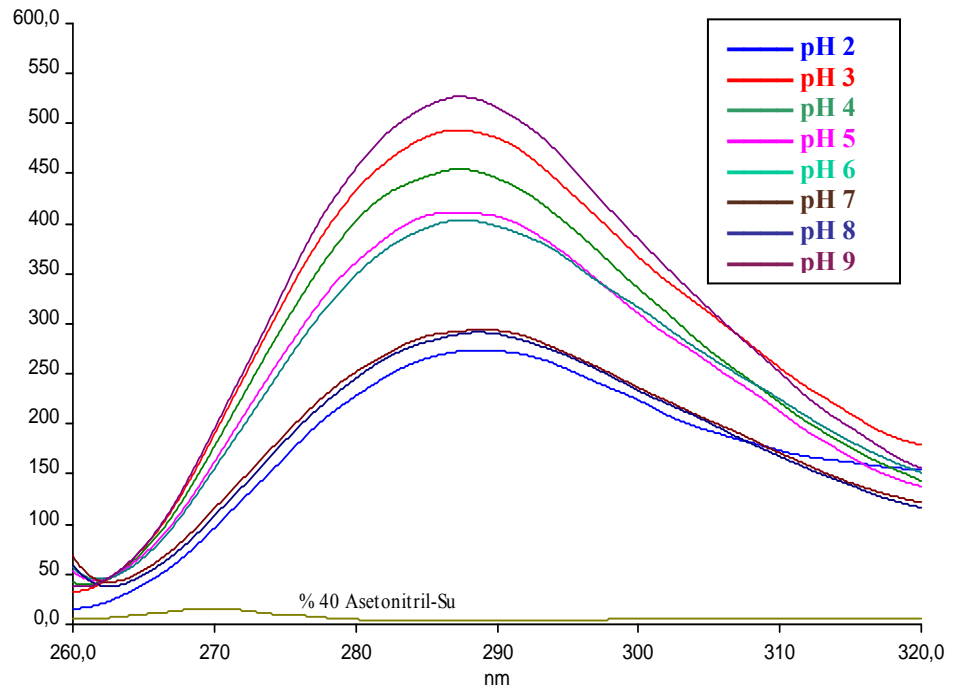
Şekil-7.21. Enalaprilin % 10 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları



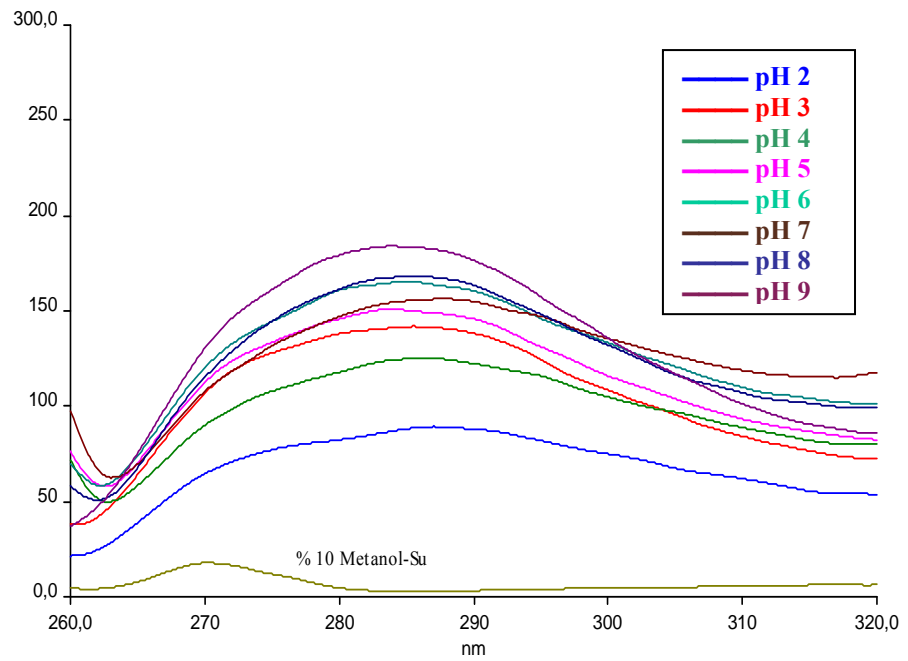
Şekil-7.22. Enalaprilin % 20 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları



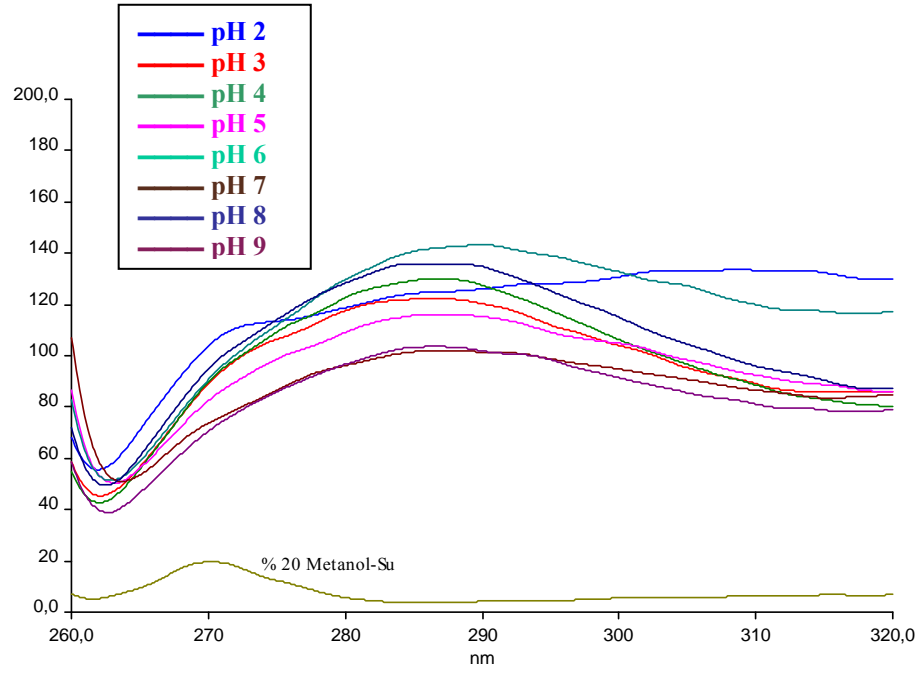
Şekil-7.23. Enalaprilin % 30 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları



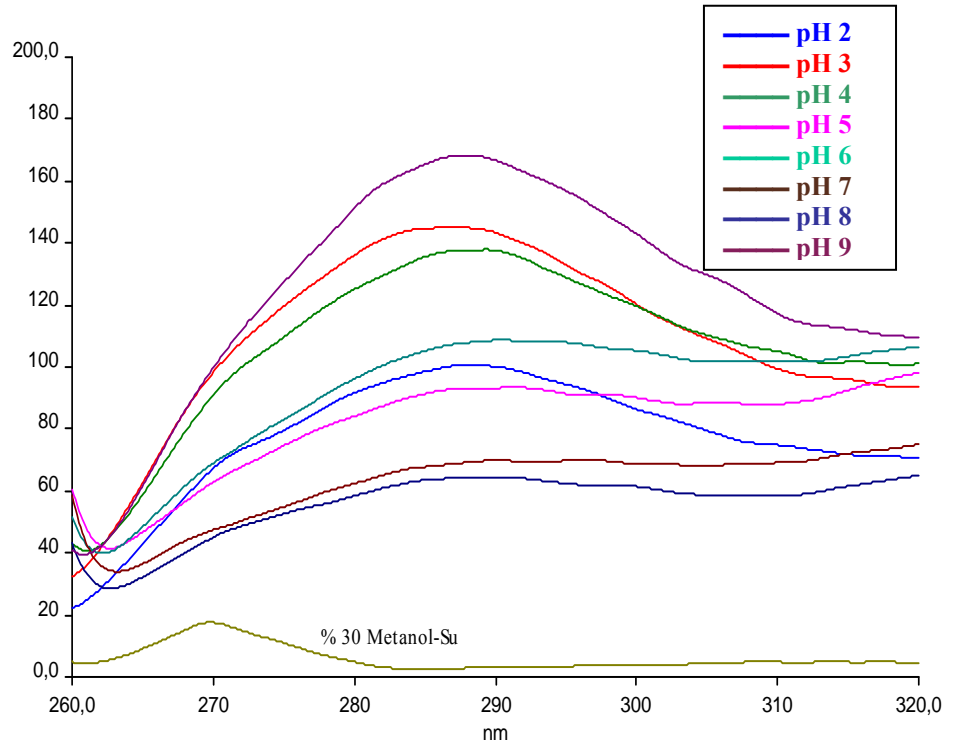
Şekil-7.24. Enalaprilin % 40 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları



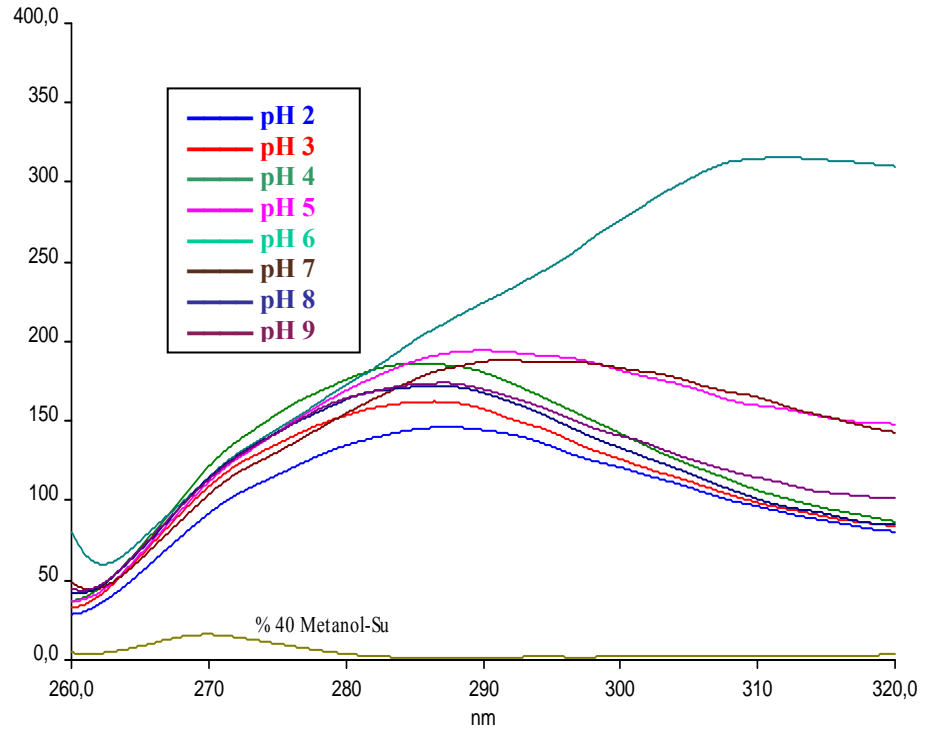
Şekil-7.25. Enalaprilin % 10 metanol-su ortamındaki pH spektrumları



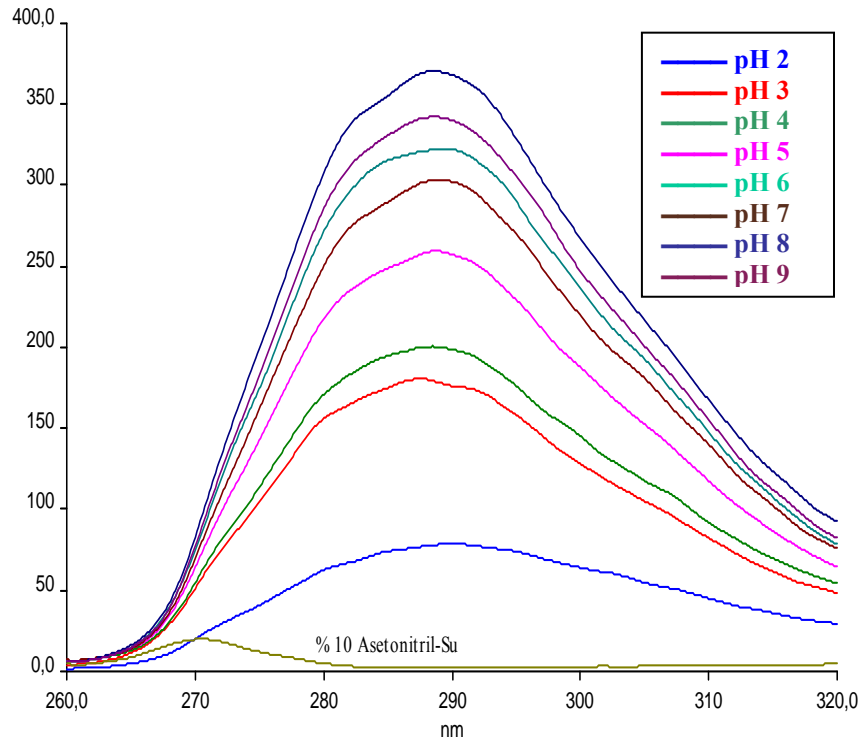
Şekil-7.26. Enalaprilin % 20 metanol-su ortamındaki pH spektrumları



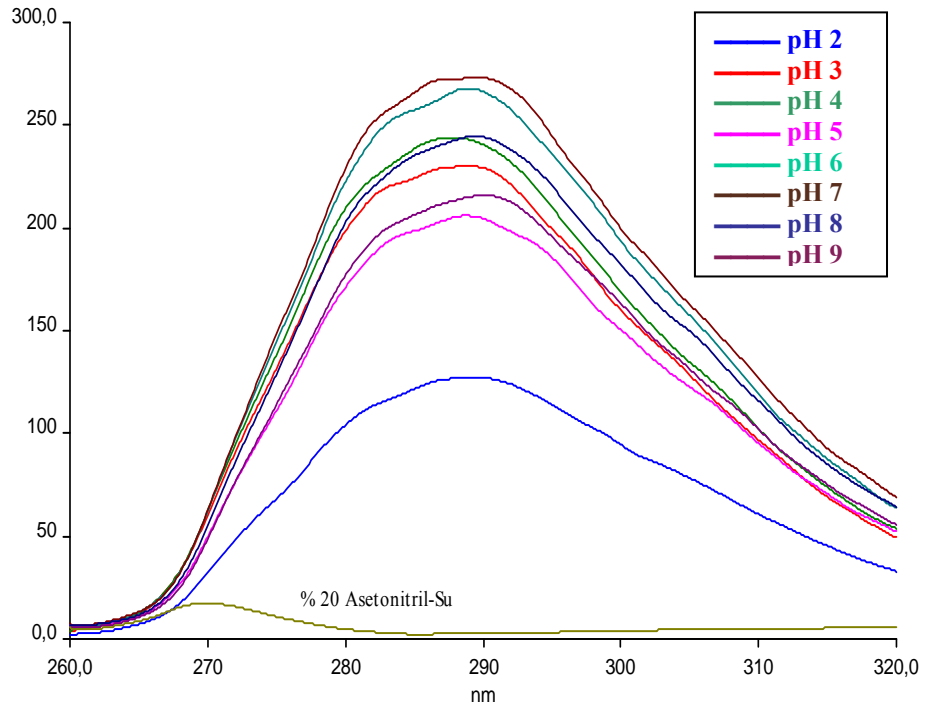
Şekil-7.27. Enalaprilin % 30 metanol-su ortamındaki pH spektrumları



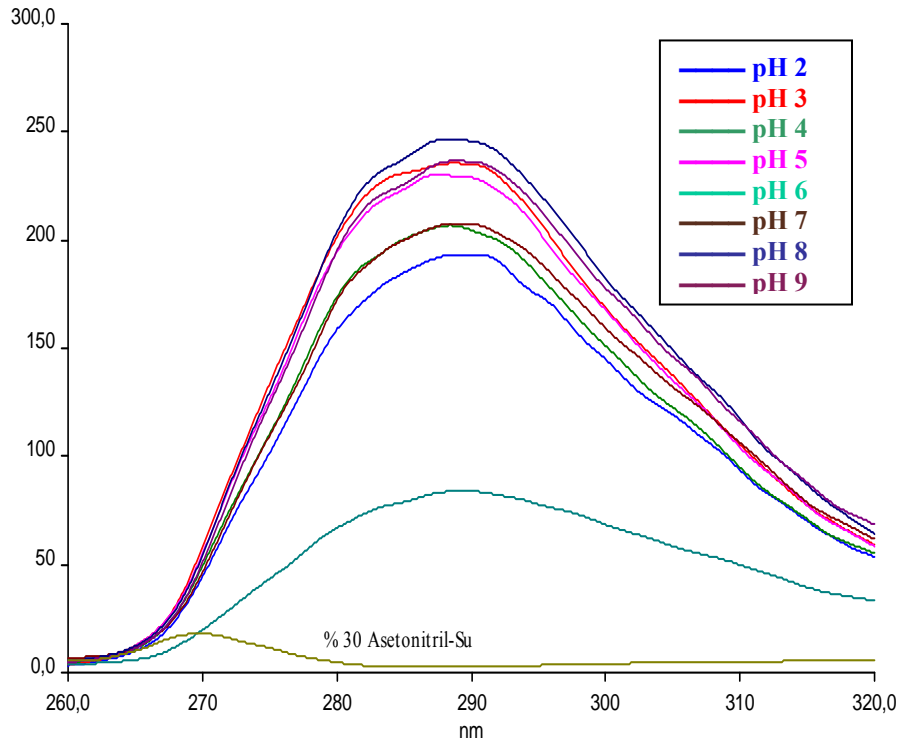
Şekil-7.28. Enalaprilin % 40 metanol-su ortamındaki pH spektrumları



Şekil-7.29. Kinapriline % 10 asetonytril-su ortamındaki pH spektrumları

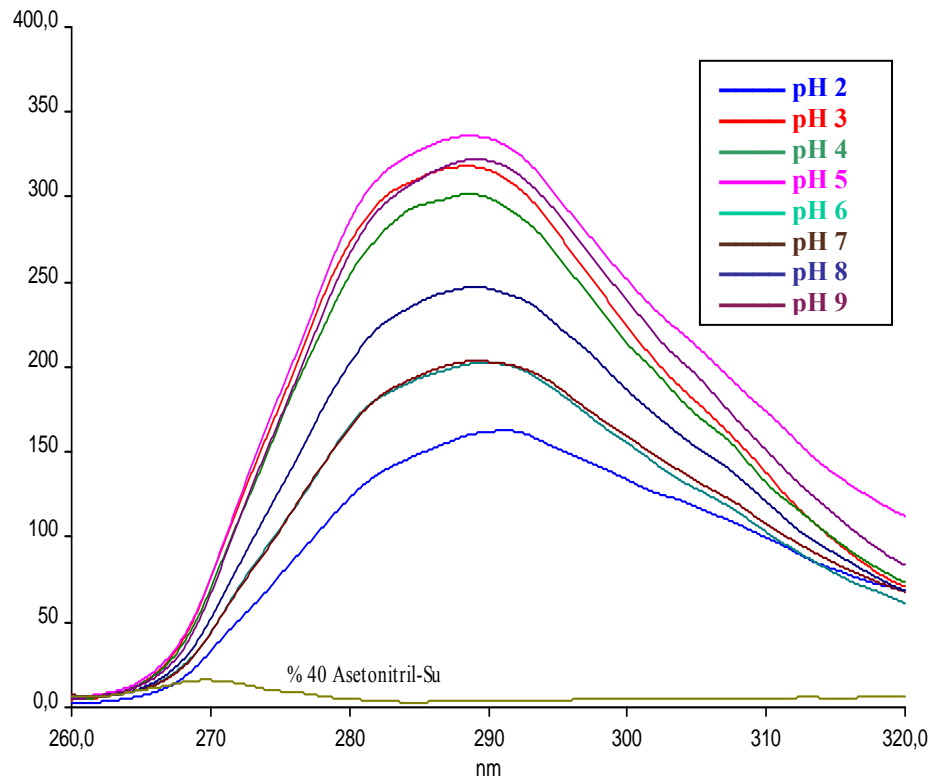


Şekil-7.30. Kinaprilin % 20 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları

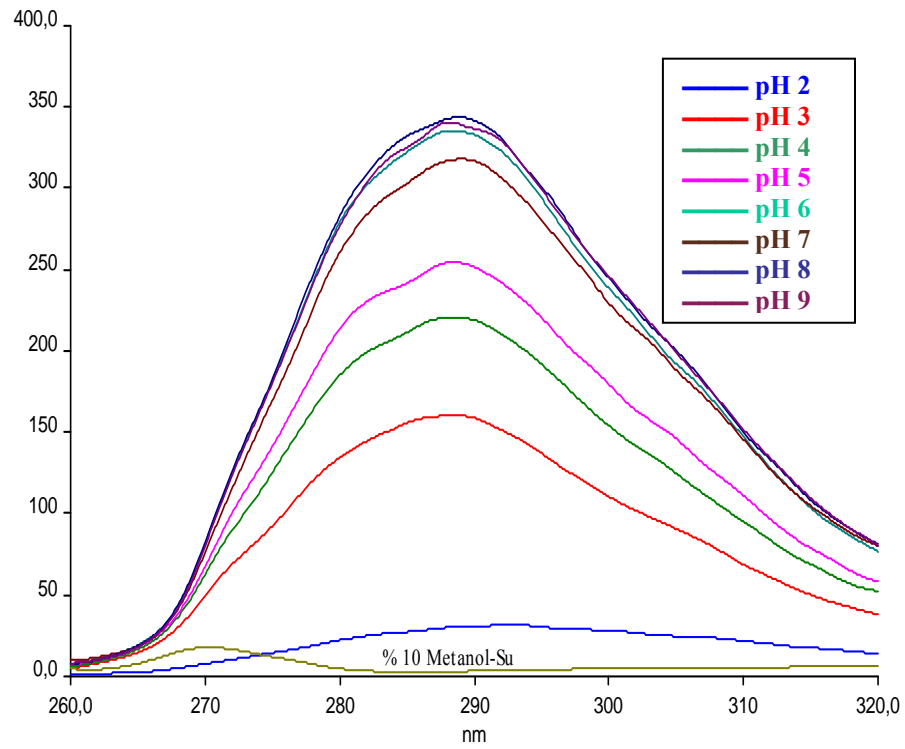


Şekil-7.31. Kinaprilin % 30 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları

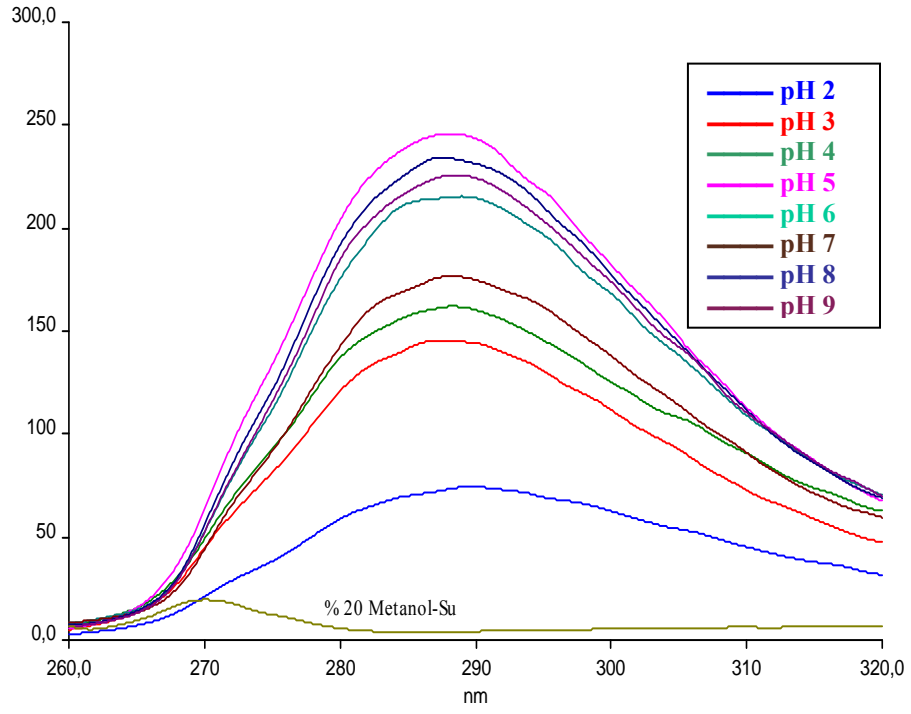




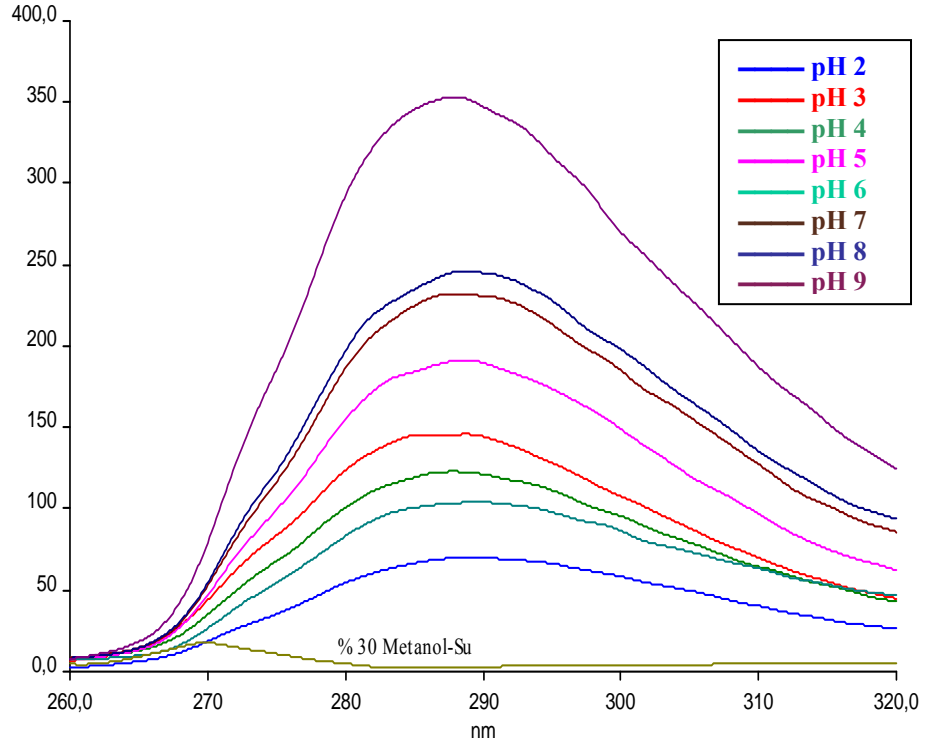
**Şekil-7.32.** Kinaprilin % 40 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları



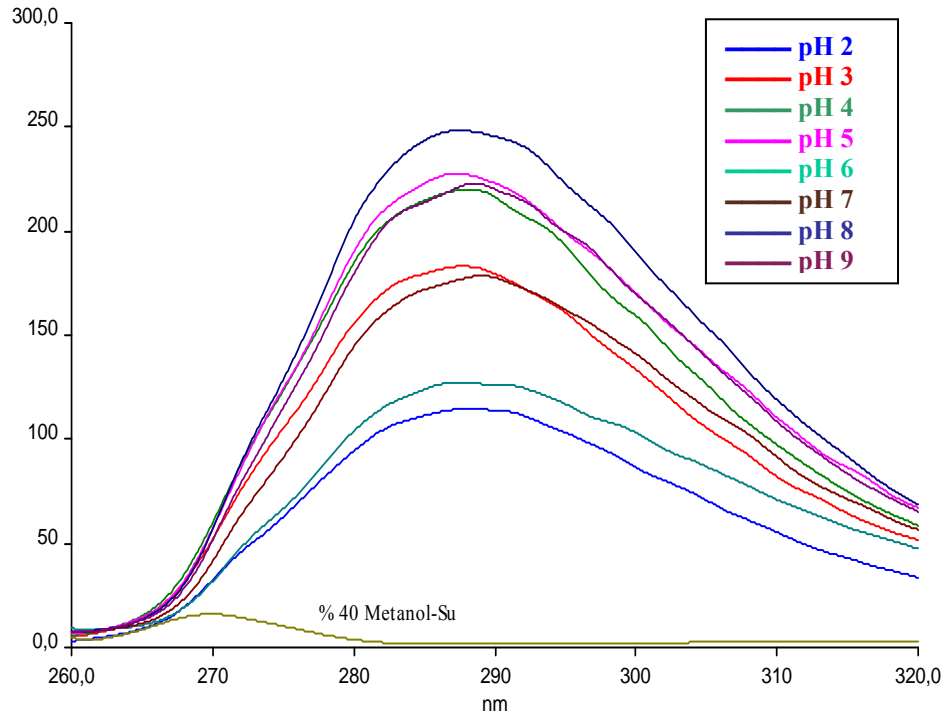
**Şekil-7.33.** Kinaprilin % 10 metanol-su ortamındaki pH spektrumları



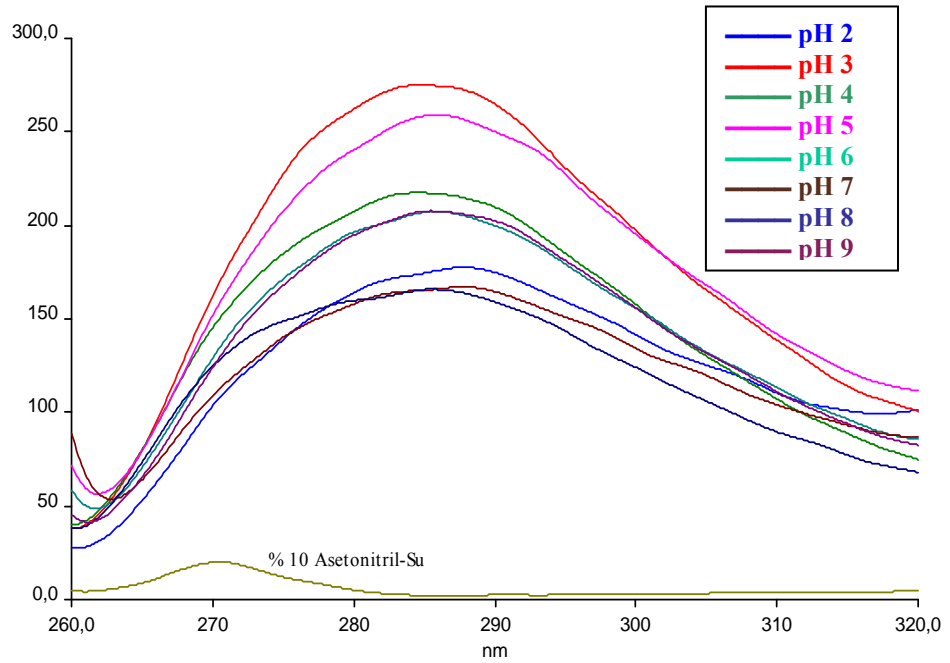
Şekil-7.34. Kinaprilin % 20 metanol-su ortamındaki pH spektrumları



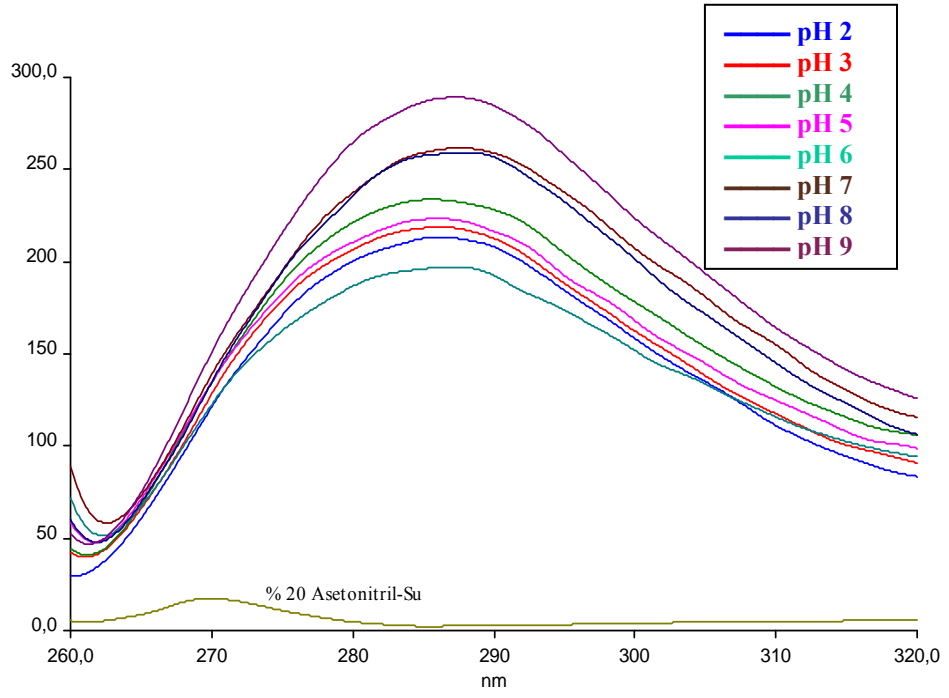
Şekil-7.35. Kinaprilin % 30 metanol-su ortamındaki pH spektrumları



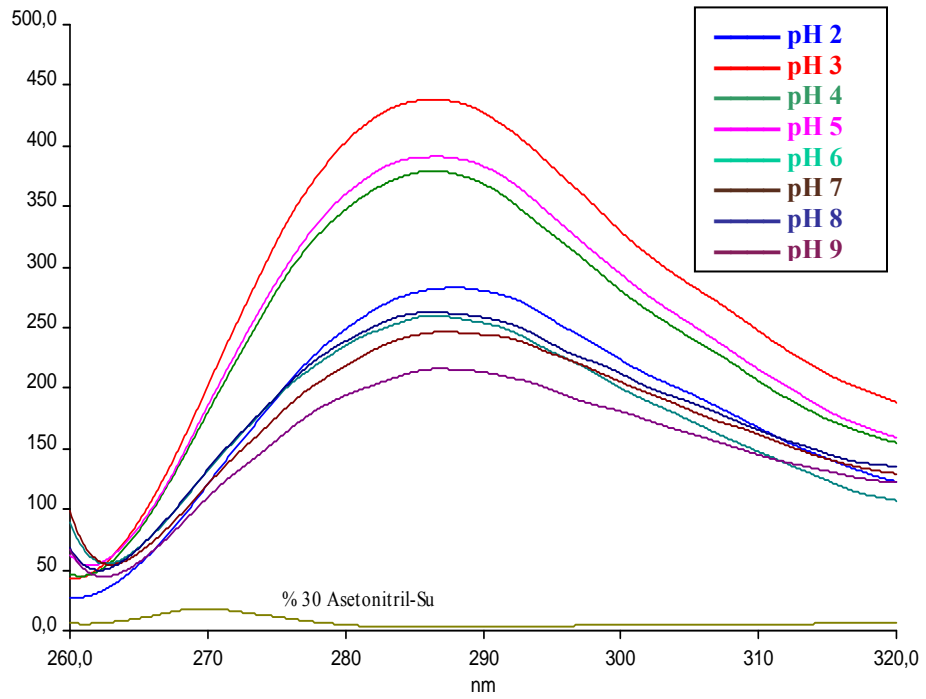
Şekil-7.36. Kinaprilin % 40 metanol-su ortamındaki pH spektrumları



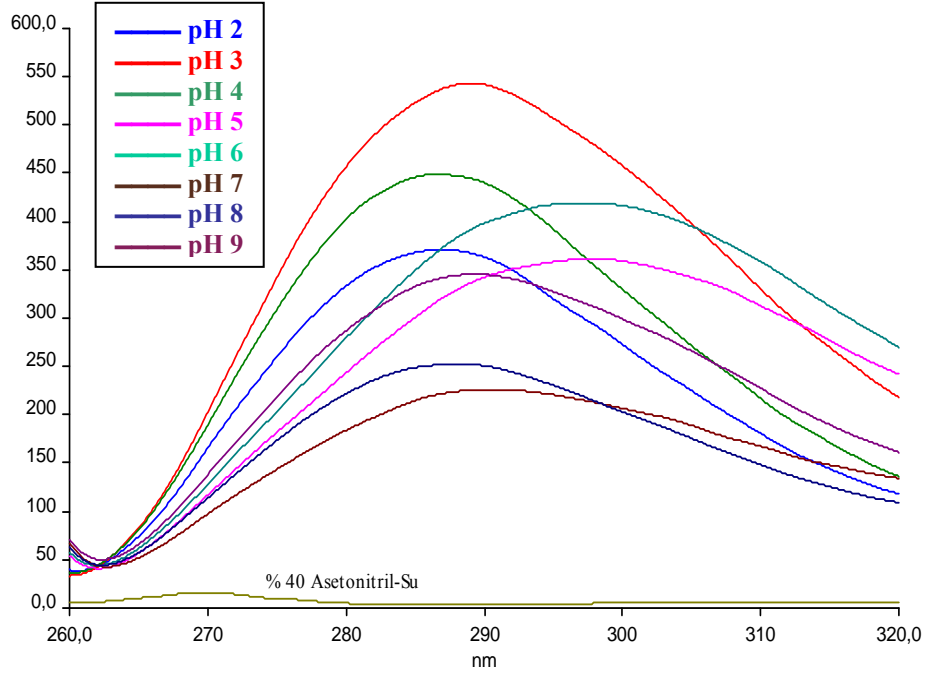
Şekil-7.37. Ramiprilin % 10 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları



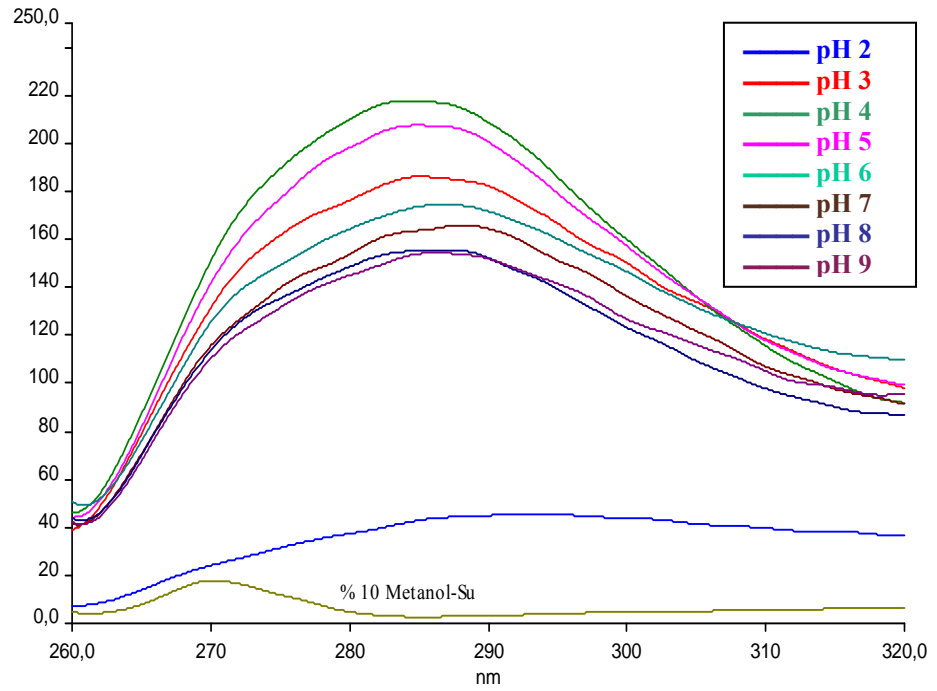
**Şekil-7.38.** Ramiprilin % 20 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları



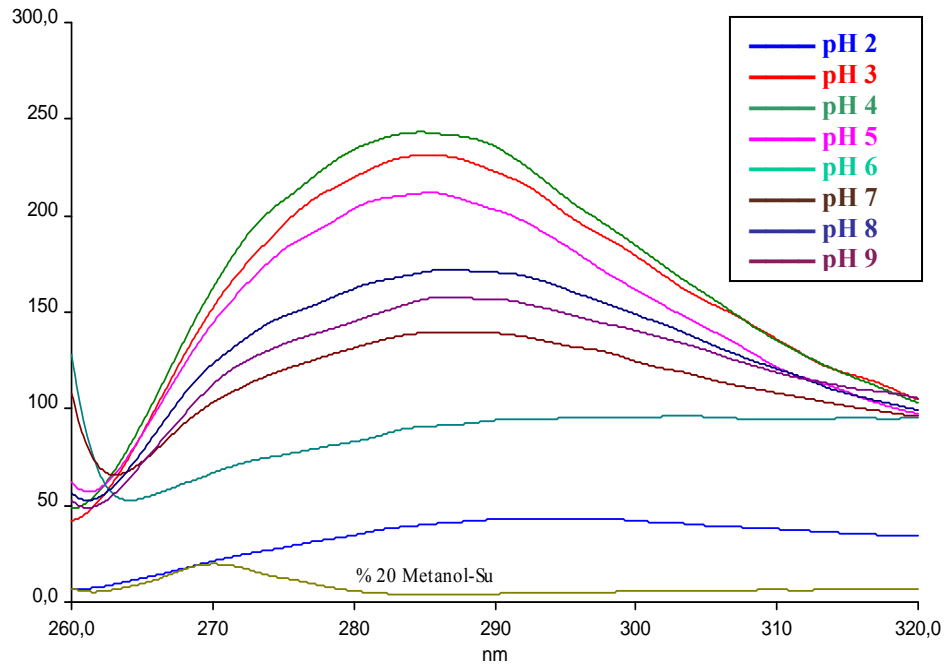
**Şekil-7.39.** Ramiprilin % 30 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları



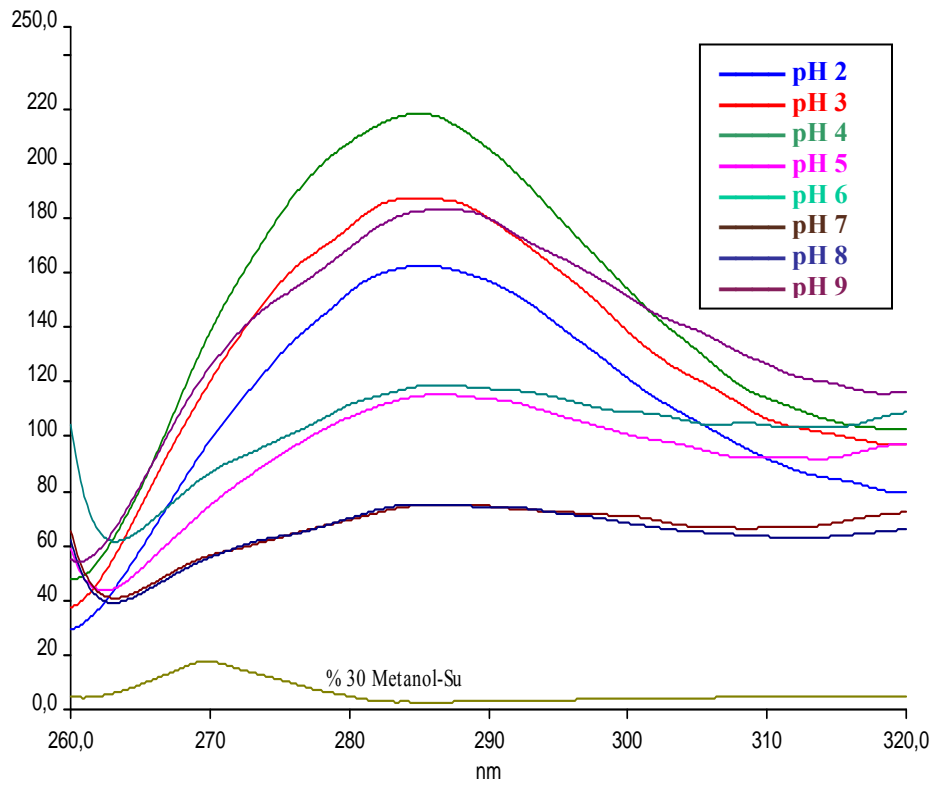
Şekil-7.40. Ramiprilin % 40 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları



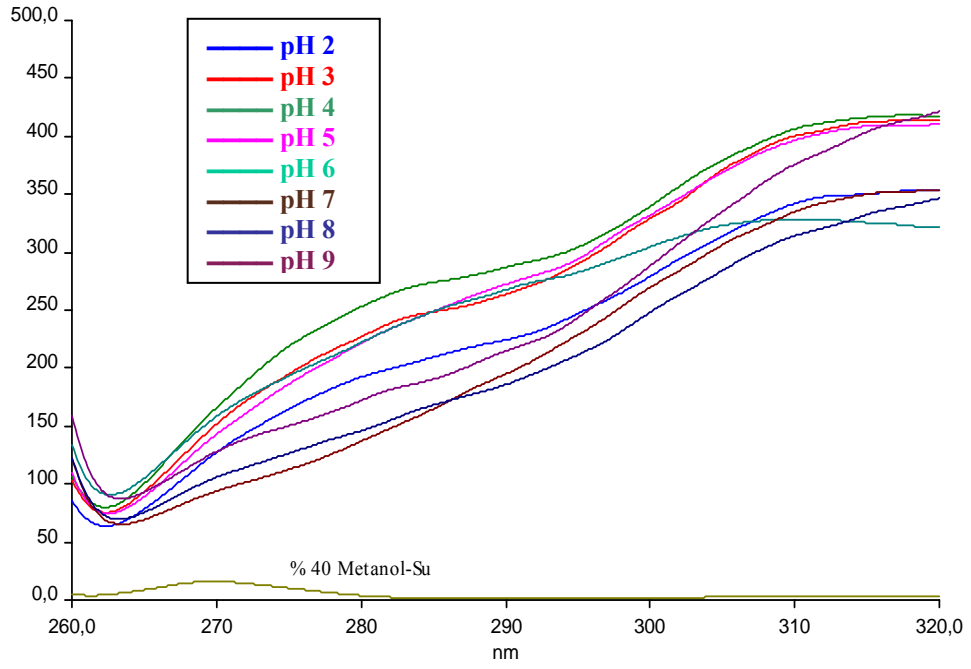
Şekil-7.41. Ramiprilin % 10 metanol-su ortamındaki pH spektrumları



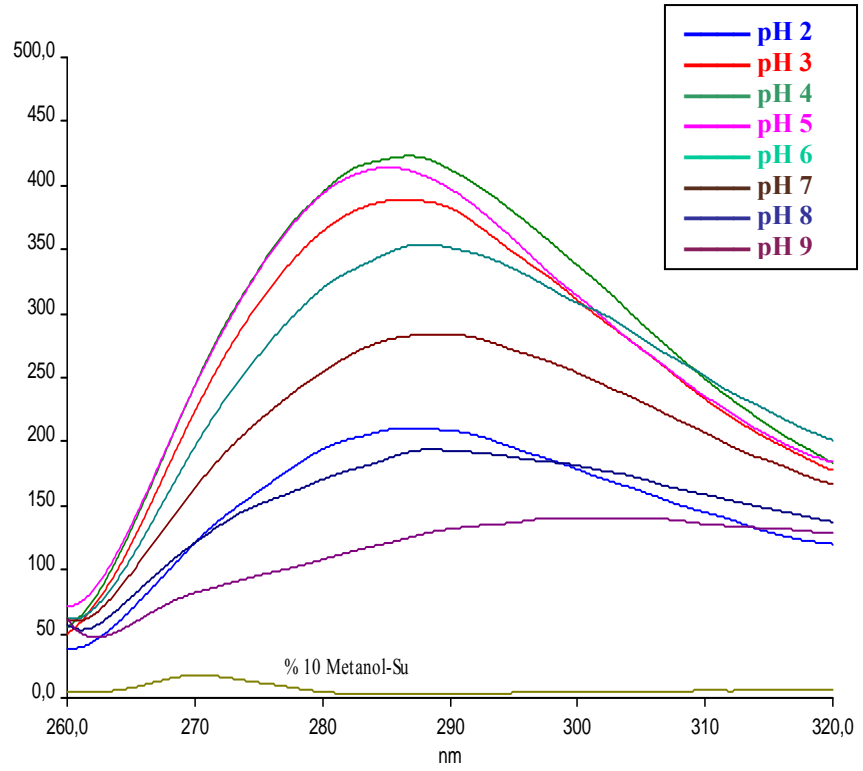
Şekil-7.42. Ramiprilin % 20 metanol-su ortamındaki pH spektrumları



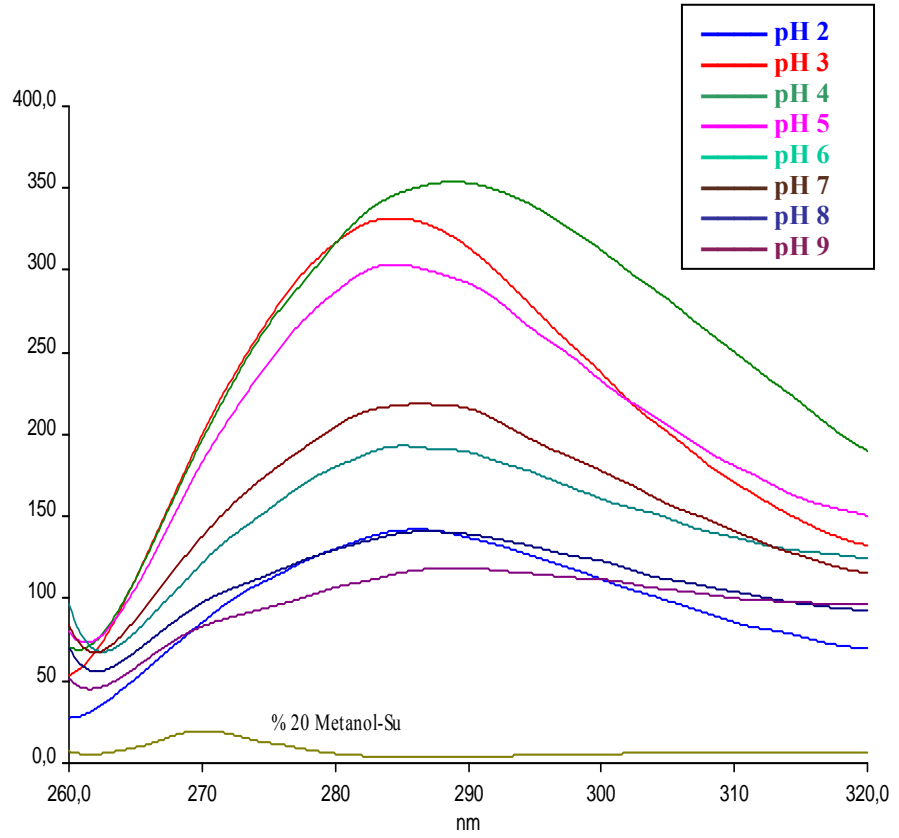
Şekil-7.43. Ramiprilin % 30 metanol-su ortamındaki pH spektrumları



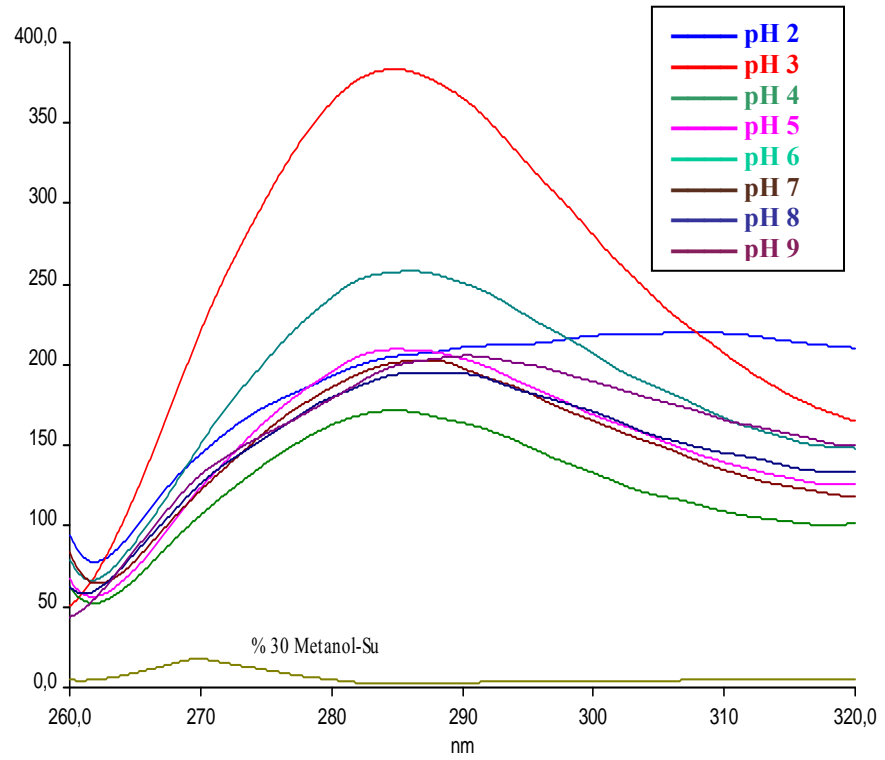
Şekil-7.44. Ramiprilin % 40 Metanol-su ortamındaki pH spektrumları



Şekil-7.45. Lisinoprilin % 10 metanol-su ortamındaki pH spektrumları

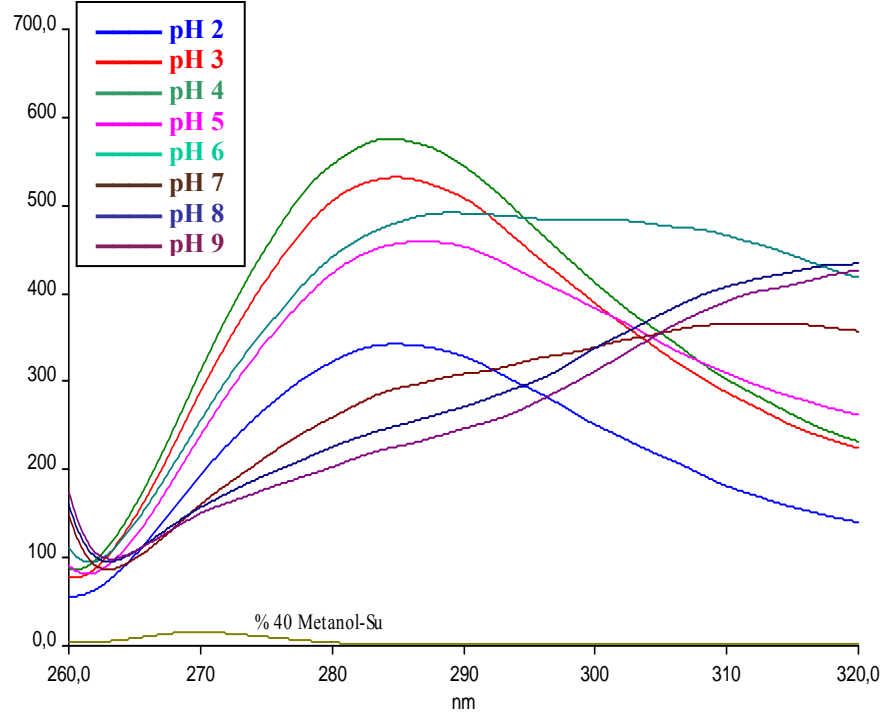


Şekil-7.46. Lisinoprilin % 20 metanol-su ortamındaki pH spektrumları



Şekil-7.47. Lisinoprilin % 30 metanol-su ortamındaki pH spektrumları

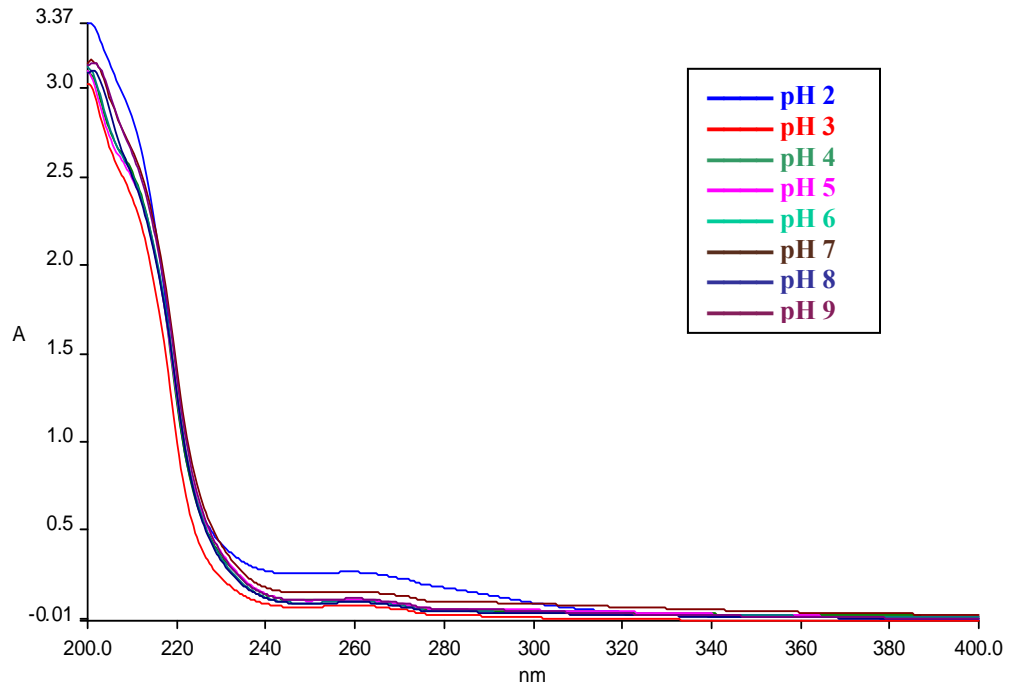




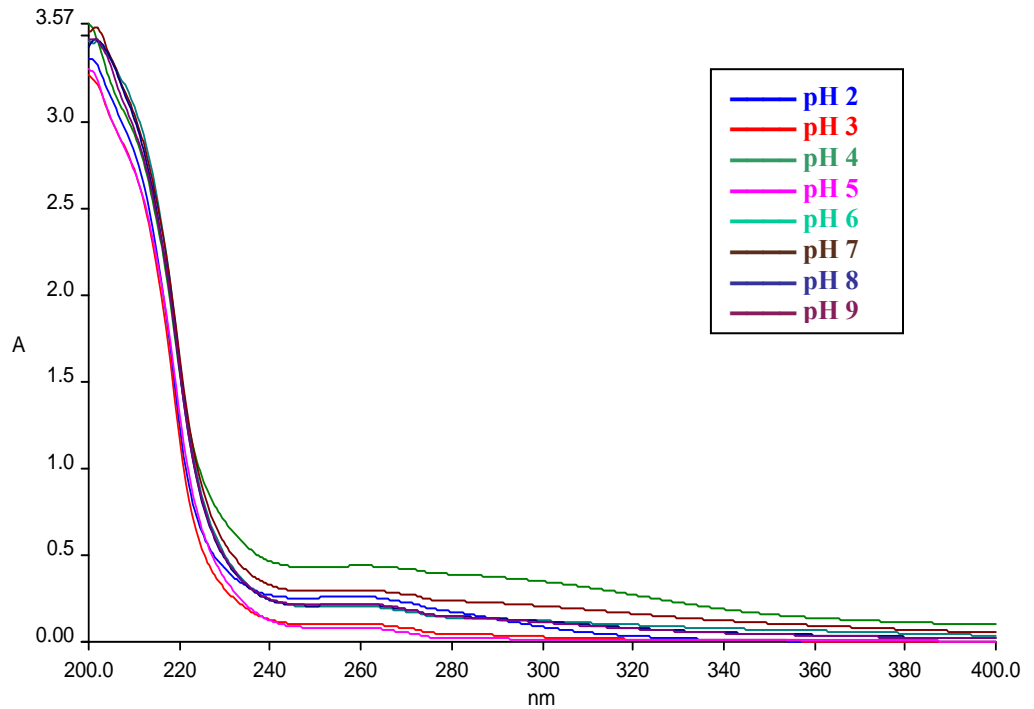
**Şekil-7.48.** Lisinoprilin % 40 metanol-su ortamındaki pH spektrumları

### 7.3.2. ADE İnhibitörlerinin Farklı pH' lardaki Absorpsiyon Spektrumları

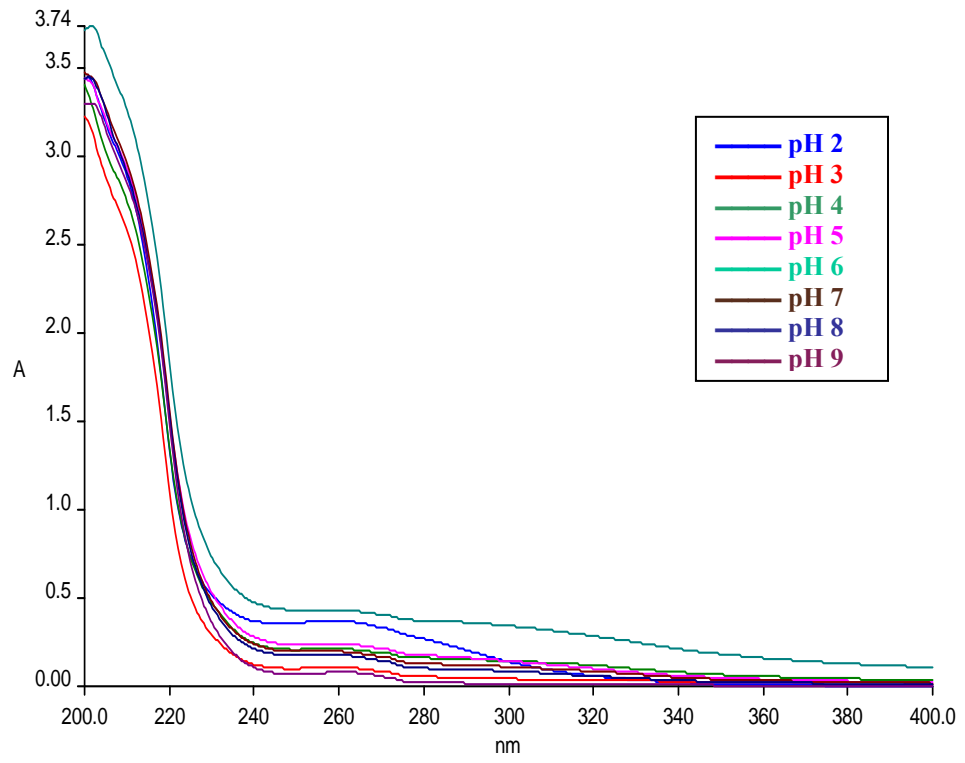
ADE inhibitörlerinin %10-40 asetonitril ve metanol sulu karışımlarında, pH 2-9 arasında absorpsiyon spektrumları alınarak asidik ve bazik iyonik türlerin absorpsiyon özelliklerinin değişimi incelenmiştir.



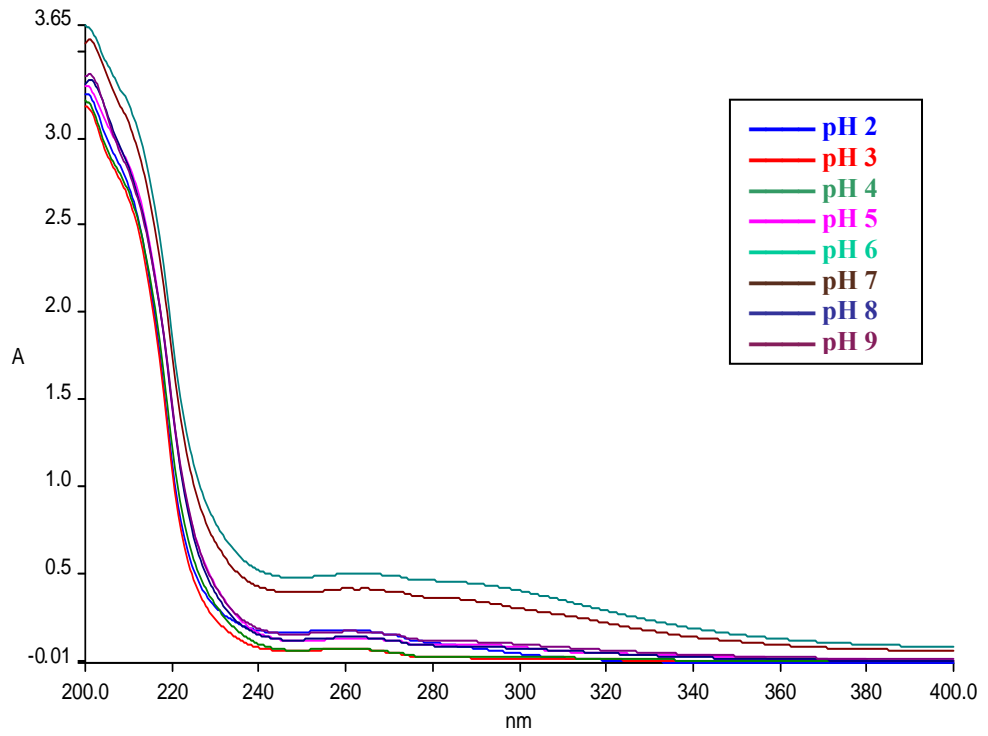
Şekil-7.49. Kinaprilin % 10 metanol-su ortamındaki UV spektrumları



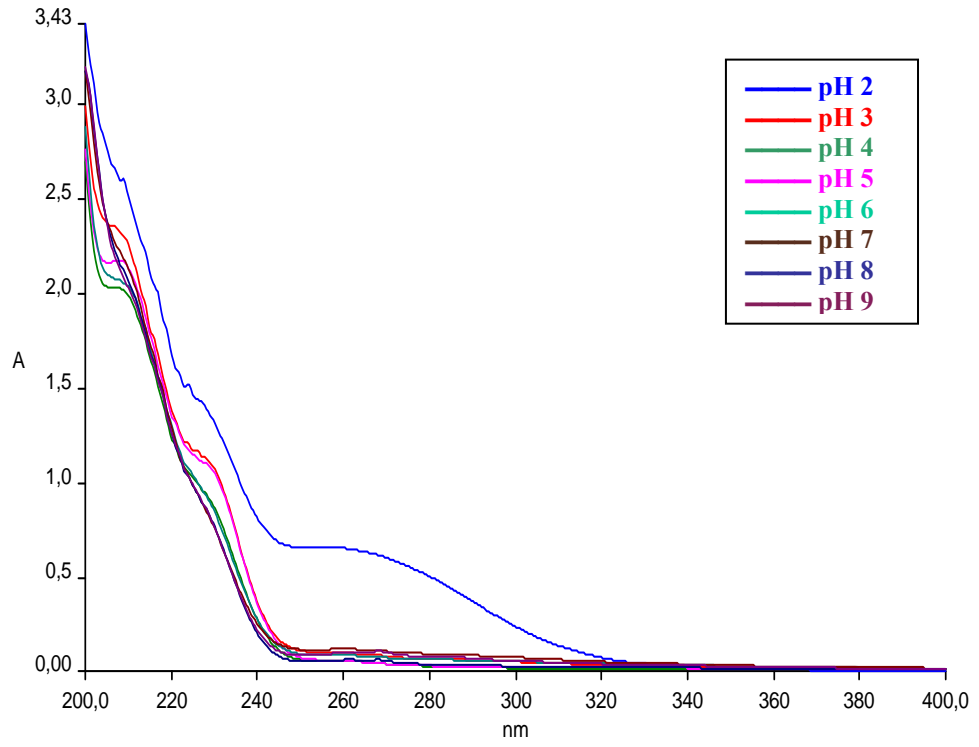
Şekil-7.50. Kinaprilin % 20 metanol-su ortamındaki UV spektrumları



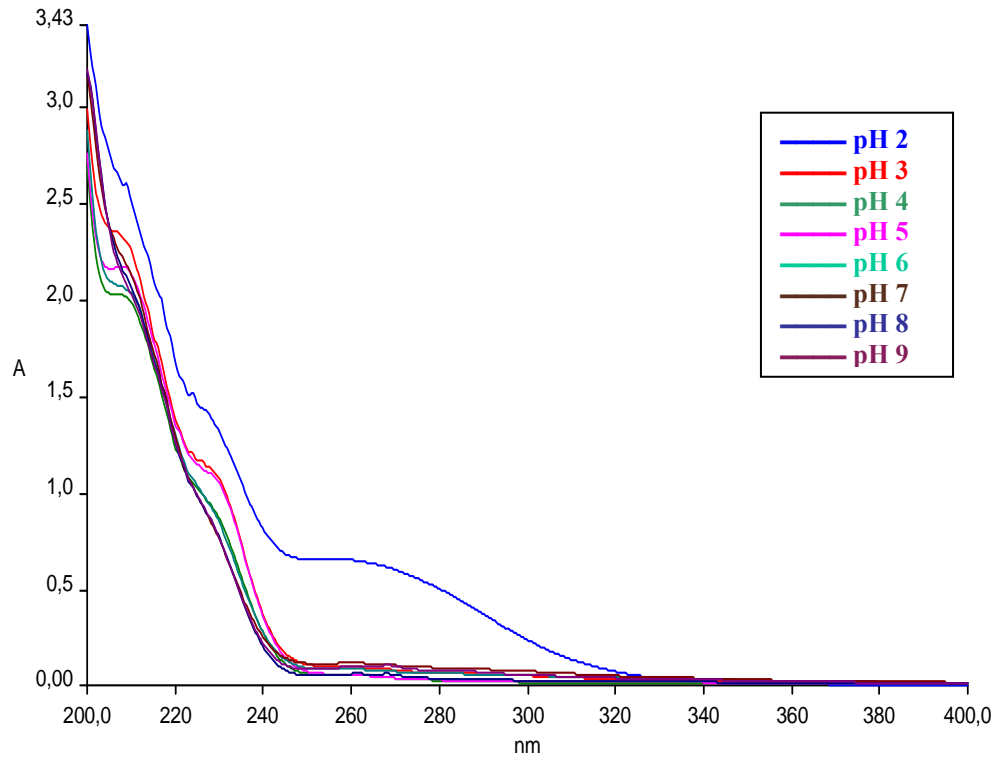
Şekil-7.51. Kinaprilin % 30 metanol-su ortamındaki UV spektrumları



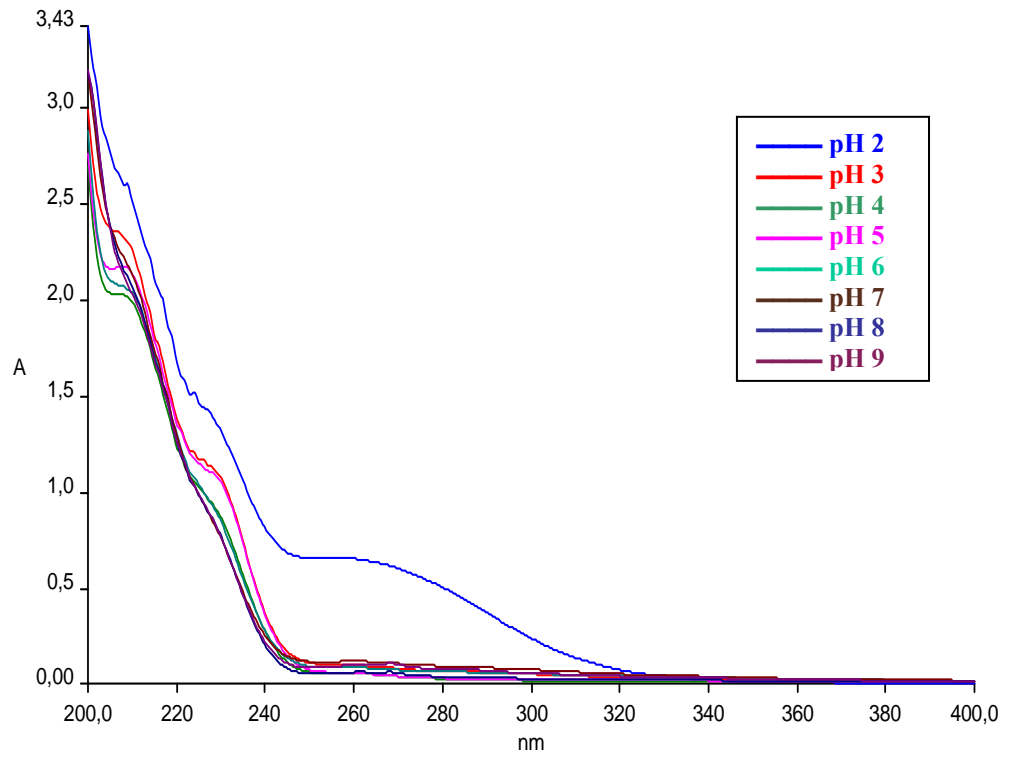
Şekil-7.52. Kinaprilin % 40 metanol-su ortamındaki UV spektrumları



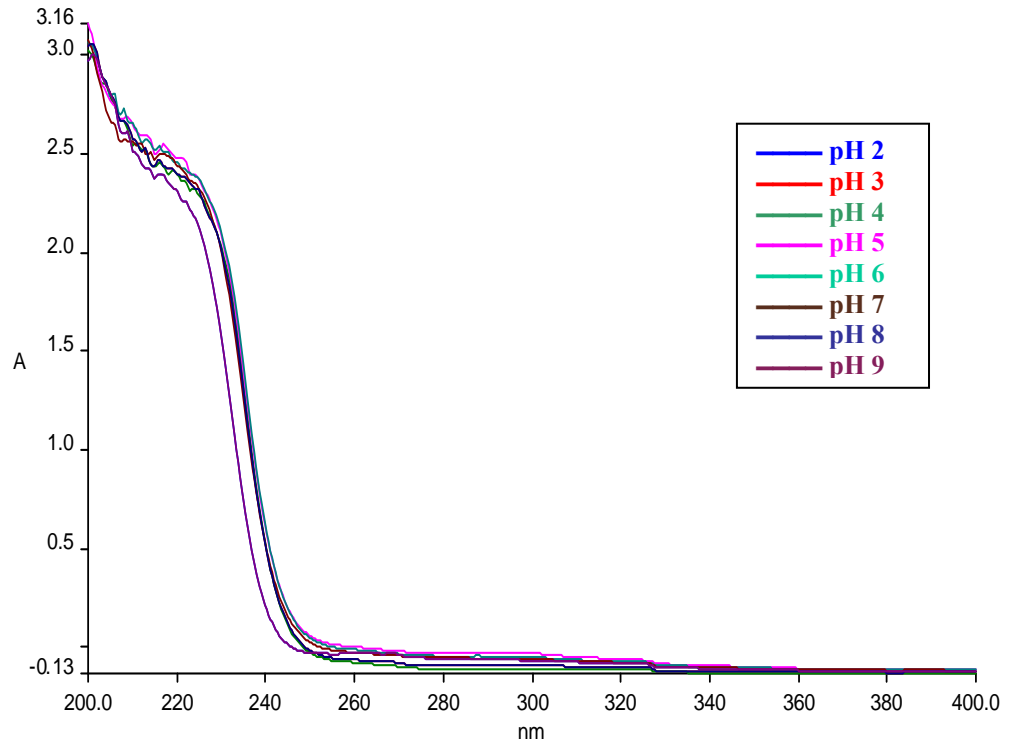
Şekil-7.53. Ramiprilin % 10 asetonitril-su ortamındaki UV spektrumları



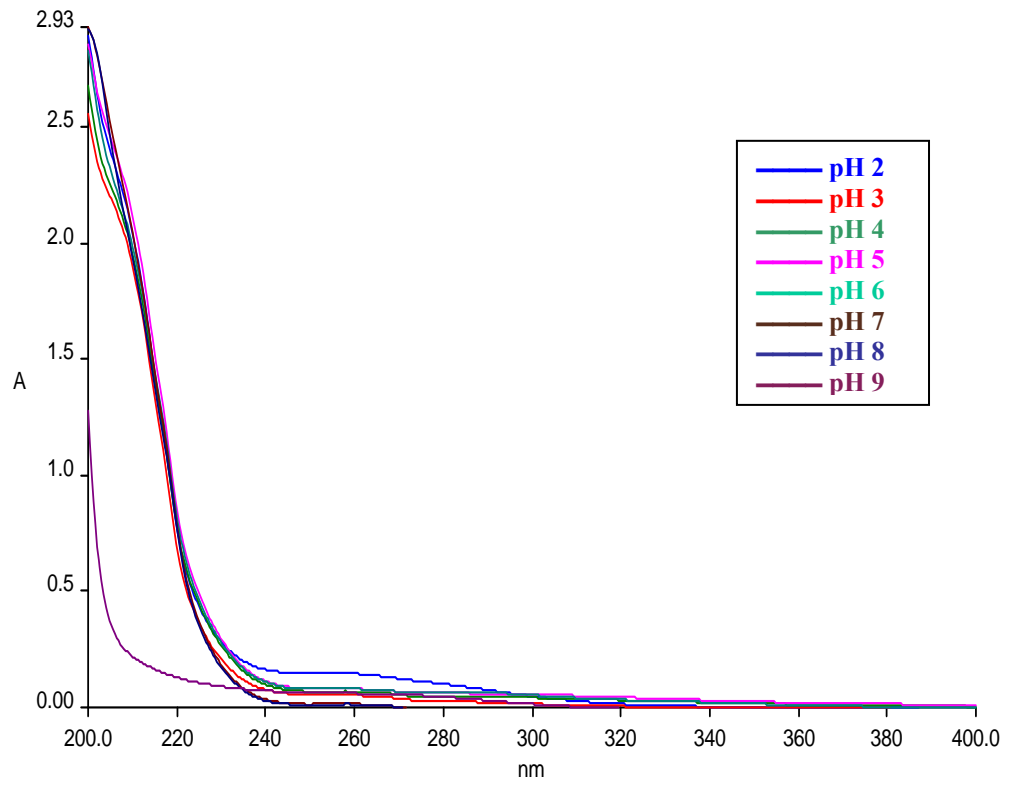
Şekil-7.54. Ramiprilin % 20 asetonitril-su ortamındaki UV spektrumları



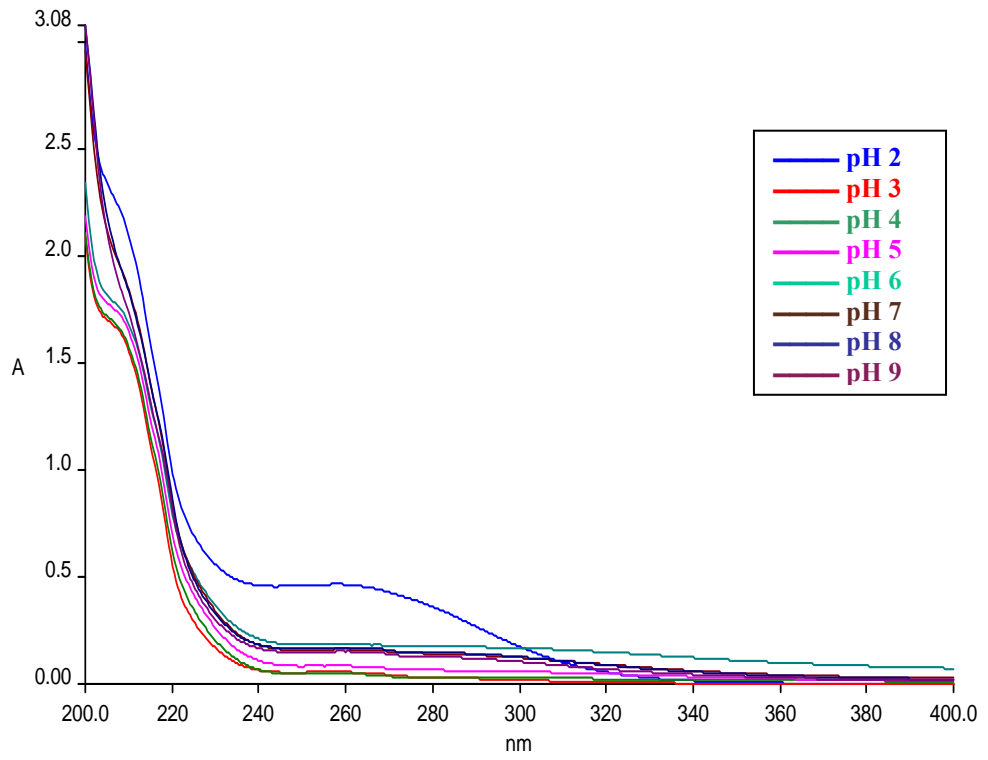
Şekil-7.55. Ramiprilin % 30 asetonitril-su ortamındaki UV spektrumları



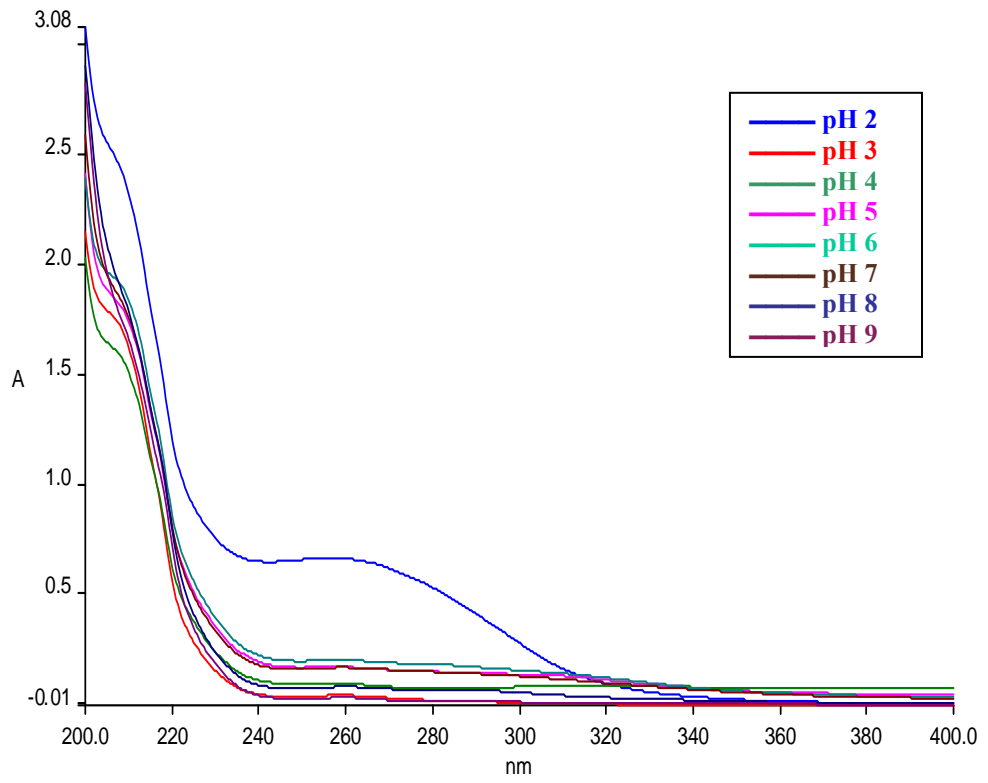
Şekil-7.56. Ramiprilin % 40 asetonitril-su ortamındaki UV spektrumları



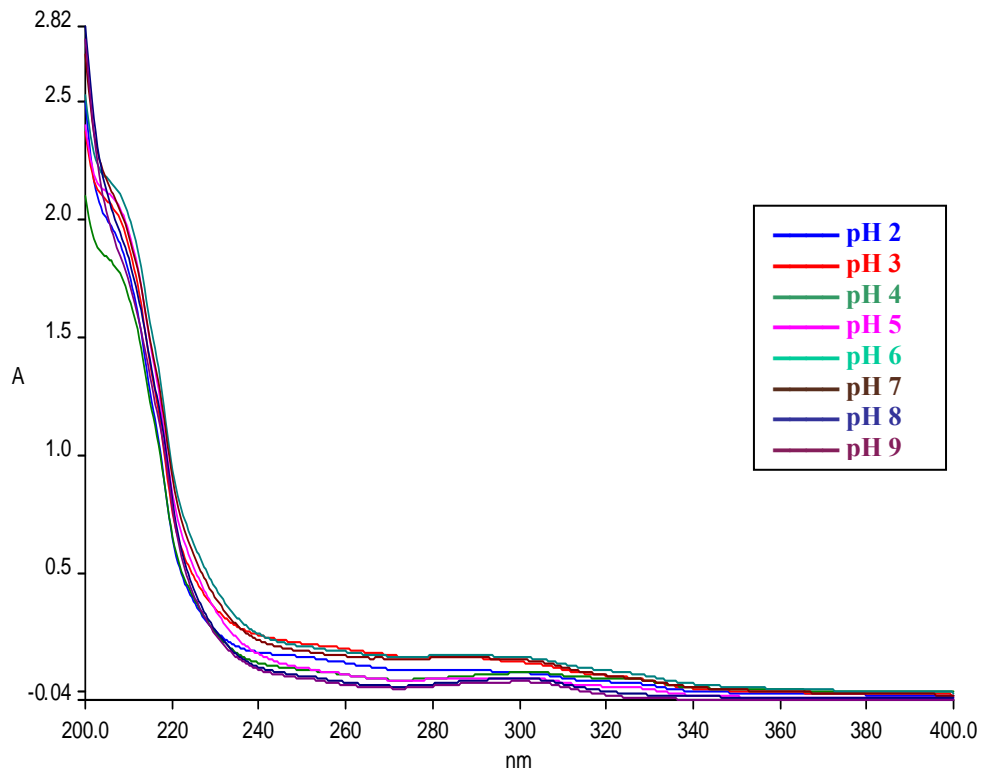
**Şekil-7.57.** Lisinoprilin % 10 metanol-su ortamındaki UV spektrumları



**Şekil-7.58.** Lisinoprilin % 20 metanol-su ortamındaki UV spektrumları



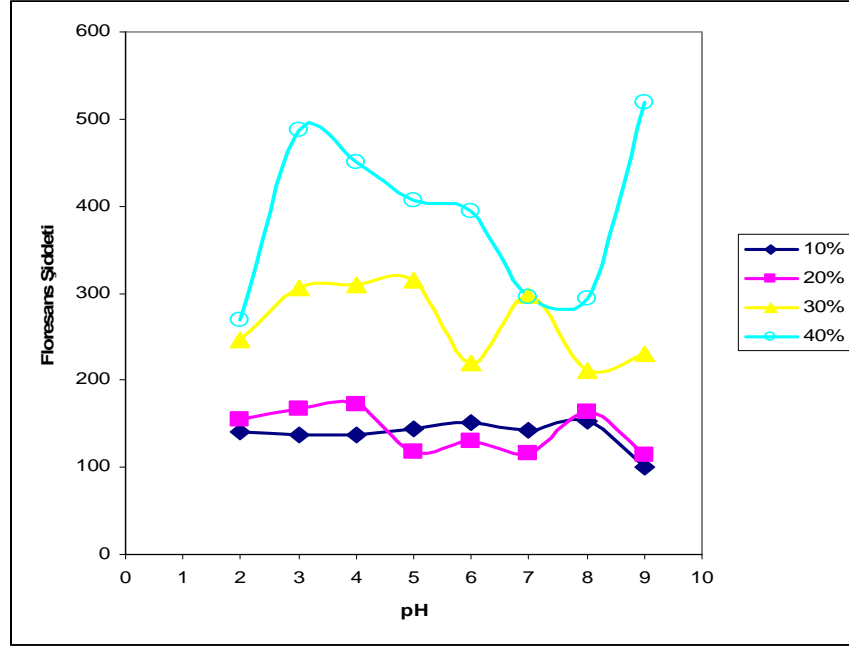
Şekil-7.59. Lisinoprilin % 30 metanol-su ortamındaki UV spektrumları



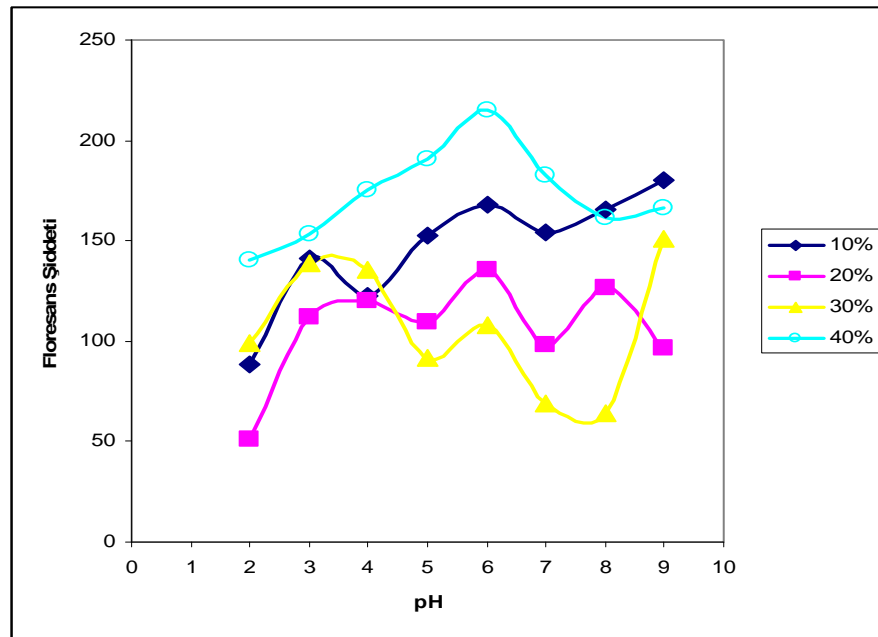
Şekil-7.60. Lisinoprilin % 40 metanol-su ortamındaki UV spektrumları

### 7.3.3. ADE İnhibitörlerinin pH-Floresans Şiddeti Grafikleri

ADE inhibitörlerinin %10-40 asetonitril ve metanol sulu karışımlarında, pH 2-9 arasında floresans şiddetleri ölçülerek pH-floresans şiddeti grafikleri çizilmiş ve bu grafiklerden her birinin pKa değerleri belirlenmiştir.

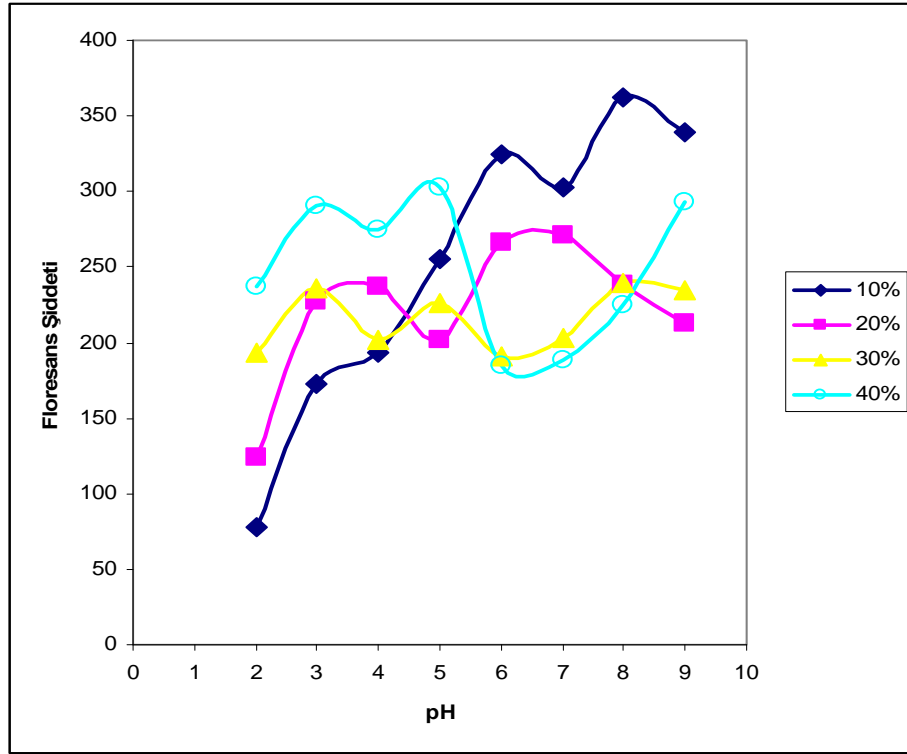


Şekil-7.61. Enalaprilin % asetonitril-su ortamında pH-floresans şiddeti grafiği

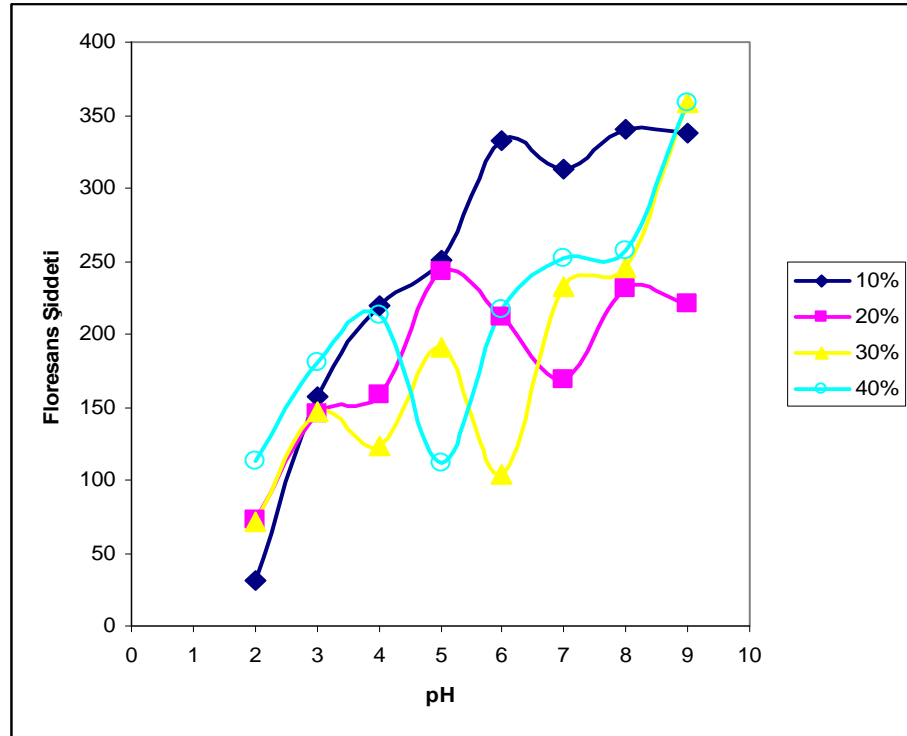


Şekil-7.62. Enalaprilin % metanol-su ortamında pH-floresans şiddeti grafiği

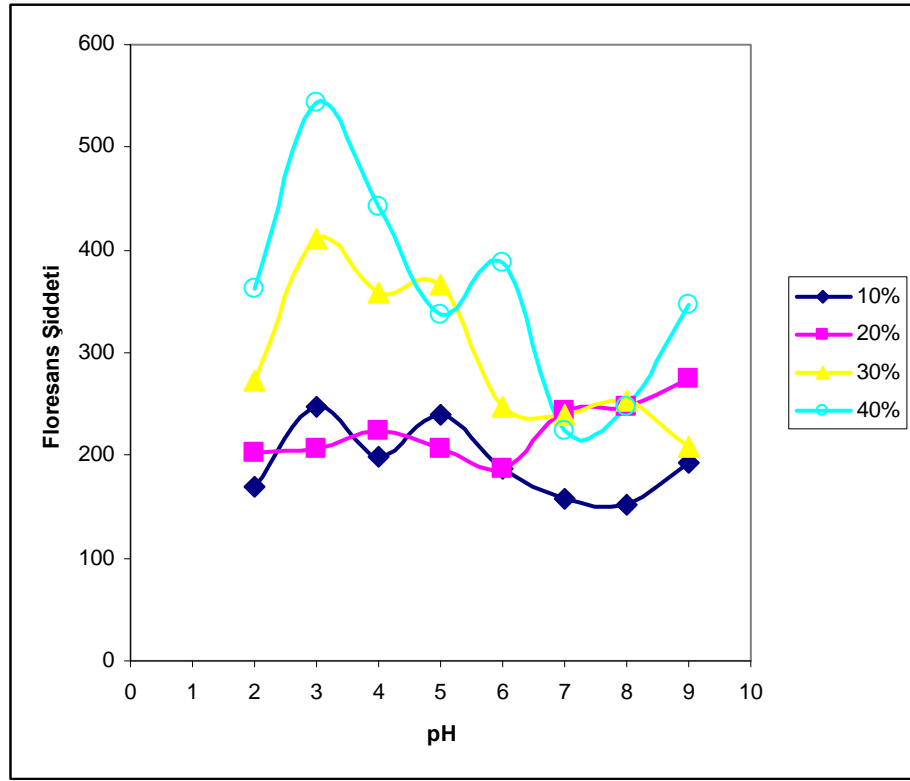




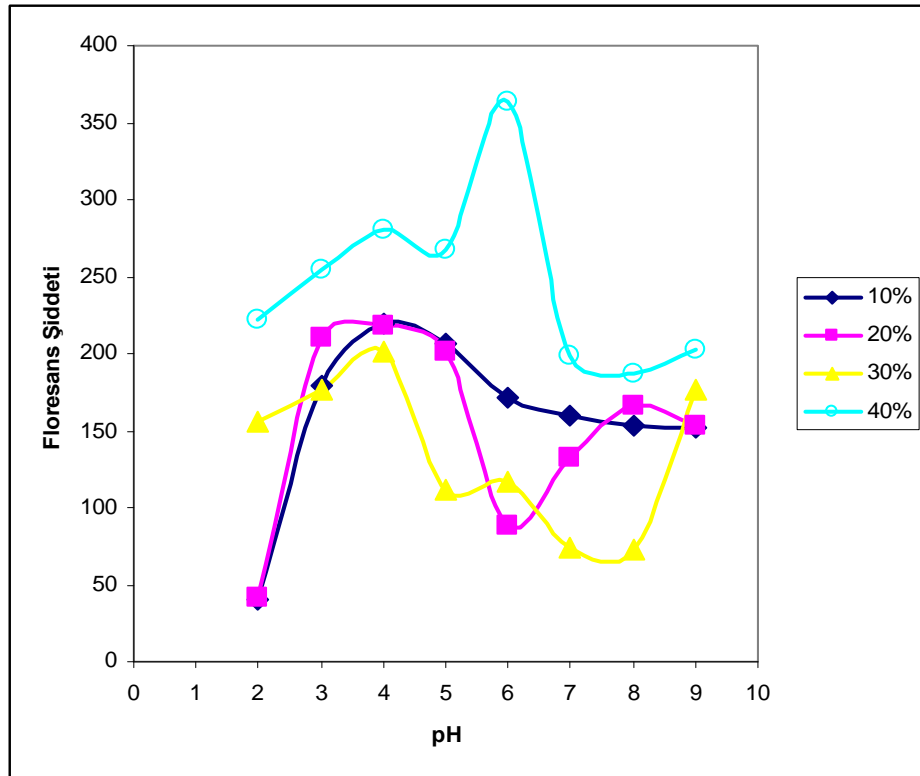
Şekil-7.63. Kinaprilin % asetonitril-Su ortamında pH-floresans şiddeti grafiği



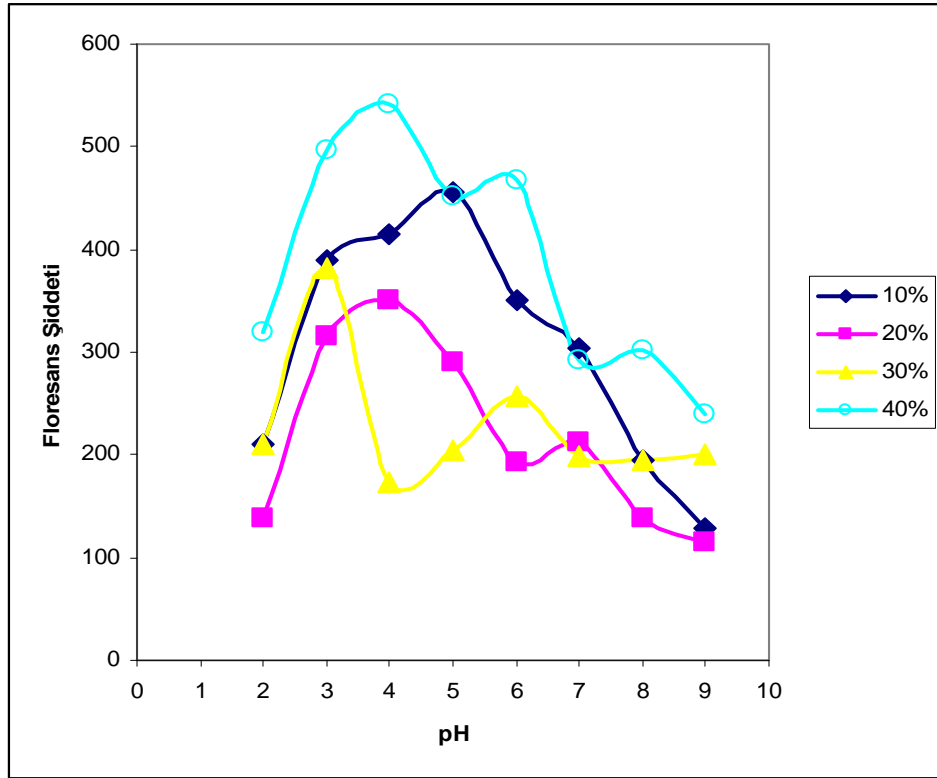
Şekil-7.64. Kinaprilin % metanol-Su ortamında pH-floresans şiddeti grafiği



Şekil-7.65. Ramiprilin % asetonitril-su ortamında pH-floresans şiddeti grafiği



Şekil-7.66. Ramiprilin % metanol-su ortamında pH-floresans şiddeti grafiği



Şekil-7.67. Lisinoprilin % metanol-su ortamında pH-floresans şiddeti grafiği

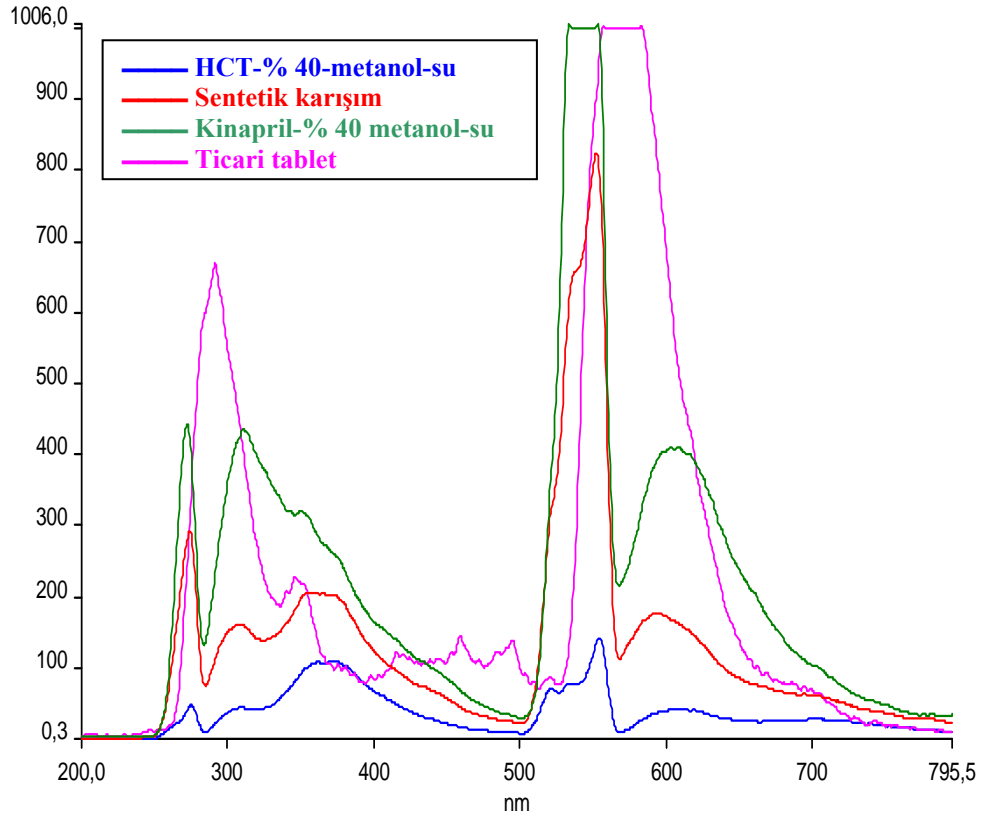
Tablo.7.12. ADE inhibitörlerinin % 10-40 metanol-su ortamlarındaki SPARC teorik pKa değerleri ile karşılaştırmalı pKa değerleri (n=3, n.d.= Bu çalışmada tayin edilemedi).

Bileşik	pKa Sayısı	SPARC pKa	Metanol Yüzdesi (% v/v)			
			10	20	30	40
Ramipril	1	3.82	4.48±0.16	4.45±0.08	2.55±0.15	3.52±0.04
	2	5.55	5.57±0.03	5.60±0.05	5.52±0.06	5.59±0.03
Lisinopril	1	1.91	2.31±0.13	2.51±0.12	2.55±0.08	n.d.
	2	3.88	3.58±0.15	3.65±0.08	4.55±0.15	n.d.
	3	6.77	5.55±0.10	7.10±0.05	7.15±0.10	n.d.
	4	10.21	8.67±0.09	8.89±0.04	8.95±0.05	
Enalapril	1	3.82	3.55±0.06	4.45±0.11	4.49±0.09	4.48±0.13
	2	5.55	6.42±0.12	6.45±0.15	6.42±0.07	6.05±0.08
Kinapril	1	3.65	3.75±0.09	3.15±0.15	3.55±0.08	n.d.
	2	5.22	5.50±0.08	5.15±0.10	5.25±0.07	n.d.

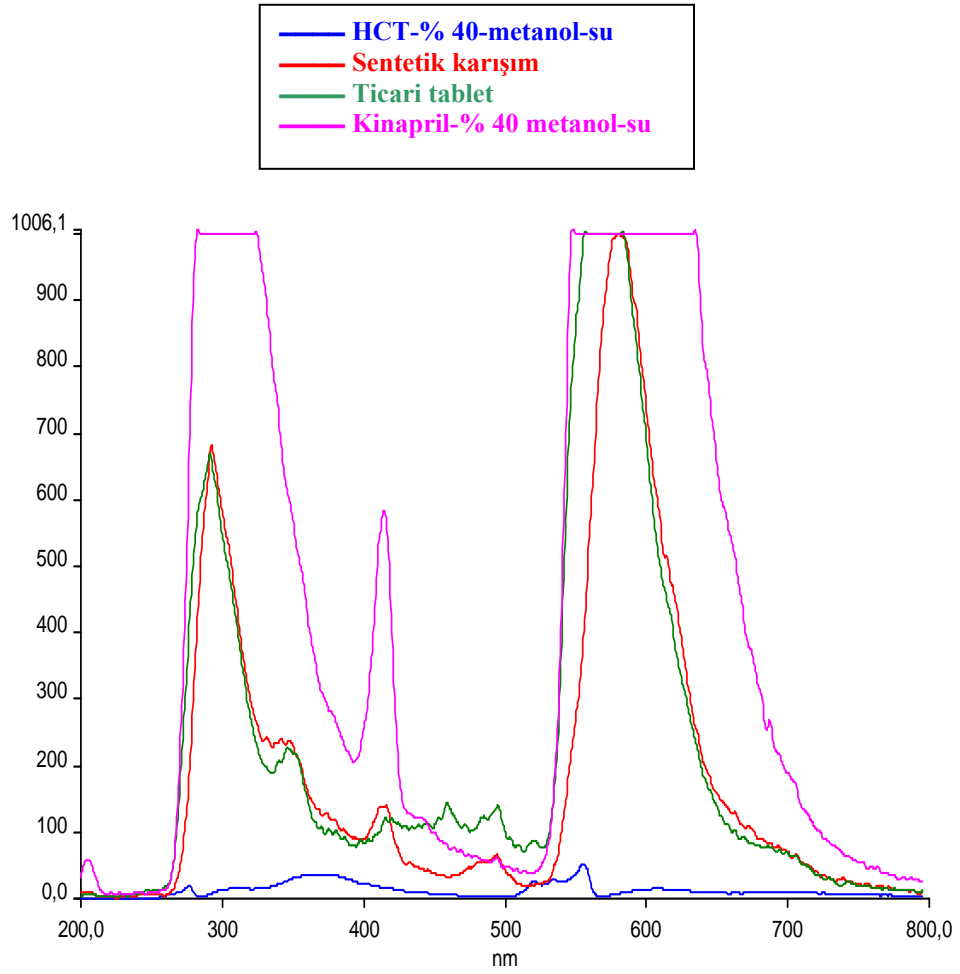
**Tablo.7.13.** ADE inhibitörlerinin % 10-40 asetonitril-su ortamlarındaki SPARC teorik pKa değerleri ile karşılaştırmalı pKa değerleri (n=3, n.d.= Bu çalışmada tayin edilemedi).

Bileşik	pKa Sayısı	SPARC pKa	Asetonitril Yüzdesi (% v/v)			
			10	20	30	40
Ramipril	1	3.82	4.49±0.12	3.52±0.09	3.60±0.05	4.48±0.08
	2	5.55	5.50±0.08	5.52±0.03	6.50±0.12	6.52±0.05
Enalapril	1	3.82	3.46±0.04	4.51±0.07	3.59±0.03	3.56±0.07
	2	5.55	5.45±0.02	6.50±0.15	5.60±0.02	5.52±0.03
Kinapril	1	3.65	2.60±0.15	2.70±0.18	3.10±0.15	3.50±0.10
	2	5.22	4.55±0.17	5.05±0.12	5.50±0.08	5.15±0.13

#### 7.4. Tabletlerde Kinapril Tayini



**Şekil.7.68.** 270 nm' de uyarılan örneklerin emisyon spektrumları



**Şekil.7.69.** 200 nm’ de uyarılan örneklerin emisyon spektrumları

ADE inhibitörleri ve HKT ikili ilaç etken madde karışımlarının direkt spektrofotometrik yöntemle, herhangi bir ayırım ve ön işlem uygulanmaksızın analizleri, mevcut deney koşullarında gerçekleştirilememiştir. Çünkü, her ne kadar 270 nm uyarma dalgaboyunda, bu iki ilaç etken maddesi farklı dalga boylarında emisyon piki verse de, bu maddelerin aynı anda tayini için doğrusal bir kalibrasyon grafiği ve uygun bir doğrusal çalışma derişim aralığı elde edilememiştir. Tez çalışmasının çok kapsamlı olması sebebiyle daha derin ve detaylı bir çalışma yapmak için bu tez süresi de yeterli olmamıştır. Bu maddelerin aynı anda tayini için, bu tezde geliştirilmeye çalışılan yöntem ile birlikte bir senkron floresans yönteminin geliştirilmesi daha sonraki çalışmalarda planlanmaktadır.

## 8. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Silazapril, enalapril, kinapril, ramipril ve lisinopril gibi anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörleri (antihipertansif ajanlar), hipertansiyon ve kalp yetmezliği hastalıklarının tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardır. ADE inhibitörleri, esas olarak esansiyel hipertansiyon, konjestif kalp yetmezliği, sol ventrikülerde diyastolik disfonksiyon, bazı aritmiler ve diyabetik nefropatinin tedavisi gibi endikasyon alanlarında kullanılmaktadır. Ayrıca miyokard infarktüsü sonrası ortaya çıkan sol ventrikül yetmezliğinin önlenmesinde bu ilaçların yararlı olduğu anlaşılmıştır. Bu ilaçlar özellikle de insüline bağımlı diyabetiklerdeki nefropati gelişmiş hipertansiyonun tedavisinde kullanılmaktadır. ADE inhibitörleri, diüretik tedavisi uygulanan bazı hastalarda, bir tiazid diüretik olan hidroklorotiazid (HKT) ile kombine edilerek uygulanmaktadır. İlaçların etki mekanizmalarının tam olarak açıklanabilmesi için etken maddelerinin tüm kimyasal özelliklerinin bilinmesi gerekir. Asitlik ve bazlık sabitleri de ilaç etken maddelerinin en önemli kimyasal özellikleridir.

Bu konu ile ilgili kaynaklar incelendiğinde bu ilaçların suda ve su-organik çözücü ikili karışımlarındaki iyonlaşma sabitleri ile ilgili yeterli çalışmanın bulunmadığı anlaşılmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada, enalapril, kinapril, ramipril ve lisinopril gibi anjiyotensin-dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörlerinin (antihipertansif maddeler) belirli yüzdelerdeki asetonitril-su ve metanol-su karışımlarında florimetrik parametrelerin optimize edilmiş, daha sonra pH ve çözücü yüzdesinin florimetrik parametrelere etkisi incelenerek, optimum uyarma ve emisyon dalga boyları ve çözücü yüzdelerinde pH-floresans şiddeti grafikleri çizilerek pKa değerleri belirlenmiştir. Nötral ve iyonik türlerin farklı floresans özellikleri olmasına dayanan spektroflorimetrik yöntem ile belirlenen pKa değerleri, online teorik pKa hesaplama programı olan SPARC sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Böylece, ADE inhibitörlerinin su ve ikili karışımlardaki asit-baz dengeleri ile ilgili davranışları hakkında bilgi sahibi olunmuştur.

Spektroflorimetrik yöntemle tayin edilen pKa değerleri; reaksiyon oranlarını, biyolojik aktiviteyi, biyolojik naklini, biyolojik transferi ve çevresel akıbetini belirlemek ve anlamak için önemli bir anahtar parametredir, ayrıca çözücü

bileşiminin bir fonksiyonu olarak pKa değerlerinin bilinmesi, iyonlaşabilen bileşiklerin ayrılması için özellikle ters faz HPLC ve kapiler elektroforez uygulamalarında da faydalıdır ve ilaç bileşiklerinin fizikokimyasal davranışları hakkında önemli bilgiler sağlayacaktır.

ADE inhibitörleri, karboksil ve amino grupları gibi asidik ve bazik özellikteki fonksiyonel gruplara sahiplerdir. ADE inhibitörlerinin pH 2-9 aralığında farklı florimetrik özelliğe sahip iyonlaşmış türler oluşturduğu gözlenmiştir. Bu türlerin bazıları (Enalapril, Kinapril ve Ramipril gibi) floresent iken, bazıları (Lisinoprilin bazik türleri gibi) floresesans özellik göstermemiştir. Ramiprilin floresans davranışının, asidik türlerinin bazik türlerinden daha yüksek floresansa sahip olmasından dolayı, çalışılan diğer ADE inhibitörlerinden farklı olduğu belirlenmiştir. Deneysel sonuçlar incelendiğinde, ADE inhibitörlerinin metanol-su ortamlarındaki pKa değerlerinin asetonitril-su ortamlarındakine çok yakın olduğu görülmüştür. Ayrıca spektroflorimetrik yöntemle tayin edilen pKa değerleri, SPARC on-line pKa hesaplama programında elde edilen değerlere de çok yakındır.

Su ve metanol protik-nötral çözücülerdir, aynı zamanda bunların bağıl asitlik/bazlık özellikleri de oldukça kuvvetlidir. Ancak asetonitril aprotik, protofobik bir çözücüdür ve oldukça zayıf bağıl asitlik/bazlık özelliğe sahiptir (solvatokromik parametreleri,  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\pi^*$ , DN ve AN, düşüktür). Çözücülerin dipol momenti ve viskozitesi, florimetrik tayinlerde floresans şiddetini etkileyen çok önemli bir parametredir. Fakat organik çözücü-su ikili karışımlarında, suyun en yüksek polariteye sahip olmasından dolayı bu durum çok farklıdır.

Farklı çözücü yüzdelerinde ADE inhibitörlerinin floresans davranışları incelendiğinde, asetonitril- su ortamlarında, asetonitril yüzdesi arttıkça, diğer ADE inhibitörlerinin floresans şiddeti yaklaşık olarak sabit kalırken, Kinaprilin floresans şiddetinin oldukça arttığı gözlenmiştir.

## 9. KAYNAKLAR

- Abdellatef, H. E., 2007. "Spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for the determination of ramipril in its pure and dosage form", *Spectrochimica Acta Part A*, 66, 701–706.
- Aktas, E. S., Ersoy, L., Sagırlı, O., 2003. "A new spectrofluorimetric method for the determination of lisinoprilin tablets", *Il Farmaco* 58, 165-168.
- Al-Majed, A. A., Belal, F., and Al-Warthan A. A., 2001. "Spectrophotometric determination of ramipril (a novel ace inhibitor) in dosage forms", *Spectroscopy Letters*, 34(2), 211–220.
- Barary, M.H., 1984. *Indian J. Pharm. Sci.*, 46 (6) 224–226.
- Barbosa, J., Barrón, D., Jiménez-Lozano, E., Sanz-Nebot, V., 2001. "Comparison between capillary electrophoresis, liquid chromatography, potentiometric and spectrophotometric techniques for evaluation of pKa values of zwitterionic drugs in acetonitrile–water mixtures, *Analytica Chimica Acta* 437, 309–321
- Beltran, J. L., Şanlı, N., Fonrodona, G., Barrón, D., Özkan, G., Barbosa J., 2003. "Spectrophotometric, potentiometric and chromatographic pKa values of polyphenolic substances in water and acetonitrile-water media." *Analytica Chimica Acta*, Volume 484, Issue 2, Pages 253-264.
- Berzas Nevado, J.J., Guiberteau, C.C., Salinas, F., 1992. *Talanta* 39, 547–553.
- Bhushan, R., Gupta, D., Singh, S. K., 2006. "Liquid chromatographic separation and UV determination of certain antihypertensive agents", *Biomed. Chromatogr.*, 20, 217–224.
- Blaih, S. M., Abdine, H. H., El-yazbi, F. A., Shaalan, R. A., 2000. "Spectrophotometric determination of enalapril maleate and ramipril in dosage forms", *Spectroscopy Letters*, 33 (1) , 91-102.
- Cagigal, E., Gonza'lez, L., Alonso, R.M., Jime'nez, R.M., 2001. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 26, 477–486.
- Cocolas, G.H., Delgado, J.N., Remers, W.A. (Eds.), 1998. *Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*, 10th ed, Lippincott-Raven, Philadelphia, p. 603.
- Dinc, E., Baleanu, D., 2002. "Spectrophotometric quantitative determination of cilazapril and hydrochlorothiazide in tablets by chemometric methods", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 30, 715-723.



- Dinc, E., Özdemir, A., 2005. "Linear regression analysis and its application to multivariate chromatographic calibration for the quantitative analysis of two-component mixtures", *Il Farmaco*, 60, 591-597.
- El-Gindy, A., Ashour, A., Abdel-Fattah, L., Shabana, M. M., 2001. "Spectrophotometric, septrofluorimetric and LC determination of lisinopril", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25, 913-922.
- El-Gindy, A., Ashour, A., Abdel-Fattah, L., Shabana, M. M., 2001. "Spectrophotometric, septrofluorimetric and LC determination of lisinopril", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25, 913-922.
- El-Gindy, A., Ashour, A., Abdel-Fattah, L., Shabana, M. M., 2001. "Spectrophotometric, septrofluorimetric and LC determination of lisinopril", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25, 913-922.
- El Walily, A.F.M., Belal, S.F., Heaba, E.A., El Kersch, A., 1995. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13, 851.
- El Yazbi, F. A., Mahrous, M. E., Hammud, H. H., Sonji, G. M., Sonji, N. M., 2008. "Comparative spectrophotometric, spectrofluorometric, and high-performance liquid chromatographic study for the quantitative determination of the binary mixture felodipine and ramipril in pharmaceutical formulations", *Analytical Letters*, 41, 853–870.
- Elshanawane, A. A., Mostafa, S. M., Elgawish, M. S., 2008. "Application of a validated, stability-indicating LC method to stress degradation studies of ramipril and moexipril.HCl", *Chromatographia*, 67, 567–573.
- Erdemgil, F.Z., Şanlı, S., Şanlı, N., Özkan, G., Barbosa, J., Guiteras, J. And Beltrán, J.L., 2007. "Determination of pKa values of some hydroxylated benzoic acids in methanol-water binary mixtures by LC methodology and potentiometry" *Talanta*, Volume 72, Issue 2, Pages 489-496.
- Erk, N., Kartal, M., 1999. *Anal. Lett.* 32, 1131.
- Gündüz, T., 2002. *İnstrümental Analiz*, Altıncı baskı, Bölüm 12, Gazi Büro Kitabevi, Ankara.
- Kumar, V., Shah, R. P., Singh, S., 2008. "LC and LC–MS methods for the investigation of polypills for the treatment of cardiovascular diseases Part 1. Separation of active components and classification of their interaction/degradation products" *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 47, 508–515.
- Küçükkolbaşı, S., 2003. İmidazol türevi ilaçlarda etken madde tayini için spektroflorimetrik yöntem geliştirilmesi, Doktora Tezi. S.Ü. Fen Bilimleri Enstitüsü, Konya.

- Lozano, R., Warren, F.V. Jr., Perlman, S., Joseph, J.M., 1995. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 13, 139.
- Magri, A.L., Balestrieri, F., Magri, A.D., Marini, D., 1995. *Talanta* 42 (11) 1719–1723.
- Menon, G.N., White, L.B., 1981. *J. Pharm. Sci.* 70 (9)1083–1085.
- Maguregui, M.I., Jimenez, R.M., Alonso, R.M., 1998. *J. Chromatogr. Sci.* 36 ,516.
- Ogretir, C., Berber, H., Asutay, O., 2001. “Spectroscopic Determination of Acid Dissociation Constants of Some Imidazole Derivatives” *J. Chem. Eng. Data* , 46, 1540-1543
- Panderi, I.E., Parissi-Poulou, M., 1999. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 21, 1017.
- Parekh, S. A., Pudage, A., Joshi, S. S., Vaidya, V. V., Gomes, N. A., Kamat, S. S., 2008. “Simultaneous determination of hydrochlorothiazide, quinapril and quinaprilat in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry”, *Journal of Chromatography B*, 2008. Accepted manuscript, Accepted date: 27-7, 28 pages
- Polster, J., Lachmann, H., 1989. *Spectrometric Titrations*, VCH publishers, USA
- Prieto, J. A., Jiménez, R. M., Alonso, R. M., 2003. “Square wave voltammetric determination of the angiotensin-converting enzyme inhibitors cilazapril, quinapril and ramipril in pharmaceutical formulations”, *Il Farmaco*, 58, 343-350.
- Rhfols, C., Ross, M., Bosch, E., 1997. “A comparison between different approaches to estimate the aqueous pK, values of several non-steroidal anti inflammatory drugs” , *Analytica Chimica Acta* 338, 127-1 34
- Rontogianni, M. A., Markopoulou, C. K., Koundourellis, J. E., 2006. “HPLC and chemometrically-assisted spectrophotometric estimation of two binary mixtures for combined hypertension therapy”, *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29, 2701–2719.
- Shetkar, P.B., Shinde, V.M., 1997. *Anal. Lett.* 30, 1143.
- Salinas, F., Berzas Nevado, J.J., Espinosa, M.A., 1990. *Talanta* 37, 347–351.
- Sane, R.T., Valiyare, G.R., Deshmukh, U.M., Singh, S.R., Sodhi R., 1992. *Indian Drugs* 29, 558.
- Sa’Sa, S.I., Jalal, I.M., Khalil, H.S., 1988. *J. Liq. Chromatogr.* 11(8)1673–1696.

Süzer, Ö. , Hipertansiyon Tedavisinde Kullanılan İlaçlar, [www.onersuzer.com](http://www.onersuzer.com)

Şanlı, N., Fonrodona, G., Barrón, D., Özkan, G. and Barbosa, J., 2002. "Prediction of chromatographic retention, pKa values and optimization of the separation of polyphenolic acids in strawberries" *Journal of Chromatography A*, Volume 975, Issue 2, Pages 299-309.

Şanlı, N., Fonrodona, G., Barbosa, J., Ozkan, G., Beltran, J.L., 2005. "Modelling retention in liquid chromatography of polyphenolic acids-Prediction of solvent composition and pH of the mobile phase", *Analytica Chimica Acta*, 537, 53-61.

Şanlı, N., 2007. Bazı sülfonamidlerin sıvı kromatografi yöntemi ile tayini, Doktora Tezi. Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.

Tama, K.Y., Takács-Novák, K., 2001. "Multi-wavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: a validation study" , *Analytica Chimica Acta* 434, 157–167

Thomas, B.R., Fang, X.G., Chen, X., Tyrrell, R.J., Ghodbane, S., 1994. *J. Chromatogr. B* 657 , 383.

Thomas, B.R., Ghodbane, S., 1993, *J. Liq. Chromatogr.* 16, 1983.

Türk Kardiyoloji Derneği web sitesi, [www.tkd.org.tr](http://www.tkd.org.tr)

Wan, H., Holmén, A., Någård, M., Lindberg, W., 2002. "Rapid screening of pK values of pharmaceuticals by pressure- assisted capillary electrophoresis combined with short-end injection", *Journal of Chromatography A*, Volume979, Pages 369-377.

Zacharis, C. K., Tzanavaras, P. D., Themelis, D. G., Theodoridis, G. A., A., Economou, Rigas, P. G., 2004. "Rapid Spectrofluorimetric determination of lisinopril in pharmaceutical tablets using sequential injection analysis", *Anal Bioanal Chem* 379, 759-763.

## ÖZGEÇMİŞ

07.11.1986 yılında Konya' nın Bozkır ilçesinde doğdum. İlkokul, Orta ve Lise eğitimimi Konya'da tamamladım. 2003 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümüne girdim. 2007 yılında mezun oldum. Aynı yıl tezli yüksek lisans programına girmeye hak kazandım. Halen Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Analitik Kimya Anabilimdalı' nda yüksek lisans yapmaktayım.

Eda EDİZ