



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI ANJİYOTENSİN II RESEPTÖR ANTAGONİSTLERİNİN (ARA-II) FLORESANS ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ VE FLORİMETRİK YÖNTEM İLE İYONLAŞMA SABİTLERİNİN TAYİNİ

Teslime ERŞAN

YÜKSEK LİSANS

Kimya Anabilim Dalı

Temmuz-2011
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

Bu tezdeki bütün bilgilerin etik davranış ve akademik kurallar çerçevesinde elde edildiğini ve tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade ve bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

DECLARATION PAGE

I hereby declare that all information in this document has been obtained and presented in accordance with academic rules and ethical conduct. I also declare that, as required by these rules and conduct, I have fully cited and referenced all material and results that are not original to this work.

Teslime ERŞAN
Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

BAZI ANJİYOTENSİN II RESEPTÖR ANTAGONİSTLERİNİN (ARA-II) FLORESANS ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ VE FLORİMETRİK YÖNTEM İLE İYONLAŞMA SABİTLERİNİN TAYİNİ

Teslime ERŞAN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

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

2011, 102 Sayfa

Jüri
Yrd. Doç. Dr. S.Beniz GÜNDÜZ
Prof. Dr. Erol PEHLİVAN
Yrd. Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI

Anjiyotensin II Reseptör Antagonistleri (ARA-II), hipertansiyon ve kalp yetmezliği tedavisinde etkin maddelerdir ve geleneksel anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörlerine alternatif olarak düşünülmüştür. Çünkü bunlar, renin-anjiyotensin sistemde anjiyotensin tip 1'i (AT 1) seçimli olarak bloke edebilirler. İrbesartan, losartan, kandesartan, valsartan ve telmisartan birçok özelliği ADE inhibitörlerininkine benzeyen özgül anjiyotensin II reseptör antegonistleridir. Anjiyotensin II Reseptör Antagonistleri amfoterik bileşiklerdir ve yapısal olarak bağlı bifenilkarboksilik asit kısmı içeren telmisartan dışında, aynı bifeniltetrazol kısmına sahiplerdir. Anti-hipertansif ilaçlar olarak ARA II'lerin iyonlaşma sabitlerinin birkaç uygun yöntem ile tam olarak tayini, etki mekanizmalarının anlaşılmasında ve biyoyararlanabilirlikleri açısından oldukça önemlidir.

Bu tez kapsamında öncelikle ARA-II'lerin organik çözücü-su ortamlarında florimetrik parametreleri (uyarma ve emisyon dalga boyu, floresans şiddeti) belirlenmiştir. Florimetrik parametrelerin belirlenmesi için, öncelikle saf asetonitril, metanol, DMF ve su içerisinde, daha sonra %10 organik çözücü - %90 su karışımlarında ilaç etken maddelerinin uygun derişimlerdeki çözeltileri hazırlanarak, uyarma dalga boyları 10' ar nm aralıklarla değiştirilip emisyon spektrumları alınmış ve her bir ilaç etken maddesinin, her bir organik çözücü-su ortamında maksimum floresans şiddetine sahip oldukları uyarma ve emisyon dalga boyları belirlenmiştir. ARA II'lerin molekül yapılarında karboksil (-COOH) ve amin (-NH) grupları gibi, asidik ve bazik fonksiyonlu gruplara sahip olduklarından, optimum koşullarda %10-40 asetonitril-su ortamlarında, bu ilaç etken maddelerinin iyonlaşma sabitleri spektroflorimetrik ve spektrofotometrik yöntemlerle hem pH-floresans şiddeti grafiklerinden hem de pKa değerlerini deney koşullarında hesaplayan bir bilgisayar programı olan STAR programıyla iyonlaşma sabitleri tayin edilmiştir. Deneysel yöntemlerle elde edilen pKa değerleri, SPARC programından (online teorik pKa hesaplama programı) hesaplanan teorik pKa değerleriyle karşılaştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Anjiyotensin II reseptör antagonistleri (ARA II), İrbesartan, Kandesartan, Losartan, pKa, Spektroflorimetri, Spektrofotometri, Telmisartan, Valsartan

ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATION OF THE FLUORESCENCE PROPERTIES OF SOME ANGIOTENSIN II RECEPTOR ANTAGONISTS (ARA II) AND DETERMINATION OF THEIR IONIZATION CONSTANTS BY USING FLUORIMETRIC METHODS

Teslime ERŞAN

THE GRADUATE SCHOOL OF NATURAL AND APPLIED SCIENCE OF SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE IN CHEMİSTRY

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

2011, 102 Pages

Jury
Asst. Prof. Dr. S. Beniz GÜNDÜZ
Prof. Dr. Erol PEHLİVAN
Asst. Prof. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI

Angiotensin II receptor antagonists (ARA-II), are effective materials in hypertension and in the treatment of cardiac failure and is used as an alternative to conventional angiotensin converting enzyme (ACE) inhibitors because they can selectively block angiotensin type-I (AT I) in renin-angiotensin system. Irbesartan, losartan, candesartan, valsartan and telmisartan have many similarities to ACE inhibitors and are specific angiotensin II receptor antagonists. Angiotensin II receptor antagonists are amphoteric compounds and apart from telmisartan which contains biphenilcarboxilic acid in structure, they all have bipheniltetrazol fraction. The exact determination of ionization constants using several suitable methods is quite usefull in understanding the action mechanisms and bioavailability of ARA II anti-hypertensive drugs.

For this reason in this study, the fluorimetric parameters of ARA IIs in organic solvent-water media are determined. In order to specify the fluorimetric parameters (excitation and emission wavelength, fluorescence intensity), the efficient drug components were prepared at suitable concentrations primarily in acetonitrile, methanol, DMF, DMSO and in pure water, and then in 10-90 % organic solvent-water mixtures. The emission spectra were obtained by changing the excitation wavelength at 10 nm intervals and the excitation and emission wavelengths were determined for every efficient drug molecule, in every organic solvent-water medium in which they had the maximum fluorescence intensity. Since ARA IIs contain acidic and basic functional groups such as carboxyl (-COOH) and amine (-NH) groups, under optimum conditions, 10-40 % acetonitrile-water medium, the effective drug materials' ionization constants were determined by spectrofluorimetric and spectrofluorimetric methods both from the pH-fluorecence intensity graphics and from the STAR programme which calculates the pKa values during experimental conditions. The pKa values obtained experimentally were compared to theoretic pKa values obtained from SPARC programme (online theoretic pKa calculation programme).

Keywords: Angiotensin II receptor antagonists (ARA II), Candesartan, Irbesartan, Losartan, pKa, Spectrofluorimetry, Spectrofotometry, Telmisartan, Valsartan

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 10201027 no' lu proje olarak desteklenmiştir.

Yüksek lisans eğitimimin ve çalışmamın her aşamasında beni destekleyen, her daim bana sevgiyle yaklaşan, bizlere bir anne gibi davranan, hiçbir zaman yardımlarını esirgemeyen, bilgi ve deneyimlerini büyük bir hoşgörüyle bana aktaran kendisiyle çalışmaktan mutluluk duyduğum çok değerli hocam Yrd. Doç. Dr. Beniz GÜNDÜZ' e, tez hazırlama sürecinde her konuda yardımını gördüğüm, bilgi ve tecrübelerini benimle paylaşan sevgili hocam Yrd. Doç. 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 Prof. Dr. Güleren ALSANCAK'a sonsuz şükran ve saygılarımı sunarım.

Tez çalışmalarım boyunca bana laboratuar 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.

Laboratuar çalışmalarım boyunca beni yalnız bırakmayan çalışma arkadaşlarım Şükran KÜÇÜKKARTALLAR'a ve Eda EDİZ'e, yaşamım boyunca hep yanımda olan; sevgi ve desteklerini esirgemeyen aileme, benden desteğini esirgemeyen eşime ve bu süreçteki sabrı için oğluma sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Teslime ERŞAN
KONYA-2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **x**

1. GİRİŞ **1**

2. TEORİK KISIM **3**

2.1. Moleküler Floresans ve Fosforesans 3
2.1.1. Floresans ve fosforesans spektroskopisi yöntemleri 4
2.1.2. Lüminesans spektrofotometreleri 5
2.1.3. Spektroflorometrelerin ayarlanması 7
2.1.4. Fotolüminesans kuantum verimi ve floresansı etkileyen faktörler 8
2.1.5. Floresans analizin avantaj ve dezavantajları 12
2.1.6. Fosforesans 13
2.1.7. Fosforesans ölçme 13
2.1.8. Florimetri ve uygulama alanları 13
2.1.9. Florimetrik uygulamalarda karışımların tayinleri 16
2.2. İyonlaşma Sabiti Tayin Yöntemleri 19
2.2.1. Potansiyometrik yöntemle iyonlaşma sabiti tayini 19
2.2.2. Spektroskopik yöntemle iyonlaşma sabiti tayini 20
2.2.3. Sıvı kromatografik yöntemler 22
2.2.4. Elektroforetik yöntemler 22
2.2.5. Florimetrik yöntemler 23

3. ANJİYOTENSİN II RESEPTÖR ANTAGONİSTLERİ **26**

3.1. Anjiotensin II Reseptör Antagonistlerinin Kimyasal Yapıları ve SPARC Programı İle Hesaplanan Maksimum pKa Değerleri 28
3.1.1. Valsartan 28
3.1.1.1. Valsartanın makraskopik pKa değerleri 29
3.1.1.2. Valsartanın SPARC programında çizilen pH grafikleri 30
3.1.2. Losartan 30
3.1.2.1. Losartanın makraskopik pKa değerleri 31
3.1.2.2. Losartanın SPARC programında çizilen pH grafikleri 32
3.1.3. Kandesartan 32
3.1.3.1. Kandesartanın makraskopik pKa değerleri 33
3.1.3.2. Kandesartanın SPARC programında çizilen pH grafikleri 34
3.1.4. Telmisartan 34
3.1.4.1. Telmisartanın makraskopik pKa değerleri 35
3.1.4.2. Telmisartanın SPARC programında çizilen pH grafikleri 36
3.1.5. İrbesartan 37

3.1.5.1. İrbesartanın makraskopik pKa değerleri 37
3.1.5.2. İrbesartanın SPARC programında çizilen pH grafikleri 38

4. KAYNAK ARAŞTIRMASI 40

5. MATERYAL VE YÖNTEM 47

5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 47
5.2. Kullanılan Çözücüler 48
5.3. Kullanılan Cihazlar 48
5.4. Çözeltiler 49

6. DENEYSEL İŞLEM 50

6.1. Çözeltilerin Hazırlanması 50
6.1.1. Valsartanın çözeltilerinin hazırlanması 50
6.1.1.1. Valsartanın metanol-su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması 50
6.1.1.2. Valsartanın asetonitril-su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması 50
6.1.1.3. Valsartanın su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması 50
6.1.2. Losartanın çözeltilerinin hazırlanması 51
6.1.2.1. Losartanın metanol-su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması 51
6.1.2.2. Losartanın asetonitril-su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması 51
6.1.2.3. Losartanın su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması 51
6.1.3. Kandesartanın çözeltilerinin hazırlanması 51
6.1.3.1. Kandesartanın metanol-su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması 51
6.1.3.2. Kandesartanın asetonitril-su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması 52
6.1.3.3. Kandesartanın su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması 52
6.1.4. Telmisartanın çözeltilerinin hazırlanması 52
6.1.4.1. Telmisartanın metanol-su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması 52
6.1.4.2. Telmisartanın asetonitril-su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması 53
6.1.4.3. Telmisartanın su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması 53
6.1.5. İrbesartanın çözeltilerinin hazırlanması 53
6.1.5.1. İrbesartanın metanol-su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması 53
6.1.5.2. İrbesartanın asetonitril-su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması 53
6.1.5.3. İrbesartanın su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması 54
6.1.6. Titrant çözeltisinin hazırlanması 54
6.2. Baz Ayarlanması 54
6.3. Asit Ayarlanması 55

7. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 56

7.1. Anjiyotensin II Reseptör Antagonistlerinin Spektroflorimetrik Özelliklerinin Belirlenmesi 56
7.1.1. Kandesartanın asetonitril ve metanoldeki emisyon spektrumları 56
7.1.2. İrbesartanın asetonitril ve metanoldeki emisyon spektrumları 57
7.1.3. Losartanın asetonitril ve metanoldeki emisyon spektrumları 59
7.1.4. Telmisartanın asetonitril ve metanoldeki emisyon spektrumları 61
7.1.5. Valsartanın asetonitril ve metanoldeki emisyon spektrumları 62
7.2. Floresans Şiddetine Çözücü Yüzdesinin Etkisinin İncelenmesi 64
7.2.1. Kandesartanın farklı çözücü yüzdelerinde alınan emisyon spektrumları 64
7.2.2. İrbesartanın farklı çözücü yüzdelerinde alınan emisyon spektrumları 67

7.2.3. Losartanın farklı çözücü yüzdelerinde alınan emisyon spektrumları 69
7.2.4. Telmisartanın farklı çözücü yüzdelerinde alınan emisyon spektrumları 72
7.2.5. Valsartanın farklı çözücü yüzdelerinde alınan emisyon spektrumları 74
7.3. Anjiyotensin Reseptör Antagonistlerinin İyonlaşma Sabitlerinin Tayini 77
7.3.1. Spektroflorimetrik yöntemle iyonlaşma sabitlerinin tayini 77
7.3.1.1. Losartanın % 10-40 ACN-Su ortamlarında farklı pH'lardaki emisyon spektrumları 78
7.3.1.2. Valsartanın % 10-40 ACN-Su ortamlarında farklı pH'lardaki emisyon spektrumları 80
7.3.2. ARA II bileşiklerinin pH-floresans şiddeti titrasyon grafikleri 82
7.3.2.1. Losartanın %10-40 ACN/Su ortamlarındaki pH-floresans şiddeti titrasyon grafikleri 82
7.3.2.2. Valsartanın %10-40 ACN/Su ortamlarındaki pH-floresans şiddeti titrasyon grafikleri 84
7.3.3. Spektrofotometrik yöntemle iyonlaşma sabitlerinin tayini 86
7.3.3.1. Losartanın % 10-40 ACN-Su ortamlarında farklı pH'lardaki absorpsiyon spektrumları 87
7.3.3.2. Valsartanın % 10-40 ACN-Su ortamlarında farklı pH'lardaki absorpsiyon spektrumları 91

8. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 96

8.1. Sonuçlar 96
8.2. Öneriler 97

KAYNAKLAR 98

ÖZGEÇMİŞ 102

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

α : Bağıl derişim
φ : Nötralizasyon kesri

Kısaltmalar

ACN	Asetonitril
ARA	Anjiyotensin reseptör antagonistleri
DMF	Dimetil Formamit
HPLC	Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi
IUPAC	"International Union of Pure and Applied Chemistry"
PKPOT	Potansiyometrik pKa
SPARC	"Performs Automated Reasoning in Chemistry"
STAR	"Stabiliy Constanst by Absorbance Readings

1. GİRİŞ

İlaçlar, günlük yaşamımızda önemli bir yer teşkil etmektedir. Değişik maksatlarla çok çeşitli ilaçlar kullanılmakta ve bunlara her geçen gün yenileri eklenmektedir. Bunların üretiminden kullanımına hatta vücuttan atılımına kadar olan tüm noktalarda yapılan analizler büyük önem arz eder. İlaçların tablet üretiminde tablet içine konulan miktar, kullanılan kimyasal maddelerin asit-baz özellikleri sağlığımız için çok önemlidir. Alınan dozların fazla olması önemli sağlık problemlerine neden olurken, az olması hastalıkların tedavisine bir fayda sağlamayabilir. Bu yüzden yapılacak olan ilaç analizlerinin titiz bir çalışmadan geçirilmesi insan sağlığı açısından çok önemlidir.
Söz konusu olan ilaç analizlerinin yapılabilmesi için, önemli olan öncelikle analiz için kullanılacak aletler ve elde edilecek verilerin anlaşılabilir hale getirebileceği matematiksel metotlardır.

Günümüzde ilaç analizi için HPLC, MS ve ICP gibi son derece hassas ve pahalı birçok cihaz bulunmaktadır. Kullanılan bu yöntemler diğerlerine göre daha karışık ve nispeten pahalı konumdadır. Oysaki, floresans spektroskopisi optik bir yöntem olarak gittikçe artan bir önem kazanmaktadır (Gündüz, 1995). Floresans spektroskopisi yönteminin duyarlı ve seçimli olması, uygulama alanını genişletmiş ve son yıllarda çok fazla kullanılabilir bir metot haline getirmiştir. Ayrıca florimetri farmakolojide klinik numune analizlerinin kullanımının dışında, numunelerde çok düşük derişimlerdeki türlerin tayinine olanak sağladığı için 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 tayinlerinde de yaygın olarak tercih edilen bir yöntemdir.

Bu çalışmada insan sağlığı için büyük önem taşıyan antihipertansif ilaç grubu olan Anjiotensin II Reseptör Antagonistlerinin florimetrik olarak pKa hesaplamaları yapılmıştır.

Anjiyotensin II Reseptör Antagonistleri (ARA-II), hipertansiyon ve kalp yetmezliği tedavisinde etkin maddelerdir ve geleneksel anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörlerine alternatif olarak düşünülmüştür. Çünkü bunlar, renin-anjiyotensin sistemde anjiyotensin tip 1'i (AT 1) seçimli olarak bloke edebilirler. İrbesartan, losartan, kandesartan, valsartan ve telmisartan birçok özelliği ADE inhibitörlerininkine benzeyen özgül anjiyotensin II reseptör antegonistleridir. ARA-II'ler oral yolla alımından sonra hızlı bir şekilde absorplanır ve 0,5-4 saat sonra plazmadaki derişimi

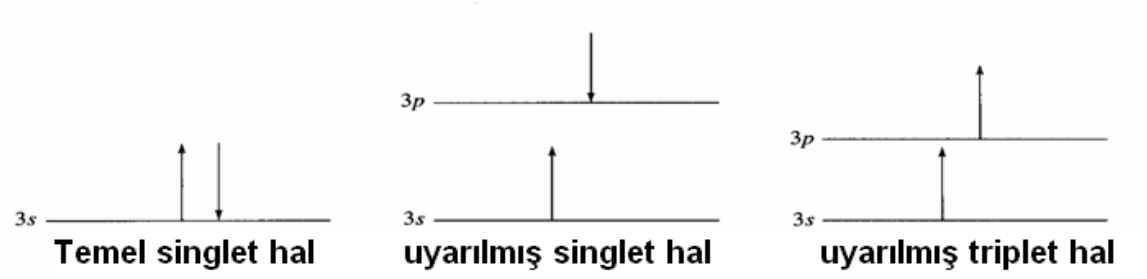
maksimum konsantrasyona ulaşabilir. Bununla birlikte, oral yolla alımından sonra bu ilaçların bazıları plazmada ng/ml seviyesindeki düşük derişimlerde oluşur ki bu da onların tayini ve/veya görüntülenmesi için problemler ortaya çıkarır. İnsan vücudunda bu ilaçların tayini için yine de duyarlı bir yöntem oluşturulabilir. Anjiyotensin II Reseptör Antagonistleri amfoterik bileşiklerdir ve yapısal olarak bağlı bifenilkarboksilik asit kısmı içeren telmisartan dışında, aynı bifeniltetrazol kısmına sahiplerdir. Antihipertansif ilaçlar olarak ARA II'lerin iyonlaşma sabitlerinin birkaç uygun yöntem ile tam olarak tayini, etki mekanizmalarının anlaşılmasında ve biyoyararlanabilirlikleri açısından oldukça önemlidir.

Bu nedenle bu çalışmada öncelikle, bu bileşiklerin çeşitli çözücü ortamlarında floresans özelliklerinin incelenmesi ve daha sonra aynı ortamlarda florimetrik ve spektrofotometrik yöntemlerle iyonlaşma sabitlerinin tayini amaçlanmaktadır. Deneysel yöntemlerle elde edilen veriler teorik verilerle, SPARC (online teorik pKa hesaplama programı) sonuçlarıyla ve literatür verileriyle karşılaştırılmıştır.

2. TEORİK KISIM

2.1. Moleküler Floresans ve Fosforesans

Bir atom veya molekülün en kararlı elektron konfigürasyonu elektronların en düşük enerjili orbitallere Hund kuralına göre yerleşimi ile ortaya çıkar ve bu durum atomun veya molekülün temel enerji düzeyini veya temel halini oluşturur. Elektronların daha üst enerji düzeylerine yerleşmesi ile atom veya molekül uyarılmış hale gelir.



Floresans ve fosforesansın her ikisi de, ışın enerjisini absorblayarak uyarılmış hale gelen bir molekül, iyon veya atom tarafından, absorplanan bu ışın enerjisinin ışın yayılması şeklinde geri verilmesi anlamına gelen *fotolüminesans*'ın çeşitleridir. Uyarılmış bir atom veya molekül kararsızdır; fazla enerjisini atarak temel hale dönmek ister. Atom veya molekül temel enerji düzeyine dönerken fazla enerjisinin tümünü veya bir kısmını ışık şeklinde atabilir ve böylece sistemden bir ışık yayılması (ışık emisyonu) gözlenir. Bu ışık yayılması olayına genel olarak lüminesans denir (Gündüz, 2002).

Uyarılmış bir singlet sistemden temel haldeki singlet bir sisteme geçiş sırasında yayılan ışığa *floresans* denir. Uyarılmış bir triplet sistemden temel haldeki singlet bir sisteme geçiş sırasında yayılan ışığa *fosforesans* denir. Uyarılma (eksitasyon) ortadan kalkınca floresans olayı 10^{-10}-10^{-6}s sürer; fosforesans ise 10^{-6}-10^{2}s sürer.

- Uyarılma enerjisi bir kimyasal tepkimeden sağlanıyorsa, bunun sonucu gözlenen lüminesans olayına *kemilüminesans* adı verilir.
- Uyarılma enerjisi elektrot tepkimesinden sağlanıyorsa, bunun sonucu gözlenen lüminesans olayına *elektrolüminesans* veya *elektrokemilüminesans* adı verilir.
- Biyolojik sistemlerde gözlenen lüminesansa *biyolüminesans* denir.

- Uyarılma olayı atom veya molekülün fotonları absorplaması sonucu gerçekleşiyorsa gözlenen ışık emisyonuna *fotolüminesans* denir.

Maddenin floresans özelliği üzerine kurulmuş olan tayin metoduna *florimetri* veya *floresans spektroskopisi* denir. Bazı yönleriyle absorpsiyon spektroskopisine benzemekle beraber ondan daha üstün özelliktedir. Florimetrik metotların selektiflikleri de yüksektir.

2.1.1. Floresans ve fosforesans spektroskopisi yöntemleri

1.Fotolüminesans emisyonu: Uyarılmış bir singlet sistemden temel haldeki singlet bir sisteme geçiş sırasında yayılan ışığa floresans ($h\nu_2$) denir.

$^1S_0 + h\nu_1 \longrightarrow {}^1S^*_{II}$ (uyarılma)

$^1S^*_1 \longrightarrow {}^1S_0 + h\nu_2$ (floresans)

Uyarılmış bir triplet sistemden temel haldeki singlet bir sisteme geçiş sırasında yayılan ışığa ise fosforesans ($h\nu_3$) adı verilir.

$^1S_0 + h\nu_1 \longrightarrow {}^1S^*_{II}$ (uyarılma)

$^1S^*_1 \longrightarrow {}^3T^*$ (sistemler arası geçiş)

$^3T^* \longrightarrow {}^1S_0 + h\nu_3$ (fosforesans)

2. *İç dönüşüm*: Işın absorpsiyonu sonucu oluşan uyarılmış bir molekül fazla enerjisini tamamen veya kısmen ışımasız yoldan da atabilir. Bir molekülün elektronik enerji düzeyleri, titreşim enerji düzeylerinin üst üste çakışmasına olanak sağlayacak kadar yakın ise, şekilde gösterilen ve fazla enerjinin ısı şeklinde atıldığı iç dönüşüm olayı gerçekleşir.

$^1S^*_{II} \longrightarrow {}^1S^*_1 + \text{ısı}$

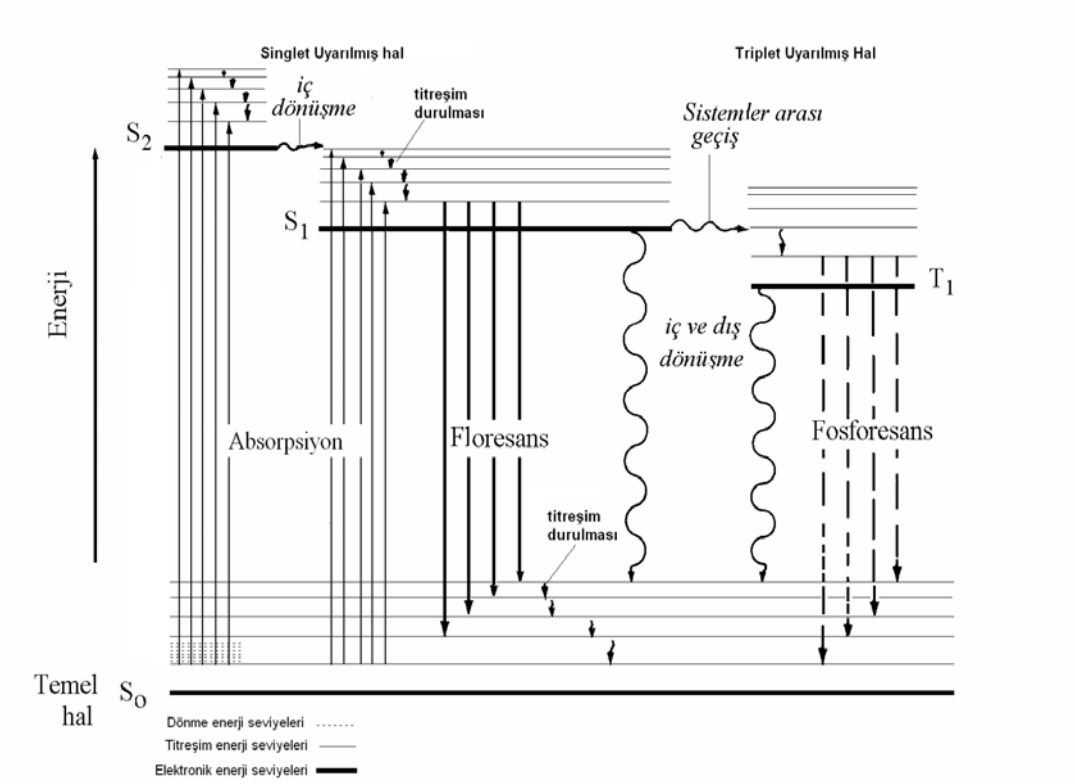
3. *Sistemler arası geçiş*: Uyarılmış singlet türü bir molekülden yine ışımasız yoldan daha düşük enerjili triplet türü uyarılmış bir molekül oluşabilir. Olasılığı oldukça az olan ve bu nedenle yavaş bir biçimde gerçekleşen bu olayda üst orbitaldeki elektronun spini terse çevrilir. Bu olaya sistemlerarası geçiş adı verilir.

$^1S^* \longrightarrow {}^3T^*$

4. *Çarpışmalı söndürme*: Absorpsiyon yapan madde çözelti halindeyse, uyarılmış madde çarpışmalar sonucu enerjisini titreşim enerjisi halinde çözücünün moleküllerine aktarabilir. Böylece çözücü moleküllerin kinetik enerjileri artar ve ortam az da olsa ısınır. Işın absorpsiyonu için 10^{-15} s gibi çok kısa bir süre gerekir ve uyarılmış singlet halde bulunan bir molekülün ömrü 10^{-10}–10^{-6} s, uyarılmış triplet halde bulunan bir

molekülün ömrü ise 10^{-6}–10^{2} s'dir. İç dönüşüm ve sistemlerarası geçiş olaylarının süreleri ise sırasıyla yaklaşık 10^{-12} s ve 10^{-8} s'dir. Floresans olayı sistemi uyaran ışıma ortadan kalkınca 10^{-10}–10^{-6} s kadar daha sürerken, böyle bir durumda fosforesans 10^{6}–10^{2} s kadar daha devam eder. Temel hale dönme süresi maddenin molar absorplama katsayısının artmasıyla azalır.

Oda sıcaklığında S_1 düzeyine uyarılmış bir türün, fazla enerjisini kaybederek S_1 düzeyinden S_0 düzeyine dört farklı şekilde dönmesi söz konusudur (Gündüz, 1995). Şekilde bunlar kısaca açıklanmıştır.



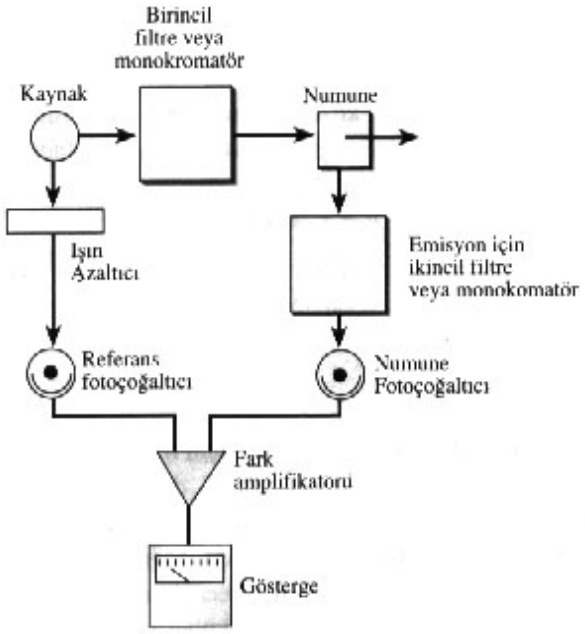
Şekil 2.1. Bir moleküldeki ışımalı ve ışımasız geçişler

2.1.2. Lüminesans spektrofotometreleri

Fotolüminesans ölçümlerinde kullanılan alet Şekil 2.2 de şematik olarak görülmektedir (Skoog, 1996).

Ultraviyole (UV) ve görünür bölgede ışın yayan bir ışık kaynağından gelen ışın bir monokromatörden (uyarma monokromatörü) geçtikten sonra örneğe gönderilir. Örnekten kaynaklanan lüminesans genellikle uyaran ışığa göre 90° lik bir açıdan toplanarak dedektöre ulaşır. Böylece numuneyi uyaran ışının 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.



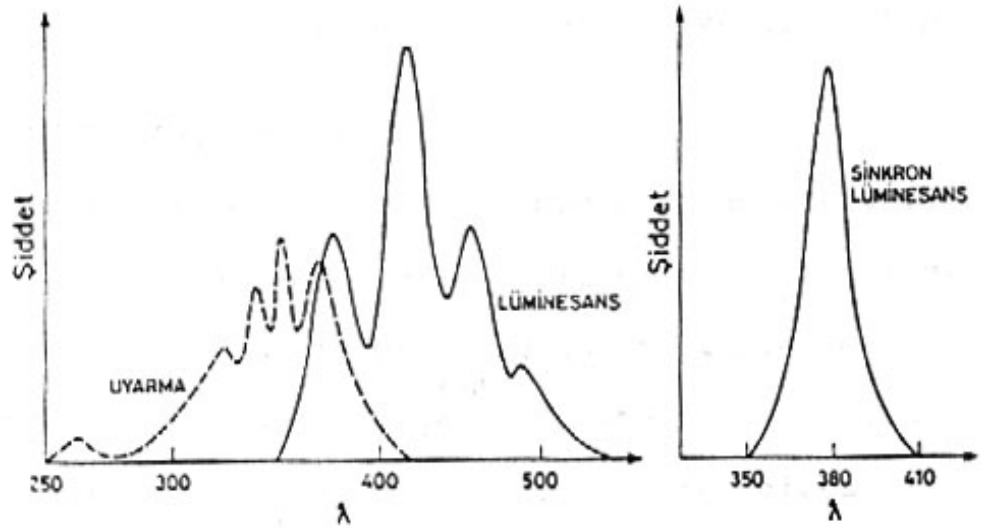
Şekil 2.2. Fotolüminesans ölçümleri için kullanılan cihaz

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. 320nm'den daha kısa dalgaboylu emisyon ölçümlerinde pireks kaplar yerine kuartz veya silika kaplar kullanılmalıdır. Fosforesans ölçümleri genellikle sıvı azot sıcaklığında (77K) yapıldığından örnek kabı azot içeren bir Dewar kabına yerleştirilir. Kullanılan Dewar kabının uyaran ve yayılan ışını 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 ışının spektrumu elde

edilir. Bu spektruma, uyarma spektrumu adı verilir. Uyarma spektrumu, spektroflorimetre ile elde edilmesine yani yayılan ışının 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 dalga boyu 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 floresant madde içeren karışımların kantitatif analizinde kullanılır. Uyarma, lüminesans ve senkron lüminesans spektrumlara ait örnekler Şekil2.3. 'de görülmektedir.



Şekil 2.3. Antrasenin uyarma, lüminesans ve senkron lüminesans spektrumları

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.

2.1.3. Spektroflorometrelerin ayarlanması

Bir spektrofotometre kullanmadan önce standart maddelerle ayarlanmalıdır. Bu amaçla çok çeşitli maddeler kullanılabilir. Bunlara florofor maddeler de denir. Florofor

maddelerden en çok kullanılan kinin sülfattır. Kinin sülfat çözeltisi (1.10^{-5} M) dalga boyu 350 nm olan bir ışınla uyarıldığı zaman dalga boyu 450 nm olan şiddetli bir ışın demeti verir. Salisilik asit de bu amaçla kullanılabilir. Salisilik asit çözeltisi 308 nm dalga boyunda bir ışınla uyarılırsa, o da 450 nm dalga boyunda, bir floresan ışın demeti verir. Bu amaçla çok kullanılan bir başka ayar maddesi de asetil salisilik asittir (ASA). Bu madde 278 nm dalga boyunda bir ışınla uyarıldığında 335 nm dalga boyunda şiddetli bir floresans ışını verir (Gündüz, 1995).

2.1.4. Fotolüminesans kuantum verimi ve floresansı etkileyen faktörler

Yayılan foton sayısının, absorblanan foton sayısına oranı o molekülün *fotolüminesans kuantum verimi*, ϕ, olarak tanımlanır. Uyarılmış singlet molekülün enerjisi ile temel haldeki molekülün enerjisi birbirinden ne kadar farklı ise, iç dönüşüm olayının olasılığı o kadar azalır ve dolayısıyla floresans verimi artar. Benzer biçimde bir molekülün uyarılmış triplet hallerinin enerjileri ne kadar farklı ise sistemlerarası geçiş olasılığı o kadar azalır ve floresans verimi artar. Uyarılmış singlet ve uyarılmış triplet hallerinin enerjileri birbirlerine yaklaşırsa, sistemlerarası geçiş olasılığı o kadar azalır ve fosforesans verimi artar. Hem maddenin çevresi, hem de yapısı floresans özelliğini (floresans verimi, emisyon dalga boyu ve ışın şiddetini) büyük ölçüde etkiler. Bunlardan başlıcaları aşağıda açıklanmıştır (Skoog, 1998 ve Gündüz, 2002).

1. Maddenin yapısının etkisi
2. Yapısal rijiditenin etkisi
3. Sıcaklık ve çözelti etkisi
4. pH etkisi
5. Çözünmüş oksijen etkisi
6. Gelen ışının dalga boyunun ve şiddetinin etkisi
7. Konsantrasyon etkisi

1. Maddenin yapısının etkisi: Moleküllerde düzlemsellik, dönmenin engellenmiş olması, konjugasyon ve halka sayısının artması genellikle floresans verimini arttırır. Halkalı bir organik molekülde halkanın elektron yoğunluğunu arttıran sübstitüentler de molekülün floresans veriminin artmasını sağlar.

En şiddetli floresans ışınlarını yapısında düşük enerjili $\pi \longrightarrow \pi^*$ geçişine imkan veren aromatik halka ihtiva eden bileşikler verir. Ayrıca yapısında çok sayıda konjuge çifte bağ ihtiva eden alifatik ve alisiklik aromatik halkalar da floresan özellik

gösterirler. Ancak, bunların sayısı aromatik bileşiklerin sayısına göre çok azdır. Birçok sübstitüe olmamış aromatik bileşik floresan özellik gösterir. Bunların kuantum verimleri halka sayısıyla ve bu halkaların kondanse olma dereceleriyle orantılı olarak artar. Ancak, aromatik olmalarına rağmen, floresans özelliği göstermeyen bileşikler de vardır. Bunlara piridin, furan, pirol gibi maddeler örnek verilebilir.

Bunun nedeni; böyle bileşiklerde en düşük enerjili geçişin $n \longrightarrow \pi^*$ olmasıdır. Bu tip bir geçiş sonucu uyarılan maddeler kolylıkla triplet hale geçerler ve sadece fosforesans özellik gösterirler. Buna karşılık bunlara bir benzen halkası kondense olursa, molar absorptiviteleri artar. Bilindiği üzere molar absorptivitesi artan bir maddenin uyarılmış ömrü çok kısalır. Ömrü böle kısa olan maddeler de şiddetli floresans ışını yayarlar. Buna göre yukarıda verilen halkalardan meydana gelen kinolini indol gibi maddeler oldukça şiddetli floresans özelliği gösterirler (Gündüz, 1995).

Floresans verimine sübstitüentlerin etkisi, benzen halkası ve benzen halkasına bağlanan bazı sübstitüentler üzerinde incelenecek olursa, benzen halkasının sübstitüsyona uğradığı zaman hem absorpsiyon, hem de floresans bandında bir değişmenin olduğu ve floresans şiddetinin de çoğu kez değiştiği görülür. Buna bazı örnekler aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 2.1. Benzenin floresans özelliğine sübstitüsyonların etkisi (etanol içinde)

Madde	**Floresans dalga boyu(nm)**	**Bağıl floresans şiddet**
Benzen	270-310	10
Toluen	270-320	17
Propilbenzen	270-320	17
Florobenzen	270-320	10
Klorobenzen	275-345	7
Bromobenzen	290-380	5
İyodobenzen	----------	0
Fenol	285-365	18
Fenolat	310-400	10
Anisol	285-345	20
Anilin	310-405	20
Anilinyum iyonu	----------	0
Benzoik asit	310-390	3
Benzonitril	280-360	20
Nitrobenzen	----------	0

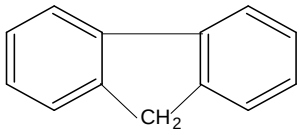
Lüminesant bir bileşikteki, bileşiğin pi (π) elektronlarını delokalize edebilen sübstitüentler genellikle, uyarılmış singlet hal ve temel hal arasında oluşan muhtemel bir ışın geçişini arttırır. Bu sonuç floresansı da arttırır. Genellikle orto- ve para-pozisyondaki sübstitüentler halkaya elektron verirler ve muhtemelen oluşacak floresansı arttırırlar. Meta-pozisyondaki sübstitüentler halkadan elektron çekerler ve muhtemel floresansı azaltırlar. Aromatik bileşiklerin floresansına bilinen bazı sübstitüentlerin etkileri aşağıdaki tabloda verilmiştir.

Çizelge 2.2. Emisyon dalga boyu ve ışın şiddetine birkaç sübstitüentlerin etkilerinin listesi

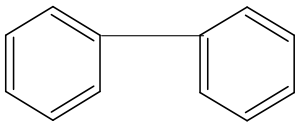
Sübstitüent	**Dalga boyuna etkisi**	**Işın şiddetine etkisi**
Alkil	Etkilemez	Önemsiz ölçüde artar
COOH, CHO, COOR, CRO	Artar	Azalır
OH, OMe, OEt	Artar	Artar
CN	Etkilemez	Artar
NH_2,NHR,NR_2	Artar	Artar
NO_2, NO	Büyük ölçüde artar	Büyük ölçüde artar
SH	Artar	Azalır
SO_3H	Etkilemez	Etkilemez
F, Cl, Br, I	Artar	Azalır

Molekülün bünyesinde veya molekülün çözündüğü çözücüde bulunan ağır bir atom (I veya Br gibi) molekülün floresans verimini azaltır, triplet oluşumu verimini arttırır ve bu nedenle genellikle fosforesans verimi artar.

***2. Yapısal rijiditenin etkisi*:** Bir molekülün yapısının rijid (sabit, hareketsiz) olması onun floresans özelliğini arttırır. Örneğin, florenin floresansı bifenilden beş defa daha şiddetlidir.



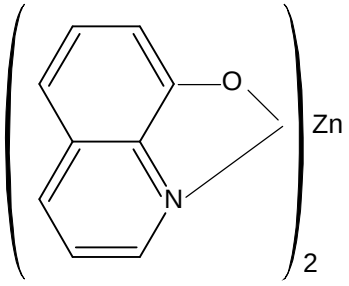
Floren



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 ayıraç bir katyonla kompleks verdiği zaman, rijiditesi ve dolayısıyla floresans emisyonu artar. Örneğin çinko katyonunun 8-hidroksikinolinle verdiği kompleksin floresansı şiddetlidir.



Rijid olmayan moleküllerde iç dönüşme daha kolay olduğundan, ışımasız 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 etkendir.

***3. Sıcaklık ve çözücü 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 π ve π^* orbitalleri arasında gerçekleştiğinde ortaya çıkar. $n \rightarrow \pi^*$ türü bir uyarılma için ise, çözücünün polaritesinin artması ile n orbitalinin daha kararlı hale gelmesi, yani enerji-sinin 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. Fosforesans verimi, sıcaklık azalması ile önemli ölçüde artar.

4. pH etkisi: Proton aktarımı reaksiyonları çok hızlı reaksiyonlar olduğundan proton aktarımının temel durumdaki moleküllerde olduğu gibi, uyarılmış moleküllerde de gerçekleşme olasılığı çok yüksektir. Ortamın pH'sındaki değişmeler, 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.

***5. Çözünmüş oksijen etkisi*:** Çözücü ile hidrojen bağı yapabilen moleküllerde çözünmüş oksijen ile molekülün yaydığı ışını absorplayabilecek bir başka madde, lüminesans verimini önemli ölçüde azaltır. Özellikle fosforesans çalışmalarında çözünmüş oksijenin ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Çözünmüş oksijen genellikle floresans ışımasının

şiddetini azaltır. Moleküler oksijen paramanyetik olduğundan, singlet halin triplet hale dönüşmesini kolaylaştırıp floresansı azaltır. Öteki paramanyetik maddeler de benzer şekilde davranırlar.

***6. Gelen ışının 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 (fotoayrışma) ve ürün oluşması (fotokimyasal reaksiyon) gibi olaylar yüzünden de azalabilir. Ayrıca gelen ışının şiddetinin (yoğunluğunun) artması floresansı arttırır.

***7. Konsantrasyon etkisi*:** Floresans ışımasının şiddeti, maddenin derişimiyle orantılıdır. Floresans, derişim arttıkça artar, ancak belli bir noktada derişim çok fazla arttırıldığında artık derişimle orantılı olarak artmaz ve hemen hemen sabit kalır.

Kemilüminesans olayında molekülün yaydığı ışıma, molekülün floresans, fosforesans veya ekzimer emisyonu spektrumunun aynısıdır. Yani, kemilüminesansda ışımanın başladığı hal, uyarılmış singlet veya triplet halidir (Gündüz, 1995).

2.1.5. Floresans analizin avantaj ve dezavantajları

Floresans analizin başlıca iki avantajı, spektrofotometrik analizden çok daha düşük derişimlerde ölçüm yapılabilmesi ve potansiyel olarak çok daha seçici olmasıdır. Çünkü uyarma ve emisyon dalga boylarının her ikisi de değiştirilebilir. Ayrıca ve en önemli avantajı florimetrik analizin, numunenin molar absorptivitesi, kuantum verimi ve kaynağın şiddetine bağlı olarak 10^{-8}-10^{-9} M' a kadar duyarlı olmasıdır. Molar absorptivite veya kuantum verimi küçük olduğunda, kaynak veya monokromotor, istenildiği gibi ayarlanabilir. Bu ayarlama normalde absorpsiyon spektrofotometresinde yapılamamaktadır (Gündüz, 1995).

Diğer bir avantajı aynı zamanda dezavantajı da, sadece bazı aromatik moleküllerin floresant olmasıdır. Bu floresant olmayan aromatik moleküller kadar bütün asiklik ve alisiklik molekülleri florimetriden dışlar, dolayısıyla bir floresant aromatik molekül ve birkaç asiklik veya alisiklik molekül içeren bir karışım analiz edildiği zaman elbette bir avantajdır.

Floresans analizde diğer dezavantajlar, istenmeyen uyarılmış düzey etkileşmeleriyle meydana gelmektedir. Bu olay, kuançing yani söndürme şeklinde ortaya çıkar. Birçok floresant olmayan molekülden dolayı, hatta eser miktarlarda, S_1 düzeyindeki floresant bir molekülü söndürebilir, bu nedenle de bir ayırma işlemi yapmaksızın

kompleks karışımının doğrudan analizi nadiren yapılabilir. İkinci olarak, ultraviyole ışınla uyarıldığı zaman, organik bileşiklerin çoğunda fotokimyasal reaksiyonlar olur. Özellikle şiddetli kaynaklarla kantitatif analitik ölçümler yaparken fotoparçalanma-dan kaçınılmalıdır.

Son olarak, floresans analizde diğer bir genel dezavantaj, çok yüksek kesinlik veya doğruluk göstermemesidir, tipik bir doğruluk seviyesi ± % 2-10'dur. Pek çok numune için, günümüzde yüksek duyarlılık, seçicilik ve doğruluğa sahip florimetrik analiz yöntemleri geliştirilmektedir.

2.1.6. Fosforesans

Uyarılmış bir molekülün temel haline dönmesi fosforesan ışınları yaymak suretiyle de gerçekleşebilir. Bir molekülde singlet-triplet geçişinin ihtimali, triplet-singlet geçişinin ihtimalinden çok daha fazla olduğundan, fosforesans ışınları meydana gelir. Ancak bunlar şiddet bakımından floresan ışınlarından daha zayıftır. Uyarılmış bir fosforesan halin ömrü 10^{-4} saniyeden dakikalara hatta saatlere kadar uzayabilir. Bunun sonucu olarak, uyarıcı ışın kaynağı ortadana kaldırıldıktan sonra bile molekül bir süre daha ışın yaymaya devam eder (Gündüz,1995).

2.1.7. Fosforesans ölçme

Fosforesans ölçmede kullanılan cihazlar floresans ölçmede kullanılan cihazlara benzer. Onlardan sadece iki bakımdan farklıdır. Bunlar;

1. Numuneyi kesikli olarak uyaran bir mekanik sistem ve numune kabı,

2. Aydınlatmadan belirli bir süre sonra fosforesans ışınlarının şiddetini ölçen bir cihazdır.

Bu iki parça spektroflorometreye monte edilirse, spektroflorometre cihazı, fosforesans ölçmelerinde de kullanılır (Gündüz, 1995).

2.1.8. Florimetri ve uygulama alanları

Florimetri, çok düşük derişimlerdeki numunelerin tayinine olanak sağladığı için besin endüstrisinde, farmakolojide, klinik numunelerde, biyokimyasal bileşiklerin analizinde, hava ve çevre kirliliği tayinlerinde, tarım kimyasında ve pek çok organik ve

inorganik bileşiğin analizinde tercih edilen bir enstrümental yöntemdir. Bütün bu uygulama alanları ve florimetrik olarak tayin edilen bazı maddeler Çizelge 2.3' de verilmiştir.

Ayrıca florimetrinin analitik uygulanmasında rutin olarak aşağıdaki üç gruptan biri tercih edilir.

a. *Analit molekülün kendi doğal floresanının ölçüldüğü direkt metotlar:* Nadir toprak elementlerinin analizleri ve floresans özelliğe sahip uranil (IV) iyonunun(UO_2^{+2}) tayini, floresein, rodamin-B, kuvartz ve bir kalsiyum florür minerali olan fluorspar'ın tayini örnek olarak verilebilir.

b. *Floresent olmayan bir analitin, floresent bir türeve dönüştürüldüğü veya floresent olan bir kompleks oluşturmak üzere şelatlaştırıcı bir madde (ajan) ile analitin reaksiyonuna dayanan türevlendirme metotları:* Bazı organik bileşiklerin geçiş metal katyonlarıyla verdikleri kompleks bileşiklerin tayini, benzokinonun siyanürle reaksiyonuyla floresent 2,3-disiyano-dihidroksikinon halinde tayini örnek olarak verilebilir.

c. *Analitin quenching (engelleme, söndürme) etkisinin, bazı floresans türlerin analitik sinyalinin şiddetinin azalmasına sebep olduğu quenching metotları:* Bu metodun prensibi, floresent türlere ait floresans emisyonunun analit tarafından söndürülmesidir. Bunun sonucunda da analit konsantrasyonu artarken floresans şiddeti düşer. Floresans, floresent türlerin analit ile kimyasal bir reaksiyon vererek bozulmasından dolayı azalır. Bu metot, farklı quenching etkisine sahip birden fazla benzer özellikteki maddenin seçimli olarak tayin edilmesinde kullanılan bir metottur. Örneğin, halojenürlerin seçimli tayinleri (Cl^-, Br^-, I^-) kinin üzerine farklı engelleme etkisinde bulunma özelliklerinden yararlanarak yapılabilir. Quenching verimi halojenin kütlesiyle orantılı olarak artar.

Metodun dezavantajı; tamamen spesifik olmaması ve ölçülen floresans şiddetinin artan konsantrasyona karşılık azalmamasıdır. Be nedenle kalibrasyon eğrisi doğrusal değildir (Gündüz,1995).

Çizelge 2.3. Florimetrinin 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, mağnezyum, nadir toprak elementleri, selenyum, kalay, tungten, silisyum, çinko, zirkonyum
Organik bileşiklerin analizi	Aromatik Hidrokarbonlar	Benzen, toulen, *o–, m–, p–*ksilenler, mesitilen, fenol, krezol, *o–, m–, p–* hidrobenzoik asitler, anilin, *o–, m–, p–* anisidinler, bifenil, bibenzil, difenilamin, bibenziletilen, 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, mağnezyum, bor florürler, alüminyum ve kalay bileşikleri
	Organik tarımsal bileşikler	İnsektisit ve pestisitler
	Tabii ürünler	Klorofiller, pigmentler
	Vitaminler	A_1, B_1, B_2, B_6, C, D ve E
	Proteinler	Süt proteinleri (kazein, laktik asit)
Sağlık hizmet 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
Besin kimyası	Karbonhidratlar	Glukoz, fruktoz, maltoz, laktoz, sellobiyozun rezorsinol ve ksantenon ile türevleri
Farmakoloji	İlaçlar	Barbitüratlar, salisilatlar, aspirinden salisilik asit, indol, prokain penisilin, alkaloidler, LSD (lizerjik asit dietilamid), tetrasiklinler, N-asetil sistein
Bakteriyoloji	Bakteri	Çeşitli bakteri teşhis ve sayımları
İmmünoloji	Kan numuneleri	Floresant antikor ve antijenler

Klinik patoloji	Elektrolit	Ca^{2+}, Mg^{2+}, 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, karbosilik asitler ve ketonlar, kandaki üre azotu, NH_3, hippurik asit, hemoglobin demiri, kolesterol, kortizon
	Enzimler	Dehidrojenazlar, transaminaz, fosfataz, lipaz, kreatinkinaz, LDH-izoenzimler, peroksidazlar
	Alkaloidler	Kodein, morfin, papaverin, nikotin

2.1.9. Florimetrik uygulamalarda karışımların tayinleri

Analit içerisinde birden çok lüminesent bileşik mevcutsa, analizler çok daha zor olur. Bir karışımdaki birden çok bileşiğin aynı anda tayinine olanak sağlayan çeşitli metotlar bulunmaktadır. Karışım, eğer mümkünse bileşenlerine ayrılmalı ve her bir bileşen ayrı ayrı tayin edilmelidir. Bu işlem biraz yorucudur ve analizle ilgili ekstra basamaklar nedeniyle hataların artmasına sebep olabilir. Genellikle ön ayırmasız analiz yapma daha iyidir.

Karışımlar, bileşenlerin aksitasyon (uyarılma) ve emisyon spektrumundaki farklılıkların sağladığı avantajlardan dolayı spektrofotometreler kullanılarak çok kolay bir şekilde tayin edilebilirler. Eğer bilşenlerden biri eksitasyon spektrumunda diğer bileşenin hiç ışık absorplamadığı bir dalga boyuna sahipse, bu bileşen bu dalga boyuna kadar ışık kaynağı ve hücre arasındaki monokromatör ayarlanarak tayin edilebilir. Yalnızca bir bileşen uyarıldığı için, sadece bu bileşen ışık yayabilir ve bu tayin, diğer bileşenlerin bozucu etkilerinden bağımsızdır. Bu metodun kullanımı, temel halde bulunan çözeltideki diğer analit olmayan moleküller ve uyarılmış haldeki analit arasında enerji transferinin olmadığını kabul eder.

Benzer şekilde, bilşenin emisyon spektrumunda yalnızca bir bileşenin ışık yaydığı bir dalga boyu bulunuyorsa, hücre ile dedektör arasındaki monokromatör bu

değere göre düzeltilebilir. Yine tayin, diğer bileşenlerin bozucu etkisinden bağımsız olabilir, çünkü diğer bileşenlerin hiçbiri seçilen dalga boyunda ışık yaymaz.

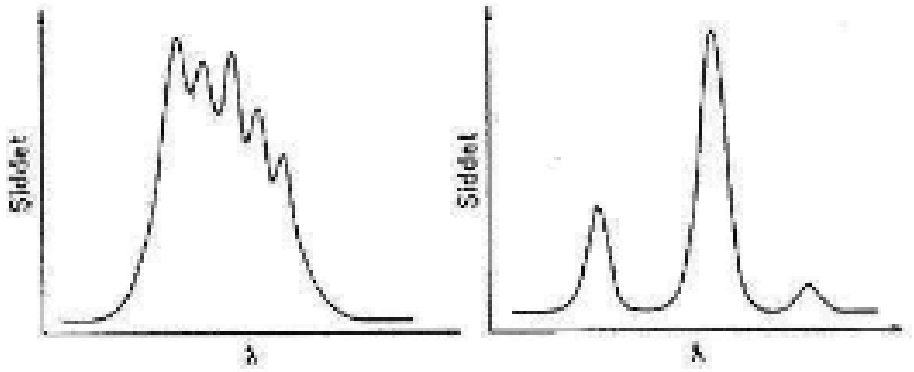
Maalesef pek çok maddenin eksitasyon spektrumu ve emisyon spektrumunun her ikisi de geniştir ve bundan dolayı karışımdaki diğer bileşenlerin spektrumuyla girişim (overlap) yapması muhtemeldir. Bu durumda, farklı dalga boylarında absorpsiyon yapan maddelerin aynı anda tayin edilmesinde UV ve görünür bölge spektrumlarındakine benzer problemler meydana gelir. Karışımın her bir bileşeni için belirli bir eksitasyon ve emisyon dalgaboyu seçilir. Herbir bileşen için, belirli bir dalga boyunda konsantrasyonun (C) değişmesiyle cihazın lüminesent cevabındaki değişim (K) deneysel olarak saf bileşenlerin standart çözeltilerinden tayin edilir ve eş zamanlı bir seri eşitlik belirli bir dalga boyunda kurulur.

Eşitlikler aşağıdaki şekilde verilir;

$$I(\text{karışım, dalgaboyu 1}) = K(\text{Bileşen 1, dalgaboyu 1})\,C_1 + K(\text{Bileşen 2, dalgaboyu 1})\,C_2 + \ldots\ldots\ldots\ldots + K(\text{Bileşen N, dalgaboyu 1})\,C_N \quad (2.1)$$

Karışımın lüminesansı belirlenen her dalgaboyunda ölçülür, alınan lüminesent cevabı ve karışımın lüminesansı eş zamanlı herbir eşitlik içerisinde yerine konur ve eşitlikler bileşenlerin her birinin konsantrasyonu için çözülür.

Karışımındaki bileşenlerin florimetrik analizi için uygulanacak bir başka yöntem ise senkron florimetridir. Şekilde bir hidrokarbon karışımını içeren çözeltinin normal floresans spektrumu ile senkron florimetri yöntemiyle elde edilen spektrum görülmektedir.



Şekil 2.4. Bir hidrokarbon karışımının normal ve senkron floresans spektrumu

Şekilden görüldüğü gibi, normal floresans spektrumu, sabit bir uyarma dalga boyu ayarlanarak ölçülmüş olup, elde edilen spektrumda iki bileşenin spektrum bantları

birbiri içine girmiştir. Uyarma ve emisyon dalga boylarının her ikisinin birden aralarında belli bir dalga boyu farkı ile taranması sonucu elde edilen senkron sinyal ise her bir bileşenin floresans spektrumunun belli dar bir kısmını içermektedir. Böylece bileşenlere ait sinyaller birbiri ile örtüşmeden elde edilir ve bileşenlerin nicel analizleri daha kolay yapılabilir.

Alternatif olarak, karışımın emisyon spektrumu kaydedilebilir ve bir bilgisayar her bir komponent için spektrumun kısımlara ayrılmasında kullanılır. Ayrılan spektrum bileşenlerin konsantrasyonunu hesaplamak için kullanılır. Fosforesent çalışmalar için kullanılan bazı cihazlar, bir titreşim kaynağının kullanımında ve her bir döngüde kaynağın kapatılmasından sonra farklı zamanlarda lüminesans ölçümünde hassaslardır. Titreşim lazerleri de bu çalışmalarda kaynak olarak kullanılabilir. Farklı bileşenler farklı emisyon ömrüne sahiplerse, analizler, ölçüm zamanının bir fonksiyonu olarak lüminesent şiddetinin logaritmasının bir grafiği hazırlanarak yapılabilir. Bileşenlerin ömürleri önemli ölçüde farklıysa, grafik her bir bileşen için doğrusal bir kısma sahiptir. Sıfır noktasına ekstrapolasyondan sonra her bir lineer kısma karşılık gelen ışık şiddeti, karşılık gelen konsantrasyonla orantılıdır. Çalışma eğrisi metodu, standart çözeltilerle hazırlanan benzer grafikler çizildikten sonra kullanılır. Karışımdaki maddeleri tayin etmek için birkaç metot daha kullanılabilir, fakat genellikle bu metotlar pek çok laboratuarda mevcut olmayan cihazlara gereksinim gösterir (Gündüz, 1995).

Yapılan bazı çalışmalarda karışımlar nitel ve nicel olarak senkron floresans spektroskopisi ile incelenmiştir. Senkron yöntemi ile ilk çalışmalar 1970 lerde Llyod tarafından yapılmıştır.

Örneğin Llyod tarafından ilk olarak yapılan bir çalışmada antrasen, benzopiren, perilen benzoflaranten karışımları ölçülerek kıyaslanmış ve sonuçların senkron yöntemiyle daha net şeklide sonuçlar verdiği tespit edilmiştir.

Yine aynı şekilde (senkron yöntemi ile) yapılan bir çalışmada adli olaylar incelenmiş, kurum, katran, petrol atıkları, yağ damlacıkları, kauçuk gibi madde karışımlarının çok az miktarlardaki numuneleri kolaylıkla tayin edilmiştir.

Vo-Dinh ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada ise öncesinde herhangi bir ayrıştırma işlemi yapılmadan kömür ekstraktından seçilmiş polinükleer hidrokarbonlar kolaylıkla tespit edilmiştir.

Latz ve ark. tarafından yapılan bir çalışmada Antrasen, 9-10 difenilantrasen, perilen ve tetrasen in tekli ve ikili karışımları çalışılmış ve senkron yöntemi ile ayrıştırmaları kolaylıkla sağlanmış.

2.2. İyonlaşma Sabiti Tayin Yöntemleri

İyonlaşma sabiti bir molekülün iyonlaşma davranışını belirleyen 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, 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 kullanılır.

İyonlaşma sabitlerinin tayininde alternatif yöntemler kullanılmaktadır. Bunlar;

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

2.2.1. Potansiyometrik yöntemle iyonlaşma sabiti tayini

İyonlaşma sabitlerinin tayininde bilinen ilk yöntemdir. Potansiyometrik titrasyon düzeneği, sıcaklık kontrollü ve inert atmosfer uygulanabilir şekilde hazırlanır. Kullanılan elektrodun kararlı ve çalışılan ortama uygun olması gereklidir. Son zamanlarda elektrot teknolojisindeki gelişmeler tekrarlanabilirlik ve duyarlığı yeterli hale getirmiştir. Su-organik çözücü karışımlarında IUPAC'ın önerdiği titrant KOH'dir. Ayarlı olması gerekir; titrasyon karbonat hatası getirmeyecek koşulda yapılmalıdır. İyonlaşma sabitinin tayininde son zamanlarda su-organik çözücü karışımlarında elektrot standardizasyonları yapılabildiği için elde edilen iyonlaşma sabitleri, termodinamik değerlerdir. Tüm titrasyon koşullarını, iyonik şiddet de dâhil olmak üzere dikkate alan ve sistematik yaklaştırmayı temel alan doğrusal olmayan (non-lineer) regresyon programları bu amaçla kullanılmaktadır. Su-organik çözücü karışımlarının özelliklerinin bilinmesi, iyonlaşma sabitlerinin yorumlanmasını sağlamaktadır. Potansiyometrik yöntemle iyonlaşma sabiti tayininde 3–5 mM derişim yeterlidir. Suda çözünmeyen ve bu nedenle su ortamında iyonlaşma sabitleri tayin edilemeyen ilaçların iyonlaşma

sabitleri potansiyometrik yöntemle su organik çözücü karışımında tayin edilir. Bu çalışmalarda iyonik şiddet fizyolojik iyonik şiddet olan 0,15 M değerine ayarlanır. Yasuda –Shedlovski ektrapolasyonu uygulanarak sudaki değer belirlenir (Takacs-Novak ve ark., 1997; Avdeef ve ark., 1999).

Potansiyometrik pKa tayini, potansiyometrik titrasyonda bileşiğin derişimi sıçrama aralığını yeterli sağlayacak şekilde seçilir. Suyun otoprotoliz değerleri bellidir. Ancak su-organik çözücü karışımları ile çalışmada su-otoprotoliz değerleri gereklidir. Bu tip bir çalışmada öncelikle potasyum asit ftalatın titrasyonu ile kuvvetli baz, kuvvetli bazın titrasyonu ile asit ayarlanır. Veriler uygun şekilde kullanılarak otoprotoliz sabitine geçilir. Kuvvetli asit - kuvvetli baz titrasyonundaki veriler, bazda karbonat hatasının belirlenmesine imkan sağlar. İyonik şiddet sıklıkla 0,1 M olarak kullanılır.

Titrasyon verilerinden pKa hesaplanmasında;

- Gran
- 1.türev
- 2.türev

Shwartz fonksiyonları kullanılır.

2.2.2. Spektroskopik yöntemle iyonlaşma sabiti tayini

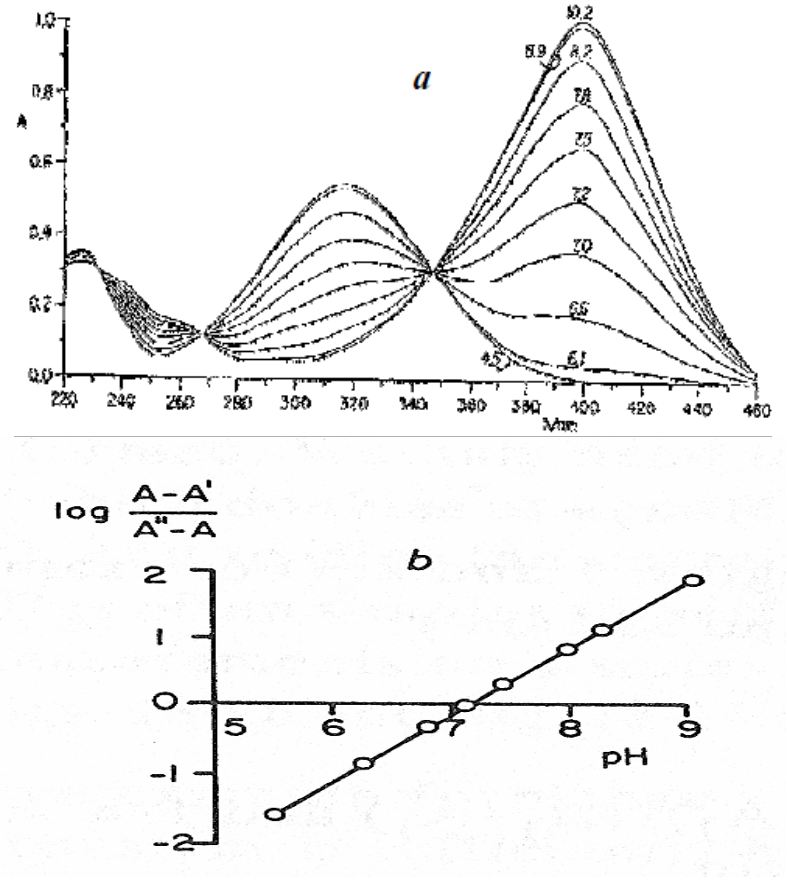
İyonlaşma sabitleri spektrofotometrik ölçümler ile de tayin edilebilir (Polster ve Lachmann, 1989). Bunun için belli bir dalga boyu aralığında kaydedilen absorbans verilerinden yararlanılır. Bu tayinde aşağıdaki bağıntı esas alınmaktadır.

$$pK = \mathrm{pH} + \log \frac{A_{abs} - A_M}{A_I - A_{abs}} \qquad (2.2)$$

Bu bağıntıda A_M moleküler formun, A_I iyonlaşmış türlerin absorbans değerlerini ifade etmektedir. Absorbans pH a karşı grafiğe geçirilerek veya log ((A-A')/(A''-A)) pH ya karşı grafiklenerek kesim noktasından pKa değerleri bulunabilir (Şekil 2.5.). Spektrofotometrik yöntemin avantaj ve dezavantajları şunlardır;

- Yöntemin doğruluğu ve kesinliği yeterlidir.
- $10^{-5} – 10^{-6}$ M derişim çalışma için uygundur.
- Çalışılan bileşikler saf olmalıdır.

- Yapıda en az bir tane kromofor grubun bulunması ve bunun absorbans özelliklerinin yeterli olması gereklidir.
- Nötral ve iyonlaşmış formların spektral özelliklerinin yeterince farklı olması gerekir.



Şekil 2.5. Spektroskopik bir çalışmada (a) A - λ/nm ve (b) log absorbans farkı – pH grafikleri (A': moleküler türün absorbansı; A'': iyonik türün absorbansı)

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

2.2.3. Sıvı kromatografik yöntemler

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

Bu yöntem ile çalışmanın bazı avantajları vardır;

• Bileşiğin saf olması gerekmez.

• ppm ve ppb düzeyinde analit ile çalışma imkanı sağlar.

• Çalışılan ortam su-organik çözücü ikili karışımıdır.

• Bu ortamlardaki pH standardizasyonunun bilinmesi gereklidir.

2.2.4. Elektroforetik yöntemler

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

Bu yöntem ile çalışmanın bazı avantajları vardır;

• Geniş bir pH aralığında çalışılabilir (pH 2-11).

• Yeterli doğruluk ve kesinlikte sonuçlar elde edilir.

• Bileşiklerin saf olması gerekmez.

• Sudaki çözünürlükleri düşük olan bileşiklerin tayini için uygundur. μM düzeyinde analit ile çalışma imkanı sağlar.

• Uygun kalibrasyon yöntemleri ile su-organik çözücü karışımlarında çalışma imkanı getirir.

2.2.5. Florimetrik yöntemler

Absorbanstaki değişim yeterli değilse ve bileşiğin yapısında floresans özellik içeren gruplar varsa florimerik yöntemle iyonlaşma sabitleri tayin edilebilir. Molar absorplama katsayısı biliniyorsa hesaplama kolaydır. Ancak pK değerleri birbirine çok yakınsa bilgisayar programları kullanmayı gerektirir. Spektrum taramalarını kullanarak pK hesaplayabilen bilgisayar programları geliştirilmiştir (Parker, 1968).

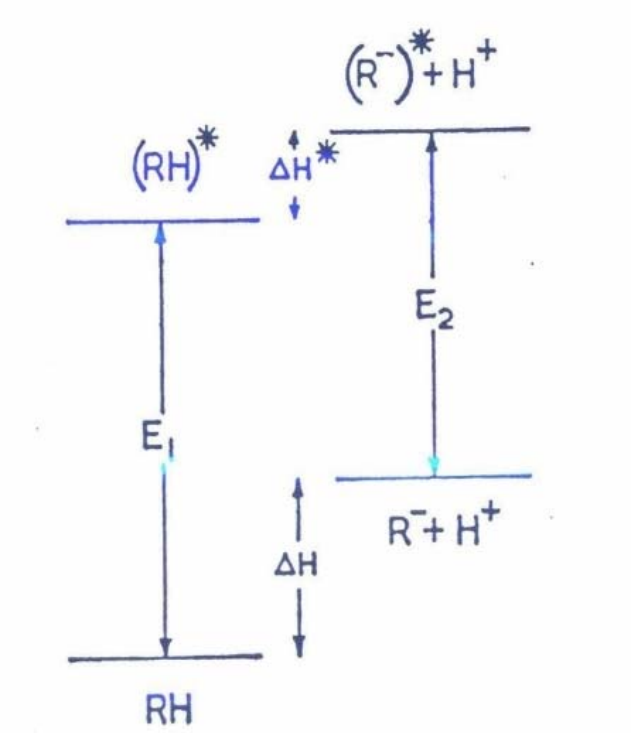
$pK_2 - pK_1 \geq 4$ olması durumunda değerler rahatlıkla hesaplanabilir.

Florimetrik analizin organik ve biyokimyasal türlere çok sayıda uygulaması vardır. Örneğin, Weissler ve White, çok çeşitli organik bileşikler, enzimler ve koenzimler, tıbbi maddeler, bitkisel ürünler, steroidler ve vitaminleri içeren 200'ün üzerindeki maddenin tayini için yöntemler vermiştir. Florometrinin en önemli uygulamaları; gıda ürünleri, ilaç, klinik numuneler ve doğal ürünlerin analizleri ile ilgilidir. Yöntemin duyarlılığı ve seçiciliği, bu yöntemi böyle alanlarda özellikle değerli bir araç yapmıştır.

Floresans Spektrumları ve Denge Sabitlikleri Arasındaki İlişki; 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. Bu relaksasyonların sonucunda temel durumda kararlı konfigürasyon ve ilk uyarılan durum arasında enerji farklılıkları oluşur. İlk uyarılma halinde enerji absorpsiyon için hν'den daha az, fakat emisyon için hν'den daha fazladır. İlk uyarılmış singlet halinde enerji için en iyi ölçüm elde edildi ve bu da iki değerle ifade edildi.

$$Es=1/2(h\nu_{abs}+h\nu_{em}) \qquad (2.3)$$

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



Şekil 2.6. Asitik ve bazik hallerin enerji seviyeleri

Örneğin β-naftol gibi bileşiklerde uyarılmış halindeki molar entalpi değeri (ΔH*), temel haldeki molar entalpi (ΔH) değerinden daha azdır. Bu durumda; E_1-E_2= ΔH- ΔH* elde edilir. Bu uygulamalar ΔH ve ΔH* ‘ in kesin değerlerinin pozitif, nötr ve negatif olduğu durumlarda uygulanır.

Temel ve uyarılmış halde bir reaksiyon entropisinin varlığını varsayarsak, (elde edilen gerçek değerleri doğrulayan bir varsayım);

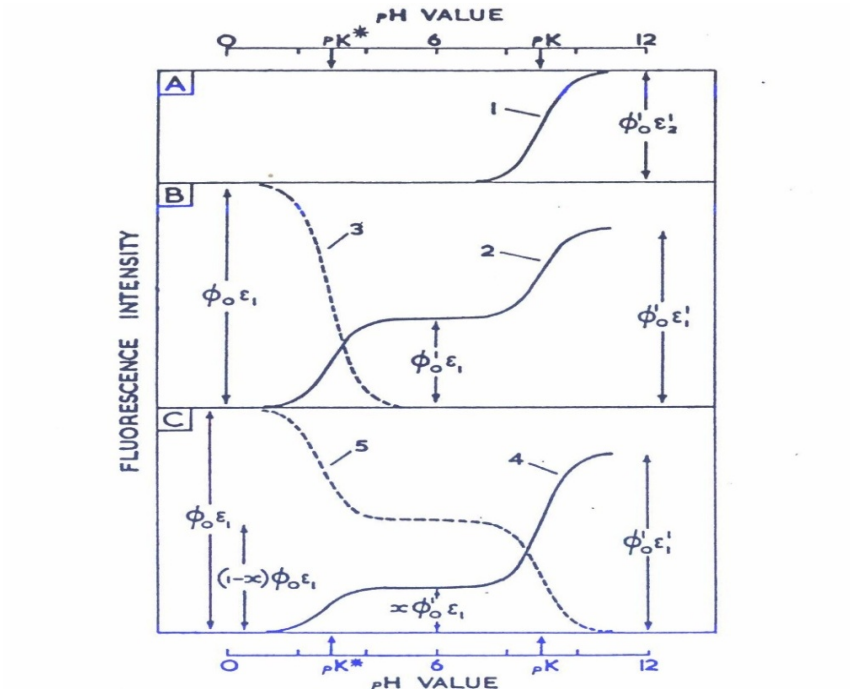
$$\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S = - RT\ln K \qquad (2.4)$$

$$\log(K^*/K) = \frac{E1 - E2}{2.3RT} = \frac{Nh(\Delta\nu)}{2.3RT} \qquad (2.5)$$

burada; Planck sabitini yerine koyar, mikrona çevirirsek;

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

$pK^* = pK - 21{,}4\,(\Delta\nu^-)$ elde edilir. (2.6)



Şekil 2.7. Asidik ve bazik formda floresans şiddetinin eğrileri

Bu eğrilerin şekli;

- pK ve pK* değerlerine,
- Asitik (ε_1) ve bazik (ε_2) formun kısa dalga boyu ekzitasyonundaki sönüm katsayıları ile bazik formun uzun dalga boyu ekzitasyonundaki sönüm katsayısına (ε_2'),
- Uyarılan türün ömrüyle karşılaştırılarak elde edilen uyarılmış haldeki dengenin elde edilme oranına,
- Asidik ve bazik formun floresans verimlerine Φ_o ve Φ_o' bağlıdır.

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

$$\Phi_o=k_f/(k_f+k_g+k_n)=kf\tau \qquad (2.7)$$

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

$$F=\omega\, I_o \varepsilon\, \Phi_o\, c \qquad (2.8)$$

Burada; ω: enstrümental sabit, c: konsantrasyon, I_o; uyaran ışın şiddeti, Φ_o:floresans verimidir.

3. ANJİYOTENSİN II RESEPTÖR ANTAGONİSTLERİ

Günümüzde her geçen gün yeni ilaçlar üretilmekte ve bu ilaçlar çeşitli hastalıklar için kullanıma hazır hale getirilmektedir. İlaçların etkili olan kısımları ilaçların etken maddeleridir. İlaçların imalat ve piyasa kontrolleri sırasında ilaç etken maddelerin miktarlarının doğru olarak tayini ilaçların kullanımı için çok önemlidir. Eksik etken madde içeren ilaçlar hastalıklar için gerekli faydayı sağlamamakta, fazla etken madde içeren ilaçlar ise birçok yan etkiye sebep olmaktadır.

Anjiotensin reseptör antagonistleri (ARA) ise yeni bir *antihipetansif* ilaç grubudur.

Antihipertansif ilaçlar 4 grupta incelenir.

Diüretikler; Kan hacmini azaltırlar, damar genişletici etkileri vardır,

Sempatoplejikler; Periferik damarsal direnci düşürürler, kalp fonksiyonlarını inhibe ederler, periferik venlerde göllenmeyi arttırırlar,

Direkt vazodilatörler; Damar düz kasını gevşetirler

Anjiyotensin antagonistleri; Anjiyotensin üretimini veya etkilerini bloke ederek periferik vasküler direnci ve dolaşan kan hacmini azaltırlar.

Sentez edilip denenmeye başlanan non-peptid anjiyotensin reseptör blokerleri ağızdan alınabilir ve *antihipertansif* ilaç olarak klinik kullanıma girmiştir. Bunlardan ilk çıkanı *losartan*dır. ARA, *renin anjiotensin* sistemi (RAS)'nin spesifik inhibitörleridirler. ARA-II'ler oral yolla alımından sonra hızlı bir şekilde absorplanır ve 0,5-4 saat sonra plazmadaki derişimi maksimum konsantrasyona ulaşabilir. Bununla birlikte, oral yolla alımından sonra bu ilaçların bazıları plazmada ng/ml seviyesindeki düşük derişimlerde oluşur ki bu da onların tayini ve/veya görüntülenmesi için problemler ortaya çıkarır. *Anjiotensin II Reseptör Antagonistleri* (ARA-II) hipertansiyon tedavisinde, yan etkileri diğer bir *antihipertansif* ilaç grubu olan ADE inhibitörlerine göre daha çok tercih edilmektedir. Bunların en büyük seçicilikleri uzun süreli hareket ve iyi tolere edilebilir olmalarıdır (Cagigal, Gonzalez, Alonso, Jimenez, 2001).

Anjiotensin reseptör antagonistleri ile diüretiklerin ikili ilaç kombinasyonları effektif ve iyi tolere edilebilir bulunmuştur**.** ARA II ler, ADE inhibitörlerine alternatif olarak, özellikle de bifenilimidazol yapısında olan Losartan ile klinik kullanıma başlanmış, daha sonra losartana valsartan, irbesartan, kandesartan ve telmisartan eklenmiştir.

İki tip anjiotensin II reseptörü vardır. Anjiotensin II tip 1 (AT1) reseptörleri damar daralması, kalp kasılabilirliği ve böbrek tübüler sodyum geri emiliminde artış, kalp ve damarlardaki hacim artışından sorumludurlar. Anjiotensin II tip 2 (AT2) reseptörleri hücre çoğalmasını engeller. ARA losartan, valsartan, irbesartan, telmisartan, candesartan, eprosartan ve olmesartan medoxomil'dir. Hepsi oral yoldan verilebilir ve günde tek doz uygulanırlar.

Losartan; Kullanıma ilk giren ilaçtır. AT1 reseptörlerini yarışmalı olarak bloke eder.



Valsartan, aktif bir metabolitine çevrilmesi gerekmez. İlacın %80'i değişmeden atılır, %20'si metabolize edilir.



İrbesartan, aktif bir metabolitine çevrilmesi gerekmez. Besinler emilimini etkilemez. *Kandesartan*, Kandesartan cilexetil formunda kullanır. Gastrointestinal sistemde kısa sürede aktif madde kandesartan'a dönüşerek emilir. Besinler emilimini etkilemez.

Telmisartan, besinler emilimini %6-20 azaltır.



ARA kan basıncını düşürücü etkiyle sahiptir. ARA, ACEİ 'ni tolere edemeyen kalp yetmezliği olan hastalar için uygun seçenektir. ARA ve ACEİ 'nin kombinasyonu maksimum RAS blokajı elde etmek için önerilmiştir.

Bu ilaçlar uzun dönem kullanımda bile düşük yan etkilere sahiptirler. Anjiotensin reseptör blokerlerinin yan etkileri ACE inhibitörlerine benzer ancak öksürük ve anjioödem gözlenmez.

Kandesartan ve losartan ön ilaçtır ve metabolitleri resptörlerin nonkompetetif inhibitörüdür. Eprosartan, irbesartan ve valsartan ön ilaç değildir ve anjiotensin reseptölerini kompetetif olarak inhibe ederler.

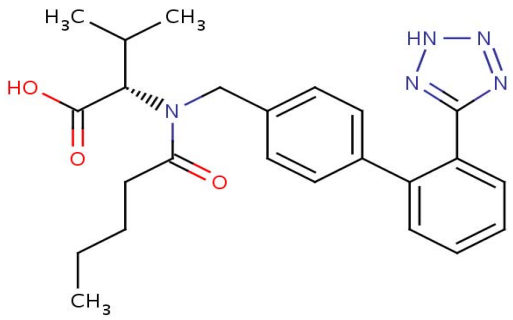
Son yıllarda yapılan çalışmalarda AT-II reseptör blokerlerinin *antiinflamatuar* etkilerinin de olduğu belirtilmiştir. Anjiotensin II Reseptör Antagonistleri amfoterik bileşiklerdir ve yapısal olarak bağlı bifenilkarboksilik asit kısmı içeren telmisartan dışında, aynı bifeniltetrazol kısmını sahiplerdir. Anti-hipertansif ilaçlar olarak ARA

II'lerin iyonlaşma sabitlerinin birkaç uygun yöntem ile tam olarak tayini, etki mekanizmalarının anlaşılmasında ve biyoyararlanabilirlikleri açısından oldukça önemlidir.

ARA II' ler, deneysel tekniklerde, asit-baz sabitlerinin belirlenmesinde, potansiyometri, Uv-Vis spektrofotometri, sıvı-sıvı ekstraksiyon ve iyonik değişimde genellikle kullanılır. Potansiyometri ve Uv-Vis homojen fazlarda denge sabitlerinin çalışmaları çok yönlü ve yeterlidir (Cagigal, Gonzalez, Alonso, Jimenez, 2001).

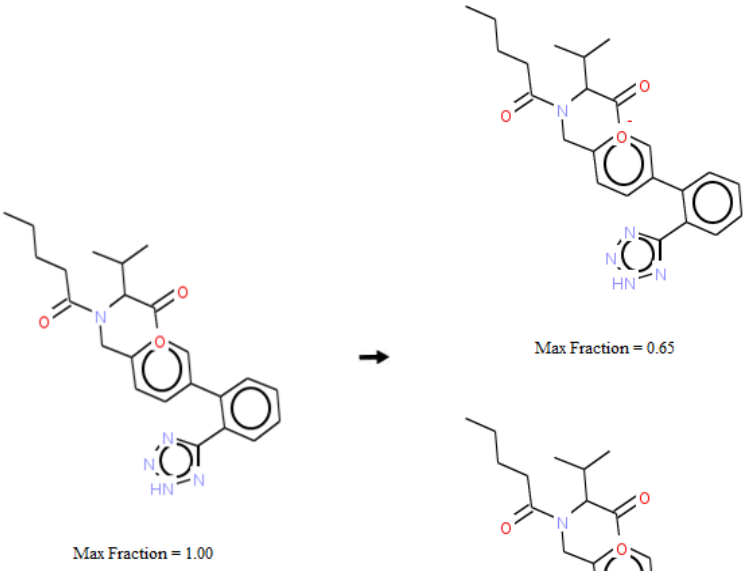
3.1. Anjiotensin II Reseptör Antagonistlerinin Kimyasal Yapıları ve SPARC Programı İle Hesaplanan Maksimum pKa Değerleri

3.1.1. Valsartan

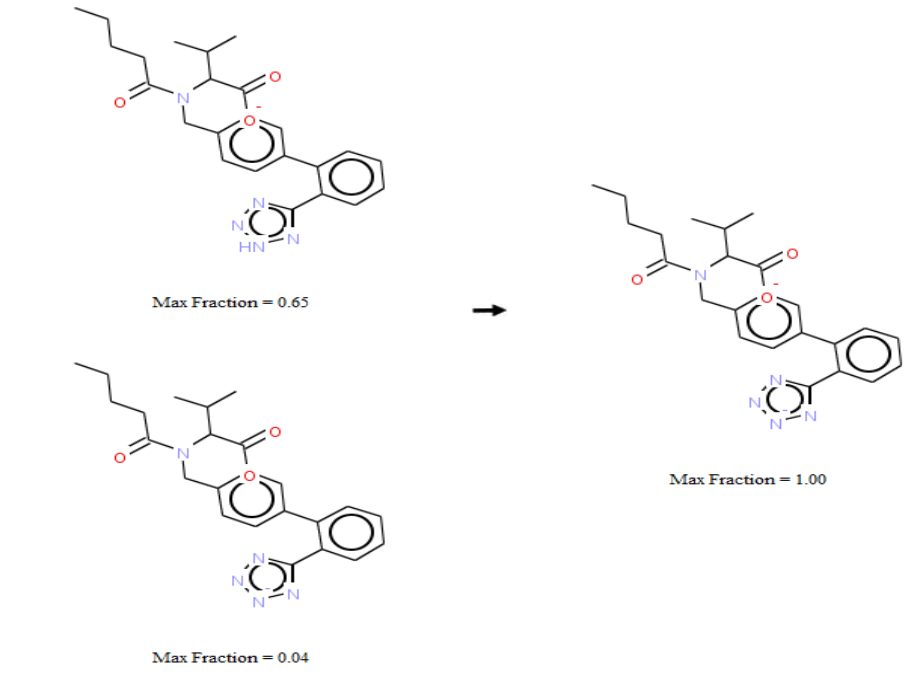


Şekil 3.1. Valsartanın kimyasal yapısı

3.1.1.1. Valsartanın makraskopik pKa değerleri

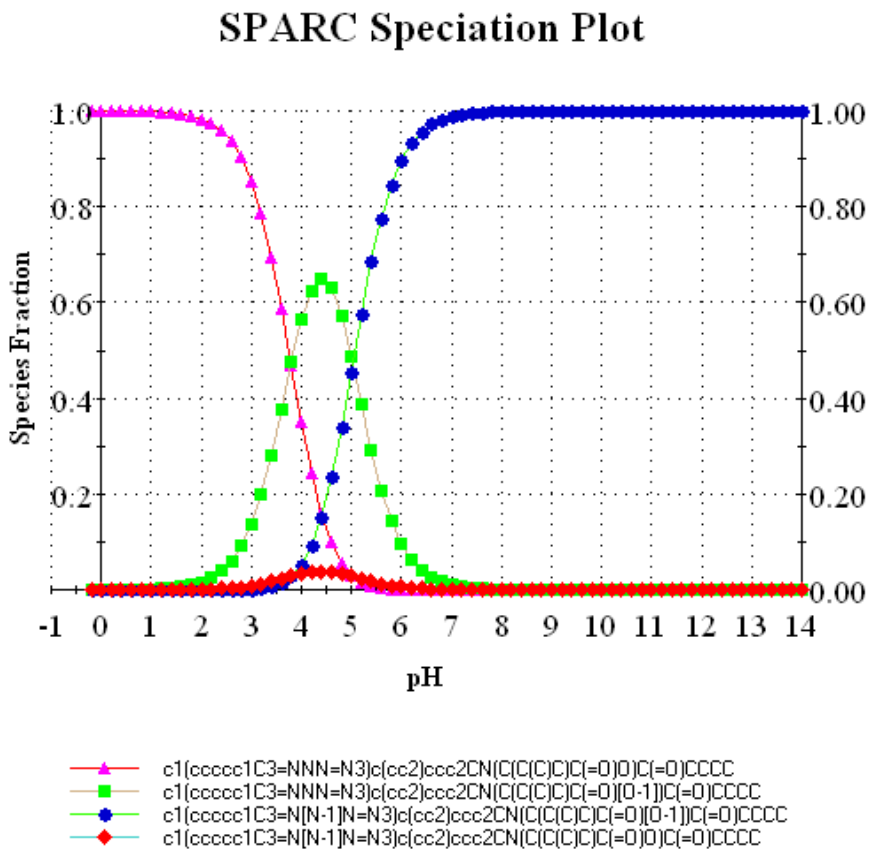


Macro Pka = 3.77



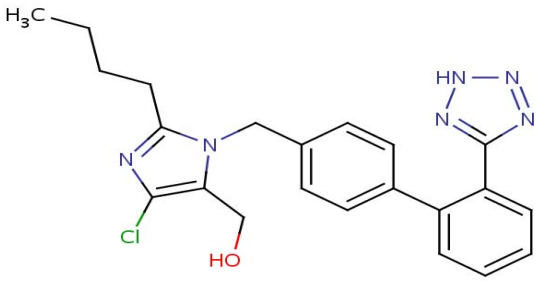
Macro Pka = 5.05

3.1.1.2. Valsartanın SPARC programında çizilen pH grafikleri



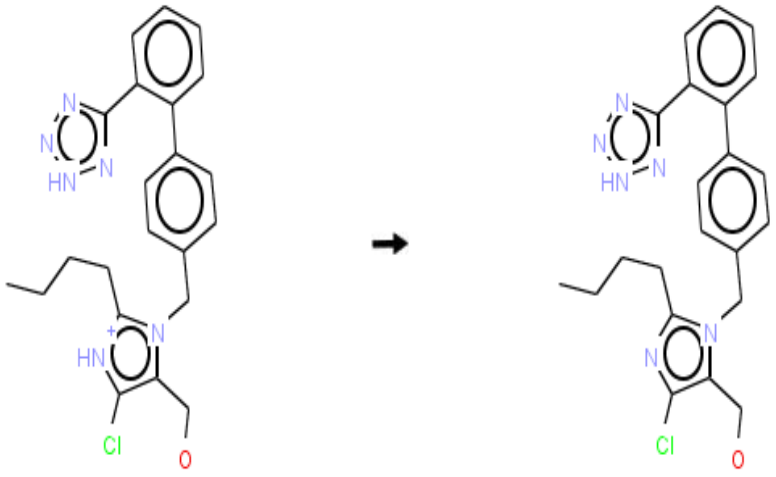
Şekil 3.2. Valsartanın α- pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi

3.1.2. Losartan



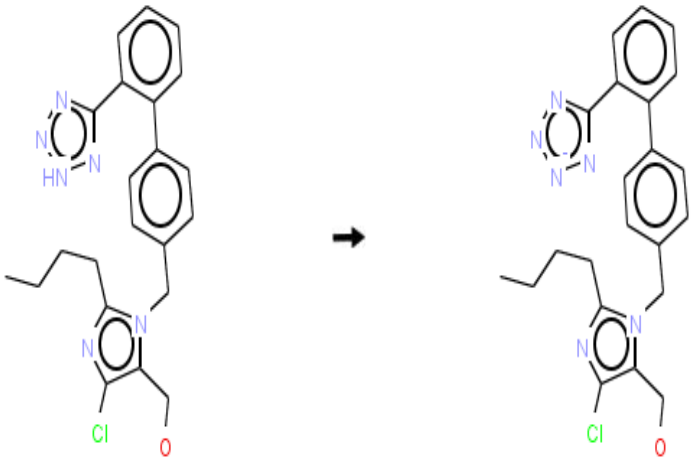
Şekil 3.3. Losartanın kimyasal yapısı

3.1.2.1. Losartanın makraskopik pKa değerleri



Max Fraction = 1.00 Max Fraction = 0.84

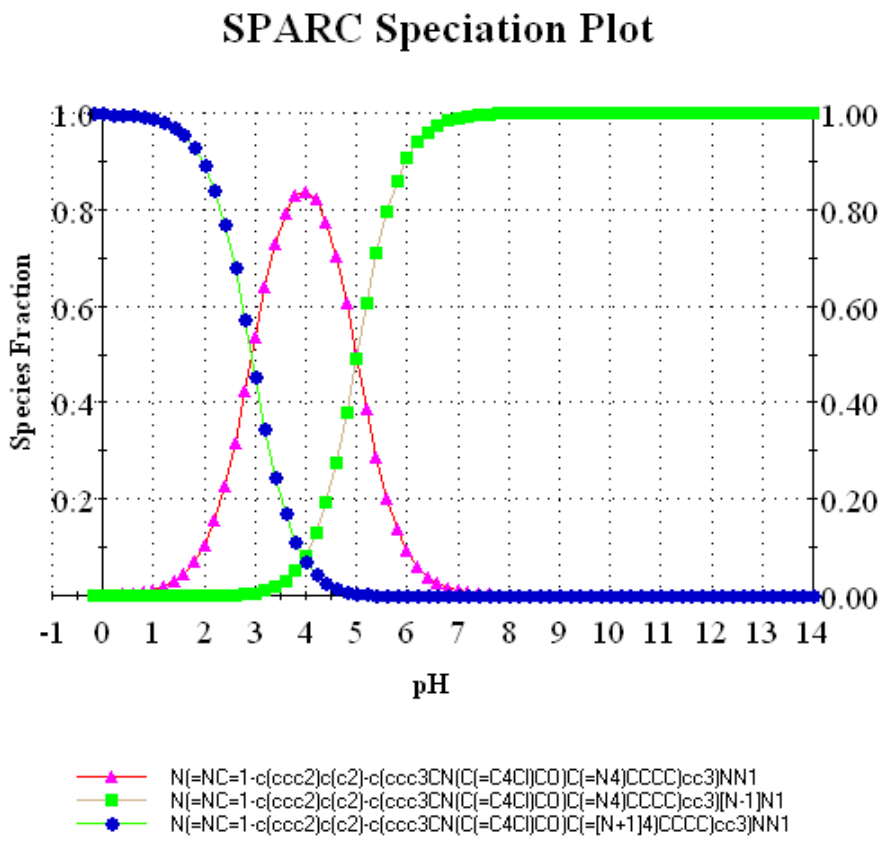
Macro Pka = 2.93



Max Fraction = 0.84 Max Fraction = 1.00

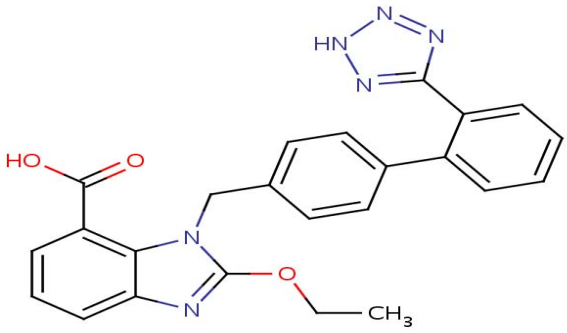
Macro Pka = 5.01

3.1.2.2. Losartanın SPARC programında çizilen pH grafikleri



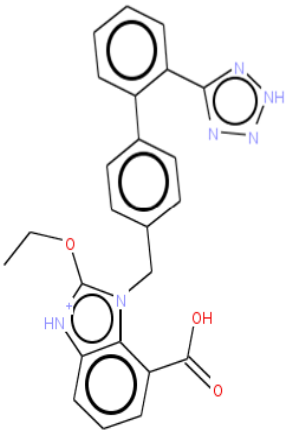
Şekil 3.4. Losartanın α- pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi

3.1.3. Kandesartan

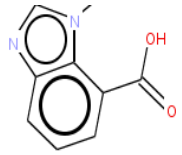


Şekil 3.5. Kandesartanın kimyasal yapısı

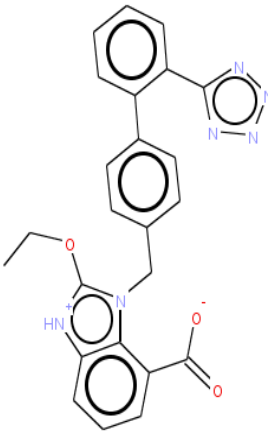
3.1.3.1. Kandesartanın makraskopik pKa değerleri



Max Fraction = 1.00

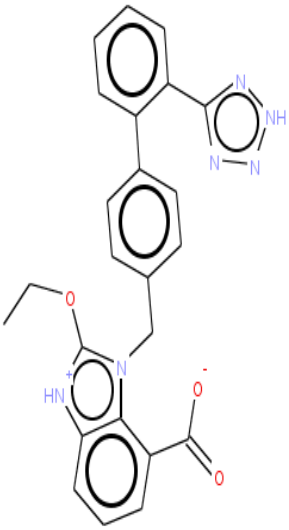


Max Fraction = 0.02

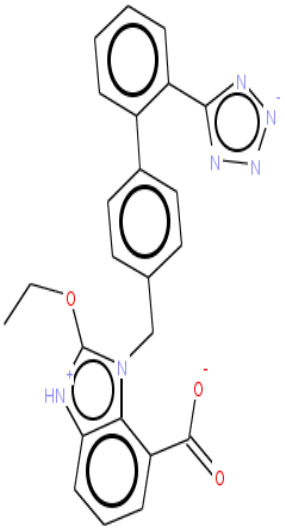


Max Fraction = 0.87

Macro Pka = 2.15



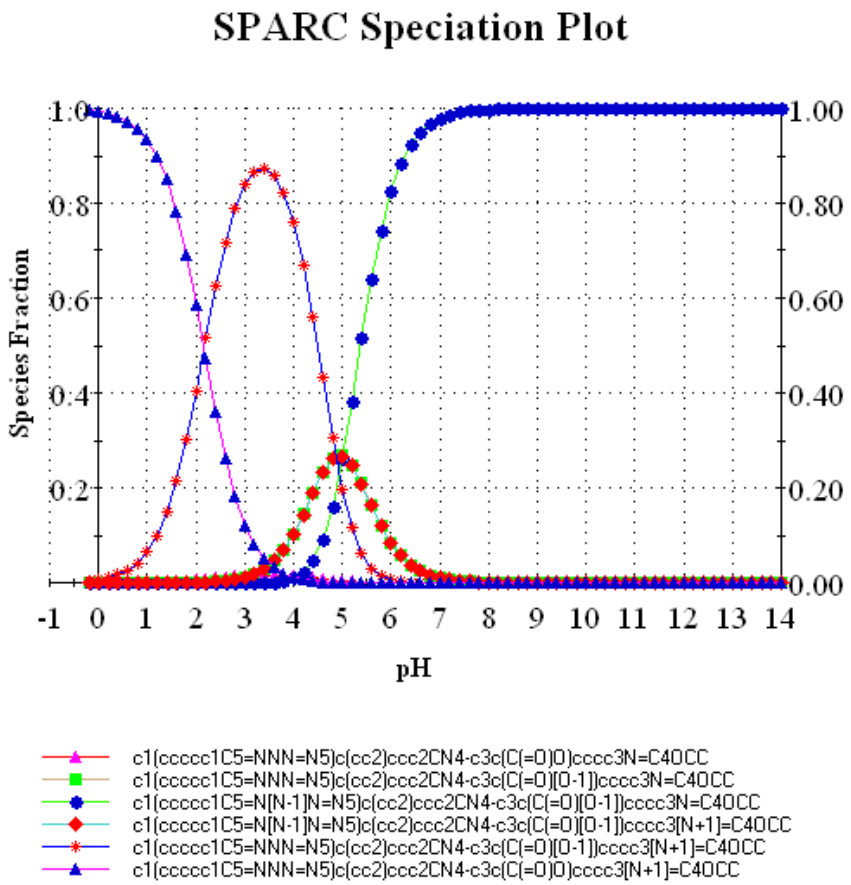
Max Fraction = 0.87



Max Fraction = 0.27

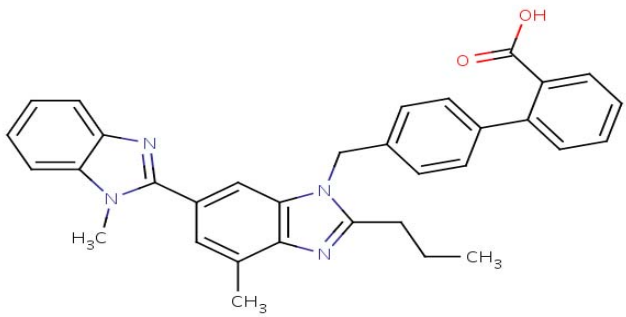
Macro Pka = 4.58

3.1.3.2. Kandesartanın SPARC programında çizilen pH grafikleri



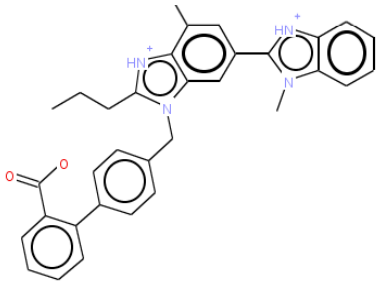
Şekil 3.6. Kandesartanın α- pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi

3.1.4. Telmisartan



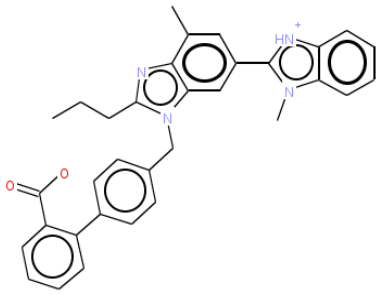
Şekil 3.7. Telmisartanın kimyasal yapısı

3.1.4.1. Telmisartanın makraskopik pKa değerleri



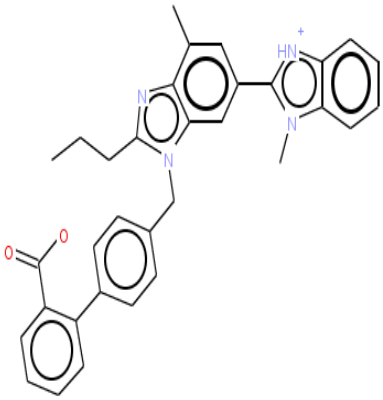
Max Fraction = 1.00

Macro Pka = 3.28



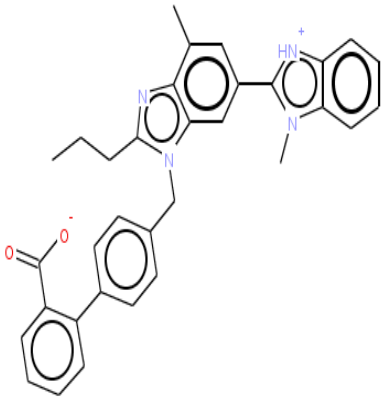
Max Fraction = 0.52

Max Fraction = 0.09

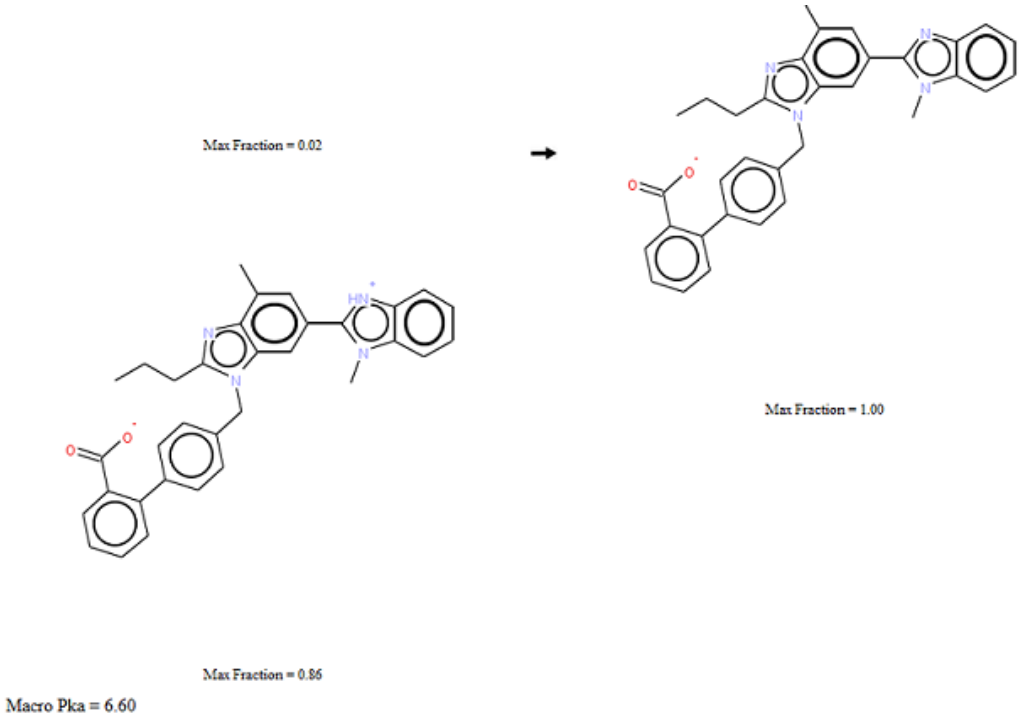


Max Fraction = 0.09

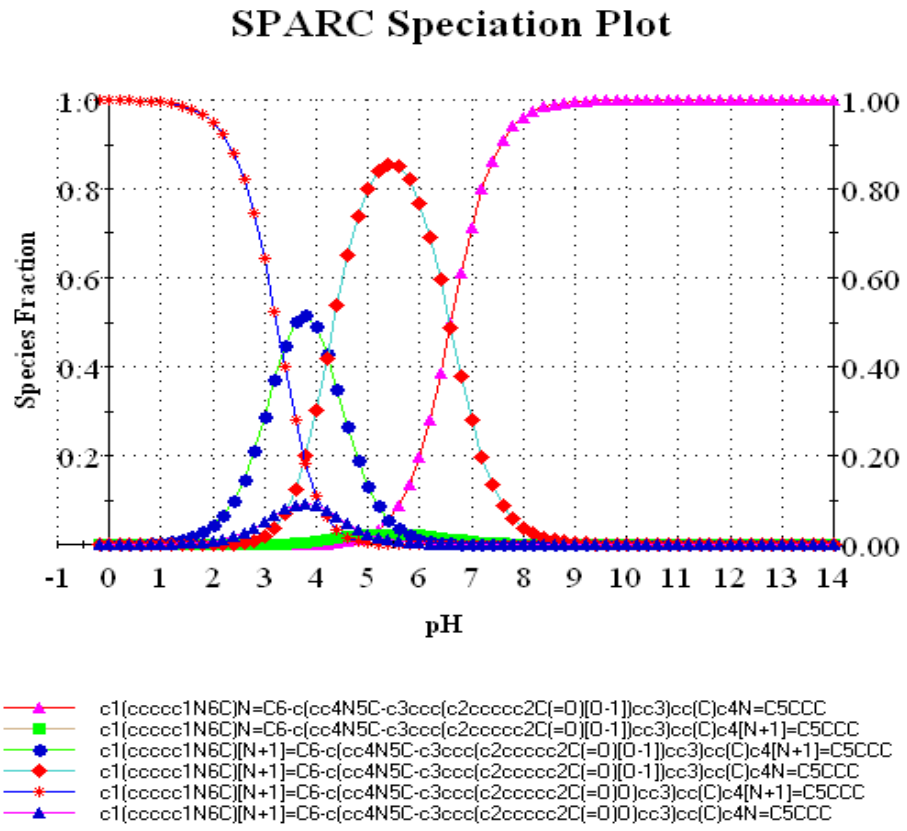
Macro Pka = 4.27



Max Fraction = 0.86

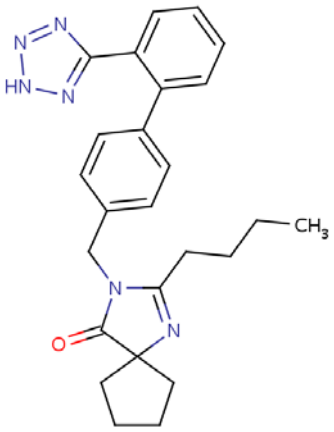


3.1.4.2. Telmisartanın SPARC programında çizilen pH grafikleri



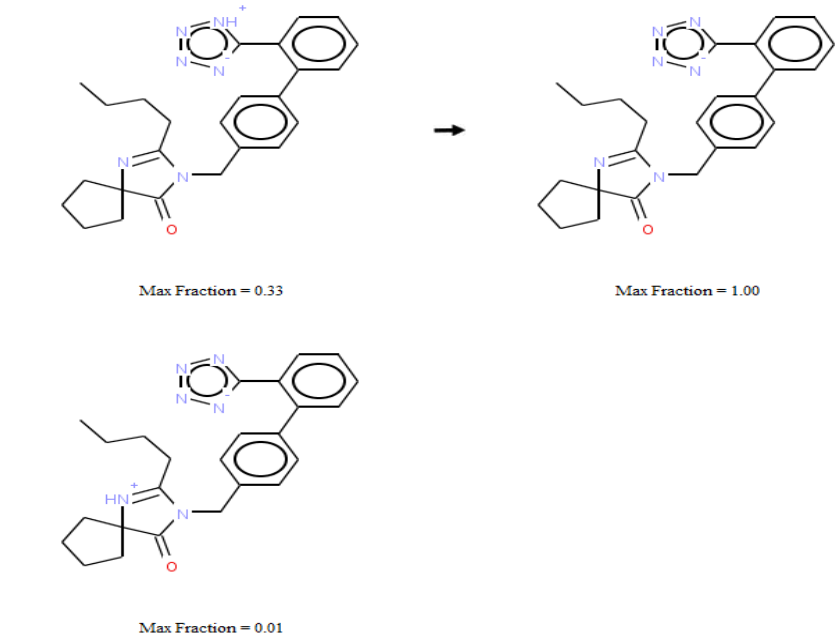
Şekil 3.8. Telmisartanın α- pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi

3.1.5. İrbesartan

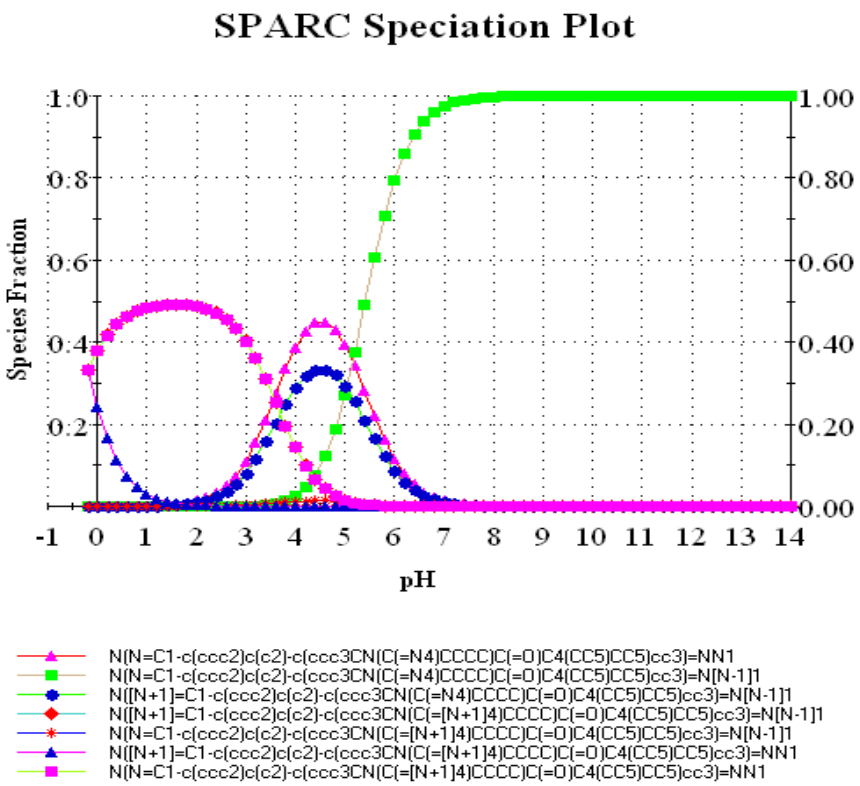


Şekil 3.9. İrbesartanın kimyasal yapısı

3.1.5.1. İrbesartanın makraskopik pKa değerleri

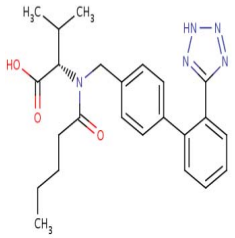
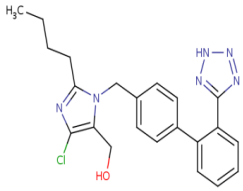
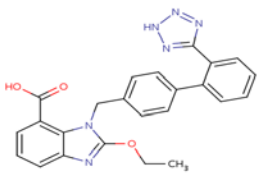
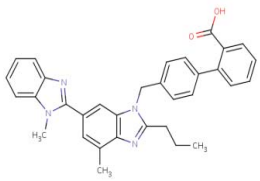
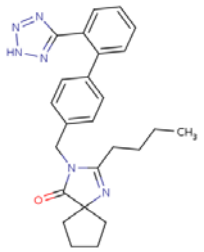


3.1.5.2. İrbesartanın SPARC programında çizilen pH grafikleri



Şekil 3.10. İrbesartanın α- pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi

Çizelge 3.1. ARA II lerin pKa değerleri

Bileşik	Kimyasal yapısı	pKa	Metot	Ref.
Valsartan		4,90±0,09 3,9-4,7	Spektroflorimetri Kromatografi	E.Cagigal, L.González, R.M.Alonso,R.M.Jime´ nez G. Flesch, M.P. Lloyd, Eur. J. Clin. Pharmacol.52 (1997)115–120. * F.Waldmeier, G. Flesch, P. Mu¨ ller, T. Wrinkler, H.P. Kriemler, P. Bu¨hlmayer,M.de Gasparo, Xenobiotica 27 (1) (1997) 59–71.
Losartan		3,15±0,07 2,36-5,55 / 4,9 / 5,6	Spektroflorimetri Kromatografi	E.Cagigal,L. Gonzélez, R.M. Alonso, R.M. Jiménez K.E. McCarthy, Q. Wang, E.W. Tsai, R.E. Gilbert, D.P. Ip, M.A. Brooks, J. Pharm. Biomed. Anal. 17 (1998) 671–677.
Kandesartan		6,0 ±0,1	Spektroflorimetri	E. Cagigal, L. González, R.M. Alonso, R.M. Jiménez
Telmisartan		4,45±0,09	Spektroflorimetri	E. Cagigal, L. González, R.M. Alonso, R.M. Jiménez
İrbesartan		4,70 ±0,06 4,5	Spektroflorimetri Kromatografi	E. Cagigal, L. González, R.M. Alonso, R.M. Jiménez S.Y. Chang, D.B. Whigan, N.N. Vachharajani, R. Patel, J. Chromatogr. B 702 (1997) 149–165

4. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Stenhoff ve arkadaşları 1999 yılında yaptıkları, "Kandesartan sileksetil, kandesartanın; insan plazmasında ve idrardaki bir metabolitin sıvı kromatografisi ve florimetrik dedeksiyon ile tayini" konulu çalışmalarında, yeni bir etkin antihipertansif ilaç olan kandesartan, onun ön ilacı olan kandesartan sileksetil, insan plazmasındaki ve idrardaki bir metabolitinin tayini için sıvı kromatografik yöntemleri çalışmışlardır. Bu tayinler sıvı-sıvı ekstraksiyonu ve florimetrik dedeksiyon ile bir fenil kolonda ayırmayı da kapsamaktadır. Bu yöntemler, kandesartan, kandesartan sileksetil ve metaboliti için sırasıyla % 70, 83 ve 78' lik mutlak geri kazanımlar ve tayin sınırlarını ise plazmada sırasıyla 5, 1 ve 3 nM (bağıl standart sapma, %20) olarak vermiştir. Bu yöntemler insanda biyofarmasötik ve klinik çalışmalardan elde edilen plazma ve idrar örneklerine uygulanmıştır.

Hempen ve arkadaşları 2006 yılında "insan plazmasındaki telmisartanın tayininde birlikte kullanılan likid kromatografi ve kütle spektrometresi ile immunoassay ve farmokokinetik yöntemlerin kıyaslanması" konulu çalışmayı yayınlamışlardır. Bu çalışma daha önceden ortaya konulan ve floresansın kullanıldığı ELISA yöntemi ile LC/APCI-MS/MS yöntemi kıyaslanmıştır. Uygulanan LC/MS metodu için, dedeksiyon limiti 0,3 ng/mL, kantitaitf limit 0,9 ng/mL ve doğrusal aralık 0,9 ile 1000 ng/mL arasında bulunmuştur. Dört gönüllüden alınan kırk sekiz plazma örneği metotların karşılaştırılması için farmakokinetik olarak analiz edilmiştir. Sonuç olarak birbirinden bağımsız telmisartanın kan plazmasındaki tespiti konusunda kullanılan analitler için biribiri ile kıyaslanabilir sonuçları olduğu bulunmuştur.

Abdellatef'in 2007 yılında yapmış olduğu "disopyramid ve irbesartanın ilaç formülasyonundaki ekstraktif spektrofotometrik tayini" isimli çalışmasında irbesartan ve disopyramidin tayininde Pikrik asit, Bromkrezol yeşili, Bromtimol mavisi, Kobalt tiyosiyanat, Molibden (V) tiyosiyanat reaktifleri spektrofotometrik olarak tayin edilmiştir. Reaksiyon ortamı daha duyarlı ve daha kararlı, renkli kompleksler elde etmek için uygun hale getirilmiştir. Oluşan iyon çifti komplekslerinin absorbansı, irbesartan disopyramidin konsantrasyonu arttıkça absorbans doğruluğu artmıştır. İlaç formülasyonlarında disopyramid ve irbesartan tayininde yeni geliştirilen metotlar kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar t-testi ve F-testi ile kıyaslanmış ve geçerliliği değerlendirilmiştir. Sonuçlar resmi veya referans metotlarla istatistiksel olarak kıyaslanmış ve metotlar arası uygunluk gözlemlenmiştir.

Koseki ve ark.'nın 2007 yılında yapmış olduğu "LC/MS kullanılarak insan plazmasındaki valsartanın kantitatif tayinindeki gelişmeler" isimli makaleyi yayınlanmıştır. Empore içerisinde katı faz ekstraksiyon kullanılarak 0,5 mL aliquat elde edilmiştir. Katı faz olarak uluslar arası reçine-96 kullanılmıştır. Bu metodun kalibrasyon aralığı 2-2000 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Bu meteodun gün içindeki doğruluğu % 94,8-107 ve kesinliği % 2,19-5,40 dir, diğer günlerdeki doğruluğu % 93,5-105 ve kesinliğ % 1,87-5,67 dir. 24 saat içinde ve 10ºC içinde işlem gören örnekler neticesinde belirgin şekilde valsartan kaybı olmamıştır. 50 kereye kadar insan plazmasıyla seyreltilen örnek analiz edilmiştir. Girişim yapan pikler ve matrixler gözlenmemiştir. Bu LC-MS/MS tekniği klinik olarak kullanılan dozlarda valsartan tayininde gelişmiş bir yöntem olarak kullanılmıştır.

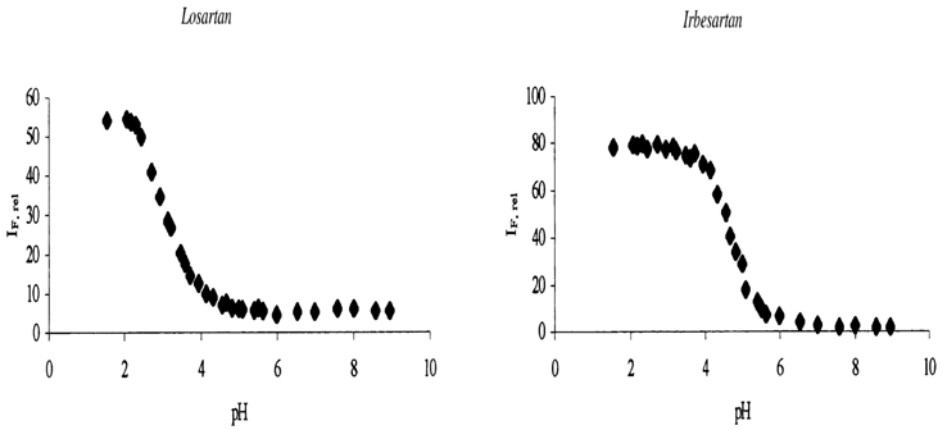
Gonza´lez ve ark. 2002 yılında " insan plazmasındaki ARA II' nin hızlı tayininde florimetrik tespiti için HPLC kullanımı" isimli makaleyi yayınlamışlardır. Seçici, doğru ve kesin sonuçlar veren HPLC ile floresans dedeksiyon yöntemi bazı ARA II' lerin (Losartan, İrbesartan, Valsartan, Kandesartan sileksetil ve onun metabolit Kandesartan M1) tespiti için geliştirilmiştir. C kartuşu kullanılarak katı faz ekstraksiyonu ile asidik ortamda plazmadan analitler ve iç standart (bumetanide, güçlü diüretik) ekstrakte edilmiştir. Kandesartan sileksetil (% 70) hariç diğer bütün ilaçlarda % 80 geri kazanım görülmüştür, Kandesartanın geri kazanım oranının düşük çıkmasının sebebi; plastik duvarlarda ve cam proseslerde absorpsiyon yapmış olmasıdır. Analitler ve potansiyel girişimler oda sıcaklığında, ters faz kolonda (mBondapak C) ayrıştırılmıştır. pH 4 de, çeşitli akış oranlarındaki (1,0-1,2 mL/min), 5mM asetat tamponu ile asetonitril kullanılarak eğim ayrıma modunda ayrıştırma sağlanmıştır. Floresans dedektörü 250nm ekzitasyon dalga boyuna, 375 nm emisyon dalga boyuna ayarlanmıştır. Losartan (% 12) hariç tüm bileşiklerde gün içi ve günler arası bağıl standart sapma % 8 den daha aşağı bulunmuştur. Bu bileşiklerin kantitatif limitleri Kandesartan sileksetil ve M1 için 3ng/mL, Losartan için 16ng/mL, İrbesartan ve Valsartan için 50ng/mL değerlerinde olduğu üzere bunlar plazma konsantrasyon değerlerinden tayin edilebilir. Tedavi amacıyla ARA II bileşiklerini kullanan hiper tansiyon hastalarından elde edilen plazma örneklerinden bu maddelerin tespiti için bu yöntem başarıyla kullanılmıştır.

"Katı faz ekstraksiyon için çoklu enjeksiyon kromotografi yöntemi ve Hidroklorotiyazid ile Losartan potasyumun yüzeysel suda, dipteki suda ve atık suda örneklerinin tayini" isimli makaleyi Obandoa ve ark. 2008 yılında yayınlamışlardır.

Makaleye göre, Hidroklorotiyazid ve losartan potasyumun yüzeysel suda, dipteki suda ve atık sulardaki tayini ve ön konsantrasyonu için, çoklu enjeksiyon kromatografi analizleri tekniği kullanılmıştır. Geliştririlen sistem, Hidroklorotiyazid ve Losartan potasyumun tayini ve geri kazanım oranları % 95 - 118 olarak örneklerde kanıtlanmıştır. Cation-SR adsorban materyali üzerine su örneklerinden alınan analitler konularak hedef analitler zenginleştirilmiştir. Analitler monolitik kolona yıkanarak transfer edilmiş ve kolonun ticari ismi Chromolith Flash RP-18e column (25mm×4.6mm i.d.) dir. Hareketli faz 10mM potasyum dihidrojen fosfat (pH 3,0): asetonitril: metanol (60:30:10 v/v/v), akış oranı 0,8 mL/min dir. UV dedeksiyonu 226 nm olarak bulunmuştur. Optimum fiziksel ve kimyasal değişkenler altında, 1 mL örnek içindeki Hidroklortiyazid ve Losartan potasyumun dedeksiyon limitleri 3Syx/b formülünden hesaplanmış ve sırasıyla 0,07 ve 0,09 mg/L bulunmuştur.

Carlucci ve ark. 2000 yılında "tabletlerdeki losartan ve hidroklorotiyazidin HPLC ile eş zamanlı tayini" isimli makaleyi yaınlamışlardır. Tabletlerdeki losartan potasyum ve hidroklorotiyazidin eş zamanlı tayini için bu metot tanımlanmıştır. Bu prosedür, esas olarak ters faz HPLC kullanılarak doğrusal konsantrasyon aralığı Losartan için 3,0-7,0 mg/mL ve Hidroklorotiyazid için 0,5-2,0 mg/mL bulunmuştur. Bu yöntem basit, hızlı, tam ve kesin sonuç elde edilmesini sağlar. Dedeksiyon limiti Losartan için 0,08 mg/mL ve Hidroklorotiyazid için 0,05 mg/mL dir.

Cagigal ve ark. "ARA II lerin spketroflorimetri ile pKa larının tayini" isimli çalışmayı 2001 yılında yayınlamışlardır. Yeni antihiperansif tür olan ilaçlardan ARA II' lerin (Losartan, İrbesartan, Valsartan, Kandesartan sileksetil, Kandesartan M1 ve Telmisartan) spektroflorimetri ile asit baz denge sabitleri tayin edilmiştir. Bağıl floresans yoğunluğu ve pH verileri grafiksel (türevlendirme ve eğri metodu) ve sayısal (Letagrop Spefo) metotlar kullanılarak belirlenmiştir. 0,5 M' lık iyonik şiddette, sonuç olarak ortaya çıkan pKa değerleri; Losartanın (3,15-0,07), İrbesartanın (4,70-0,06), Valsartanın (4,90-0,09), Kandesartan sileksetilin (6,0-0,1), Kandesartan M1' in (3,9-0,1) ve Telmisartanın (4,45-0,09) olarak bulunmuştur.



Şekil 4.1. Losartan ve irbesartan için örnek pH-floresans şiddeti grafiği

Yan ve ark. "LC-MS/MS metodu ile insan plazmasındaki Telmisartan ve Hidroklorotiyazidin eş zamanlı kantitatif analizi" isimli makaleyi 2008 yılında yayınlamışlardır. İnsan plazmasındaki Telmisartan ve Hidroklorotiyazidin eş zamanlı tayini için hızlı ve hassas bir metot olan LC_MS/MS gelitrilerek kullanılmıştır. Örnek dietil eter-diklorometan (60:40, v/v) kullanılarak sıvı-sıvı ekstarkasiyon ile hazırlanmıştır. Analitler ve probenecid (iç standart) VenusilXBP-C8 kolonunda, akış oranı 1,2 mL/min olan asetonitril-10mM amonyum asetat- formik asit ile gradient elüsyon kullanılarak ayılmıştır. Elektrospray negatif iyonizasyon kütle spektrometresi kullanılarak değişimler Telmisartan için m/z 513,0→469,4, Hidroklorotiyazid için m/z 295,9→268,9 ve probenecid için m/z 283,9→239,9 bulunmuştur. Her iki analit için, metodun doğrusal aralığı 1,00-600ng/mL ile gün içi ve günler arası kesinlik ≤% 10.6 ve doğruluk ≤% 4.2 dir. Tek doz 80mg Telmisartan ve 12,5 mg Hidroklorotiyazid kombinasyonu verilen 9 gönüllüde farmakokinetik çalışmada bu analiz başarıyla uygulanmıştır.

Shakya ve ark. "insan plazmasındaki irbesartanın sıvı kromatografi ile tayini" isimli makaleyi 2007 yılında yayınlamışlardır. İnsan plazmasındaki İrbesartan ve Losartan dietileter:diklorometan (7:3, v/v) kullanılarak ekstrakte edilmiş, 0,05 M sodyum hidroksit ile geri ekstraksiyon yapılmış. Nötralleştirilen örnekler 0,01 M potasyum dihidrojen fosfat tamponu ve asetonitril kullanılarak analiz edilmiştir. Kromatografik ayrılma isokratik elüsyon kullanılarak ODS-C-18 kolonda (100mmx4,6mm i.d., parçacık ebatı 5m) sağlanmıştır. Pikler floresans dedktörde ekzitasyon 259 nm ve emisyon 385 nm ye ayarlanarak saptanmış ve kromatografik ayrılmanın toplam süresi 13 dakikadır. Bu metot için kantitatif aralıklar 15-4000 ng/mL, varyasyon katsayısı 0,75- %12,53 tür. Ortalama geri kazanım % 73,3-77,12 dir

(varyasyon katsayısı % 3,7-6,3). İrbesartanın plazmadaki kararlılığı >% 89, işlem sırasında bozunmaya uğramamış ve -70 ºC de 60 gün depolanmıştır. Bu yöntem duyarlı, basit ve farmakokinetik çalışmalarda kullanılabilir.

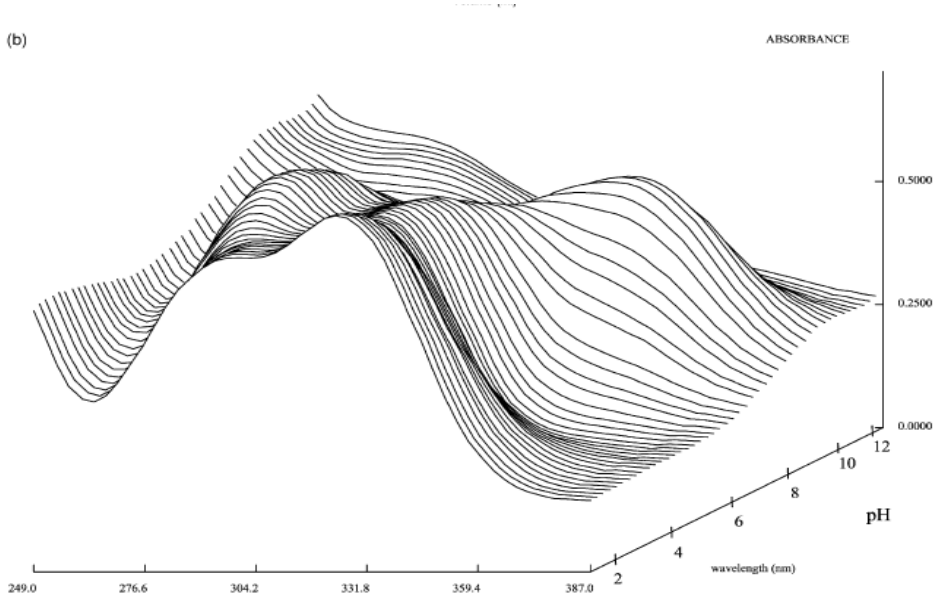
Şatana ve ark. "1. türev UV spektrofotometre ve LC ile tabletlerdeki valsartan ve hidroklorotiyazidin eş zamanlı tayini" isimli makaleyi 2001 yılında yayınlamışlardır. Türevlendirme metodunda ilaç konsantrasyonları ile türev genlikleri doğrusal ilişki gösterir ve Valsartan ve Hidroklorotiyazidin 1.türev genlikleri sırasıyla 270,6 ve 335 nm dir. Valsartan için 12,0-36,1 g/mL, Hidroklorotiyazid için 4,0-12,1 g/mL aralıklarında kalibrasyon garfiği lineer olarak bulunmuştur. 225 nm deki UV dedeksiyon ile HPLC karşılaştırma metodu olarak kullanılmıştır. HPLC prosedüründe hareketli fazı 0,02 M fosfat tampon (pH 3,2), asetonitril (55:45;v/v) olan ters faz kolonu Valsartan ve Hidroklorotiyazidin ayrıştırılması için kullanılmış. İç standart ile verilen konsantrasyonlarda Valsartan (0,06-1,8 g/mL) ve Hidroklorotiyazid (0,07-0,5 g/mL) arasında lineer bir pik alan oranı bulunmuştur. Bu yöntem laboratuarda hazırlanmış ilaç karışımları ve ticari tabletlerde bu ilaçların tespitinde başarıyla kullanılmıştır.

Hillaert ve ark. 2002 yılında " çeşitli ARA II' lerin kapiller bölge elektroforetik metodunun uyarlanması ve doğrulanması" isimli makaleyi yayınlamışlardır. Yazarlar 6 tane ARA II' nin (Kandesartan, Eprosartan, İrbesartan, Losartan potasyum, Telmisartan ve Valsartan) ayrıştırılmasına elektroforetik yöntemi uyarlamışlardır. pH nın etkisi ve kullanılan tamponun molaritesinin ayrıştırmadaki etkisine bakılmıştır. Yapılan çalışmada ARA II' lerin ayrıştırılması en iyi 60 mM sodyumfosfat tamponu kullanılarak sağlanmıştır. Bu sistem ayrıca, çok çözünen bileşiklerin kantitatif tayini için de kullanılmıştır.

Macek ve ark. 2006 yılında "HPLC ve protein çöktürmesi ile insan plazmasındaki valsartanın hızlı tayini" isimli makaleyi yayınlamışlardır. Bu analiz metanol ile protein çöktürülmesine ve florimetrik dedeksiyon ile ters faz kromatografisine dayanmaktadır. 24 örneğin hazırlanması 20 dakika sürmüştür. Bu kromatografide oktadesilsilika kolon kullanılmış (50mmx4mm), hareketli faz asetonitril-15mM dihidrojenpotasyumfosfattan (45:55, v/v) meydana gelmiştir, pH 2,0'dır. İşlem süresi 2,8 dakikadır. Florimetrik dedektör 234/374 nm (ekzitasyon/emisyon) dalga boylarında çalışmıştır. 0,2 mL plazma kullanıldığında kantitatif limit 98ng/mL bulunmuştur. Gün içi ve günler arası kesinlik, standart sapma için % 5 den az, hata ise % 8 i aşmamıştır. Bu analiz farmokokinetik çalışmalarda örnek analizi için kullanılmıştır.

Wan H. ve ark.' nın 2002 yılında yaptığı " Kısa-son Enjeksiyon ile Birleştirilmiş Basınç destekli Kapiler Elektroforezle İlaçların pKa Değerlerinin Hızlı Görüntülenmesi" başlıklı çalışmada, kısa-son enjeksiyon ile birleştirilmiş basınç destekli kapiler elektroforez 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'nın üzerinde olduğunda, basınçtaki bir artışı etkin hareketlilik üzerinde az bir azalmaya sebep olduğu, ayrıca pH pK'nın altındayken basıncın arttırılmasıyla etkin hareketlilik artışı gözlenmiştir. Bununla birlikte, basınç uygulamasıyla gözlenen etkin hareketlilik kaymasının, pKa değerlerinin tayininde önemli ölçüde etkin olmadığı ifade edilmektedir. Tayin edilen pKa değerlerinin, yayınlanan verilerle iyi bir uyum içinde olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bir yığma (istif) koşulu, duyarlılığı arttırmak için uygulanmış ve iç çapı 50 μm olan bir kapiler kullanarak UV dedeksiyonu ile 2 μM'ın altındaki derişim kolaylıkla saptanabilmiştir. Bu teknik, özellikle suda az çözünen bileşiklerin pKa 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 pKa tayinini mümkün kılar.

J.L. Beltrán ve ark.' nın 2003 yapmış olduğu çalışmada, polifenolik asitlerin pKa değerleri; su ve asetonitril-su ortamlarında spektrofotometrik, potansiyometrik ve kromatografik yöntemlerle hesaplanmıştır. Yeni geliştirilmiş olan metotla daha önce elde edilen kromotografik 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 örneklere kullanılması da avantaj sağlar. 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.



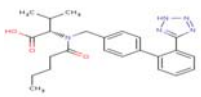
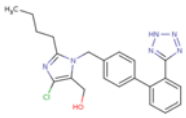
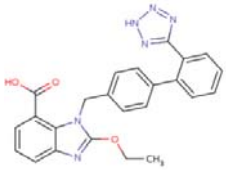
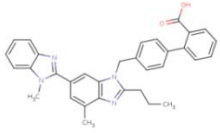
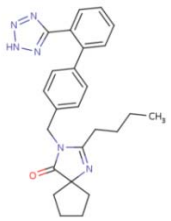
Şekil 4.2. Kafeik asidin % 30 MeCN ortamındaki pH-absorbans değerlerinin PKPOT grafiği

5. MATERYAL VE YÖNTEM

5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan antihipertansif maddeler, CAS numaraları, bileşiğin formülü, molekül ağırlıkları ve açık formülleri ile Çizelge 5.1. ‘de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Deneylerde kullanılan kimyasal maddelerin özellikleri

Maddenin Adı	Açık formülü	Kapalı formülü	Molekül ağırlığı	CAS numarası
Valsartan		$C_{24}H_{29}N_5O_3$	435,5188	137862-53-4
Losartan		$C_{22}H_{23}ClN_6O$	422,911	114798-26-4
Kandesartan		$C_{24}H_{20}N_6O_3$	440,454	139481-59-7
Telmisartan		$C_{33}H_{30}N_4O_2$	514,6169	144701-48-4
İrbesartan		$C_{25}H_{28}N_6O$	428,5294	138402-11-6

5.2. Kullanılan Çözücüler

Bu çalışmamızda kullandığımız çözücülerin adları, firma adları ve saflık dereceleri Çizelge 5.2. 'de gösterilmiştir. Deneysel çalışmalar sırasında ultra saf su kullanılmıştır.

Çizelge 5.2. Çalışmada kullanılan çözücüler

Maddenin Adı	Firmanın Adı	Saflık Derecesi
Asetonitril	Merck	99,5
Metanol	Merck	99,9

Çizelge 5.3. Kullanılan çözücülerin özellikleri ve solvatokromik parametreleri (α, β, π*, DN, AN)

Çözücü	D^a	μ^b	η^c	α	β	π*	DN^d	AN^e	$E_T^{(30)}$	λex, nm	λem,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

[a] Çözücünün dielektrik sabiti (20-25°C)

[b] Çözücünün dipol momenti (debye biriminde)

[c] Çözücünün viskozitesi (centipoise biriminde)

[d] Gutman'ın donör sayısı

[e] Gutman-Mayer akseptör sayısı

α = Kamlet-Taft Lewis-asitlik (hidrojen bağı donörü) parametresi

β = Kamlet-Taft Lewis-bazlık parametresi

π* =Kamlet-Taft polarlık /polarizlenebilirlik parametresi

5.3. Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada floresans ölçümleri için laboratuarımızda bulunan Perkin Elmer LS/55 spektroflorimetre 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 Mettler Toledo marka pH metre ve Mettler Toledo marka cam elektrot kullanıldı. pH metrenin kalibrasyonu Merck firmasından temin edilen tamponlarla yapıldı. Deneyler yapılmadan 24 saat önce kullanılacak çözücülerde şartlanması için bekletildi.

Çözeltilerimizi hazırlamak için kullanılan ultra saf su Pure Lab Option-Q ELGA DV25 marka cihazdan elde edilmiştir. Çözeltileri hazırlarken çözünmenin tam olması amacıyla ULTRASONIC LC/30H marka ultrasonic su banyosu kullanıldı.

pH ölçümleri yapılırken HEİDOLP MR 3001 K marka hot plate karıştırıcı ile çözelti karıştırıldı. Ayrıca pH ölçümleri sırasında sıcaklığı sabit tutmak amacıyla WiseCircu marka sirkülasyonlu su banyosu kullanıldı.

5.4. Çözeltiler

Kullanılan antihipertansif maddelerin metanol, asetonitril ve ultra saf suda 10^{-4}M derişimde stok çözeltileri hazırlandı. Floresans özelliklerinin incelenmesinde, pH çalışmalarında bu çözeltiler kullanıldı. pH çalışmasında ayrıca titrant çözeltilerinin (0,1 M KOH ve HCl çözeltileri) ve ortamın iyonik şiddetini dengede tutmak için 0,1 M KCl çözeltisi kullanıldı.

6. DENEYSEL İŞLEM

6.1. Çözeltilerin Hazırlanması

6.1.1. Valsartanın çözeltilerinin hazırlanması

6.1.1.1. Valsartanın metanol-su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması

10^{-4} M Valsartanın metanoldeki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0010 g valsartan tartılmıştır. Daha sonra 25 mL' lik balon jojeye aktarılarak bir miktar metanolde çözülmüş ve hacim 25 mL' ye metanolle tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M' a seyreltilerek hazırlanmıştır. Yüzde çözücü çalışmalarında, uygun hacimlerde metanol ve su kullanarak çözeltiler hazırlanmıştır.

6.1.1.2. Valsartanın asetonitril-su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması

10^{-4} M Valsartanın asetonitrildeki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0010 g valsartan tartılmıştır. Daha sonra 25 mL' lik balon jojeye aktarılarak bir miktar asetonitrilde çözülmüş ve hacim 25 mL' ye asetonitrille tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M' a seyreltilerek hazırlanmıştır. Yüzde çözücü çalışmalarında, uygun hacimlerde asetonitril ve su kullanarak çözeltiler hazırlanmıştır.

6.1.1.3. Valsartanın su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması

10^{-4} M Valsartanın sudaki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0010 g valsartan tartılmıştır. Daha sonra 25 mL' lik balon jojeye aktarılarak bir miktar suda çözülmüş ve hacim 25 mL' ye su ile tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M' a seyreltilerek hazırlanmıştır.

6.1.2. Losartanın çözeltilerinin hazırlanması

6.1.2.1. Losartanın metanol-su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması

10^{-4} M Losartanın metanoldeki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0010 g losartan tartılmıştır. Daha sonra 25 mL' lik balon jojeye aktarılarak bir miktar metanolde çözülmüş ve hacim 25 mL' ye metanolle tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M' a seyreltilerek hazırlanmıştır. Yüzde çözücü çalışmalarında, uygun hacimlerde metanol ve su kullanarak çözeltiler hazırlanmıştır.

6.1.2.2. Losartanın asetonitril-su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması

10^{-4} M Losartanın asetonitrildeki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0010 g losartan tartılmıştır. Daha sonra 25 mL' lik balon jojeye aktarılarak bir miktar asetonitrilde çözülmüş ve hacim 25 mL' ye asetonitrille tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M' a seyreltilerek hazırlanmıştır. Yüzde çözücü çalışmalarında, uygun hacimlerde asetonitril ve su kullanarak çözeltiler hazırlanmıştır.

6.1.2.3. Losartanın su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması

10^{-4} M Losartanın sudaki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0010 g losartan tartılmıştır. Daha sonra 25 mL' lik balon jojeye aktarılarak bir miktar suda çözülmüş ve hacim 25 mL' ye su ile tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M' a seyreltilerek hazırlanmıştır.

6.1.3. Kandesartanın çözeltilerinin hazırlanması

6.1.3.1. Kandesartanın metanol-su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması

10^{-4} M Kandesartanın metanoldeki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0011 g kandesartan tartılmıştır. Daha sonra 25 mL' lik balon jojeye aktarılarak bir miktar metanolde çözülmüş ve hacim 25 mL' ye metanolle tamamlanmıştır.

Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M' a seyreltilerek hazırlanmıştır. Yüzde çözücü çalışmalarında, uygun hacimlerde metanol ve su kullanarak çözeltiler hazırlanmıştır.

6.1.3.2. Kandesartanın asetonitril-su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması

10^{-4} M Kandesartanın asetonitrildeki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0011 g kandesartan tartılmıştır. Daha sonra 25 mL' lik balon jojeye aktarılarak bir miktar asetonitrilde çözülmüş ve hacim 25 mL' ye asetonitrille tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M' a seyreltilerek hazırlanmıştır. Yüzde çözücü çalışmalarında, uygun hacimlerde asetonitril ve su kullanarak çözeltiler hazırlanmıştır.

6.1.3.3. Kandesartanın su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması

10^{-4} M Kandesartanın sudaki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0011 g kandesartan tartılmıştır. Daha sonra 25 mL' lik balon jojeye aktarılarak bir miktar suda çözülmüş ve hacim 25 mL' ye su ile tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M' a seyreltilerek hazırlanmıştır.

6.1.4. Telmisartanın çözeltilerinin hazırlanması

6.1.4.1. Telmisartanın metanol-su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması

10^{-4} M Telmisartanın metanoldeki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0012 g telmisartan tartılmıştır. Daha sonra 25 mL' lik balon jojeye aktarılarak bir miktar metanolde çözülmüş ve hacim 25 mL'ye metanolle tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M' a seyreltilerek hazırlanmıştır. Yüzde çözücü çalışmalarında, uygun hacimlerde metanol ve su kullanarak çözeltiler hazırlanmıştır.

6.1.4.2. Telmisartanın asetonitril-su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması

10^{-4} M Telmisartanın asetonitrildeki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0012 g telmisartan tartılmıştır. Daha sonra 25 mL' lik balon jojeye aktarılarak bir miktar asetonitrilde çözülmüş ve hacim 25 mL'ye asetonitrille tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M' a seyreltilerek hazırlanmıştır. Yüzde çözücü çalışmalarında, uygun hacimlerde asetonitril ve su kullanarak çözeltiler hazırlanmıştır.

6.1.4.3. Telmisartanın su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması

10^{-4} M Telmisartanın sudaki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0012 g telmisartan tartılmıştır. Daha sonra 25 mL' lik balon jojeye aktarılarak bir miktar suda çözülmüş ve hacim 25 mL'ye su ile tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M' a seyreltilerek hazırlanmıştır.

6.1.5. İrbesartanın çözeltilerinin hazırlanması

6.1.5.1. İrbesartanın metanol-su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması

10^{-4} M İrbesartanın metanoldeki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0010 g irbesartan tartılmıştır. Daha sonra 25 mL' lik balon jojeye aktarılarak bir miktar metanolde çözülmüş ve hacim 25 mL'ye metanolle tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M' a seyreltilerek hazırlanmıştır. Yüzde çözücü çalışmalarında, uygun hacimlerde metanol ve su kullanarak çözeltiler hazırlanmıştır.

6.1.5.2. İrbesartanın asetonitril-su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması

10^{-4} M İrbesartanın asetonitrildeki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0010 g irbesartan tartılmıştır. Daha sonra 25 mL' lik balon jojeye aktarılarak bir miktar asetonitrilde çözülmüş ve hacim 25 mL'ye asetonitrille tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M' a seyreltilerek

hazırlanmıştır. Yüzde çözücü çalışmalarında, uygun hacimlerde asetonitril ve su kullanarak çözeltiler hazırlanmıştır.

6.1.5.3. İrbesartanın su ortamındaki çözeltisinin hazırlanması

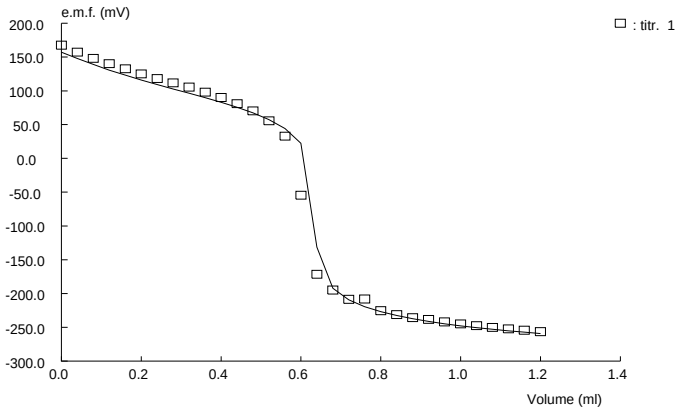
10^{-4} M İrbesartanın sudaki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0010 g irbesartan tartılmıştır. Daha sonra 25 mL' lik balon jojeye aktarılarak bir miktar suda çözülmüş ve hacim 25 mL'ye su ile tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M' a seyreltilerek hazırlanmıştır.

6.1.6. Titrant çözeltisinin hazırlanması

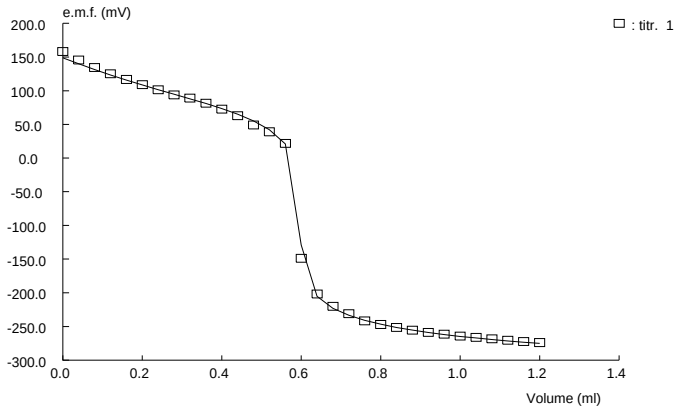
0,1 M' lık titrant çözeltisi 50 mL' lik santrifüj tüpünde 0,1 M KCl içerecek şekilde, her bir % çözücü ortamında, 1M' lık Titrisol KOH çözeltisinden hazırlanmıştır. Titrasyonlar, her seferinde hücreye 40 mikrolitre titrant ilave edilip potansiyeller E (mv) kaydedilerek yapılmıştır (Marquès,1999). Bu işleme titrant hacmi 1,2 mL oluncaya kadar devam edilmiştir (dönüm noktası 0,6 mL' dir).

6.2. Baz Ayarlanması

Baz ayarlanması için potasyum asit fitalat (KHP) kullanıldı. KHP kullanılmadan önce etüvde 120 ºC de 2 saat kurutma yapıldı. Daha sonra 3×10^{-3} M KHP hazırlamak amacıyla 0,01225 g KHP tartıldı. KHP ın çözünmesi amacıyla az miktarda ultra saf su kullanıldı ve pH ölçümlerinin yapılması için ceketli reaksiyon kabına aktarıldı. Ortamın iyonik şiddetini dengede tutmak amacıyla 2mL KCl ilave edildi. %10 asetonitril-su ortamı için 2mL, %20 asetonitril-su ortamı için 4ml, %30 asetonitril-su ortamı için 6mL, %40 asetonitril-su ortamı için 8 mL asetonitril ceketli reaksiyon kabına ilave edildi. Reaksiyon kabındaki çözeltinin hacmi saf suyla 20 mL'ye tamamlandı. Ortamın sıcaklığı 25 ºC de sabit tutmak amacıyla ceketli reaksiyon kabı sirkülatöre bağlandı.



Şekil 6.1. 0,1 M KOH'in %10 asetonitril-su ortamında potasyum asit ftalat ile ayarlanmasına ait PKPOT programında çizilen titrasyon grafiği



Şekil 6.2. 0,1 M KOH'in %30 asetonitril-su ortamında potasyum asit ftalat ile ayarlanmasına ait PKPOT programında çizilen titrasyon grafiği

6.3. Asit Ayarlanması

KHP ile ayarlanan 0,1 M'lık KOH kullanılarak, 1M'lık Titrisol HCl çözeltisi ayarlanmıştır. Ortamın iyonik şiddetini dengede tutmak amacıyla 2mL KCl ilave edildi. %10 asetonitril-su ortamı için 2mL, %20 asetonitril-su ortamı için 4ml, %30 asetonitril-su ortamı için 6mL, %40 asetonitril-su ortamı için 8 mL asetonitril tüpe ilave edildi. Toplam hacmin 20mL olması için 16mL saf su ilave edildi. Hazırlanan 0,1 M'lık HCl çözeltisinden 40ar µL'lik ilaveler yapılarak titrasyon gerçekleştirilmiş ve asit çözeltisi ayarlanmıştır.

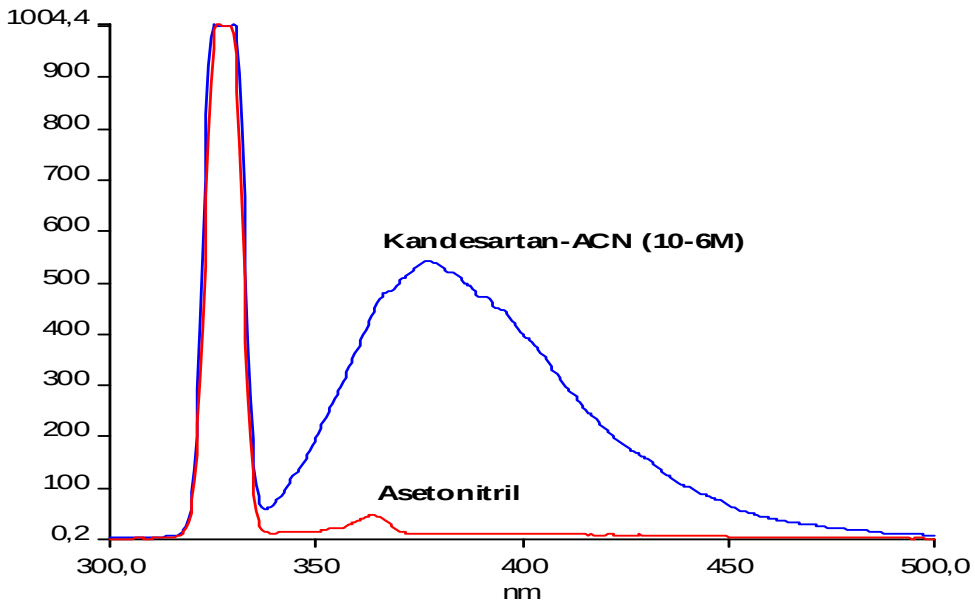
7. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

7.1. Anjiyotensin II Reseptör Antagonistlerinin Spektroflorimetrik Özelliklerinin Belirlenmesi

Anjiyotensin II Reseptör Antagonist (ARA II) maddelerinin asetonitril ve metanolde hazırlanan çözeltilerinin, 10'ar nm aralıklarla değiştirilen uyarma dalga boylarında ve 200-800 nm emisyon dalga boyu aralığında çoklu emisyon spektrumları alınmış ve bu çoklu spektrum taramalarından yararlanılarak maksimum floresans şiddeti elde edilen uyarma ve emisyon dalga boyları belirlenmiştir. Aynı işlemler %10-%90 asetonitril ve metanol içeren sulu çözeltilere uygulanarak optimum dalga boyları belirlenmiştir.

7.1.1. Kandesartanın asetonitril ve metanoldeki emisyon spektrumları

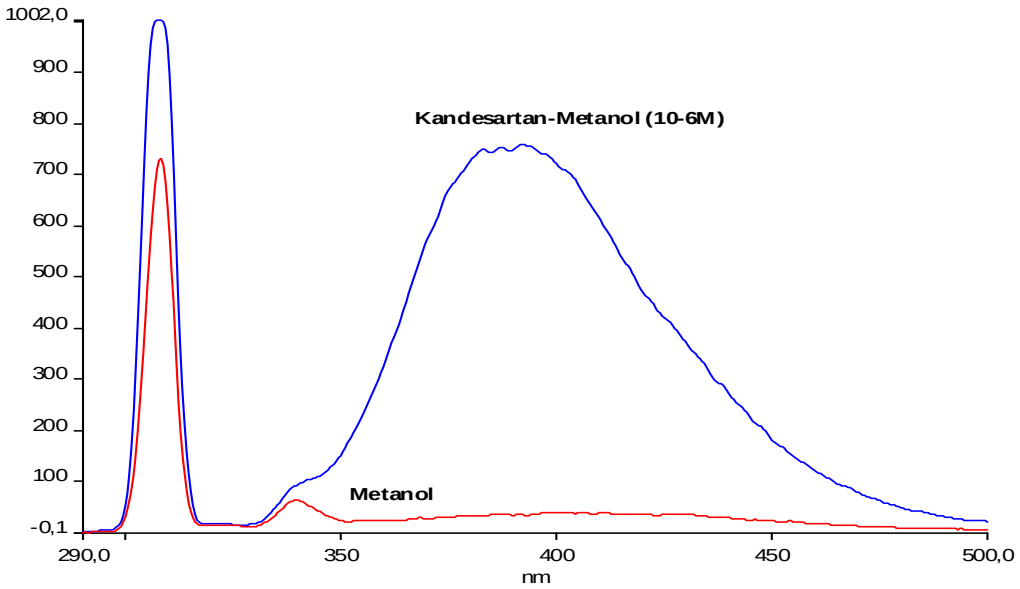
Kandesartanın asetonitril ve metanol ortamlarında hazırlanan 10^{-6} M' lık çözeltisinin çoklu spektrum taramalarıyla belirlenen en uygun uyarma dalga boyunda emisyon spektrumu alınmış ve aynı dalga boyunda alınan çözücüye ait emisyon spektrumu ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 7.1. Kandesartanın asetonitrildeki emisyon spektrumu

Çizelge 7.1. Kandesartanın asetonitrildeki floresans şiddeti

λems : 377,44 nm	Flor. Şid : 546,64	λekz: 327,72 nm



Şekil 7.2. Kandesartanın metanoldeki emisyon spektrumu

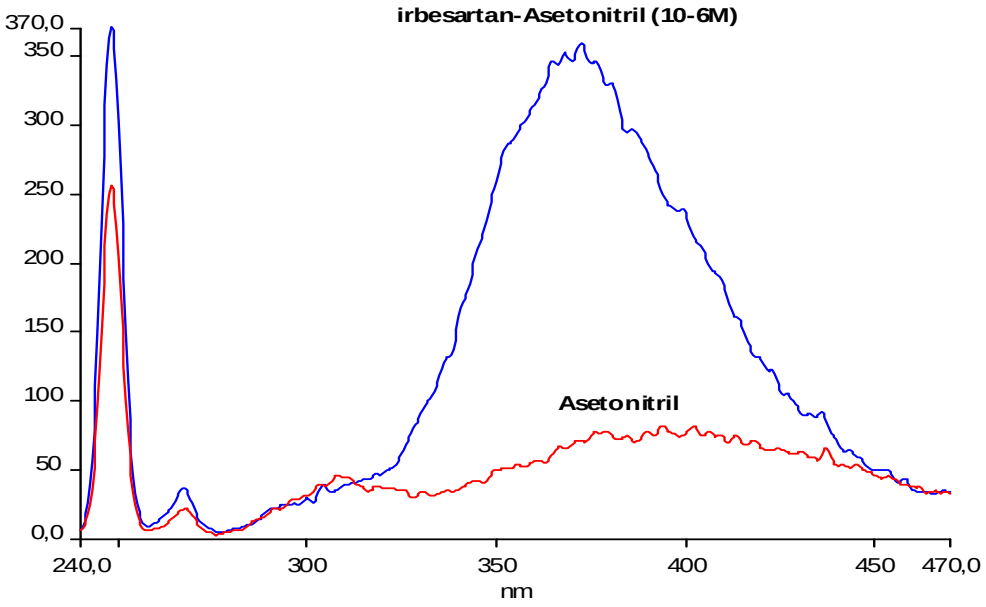
Çizelge 7.2. Kandesartanın metanoldeki floresans şiddeti

λems : 391,16 nm	Flor. Şid : 762,00	λekz: 307,15 nm

Kandesartanın hem asetonitril hem de metanol ortamlarındaki spektrumları incelendiğinde, maddenin bu ortamlardaki çözeltisinin çözücülerden çok daha yüksek floresans şiddetine sahip olduğu görülmüştür. Bu durum, kandesartanın her iki çözücü ortamında da polaritelerinin maddenin polaritesine yakın olması sebebiyle oldukça iyi çözündüğü ve bu ortamların maddenin floresans şiddetini arttırdığı şeklinde yorumlanabilir.

7.1.2. İrbesartanın asetonitril ve metanoldeki emisyon spektrumları

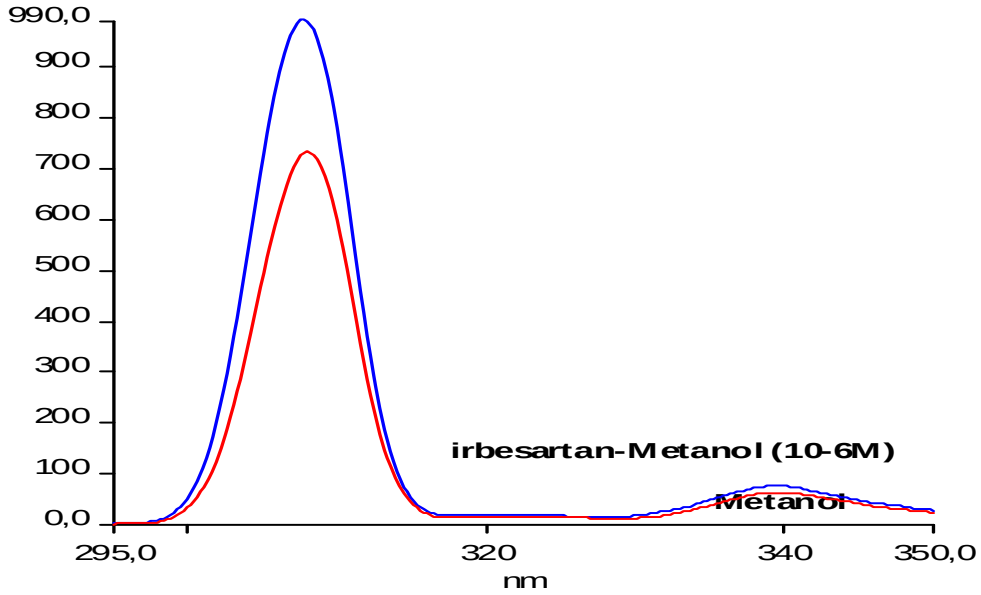
İrbesartanın asetonitril ve metanol ortamlarında hazırlanan 10^{-6} M' lık çözeltisinin çoklu spektrum taramalarıyla belirlenen en uygun uyarma dalga boyunda emisyon spektrumu alınmış ve aynı dalga boyunda alınan çözücüye ait emisyon spektrumu ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 7.3. İrbesartanın asetonitrildeki emisyon spektrumu

Çizelge 7.3. İrbesartanın Asetonitrildeki Floresans Şiddeti

λems : 372,30 nm	Flor. Şid : 363,67	λekz: 248 nm



Şekil 7.4. İrbesartanın metanoldeki emisyon spektrumu

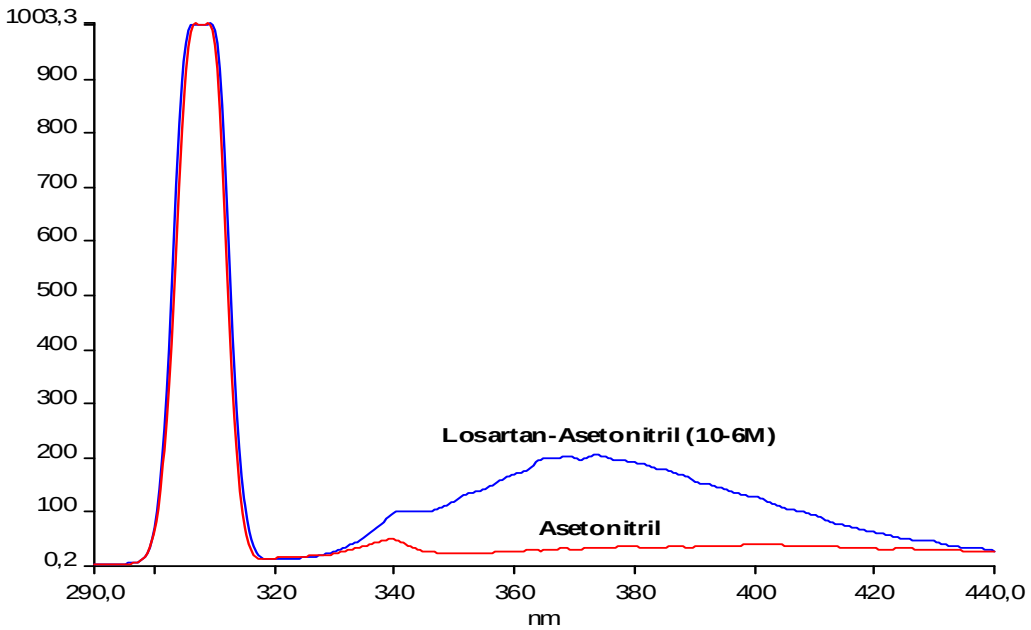
Çizelge 7.4. İrbesartanın metanoldeki floresans şiddeti

λems : 339,16 nm	Flor. Şid : 78,27	λekz: 307,39 nm

İrbesartanın hem asetonitril hem de metanol ortamlarındaki spektrumları incelendiğinde, maddenin asetonitril ortamındaki çözeltisinin çözücüden çok daha yüksek floresans şiddetine sahip olduğu, ancak metanol ortamında çözeltinin çözücü ile yaklaşık aynı floresans şiddeti gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum, irbesartanın asetonitril ortamında polaritesinin maddenin polaritesine yakın olması sebebiyle oldukça iyi çözündüğü ve bu ortamın maddenin floresans şiddetini arttırdığı şeklinde yorumlanabilir. Metanol ise, irbesartan ile yapılacak florimetrik çalışmalarda kullanıma uygun bir çözücü değildir.

7.1.3. Losartanın asetonitril ve metanoldeki emisyon spektrumları

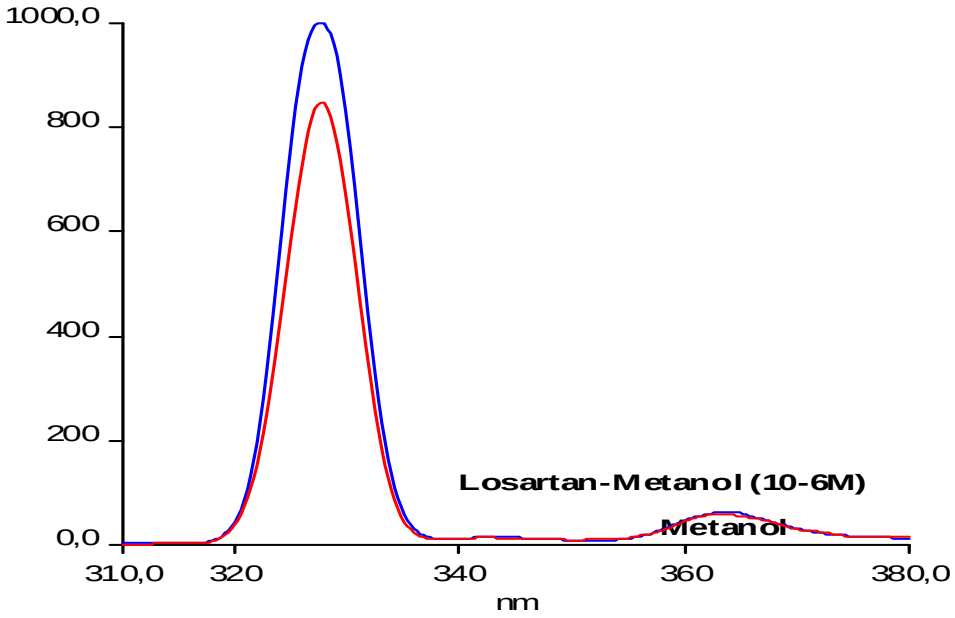
Losartanın asetonitril ve metanol ortamlarında hazırlanan 10^{-6} M' lık çözeltisinin çoklu spektrum taramalarıyla belirlenen en uygun uyarma dalga boyunda emisyon spektrumu alınmış ve aynı dalga boyunda alınan çözücüye ait emisyon spektrumu ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 7.5. Losartanın asetonitrildeki emisyon spektrumu

Çizelge 7.5. Losartanın asetonitrildeki floresans şiddeti

λems : 372,94 nm	Flor. Şid : 209,48	λekz: 307,90 nm



Şekil. 7.6. Losartanın Metanoldeki emisyon spektrumu

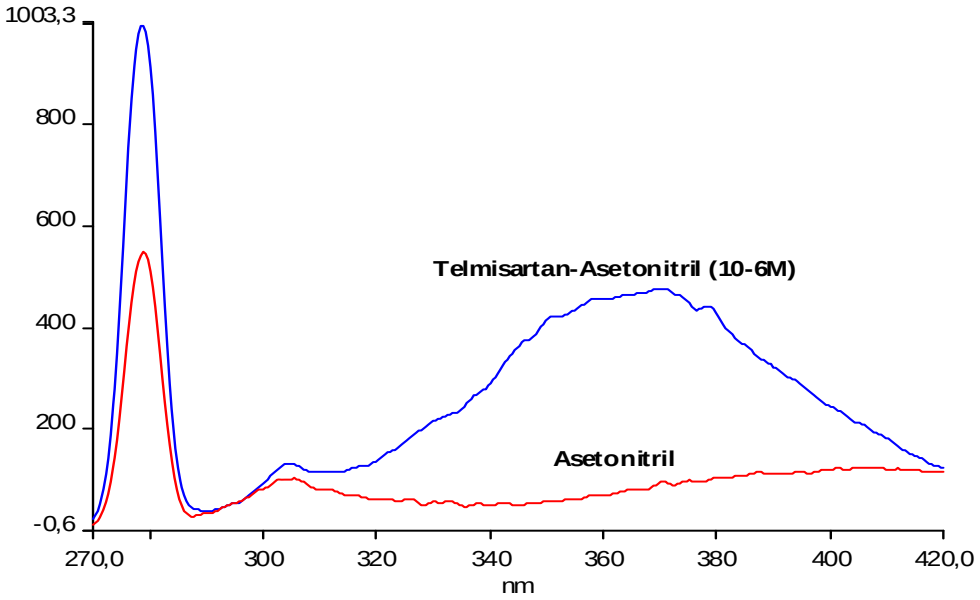
Çizelge 7.6. Losartanın Metanoldeki Floresans Şiddeti

λems : 363,87 nm	Flor. Şid : 65,85	λekz: 327,56 nm

Losartanın hem asetonitril hem de metanol ortamlarındaki spektrumları incelendiğinde, irbesartandaki duruma benzer şekilde, maddenin asetonitril ortamındaki çözeltisinin çözücüden çok daha yüksek floresans şiddetine sahip olduğu, ancak metanol ortamında çözeltinin çözücü ile yaklaşık aynı floresans şiddeti gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum da, losartanın asetonitril ortamında polaritesinin maddenin polaritesine yakın olması sebebiyle oldukça iyi çözündüğü ve bu ortamın maddenin floresans şiddetini arttırdığı şeklinde yorumlanabilir. Metanol ise, Losartan ile yapılacak florimetrik çalışmalar için de kullanıma uygun bir çözücü değildir.

7.1.4. Telmisartanın asetonitril ve metanoldeki emisyon spektrumları

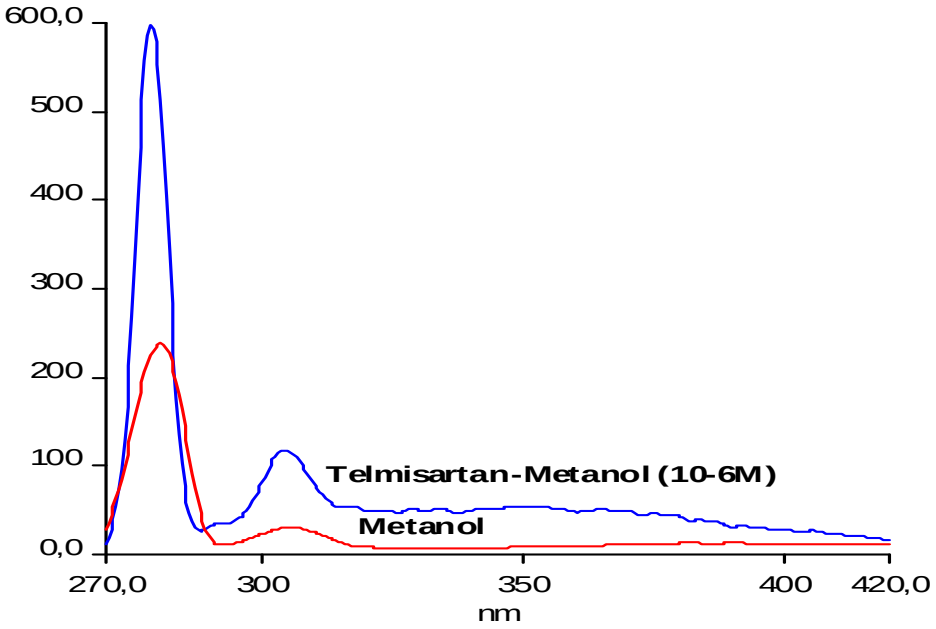
Telmisartanın asetonitril ve metanol ortamlarında hazırlanan 10^{-6} M' lık çözeltisinin çoklu spektrum taramalarıyla belirlenen en uygun uyarma dalga boyunda emisyon spektrumu alınmış ve aynı dalga boyunda alınan çözücüye ait emisyon spektrumu ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 7.7. Telmisartanın asetonitrildeki emisyon spektrumu

Çizelge 7.7. Telmisartanın asetonitrildeki floresans şiddeti

λems : : 368,91 nm	Flor. Şid : 478,98	λekz: 279,16 nm



Şekil.7.8. Telmisartanın metanoldeki emisyon spektrumu

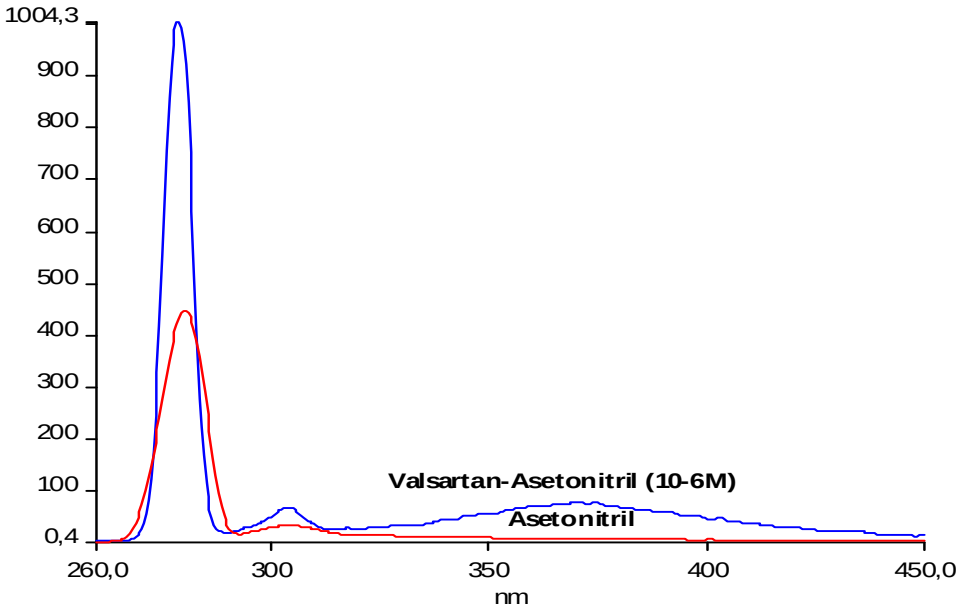
Çizelge 7.8. Telmisartanın metanoldeki floresans şiddeti

λems : 304,87 nm	Flor. Şid : 118,09	λekz: 279,16 nm

Telmisartanın hem asetonitril hem de metanol ortamlarındaki spektrumları incelendiğinde, maddenin asetonitril ortamındaki çözeltisinin çözücüden çok daha yüksek floresans şiddetine sahip olduğu, ancak metanol ortamında çözeltinin çözücününkine yakın bir floresans şiddeti gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum da, telmisartanın asetonitril ortamında polaritesinin maddenin polaritesine yakın olması sebebiyle oldukça iyi çözündüğü ve bu ortamın maddenin floresans şiddetini arttırdığı şeklinde yorumlanabilir. Metanol ise, telmisartan ile yapılacak florimetrik çalışmalar için de kullanıma uygun bir çözücü değildir.

7.1.5. Valsartanın asetonitril ve metanoldeki emisyon spektrumları

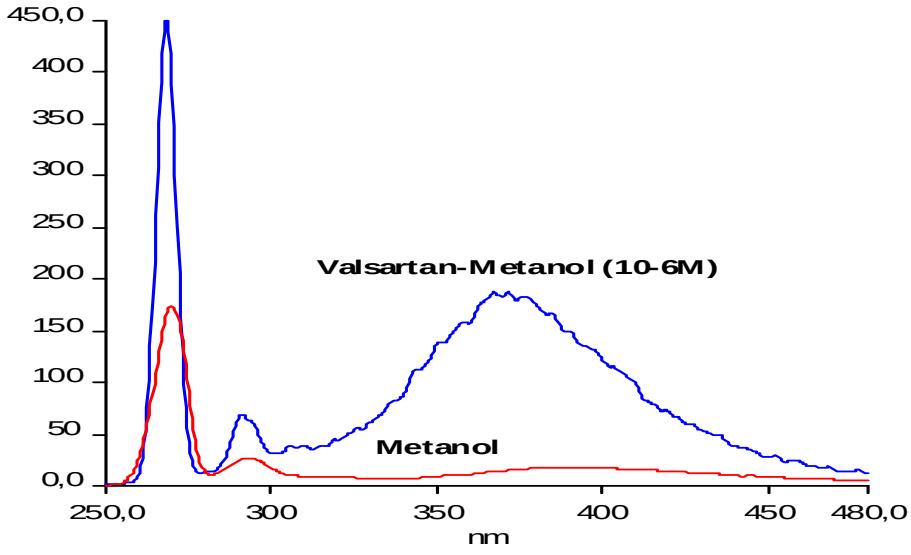
Valsartanın asetonitril ve metanol ortamlarında hazırlanan 10^{-6} M'lık çözeltisinin çoklu spektrum taramalarıyla belirlenen en uygun uyarma dalga boyunda emisyon spektrumu alınmış ve aynı dalga boyunda alınan çözücüye ait emisyon spektrumu ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 7.9. Valsartanın asetonitrildeki emisyon spektrumu

Çizelge 7.9. Valsartanın asetonitrildeki floresans şiddeti

λems : 370,93 nm	Flor. Şid : 80,58	λekz: 278,65 nm



Şekil.7.10. Valsartanın metanoldeki emisyon spektrumu

Tablo 7.10. Valsartanın metanoldeki floresans şiddeti

λems : 371,43 nm	Flor. Şid : 191,92	λekz: 268,06 nm

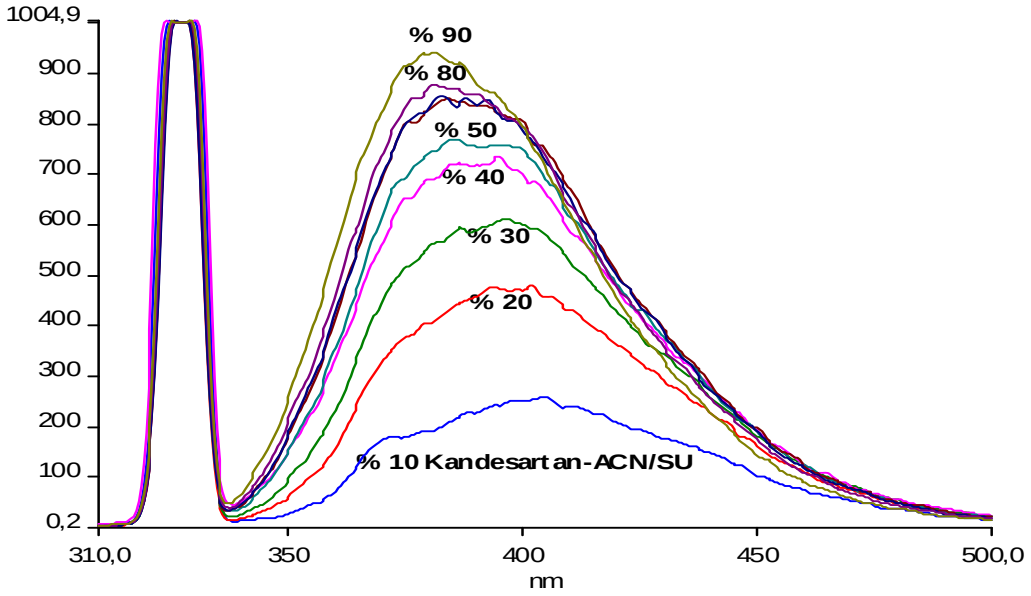
Valsartanın hem asetonitril hem de metanol ortamlarındaki spektrumları incelendiğinde, maddenin bu ortamlardaki çözeltisinin çözücülerden daha yüksek floresans şiddetine sahip olduğu, ancak metanol ortamında maddenin asetonitril ortamındakine göre daha yüksek floresans şiddeti gösterdiği belirlenmiştir. Bu durum, valsartanın her iki çözücü ortamında da polaritelerinin maddenin polaritesine yakın olması sebebiyle iyi çözündüğü ve bu ortamların maddenin floresans şiddetini arttırdığı şeklinde yorumlanabilir. Metanol, valsartan için florimetrik çalışmalarda tercih edilebilecek bir çözücüdür.

7.2. Floresans Şiddetine Çözücü Yüzdesinin Etkisinin İncelenmesi

Anjiyotensin reseptör antagonistlerinin (ARA II) floresans şiddetlerine çözücü yüzdelerinin etkisinin incelenmesi amacıyla, % 10-90 oranlarındaki asetonitril ve metanol içeren su karışımlı ortamlarda emisyon spektrumları alınmış ve en uygun çözücü yüzdesi ortamı belirlenmiştir.

7.2.1. Kandesartanın farklı çözücü yüzdelerinde alınan emisyon spektrumları

Kandesartanın, % 10-90 oranlarındaki asetonitril ve metanol içeren su karışımlı ortamlarda hazırlanan 10^{-6} M' lık çözeltisinin çoklu spektrum taramalarıyla belirlenen en uygun uyarma dalga boyunda emisyon spektrumu alınmış ve en uygun çözücü yüzdesi ortamı belirlenmiştir.

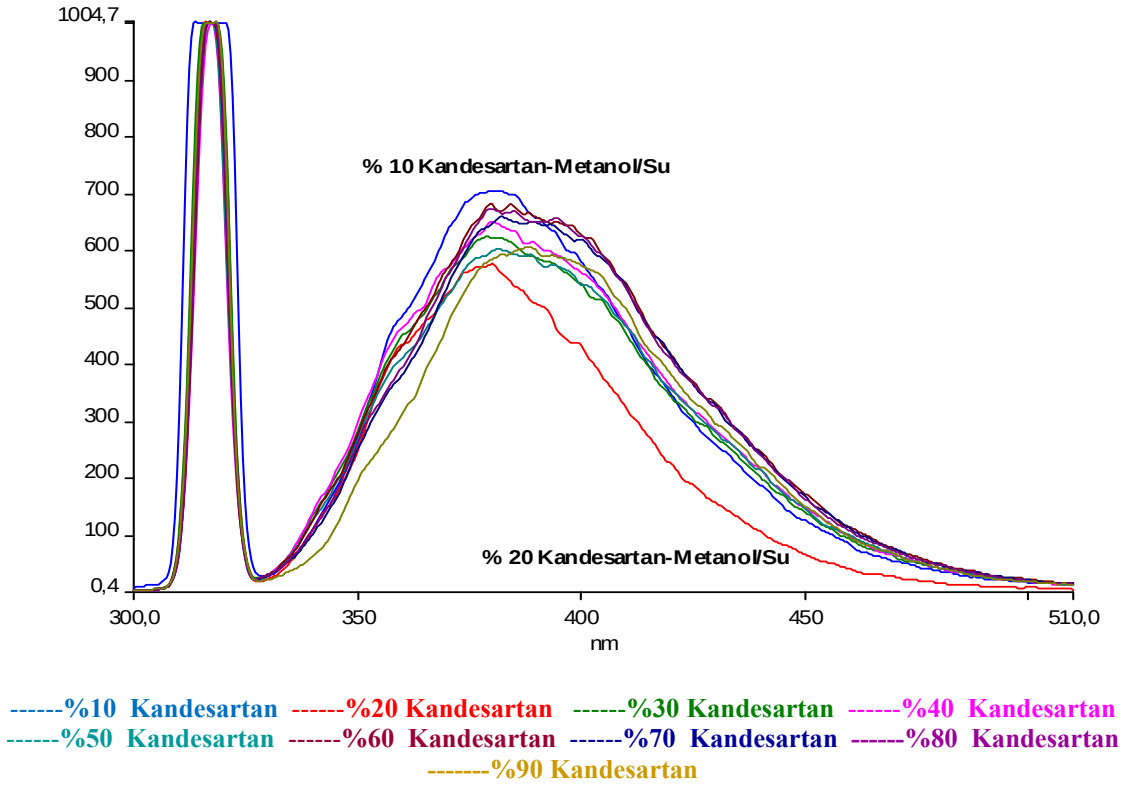


------%10 Kandesartan ------%20 Kandesartan ------%30 Kandesartan ------%40 Kandesartan
------%50 Kandesartan ------%60 Kandesartan ------%70 Kandesartan ------%80 Kandesartan
-------%90 Kandesartan

Şekil 7.11. Kandesartanın %10-90 ACN-su karışımlarındaki emisyon spektrumu

Çizelge 7.11. Kandesartanın Asetonitrildeki λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

%Kandesartan-ACN/SU	λ ekz	Λems	F.Şid.
%10	327,56	405,72	260,04
%20	327,56	402,19	488,38
%30	328,07	397,14	614,60
%40	327,56	395,13	741,16
%50	327,56	386,56	774,52
%60	327,56	385,04	858,38
%70	327,56	388,07	858,37
%80	328,07	380,52	878,63
%90	328,07	381,51	949,86



Şekil 7.12. Kandesartanın %10-90 Metanol-su karışımlarındaki emisyon spektrumu

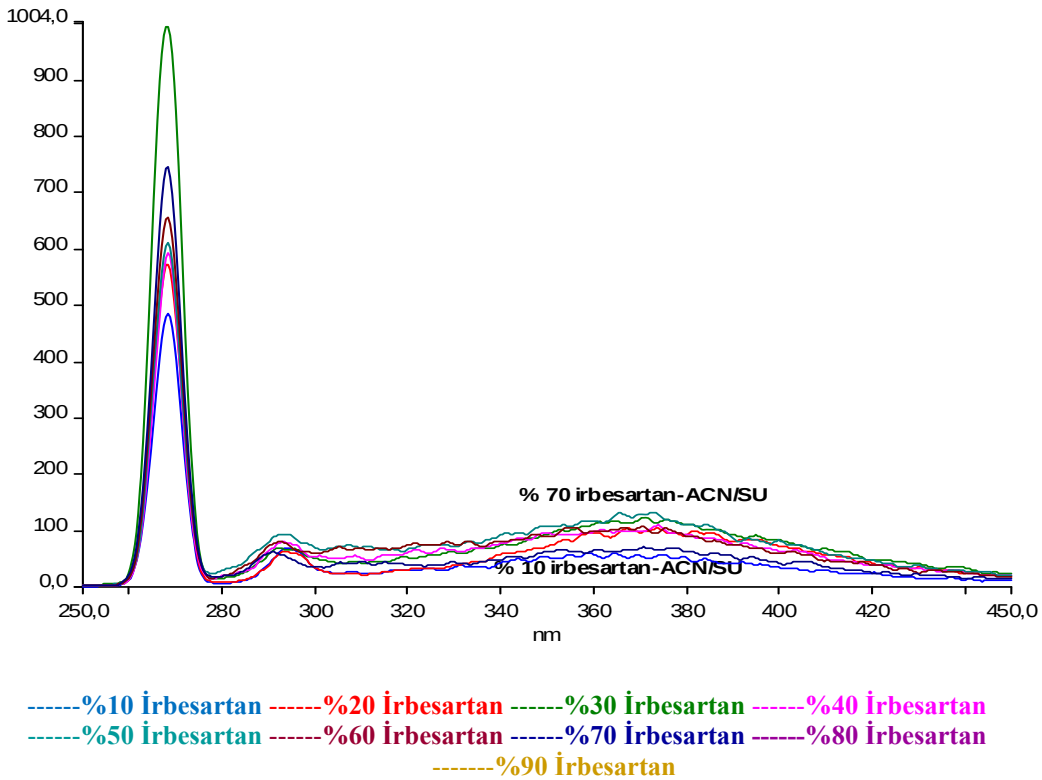
Çizelge 7.12. Kandesartanın Metanoldeki λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

%Kandesartan-Metanol/su	λekz	λems	F.Şid.
%10	317,48	381,51	707,90
%20	316,97	380,00	585,30
%30	316,97	377,98	630,21
%40	317,48	380,00	659,32
%50	316,97	381,01	607,27
%60	317,48	380,00	686,05
%70	317,48	382,02	661,92
%80	317,48	380,00	678,60
%90	317,48	388,07	611,29

Kandesartanın %10-90 su karışımlı organik çözücülerdeki (asetonitril ve metanol) emisyon spektrumları incelendiğinde, %90 asetonitril ve %10 metanol, ortamlarında en yüksek floresans şiddeti verdiği ve asetonitril ortamında organik çözücü yüzdesi arttıkça floresans şiddeti düşerken, metanol-su ortamlarında %20 ortamında düşmüş daha sonra %80 ortamına kadar artmış ve %90' da birden bir düşme gösterdiği gözlenmiştir. Bu durumda kandesartanın floresans özelliklerinin tayini için asetonitril ortamlarında çalışılmasının daha uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

7.2.2. İrbesartanın farklı çözücü yüzdelerinde alınan emisyon spektrumları

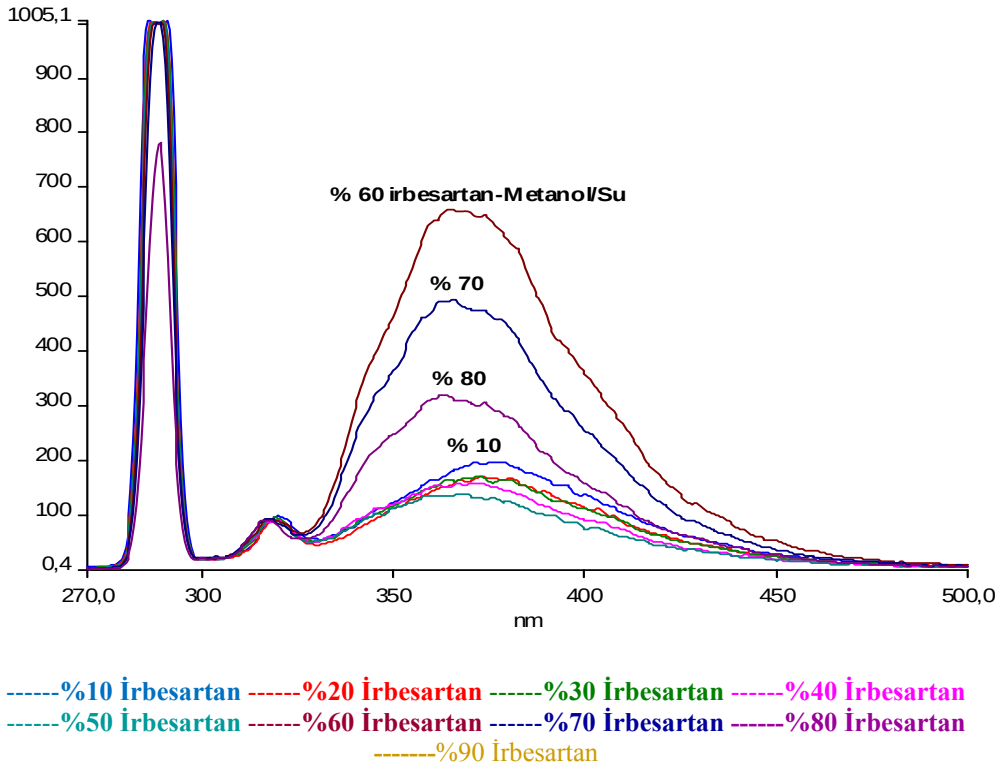
İrbesartanın, %10-90 oranlarındaki asetonitril ve metanol içeren su karışımlı ortamlarda hazırlanan 10^{-6} M' lık çözeltisinin çoklu spektrum taramalarıyla belirlenen en uygun uyarma dalga boyunda emisyon spektrumu alınmış ve en uygun çözücü yüzdesi ortamı belirlenmiştir.



Şekil 7.13. İrbesartanın %10-90 ACN-su karışımlarındaki emisyon spektrumu

Çizelge 7.13. İrbesartanın Asetonitrildeki λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

%İrbesartan-ACN/su	λekz	λems	F.Şid.
%10	268,57	358,59	62,88
%20	268,57	373,95	110,62
%30	268,57	370,42	166,40
%40	268,57	371,43	126,09
%50	268,57	374,45	111,92
%60	268,57	349,75	165,01
%70	268,57	372,94	138,70
%80	268,57	370,42	113,27
%90	268,57	370,42	72,06



Şekil 7.14. İrbesartanın %10-90 Metanol-su karışımlarındaki emisyon spektrumu

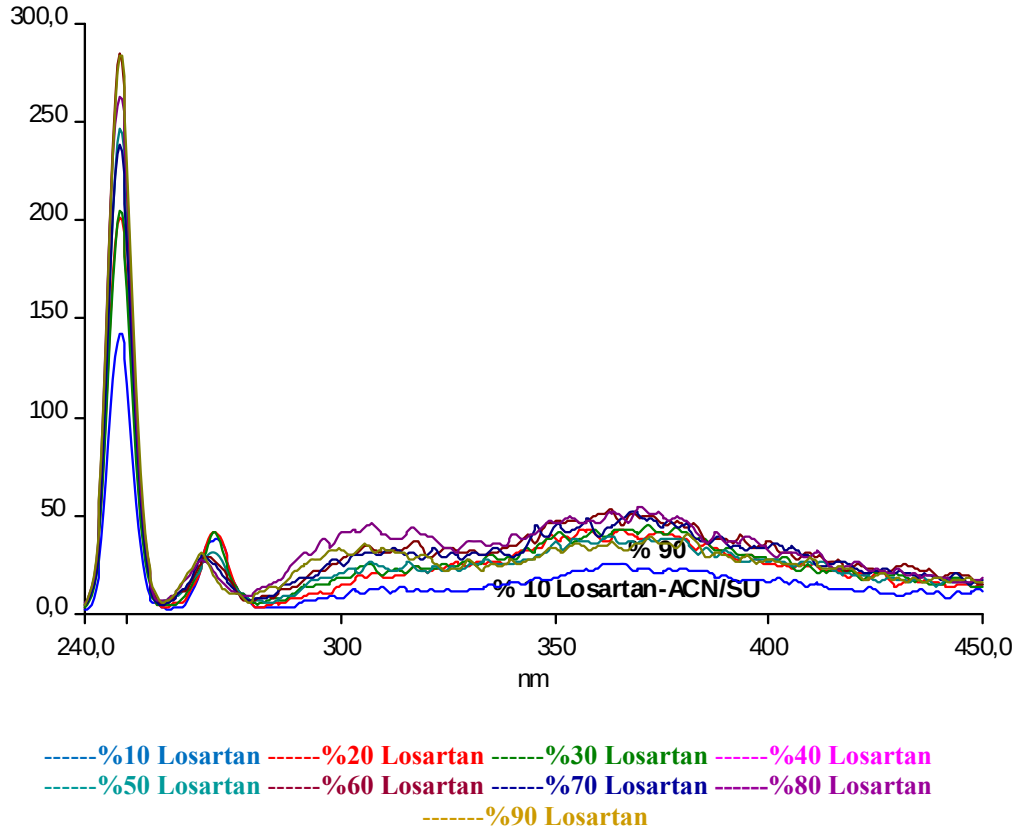
Çizelge 7.14. İrbesartanın Metanoldeki λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

%İrbesartan-ACN/su	λekz	λems	F.Şid.
%10	316,97	357,31	105,42
%20	316,97	355,80	99,64
%30	316,97	354,79	96,54
%40	317,48	354,79	91,33
%50	317,48	355,80	86,80
%60	316,97	357,31	292,00
%70	316,97	358,82	231,58
%80	317,48	356,30	255,44
%90	317,48	350,25	61,09

İrbesartanın %10-90 su karışımlı organik çözücülerdeki (asetonitril ve metanol) emisyon spektrumları incelendiğinde, %30, %60 asetonitril ve %60 metanol, ortamlarında en yüksek floresans şiddeti verdiği ve asetonitril ortamında %30 organik çözücü yüzdesine kadar floresans şiddetinin arttığı, daha sonra azalıp %70 ortamında tekrar maksimum olduğu ve sonra yine azaldığı belirlenmiştir. Metanol-su ortamlarında ise %60 ortamına kadar düzenli olarak arttığı, daha sonra metanol yüzdesi arttıkça düşme gösterdiği gözlenmiştir. Bu durumda irbesartanın floresans özelliklerinin tayini için %30 asetonitril ve %60 metanol ortamlarında çalışılmasının uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

7.2.3. Losartanın farklı çözücü yüzdelerinde alınan emisyon spektrumları

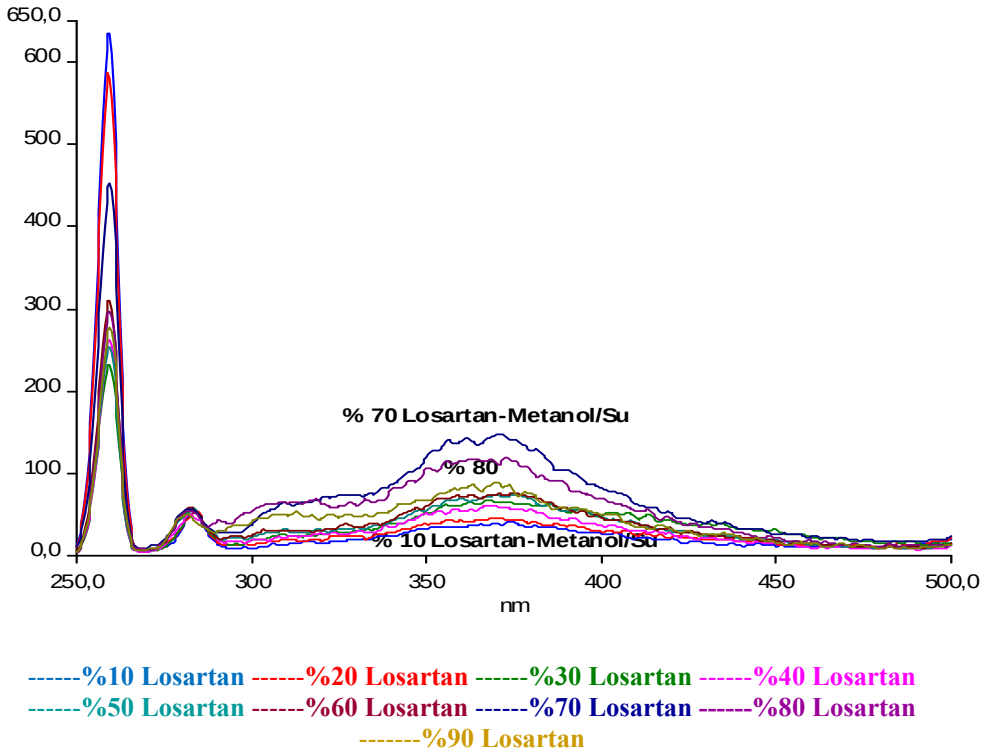
Losartanın, %10-90 oranlarındaki asetonitril ve metanol içeren su karışımlı ortamlarda hazırlanan 10^{-6} M' lık çözeltisinin çoklu spektrum taramalarıyla belirlenen en uygun uyarma dalga boyunda emisyon spektrumu alınmış ve en uygun çözücü yüzdesi ortamı belirlenmiştir.



Şekil 7.15. Losartanın %10-90 ACN-su karışımlarındaki emisyon spektrumu

Çizelge 7.15. Losartanın Asetonitrildeki λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

%Losartan-ACN/su	λekz	λems	F.Şid.
%10	259,49	366,89	25,29
%20	259,49	366,89	43,95
%30	259,49	369,41	46,04
%40	259,49	370,93	55,08
%50	259,49	359,83	37,48
%60	259,49	348,24	50,21
%70	259,49	373,95	51,79
%80	259,49	366,89	49,76
%90	259,49	370,42	37,09



Şekil 7.16. Losartanın %10-90 Metanol-su karışımlarındaki emisyon spektrumu

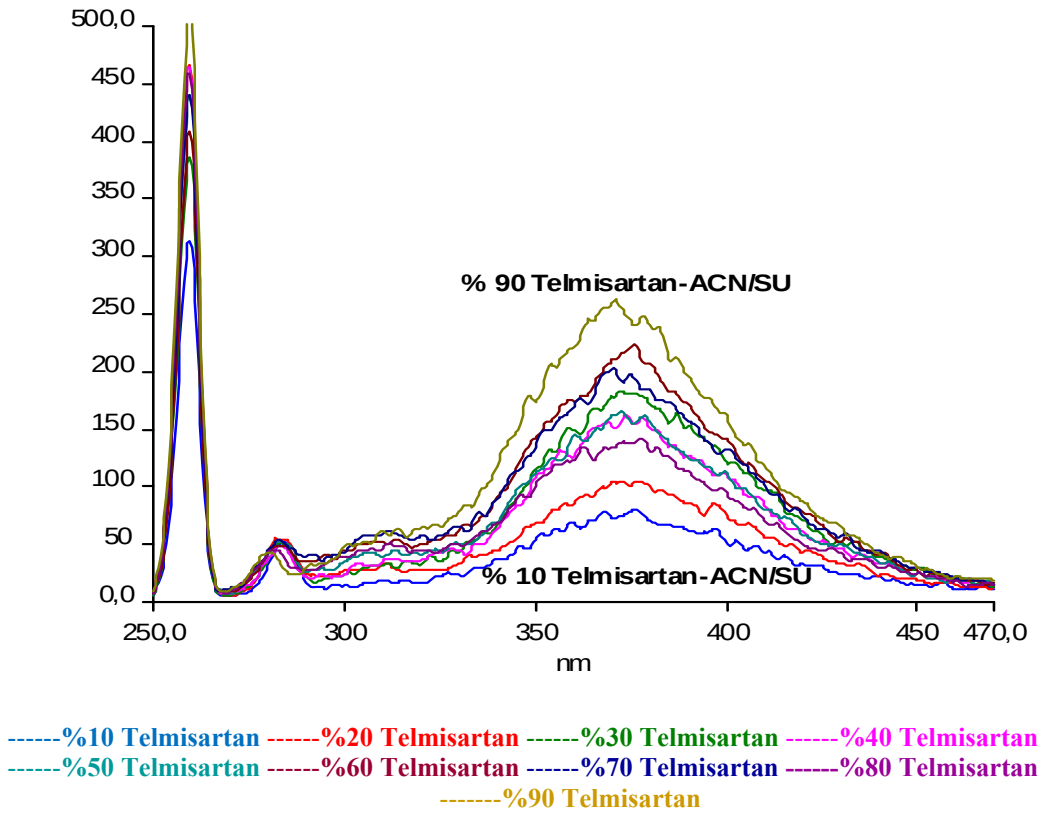
Çizelge 7.16. Losartanın Metanoldeki λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

%Losartan-Metanol/su	λekz	λems	F.Şid.
%10	258,99	373,95	44,41
%20	258,99	370,93	47,64
%30	258,99	367,40	68,72
%40	258,99	369,92	62,75
%50	258,99	369,41	76,27
%60	258,99	362,35	77,46
%70	258,99	369,41	148,19
%80	258,99	372,44	123,16
%90	258,99	369,92	92,85

Losartanın, %10-90 su karışımlı organik çözücülerdeki (asetonitril ve metanol) emisyon spektrumları incelendiğinde, %40 asetonitril ve %70 metanol, ortamlarında en yüksek floresans şiddeti verdiği ve su karışımlı %10-90 asetonitril ortamlarında alınan emisyon spektrumlarının çok uygun olmadığı, metanol-su ortamlarında ise %70 ortamına kadar çözücü yüzdesi arttıkça floresans şiddetinin de arttığı, daha sonra azaldığı gözlenmiştir. Bu durumda losartanın floresans özelliklerinin tayini için metanol ortamlarında çalışılmasının daha uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

7.2.4. Telmisartanın farklı çözücü yüzdelerinde alınan emisyon spektrumları

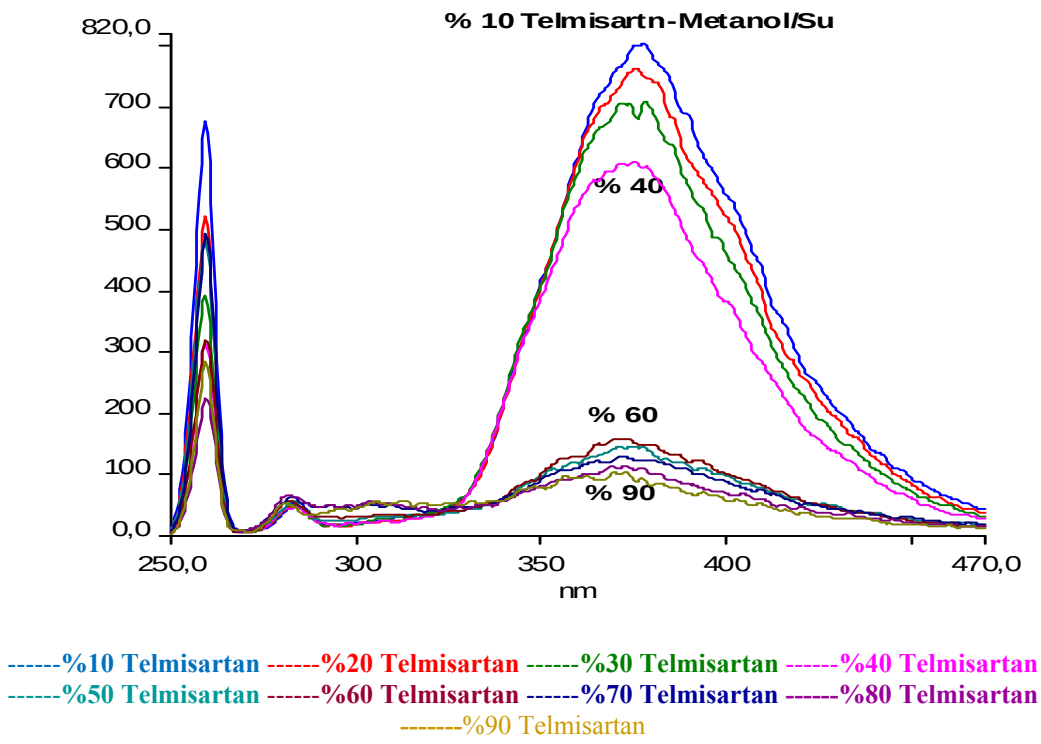
Telmisartanın, %10-90 oranlarındaki asetonitril ve metanol içeren su karışımlı ortamlarda hazırlanan 10^{-6} M' lık çözeltisinin çoklu spektrum taramalarıyla belirlenen en uygun uyarma dalga boyunda emisyon spektrumu alınmış ve en uygun çözücü yüzdesi ortamı belirlenmiştir.



Şekil 7.17. Telmisartanın %10-90 ACN-su karışımlarındaki emisyon spektrumu

Çizelge 7.17. Telmisartanın Asetonitrildeki λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

%Telmisartan-ACN/su	λekz	λems	F.Şid.
%10	259,49	367,40	81,03
%20	259,49	376,47	11,60
%30	259,49	372,44	190,29
%40	259,49	373,45	165,22
%50	259,49	373,45	168,20
%60	259,49	375,97	225,80
%70	259,49	370,42	205,54
%80	259,49	377,98	147,92
%90	259,49	370,42	263,62



Şekil 7.18. Telmisartanın %10-90 Metanol-su karışımlarındaki emisyon spektrumu

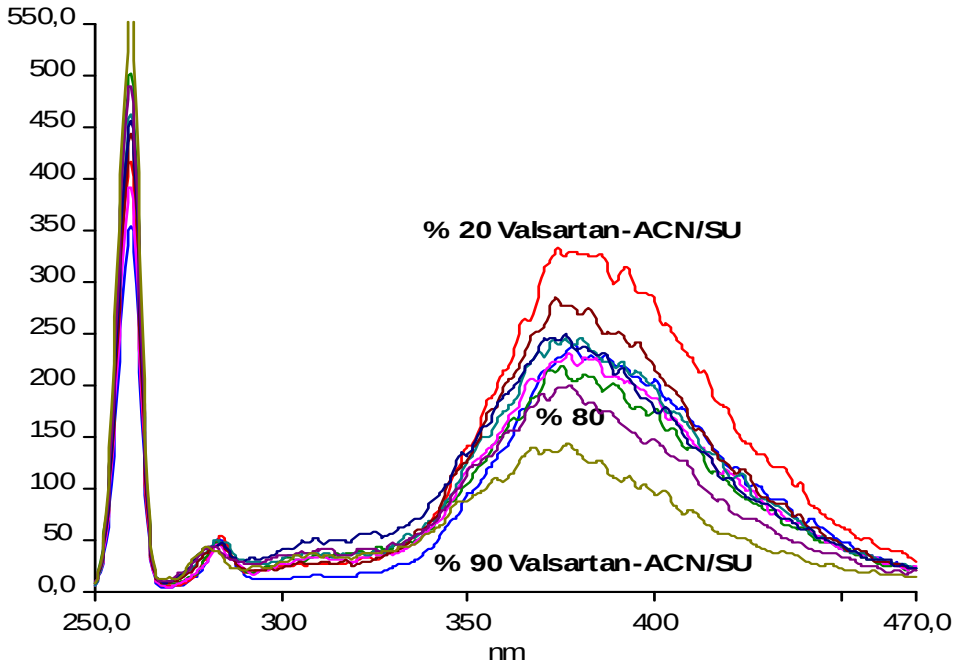
Çizelge 7.18. Telmisartanın Metanoldeki λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

%Telmisartan-Metanol/su	λekz	λems	F.Şid.
%10	258,99	377,98	806,15
%20	258,99	375,97	766,76
%30	258,99	377,48	715,62
%40	258,99	375,46	620,33
%50	258,99	370,93	150,08
%60	259,49	372,44	161,19
%70	259,49	372,44	133,52
%80	259,49	372,94	119,11
%90	259,49	372,94	108,46

Telmisartanın, %10-90 su karışımlı organik çözücülerdeki (asetonitril ve metanol) emisyon spektrumları incelendiğinde, %90 asetonitril ve %10 metanol, ortamlarında en yüksek floresans şiddeti verdiği ve su karışımlı metanol ortamlarında organik çözücü yüzdesi arttıkça floresans şiddeti düşerken, asetonitril-su ortamlarında %60 ortamına kadar arttığı, daha sonra %80 metanol ortamına kadar azaldığı ve %90da birden bir düşme gösterdiği gözlenmiştir. Bu durumda telmisartanın floresans özelliklerinin tayini için metanol ortamlarında çalışılmasının daha uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

7.2.5. Valsartanın farklı çözücü yüzdelerinde alınan emisyon spektrumları

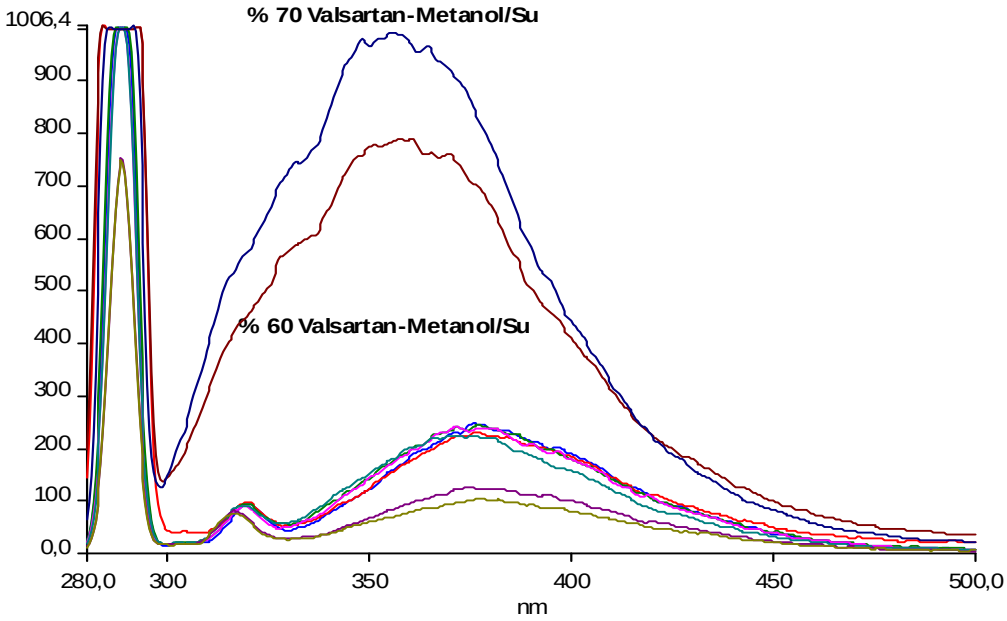
Valsartanın, %10-90 oranlarındaki asetonitril ve metanol içeren su karışımlı ortamlarda hazırlanan 10^{-6} M' lık çözeltisinin çoklu spektrum taramalarıyla belirlenen en uygun uyarma dalga boyunda emisyon spektrumu alınmış ve en uygun çözücü yüzdesi ortamı belirlenmiştir.



Şekil 7.19. Valsartanın %10-90 ACN-su karışımlarındaki emisyon spektrumu

Çizelge 7.19. Valsartanın Asetonitrildeki λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

%Valsartan-ACN/su	λekz	λems	F.Şid.
%10	259,49	378,99	242,47
%20	259,49	373,95	338,49
%30	259,49	374,96	224,37
%40	259,49	376,47	236,12
%50	259,49	372,44	251,37
%60	259,49	372,94	292,79
%70	259,49	376,47	253,02
%80	259,49	373,95	201,42
%90	259,49	376,47	147,29



Şekil 7.20. Valsartanın %10-90 Metanol-su karışımlarındaki emisyon spektrumu

Çizelge 7.20. Valsartanın Metanoldeki λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

%Valsartan-Metanol/su	λekz	λems	F.Şid.
%10	288,23	374,96	251,32
%20	288,23	376,47	233,77
%30	288,23	371,93	248,14
%40	288,23	370,42	242,41
%50	288,23	369,41	227,41
%60	288,23	360,84	796,62
%70	288,23	355,29	993,74
%80	288,23	374,96	127,57
%90	288,23	377,48	106,88

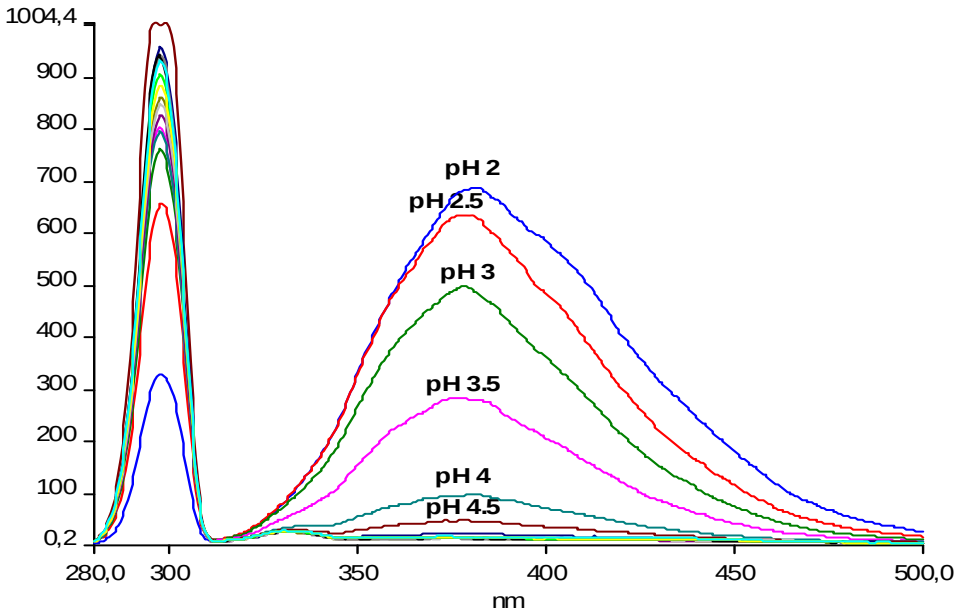
Valsartanın %10-90 su karışımlı organik çözücülerdeki (asetonitril ve metanol) emisyon spektrumları incelendiğinde, %20, %60 asetonitril ve %70 metanol, ortamlarında en yüksek floresans şiddeti verdiği ve asetonitril-su ortamlarında %90 organik çözücü yüzdesinde floresans şiddeti en düşük iken, %20 ortamında en yüksek olduğu belirlenmiştir. Metanol-su ortamlarında ise %10-50 ortamlarında birbirine çok yakın floresans şiddeti gözlenirken, %60 ve %70 ortamlarında en yüksek floresans şiddeti kaydedilmiştir. Bu durumda valsartanın floresans özelliklerinin tayini için %20 asetonitril ve %70 metanol ortamlarında çalışılmasının uygun olacağı sonucuna varılmıştır.

7.3. Anjiyotensin Reseptör Antagonistlerinin İyonlaşma Sabitlerinin Tayini

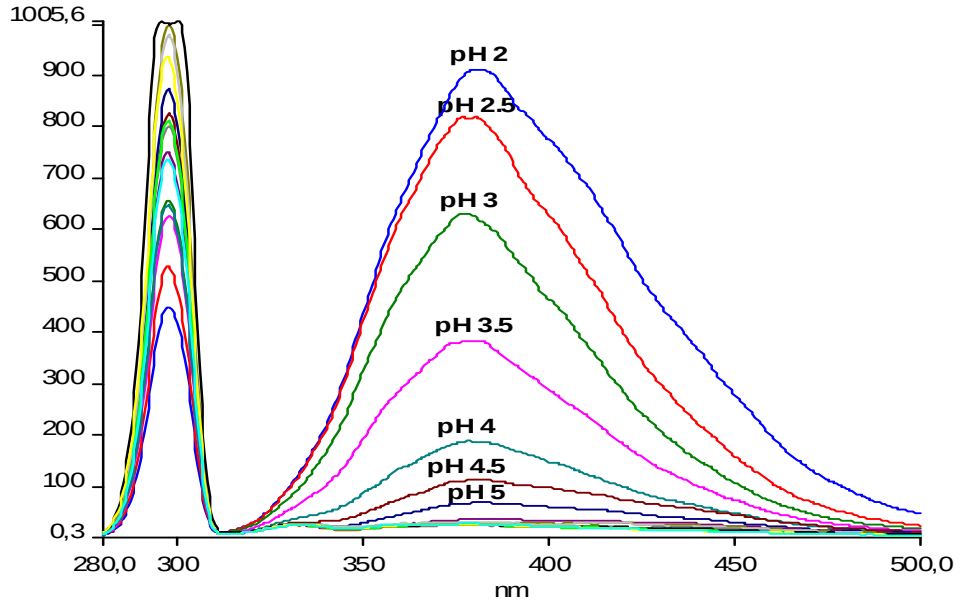
7.3.1. Spektroflorimetrik yöntemle iyonlaşma sabitlerinin tayini

Anjiyotensin reseptör antagonistleri (ARA II) %10-40 asetonitril sulu karışımlarında, pH 2-10 arasında floresans şiddetleri ölçülerek pH-floresans şiddeti grafikleri çizilmiş ve bu grafiklerden her birinin pKa değerleri, sigmoidal grafiklerin yarı nötralizasyon noktasına karşılık gelen pH değerlerinden belirlenmiştir.

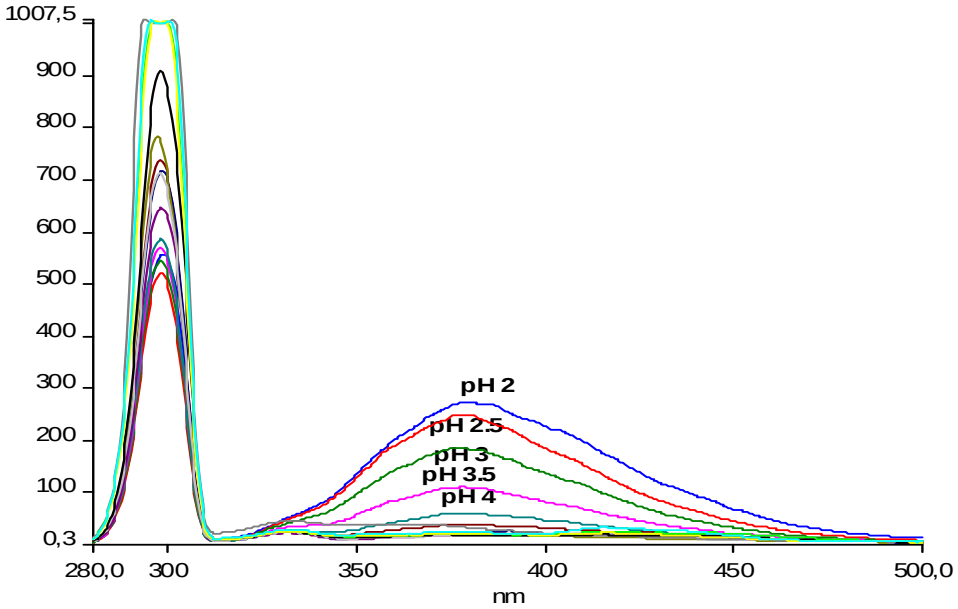
7.3.1.1. Losartanın % 10-40 ACN-Su ortamlarında farklı pH'lardaki emisyon spektrumları



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

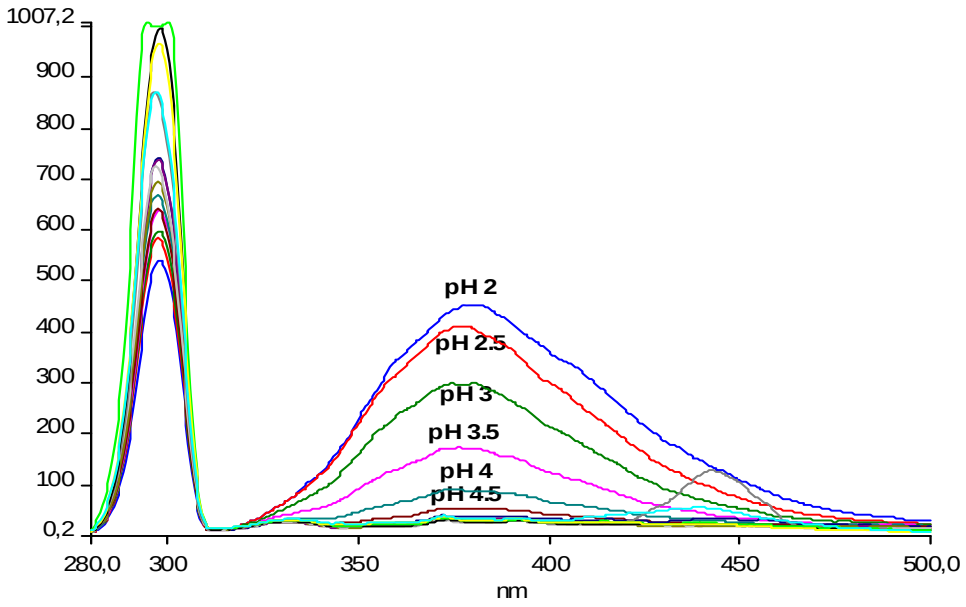


Şekil 7.22. Losartanın % 20 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları



----- pH 2 ----- pH 2.5 ----- pH 3 ----- pH 3.5 ----- pH 4 ----- pH 4.5 ----- pH 5 ----- pH 5.5 ----- pH 6
----- pH 6.5 ----- pH 7 ----- pH 7.5 ----- pH 8 ----- pH 8.5 ----- pH 9 ----- pH 9.5 ----- pH 10

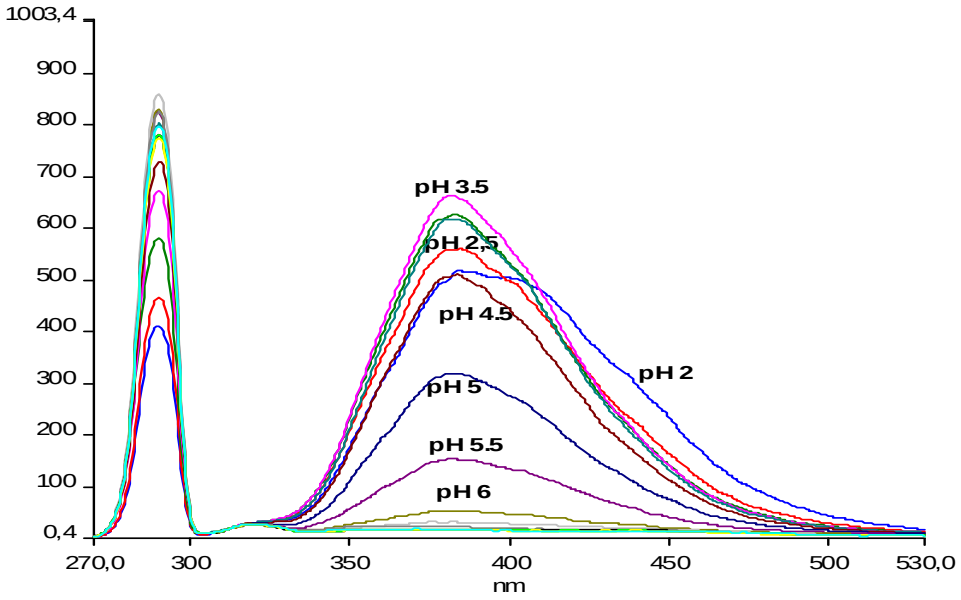
Şekil 7.23. Losartanın % 30 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları



----- pH 2 ----- pH 2.5 ----- pH 3 ----- pH 3.5 ----- pH 4 ----- pH 4.5 ----- pH 5 ----- pH 5.5 ----- pH 6
----- pH 6.5 ----- pH 7 ----- pH 7.5 ----- pH 8 ----- pH 8.5 ----- pH 9 ----- pH 9.5 ----- pH 10

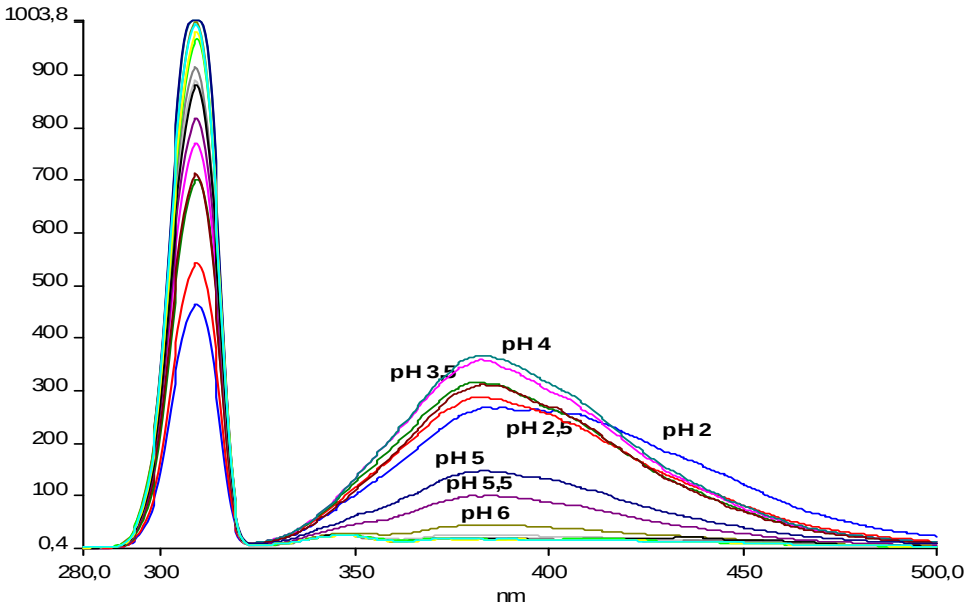
Şekil 7.24. Losartanın % 40 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları

7.3.1.2. Valsartanın % 10-40 ACN-Su ortamlarında farklı pH'lardaki emisyon spektrumları



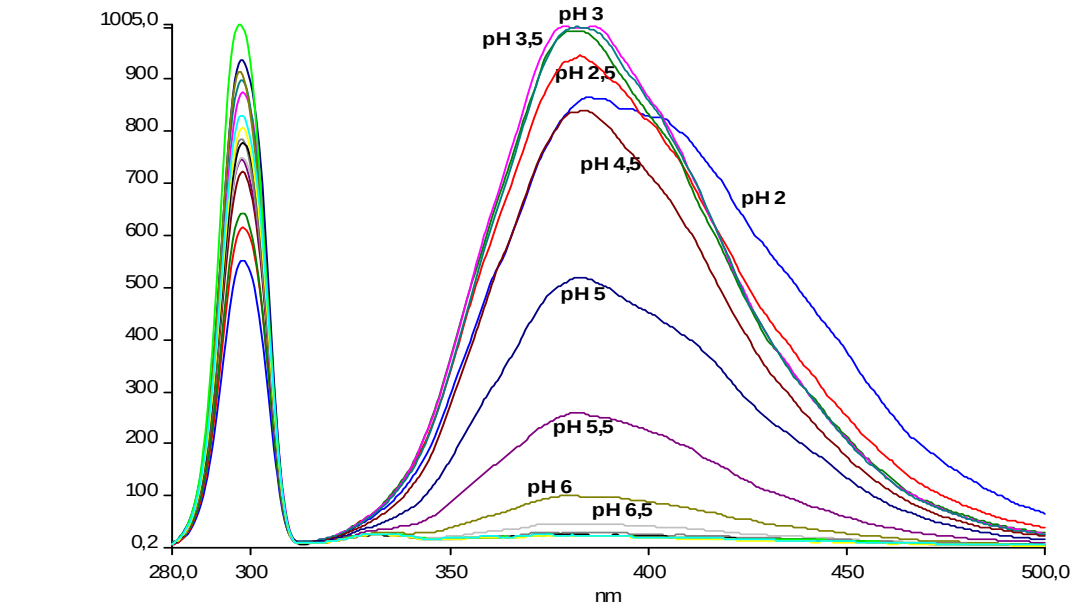
----- pH 2 ----- pH 2.5 ----- pH 3 ----- pH 3.5 ----- pH 4 ----- pH 4.5 ----- pH 5 ----- pH 5.5 ----- pH 6
----- pH 6.5 ----- pH 7 ----- pH 7.5 ----- pH 8 ----- pH 8.5 ----- pH 9 ----- pH 9.5 ----- pH 10

Şekil 7.25. Valsartanın % 10 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları

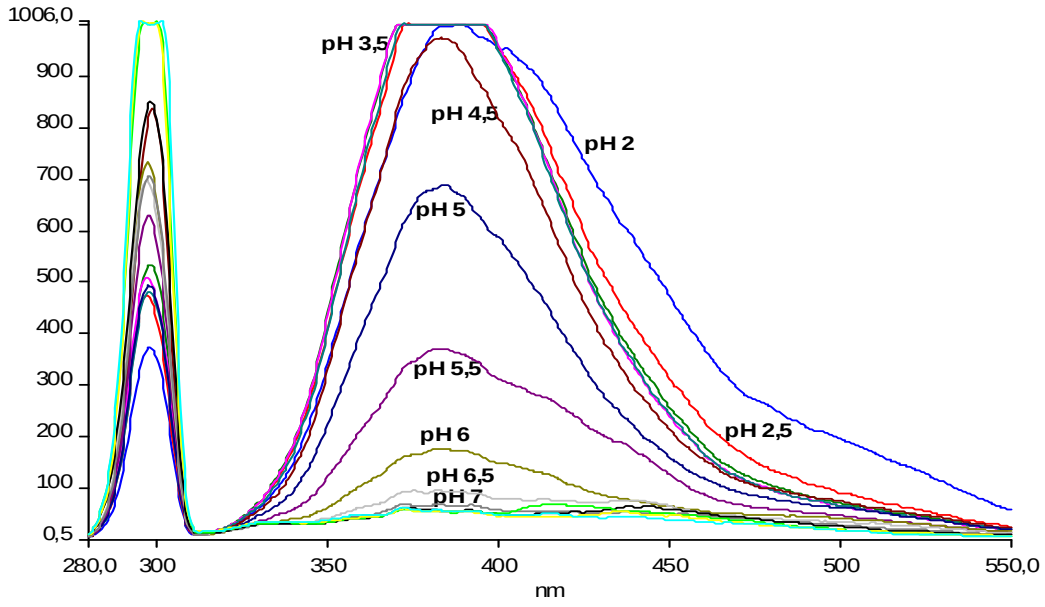


----- pH 2 ----- pH 2.5 ----- pH 3 ----- pH 3.5 ----- pH 4 ----- pH 4.5 ----- pH 5 ----- pH 5.5 ----- pH 6
----- pH 6.5 ----- pH 7 ----- pH 7.5 ----- pH 8 ----- pH 8.5 ----- pH 9 ----- pH 9.5 ----- pH 10

Şekil 7.26. Valsartanın % 20 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları



Şekil 7.27. Valsartanın % 30 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları

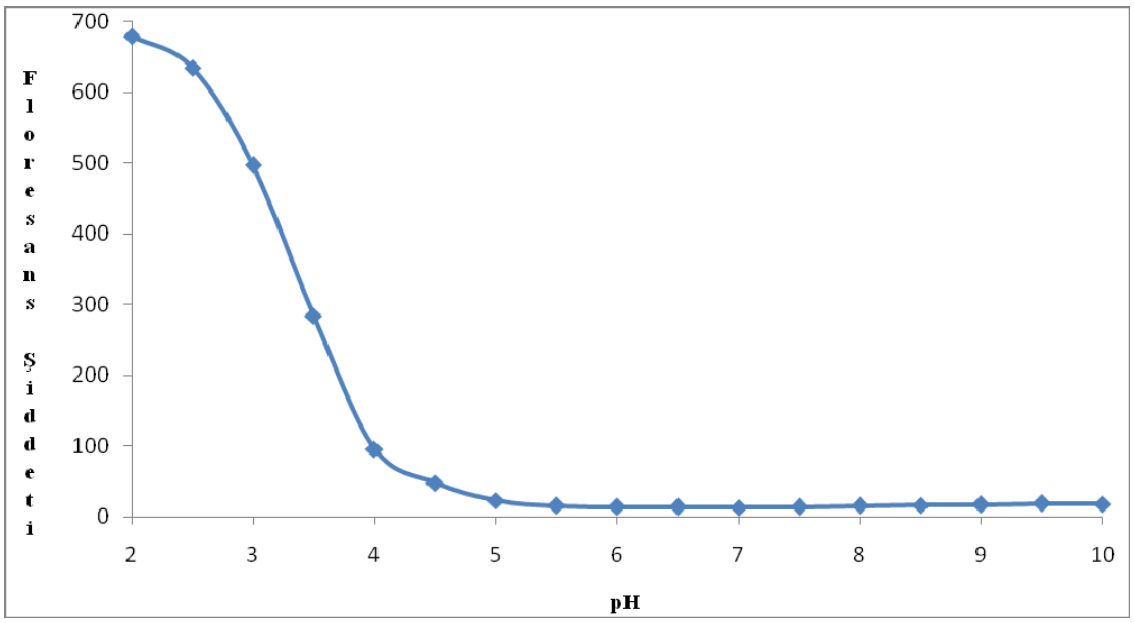


Şekil 7.28. Valsartanın % 40 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları

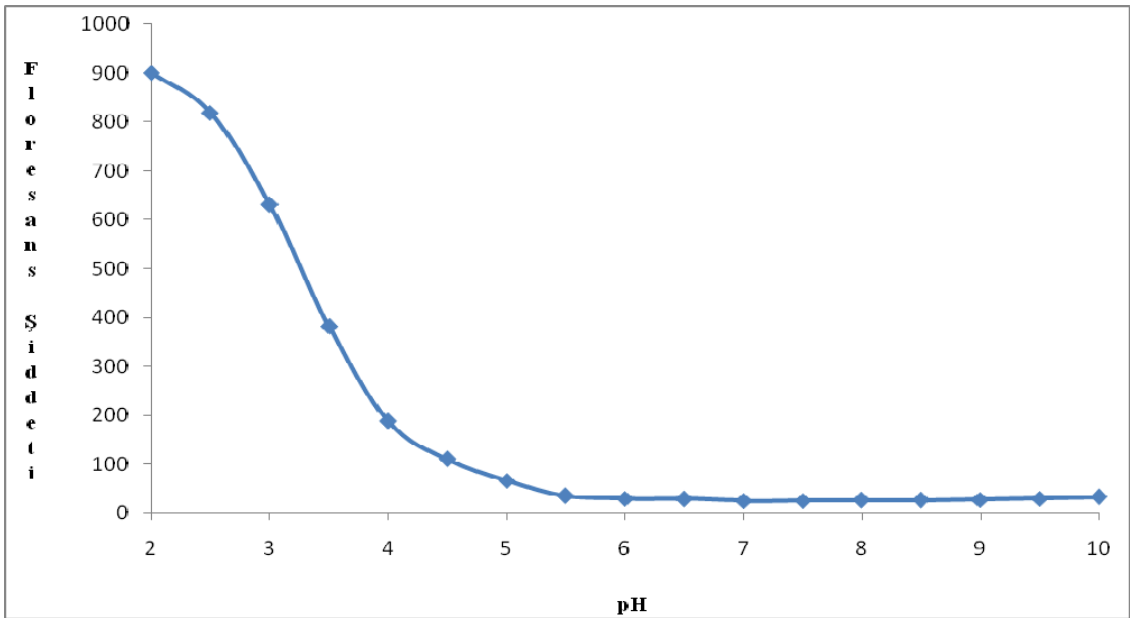
7.3.2. ARA II bileşiklerinin pH-floresans şiddeti titrasyon grafikleri

ARA II bileşiklerinin %10-40 asetonitril ortamlarında hazırlanan 10^{-5} M'lık çözeltileri, 25˚C sabit sıcaklıkta, iyonik şiddeti sabit tutmak için ilave edilen 0,1 M KCl yanında, ayarlı 0,1 M'lık KOH çözeltisiyle titre edilmiştir. pH: 2-10 değerleri arasında, her bir pH değerinde çözeltilerin belirlenen uyarma dalga boyunda emisyon spektrumları alınmış ve pH-floresans şiddeti titrasyon grafikleri çizilmiştir. Bu grafiklerden yarı nötralizasyon noktasındaki pH değerlerinden iyonlaşma sabitleri belirlenmiştir. ARA II bileşikleri teorik olarak iki iyonlaşma sabitine sahip olmasına rağmen, florimetrik yöntemle sadece bir iyonlaşma sabiti belirlenebilmiştir. Deneylerde kullanılan maddeler 10^{-6}M' dır.

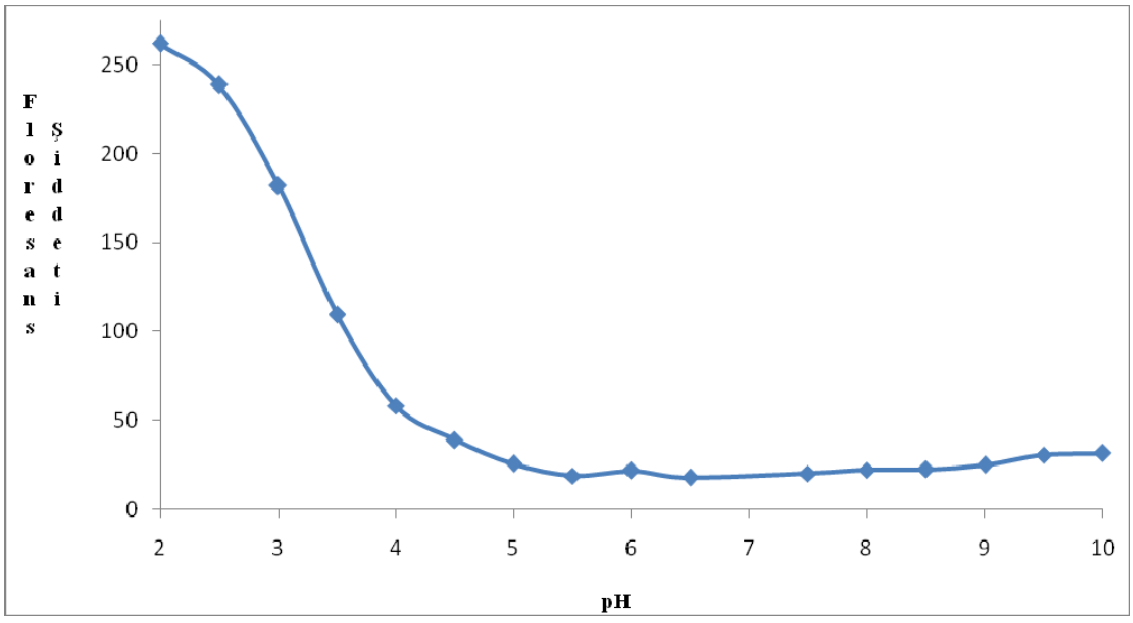
7.3.2.1. Losartanın %10-40 ACN/Su ortamlarındaki pH-floresans şiddeti titrasyon grafikleri



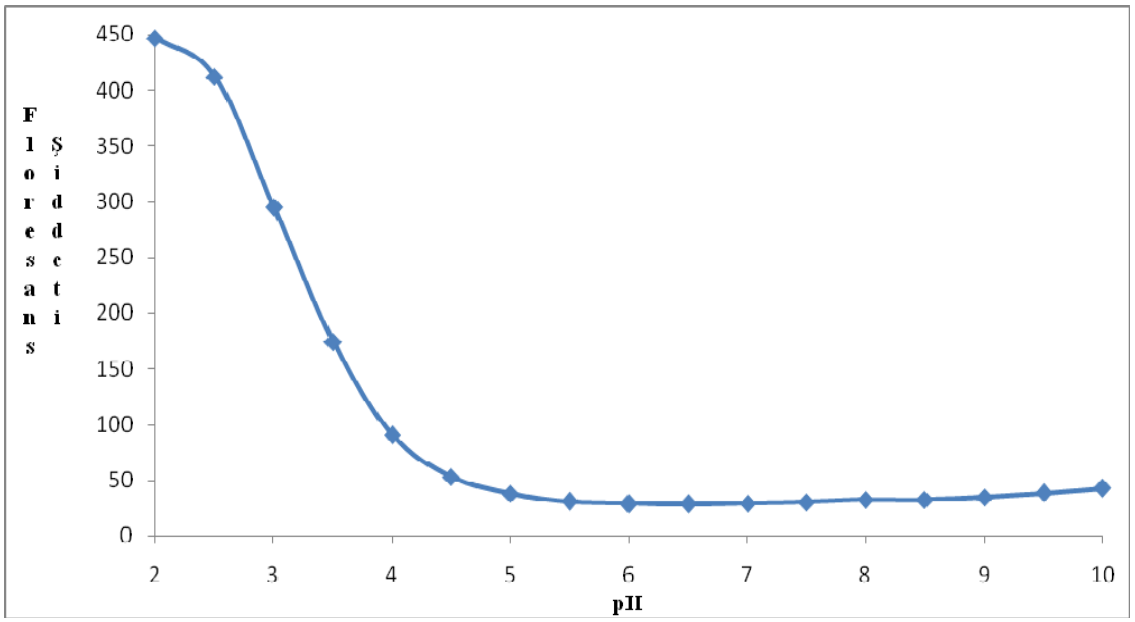
Şekil 7.29. Losartanın %10 ACN-su ortamındaki pH-floresans şiddeti titrasyon grafiği



Şekil 7.30. Losartanın %20 ACN-su ortamındaki pH-floresans şiddeti titrasyon grafiği

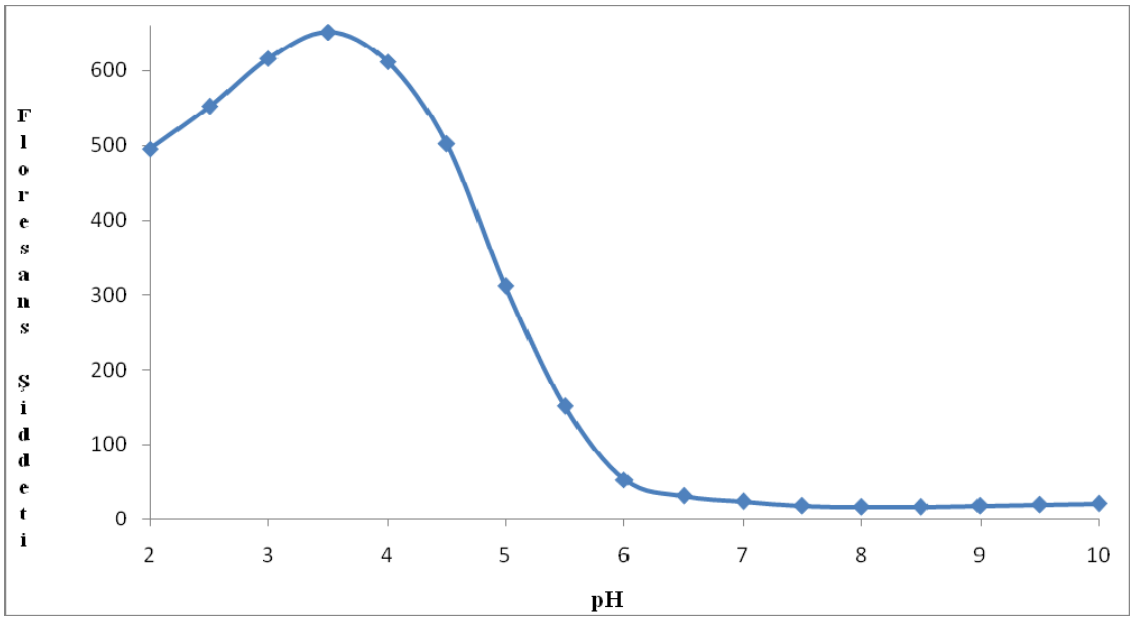


Şekil 7.31. Losartanın %30 ACN-su ortamındaki pH-floresans şiddeti titrasyon grafiği

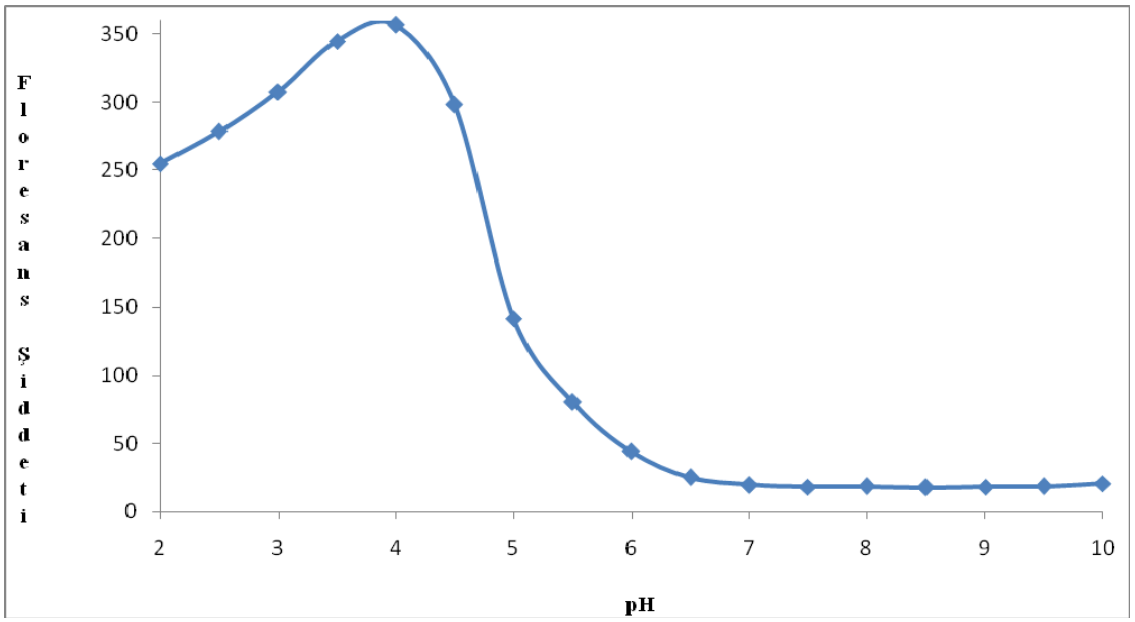


Şekil 7.32. Losartanın %40 ACN-su ortamındaki pH-floresans şiddeti titrasyon grafiği

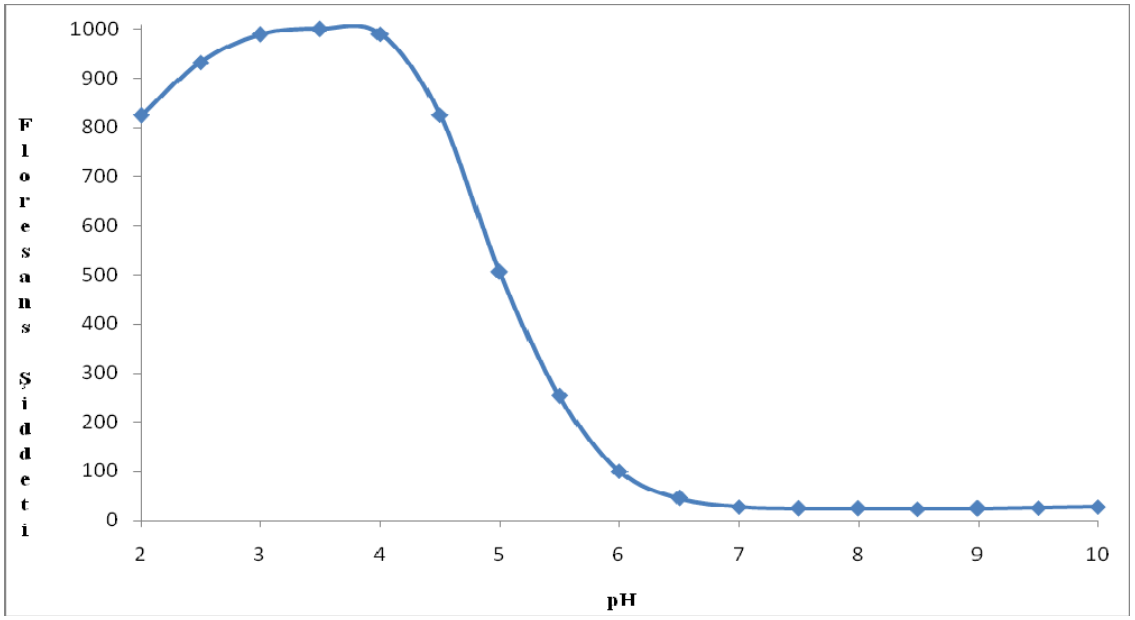
7.3.2.2. Valsartanın %10-40 ACN/Su ortamlarındaki pH-floresans şiddeti titrasyon grafikleri



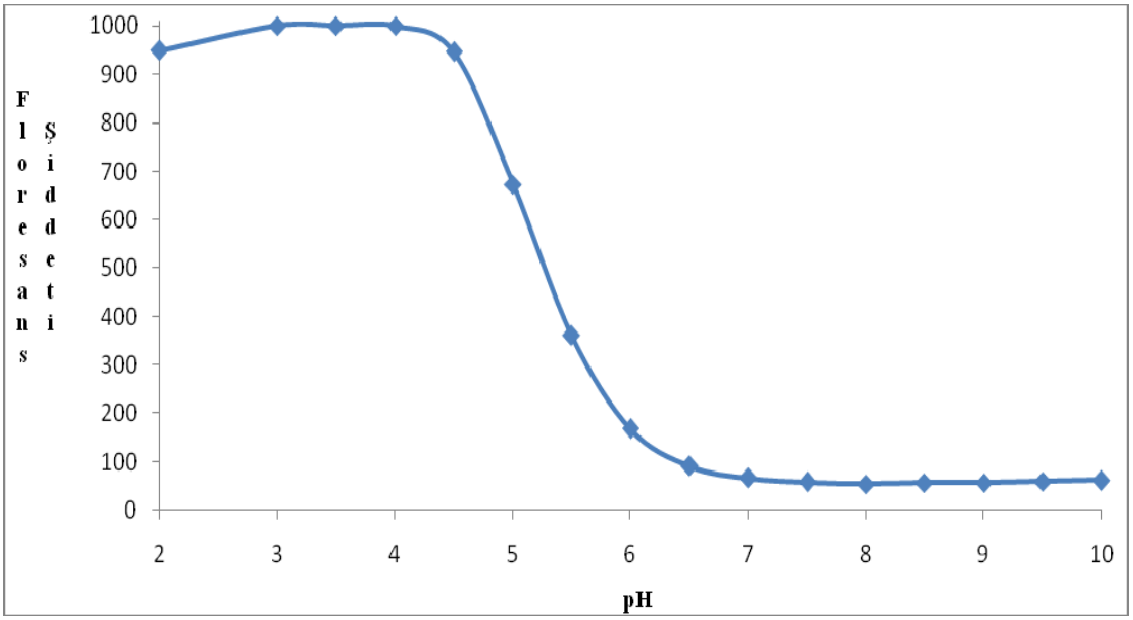
Şekil 7.33. Valsartanın %10 ACN-su ortamındaki pH-floresans şiddeti titrasyon grafiği



Şekil 7.34. Valsartanın %20 ACN-su ortamındaki pH-floresans şiddeti titrasyon grafiği



Şekil 7.35. Valsartanın %30 ACN-su ortamındaki pH-floresans şiddeti titrasyon grafiği

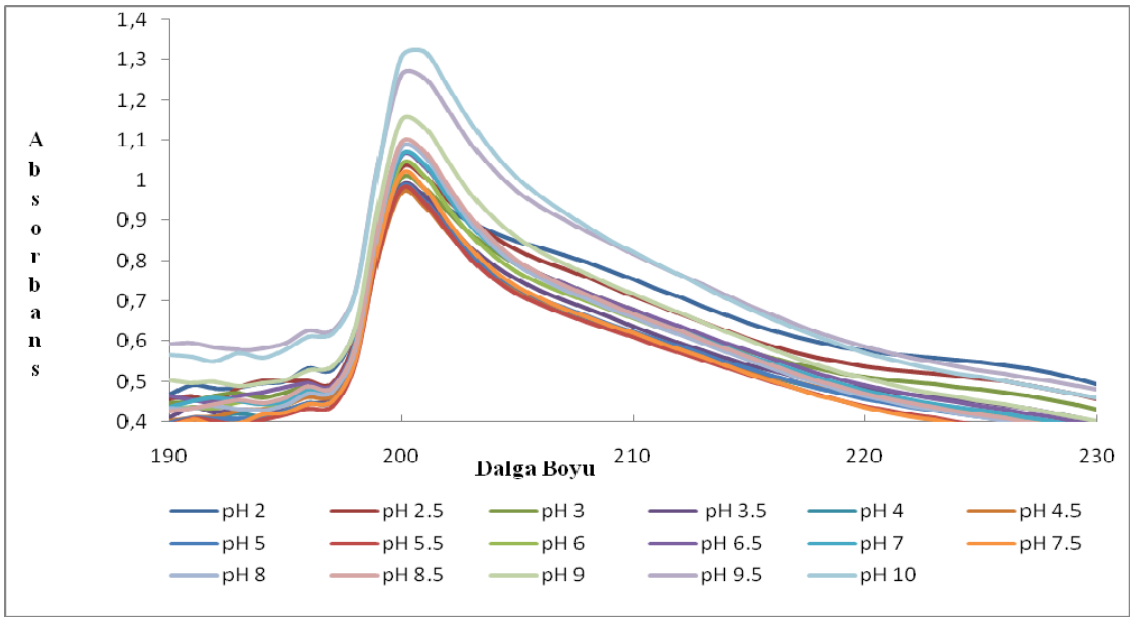


Şekil 7.36. Valsartanın %40 ACN-su ortamındaki pH-floresans şiddeti titrasyon grafiği

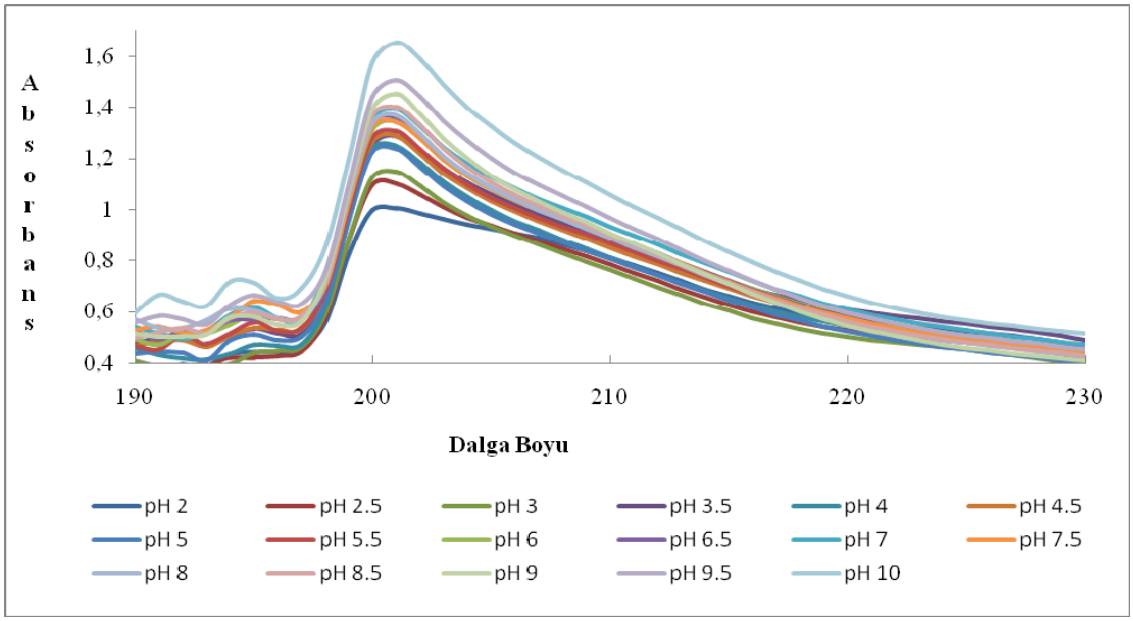
7.3.3. Spektrofotometrik yöntemle iyonlaşma sabitlerinin tayini

ARA II bileşiklerinin %10-40 asetonitril ortamlarında hazırlanan 10^{-5} M'lık çözeltileri, 25˚C sabit sıcaklıkta, iyonik şiddeti sabit tutmak için ilave edilen 0,1 M KCl yanında, ayarlı 0,1 M'lık KOH çözeltisiyle titre edilmiştir. pH: 2-10 değerleri arasında, her bir pH değerinde çözeltilerin, emisyon spektrumlarıyla eş-zamanlı olarak spektrofotometrede de absorpsiyon spektrumları alınmıştır. Bu spektrumlardan elde edilen dalgaboyu-absorbans verilerinden, deneysel olarak spektrofotometrik iyonlaşma sabitlerini hesaplayan STAR programı kullanılarak ARA II bileşiklerinin pKa değerleri belirlenmiştir. Bu program ARA II bileşiklerinin her iki iyonlaşma sabiti değerini de hesaplamıştır.

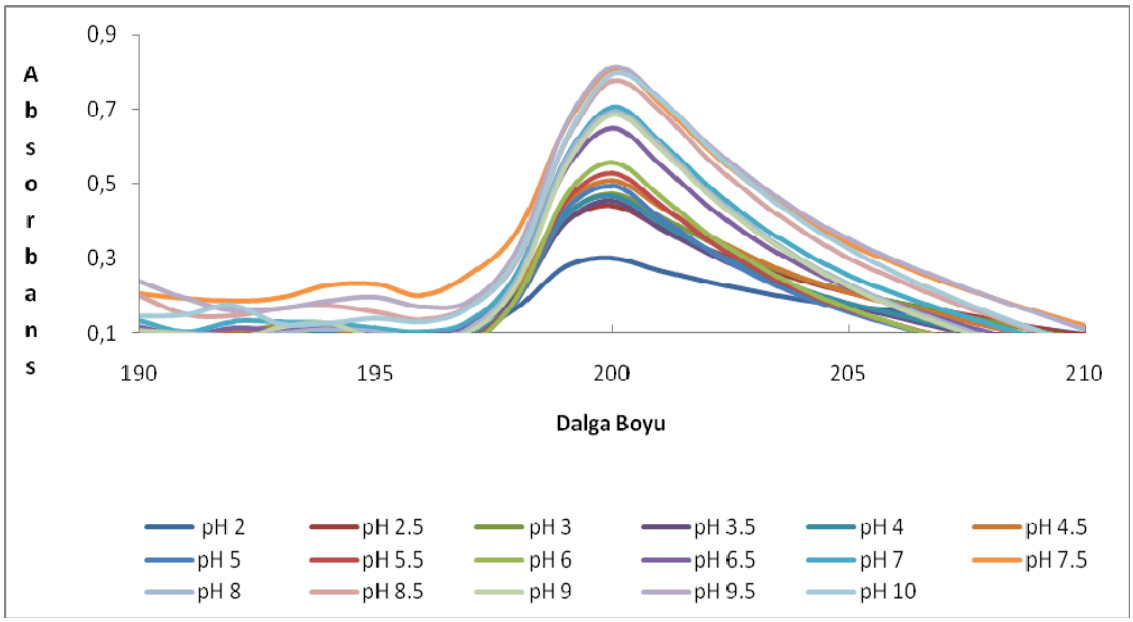
7.3.3.1. Losartanın % 10-40 ACN-Su ortamlarında farklı pH'lardaki absorpsiyon spektrumları



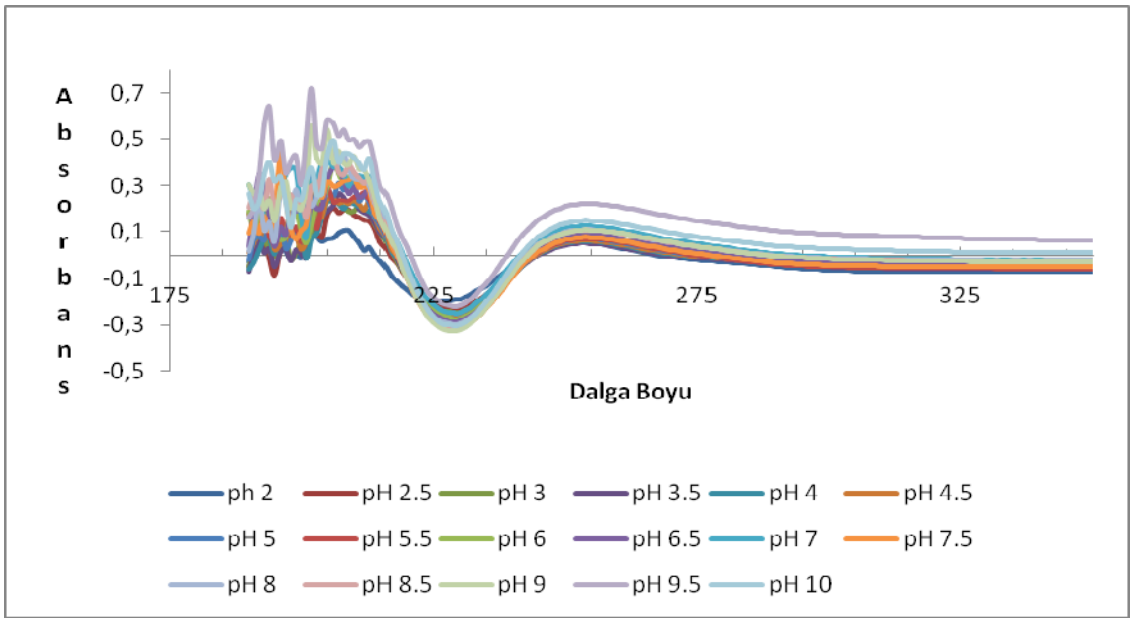
Şekil 7.37. Losartanın %10 ACN-Su ortamında farklı pH'lardaki absorpsiyon spektrumları



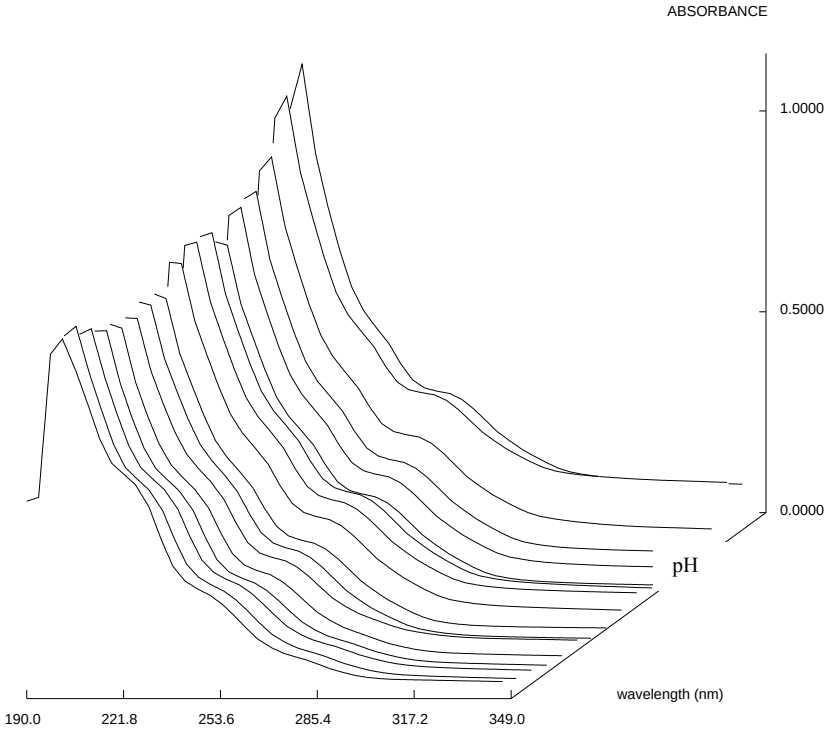
Şekil 7.38. Losartanın %20 ACN-Su ortamında farklı pH'lardaki absorpsiyon spektrumları



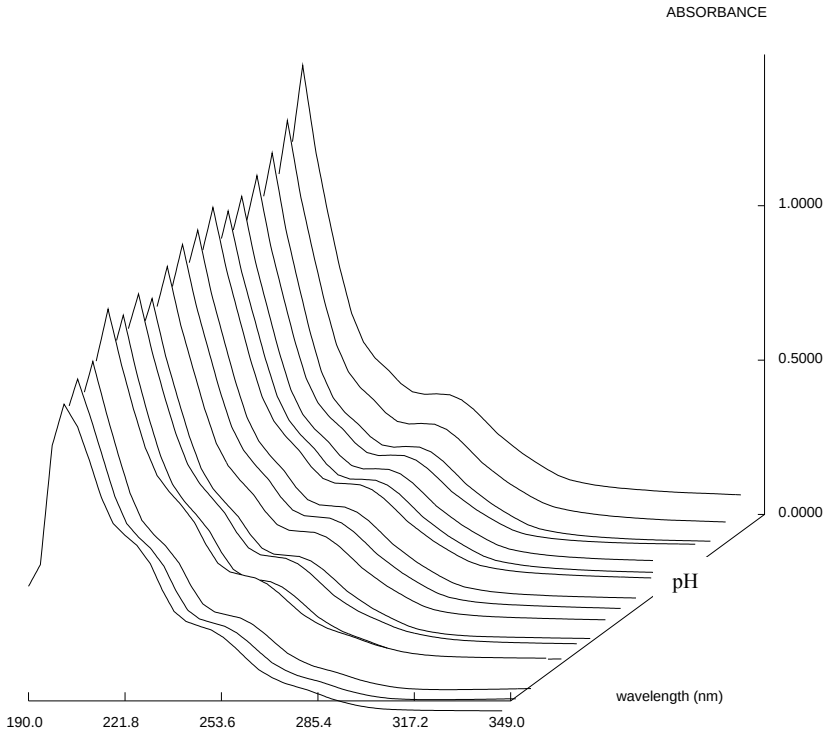
Şekil 7.39. Losartanın %30 ACN-Su ortamında farklı pH'lardaki absorpsiyon spektrumları



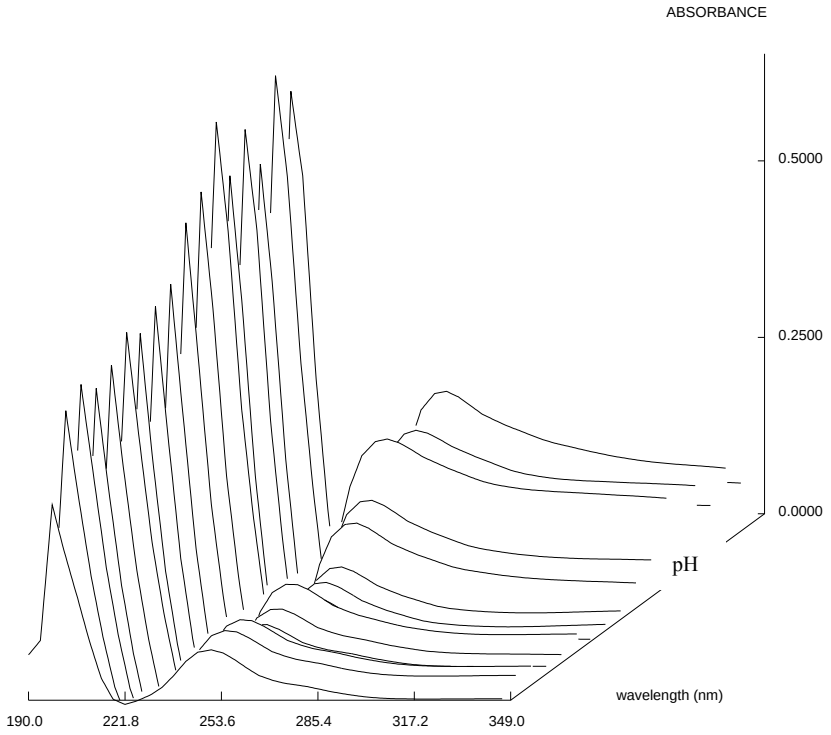
Şekil 7.40. Losartanın %40 ACN-Su ortamında farklı pH'lardaki absorpsiyon spektrumları



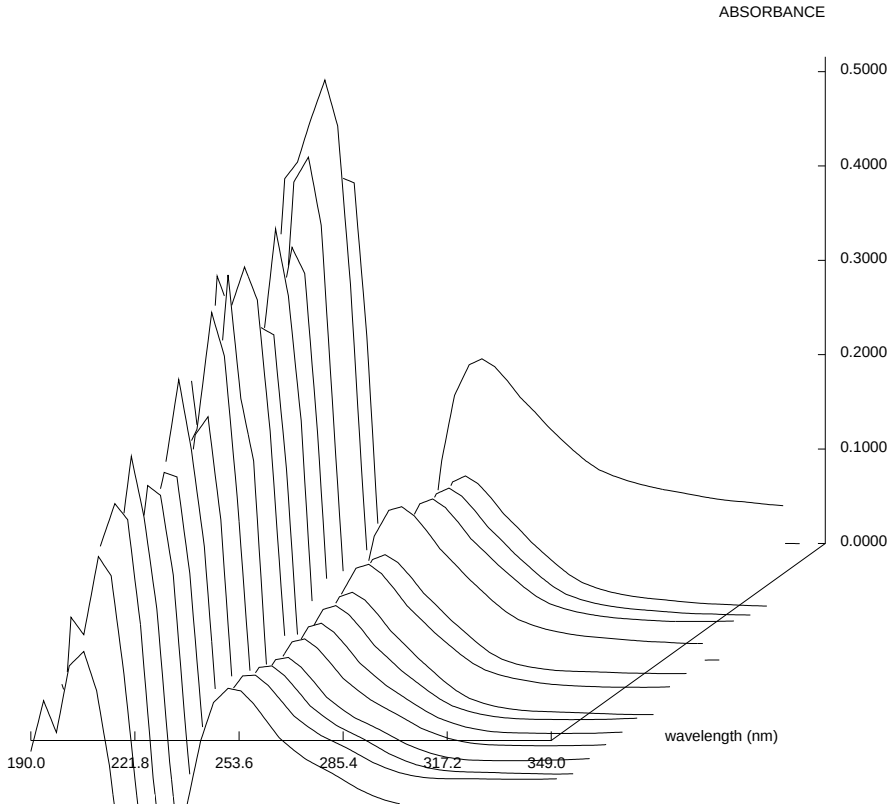
Şekil 7.41. Losartanın %10 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans (STAR) grafiği



Şekil 7.42. Losartanın %20 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans (STAR) grafiği

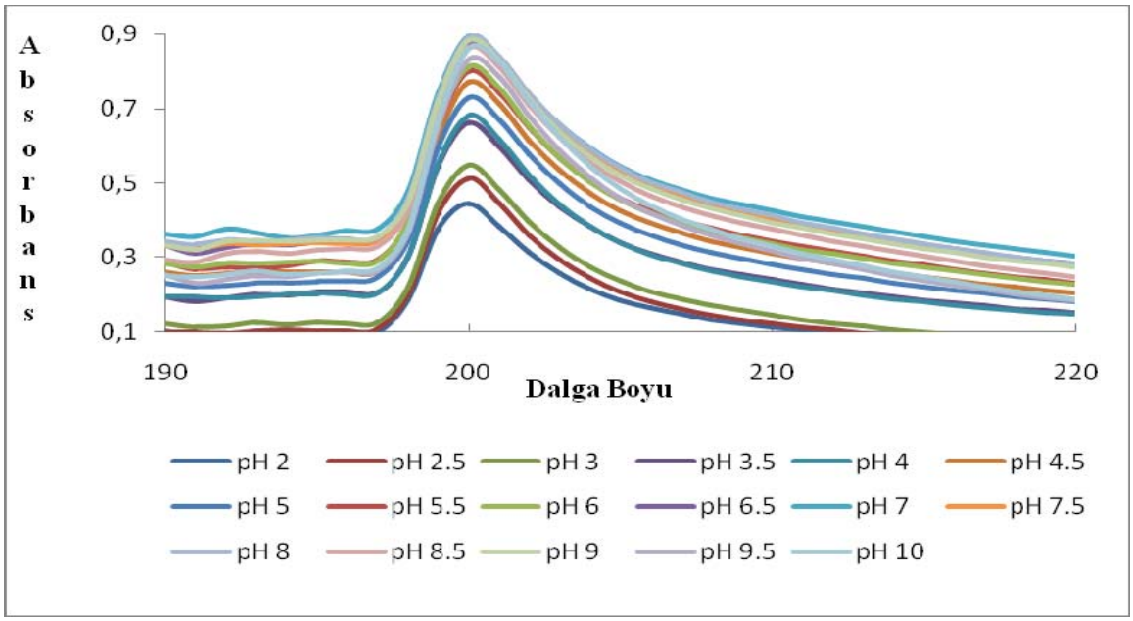


Şekil 7.43. Losartanın %30 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans (STAR) grafiği

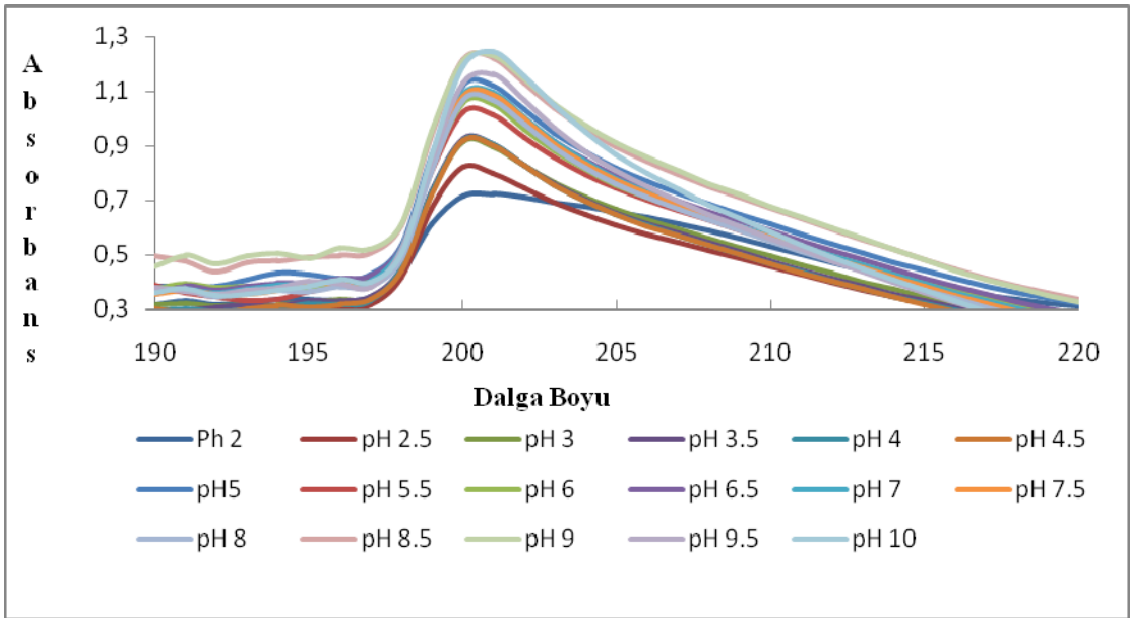


Şekil 7.44. Losartanın %40 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans (STAR) grafiği

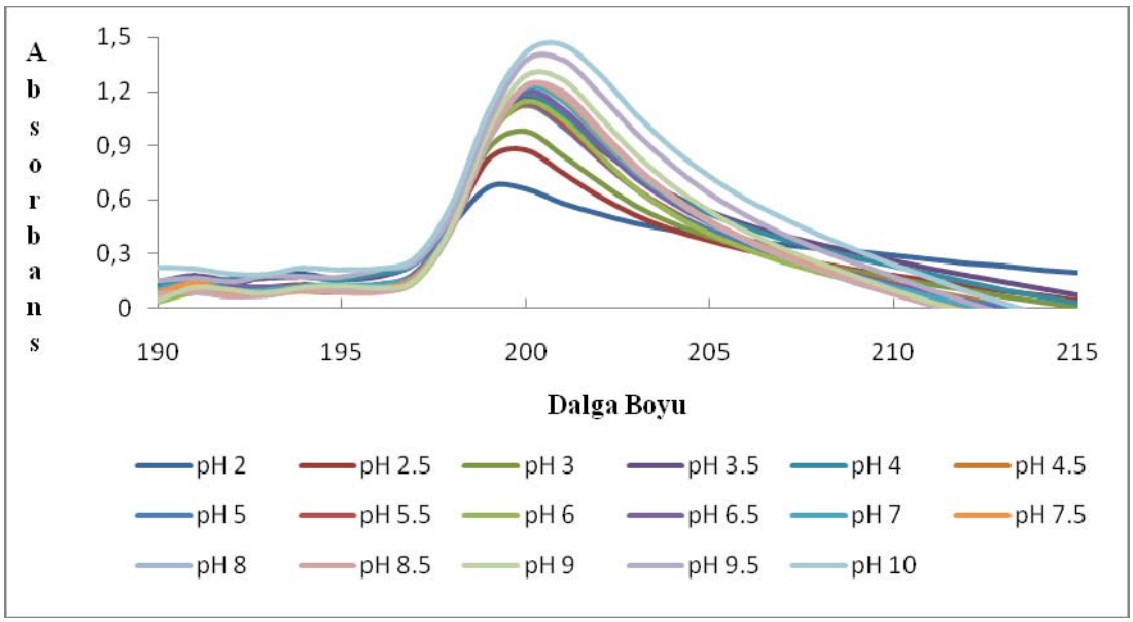
7.3.3.2. Valsartanın % 10-40 ACN-Su ortamlarında farklı pH'lardaki absorpsiyon spektrumları



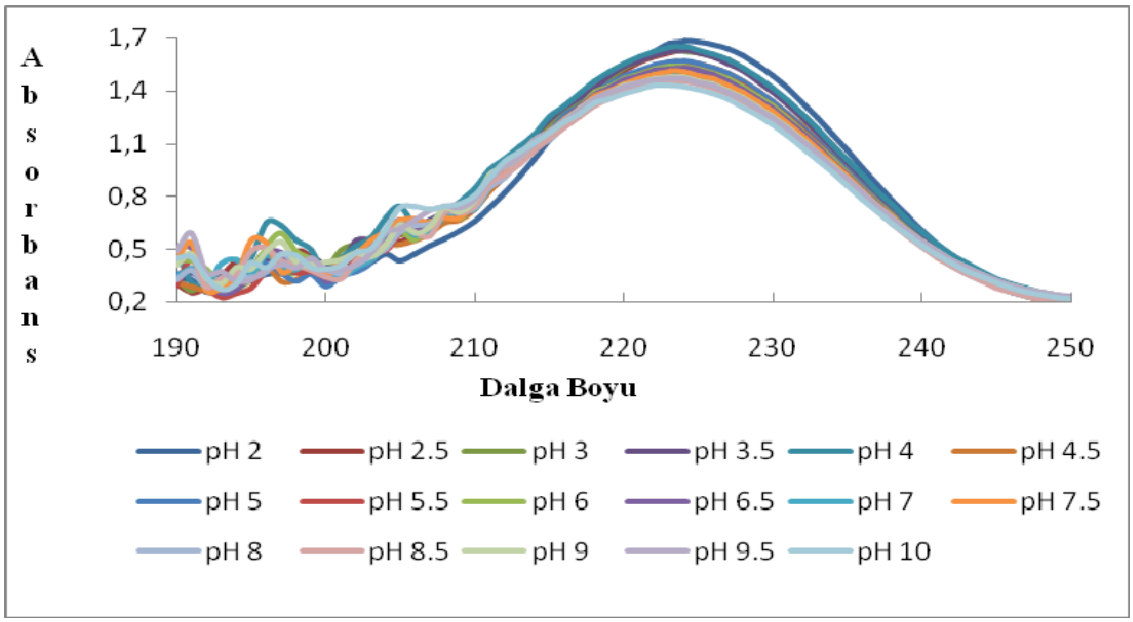
Şekil 7.45. Valsartanın %10 ACN-Su ortamında farklı pH'lardaki absorpsiyon spektrumları



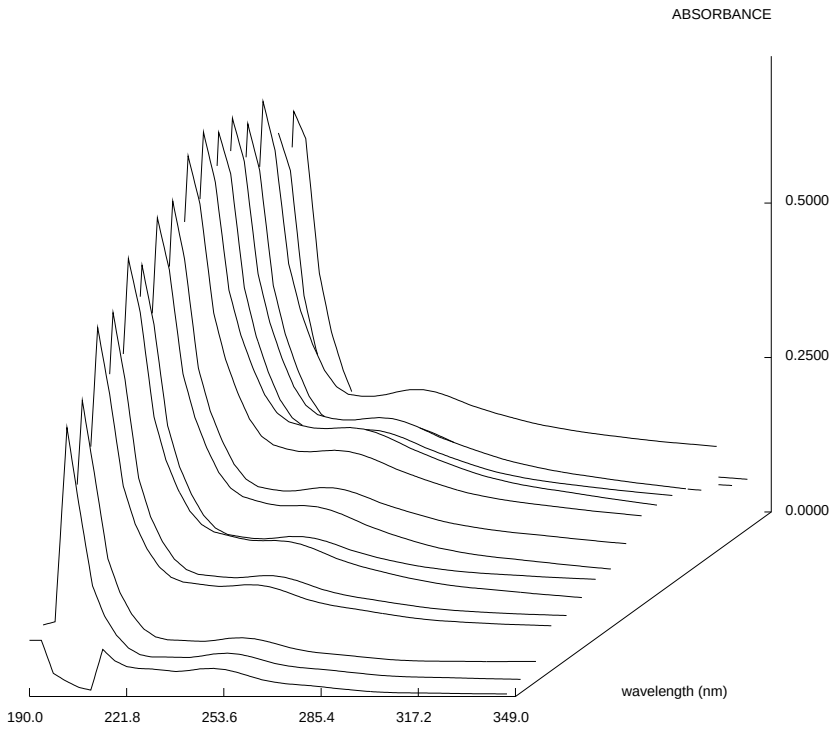
Şekil 7.46. Valsartanın %20 ACN-Su ortamında farklı pH'lardaki absorpsiyon spektrumları



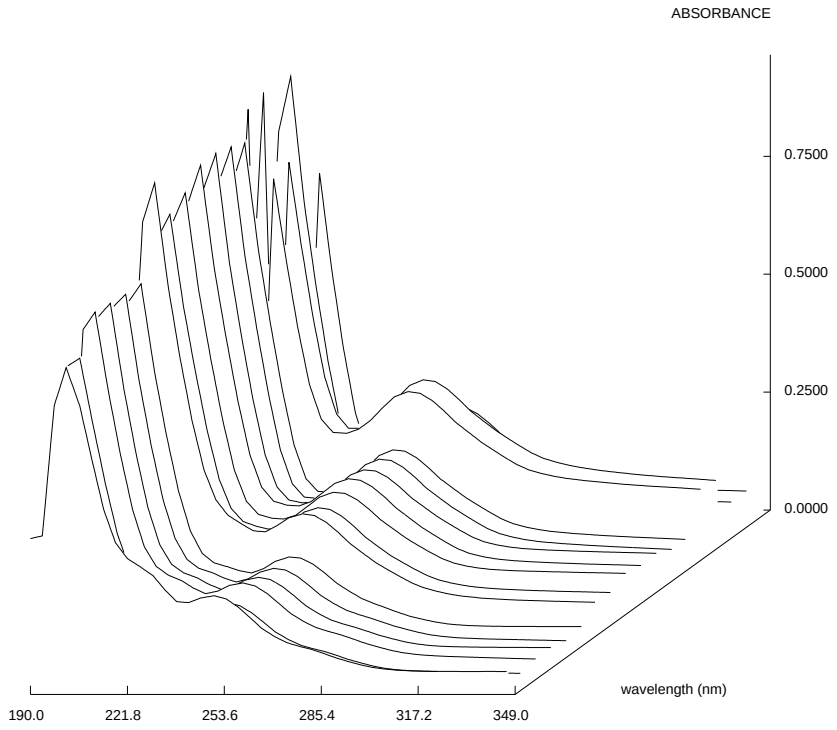
Şekil 7.47. Valsartanın %30 ACN-Su ortamında farklı pH'lardaki absorpsiyon spektrumları



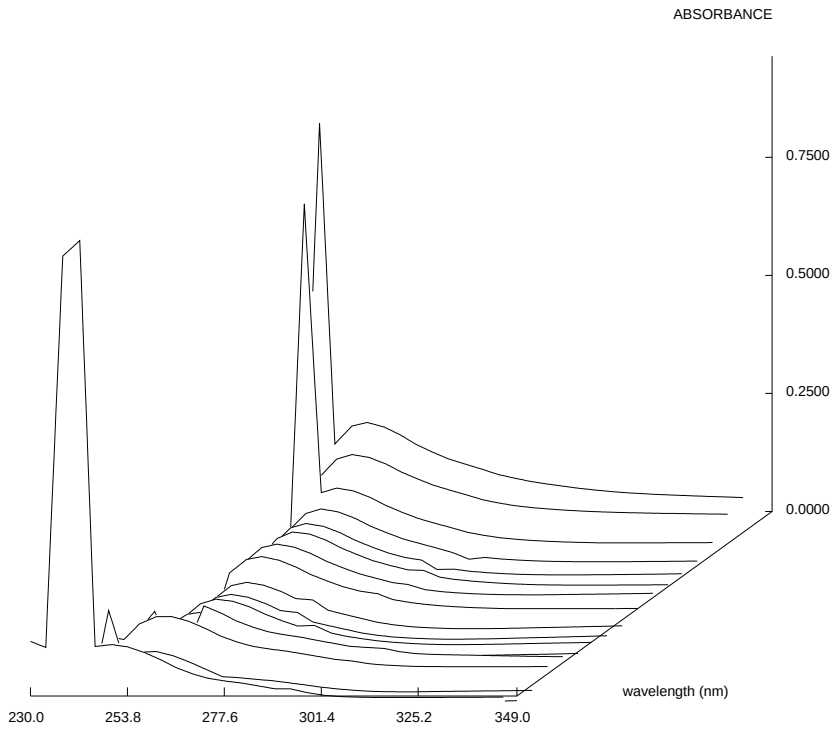
Şekil 7.48. Valsartanın %40 ACN-Su ortamında farklı pH'lardaki absorpsiyon spektrumları



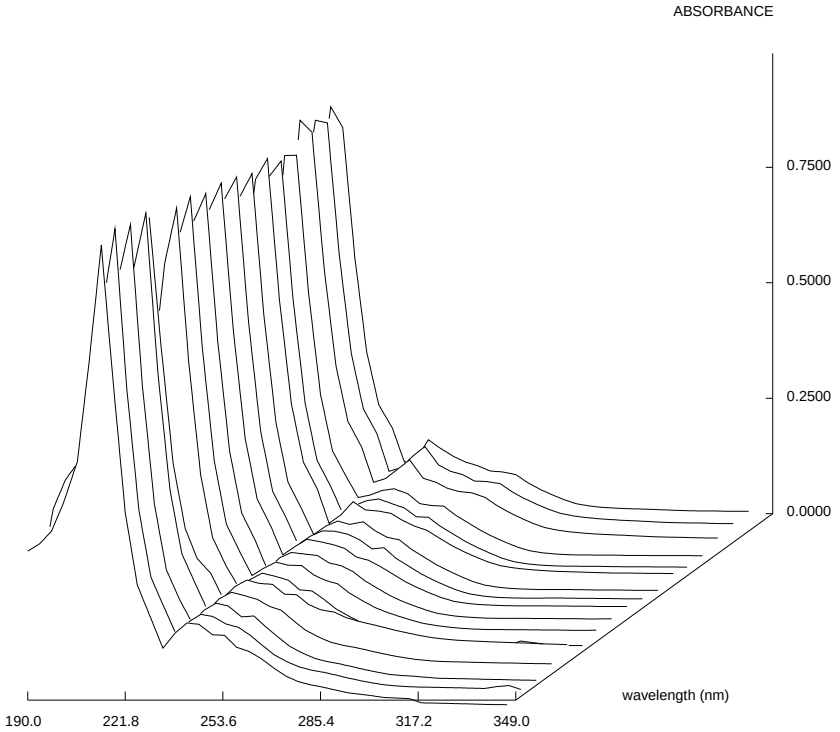
Şekil 7.49. Valsartanın %10 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans (STAR) grafiği



Şekil 7.50. Valsartanın %20 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans (STAR) grafiği



Şekil 7.51. Valsartanın %30 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans (STAR) grafiği



Şekil 7.52. Valsartanın %40 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans (STAR) grafiği

%10-%40 asetonitril-su ortamlarında hem valsartanın hem de losartanın ekzitasyon (uyarma) ve emisyon dalga boylarında artan pH'ya karşılık daha yüksek dalga boylarına (kırmızıya kayma) kaymaların olduğu gözlenmiştir. Bunun başlıca sebebi hem asidik (-COOH) hem de bazik (-NH) grubu içeren ARA II bileşiklerinin, moleküler formlarının iyonik formlarına (anyonik ya da katyonik) göre farklı floresans özelliklere sahip olmalarıdır. Her iki bileşiğin de herbir ortamdaki katyonik formlarının, anyonik formlarına göre oldukça yüksek floresans özelliğe sahip olduğu belirlenmiştir. Diğer bir ifadeyle ortamın pH değeri 2'den 10'a kadar artarken bu maddelerin floresans şiddetleri de düşmektedir.

Spektroflorimetrik yöntemle elde edilen pKa değerlerinin, özellikle de losartan için belirlenen pKa değerlerinin, teorik olarak bileşiklerin pKa değerlerini hesaplayan SPARC programıyla elde edilen pKa değerlerine, spektrofotometrik yöntemle bulunup STAR programında hesaplanan pKa değerlerinden çok daha yakın olduğu görülmüştür.

8. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

8.1. Sonuçlar

Yapılan çalışmada, bazı antihipertansif maddelerin metanol-su ve asetonitril-su gibi karışım çözücülerde pKa değerlerinin, spektrofotometrik ve florimetrik yöntemler kullanarak tayinleri yapılmıştır. Veriler ile SPARC programından hesaplanan sonuçlar karşılaştırılmıştır. Teorik olarak iyonlaşma davranışlarını incelemek üzere SPARC (Sparc Performs Automated Reasoning in Chemistry) adlı on-line hesap programı kullanılmıştır. Bu hesap programı sübstitüe grupların etkisini de inceleyerek olası iyonlaşma formlarını ve bunların bağıl derişimlerini vermektedir.

Bunun için ilk olarak bazı antihipertansif maddelerin çözündüğü ve tayin yöntemlerinde kullanılabilecek en uygun çözücü karışım yüzdeleri belirlendi. Daha sonra uyarma ve emisyon dalga boyları, çözücü ortamı ve molar absorbtivite katsayısı gibi değerler optimize edilerek, en uygun deney koşulları saptanmış ve spektrofotometrik titrasyonlarla ise belli bir dalga boyu aralığında kaydedilen absorbans verilerinden yararlanılıp, maksimum absorbansın olduğu dalga boyunda, absorbans pH' a karşı grafiğe geçirilerek, pKa değerlerini deney koşullarında hesaplayan bir bilgisayar programı olan STAR programıyla iyonlaşma sabitleri (pKa değerleri tayin edilmiştir. İkinci aşamada, çeşitli pH'larda (pH=2-10 arasında) çözeltiler hazırlanarak, her birinin optimum koşullardaki floresans şiddetleri ölçülerek pH-floresans şiddeti grafiğinden yararlanılarak iyonlaşma sabitleri (pKa) tayin edilmiştir. Spektroflorimetrik yöntemle elde edilen pKa değerlerinin, teorik olarak bileşiklerin pKa değerlerini hesaplayan SPARC programıyla elde edilen pKa değerlerine, spektrofotometrik yöntemle bulunup STAR programında hesaplanan pKa değerlerinden çok daha yakın olduğu görülmüştür.

Çizelge 8.1. ARAII bileşiklerinin %10-40 asetonitril ortamlarında teorik ve deneysel iyonlaşma sabitleri.

BİLEŞİK ADI		**SPARC**	**DENEYSEL pKa**	**Asetonitril Yüzdesi**			
				%10	**%20**	**%30**	**%40**
LOSARTAN	Ka_1	2.93	Spektroflorimetrik	3.37	3.35	3.28	3.20
	Ka_2	5.01		-	-	-	-
	Ka_1		STAR (Spektrofotometrik)	5.01	5.90	4.25	5.73
	Ka_2			7.99	7.13	7.92	8.09
VALSARTAN	Ka_1	3.77	Spektroflorimetrik	2.92	2.98	2.52	2.50
	Ka_2	5.05		4.95	4.90	5.05	5.22
	Ka_1		STAR (Spektrofotometrik)	3.46	5.28	4.17	3.53
	Ka_2			5.82	6.93	5.53	5.87

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, α, β, π*, 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 ARA II bileşiklerinin floresans davranışları incelendiğinde, asetonitril-su ortamlarında, asetonitril yüzdesi arttıkça, diğer ARA II bileşiklerinin floresans şiddeti yaklaşık olarak sabit kalırken, Kandesartanın floresans şiddetinin oldukça arttığı gözlenmiştir.

8.2. Öneriler

Yapılan çalışmalarda çözücü olarak asetonitril, su ve metanol kullanılmıştır. Öyle ki dimetil formamitin (DMF) güçlü çözücü özellikte olması ve pratik çalışma viskozitelerinde DMF in daha fazla katı madde çözebilmesi nedeniyle ileriki çalışmalarda bu çözücü de kullanılmalıdır. Ayrıca DMF düşük fiyatlı olması sebebiyle kullanımı da oldukça ekonomiktir. Ayrıca bu çözücünün toksik olmaması da tercih sebebidir.

Spektroflorimetrik yöntemle tayin edilen pKa değerleri; reaksiyon oranını, biyolojik aktiviteyi, biyolojik transferi ve çevresel durumu 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.

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.

Akay M. A. , 1995, Bazı Schiff Bazlarının İyonlaşma Sabitlerinin Spektrofotometrik Metotla Tayini, Doktora Tezi, Ankara Üniversitesi, Ankara.

Allen, R., I., Box, K., J., Comer, J., E., A., Peake, C., Tam, K., Y., 1998, "Multiwavelenght spectrophotometric determination of acid dissociation constants of ionizable drugs", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 17, 699 –712.

Ando, H., Y., Heimbach, T., 1997, "pK_a determination by using a HPLC equipped with DAD as a flow injection apparatus", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 16, 31 – 37.

Avdeef, A., Box, K.J., Comer, J.E.A., Gilges, M., Hadley, M., Hibbert, C., Patterson, W., Tam, K.Y., 1999, "pH Metric log P 11. pK_a determination of water soluble drugs in organic solvent- water mixtures", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 20, 631 - 641.

Barbosa, J., Barrón, D., Jiménez-Lozano, E., Sanz-Nebot, V., 2001, "Comparisonbetween 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, 484 (2), 253-264.

Bhushan, R., Gupta, D., Singh, S. K., 2006, "Liquid chromatographic separationand UV determination of certain antihypertensive agents", Biomed. Chromatogr., 20, 217–224.

Cagigal, E., Gonza´lez, L., Alonso, R.M., Jime´nez, R.M., 2001, "p*K*a determination of angiotensin II receptor antagonists (ARA II) by spectrofluorimetry", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 26, 477–486.

Carlucci, G., Palumbo, G., Mazzeo, P., Quaglia, M.G., 2000, "Simultaneous determination of losartan and hydrochlorothiazide in tablets by high-performance liquid Chromatography", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 23, 185–189.

Ertaş, N., 1997, "Simultaneous and remote determination of Zn and Cd using fluorescence spectrometry" Doktora Tezi, Ortadoğu Teknik Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Geiser, L., Henchoz, Y., Galland, A., Corrupt, P., A., Veutley, J., L., 2005, "Determination of pK_a values by capillary zone electrophoresis with a dynamic coating procedure", Journal of Separation Science, 28, 2374-2380.

Gonza´lez, L., Lo´pez, J.A., Alonso, R.M., Jime´nez, R.M., 2002, "Fast screening method for the determination of angiotensin II receptor antagonists in human plasma by high-performance liquid chromatography with fluorimetric detection", Journal of Chromatography A, 949, 49–60

Gören, B., Fen, T.,2003, Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, Cilt 16, Sayı 5

Gündüz, T., 1999, Kantitatif Analiz, 6. Baskı, Gazi, ANKARA

Gündüz, T., 2002, İnstrümental Analiz, Dokuzuncu baskı, Bölüm 12, Gazi Büro Kitabevi, Ankara.

Gündüz, B., 1995, Fotolüminesans ve analitik uygulama alanları, Doktora Semineri, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Hardcastle J., Jano I., 1998, "Determination of dissociation constants of polyprotic acids from chromatographic data", Journal of Chromatography B, 71, 739-756.

Hempen, C., Gl¨asle-Schwarz, L., Kunz, U., Karst,U., 2006, "Determination of telmisartan in human blood plasma Part II: Liquid chromatography-tandem mass spectrometry method development, comparison to immunoassay and pharmacokinetic study", Analytica Chimica Acta 560, 41–49

Hillaert, S., Van den Bossche, W., 2002, "Optimization and validation of a capillary zone electrophoretic method for the analysis of several angiotensin II receptor antagonists", Journal of Chromatography A, 979, 323-333.

Koseki, N., Kawashit, H., Har, H., Niin, M., Tanak, M., Kawai, R., Nagae, Y., Masuda, N., 2007, "Development and validation of a method for quantitative determination of valsartan in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 43, 1769–1774.

Li, P., Wang, Y., Wang, Y., Tang, Y., Fawcett, J.P., Cui, Y., Gu, J., 2005, "Determination of telmisartan in human plasma by liquid chromatography-tandem mass spectrometry" Journal of Chromatography B, 828, 126-129.

Macek, J., Kl´ıma, J., Pt´aˇcek, P., 2006, "Rapid determination of valsartan in human plasma by protein precipitation and high-performance liquid chromatography", Journal of Chromatography B, 832, 169–173.

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

Obando, M.A., Estela, J.M., Cerda` , V., 2008, " Multi-syringe chromatography (MSC) system for the on-line solid-phase extraction and determination of hydrochlorothiazide and losartan potassium in superficial water, groundwater and wastewater outlet samples", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 48, 212–217

Parker, C. A., 1968, Photoluminescence of Solutions, With Applications to Photochemistry and Analytical Chemistry, Elsevier Pulishing Company, London, 332-337.

Poole, S. K., Patel, S., Dehring, K., Workman, H., Poole, C., F., 2004, "Determination of acid dissociation constants by capillary electrophoresis", Journal of Chromatography A , 1037, 445-454.

Poole, C. P., Poole, S. W., 1997, Chromatography Today. Fifth impression. Elsevier Science, B.V., Amsterdam.

Roses, M., Bosch, E., 2002, "Influence of mobile phase acid-base equilibria on the chromatographic behaviour of protolytic compounds", Journal of Chromatography A, 98, 21-30.

Sanz-Nebot, V., Toro, I., Barbosa, J., 2001, "Prediction of retention behaviour and evaluation of pK values of peptides and quinolones in liquid chromatography", Journal of Chromatography A, 933 45–56.

Shakya, A.K., Al-Hiari, Y.M., Alhamami, O.M.O., 2007, "Liquid chromatographic determination of irbesartan in human plasma", Journal of Chromatography B, 848, 245–250.

Singh, S., Sharda, N., Mahajan, L., 1999, "Spectrophotometric determination of pKa of nimesulid", International Journal of Pharmaceutics 176, 261-264.

Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., Çeviri: Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H.,2000, Enstrümental Analiz İlkeleri, Bilim Yayıncılık, Ankara, 355-377.

SPARC: http://ibmlc2.chem.uga.edu/sparc.

Stenhoff, H., Lagerström, P., Andersen, C., 1999, "Determination of candesartan cilexetil, candesartan and a metabolite in human plasma and urine by liquid chromatography and fluorometric detection", Journal of Chromatography B, 731, 411–417.

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, 975(2), 299-309.

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

Şatana, E., Altınay, Ş., Günden Göğer, N., Özkan, S., Şentürk, Z., 2001, "Simultaneous determination of valsartan and hydrochlorothiazide in tablets by first-derivative ultraviolet spectrophotometry and LC", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 25, 1009-1013.

Takacs-Novak, K., Box, K., J., Avdeef, A., 1997, "Potentiometric pK_a determination of water-insoluble compounds: validation study in methanol/water mixtures", International Journal of Pharmaceutics, 151, 235-248.

Torrealday, N., Gonza'lez, L., Alonso, R.M., Jime'nez, R.M., Ortiz Lastra, E., 2003, "Experimental design approach fort he optimisation of a HPLC-fluorimetric method fort he quantitation of the angiotensin II receptor antagonist telmisartan in urine", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 32, 847-857.

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, 979, 369-377.

Yan, J., Wang, W., Chen, L., Chen, S., 2008, "Electrochemical behavior of valsartan and its determination in capsules", Colloids and Surfaces B; Biointerfaces 67, 205-209.

Zhang, L.W., Wang, K., Zhang, Xin-Xiang., 2007, "Study of the interactions between fluoroquinolones and human serum albumin by affinity capillary electrophoresis and fluorescence method", Analytica Chimica Acta, 603, 101-110.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	Teslime ERŞAN
Uyruğu	**:**	T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	Konya – 1985
Telefon	**:**	0505 395 06 14
Faks	**:**	----
e-mail	**:**	t.ataoglu@hotmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı, İlçe, İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	Dolapoğlu Anadolu Lisesi - KONYA	**2003**
Üniversite	:	S.Ü. Fen Fakültesi Kimya Bölümü- KONYA	**2008**
Yüksek Lisans	:	S.Ü. Fen Fakültesi Kimya Bölümü Analtik Kimya Anabilimdalı	
Doktora	:	**-----**	

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2009	İlke Dershaneleri	Stajyer Öğretmenlik
2009	Adıbelli Yapı Kimyasalları	İngilizce çevirmenlik

YABANCI DİL

İngilizce