

**4'-DİOKTİLAMİNO-3-HİDROKSİFLAVON TEMELLİ
FLORESANS PROBLARIN SENTEZLERİ VE
ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
Kimyager Simay ÇIKRIKÇI
(509031221)**

**Tezin Enstitüye Verildiği Tarih : 9 Mayıs 2005
Tezin Savunulduğu Tarih : 30 Mayıs 2005**

**Tez Danışmanı : Prof.Dr. Turan ÖZTÜRK
Diğer Jüri Üyeleri Prof.Dr. Ümit TUNCA (İ.T.Ü.)
Doç.Dr. Mehmet EROĞLU (M.Ü.)**

HAZİRAN 2005

ÖNSÖZ

Bana kendisiyle çalışma olanağı veren ve desteğini hiç esirgemeyen, her konuda tavsiyelerinden ve bilgilerinden yararlandığım değerli hocam, Prof. Dr. Turan Öztürk'e, deneysel çalışmalar sırasındaki yardımları için sevgili arkadaşlarım, Bahar Taşan ve Şule Taşkiran'a, TÜBİTAK-GMBAE'de floresans ölçümlerinde emeği geçen Şule Öncül'e, biyolojik çalışmaları gerçekleştiren Doç. Dr. Kemal Baysal'a, sentez çalışmalarında yardımcı olan Andrey Klymchenko'ya ve tez yazım aşamasında gösterdikleri ilgi ve anlayış için TÜBİTAK-UME Kimya Bölümü çalışanlarına teşekkür ederim.

Son olarak, tüm yaşantım boyunca bana her konuda destek olan ve yol gösteren annem Yüksel Çıkrıkçı, babam Erdoğan Çıkrıkçı ve canım kardeşim Zeray Çıkrıkçı'ya teşekkür ederim.

MAYIS 2005

SİMAY ÇIKRIKÇI

İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	vi
TABLO LİSTESİ	vii
ŞEKİL LİSTESİ	viii
SEMBOL LİSTESİ	xi
ÖZET	xii
SUMMARY	xiv
1. GİRİŞ	1
2. TEORİK BÖLÜM	2
2.1. Flavonoidler	2
2.1.1. Flavonoidlerin Yapı Özellikleri Ve Sınıflandırılmaları	3
2.1.1.1. Flavonoidlerin Yapı Özellikleri	5
2.1.1.2. Flavonoidlerde yapı çeşitliliği	10
2.1.1.3. Flavonoid sınıfları	13
2.1.2. Flavonlar	13
2.1.2.1. Hidroksil ve metoksil içeren flavonlar	13
2.1.3. Flavonoller	14
2.1.4. Kalkonoidler	14
2.1.4.1. Kalkonoidlerin Yapı Çeşitliliği	15
2.1.4.2. Kalkonlar	16
2.1.4.3. Basit kalkonlar	17
2.1.5. Flavonoidlerin Tanınmaları	17
2.1.5.1. Renk Reaksiyonları:	17
2.1.5.2. Ultraviyole (UV) Spektrumu	18
2.1.5.3. Metanoldeki Spektrumu	19
2.1.5.4. NMR Spektrumu ile Flavonoidlerin yapı Analizi	19
2.1.5.5. Flavonoidlerin Kütle Spektrumu	20

2.1.6. Flavonların Doğal Kaynaklardan İzolasyonu	20
2.1.6.1. Kolon Kromotografisi	21
2.1.6.2. İnce Tabaka Kromatografisi	21
2.1.7. Flavonoidlerin Tıbbi ve Biyolojik Özellikleri	22
2.1.7.1. Flavonoidlerin Antioksidatif Etkileri	23
2.1.7.2. Flavonoidlerin Kanserle İlgili Özellikleri	28
2.1.7.3. Mikrobiyal Mutajen Özelliklerin Araştırılması	29
2.1.7.4. Flavonoidlerin Antikarsinogenik Etkileri	29
2.1.7.5. Flavonoidlerin Antitoksik Ve Hepatoprotektif Etkileri	30
2.1.7.6. Flavonoidlerin Virüslere Karşı Etkileri	30
2.1.7.7. Flavonoidlerin Memelilerin Enzim Sistemlerine Etkileri	30
2.1.8. Çeşitli Flavon Sentez Yöntemleri	31
2.1.8.1. 3-hidroksi flavon'ların Sentezi	31
2.1.8.2. Sentezlenen 3HF'ların spektral özellikleri	33
2.2. Floresans Spektroskopisi	36
2.2.1. Floresans Spektroskopisinin Teorisi	36
2.2.2. Moleküler Floresans Spektroskopisi	39
2.2.3. Floresans Oluşumun Prensipleri	41
2.2.3.1. Titreşimsel Dinlenme	42
2.2.3.2. İç Dönüşüm	43
2.2.3.3. Sistemler Arası Geçiş	43
2.2.3.4. Enerji Transferi	43
2.2.4. Floresans Yayma	43
2.2.5. Fosforesans Yayma	44
2.2.6. Floresansı Etkileyen Faktörler	44
2.2.6.1. Yapısal Faktörler	44
2.2.6.2. Moleküler katılık	45
2.2.6.3. Sıcaklık ve Viskozite	46
2.2.6.4. Çözücü	46
2.2.6.5. pH	48
2.2.6.6. Çözünmüş Oksijen, Paramanyetikler ve Ağır Atomlar	48
2.2.7. Işık Soğurumu	49
2.2.8. Floresans Yayılım Grafiği	49
2.2.9. Florometre ve Spektrofluorometre Aleti	51
2.2.10. Uyarılma ve Emisyon Spektrumları	53
2.2.11. Floresans Uygulamaları	54
2.2.11.1. Anorganik Maddelerin Analizi	55
2.2.11.2. Organik Maddelerin Analizi	55
2.3. Floresans Problemleri: Prensipler Ve Uygulamaları	59
2.3.1. Yeni Floresan Problemlerin Dizaynı	62
2.3.1.1. İyon tanıma için kullanılan problemler:	62
2.3.1.2. Membran potansiyeli için kullanılan problemler:	62
2.4. Uyarılmış Seviye Yük Aktarımı Reaksiyonu (ESCT)	64
2.5. Biyolojik Sistemlerde 3-Hidroksi Flavonların Prob Olarak Önemi	67
2.5.1. Prob-Çözücü Etkileşimleri	68
2.5.2. Prob-Ters(reverse) Misel Etkileşimleri	69
2.5.3. Problemlerin Fosfolipid keselerdeki Floresans Özellikleri	69

3. DENEYSEL BÖLÜM	71
3.1. Genel Teknikler	71
3.1.1. Kromatografi	71
3.1.1.1. Kolon kromatografisi	71
3.1.1.2. İnce Tabaka Kromatografisi	71
3.1.2. Spektrometreler	71
3.1.2.1. Ultraviyole (UV) Spektrofotometresi	71
3.1.2.2. ¹ H NMR Spektrometresi	71
3.1.2.3. Floresans Spektrofotometresi	72
3.2. Çözücüler Ve Kullanılan Kimyasal Maddeler	72
3.3. Kullanılan Elektronik Aletler	72
3.4. Deney Prosedürü	72
3.4.1. Anilin'in Oktilyodür ile Reaksiyonu - Dioktilaminobenzen eldesi	72
3.4.2. Dioktilaminobenzaldehit eldesi (Vilsmeier Formulation)	73
3.4.3. Çalkon Sentezi için Genel Prosedür (FN8)	74
3.4.4. FN8 (2-(4-(dioktilamino)fenil)-3-hidroksi-4H-kromen-4-on)eldesi, Flavon oluşum(halka kapama) reaksiyonu	74
3.4.5. 2-hidroksi-4-oktiloksiasetofenon Eldesi için Genel Yöntem	75
3.4.6. OFN8 için Çalkon Sentezi	76
3.4.7. OFN8 eldesi, Flavon oluşum(halka kapama) reaksiyonu	76
3.4.8. Çalkon Sentezi için Genel Prosedür (MFN8)	77
3.4.9. MFN8 eldesi, Flavon oluşum(halka kapama) reaksiyonu	77
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA	79
4.1. Gerçekleştirilen Reaksiyonlar	80
4.1.1. Anilin'in Oktilyodür ile Reaksiyonu - Dioktilaminobenzen eldesi	80
4.1.2. Dioktilaminobenzaldehit eldesi (Vilsmeier Formulation)	81
4.1.3. FN8 eldesi, Flavon oluşum(halka kapama) reaksiyonu	82
4.1.4. 2-hidroksi-4-oktiloksiasetofenon Eldesi için Genel Yöntem	83
4.1.5. OFN8 eldesi, Flavon oluşum(halka kapama) reaksiyonu	84
4.1.6. MFN8 eldesi, Flavon oluşum(halka kapama) reaksiyonu	86
4.2. Sentezlenen Problara ait Floresans ve Absorbsiyon Ölçümleri	88
4.3. MFN8' e ait Biyolojik Çalışmalar	98
4.4. Sonuç	99
KAYNAKLAR	101
ÖZGEÇMİŞ	105

KISALTMALAR

THF	: Tetrahidrofuran
DMF	: Dimetil Formamid
TLC	: İnce Tabaka Kromatografisi
UV	: Ultraviyole
IR	: İnfrared
NMR	: Nükleer manyetik rezonans
3HK	: 3-hidroksikromon
3HF	: 3-hidroksiflavon
ESIPT	: Excited State Intramolecular Proton Transfer (Uyarılmış Hal Moleküliçi Proton Transferi)
ESCT	: Excited state charge transfer (Uyarılmış hal yük transferi)
ICT	: Intramolecular Charge Transfer (Moleküliçi Yük Transferi)
N	: Probun normal formunun temel hali,
T	: Probun tautomer formunun temel hali,
N*	: Probun Normal formunun uyarılmış hali,
T*	: Probun tautomer formunun uyarılmış hali
MFN8	: 2-(4-(dioktilamino)fenil)-3-hidroksi-7metoksi-4 <i>H</i> -kromen-4-on
FN8	: 2-(4-(dioktilamino)fenil)-3-hydroxy-4 <i>H</i> -kromen-4-on
OFN8	: 2-(4-(dioktilamino)fenil)-3-hidroksi-7(oktiloksi)-4 <i>H</i> -kromen-4-on

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 2.1. Flavonoidlerin hetero halkadaki /-C3-/ yapısına göre sınıflandırılması.....	9
Tablo 2.2. Tablo 2.1'in devamı	19
Tablo 2.3. Flavonoidlerin renk reaksiyonları	
Tablo 2.4. Sentezlenen kromanların spektral özellikleri.....	35
Tablo 2.5. Benzenin floresansına süstitüsyonun etkisi.....	45
Tablo 4.1. Sentezlenen proplar (FN8, MFN8, OFN8)	87
Tablo 4.2. OFN8 probuna ait, farklı çözücülerde hesaplanmış floresans özellikleri.....	97
Tablo 4.3. MFN8 proba ait, farklı çözücülerde hesaplanmış floresans özellikleri.....	97
Tablo 4.4. FN8 proba ait, farklı çözücülerde hesaplanmış floresans özellikleri.....	98

ŞEKİL LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Şekil 2.1 : Flavonoidlerin sınıflandırılması	5
Şekil 2.2 : 1,3-Difenilpropan (a) ve Kalkon (b).....	6
Şekil 2.3 : Auron.....	6
Şekil 2.4 : Flavan(a) ve Flavon(b)	6
Şekil 2.5 : 1,1-difenilpropan ve neoflavonoid yapıları	7
Şekil 2.6 : 1,2-difenilpropan iskeleti içeren flavonoidler	8
Şekil 2.7 : Flavonoid yapılarında süstitüentlerin en yaygın yerleşmepozisyonları	11
Şekil 2.8 : Hinokiflavon ve Bryoflavon.....	12
Şekil 2.9 : Kalkan ve kalkon bileşiklerine örnekler.....	15
Şekil 2.10 : β' -Kalkanol ve α -Kalkanol.....	15
Şekil 2.11 : β' -Kalkanon ve α -Kalkanon	16
Şekil 2.12 : β' -Kalkanon- α -ol ve β' -Kalkanon- β -ol	16
Şekil 2.13 : Kalkononaringenin naringenine dönüşümü	17
Şekil 2.14 : Bant I ve Bant II'yi gösteren gruplar.....	18
Şekil 2.15 : Polygonum hidropiper bitkisinden elde edilen antioksidatif..... flavonoidler.....	26
Şekil 2.16 : Flavonoidlerin yapı özellikleri ile total antioksidan aktiviteleri .arasındaki ilişki	28
Şekil 2.17 : Sentezlenen 3-hidroksiflavonlar.....	32
Şekil 2.18 : 1a ve 2a'nın sentezi.	33
Şekil 2.19 : Sentezlenen kromanların toluen içerisindeki normalize absorpsiyon spektrası.....	34
Şekil 2.20 : 1 ve 1a'nın kloroform(A) ve asetonitrildeki(B) normalize floresans spektrumu.....	34
Şekil 2.21 : 2 ve 2a'nın toluen (A) ve asetonitrildeki(B) normalize floresans .spektrası.....	35
Şekil 2.22 : Jablonski diyagramı.....	38
Şekil 2.23 : Moleküler elektronik enerji seviyeleri arası geçişler	38
Şekil 2.24 : Fluorescein ve fenolftaleyn	46
Şekil 2.25 : Pontokrom BBR ve Pontokrom BBR'nin alüminyum şelatı	46
Şekil 2.26 : Floresans emisyonuna çözücü etkileri (A) polar çözücü, (B) nonpolar çözücü, ($\rightarrow$) florofor dipolü, ($\curvearrowright$) solvent dipolü, (o) dipolü olmayan solvent molekülleri	47
Şekil 2.27 : Anilinyum iyonu ve anilinin bazı rezonans şekilleri.....	48
Şekil 2.28 : Naftalende konsantrasyonun floresans şiddeti üzerine etkisi.....	51
Şekil 2.29 : Florometre cihazı.....	52
Şekil 2.30 : a) Asetilsalisilik asidin, b) Salisilik asidin eksitasyon ve emisyon spektrumları.....	57

Şekil 2.31 : Elektronik uyarılma sırasında dipol momentleri değişen floresans problemlere örnekler; Mq: stilbazolium betain, PRODAN: 6-propiyonil-2-metilaminonaftalen, 1,8-ANS: 1-anilinonaftalen-8-sulfonikası.....	60
Şekil 2.32 : Biantrildeki yük dağılımı.....	61
Şekil 2.33 : 3-hidroksiflavon problemlere örnekler.....	61
Şekil 2.34 : Doğal floresans maddelere bazı örnekler	64
Şekil 2.35 : Yapay Floresans maddelere örnekler	64
Şekil 2.36 : İntermoleküler yük aktarım reaksiyonu	65
Şekil 2.37 : İntramoleküler yük transfer reaksiyonu	65
Şekil 2.38 : 3-Hidroksiflavonlarda uyarılmış hal moleküllü proton transferinin gösterimi (ESIPT)	68
Şekil 3.1 : Dioktilaminobenzen sentezi	72
Şekil 3.2 : Dioktilaminobenzaldehit sentezi	73
Şekil 3.3 : Çalkon eldesi	74
Şekil 3.4 : FN8 sentezi.....	74
Şekil 3.5 : 2-hidroksi-4-oktiloksiasetofenon sentezi	75
Şekil 3.6 : Çalkon sentezi (OFN8).....	76
Şekil 3.7 : OFN8 sentezi.....	76
Şekil 3.8 : OFN8 için özet sentez reaksiyonu.....	77
Şekil 3.9 : MFN8 için çalkon eldesi	77
Şekil 3.10 : MFN8, halka kapama reaksiyonu.....	77
Şekil 3.11 : MFN8 için özet sentez reaksiyonu	78
Şekil 4.1 : Sentezlenen 3-hidroksiflavon türevleri	79
Şekil 4.2 : Dioktilaminobenzen sentezi	80
Şekil 4.3 : Dioktilaminobenzen' e ait H-NMR spektrumu	80
Şekil 4.4 : Dioktilaminobenzaldehit sentezi	81
Şekil 4.5 : Dioktilaminobenzaldehite ait ¹ H-NMR spektrumu	81
Şekil 4.6 : FN8 sentezi.....	82
Şekil 4.7 : FN8'e ait ¹ H-NMR spektrumu	82
Şekil 4.8 : FN8'e ait ¹ H-NMR spektrumu (8.4-6.6 ppm)	83
Şekil 4.9 : 2-hidroksi-4-oktiloksiasetofenon sentezi	83
Şekil 4.10 : 2-hidroksi-4-oktiloksiasetofenona ait ¹ H-NMR spektrumu	84
Şekil 4.11 : OFN8 için özet sentez reaksiyonu.....	84
Şekil 4.12 : OFN8'e ait ¹ H-NMR spektrumu	85
Şekil 4.13 : OFN8'e ait ¹ H-NMR spektrumu (8.2-6.4ppm)	86
Şekil 4.14 : MFN8 için özet sentez reaksiyonu	86
Şekil 4.15 : MFN8'e ait ¹ H-NMR spektrumu.....	86
Şekil 4.16 : MFN8'e ait ¹ H-NMR spektrumu (8.2-6.6 ppm).....	87
Şekil 4.17 : FN8'e ait absorpsiyon spektrumu.....	89
Şekil 4.18 : MFN8'e ait absorpsiyon spektrumu	89
Şekil 4.19 : OFN8'e ait absorpsiyon spektrumu.....	90
Şekil 4.20 : FN8 probuna ait, farklı polaritedeki çözücülerde incelenen, T* bandına göre normalize edilmiş floresans spektrumu.....	91
Şekil 4.21 : OFN8 probuna ait, farklı polaritedeki çözücülerde incelenen, T* bandına göre normalize edilmiş floresans spektrumu.....	92
Şekil 4.22 : MFN8 probuna ait, farklı polaritedeki çözücülerde incelenen, floresans spektrumu.....	92
Şekil 4.23 : FN8 probuna ait farklı polaritedeki çözücülerde alınan emisyon band maksimumlarına karşı f(ε) grafiği.....	94

Şekil 4.24 : FN8 probuna ait farklı polaritedeki çözücülerde alınan $\log(I_{N^*}/I_{T^*})$ şiddet oranlarına karşı $f(\epsilon)$ grafiği	94
Şekil 4.25 : OFN8 probuna ait farklı polaritedeki çözücülerde alınan emisyon band maksimumlarına karşı $f(\epsilon)$ grafiği	95
Şekil 4.26 : OFN8 probuna ait farklı polaritedeki çözücülerde alınan $\log(I_{N^*}/I_{T^*})$ şiddet oranlarına karşı $f(\epsilon)$ grafiği	95
Şekil 4.27 : MFN8 probuna ait farklı polaritedeki çözücülerde alınan emisyon band maksimumlarına karşı $f(\epsilon)$ grafiği	96
Şekil 4.28 : MFN8 probuna ait farklı polaritedeki çözücülerde alınan $\log(I_{N^*}/I_{T^*})$ şiddet oranlarına karşı $f(\epsilon)$ grafiği	96

SEMBOL LİSTESİ

$\Lambda_{\text{abs}}^{\text{max}}$	: Absorbsiyon maksimumu
$\Lambda_{\text{max}}^{\text{N}^*}, \Lambda_{\text{max}}^{\text{T}^*}$	: Normal(N*) ve tauomer(T*) forma ait floresans emisyon maksimumları
$I_{\text{N}^*}/I_{\text{T}^*}$	: N* ve T* bandlarının floresans şiddeti oranları
Q_{F}	: Floresans kuantum verimi
$f(\epsilon)$	: Düşük frekans dielektrik sabitinin fonksiyonu
$f(n)$	: Refraktif indeks fonksiyonu

4'-DİOKTİLAMİNO-3-HİDROKSİFLAVON TEMELLİ FLORESANS PROBLARIN SENTEZLERİ VE ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ

ÖZET

3-hidroksiflavonlar, çevrelerinde gerçekleşen küçük değişimlere gösterdikleri hassasiyet ve bu değişimlere, birbirinden oldukça iyi ayrılmış iki emisyon bandıyla yanıt vermeleri sebebiyle, dikkate değer floresans özelliklere sahip bileşiklerdir. İki floresans band verebilmeleri, bu moleküllerin uyarılma durumunda, iç proton transferi (Excited state intramolecular proton transfer, ESIPT) yapabilmelerinden kaynaklanmaktadır. Bu yüzden misel ve fosfolipid kesecikler gibi biyolojik sistemlerde floresans sensör olarak kullanılabilirler. Günümüzde yeni floresans prob arayışları ile ilgili araştırmalar biyoteknoloji, moleküler biyoloji ve hücre biyolojisi, eczacılık, kimya, fizik ve bunlarla ilgili disiplinlerde sürdürülmektedir.

Özellikle biyolojik sistemlerde daha iyi iletişime girecek floresans sensörler geliştirmek için yeni 3-hidroksiflavon analoglarının sentez edilmesi önem taşımaktadır. Proben kararlılığını artırabilmek için, floresans spektrumunda konjugasyonu arttırarak bandların kırmızı alana kaymasını sağlamak ve probun özelliğini lipid yapının özelliğine benzetmek üzere probun yapısına farklı uzunluklarda hidrokarbon zincirleri yerleştirmek söz konusu olabilir.

Bu amaçla bu çalışmada, 3-hidroksiflavon'un yağsı özelliğini artırmak üzere, elektron verici grup olarak benzaldehitin para pozisyonuna dioktil amino grupları takılmıştır. Nonpolar özelliği artan sensörün, biyolojik sistemlerle daha iyi iletişime girmesi, biyolojik kirliliği belirleme özelliklerinin geliştirilmesi, seçici olarak hücrelere duyarlılığının artırılması ve hücre hakkında daha fazla bilgi edinilmesi planlanmıştır.

3-hidroksiflavonlar uyarılmış halde molekül içi proton transferi yaptıklarından dolayı (excited state intramolecular proton transfer, ESIPT), floresans spektrumlarında, uyarılmış durum normal (N*) form ve fototautomer(T*) forma ait iki emisyon bandı gösterirler. Bu emisyon bantları dalga boyu skalasında iyi ayrılmış iki bant

şeklindedir. Mavi bölgedeki bant normal uyarılmış durumdan (N*), kırmızıya kayan diğer bant ise uyarılmış tautomer durumdan (T*) kaynaklanır. İkinci bant çarpıcı bir şekilde yüksek dalga boyuna (kırmızıya) kayarak bandlar arasında iyi bir ayrım sağlanır.

Bu bantların ışık şiddetlerindeki farklılık, absorbsiyon ve floresans maksimumlarının pozisyonları, floresans kuantum verimleri gibi spektroskopik davranışlar, 3-hidroksiflavon ve 3-hidroksikromonların yapısına ve onların mikro çevre parametrelerine önemli ölçüde bağlıdır. 3-hidroksiflavonlar hidrojen bağı etkileşimlerine duyarlıdır. Bu bantların ışık şiddeti oranları ve pozisyonları çözücü molekülleri ile yaptığı hidrojen bağı ya da çözücü polaritesine göre değişiklik gösterir. Bu nedenle floresans ölçümleri farklı polaritelere sahip çözücüler içinde gerçekleştirilmiştir.

Sentezlenen moleküllerin absorbsiyon ve floresans spektrumlarında çözücüye bağlı kaymalar görülmüştür (solvatokromizm ve solvato florokromizm). Absorbsiyon ölçümleri farklı polaritedeki solventlerde yapılmıştır.

Tüm solventlerde, absorbsiyon spektrumunda kırmızıya kayma gözlenmiştir. Bu kırmızıya kayma, π -elektron donör, dioktilamino grubunun ana yapıya ilavesiyle gerçekleşmiştir. Çözücü polaritesi arttıkça absorbsiyon maksimumu, $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$, uzun dalga boylarına kaymaktadır.

Farklı polaritelerdeki çözücülerde yapılan floresans ölçümlerinde, beklenildiği gibi, normal (N*) ve tautomer(T*) forma ait iki band görülmüştür.

Yeni sentezlenen 3-HF türevleri, düşük polaritedeki çözücülerde yapılan floresans ölçümlerinde, belirgin bir şekilde çözücüye bağımlı değişim göstermektedir.

Farklı polaritedeki çözücülerde yapılan floresans ölçümlerinde, çözücü polaritesi arttıkça emisyon bandlarında kırmızıya, yüksek dalga boyuna kayma gözlenmiştir.

Sonuç olarak, bu çalışmada, 3-hidroksiflavon'un nonpolar özelliğini artırmak üzere, sentezlenen FN8, OFN8 ve MFN8 problemleri ile ilgili, biyolojik çalışmalar ve floresans özelliklerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar grubumuzca sürdürülmektedir.

THE SYNTHESIS AND CHARACTERIZATION OF 4'-DIOCTYLAMINO-3-HYDROXYFLAVONE BASED FLUORESCENCE PROBES

SUMMARY

3-Hydroxyflavone derivatives are very attractive fluorescence sensors due to their ability to respond to small changes in their microenvironment via a dramatic alteration of the relative intensities of their two-well separated emission bands. The presence of two well separated emission bands belonging to excited state normal (N^*) and tautomer (T^*) forms is a characteristic feature of 3-HF derivatives. These two fluorescence maxima is a result of excited state intramolecular proton transfer (ESIPT) reaction of 3-hydroxyflavones. The unique spectroscopic properties of 3-HFs allowed their applications as prospective sensors of polarity, ions and electric fields, and also as probes to study polymers, reverse micelles, lipid membranes and proteins. The advantage of these dyes as fluorescence sensors and probes is their ratiometric response to interactions with the environment, provided by the changes of relative intensities of these bands.

For the development of new fluorescence sensors to be used in the biological systems, it is important to synthesize new 3-hydroxyflavone derivatives. To increase the probe stability, it is possible to increase the conjugation that result with a red shift in fluorescence spectra and introduction of long hydrocarbon chains to the probe to make the probe similar to the lipid structure.

New strategies have recently been found for improvement of spectroscopic properties of the parent 3-hydroxyflavone chromophore. They allow shifting its absorption and fluorescence spectra to longer wavelengths, increasing the quantum yield and modulating the two-wavelength sensitivity within the desired ranges.

We developed fluorescence probes with locations at different depths and orientations of 3-HF moiety in the phospholipid bilayer, which determine their fluorescence behaviour. While the spectral shifts of the probes correlate with their binding site polarity, the intensity ratio is a complex parameter that is also sensitive to the local hydration.

The other unique sensor property of the synthesized 3-HFs is the ability to report on different properties of environment simultaneously. Its heterocyclic π electronic system, which provides the strong increase in asymmetry of charge distribution on the excited state, allows the shifts of fluorescence spectra similarly to common solvatochromic and electrochromic dyes; but since the two bands in emission originate from two separate excited states, N^* and T^* , with different magnitudes and orientations of their dipole moments, the sensitivity of these states to polarity and electric field perturbation of their microenvironment is different.

Introduction of an electron donor group in the 4'-position increased the charge-transfer nature of N^* form and made the distribution between these forms in emission very sensitive to solvent polarity. This property resulted in a variety of applications of substituted 3-hydroxyflavones as probes in the studies of organized ensembles such as micelles, phospholipid vesicles, protein molecules and polymers.

Absorbtion and fluorescence properties of synthesized derivatives were studied in solvents of different polarity. As a result of increase in charge transfer character of normal excited state, an extremely high sensitivity to solvent polarity is observed.

A red shift in absorbtion spectra is observed, in all of the studied solvents. This is a result of introduction of dioctylamino group to the parent structure. As the solvent polarity increases, the absorbtion maksima shifts to longer wavelengths.

In the fluorescence measurements, studied in different polarities of solvent, as the solvent polarity increases, a red shift in the emission bands observed.

As a result, in this study, FN8, OFN8 and MFN8 probes are synthesized to increase the nonpolar character of 3-hydroxyflavon and the biological and spectroscopical studies within this project are still continuing by our group.

1. GİRİŞ

3-hidroksiflavonlar, dikkate değer floresans özelliklere sahip bileşiklerdir. En belirgin özellikleri çevrelerinde gerçekleşen küçük değişimlere çok hassas olmaları ve bu değişimlere, birbirinden oldukça iyi ayrılmış iki emisyon bandıyla yanıt vermeleridir. İki floresans band verebilmeleri, bu moleküllerin uyarılma durumunda, iç proton transferi (Excited state intramolecular proton transfer, ESIPT) yapabilmelerinden kaynaklanmaktadır. Bu yüzden misel ve fosfolipid kesecikler gibi biyolojik sistemlerde floresans sensör olarak kullanılabilmektedirler. Günümüzde yeni floresans prob arayışları ile ilgili araştırmalar biyoteknoloji, moleküler biyoloji ve hücre biyolojisi, eczacılık, kimya, fizik ve bunlarla ilgili disiplinlerde sürdürülmektedir.

Özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla bazı 3-hidroksiflavon analogları yakın zamanda sentezlenmiş ve floresan kuantum verimlerinin artması ve istenilen aralıktaki çift dalga boyu hassasiyetinin artırılması yanında, absorpsiyon ve floresan spektrumlarında kırmızıya kayma gözlenmiştir.

Bunun yanında, özellikle biyolojik sistemlerde daha iyi iletişime girecek floresan sensörler geliştirmek için yeni 3-hidroksiflavon analoglarının sentez edilmesi önem taşımaktadır. Proben kararlılığını artırabilmek için, floresans spektrumunda konjugasyonu arttırarak bandların kırmızı alana kaymasını sağlamak ve probun özelliğini lipid yapının özelliğine benzetmek üzere probun yapısına farklı uzunluklarda hidrokarbon zincirleri yerleştirmek söz konusu olabilir.

Bu amaçla bu çalışmada, 3-hidroksiflavon'un yağsı özelliğini arttırmak üzere, elektron verici grup olarak benzaldehitin para pozisyonuna dioktil amino grupları takılması amaçlanmıştır. Nonpolar özelliği artacak olan sensörün, biyolojik sistemlerle daha iyi iletişime girmesi, biyolojik kirliliği belirlemelerinin geliştirilmesi, seçici olarak hücrelere duyarlılığının artırılması ve hücre hakkında daha fazla bilgi edinilmesi planlanmıştır.

2. TEORİK BÖLÜM

2.1 Flavonoidler

Flavon ismi Latince flavus (sarı) kelimesinden gelmektedir. Bitkilerden elde edilen ve genellikle sarı renkli olan bu bileşikler “flavonoid” olarak isimlendirilmiştir. Flavonoidler bitki kaynaklı bileşikler olup doğada yaygın olarak bulunurlar. Limon kabuğundan 1936 yılında elde edilen flavon bileşiklerinin, P vitamini adı altında, kılcal damar geçirgenliği ve kırılgenliğini düşürmede kullanılması, flavonoidlere verilen önemi artırmış oldu. Bu nedenle flavonoidlere karşı ilgi 1940’lı yıllardan itibaren hızlanmaya başladı. 1970’li yıllarda artan, flavonoidlerle ilgili çalışmaların sonucu olarak bugün bitkilerden 4000’den fazla flavonoid izole edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır [1].

Flavonoidler doğada bir milyar yıldan beri bulunmaktadır [2]. Bu uzun zaman sürecinde, gelişen organizmalarla karşılıklı etkileşimde bulundukları düşünülmektedir. Flavonoidler, doğada birçok önemli göreve sahip olduklarından, damarlı bitkilerde korunup saklanmışlardır.

Bitkilerde rastlanan bu bileşikler, önceleri çiçeklerin sarı, kırmızı, turuncu, lacivert ve benzeri renklerinden sorumlu olan pigmentler olarak biliniyorlardı. Flavonoidlere genellikle meyve, sebze, tohum, çiçek, yaprak ve dallarda rastlanır. Görüldüğü gibi, bu bileşikler insan besininin bileşiminde yer alan vazgeçilmez unsurlardır.

Flavonoidler bitkilerde antioksidan, enzim inhibitörü ve aynı zamanda ışıktan korunma gibi bir dizi önemli özelliklere sahiptir [3]. Bunlardan başka flavonoidler, bitkilerde enerjinin dönüşümüne ve büyüme hormonlarına etki ederler. Ayrıca solunumu ve fotosentezi düzenleme ve bulaşıcı hastalıklara karşı savunma fonksiyonlarına sahiptirler [4].

Yapılan araştırmalar [5] flavonoidlerin bitkilerde azotun tutulmasını düzenleyen bakteriyel genlerin aktifleştirilmesinde yer aldıklarını da göstermiştir. Bu ise, flavonoidlerle genler arasında belirgin bir ilişki olduğunu düşündürmektedir [6].

Diğer yandan flavonoidlerin, kanın bileşenleri üzerine etkisi araştırılarak, eritropoezi (eritrosit oluşumu) teşvik ettiği ve kanda lökositlerin (akyuvarlar) miktarını artırdığı açıklanmıştır. Flavonoidlerin aynı zamanda, kolesterolün seviyesini düşürerek, kanın bileşenlerine etkide bulunduğu da gösterilmiştir [7]. Quercetin, rutin ve bazı flavonollerin kalp zayıflığını kuvvetlendirme (hipodinamik), nabızı normalleştirme özelliklerinde sahip oldukları açıklanmıştır [8].

Geleneksel tıpta, son 20 yılda flavonoidlere karşı ilgi artmış ve gerçekleştirilen geniş çaplı araştırmalar sonucu, flavonoidlerin çok yönlü biyokimyasal ve farmakolojik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir. Örneğin, bu tür bileşiklerin antioksidatif, antiinflamatuvar, antimikrobiyal, antiülserojen, antiviral, hepatoprotektif ve hipolidemik etkiye sahip oldukları açıklanmıştır [9]. Bunlardan başka flavonoidlerin (quercetin ve kaempferolün) in vitro ve in vivo şartlarda antitumör ve antikarsinogenik etkilere sahip oldukları da belirtilmiştir [10].

Son yıllarda, flavonoidlerin endüstrinin çeşitli alanlarında kullanılması için yürütülen araştırmaların sayısı artmaktadır. Bu bileşiklerin, antioksidan özellikleri, çeşitli ürün ve malzemeleri boyama yetenekleri, metallerle tepkide bulunma ve tabaklama maddelerinin (tanenlerin) bileşenine katılmalarından dolayı, besin, tekstil, deri, metalurji, tıp, ziraat ve benzer alanlarda kullanılma olasılıkları artmaktadır.

Bazı flavonoidler, UV ışınlarından koruma özelliklerine sahip olmaları sebebiyle kozmetik ürünlerde, özellikle kremlerde önemli katkı maddesi olarak kullanılmaktadır. Metal iyonları ile reaksiyon verme yeteneğine sahip olduklarından analitik amaçla, uranyum, zirkonyum, titan ve diğer metallerin tayininde kullanılabilirler.

Flavonoidlerin askorbik asitle birlikte et ve et ürünlerinin proteolizini hızlandırdığı açıklanmıştır. Bu nedenle flavonoidlerin et-konserve endüstrisinde kullanılması da mümkündür.

2.1.1 Flavonoidlerin Yapı Özellikleri Ve Sınıflandırılmaları

Flavonoidler, bitkilerde yaygın olarak bulunan fenilbenzopiran iskeletine sahip bileşiklerdir. Flavonun γ -piran halkasının C-3 üzerindeki hidrojenine bir hidroksil grubu bağlandığında flavonol (3-hidroksiflavon) meydana gelir. Flavonlar doğada, hidroksil grupları serbest, metil esteri veya glikozitleri halinde bulunurlar. Erime noktaları yüksek, kristal yapıda maddelerdir. Suda, alkolde, seyreltik asitlerde ve

bazlarda çözünürler. Asitlerdeki çözünürlük, γ -piran halkasındaki oksijen atomundan ileri gelir ve oksonyum tuzları oluşur. Flavonların oksonyum tuzları çoğunlukla suda kararsızdır. Bu özellikleriyle de antosyanidinlerden ayrılırlar, çünkü antosiyandinler, kararlı oksonyum tuzları halinde bitkilerde bulunurlar. Flavonlar, bazlarda kaynatılınca fenol ve aldehite parçalanırlar.

Flavon molekülünde A ve B halkaları, aromatik halkalar gibi reaksiyona girerler. Özellikle, hidroksiflavonlar ve bunların eterleri, süstitüsyon reaksiyonlarında fenoller ya da eterleri gibi davranırlar. Bu özelliklerinden yararlanılarak, değişik reaksiyonlarla (nitrolama, bromlama gibi) özellikle hidroksiflavonların türevleri elde edilmiş ve yapıları aydınlatılmıştır.

Piran halkası, bir karbonil grubu içermesine rağmen flavonlar, karbonil reaktifleriyle reaksiyon vermezler. Grignard reaktifleri yine de karbonil grubu ile reaksiyon verir ve yalnızca susuz pirilyum tuzları izole edilebilir.

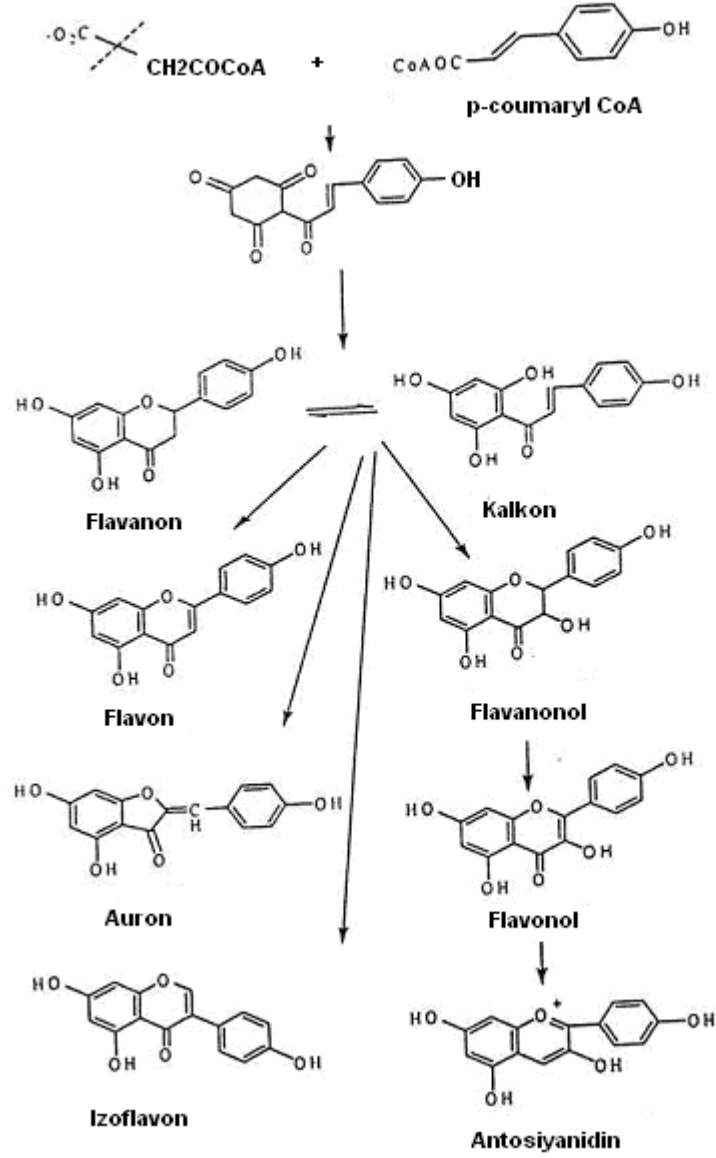
Flavonlarda bulunan çift bağ ve karbonil grubu, hidrojen atomunun farklı yollarla katılabileceği konjuge bir sistem oluşturmuştur.

Flavonoidler, her bitki türünde yaygın olarak rastlanan fenolik bileşiklerdir. Zamanla bitkilerden elde edilen flavonoid bileşiklerin çokluğu sınıflandırma zorluğuna neden olmuştur. Şekil 2.1' de değişik flavonoid bileşiklerinde ait iskelet yapılarına bazı örnekler gösterilmiştir.

Flavonoidler, bitkilerin fotosentezle sentezleyerek, yaşamsal gereksinimleri için kullandıkları karbonhidrat, amino asitler, vb. birincil metabolitlerden türerler ve bitkilerin ikincil metabolitlerinin önemli bir sınıfını oluştururlar.

Biyosentez araştırmalarından elde edilen sonuçlara göre flavonoidler fenilalanin gibi aminoasitlerin enzimatik deaminasyonlarından oluşan fenil propanoidlerin (sinnamik asit türevleri) asetil koenzim A ile kondanse olduktan sonra yine karbonhidrat metabolizması sonucu oluşan malonil koenzim A'nın üç molekülüne kondenzasyonu sonucu oluşurlar [1] .

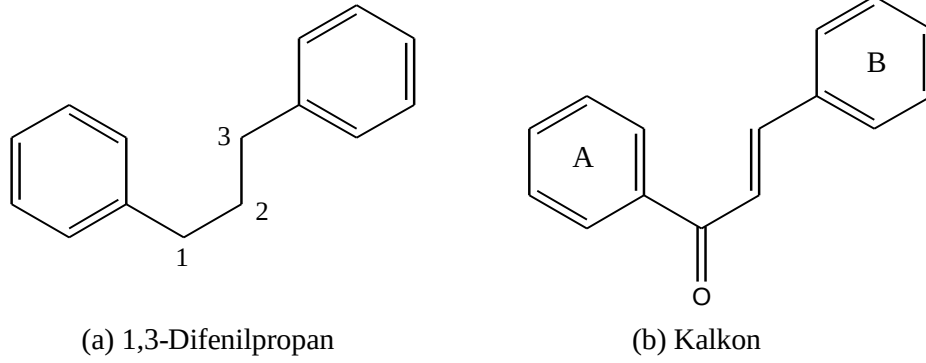
Biyosentez esnasında kalkon-flavonon izomerizasyonu, oksidasyon, çevrilme, alkilasyon ve glikolizasyon gibi birçok reaksiyon da yer alır.



Şekil 2.1: Flavonoidlerin sınıflandırılması

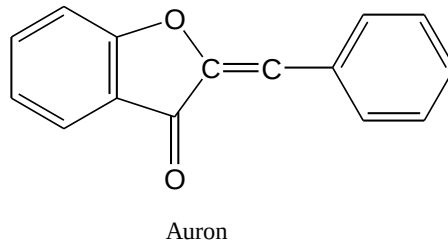
2.1.1.1 Flavonoidlerin Yapı Özellikleri

Flavonoidlerin karbon iskeletini, iki fenil halkasının propan zinciri ile birleşmesinden oluşan ve 15 karbon atomu içeren, difenilpropan ($\text{C}_6 - \text{C}_3 - \text{C}_6$) yapısı oluşturur. Fenil halkalarının propan zincirine farklı pozisyonlarda bağlanması sonucu flavonoidler alt sınıflara ayrılırlar. Bu sınıflardan birisi, fenil gruplarının propan zincirine 1.3-pozisyonlarında bağlanmasından oluşan ve 1.3-difenilpropan iskeleti içeren kalkonoidlerdir. Bunları en basit üyesi kalkondur (Şekil 2.2).



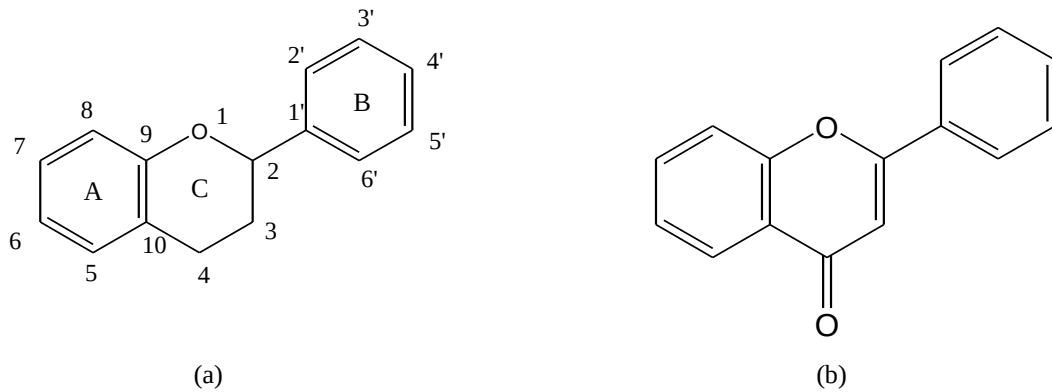
Şekil 2.2: 1,3-Difenilpropan (a) ve Kalkon (b)

1,3-difenilpropan yapısındaki propan zinciri, oksijen atomu üzerinden fenil halkası (A) ile birleşerek, beş veya altı üyeli heterosiklik üçüncü bir halka oluşturduğunda trisiklik bir sistem meydana gelir. Beş üyeli hetero halkanın oluşması ile meydana gelen trisiklik yapıya auron (Şekil 2.3), türevlerine ise auronoidler denir.



Şekil 2.3: Auron

Altı üyeli hetero halkanın oluşması ile meydana gelen trisiklik sistem ise hetero halkanın yükseltgenme derecesine bağlı olarak, iki farklı yapıda bulunabilir. Bunlardan birisi 2-fenilkroman veya fenilbenzopiran iskeletine sahip flavan, diğeri ise 2-fenilbenzo- γ -piron iskeleti içeren flavondur (Şekil 2.4).



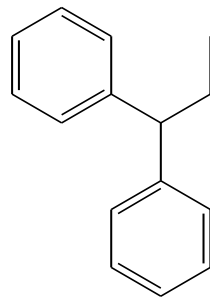
Şekil 2.4: Flavan(a) ve Flavon(b)

Genellikle flavon türevlerine flavonoidler, flavan türevlerine ise flavanoidler denir. Flavan ve flavon yapılarındaki aromatik halkalar A ve B, hetero halka ise C ile gösterilir. A ve C halkalarındaki (benzopiran çekirdeğinde) karbon atomları oksijen atomundan başlayarak numaralandırılır. B halkasındaki atomlar ise, üssü (') rakamlarla numaralandırılır. Bazı yazarlar flavonoid yapısındaki C-9 ve C-10 atomlarını C-8a ve C-4a olarak da göstermektedirler. Yukarıda söz edilen kalkon, auron, flavan ve flavon türevleri 1,3-difenilpropan iskeleti içeren bileşiklerdir.

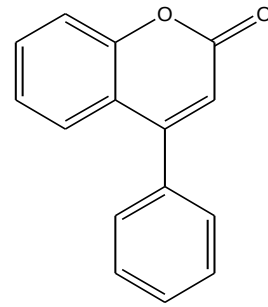
Fenil gruplarının propan zincirine 1,2-pozisyonlarında bağlanmasıyla 1,2-difenilpropan iskeleti oluşur (Şekil2.6). 1,2-difenilpropan iskeletinde, propan zincirinin uçtaki karbon atomunun (C-3) oksijen atomu üzerinden halka kapanması sonucu oluşan hetero halkalı yapıya izoflavan denir. İzoflavan yapısındaki hetero halkanın modifikasyonuna bağlı olarak izoflavon, 3-fenilkumarin ve pterokarpan meydana gelir. Bu bileşiklerin çekirdek yapıları Şekil 2.6'de verilmiştir.

Fenil gruplarının difenilpropan iskeletine 1,1-pozisyonlarında bağlanmasından oluşan ve 1,1-difenilpropan iskeleti içeren bileşikler sınıfına ise neoflavonoidler denir. (Şekil 2.5)

Görüldüğü gibi, C₆-C₃-C₆ (difenilpropan) iskeleti içeren doğal bileşikler, fenil gruplarının propan zincirine bağlanma pozisyonlarına göre flavonoid, izoflavonoid ve neoflavonoidler olmak üzere, üç ana grupta toplanırlar. Bu grupların her biri de çeşitli alt sınıflara ayrılırlar. Flavonoid yapılarında C₃-sisteminin oluşturduğu hetero halka, değişik yükseltgenme derecelerinde bulunabilir. Hetero halkanın yükseltgenme derecesi flavonoidlerin alt sınıflarını belirleyen bir göstergedir. C₃-sisteminin yükseltgenme derecesine bağlı olarak, bilinen flavonoid sınıfları ve bitkilerde yaygın olan örnekleri Tablo 2.1 ve Tablo 2.2'de verilmiştir [1].

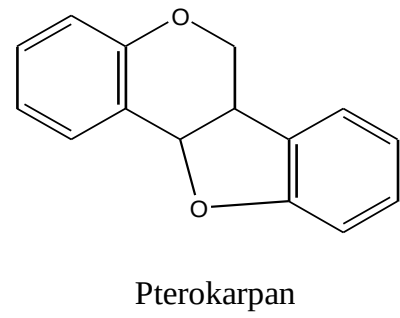
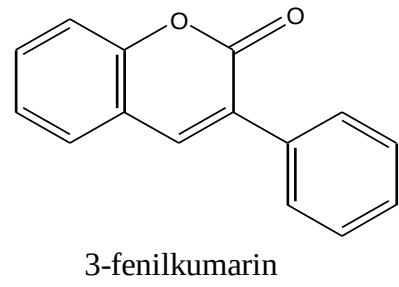
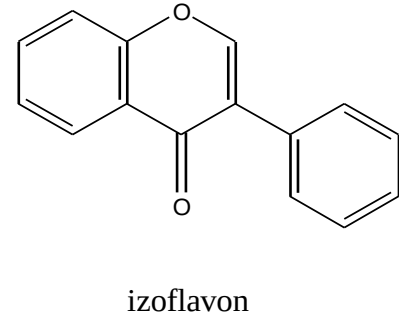
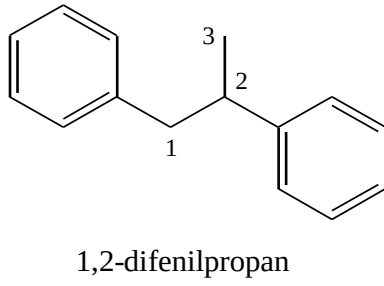
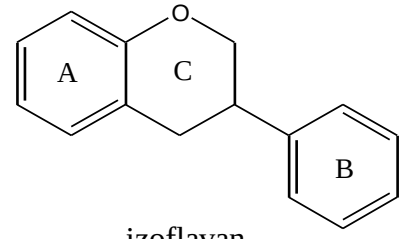


1,1-difenilpropan



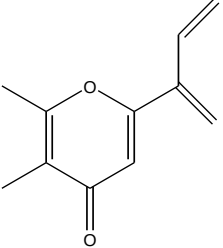
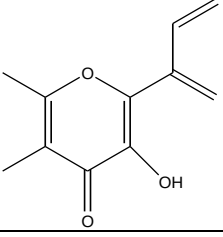
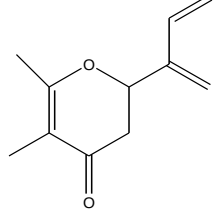
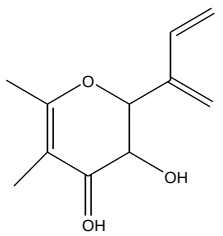
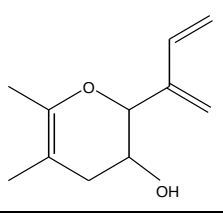
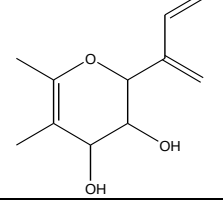
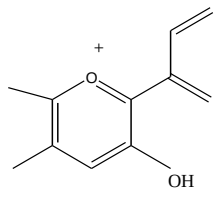
Neoflavonoid

Şekil 2.5: 1,1-difenilpropan ve neoflavonoid yapıları



Şekil 2.6: 1,2-difenilpropan iskeleti içeren flavonoidler

Tablo 2.1: Flavonoidlerin hetero halkadaki $/-C_3-/$ yapısına göre sınıflandırılması

Flavonoid Sınıfları	$/-C_3-/$ yapısı	Örnekler	A ve B halka Hidroksillerinin Pozisyonları
Flavonlar		Apigenin Luteolin	5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'
Flavonoller		Kaempferol Quercetin Myricetin	5, 7, 4' 5, 7, 3' 5, 7, 3', 4'
Flavononlar (Dihydroflavonlar)		Naringenin Bütün Eriodiktyol	5, 7, 4' 5, 7, 3' 5, 7, 3', 4'
Flavanonoller (Flavanon-3-oller)		Fussin Dihidrokaempferol Taxifolin	7, 3', 4' 5, 7, 4' 5, 7, 3', 4'
Flavan-3-oller (Katekinler)		Katekin Gallokatekin	5, 7, 3', 4' 5, 7, 3', 4', 5'
Flavan-3,4-dioller		Leucocyanidin Leucodelphinidin	5, 7, 3', 4' 5, 7, 3, 4'
Antosiyanidinler		Delphinidin Pelargonidin Cyanidin	5, 7, 3' 5, 7, 4' 5, 7, 3', 4', 5'

Tablo 2.2: Tablo 2.1'in devamı

Kalkonlar		Isoliquiritigenin Bufein	4, 2', 4'
Dihidroalkonlar		Phloretin Hidroksiphloretin	4, 2, 4', 6' 3, 4, 2', 4', 6'
Auronlar		Sulfuretin Aureusidin	6, 3', 4' 4, 6, 3', 4'

2.1.1.2 Flavonoidlerde yapı çeşitliliği

Flavonoidlerin yapı çeşitliliği, difenilpropan iskeletinin farklı yapılarda düzenlenme özelliğinin yanı sıra, her sınıf içinde, molekülün aromatik (A ve B) halkalarına bağlanan süstitüenlerin sayısı, özelliği ve bağlanma pozisyonlarına göre ortaya çıkar.

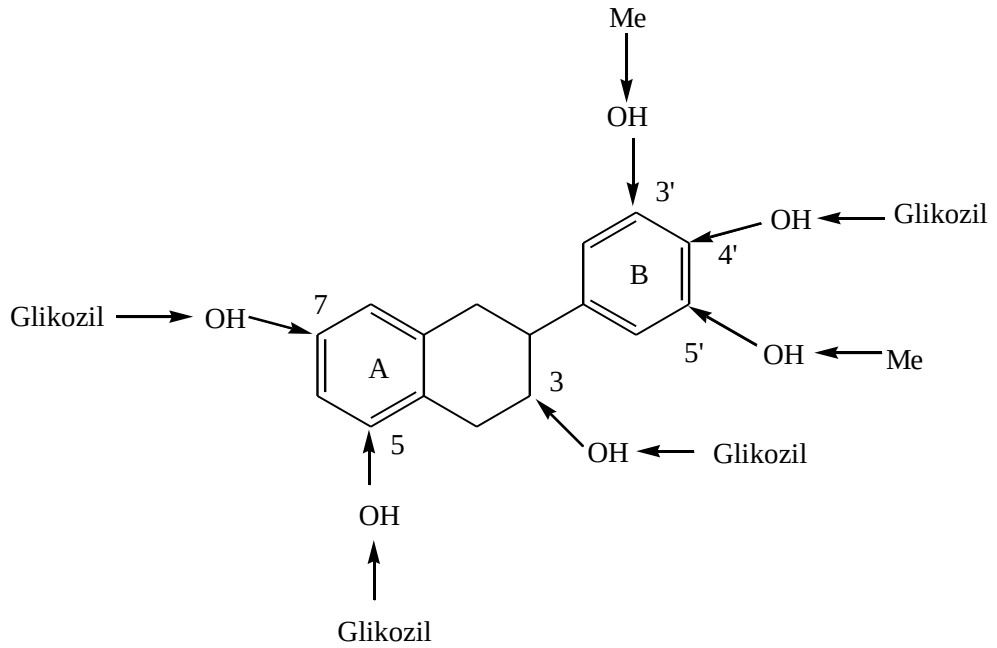
Hidroksil grupları, flavonoid yapılarında bulunan en yaygın süstitüentlerdir. Bu biyosentetik yolla olur. Doğal flavonoidlerin yapısında en fazla yedi hidroksil grubunun bulunduğu bilinmektedir. A halkasının genellikle floroglusin tipi hidroksillenmeye (C-5 ve C-7 pozisyonlarında) yatkın olduğu gözlenmiştir. Ancak, A halkasının başka pozisyonlarda da hidroksillendiği flavonoidler doğada yaygındır. Örneğin C-6 ve C-8 pozisyonlarının hidroksillendiği flavonoidler çeşitli bitki türlerinde bulunmuştur. B halkasında ise genellikle C-4' pozisyonu, çoğu zaman da C-3' ve C-5' pozisyonları hidroksillenmiştir. Son iki pozisyonadaki (C-3' ve C-5') hidroksil grupları çoğu kez metilenmiş halde bulunurlar. Aromatik halkalardaki hidroksil grubu içermeyen veya C-2' pozisyonu hidroksillenmiş flavonoidlere doğada ender rastlanır.

Flavonoidlerin yapısındaki hidroksil grupları, reaktif özelliklerinden dolayı, kolaylıkla alkilenir veya glikozillenirler. Bu nedenle, flavonoidlerin metoksi ve

glikozil türevlerine bitkilerde sık rastlanır. Metoksi flavonodilerin yapılarında birden yediye kadar metoksil grubuna rastlanmaktadır. Ancak, doğada mono-, di- veya trimetoksi flavonoidlere daha sık rastlanır. Flavonoidlerin C-5 ve C-7 pozisyonlarındaki hidroksil gruplarının metilenmesine pek sık rastlanmaz. Flavonoid yapılarında süstitüentlerin genel yerleşme pozisyonları Şekil 2.7’de verilmiştir.

Bitkilerde flavonoidlere çoğunlukla mono-*O*-glikozitler halinde rastlanır. Ancak, di- ve trisakkaritlerle glikozillenmiş flavonoidler de doğada yaygındır. Flavonoidlerin, özellikle antosiyanidin ve flavonollerin, 3-*O*- glikozitlerine daha sık rastlanır. Ancak C-7, C-4’ ve C-5’ pozisyonları glikozillenmiş flavonoidlere de doğada rastlanmaktadır. Bitkilerde rastlanan flavonoid glikozitlerin diğer bir türü de C-glikozitlerdir [1].

Aglikonların glikozillenme derecesi, şeker kalıntılarının aglikona bağlanma pozisyonları, şekerlerin oksit halkasının yapısı ve glikozit bağlarının konfigürasyonu flavonoidlerin çeşitliliğinin nedenlerindendir.



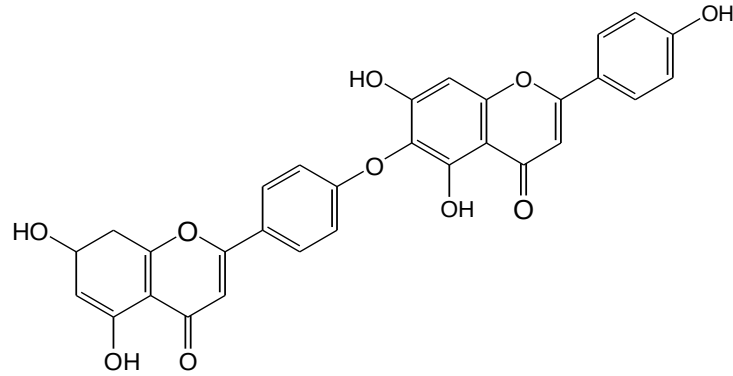
Şekil 2.7: Flavonoid yapılarında süstitüentlerin en yaygın yerleşme pozisyonları

Sülfatlanmış flavonoidler, bitkilerde bulunan, başka bir flavonoid grubudur. Bunlar, molekülde bulunan bir veya birkaç hidroksile ya da şeker kalıntısına sülfat grubunun bağlanmasıyla oluşur.

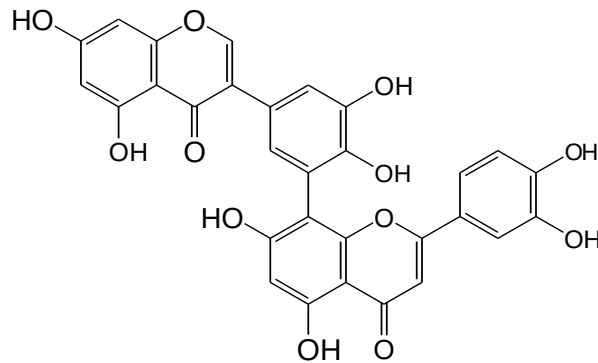
Hiç şüphesiz, doğada yukarıda sözü edilenlerden farklı pozisyonlarda da hidroksillenmiş, metoksillenmiş veya glikozillenmiş flavonoidler de bulunmaktadır.

Bitkilerde flavonoidlerin dimer formları da yaygındır. Bu tür bileşikler biflavonoid olarak adlandırılırlar. Biflavonoidler monomer flavonoid moleküllerinin kondenzasyonu sonucu oluşurlar. Çoğu flavonoidler bu tür reaksiyonlara girme yeteneğine sahiptirler. Biflavonoid yapılarında, flavonoid birimleri birbiriyle –O-, -C- veya –C-C- bağı ile bağlanmıştır. Biflavonoidler ilk olarak 1970’li yıllarda bulunmuştur. Biflavonoid molekülünde iki flavon, iki flavonon veya katekin, flavon flavanon birbiriyle birleşmiş haldedir. Monomer katekin birimlerinden oluşan biflavonoidlere proantosiyanidinler de denir. Başka flavonoid sınıflarının örneğin, kalkon, auron ve izoflavonların biflavonoidleri de bilinmektedir. Bitkilerde iki molekül apigeninden oluşan biflavonoidler daha yaygındır [1].

Biflavonoid yapılarında, flavonoid birimleri değişik yollarla bağlanabilirler: flavonoid birimleri yalnız A-A, B-B ve C-C halkalarının bağlanmasından oluşabildikleri gibi, aynı zamanda farklı halkaların (örneğin A ve B halkası) bağlanmasıyla da oluşabilirler. Monomer birimleri –C-C- ve –O- bağlı biflavonoidlere ait örnekler Şekil 2.8’de verilmiştir.



Hinokiflavon



Bryoflavon

Şekil 2.8: Hinokiflavon ve Bryoflavon

2.1.1.3 Flavonoid sınıfları

Flavonoidleri iskelet yapısında keto grubunun varlığına göre, “onoidler” keto grubu içerenler ve “anoidler” keto grubu içermeyenler, olmak üzere iki gruba ayırmak da olasıdır.

Flavon, izoflavon, neoflavon, kalkon ve auron türevleri onoid grubuna, flavan, izoflavan, kalkan ve pterokarpan türevleri ise anoid grubuna aittir.

2.1.2 Flavonlar

Flavonoidlerin bitkilerde sıkça rastlanan bir sınıfı flavonlardır. Çekirdek iskeletleri Şekil 2.4’de verilmiştir. Bu bileşiklerin hetero halkasında C-2 ve C-3 atomları arasında çift bağın bulunması karakteristiktir. Flavonlar, flavononların 2,3-dehidro türevleridir. Bitkilerde hem serbest (aglikon), hem de glikozitleri halinde bulunurlar. Günümüzde bitkilerden 300’ün üzerinde flavon aglikon izole edilmiştir.

Flavonların basit üyeleri, aromatik halkalarda hidroksil ve/veya metoksil grupları içeren türevleridir. Yapılarında yalnız oksijen fonksiyonu (hidroksi ve/veya metoksil grupları) içermelerinden dolayı, bu grup bileşiklere, oksijenli veya O-süstitüye flavonlar da denir. Flavonların O-süstitüye türevleri doğada yaygındır. Flavonlar yapılarında bulunan, O-süstitüentlerin (hidroksil ve metoksil gruplarının) sayısına bağlı olarak gruplandırılabilirler [15].

Yapılarında O-süstitüentler yanında izoprenil, geranil, metilendioksi ve başka grupların da bulunduğu, değişik flavon türevleri doğada yaygındır. Süstitüentlerin türüne bağlı olarak flavonlar genellikle, hidroksil ve/veya metoksil içeren (O-süstitüye) basit flavonlar, ya da bu gruplar beraberinde başka süstitüentleri de içeren karmaşık flavonlar olmak üzere iki büyük gruba ayrılırlar.

2.1.2.1 Hidroksil ve metoksil içeren flavonlar

O-süstitüye flavonlar yapılarında bulunan hidroksil ve/veya metoksil gruplarının sayısına bağlı olarak gruplandırılırlar. Yapılarında bir hidroksil veya metoksil grubu içeren flavon türevlerine mono-O-süstitüye flavonlar, iki hidroksil veya iki metoksil ya da bir hidroksil ve bir metoksil grubu içerenlere ise di-O-süstitüye flavonlar denir. Toplam hidroksil ve/veya metoksil sayısı üç olan flavonoidler tri-O-süstitüye flavonlardır. Çeşitli bitki türlerinden tetra-, penta-, hekza- ve hepta-O-süstitüye flavonlar da izole edilmiştir.

2.1.3 Flavonoller

C halkasının en fazla yükseltgendiği flavonoid sınıfı, flavonollerdir. C-3 pozisyonunda hidroksil grubu içeren 2-fenilbenzo- γ -piran çekirdeği içerdiklerinden dolayı, flavonollere 3-hidroksiflavonlar da denilebilir. Flavonoller, flavonoidlerin bitkilerde en çok rastlanan ve yapı çeşidi en fazla olan sınıfıdır.

Flavonoller, kristalsi veya amorf özellikli olup, flavonlar gibi açık sarı veya sarı renklidirler. Bu bileşikler genellikle oksijenli ortamda, flavonlara göre daha dayanıksızdırlar.

Değişik pozisyonlarda hidroksil ve/veya metoksil grupları içeren flavonol türevleri doğada daha yaygındır. Günümüze kadar bitkilerden 400'ün üzerinde flavonol aglikon izole edilmiştir.

Flavonoller de, flavonlar gibi, yapılarında bulunan hidroksil ve/veya metoksil gruplarının sayısına bağlı olarak gruplandırılabilirler. Flavonol çekirdeğinde hidroksil grubu bulunduğundan, böyle bir sınıflandırmada, C-3 pozisyonundaki hidroksil grubu dikkate alınmaz [1].

2.1.4 Kalkonoidler

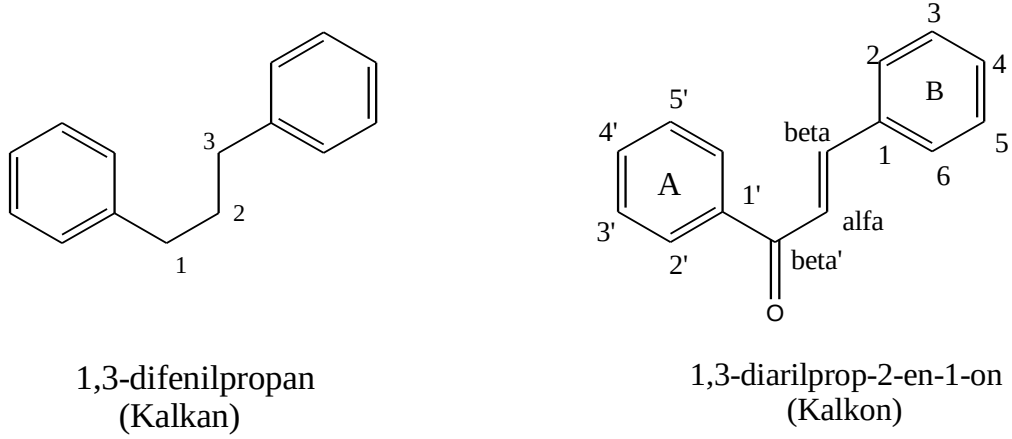
Kalkonoidler, molekül yapılarında $C_6-C_3-C_6$ karbon iskeletine sahip, iki aromatik halkalı bileşiklerdir. Bu bileşiklere, piran halkası açılmış flavonoidler olarak bakılabilir. Kalkonoidler her ne kadar flavonoid değilse de, biyogenetik ve kimyasal yönden flavonoidlere çok yakın olduklarından bu sınıfa dahil edilirler. Kalkonoidlerin, biyosentez sırasında farklı flavonoid gruplarının önceli oldukları düşünülür. Asit etkisiyle kalkonoidler kolayca flavononlara dönüşürler.

Kalkonoidlerin bazı üyeleri geniş spektruma sahip biyolojik aktivite gösterirler [11]. Kalkonoidler suni tatlandırıcı, ısı ve ışığa karşı koruyucu ve diğer amaçlarla kullanılır[12].

Kalkonoid terimi, 1,3-difenilpropan (Şekil 2.9) ve buna olefinik bağ, keto ve/veya hidroksil grubu takılması ile değiştirilmiş karbon iskeleti içeren tüm bileşikler için kullanılır. 1,3-difenilpropan iskeletinin modifikasyonuna bağlı olarak kalkonoidler birkaç gruba ayrılırlar.

2.1.4.1 Kalkonoidlerin Yapı Çeşitliliği

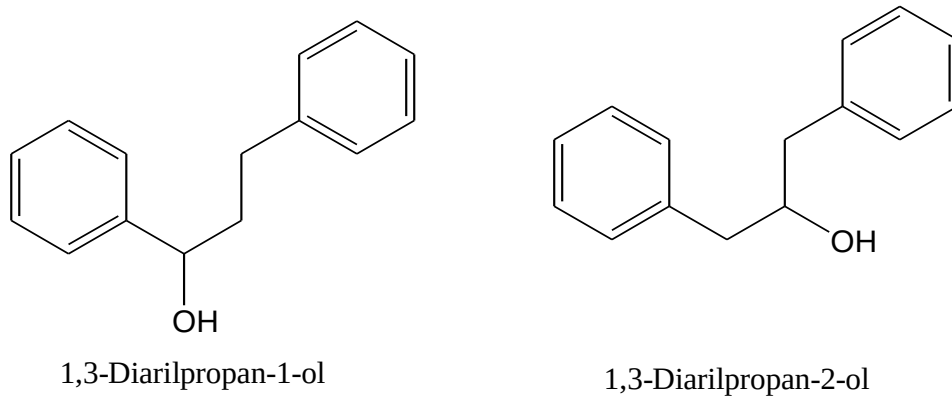
Kalkonoidlerin en yaygın grubu, 1,3-difenilpropan iskeletinin propan zincirine çift bağ ve karbonil grubu takılmasından oluşan, 1,3-diarilprop-2-en-1-on (Şekil 2.9) karbon iskeleti içeren kalkonlardır.



Şekil 2.9: Kalkan ve kalkon bileşiklerine örnekler

Kalkonoidlerin adlandırılması flavonoidlerinkine benzer. Buna göre, C₃ zincirinde olefinik bağ ve keto grubu içermeyen, yani 1,3-diarilpropan iskeletine sahip kalkonoidler “kalkan” olarak isimlendirilirler.

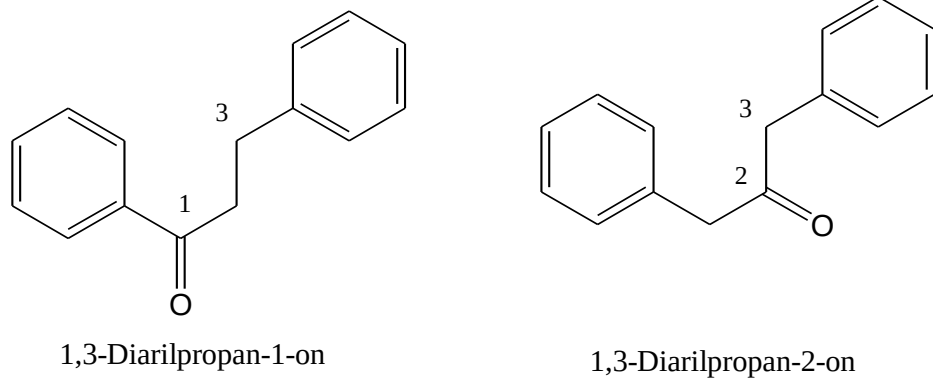
Kalkanların 1,3-difenilpropan-1-ol ve 1,3-difenilpropan-2-ol karbon iskeleti içeren hidroksi türevleri “kalkanol” olarak adlandırılırlar. Kalkanollarin adlandırılmasında, yapıda bulunan hidroksil grubunun pozisyonunu göstermek için, α ve β örnekleri kullanılır. Şöyle ki, 1,3-diarilpropan-1-ol türevleri β kalkanol, 1,3-diarilpropan-2-ol türevleri ise α -kalkanol olarak isimlendirilir(Şekil 2.10).



Şekil 2.10: β -Kalkanol ve α -Kalkanol

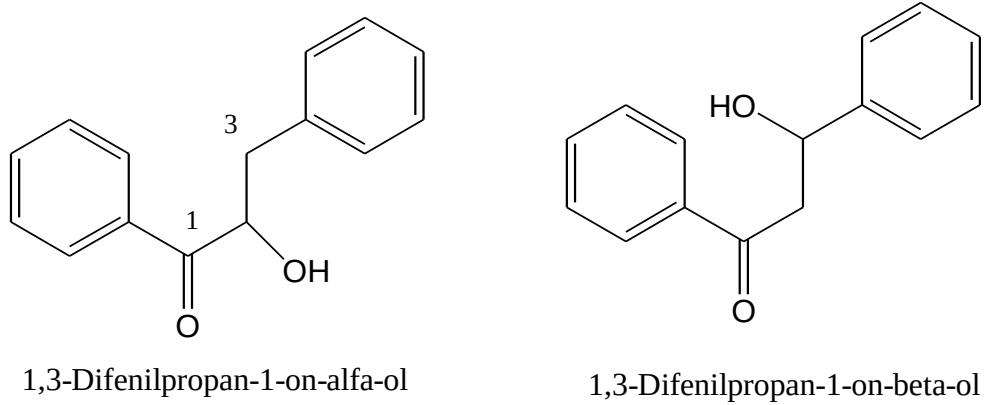
Kalkan yapısındaki C₃-zincirinin herhangi bir karbon atomuna keto grubu bağlanmasından oluşan bileşiklere kalkanonlar denir. C₃-zincirinde C-1 pozisyonu

keto grubu içeren kalkanonlara 1,3-diarilpropan-1-on (β' -Kalkanonlar) veya dihidrokalkanon, C-2 pozisyonunda keto grubu bulunan kalkanonlara ise 1,3-diarilpropan-2-on veya α -kalkanonlar (Şekil 2.11) denir.



Şekil 2.11: β' -Kalkanon ve α -Kalkanon

C₃ zincirinde hidroksil grubu içeren kalkanlar “kalkanol” olarak adlandırıldıkları gibi, bu zincirde hidroksil grubu içeren kalkanon türevleri de kalkanonol olarak isimlendirilirler. Doğada β' -Kalkanonun hidroksi türevlerine (C₃ zincirinde) rastlanmaktadır. Bu bileşikler hidroksil grubunun C₃ zincirindeki pozisyonuna bağlı olarak β' -Kalkanon- α -ol ve β' -Kalkanon- β –ol (Şekil 2.12) olarak adlandırılır.



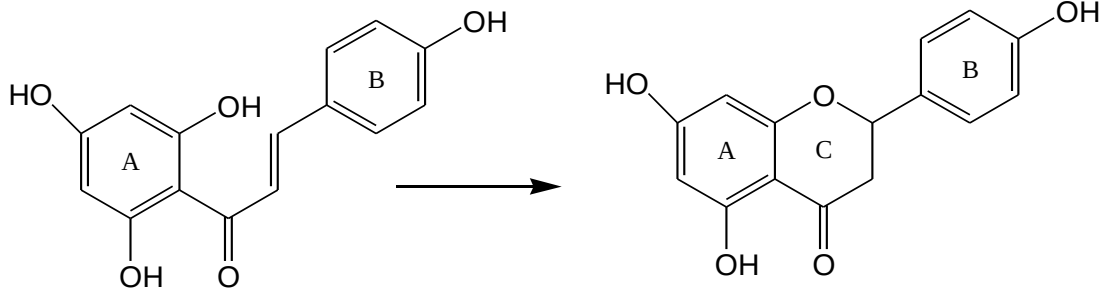
Şekil 2.12: β' -Kalkanon- α -ol ve β' -Kalkanon- β –ol

2.1.4.2 Kalkonlar

Kalkon terimi 1,3-diarilprop-2-en-1-on (Şekil 2.9) iskeleti içeren tüm bileşikler kapsar. Bu bileşiklerin karakterisitik özellikleri, propan zincirinde olefinik bağ ve keto grubunun bulunmasıdır.

Kalkonlar ve dihidrokalkonlar (kalkanonlar), flavonoidlerden farklı olarak heterosiklik C halkasına sahip değildir. Kalkon yapısındaki A halkası biyosentetik olarak heterosiklik flavonoidlerin A halkasına, B halkası ise flavonoidlerin B

halkasına eşdeğerdir. Bu ilişki daha açık olarak 2', 4', 6', 4-tetrahidroksikalkonun (kalkononaringenin) 5,7,4'-trihidroksiflavanona (naringenine) (Şekil 2.13) dönüşümünde izlenebilir[1].



Şekil 2.13: Kalkononaringenin naringenine dönüşümü

Kalkonlar 1,3-diarilprop-2-en-1-on iskeletine farklı süstitüentlerin bağlanmasından dolayı birkaç gruba ayrılırlar.

1. Basit Kalkonlar
2. Kinokalkonlar
3. Alkillenmiş Kalkonlar
4. β -Kalkonlar
5. β -Metoksikalkonlar

2.1.4.3 Basit kalkonlar

Basit kalkonlar, 1,3-diarilprop-2-en-1-on iskeleti içeren kalkon türevleridir ve bitki aleminde yaygındırlar. Basit kalkonların A ve B ya da her iki halkada çeşitli süstitüentler (-OH, OCH₃) içeren çok sayıda türevleri bilinmektedir[1].

A halkasındaki O-süstitüentlerin (hidroksil ve/veya metoksil gruplarının) pozisyonuna bağlı olarak basit kalkonlar birkaç gruba ayrılırlar.

- a) A halkası mono-O-süstitüye kalkonlar,
- b) A halkası rezorsinol tipi O-süstitüye (2',4'-dioksi) kalkonlar,
- c) A halkası floroglusinol tipi O-süstitüye (2',4',6'-trioksi) kalkonlar.

2.1.5 Flavonoidlerin Tanınmaları

2.1.5.1 Renk Reaksiyonları:

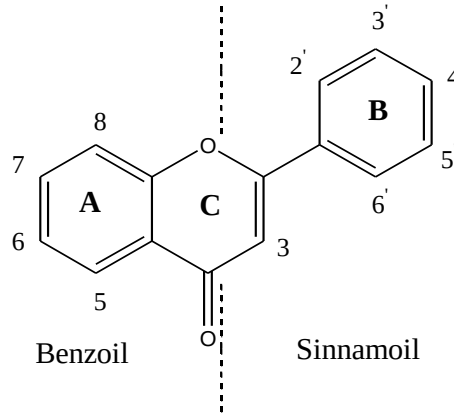
Günümüzde en çok kullanılan renk reaksiyonları, kromotogramlardaki flavonoid lekesini doğrudan UV ışık altında inceleme ve yine bu lekenin NH₃ buharına tutulup

NA(Naturstoffreagenz A) belirteci püskürtüldükten sonra UV ışık altında göstermiş olduğu renk değişikliğinin incelenmesidir. Bu yöntemle flavonoid bileşiğin tipi ve sübstitüsyonları hakkında kabaca ön bilgi edinmek mümkün olmaktadır. (Tablo 2.3).

2.1.5.2 Ultraviyole (UV) Spektrumu

UV spektroskopisi, analiz için düşük miktarlarda numunenin yeterli olması ve UV cihazının kolay bulunabilmesi bakımından, flavonoidlerin yapı tayininde sıklıkla kullanılan bir yöntemdir.

Bileşiğin metanoldeki çözeltisinin spektrumu ve özel belirteçlerle bu spektrumda gözlenen kaymalar, bileşiğin ana iskeleti ile sübstitüsyon durumları hakkında geniş bilgi verir [1]. Flavonoid bileşiklerinin çoğunda, UV spektrumunda biri uzun diğeri kısa dalga boyunda olmak üzere iki büyük absorbsiyon bandı gözlenir. Bunlardan uzun dalga boyunda olanı flavonoid yapının B halkası ile ilişkilidir ve Bant I adını alır. Kısa dalga boyunda olanı ise A halkası ile ilişkilidir ve Bant II adını alır (Şekil 2.14).



Şekil 2.14: Bant I ve Bant II'yi gösteren gruplar

Flavonoid bileşiklerde A ve B halkalarında hidroksil sayısı arttıkça bantlar uzun dalga boyuna doğru kayar. Hidroksil grupları (özellikle 3,5 ve 4' konumundakiler) metillendikleri ya da glikozitlendikleri takdirde bantlar hidroksil grupları serbest olan bileşiğe göre daha kısa dalga boyuna kayarlar.

Tablo 2.3: Flavonoidlerin renk reaksiyonları

UV	UV/NH3	UV/NA	Flavonoid bileşik
Koyu mor	Koyu mor	Koyu mor	5-OH açık, 3-OH yok ya da kapalı, 3',4'-OH yok veya kapalı.
Koyu mor	Koyu mor	Sarı	5-OH açık, 3-OH yok ya da kapalı, 4'-OH kapalı, 3'-OH açık.
Koyu mor	Sarı	Turuncu	5-OH açık, 3-OH yok ya da kapalı, 4'-OH serbest, 3'-OH yok ya da kapalı.
Koyu mor	Sarı	Turuncu	5-OH açık, 3-OH yok ya da kapalı, 3',4'-OH açık.
Koyu mor	Koyu kahverengi	Kahverengi	5-OH açık, 3-OH yok ya da kapalı, 3' ya da 4'-OH açık, 6-OH bulunabilir.
Koyu mor	Koyu kahverengi	Turuncu	5-OH açık, 3-OH yok ya da kapalı, 3',4'-OH açık, 6-OH bulunabilir.
Sarı	Sarı	Sarı	Serbest 3 ve 5-OH var.
Sarı	Sarı	Turuncu-Kırmızı	3,5-OH açık, 3',4'-OH var.
Parlak floresans mavi	Parlak floresans mavi-yeşil	Mavi	5-OH yok ya da kapalı, 3-OH yok ya da kapalı.

2.1.5.3 METANOLDEKİ SPEKTRUMU:

Değişik iskeletlere sahip flavonoid bileşiklerinin metanoldeki UV absorpsiyonları da farklıdır. Flavonlarda Bant I, 304-350 nm arasında, flavonollerde ise 352-386 nm arasında yer alır. Bant II, 5,7-disüstitüe flavonlarda 240-260 nm ve flavonollerde 260-270 nm'de izlenir. Flavon ve flavonollerde A halkasında 6 ve 8 konumlarında oksijen bulması Bant II'nin uzun dalga boylarına doğru kaymasına neden olur.

UV kayma belirteçleri ile alınan spektrumlar (MeOH/NaOMe) flavonlarda hidroksil gruplarının (özellikle 3', 4', 3 ve 7 konumundaki) serbest olup olmadığı ve diğer süstitüentlerin yeri hakkında önemli bilgiler verir.

2.1.5.4 NMR Spektrumu ile Flavonoidlerin yapı Analizi

A halkası protonları:

5,7-dihidroksi flavonlarda C6 ve C8 protonları 5.7-6.9 ppm arasında ($J=2.5$ Hz) iki dublet olarak gözlenir. 6 veya 8'de de süstitüent varsa, C6 ve C8 protonu 6-6.5 ppm arasında bir singlet olarak görülür. Sadece C7'de bir hidroksil grubu bulunuyorsa, C6 protonu hem C8'deki hem de C5'teki protonlarla orto ve meta etkileşiminden J değeri 9 ve 2.5 Hz olan bir dublet-dublet halinde, C8 protonu ise J değeri 2.5 Hz olan bir dublet halinde, 5,7-dihidroflavonlarda gözlenenden daha alt

alandan çıkarken C5 protonu C6 protonuyla orto etkileşmesi ile J değeri 9 Hz olan bir dublet halinde 8 ppm civarında gözlenir.

B-halkası protonları:

C4 süstitüye flavonlarda B halkasının serbestçe dönebilmesine bağlı olarak C2' ve C6' ile C3' ve C5' protonları orto etkileşimli J değeri 8-9 Hz olan iki dublet halinde 6.5-7.9 ppm arasında görülür. C3' ve C5' protonlarının dubletleri genellikle C2' ve C6' protonlarından daha üst alanda görülürler.

3', 4' disüstitüye flavonlarda C5' protonu J değeri 8.5 Hz olan bir dublet halinde 6.7-7.1 ppm arasında çıkar. C2' ve C6' protonlarından C2' protonu J=2.5 Hz olan bir dublet halinde (meta etkileşimi), C6' protonu ise hem orto hem meta etkileşiminden dolayı J=2.5 e J=8.5 Hz olan bir dublet halinde görülür, ancak C2' ve C6' bantları birbirini üzerinden aştıklarından genellikle 7.2-7.9 ppm arasında bir multiplet olarak gözlenirler. Flavonlarda C halkasındaki C3 protonu 6.3 ppm civarında keskin bir singlet halinde gözlenir.

Metoksi protonları:

Genellikle 3.5-4.1 ppm arasında çıkarlar. Farklı çözücülerde alınan spektrumlarda 3, 6 ve 8 konumlarındaki metoksi grupları çok az kayarken 3', 4', 2' ve 7 konumlarındaki metoksi grupları üst alana doğru 0.35-0.70 ppm'lik bir kayma göstermişlerdir. En büyük kayma 7'deki metoksi grubu için gözlenmiştir.

2.1.5.5 Flavonoidlerin Kütle Spektrumu

Flavonoid aglikon ve glikozitlerinin yapısal analizlerinde kütle spektrumu ile tamamlayıcı bilgiler sağlanır. Az miktardaki numuneler için de çalışma kolaylığı sağladığından, flavonoidlerin yapı analizlerinde sıklıkla kullanılır. Çoğu flavonoid aglikonları şiddetli moleküler iyon (M⁺) piki verirler, hatta bu genellikle spektrumdaki ana piktir. Flavonoid glikozitleri uçucu özelliklerinin az olması nedeniyle nadiren moleküler iyon verirler, bu nedenle de kütle spektrumunda türevleri halinde incelenirler [1].

2.1.6 FLAVONLARIN DOĞAL KAYNAKLARDAN İZOLASYONU

Kolon kromatografisi, büyük miktardaki flavonoid karışımlarının ayrılmasında kullanılan bir yöntemdir. Küçük miktarların ayrılması için preparatif ince tabaka ya da kağıt kromatografisi yöntemi kullanılabilir.

2.1.6.1 Kolon Kromotografisi

Bu yöntemde kullanılan adsorbanlar;

Poliamid: Flavonoid bileşikler için ayırma gücü yüksek olduğundan kolon kromotografisinde en çok kullanılan adsorban poliamiddir. Flavonoidlerin ayrılmasında rol oynayan faktör poliamid molekülündeki $-NH_2$ ve $C=O$ gruplarının fenolik OH'larla hidrojen bağı yapmasıdır.

Silikajel: İzoflavonlar, flavanonlar, dihidroflavonoller ve polimetoksi flavonlar için tercih edilir.

Selüloz: Özellikle mikrokristal tipi kullanılır. Bu adsorban ile çeşitli flavonoid aglikon ve glikozidler kolaylıkla en iyi şekilde ayrılırlar. Selüloz kolon kromotografisinde gerek adsorbsiyon gerekse partisyon yöntemine göre ayırım yapılabilir.

Sefadeks LH-20: Flavonoid bileşiklerin saflaştırmasında jel geçirgenlik kromotografisi esasına dayanarak ayırım sağlayan sefadeks jellerdir. Özellikle organik çözücülerle çalışma olanağı veren Sefadeks LH-20 tipi bu amaçla sıklıkla kullanılmaktadır.

Bu adsorbanlardan başka bazı hallerde alumina, magnezyum silikat ve iyon değiştirici reçineler de flavonoidlerin ayrılmalarında çok daha az olmalarına rağmen kullanılmaktadır.

2.1.6.2 İnce Tabaka Kromatografisi

Bu yöntemde çeşitli adsorbanlarla preparatif ince tabaka kromatografisinde yapılan ayırmaların yanı sıra eskiden beri preparatif tek veya iki boyutlu kağıt kromatografisi de kullanılır.

Preparatif kağıt kromatografisinde kullanılan kağıtlar analitik çalışmalarda kullanılan tiplerinden daha kalındır (Örneğin Whatman 3 MM).

Preparatif çalışmalarda çok az miktarda olan flavonlar da elde edilebilmekte ve yapıları aydınlatılabilmektedir. Özellikle az miktardaki flavonoidlerin UV, kütle spektrumu ve 1-2 mg ile çalışılabilen, yüksek rezolüsyona sahip, NMR spektral analizleriyle yapı tayini mümkün olmaktadır.

Bu yöntemlerden başka uçucu türevleri haline getirilmiş flavonların gaz kromatografisinde ya da yüksek basınçlı sıvı kromatografisinde (HPLC) ayrılmaları

mümkün olmaktadır. Hatta gaz kromatografisi-kütle spektrumu (GC-MS) veya HPLC-kütle spektrometresi aletleri ile birlikte kullanılıp doğrudan yapı analizleri de yapılabilmektedir.

Ayrıca özellikle biflavonoidler ve neoflavonoid denilen 4-fenil-kumarinlerin yapılarının tayininde ^{13}C NMR spektrumları son derece yararlı olmaktadır.

2.1.7 Flavonoidlerin Tıbbi ve Biyolojik Özellikleri

Bazı flavonoidlerin biyolojik aktivite göstermesinden dolayı, flavonoidlere karşı ilgi 1940'lı yıllardan itibaren artmaya başlamıştır. Bu ilginin başlıca nedenlerinden biri, 1936 yılında limon kabuklarından elde edilen flavonoidli bir preparatın P-vitamini aktivitesi göstermesi olmuştur [1].

Flavonoidlerin ilk olarak belirlenen biyolojik özelliği kılcal damar duvarlarına olumlu etkileridir. Genellikle kan sızdırmanın önlenmesinde, kırılganlık ve geçirgenliğin ortadan kalkmasında, bu bileşiklerin kılcal damar sistemine olumlu etkisi kendini göstermiştir. Flavonoidlerden flavon ve flavonoller, katekinler, leykantosiyanidinler ve flavononların kılcal damarların tedavisinde etkili oldukları tespit edilmiştir. Flavonoidlerin kan damarlarına olumlu etkisinin, spazmolitik özelliklerinden ileri geldiği gösterilmiştir [13].

Flavonoidlerin kanın bileşenleri üzerine etkisi de açıklanmıştır. Örneğin, Hedusarum L. Türünün toplam flavonoidlerinin eritropoezi (eritrosit oluşumu) teşvik ettiği ve kanda lökositlerin(akyuvarlar) miktarını artırdığı açıklanmıştır. 3-metilflavonoidlerin kanın formülü elementlerine (bu elementler kan hücrelerinin agregasyon ve sedimentasyonunu önlerler) etki gösterdikleri de belirtilmiştir [41].

Flavonoidler kan damarlarına etkileriyle birlikte, zayıf kardiyotonik (kalp kuvvetlendirici) maddeler olarak da bilinirler. Bunlar kalp ritimlerinin kısılmasını sınırlama ve amplitüdünü artırma özelliği gösterirler. Başka bir araştırma sonucuna göre quercetin, rutin ve bazı flavonoller zayıf (hipodinamik) kalbi kuvvetlendirme, nabızı normalleştirme özelliğine sahiptirler. Bazı flavonoidlerin zayıf hipotansif etki gösterdikleri de açıklanmıştır.

Flavonoidlerin en önemli özelliklerinden biri de, karaciğer fonksiyonuna olumlu etkileridir. Flavonoidlerin safra salgılanmasını hızlandırdıkları, karaciğerin barbiturat ve arsenik gibi bileşiklere karşı detoksikasyonuna etki ettikleri açıklanmıştır. Flavonoidlerin detoksikasyon etkisinin nedenlerinden birinin, idrar kovucu

özellikleri olduğu gösterilmiştir. Bazı flavonoidler bağırsakların kuvvetini yükselterek, hazım prosesine olumlu etki gösterirler.

Flavonoidlerin pratik kullanım amacı ile incelenmeleri 1970’li yıllarda daha da hızlanmaya başlamıştır. Gerçekleştirilen geniş çaplı araştırmalar sonucu flavonoidlerin çok yönlü biyokimyasal ve farmakolojik aktivitelere sahip oldukları belirlenmiştir. Örneğin, bu tür bileşiklerin antioksidan özelliğe, antimikrobiyal, antiülserojenik, antiviral, hepatoprotectiv, hipolidemik ve iltihaba karşı etkiye sahip oldukları açıklanmıştır. Bunlardan başka flavonoidlerin (quercetin ve kaempferolun) antimitojenik ve antikarsinojenik etkilere sahip oldukları in vitro ve in vivo şartlarda belirlenmiştir [14].

2.1.7.1 Flavonoidlerin Antioksidatif Etkileri

Antioksidanlar, düşük konsantrasyonlarda organik bileşiklerin nonenzimatik, serbest radikal mekanizmalı oksidasyonunu önleyen bileşiklerdir.

Son zamanlarda besin kimyası ve koruyucu tıbbın bitki kaynaklı doğal antioksidanlara karşı ilgisi artmaktadır. Bunun nedeni, sentetik antioksidanların (butilhidroksianizol ve butilhidroksitoluen gibi) kanserojen olarak düşünülmesidir. Doğal antioksidanlar ise, insan organizması için genellikle zararsız olup yan etki göstermezler. Doğal antioksidanlar gıda sanayinde besinlerin bozunmasını önlemek, lipidlerin ve vitaminlerin parçalanmasını, besin rengini korumak için kullanılan önemli katkı maddeleridir. Flavonoidlerin antioksidatif özelliklerinden dolayı onlara karşı ilgi gittikçe artmaktadır [43].

Canlı organizmanın, serbest radikallerin etkisinden korunması için, antioksidatif korunma sistemine sahip olduğu bilinmektedir. Bazı durumlarda, antioksidatif koruyucu sistemin yetersiz kalmasından dolayı, serbest radikal oluşumunda belli bir artma meydana gelir. Bu ise, serbest radikal mekanizmalı hasarın meydana çıkmasına neden olur. Bu etkiyi ifade etmek için “oksidatif baskı” terimi kullanılır. Eğer düşük seviyede bir oksidatif baskı meydana çıkarsa, dokular bunu karşılayacak şekilde ekstra antioksidan savunma sistemi oluştururlar. Ancak, meydana çıkan şiddetli bir oksidatif baskı hücrelerin hasarına, hatta ölümüne neden olur. Serbest radikallerin sebep olduğu hücre ölümü, doku ölümüne ve beyin damarlarının tahribatına kadar ilerleyebilir. Oksidatif baskıyı artıran etkenlerden biri, serbest radikallerin oluşmasına ve antioksidanların azalmasına neden olan bazı toksinlerdir.

Kısmen diğerk bir sebebin de, bazı ilaçların yan etkileri olduğu bilinmektedir. Serbest radikallerin yüzden fazla insan hastalığında yer aldığı tespit edilmiştir.

Organizmada bulunan bileşiklerin çoğu radikal özellikli değildir. Buna rağmen oluşturulan herhangi bir serbest radikal nonradikallerle tepkide bulunabilir. Bu tepkimeden oluşan serbest radikal mekanizmalı zincir reaksiyonu yeni radikallerin meydana çıkmasına neden olur.

Aktif oksijen formları olan süper oksit (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikalleri ($HO\cdot$) normal metabolizmanın yan ürünleridir ve oksidatif baskı sırasında biyolojik moleküllere hücum ederek, hücre ve dokuların hasar görmesine neden olurlar. Aktif oksijen formları ve diğerk serbest radikallerin çeşitli hastalıklarda doku zedelenmelerine neden oldukları tespit edilmiştir [13]. Bu radikallerin ayrıca inflamasyon, immunizasyon, ihtiyarlama, mutajeniklik ve karsinojeniklik gibi değişik fizyolojik ve patolojik durumları da etkiledikleri bilinmektedir.

Oksijenin aktif formlarının etkilerine ilk sırada maruz kalan doku bileşenlerinden başlıcaları, lipidlerin doymamış asitleri ve hücre membranlarının temel kısımlarını oluşturan fosfolipidlerdir. Lipidlerin peroksitlenmesi sonucu oluşan peroksil radikalleri, hidroperoksitler ve parçalanma ürünleri, daha sonra bir seri prosesleri başlatırlar. Bu prosesler hücre membranlarının çalışmasını bozan ve genetik sistem de dahil olmak üzere hücrenin esas bileşenlerini zedeleyen faktörlerdir.

Aktif oksijen ve serbest radikallerin belirli kimyasal karsinojenler tarafından oluşturulduğu ve kanserojenik proseslerde yer aldıkları da açıklanmıştır. Başka bir araştırmada hidrojen peroksitin fare cildinde şişliklerin oluşumunu hızlandırdığı da tespit edilmiştir [1]. 12-O-tetra-decanoilforbol 13 asetat (TPA), 12-O-retinoilforbol 13 asetat (RPA) gibi bazı şiş oluşturunucuların insanın polimorfonükleer lökositlerinde hidrojen peroksit oluşmasına ve DNA zedelenmelerine neden oldukları gösterilmiştir.

Doğal flavonoidler içinde antioksidan özellikli bileşiklerin belirlenmesi ve bunların antioksidatif etkilerinin açıklanması flavonoidlere karşı ilginin daha da artmasına neden olmuştur.

Son zamanlarda yürütölen, bu amaca yönelik araştırmalar, bazı flavonoidlerin (en fazla incelenen quercetindir.) super oksit ve hidroksil radikallerini ortadan

kaldırdığını; lipid peroksil radikallerini indirgediğini ve lipid peroksidasyonunu inhibe ettiğini ortaya koymuştur.

Flavonoidlerin alt sınıflarından biri olan katekinler, insan besinin genel bileşeni olarak tanınmaktadır. Ayrıca, yeşil çay yapraklarında, nispeten bol miktarda (-)-epikateşin, (-)-epikatekingallat, (-)-epigallokatekin ve (-)-epigallokatekingallat bulunmaktadır. Katekinler antimutajenik ve antikanserojenik aktivite gibi biyolojik özelliklerinden dolayı son yıllarda büyük ilgi çekmektedirler. Bu nedenle, çay ekstratları ve çay bileşenlerinin biyolojik aktivitelerinin incelenmesi için geniş çaplı araştırmalar yürütülmektedir.

Çayın antipiretik, diüretik ve diğer bazı özellikleri daha önceden bilinmektedir. Diğer yünden, bazı araştırmalar çay tüketiminin kanserin önlenmesinde belirli bir etkiye sahip olduğunu göstermektedir.

Ancak, son yıllarda, çayın farmakolojik özellikleri yeniden incelenerek, çay bileşenlerinin antioksidatif, antimutajenik ve antikanserojenik aktiviteye sahip olduğu belirlenmiştir.

Yeşil çayın antioksidan ve antikarsinojenik etkileri ile ilgili olarak, çay bileşenlerinin aktif oksijen formları, hidrojen peroksit ve süperoksite karşı antioksidatif aktivite gösterdiği, oksijen radikalleri ve hidrojen peroksitin neden oldukları sitotoksikliği ve hücre kültürlerinde hücreler arası etkilenmeyi önlediği bildirilmiştir[35]. Başka bazı araştırmalar neticesinde de katekin ve bazı flavonoidlerin oksijen radikallerini ortadan kaldıran önemli antioksidanlar oldukları gösterilmiştir.

Çeşitli çay ekstraktlarının antioksidan aktivitesi ile antimutajenik etkileri arası ilişki araştırılarak çay ekstraktlarının kuvvetli antimutajenik ve antioksidan aktiviteye, indirgeme gücüne (reducing power), aktif oksijen ve serbest radikalleri ortadan kaldırma (tutma) özelliğine sahip olduğu kanıtlanmıştır.

Oksijenin aktif formlarını tutan bileşiklerin, çeşitli mutajenler tarafından doğan mutasyonu bastırdıklarını göstermişlerdir. Diğer yünden, çay ekstraktlarının superoksit, hidrojen peroksit ve hidroksil radikallerinin kuvvetli tutucusu olduğu ortaya çıkmıştır. Böylece, oksijenin aktif formlarını tutan çay ekstraktlarının antioksidatif ve antimutajenik aktiviteleri doğrulanmıştır.

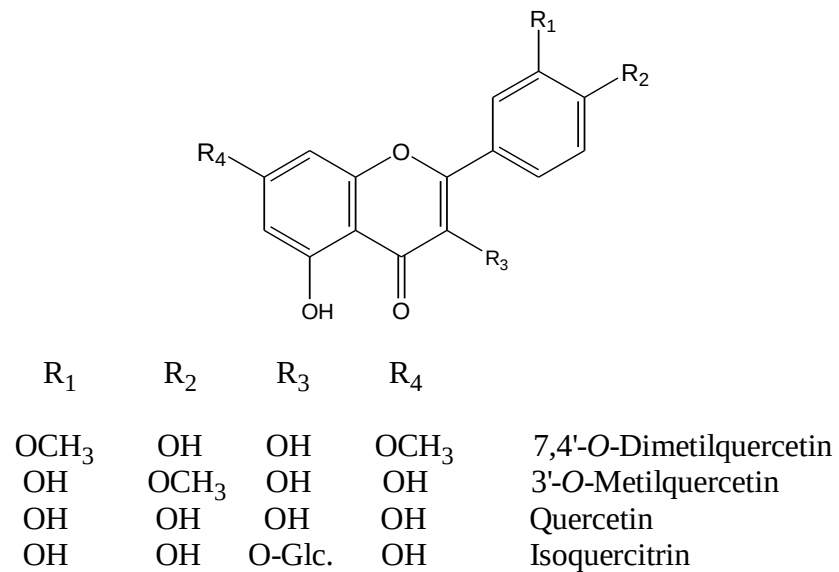
Bu bileşiklerin antioksidatif etkileri, kansere yol açan proseslerin ihtiva ettikleri oksijen radikallerini ve lipid peroksidasyonunu önlemek açısından çok önemlidir.

Çok sayıda araştırma, katekinlerin biyolojik doku ve hücre altı fraksiyonlarda yer alan lipid peroksidasyonunu önlediğini göstermiştir [15].

Tributil hidroperoksit etkisiyle iri farelerin karaciğer ve böbreklerinde oluşturulan lipid peroksidasyonunun çay katekinlerinin etkisiyle önlediği gösterilmiştir. Ancak, katekinlerin oksijen radikallerinin hücumlarına duyarlılığı yüksek olan biyomembranlardaki antioksidatif aktiviteleri hakkında yeterli bilgi bulunmamaktadır.

Model sistem olarak unilamellar lipozomlar içeren fosfolipid çift tabakalarda serbest radikal oluşturucu olarak, suda çözünen azo bileşik kullanarak, katekinlerin antioksidatif etkileri araştırılmıştır [16]. Bu amaçla çay katekinleri (-)-epikatekin, (-)-epikatekingallat ve bitki kaynaklı besinlerde yaygın olan flavonoid olarak quercetin kullanılmıştır. Elde edilen sonuçlar, bu bileşiklerin sulu ortamda oksijen radikallerinin etkisiyle başlatılan membran lipidlerinin peroksidasyonunu α -tokoferole göre daha aktif olarak önleyen lipofilik antioksidanlar olduğunu göstermiştir.

Polygonum hidropiper türünden elde edilen flavonoidlerin (quercetin, isoquercitrin, 3'-O-metilquercetin ve 7,4'-O-dimetilquercetin) antioksidatif aktiviteleri araştırılarak bu bileşiklerin her birinin doğal antioksidan α -tokoferole göre daha aktif olduğu belirlenmiştir. Bunlardan isoquercitrin ve 7,4'-O-dimetilquercetin daha yüksek antioksidatif aktivite gösterdikleri açıklanmıştır (Şekil 2.15).



Şekil 2.15: *Polygonum hidropiper* bitkisinden elde edilen antioksidatif flavonoidler.

Polygonum hidropiper flavonoidlerinden izoquercitrinin daha yüksek antioksidan aktivite göstermesi ve quercetin'in başka glikozitlerinin de peroksidasyonu etkili olarak inhibe etmesi, glikozillenmenin antioksidan etkiye katkıda bulunduğunu göstermektedir.

Flavonoid radikallerinin indirgeme potansiyelleri alkil peroksil ve superoksit radikallerinin indirgeme potansiyellerinde göre daha düşüktür. Bu yüzden flavonoidler bu oksit türlerini deaktive eder ve reaksiyonlarının verebileceği zararlı sonuçları önlerler [17].

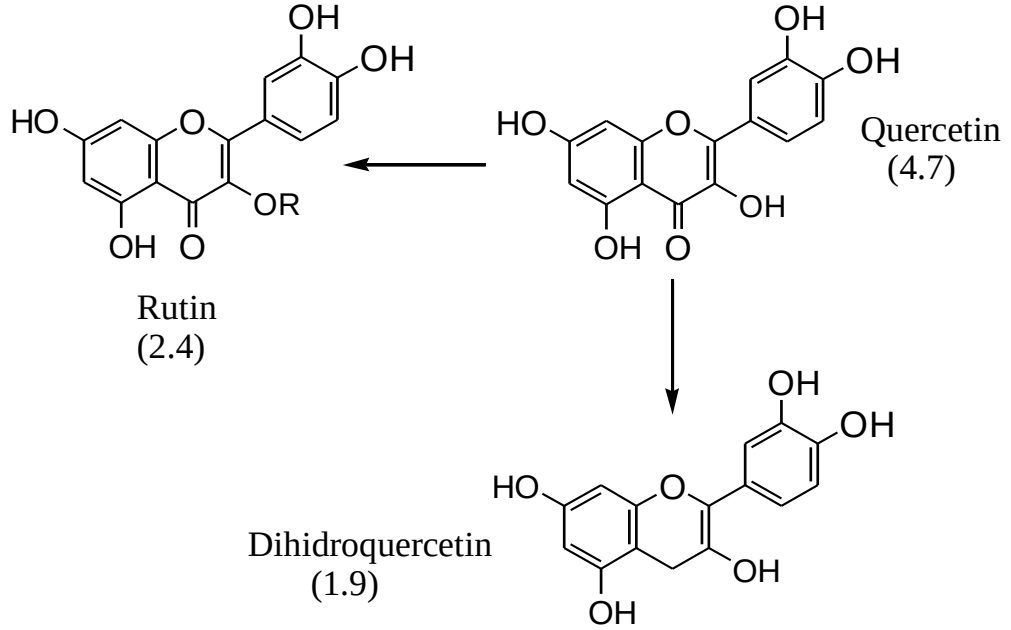
Flavonoidlerin yapı özellikleri ile antioksidan aktiviteleri arasındaki bağıntı birkaç grup tarafından araştırılmıştır. Flavonoidlerin serbest radikalleri etkili olarak ortadan kaldırması için bazı kimyasal kriterlerin gerekli olduğu Bors ve ark., (1990) ve Sichel ve ark., (1991) tarafından açıklanmıştır. Flavonoidlerin yapısında 3-OH, C-2 ve C-3 atomları arasında doymamış bağ ve C-4 pozisyonunda (piron halkasında) karbonil grubu bulunmasının antioksidan özelliğe olumlu etki yaptığı gösterilmiştir. C halkasındaki 2,3-çift bağın 4-okso grubuyla konjugasyonu B-halkasının elektron delokalizasyonuna katkıda bulunur; A ve C halkalarında bulunan C-3 ve C-5 hidroksil grupları ise 4-okso grubuyla birlikte maksimum radikal uzaklaştırma etkisi sağlar. Molekülde 3',4'-pozisyonlarında hidroksil grubunun bulunması da antioksidan aktiviteye katkıda bulunur. B halkasında bulunan o-dihidroksi grubu elektron delokalizasyonuna etki ederek, yüksek kararlılıkta flavonoid radikalinin oluşmasında neden olur. İzoflavonlar, yapılarında bulunan 4-karbonil ve 5-hidroksi grubunun, oluşan izoflavon radikaline sağladıkları kararlılık nedeniyle, flavonlara göre daha aktiflerdir.

3,4-dihidroksikalkonlar, kalkon türevi radikalinin yüksek elektron delokalizasyonu nedeniyle, örneğin butein, analog flavonlara göre daha aktif antioksidan özellik gösterirler.

Çeşitli araştırmacılar tarafından, o-dihidroksi flavonoidlerin antioksidan etkilerine metallerle şelatlaşma mekanizmasının önemli etki gösterdiği de açıklanmıştır.

Bu bilgilere dayanarak flavonollerin (örneğin, quercetin), flavanollerden (örneğin, kateşin) daha etkili antioksidan olduğu ileri sürülmüştür. Quercetin ve başka flavonoller yukarıdaki özelliklere sahip oldukları halde, kateşin sahip değildir.

Bazı polifenollerin sulu çözeltide oluşturulan radikallere karşı antioksidan aktiviteleri ve yapı formulleri Şekil 2.16’ da verilmiştir.



Şekil 2.16: Flavonoidlerin yapı özellikleri ile total antioksidan aktiviteleri arasındaki ilişki

Flavonollerin yapısında bulunan hidroksil gruplarının pozisyonları ile antioksidatif aktivite arasındaki ilişki araştırılmıştır. Quercetin’in de morin, kaempferol ve luteolin gibi etkili antioksidan olduğu gösterilmiştir.

Myricetin, quercetin ve rhamnetinin hidroksil radikale karşı antioksidan özelliği göstermekte ve bu etki B aromatik halkasında bulunan hidroksil gruplarının sayısına bağlı olarak artmaktadır.

Antosiyaninler çiçek ve meyvelerin renklerinden sorumlu bileşikler olup, besin ve farmasötik ürünlerin boyanmasında kullanılırlar [18]. Günümüze kadar antioksidan özelliği test edilen antosiyaninlerin sayısı fazla değildir. Ancak, test edilen antosiyaninlerin çok yüksek antioksidatif aktivite gösterdikleri de belirlenmiştir. Örneğin, antosiyaninlerin üzüm kabuğundan izole edilen ekstraktı çok iyi antioksidatif aktivite göstermiştir. Açılınmış malvidin glikozit, üzüm kabuğunun temel bileşeni, linoleik asidin oksidasyonunda oldukça yüksek aktivite göstermiştir.

2.1.7.2 Flavonoidlerin Kansere İlgili Özellikleri

Günlük yiyeceklerimizin bileşeni olan flavonoidlerin genotoksik etkileri her geçen gün artmakta ve dikkat çekmektedir. Flavonoidlerin genotoksik etkilerini belirlemek

için çeşitli araştırmalarla: a) değişik flavonoidlerin *Salmonella typhimurium* türleri ve diğer mikroorganizmaların mutajen özelliklerinde etkisi denenmiş; b) flavonoid içeren bitkilerin mutajen özellikleri; c) non-mikrobiyolojik sistemlerde in vitro ve in vivo genetik etkileri ve d) deney hayvanları kullanarak karsinojen özellikleri test edilmiştir.

2.1.7.3 Mikrobiyal Mutajen Özelliklerin Araştırılması

Bazı flavonoidlerin mutajen özellikleri değişik *Salmonella typhimurium* türlerinde denenmiş ve flavonoid aglikonların önemli mutajenik aktivite gösterdikleri belirlenmiştir. Quercetin, myricetin, kaempferol ve tamarixetin gibi flavonoidlerin aktif mutajenler olduğu bulunmuştur.

2.1.7.4 Flavonoidlerin Antikarsinojenik Etkileri

Taze sebze ve meyvelerle alınan besinlerin bazı kanser türlerine karşı koruyucu etki gösterdiğine dair önemli bilgiler mevcuttur. Genellikle bu koruyucu etkinin, besinlerde bulunan antioksidan özellikli bileşiklerden kaynaklandığına inanılmaktadır. Bununla beraber son yıllarda, yürütülen çalışmalar bitkilerden elde edilen polifenolik bileşiklerin antioksidan etki veya farklı bir mekanizma ile antikanserojen etki gösterdikleri ileri sürülmektedir. Özellikle, içilen şarap ve çayın in vitro ve in vivo koşullarda antioksidatif etki gösterdiği açıklanmıştır.

Polanisia dedecandra bitkisinden izole edilen 5,3'-dihidroksi-3,6,7,8,4'-pentametoksiflavonol ve 5,4'-dihidroksi-3,6,7,8,3'-pentametoksi flavonolun bazı kanser türlerine karşı aktivitelerini araştırmışlardır. Bu araştırmada 5,3'-dihidroksi-3,6,7,8,4'-pentametoksi flavonolun in vitro koşullarda merkezi sinir sistemi kanserine, akciğer kanseri hücrelerine, yumurtalık kanseri hücrelerine, kalın bağırsak kanseri hücrelerine, böbrek kanseri hücrelerine, melanoma hücrelerine ve iki değişik lösemi hücrelerine karşı sitotoksik etki gösterdiği belirlenmiştir.

Antimutajenler etki tarzlarına bağlı olarak, desmutajen ve biyoantimutajenler olarak sınıflandırılırlar. Desmutajenlik DNA'ya hasar verdikten sonra, mutajeni nötralize aktivitesi olup bazı testlerde antimutajenlik olarak değerlendirilmektedir. Biyoantimutajenlik ise DNA'nın mutajen etkisiyle hasarından sonra, mutajenezis prosesinin bastırılma aktivitesidir.

Quercetin, luteolin ve galangin yapılarındaki farklılığa rağmen kuvvetli antioksidan olarak bilinir. Luteolinin quercetine göre daha kuvvetli antioksidan olduğunu ve

antioksidatif etki için C-3',C-4' pozisyonlarında mutlaka hidroksil grubu bulunmasının gerekli olmadığı gösterilmiştir. Böylece, bu flavonoidlerin desmutajenik etkileri ile beraber antioksidan aktiviteye de sahip oldukları da açıklanmıştır.

Bu nedenle, flavonoidlerin olası desmutajenik etki mekanizma yollarından biri, DNA'nın hasarından sonra radikallerin yakalanmasıdır. Bu flavonoidler genellikle yenilen sebze, meyve ve çayda yeterli miktarda bulunurlar. Bu nedenle, flavonoidlerin olası desmutajenik etki mekanizmalarından biri, DNA' nın hasarından sonra radikallerin yakalanmasıdır [19].

2.1.7.5 Flavonoidlerin Antitoksik Ve Hepatoprotektif Etkileri

X-ışınlarının kapiler geçirgenliğin artmasına neden olduğu bilinmektedir. İki flavonoid ve bir "citruz biflavonoid" karışımının fare bağırsaklarında X-ışınlarının neden olduğu kapiler geçirgenliğe etkisi araştırılmıştır. Her üç bileşik mavi Evans boyasının bağırsaklara sızmasını azaltmış ve X-ışınlarına karşı yüksek koruyucu aktivite göstermiştir. Flavonoidlerin hasarlara neden olan ışın etkisine karşı koruyucu özelliklerinden faydalanmak için yeni araştırmaların yapılmasına ihtiyaç duyulmaktadır.

2.1.7.6 Flavonoidlerin Virüslere Karşı Etkileri

Flavonoidlerin virüslere karşı aktivite gösterdiği 1940'lı yıllardan itibaren bilinmektedir. Flavonoidlerden: quercetin, morin, rutin, dihidroquercetin (taxifolin), dihidroflisetin, leykocyanidin, pelargonidin klorür, apigenin, kateşin, hesperidin ve naringenin bazı virüslere karşı etkili olduğu belirlenmiştir. Virüslere karşı etkinin aglikonlar için karakteristik olduğu ve C-3 pozisyonunda hidroksil varlığının aktiviteye katkıda bulunduğu ileri sürülmüştür.

2.1.7.7 Flavonoidlerin Memelilerin Enzim Sistemlerine Etkileri

Bazı flavonoidlerin patolojik olaylara karışan farklı enzimlere, örneğin adenazin deaminaz, angiotenzin-dönüştürücü enzim, siklooksijenaz ve lipooksijenaz , protein tirozin kinaz ve HIV-1 proteinaza etkileri araştırılmıştır. Flavonoidlerin in vitro şartlarda memelilerin enzim sistemlerine gösterdikleri etkiyle yapıları arasındaki ilişki de araştırılmıştır. Flavonoidlerin bazı enzimlere etkisi olduğu bulunmuştur.

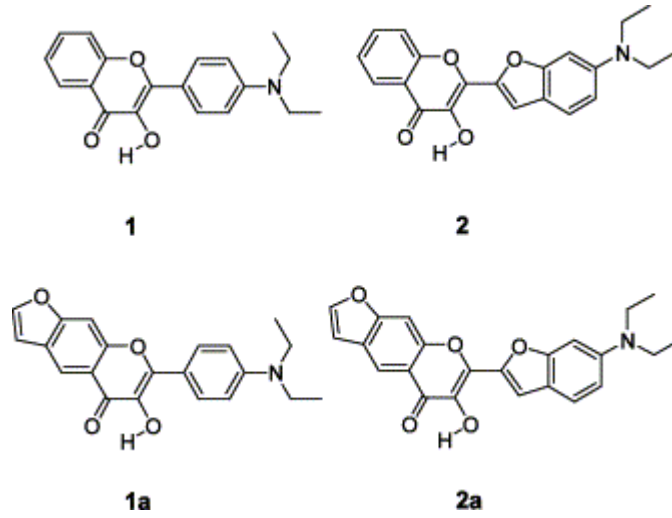
2.1.8 Çeşitli Flavon Sentez Yöntemleri

Oldukça aktif bileşikler olan flavonlar için sentez yoluna gidilmiş ve bu amaçla farklı yollar izlenmiştir. Genellikle hedef flavonun yapısına göre uygun başlangıç maddeleri kullanılarak önce çalkon sentezlenmiş, daha sonra da halka kapanması gerçekleştirilmiştir [20].

2.1.8.1 3-hidroksi flavon'ların Sentezi

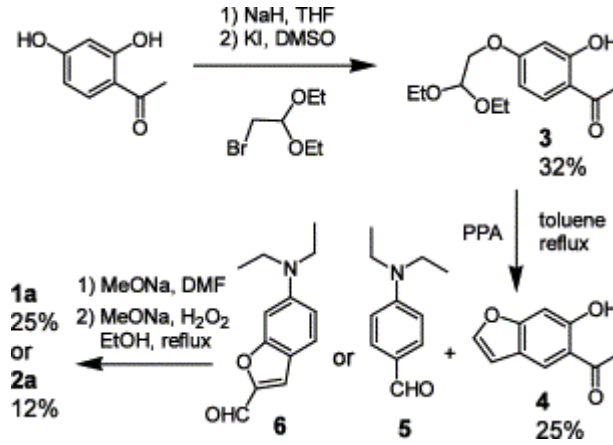
3-hidroksiflavonlar(3HF), ilginç fotokimyasal özellikleri ve 2 bandlı floresans sensörleri olarak kullanılmaları dolayısıyla son zamanlarda araştırmacıların ilgisini çekmektedir. 3HF, ESIPT reaksiyonu vererek, 2 yüksek şiddetli, iyi ayrılmış ve solvent etkileşimli, N* ve T* bandı veren eşsiz bir organik boya ailesidir. Şekil 2.17'de, 1 numaralı bileşiğin 4 pozisyonuna bir e⁻ donör, bir dialkil amino grubu takılarak N* formunun yük-transfer karakteri artırılır. Bu da N* bandının rölatif şiddetini yükseltir ve solvent polaritesine bağımlı hale getirir.

Bu özellikleri geliştirmek üzere yapılan çalışmalar sonucu 2-benzolnaftofuril-3-hidroksikroman türevleri sentezlenmiştir. Bu bileşikler yüksek floresans kuantum verimine sahiptir ve absorpsiyon ve floresans spektralarında güçlü kırmızıya kayma gözlenmiştir. Sonuç olarak 2'nin 6' pozisyonuna bir dialkilamino grubu takılarak, 3-hidroksikroman türevleri için absorpsiyon ve floresansta yüksek dalga boyları sağlanmıştır. Bununla birlikte, biyolojik sistemlerde floresans sensör olarak daha iyi kullanılmaları için 3-hidroksikromanların daha çok geliştirilmeleri gerekmektedir. Normalde %30'dan düşük olan kuantum verimine 35000 civarında olan ekstinksiyon katsayısının yükseltilmesi istenmektedir. Dahası, çift renkli ölçümler ve mikroskopide, uygulanan problemlerin floresans maksimumları arası iyi ayrım olması istenmektedir. Bu özelliğin yüksek polarite ve homojen olmayan ortamlara maruz kalan 3-hidroksi kroman problemlerde yetersiz olduğu görülmüştür. Bu problem özellikle, güçlü solvatokromik N* bandı kırmızıya kayan ve T* bandı ile örtüşen, 4'-dialkil amino süstitüye 3-HF için önemlidir [20].



Şekil 2.17: Sentezlenen 3-hidroksiflavonlar

4'-Dietilamino-3-hidroksi-furano[3,2-*g*]flavon(1a) ve 2-(6-dietilaminobenzo[*b*]furan-2-il)-3-hidroksifurano[3,2-*g*]kromon (2a) 2',4'-dihidroksiasetofenon (Şekil 2.18)'dan başlayarak 4 basamakta sentezlenmiştir. Başlangıç maddesi önce sodyum hidrür ile sodyum tuzuna dönüştürülür ve daha sonra bromoasetaldehyt dietilasetal ile 50°C'de DMSO içerisinde, KI katalizörü kullanılarak reaksiyona sokulur. Ürün (3) polifosforik asit varlığında, toluen içerisinde 2 saat reflux edilir. Oluşan benzofuran türevi kolon kromatografisi ile izole edilir(hekzan/etil asetat, 8/1, v/v). 4'ü iki aşamalı Algar-Flynn-Oyamada prosedürü ile uygun 3-hidroksikroman türevine dönüştürmek mümkün olmadığından her iki basamak da modifiye edilmiştir. 4'ün 5 ve 6 numaralı aldehytlerle kondenzasyonu için, çoğunlukla kullanılan, sulu NaOH yerine, DMF içerisinde sodyummetoksit kullanılır. Reaksiyon bir saatte tamamlanarak, karışım etanol ile seyreltilmiş ve sodyum metoksit ile 30% hidrojen peroksit ilave edilir. Daha sonra bir dakika kadar reflux edilir, oda sıcaklığına soğutularak su içerisine dökülür. Nötralizasyondan sonra oluşan çökelti süzülür. Hedef kromanlar butanolden kristallendirilir. Genel Algar-Flynn-Oyamada reaksiyonunun burada ki başarısızlığı, dialkilamino grubunun π -elektronlarını vermesinden ve yoğun furan heterohalkasından kaynaklanmış olabilir. Bu modifiye yöntemle sentezlenen komplike yapı 3-hidroksikromanlar düşünülürse, bu yeni yöntem gelişmiş kroman sentezlerinde oldukça yararlı olacaktır.

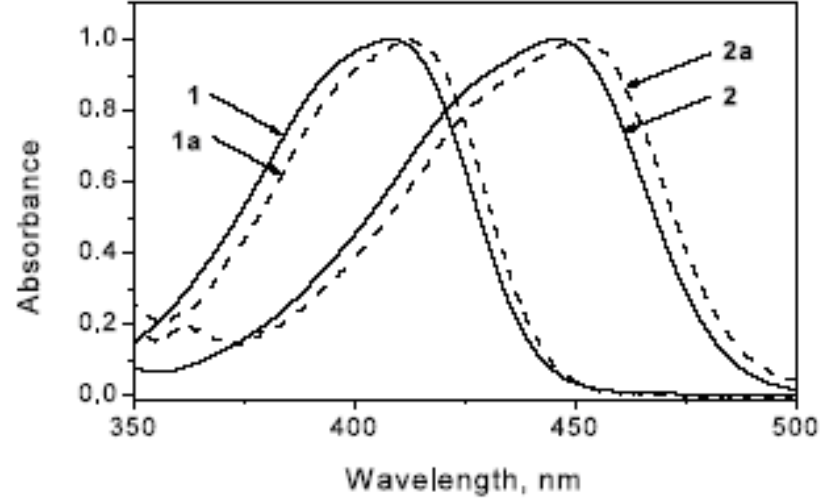


Şekil 2.18: 1a ve 2a'nın sentezi.

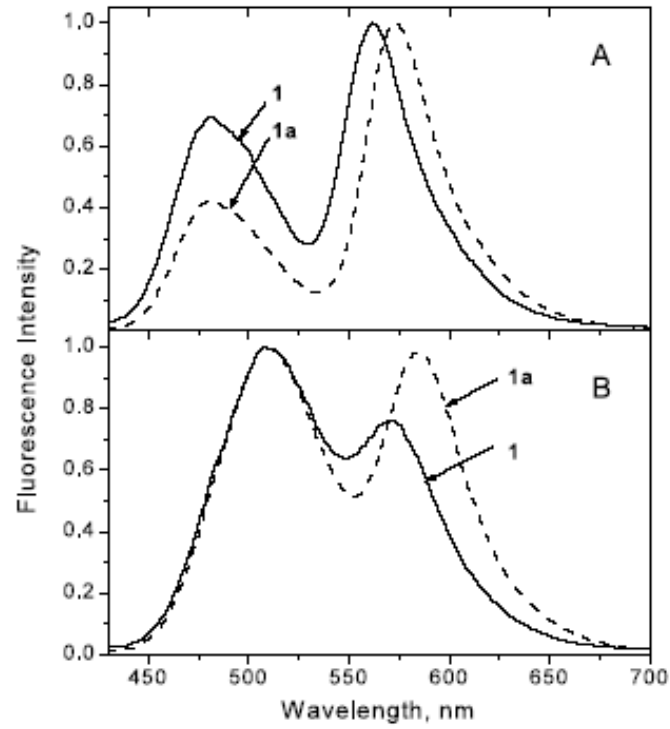
2.1.8.2 Sentezlenen 3HF'ların spektral özellikleri

3-hidroksifurano[3,2-*g*]kromon (1a ve 2a)'ların absorpsiyon ve floresans özellikleri, 1 ve 2 numaralı temel 3-hidroksikromonlar esas alınarak, farklı polaritedeki altı çözücünde çalışılmıştır: hekzan, tolüen, etil asetat, kloroform, asetonitril ve etanol. Tüm çözücülerde furanokromonların absorpsiyon spektrası daha yüksek dalgaboylarına kaymıştır (4–5 nm) ($210\text{--}300 \text{ cm}^{-1}$), aynı zamanda 1a' da ekstinksiyon katsayısı yaklaşık $5,000 \text{ l}\times\text{mol}^{-1}\times\text{cm}^{-1}$ (Şekil 2.19 and Tablo 2.3) artmıştır. Böylece kromon kromoforunun çeşitli kısımlarına bir furan heterohalkası takılarak, farklı spektral özellikler elde edildiği söylenebilir. 1a'daki yoğun furan halkası moleküler ekstinksiyonda, güçlü kırmızıya kayma olmaksızın, gözle görülür artış gösterirken, 2'deki furan halkası güçlü kırmızıya kayma ve moleküler ekstinksiyonda göreceli olarak küçük bir artışla sonuçlanır. Floresans spektrumunda 1a ve 2a furanokromonları 2 band gösterirler, şiddet oranları (I_{N^*}/I_{T^*}) çözücü polaritesine oldukça duyarlıdır. Bu davranış 3-hidroksikromon türevlerinin tipik bir davranışdır. Floresans bandlarının pozisyonlarına etkileri oldukça ilginçtir. 1 ve 2 numaralı kromonlara furan heterohalkasının eklenmesiyle T^* emisyon bandında kırmızıya kayma gözlenirken N^* bandı aşağı yukarı aynı pozisyonda kalmıştır (Şekil 2.20, Şekil 2.21, Tablo 2.4). Bu oldukça sıra dışıdır çünkü daha önce ki tüm modifikasyonlarda, 2-aril sübstitüentinin donör özellikleri, 3-hidroksikromon'un her iki bandını da, N^* bandında güçlü kaymalarla, etkilemiştir. [73,74] Daha düşük polaritedeki çözücülerde daha güçlü görünen, T^* bandındaki kırmızıya kayma (Tablo 2.4), 1a ve 2a furanokromonlarında band ayrımını sırasıyla 12–17 nm ($360\text{--}520 \text{ cm}^{-1}$) ve 7–13 nm ($180\text{--}320 \text{ cm}^{-1}$) arttırır. (Şekil 2.20, Şekil 2.21). Bu furanokromonların bir diğer özelliği ise yüksek floresans kuantum verimidir. Bu,

ana kromonların yaklaşık iki katıdır ve diğer 3-hidroksikromonlarla kıyaslandığında rekor seviyeye ulaşmaktadır (70% 1a için etanolde ve 61% 2a için kloroformda) (Tablo 2.4).



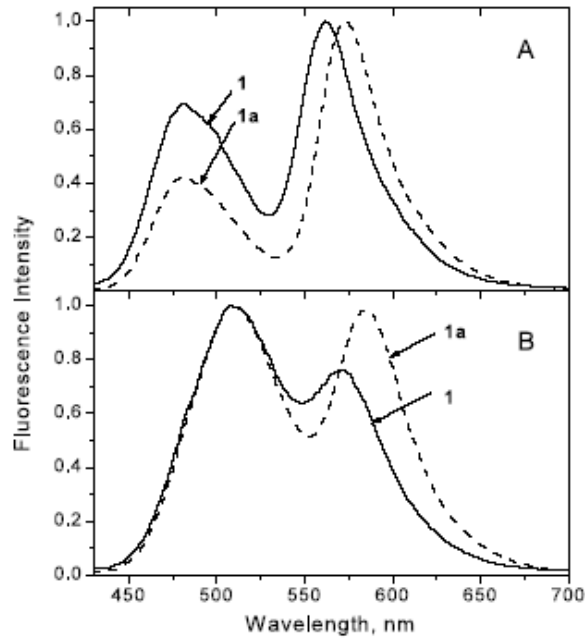
Şekil 2.19: Sentezlenen kromonların tolüen içerisindeki normalize absorpsiyon spektrası



Şekil 2.20: 1 ve 1a'nın kloroform(A) ve asetonitrilde(B) normalize floresans spektrumu

Tablo 2.4: Sentezlenen kromanların spektral özellikleri

Solvent		$\lambda_{\max}$ abs (nm)	$\lambda_{\max}$ fl N* (nm)	$\lambda_{\max}$ fl T* (nm)	I_{N^*}/I_T	ϵ ($l \times \text{mol}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$)	φ
Hexane	1	403	425	553	0.010	37000	0.14
	1a	407	426	571	0.0077	42000	0.26
	2	439	457	583	0.078	44800	0.20
	2a	445	460	599	0.088	47000	0.23
Toluene	1	408	456	566	0.044	35000	0.14
	1a	413	458	581	0.0313	40000	0.29
	2	446	508	613	0.55	37600	0.26
	2a	451	508	623	0.601	39000	0.36
EtOAc	1	401	475	570	0.253	35000	0.05
	1a	406	476	584	0.133	41000	0.13
	2	436	537	618	1.93	37000	0.26
	2a	440	538	626	2.24	38000	0.40
CHCl_3	1	413	481	560	0.669	35000	0.19
	1a	418	482	573	0.422	41000	0.34
	2	453	545	621 ^b	4.21 ^b	37000	0.46
	2a	458	546	629 ^b	4.07 ^b	38000	0.61
CH_3CN	1	404	509	571	1.30	35000	0.09
	1a	408	510	586	1.01	38000	0.18
	2	437	582	—	—	36000	0.25
	2a	441	582	—	—	37000	0.37
EtOH	1	412	523	—	—	35000	0.52
	1a	418	523	—	—	38000	0.70
	2	444	600	—	—	36000	0.09
	2a	449	600	—	—	37000	0.18

**Şekil 2.21:** 2 ve 2a'nın tolüen (A) ve asetonitrildeki(B) normalize floresans spektrası

Furan heterohalkasının ilavesiyle, 3-hidroksikromonların temel floresans özelliklerinin değişmediği açıktır. Dahası, emisyon bandları arasındaki şiddet oranının (I_{N^*}/I_{T^*}) solvent polaritesine güçlü hassasiyeti korunmuştur. Hekzandan asetonitrile doğru artan çözücü polaritesi her iki furanokromon için I_{N^*}/I_{T^*} 'da güçlü artış ile sonuçlanmıştır. (Tablo 2.4), ki bu da ana kromonlarda da benzerdir [20].

Sonuçta yeni prosedür ile 2-aril-3-hidroksifurano[3,2-*g*]kromonlar kısa sürede, yüksek verimde sentezlenmişlerdir. Furan heterohalkasındaki Π elektronları 3-hidroksikromon kromoforunun floresans özelliklerini geliştirmiştir, bunlardan en önemlileri floresans kuantum verimindeki önemli artış ve iki emisyon maksimumu arasındaki geniş ayırmadır.

2.2 Floresans Spektroskopisi

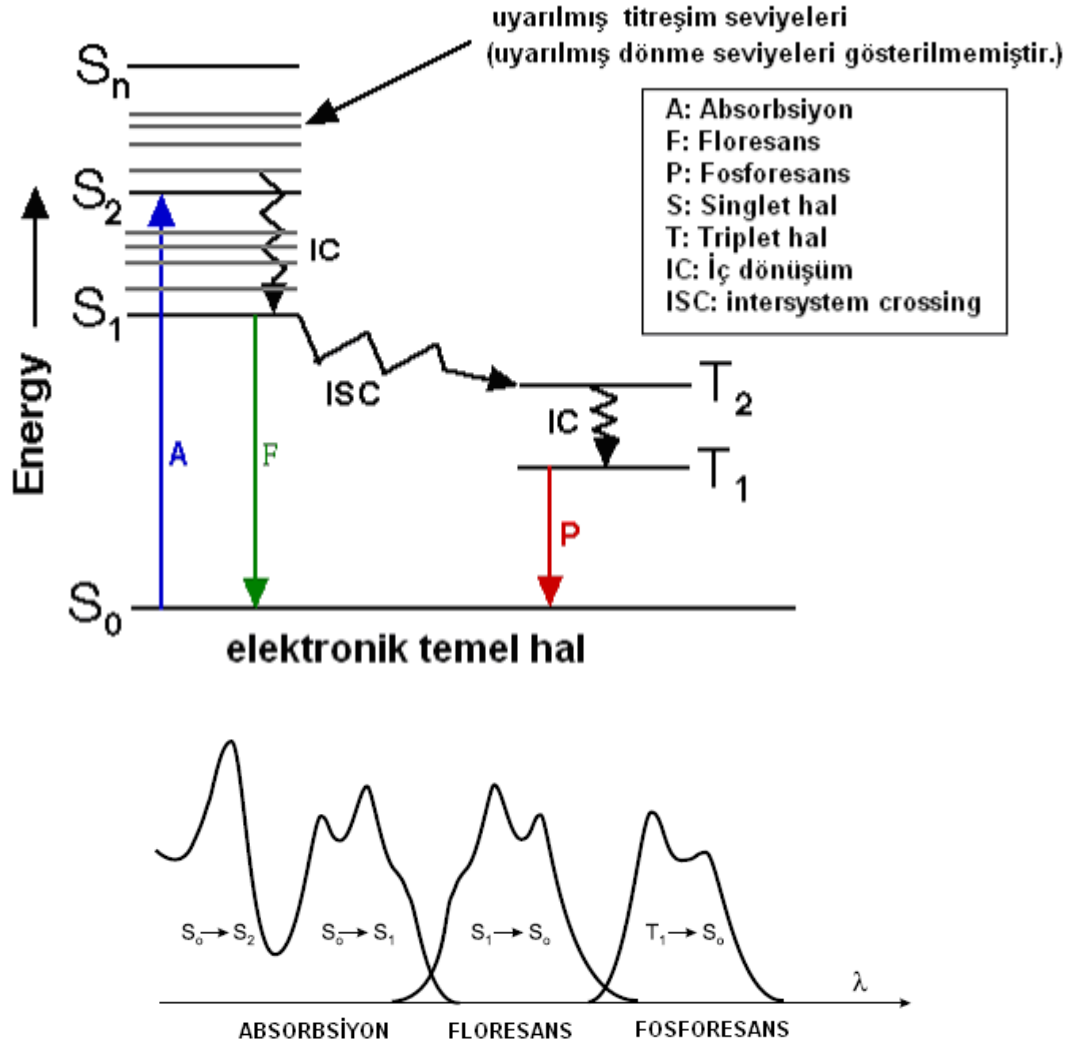
2.2.1 Floresans Spektroskopisinin Teorisi

Fotonların bir molekül tarafından soğurulması olarak tanımlanan ışık absorpsiyonu sonucu, molekül temel enerji durumundan uyarılmış duruma geçer. Bu durumda yaklaşık 10^{-9} saniye kalan molekül enerjisini radyasyon (ışık ile) ya da radyasyonsuz olarak ortama aktararak tekrar kararlı durum olan temel duruma döner. Radyasyon ile uyarma sonucu molekülün enerjisini ortama radyasyon olarak yayması olayı fotoluminesans ya da lüminesans olarak adlandırılır. Lüminesans; uyarılmış enerji seviyesinin durumuna göre iki şekilde olabilir: Floresans veya fosforesans [21].

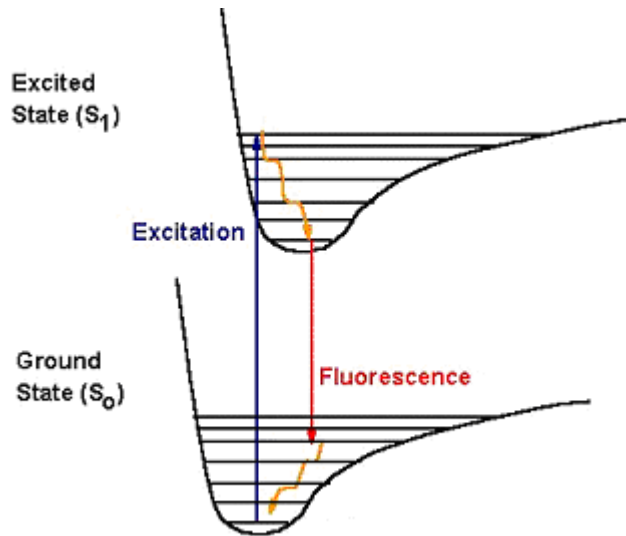
Temel seviyedeki bir organik molekül, S_0 olarak adlandırılan singlet temel elektronik durumda bulunur. Uyarılmış singlet durumda, yüksek-enerji orbitalindeki bir elektron ile düşük-enerji orbitalindeki ikinci bir elektron zıt spin yönelimlerine sahiptirler. Singlet durumu belirleyen zıt spin yönelimli bu elektronlara “çiftlenmiştir” denir. Floresans; ışık ile uyarılan aromatik organik bir molekülün, birinci uyarılmış singlet elektronik durumdan ışıma yapması olayıdır. Singlet uyarılmış durumdan, singlet temel duruma dönüş, zıt yönelimli elektronların yönelimlerini değiştirmelerini gerektirmezken, triplet durumda bu zorunludur. Pauli Dışarlama İlkesi'ne göre aynı spin yönelimine sahip iki elektronun bir arada bulunmaları yasaklanmıştır. Bu durumda elektronlar çiftlendiklerinden floresansda, kuantum mekaniğince izinli geçişler söz konusudur. Triplet durumda bu elektronlar “çiftlenmemişlerdir” , yani aynı spin yönelimine sahiptirler. Triplet seviyeden yapılan ışımlar fosforesans olarak adlandırılır. Floresans ve fosforesans

mekanizması ilk kez Alexander Jablonski tarafından önerilen enerji seviyeleri diyagramı ile açıklanmaya çalışılmıştır (Şekil 2.22).

Şekilde temel, 1. ve 2. uyarılmış elektronik seviyeler S_0 , S_1 ve S_2 ile gösterilmiştir. Floresans özellik gösteren molekölü tanımlayan florofor, uyarıldığı herhangi bir elektronik enerji seviyesinin 0.,1.,2.,...vs titreşim enerji seviyelerinden birinde bulunur. Belirtilmesi gereken bir diğer nokta da çeşitli elektronik enerji seviyeleri arasındaki geçişlerin dik olmasıdır, bu geçişler 10^{-15} saniye gibi kısa bir sürede gerçekleşir. Molekül uyarılmış hale o kadar hızlı geçer ki çekirdek koordinatları değişmez. Bu FRANCK-CONDON yasası olarak adlandırılır. Uyarılma 10^{-15} saniyede gerçekleşen oldukça hızlı bir prosestir. Böylece singlet uyarılmış hal için potansiyel enerji diyagramı, temel hal ile tam simetrik değildir (Şekil 2.23). Temel halden uyarılma ilk singlet uyarılmış halin en düşük enerjili durumuyla sonuçlanmak zorunda değildir. İlk singlet uyarılmış halin en düşük enerji seviyesine geçişler emisyonla kıyaslandığında oldukça hızlı gerçekleşir. Singlet uyarılmış halin en düşük enerji seviyesinden emisyon 10^{-9} saniyede gerçekleşir. Bu yüzden, bu seviye ilk absorpsiyon haline göre yarı kararlı bir durum sergiler. Bu yarı kararlı durum uyarılmış denge hali olarak düşünülebilir ve çoğunlukla Franck-Condon uyarılmış hali olarak adlandırılır. Temel halde, normal sıcaklıklarda çoğu elektron en düşük enerji seviyelerini tercih edeceğinden, absorpsiyon genelde bu seviyelerden gerçekleşir. Uyarılmış hal titreşim enerjisi, uyarılma sırasında kullanılan ışığın dalga boyuna bağlıdır. Bununla birlikte, floresans ile temel enerji düzeyine dönüş her zaman uyarılmış denge halinden gerçekleşir. Franck-Condon prensibine göre, uyarılmış denge halinden, temel hale geçişte de çekirdekler arası mesafe değişmez.



Şekil 2.22: Jablonski diyagramı



Şekil 2.23: Moleküler elektronik enerji seviyeleri arası geçişler

Bazı istisnalar dışında, katı fazdaki moleküller uyarıldıktan sonra enerjilerinin bir kısmını titreşim veya ısı olarak ortama aktarırlar ve bu şekilde S_1 elektronik enerji seviyesine dönerler. Bu işlem iç dönüşüm olarak adlandırılır ve 10^{-12} saniye gibi kısa bir süre içinde gerçekleşir. Proteinlerin uyarılmış düzeyde bulunma süreleri olarak tanımlanan “lifetime”, yaklaşık 10^{-8} olduğundan iç dönüşüm, emisyon dan daha kısa bir süre içerisinde gerçekleşir. S_1 seviyesinde bulunan moleküller T_1 ’e geçerek oradan ışık yayabilirler. Bu işlem de çapraz geçiş olarak adlandırılır [22].

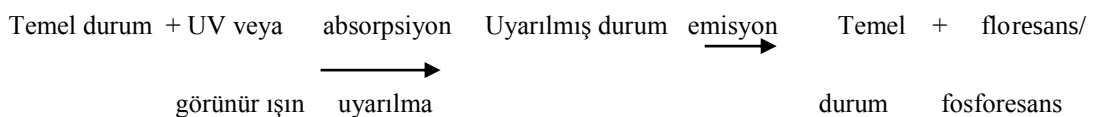
Floresans yayılımının üç önemli karakteristik özelliği:

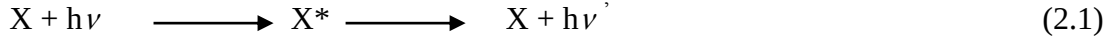
1. Stoke’s kayması floroforun uyarma enerjisinden daha düşük bir enerji ile yayılım vermesi olarak tanımlanabilir. Bu durum, yayılım spektrumunun absorbans spektrumuna oranla daha büyük dalga boyuna (düşük enerjiye) kayması olarak, spektrum üzerinde açıkça görülür.
2. Floroforun enerjisinin bir kısmını hızlı bir şekilde ortama aktararak S_1 ’e inmesi nedeniyle oluşan emisyon spektrumunun dalga boyu, uyarma dalga boyundan bağımsızdır.
3. Floresans spektrumu, absorbansın ayna görüntüsüdür.

2.2.2 Moleküler Floresans Spektroskopisi

Optik yöntemlerden biri olan moleküler floresans spektroskopisi, spektrofotometri ile yakından ilgili bir analitik yöntemdir.

Üzerine uygun dalga boyunda bir ışın yollanan molekül bunu 10^{-15} saniye gibi çok kısa bir sürede absorblamakta ve uyarılmış duruma geçmektedir. Bu dayanıklı bir durum değildir. Uyarılmış haldeki molekül fazla enerjisinin bir kısmını ya da tamamını kaybetmeden ancak 10^{-7} - 10^{-8} saniye kadar bu halde kalabilir. Uyarılmış durumdaki birçok molekül fazla enerjilerini komşu moleküller ile çarpışarak ve dışarıya ısı vererek harcar. Bazı moleküller ise bu fazla enerjilerini bir radyasyon yayarak harcar ve temel duruma dönerler. Absorbe edilmiş ışının yeniden yayılması genel olarak fotoluminesans veya lüminesans olarak tanımlanır. Fotoluminesans, floresans veya fosforesans yayma olmak üzere iki şekilde olabilir.





Molekölün uyarılmış durumdan temel duruma dönüş şekline göre fluoresans veya fosforesans yayma oluşur. Bir molekül absorpsiyon ile temel elektronik ve vibrasyonel durumdan uyarılmış hale geçer. Molekül uyarılmış elektronik halde iken titreşim enerjisinin fazlası moleküller arası çarpışmalarla dağıtılır. Daha sonra molekül temel enerji seviyesine ya doğrudan doğruya bir ışın yayarak veya bir triplet seviyeye geçtikten sonra bir ışın yayarak döner. İlk halde yayılan ışın fluoresansı, ikinci halde yayılan ışın ise fosforesansı oluşturur [23].

Bu iki ışın yayma olayının ortaya çıkması için geçen zaman da farklıdır. Genel olarak fluoresans yayılması, molekülün radyasyonu absorblamasından hemen sonra (yaklaşık 10^{-4} - 10^{-8} saniye) olur. Fosforesans yayılması ise daha yavaş ortaya çıkar ($> 10^{-4}$ saniye). Bu nedenle fluoresans gösteren birçok madde radyasyon kaynağı uzaklaştırıldıktan sonra görülmezken, fosforesans gösteren maddeler ışımaya devam edebilirler. Saptanan en uzun fosforesans Willemite($ZnSiO_4$) mineralinin gösterdiği fosforesanstır. Bu mineralin 340 saat fosforesans gösterdiği bildirilmiştir.

Işın absorblayarak uyarılmış duruma geçen pek çok molekül radyasyon yaymaksızın fazla enerjisini harcarken, az sayıda molekül fluoresans ve çok daha azı ise fosforesans yayar. Hem fluoresans hem de fosforesans yayma absorblanan enerjiden daha düşük enerjilidir. Yani daha uzun dalga boyunda ortaya çıkar. Burada fosforesans ölçmelerine kıyasla çok daha yaygın olarak kullanılan fluoresans spektroskopisi yöntemi anlatılacaktır.

Fluoresans, hem gaz hem sıvı, hem de katı halde ki sistemlerde ortaya çıkabilir. Fluoresansın en basit şekli seyreltik atomik gazda görülendir. Örneğin gaz haline getirilmiş sodyum atomlarının 3s elektronları 589.6 ve 589 nm'deki ışının absorpsiyonu ile 3p haline uyarılabilirler. Uyarılmadan yaklaşık 10^{-8} saniye sonra uyarılmış haldeki elektronlar normal seviyeye absorbladıkları ile aynı dalga boyunda ışın yayarak dönerler. Bu çeşit fluoresans yani absorbladıkları ile aynı frekansta ışın yayma, rezonans radyasyon veya rezonans fluoresanstır. Bu olay moleküller arası çarpışmanın olmadığı bazı katı maddelerde de olabilir. Bazı katı veya sıvı haldeki moleküller daha uzun dalga boyunda fluoresans yayma yanında aynı frekansta ışın da yayabilirler (Rayleigh yayılması). Bu olay konumuzun dışındadır.

Moleküllerin floresans yayma özelliklerinden geliştirilen moleküler floresans spektroskopisi yöntemi ile eser miktarlardaki bir çok organik ve anorganik maddenin kalitatif ve kantitatif analizi yapılabilmektedir.

Maddenin yaydığı floresans ışının dalga boyu o madde için karakteristik olmasından yararlanılarak kalitatif analizi yapılır. Diğer taraftan yöntemin daha yaygın olarak kullanma alanı kantitatif tayinlerdir. Belirli bir konsantrasyon aralığında yayılan floresans ışının şiddeti konsantrasyon ile orantılı olduğundan yararlanılarak bu maddelerin miktar tayini yapılabilmektedir [24].

Yöntemin en önemli üstünlüğü absorpsiyon yöntemine kıyasla çok daha az miktarlardaki maddelerin analizinin yapılabilmesi yani duyarlılığıdır. Ayrıca floresans gösteren maddelerin çok fazla sayıda olmaması yöntemin seçiciliğini diğerlerine kıyasla arttırmaktadır. Fakat diğer taraftan bu son özellik yöntemin uygulama alanını sınırlı tutmaktadır.

2.2.3 Floresans Oluşumun Prensipleri

Genellikle temel durumda yani en düşük enerjili halde tüm elektronları çiftleşmiş halde bulunan moleküller floresans veya fosforesans ışın yaymaktadırlar. Moleküler floresans olayı moleküldeki bağ elektronlarının, özellikle Π bağ elektronlarının bir foton ile etkileşmesinden oluşmaktadır. Çiftleşmiş spinli elektronların moleküler elektronik durumu, singlet hal olarak adlandırılır. Normal halde moleküldeki elektronlar en düşük enerjili temel singlet durumdadır. Ve spinleri birbirine zıttır. Gönderilen elektromanyetik radyasyonun enerjisi, molekülün temel durumu ile eksite durumu arasındaki farka eşdeğer ise elektronların biri veya birkaçı bu enerjiyi absorblar ve temel durumdan eksite singlet duruma yükselir. Elektronik seviyeler arasındaki enerji farkı UV veya görünür alandaki enerjilere eşdeğer olduğundan, enerji seviyeleri geçişlerine neden olan alan bu alandadır. Bu geçiş sırasında elektronların spininde bir değişiklik olmamış, aynı yönde kalmıştır. Eksite singlet hale yükseltilmiş, elektronun spini temel durumdaki elektronun spini ile çiftleşmiş halde kalır, sistemler arası bir geçiş yoktur [22].

Uyarılmış triplet durumunda ise elektronlardan birinin spini yön değiştirir. Aynı kuantum sayılı iki elektron bir orbitalde bulunamayacağından yeni bir orbitale yükselir. Uyarılmış triplet durumunda elektronların spinleri çiftleşmemiştir, paralel haldedir. Triplet seviyeye çıkmak üzere spinini ters döndüren elektron bu iş için bir

enerji harcamıştır. Bu nedenle triplet durumunun enerjisi singlet durumunkinden biraz daha düşüktür. Singlet temel durumdan doğrudan doğruya eksite triplet duruma geçiş olmaz. Ancak eksite singlet durumdan eksite triplet duruma geçiş olabilmektedir. Uyarılmış triplet durumda elektronun spininin başlangıçtaki yönüne dönmesine bir direnç oluştuğundan bu durumun ömrü eksite singlet halin ömründen daha uzun sürmektedir.

Molekülün temel hale geçişte seçtiği yol, uyarılmış halin en kısa süreli olduğu yoldur. Yani eğer floresans yayma ile deaktivasyon işlemi radyasyonsuz yola kıyasla daha çabuk oluyorsa floresans yayar. Radyasyonsuz yol daha hızlı ise ışın yayma ya çok azdır ya da yoktur.

Eğer uyarılmış singlet hal nispeten dayanıksızsa molekül temel duruma genellikle radyasyon yaymaksızın döner. Temel duruma dönmenin dışında uyarılmış veya temel durumların çeşitli titreşim seviyelerinden en düşük seviyeye inişlerde ya da bir uyarılmış singlet halden bir başkasına veya uyarılmış triplet hale geçişlerde de enerji kayıpları olmaktadır.

Radyasyon yaymaksızın ortaya çıkan başlıca enerji kaybı durumları şunlardır:

1. Titreşimsel dinlenme (vibrational relaxation : VR)
2. İç dönüşüm (internal conversion: IC)
3. Sistemler arası geçiş (intersystem crossing : ISC)
4. Enerji transferi (energy transfer)

2.2.3.1 Titreşimsel Dinlenme

Uyarılma ile herhangi bir titreşim seviyesine geçiş olabilir. Çözeltide uyarılmış haldeki moleküller ile çözücü moleküllerinin çarpışması sonucu titreşim enerjisinin fazlası derhal kaybedilir ve uyarılmış halin en düşük seviyesine geçiş olur. Bunun sonucunda ısı açığa çıkar ve çözeltinin sıcaklığı artar. Temel durumda da benzer durum söz konusudur. Herhangi bir yol ile temel haldeki bir titreşim seviyesine dönüş olduktan sonra bu seviyelerden en düşük olanına geçiş yine vibrasyonel dinlenme işlemi ile olmaktadır.

2.2.3.2 İç Dönüşüm

İki elektronik durumun titreşim seviyelerinin aynı olması halinde iki uyarılmış halin potansiyel enerjileri aynı olur. Bu durumda aynı enerjili titreşim seviyeleri arasında bir geçiş olur. İç dönüşüm sonucunda elektronun spini aynı yönde kalır.

2.2.3.3 Sistemler Arası Geçiş

Uyarılmış singlet durumdan triplet duruma geçişlerdir. Bu işlem sırasında elektronun spini döner. İç dönüşümde olduğu gibi iki durumun titreşim enerjilerinin aynı olması şarttır. Genellikle iyot, brom gibi ağır atomlu moleküllerde bu geçiş görülmektedir. Oksijen gibi paramagnetik türlerin varlığı da sistemler arası geçişi arttırmakta, floresans oluşumunu azaltmaktadır.

2.2.3.4 Enerji Transferi

Bu işlem uyarılmış durumdaki bir molekülün fazla enerjisini alıcı bir moleküle doğrudan ve ışıksız bir şekilde aktararak normal duruma dönmesidir. Enerji nakli aynı zamanda bir molekülde birbirinden uzaktaki iki kromofor grup arasında da ortaya çıkabilir.

Bu işlemlerin dördü de floresans yaymayı engelleyicidir.

Radyasyon yayılması sonucu floresans ve fosforesans oluşur.

2.2.4 Floresans Yayma

Molekül eğer göreceli olarak daha dayanıklı bir uyarılmış singlet durumda ise uyarılmış singlet durumun en düşük titreşim seviyesinden temel elektronik hale dönüş floresans yayma ile olur (Şekil 2.22) . Düşük konsantrasyonlarda, düşük sıcaklıkta ve yoğun çözücülerde çalışılarak uyarılmış singlet durum daha dayanıklı hale getirilebilir. Bunun sonunda çarpışma ile olan enerji kaybı azaltılarak floresans yayma arttırılabilmektedir [25].

Uyarılmış singlet halin titreşim seviyelerine uyarılmış bir molekül önce radyasyon yaymaksızın bu durumun en düşük titreşim seviyesine indiği ve sonra floresans yaydığı için, floresans yayma ile sonuçlanan geçişler absorpsiyon geçişlerinden daha düşük enerjilidir. Bu nedenle floresans ışının dalga boyu absorbe edileninkinden daha uzun olmakta yani emisyon spektrumu uyarılma spektrumundan daha uzun dalga boyunda ortaya çıkmaktadır. Bazı özel durumlarda ise temel halin bazı üst titreşim seviyelerinde bulunan moleküller de olabilir. Enerji diyagramında (Şekil

2.22) görüldüğü gibi böyle bir seviyeden S_1 haline uyarılma ve buradan temel durumun en düşük enerji seviyesine dönüş de mümkün olabilir. Bu durumda ise uyarılma spektrumunun en uzun dalga boyundan daha kısa dalga boyunda floresans yayılması nedeniyle uyarılma ve emisyon spektrumlarında çakışmalar gözlenebilir.

2.2.5 Fosforesans Yayma

Molekülün daha dayanıklı bir uyarılmış singlet durumda olması halinde önce singlet halden triplet duruma bir sistemler arası geçiş olur ve daha sonra temel duruma geçiş, fosforesans yayma ile olur. Uyarılmış triplet durumun en düşük enerji seviyesi en uzun ömürlü olan haldir. Dış koşullara bağlı olarak buradan ya fosforesans yayma ya da moleküller arası çarpışma ile temel duruma geçiş olur.

2.2.6 Floresansı Etkileyen Faktörler

Bir bileşiğin floresans gösterip göstermemesi ve floresans ışını şiddeti hem molekül yapısı hem de kimyasal çevreye bağlı olmaktadır.

2.2.6.1 Yapısal Faktörler

Bir molekülün floresans gösterebilmesi için ilk koşul UV veya görünür alandaki radyasyonun absorblanmasıdır. Bu absorblama ne kadar kuvvetli olursa yayılan floresansın şiddeti de o kadar kuvvetli olur. En düşük enerjili elektronik geçişleri $\Pi \rightarrow \Pi^*$ olan moleküllerin hem ϵ değerleri hem de floresans etkinlikleri yüksek olmaktadır.

Basit alifatik yapıli bileşikler absorbladıkları enerjiyi ışın yaymaksızın harcarlar ve floresans göstermezler. Ketonlar, aldehitler, karboksilli asitler, amidler, esterler gibi Π bağıli heteroatom içeren ve endüşük enerjili geçişleri $n \rightarrow \Pi^*$ olan bileşikler genellikle absorbladıkları enerjiyi iç dönüşüm şeklinde harcarlar ve az floresans gösterirler. Polienler ve aromatikler ile bunların türevleri ise floresans gösteren bileşiklerdir. Özellikle bunlardan düzlemsel ve katı yapıda olanların floresans etkinliğı en yüksektir.

Benzenin kendisi zayıf floresans gösterir. Benzen halkasının sübstitüsyonu sübstitüye olan gruba göre floresansı olumlu veya olumsuz yönde etkiler. Örneğın, orto ve para yönlendiricilerinden $-\text{OH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{NHR}$, $-\text{NRR}'$, $-\text{OR}$ gibi sübstitüentler floresansa ya etkili olmazlar ya da arttırlrlar. $-\text{COOH}$, $-\text{NO}$, $-\text{RCO}$, $-\text{CHO}$, $-\text{N}=\text{N}$, $-\text{I}$, $-\text{Br}$, $-\text{Cl}$ gibi

meta yönlendiriciler ise floresansı azaltıcı etki gösterirler. Bazı süstitüentlerin benzenin floresansına etkisi Tablo 2.5’de verilmiştir [23].

Tablo 2.5: Benzenin floresansına süstitüsyonun etkisi

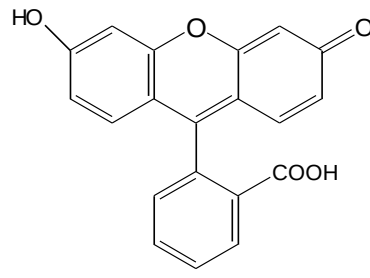
Bileşik	Formül	Floresansın dalga boyu, nm	Floresansın bağıl şiddeti
Benzen	C ₆ H ₆	270-310	10
Anisol	C ₆ H ₅ OCH ₃	285-345	20
Anilin	C ₆ H ₅ NH ₂	310-405	20
Fenol	C ₆ H ₅ OH	285-365	18
Toluen	C ₆ H ₅ CH ₃	270-320	17
Klorobenzen	C ₆ H ₅ Cl	275-354	7
Bromobenzen	C ₆ H ₅ Br	290-380	5
Benzoik asit	C ₆ H ₅ COOH	310-390	3
Nitrobenzen	C ₆ H ₅ NO ₂	-	0

2.2.6.2 Moleküler katılık

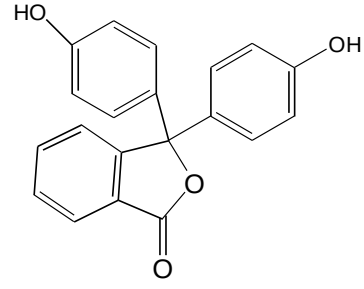
Moleküler katılık hareket serbestliğini azalttığından, triplet duruma sistemler arası geçişler ve moleküller arası çarpışmalar gibi ışın yaymadan geçiş olasılıkları azalır. Örneğin, benzer yapıda olan fluorescein ve fenolftaleyn bileşiklerinden fluorescein çözelti halinde kuvvetli floresans göstermesine karşılık moleküler katılık göstermeyen fenolftaleynin böyle bir özelliği yoktur (Şekil 2.24).

Metal iyonları ile şelat oluşturma da titreşimleri azaltan moleküler katılık sağladığından floresansı artırır. Örneğin, pontakrom BBR : 2,2’-dihidroksi-1,1’-azonaftalen-3-sulfonik asit sodyum tuzu floresans göstermezken alüminyum ile oluşturduğu şelat kuvvetli floresans gösterir (Şekil 2.25). Alüminyum ile şelat oluşturmada önce naftalen grupları azo grubu etrafında serbestçe dönebilmektedir. Şelat oluşumundan sonra molekül düzlemsel ve katı bir duruma kavuşur.

Şelatometrik titrasyonlarda bu tür maddelerden floresans indikatörü olarak yararlanılabilir. Örneğin, kalsiyum veya bakırın EDTA ile titrasyonunda, EDTA ile reaksiyon vermeyip kalsiyum veya bakır ile yeşil floresans gösteren şelatlar oluşturan kalsein bu amaçla kullanılmaktadır.

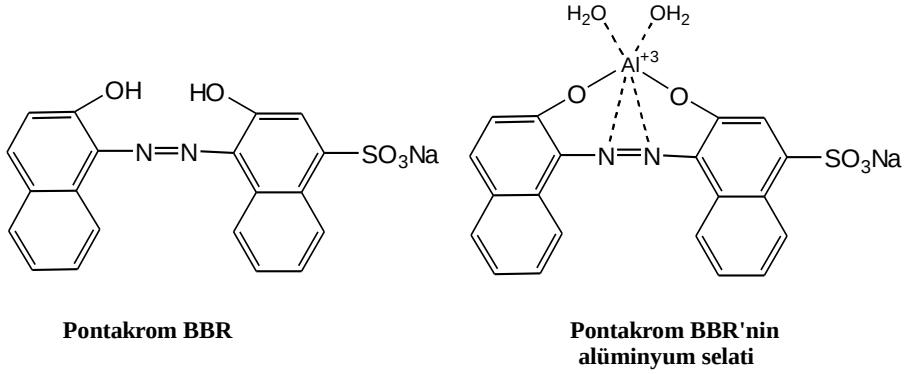


Fluorescein



Fenolftaleyn

Şekil 2.24: Fluorescein ve fenolftaleyn



Pontakrom BBR

Pontakrom BBR'nin
alüminyum selati

Şekil 2.25: Pontokrom BBR ve Pontokrom BBR'nin alüminyum şelati

2.2.6.3 Sıcaklık ve Viskozite

Birçok molekülün floresansı sıcaklığın artması ile azalır. Sıcaklığın artması ve çözücünün viskozitesinin azalması, uyarılmış molekül ile diğer moleküllerin çarpışması ve ayrıca sistemler arası geçişlerin olasılığını arttırmaktadır. Düşük sıcaklıkta ve yüksek viskoziteli ortamda ise dinlenme zamanı uyarılmış durumun ömründen daha uzun olmakta ve floresans artmaktadır.

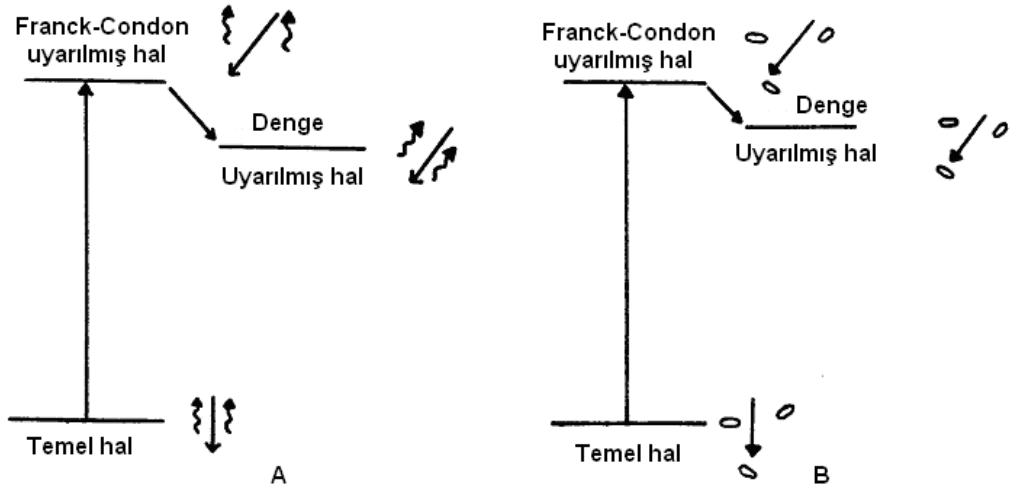
2.2.6.4 Çözücü

Kullanılan çözücüler floresans şiddetinin veya floresansın görüldüğü dalga boyunun değişmesine neden olabilir. Çözücünün genellikle uyarılmış durumdaki moleküller ile hidrojen bağı oluşturması temel hale radyasyonsuz dönüş işleminin hızını artırdığından floresansın şiddetinde azalma olur. Bu nedenle -OH, -COOH, -NH₂ gibi hidrojen bağı oluşturabilecek gruplar içeren maddelerin analizinde çözücü seçiminde dikkatli olunmalıdır. Örneğin, 5-hidroksi kinolinin izopentandaki floresans etkinliği değeri 0,3 iken DMSO'da 0,07'ye düşmektedir.

Bir veya daha çok sayıda ağır atom içeren çözücüler, sistemler arası geçiş olasılığını arttırdıklarından floresansı azaltırlar.

Çözücünün polaritesi floresansın şiddetinden çok dalga boyunu etkiler. Genellikle polaritenin artması ile floresans emisyonunun maksimumu daha uzun dalga boyuna kayar. Örneğin, uyarılma maksimumu 285 nm olan indolün emisyon maksimumları sikloheksanda 297 nm, benzende 305 nm, dioksanda 310 nm, etanolde 330 nm ve suda 350 nm'dir [21].

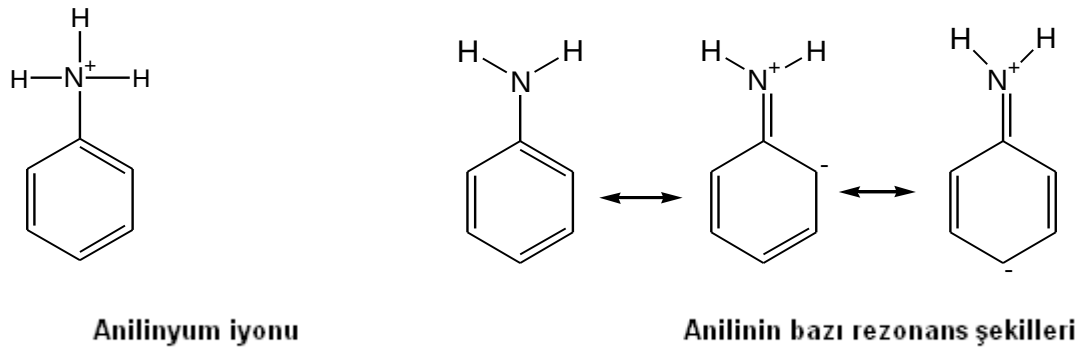
Uyarılma spektrumuna solvent etkileri, absorpsiyondakine benzerdir. Bir florofor, daha az polar ortama koyulduğunda emisyon spektrumunda maviye kayma gözlenir. Bu şekil 2.26'te gösterilmiştir. Polar bir çözücüde (Şekil 2.26A), solvent molekülleri temel hal çevresinde düzenlenmişlerdir. Uyarılda ise, floroforun dipolü değişmiş ve Franck-Condon uyarılmış halde, solvent molekülleri artık en kararlı konfigürasyonda değildir. Bununla birlikte, emisyon uyarılmış denge halinde oluşmaktadır ve solvent molekülleri emisyonadan önce yeni uyarılmış hal dipolü çevresinde kendilerini düzenlemek için yeni bir şansa sahip olmuşlardır. Ve uyarılmış hal solvent etkileşimleri ile kararlı hale gelmiştir. Apolar bir solventte (Şekil 2.26B) solvent moleküllerinin uyarılmış hal çevresinde yeniden düzenlenmeleri söz konusu değildir ve de uyarılmış hal kararlı hale gelmez. Bir florofor polar bir çözücüden apolar bir çözücüye aktarıldığında, uyarılmış hal ve temel hal arasındaki enerji farkı, apolar çözücünün uyarılmış hali stabilize edememesine bağlı olarak, artar. Bu, emisyon maksimumunda “maviye kayma” ile sonuçlanır.



Şekil 2.26: Floresans emisyonuna çözücü etkileri (A) polar çözücü, (B) nonpolar çözücü, (→) florofor dipolü, (o) solvent dipolü, (o) dipolü olmayan solvent molekülleri

2.2.6.5 pH

Asidik ve bazik grup içeren bir bileşiğin floresansı ortamın pH'ına bağlıdır. Örneğin, nötr ortamda hem fenol hem metoksibenzen floresans gösterir. Bazik ortamda fenol, floresans göstermeyen anyonuna dönüşürken, metoksibenzen değişiklik göstermeden kalır. Anilin çözeltisi nötr ve bazik ortamda iken görünür alanda floresans gösterir. Çözelti asitlendirildiğinde bu floresans kaybolur. Diğer taraftan anilin pH'a bağlı olmaksızın UV alanda floresans göstermektedir. Asidik çözeltide azot atomu pozitif yük ile yüklenerek anilinyum iyonu oluşturur. Bu durumda amin grubu halka ile rezonansa girememekte ve bu nedenle anilinyum iyonunun rezonansı benzeninkiyle aynı olmaktadır (Şekil 2.27). Nitekim benzen de UV alanda floresans gösterir. Diğer taraftan nötr ve bazik ortamda anilin üç ilave rezonans yapısı gösterir ve bunu sonucunda daha dayanıklı uyarılmış singlet durumu oluşması nedeniyle floresans ışının dalga boyu daha uzun dalga boyuna kayar.



Şekil 2.27: Anilinyum iyonu ve anilinin bazı rezonans şekilleri

Bu şekilde ortamın pH'ına bağlı olarak floresans gösteren bileşiklerden asit-baz titrasyonlarında indikatör olarak yararlanılabilir.

2.2.6.6 Çözünmüş Oksijen, Paramanyetikler ve Ağır Atomlar

Floresans gösteren bir çözeltinin floresans şiddeti çözünmüş halde bulunan oksijenin etkisi ile azalır. Bu etki organik maddenin fotokimyasal yolla oksidasyonu sonucu olabileceği gibi oksijenin paramanyetik yapısı da bu duruma neden olabilir. Oksijen bu yapısı nedeniyle uyarılmış durumdaki moleküllerin sistemler arası geçişler ile triplet duruma geçmelerine neden olur ve bunun sonucunda floresans azalır. Bu bakımdan analizden önce çözeltiden çözünmüş havanın uzaklaştırılması uygun olur.

Oksijenden başka Fe⁺³, Co⁺², Ni⁺², Cu⁺² gibi paramanyetik ve dış d orbitalleri dolmamış geçiş elementleri de floresansı söndürmektedir. Bunların etkisi de

oksijende olduğu gibidir. Uyarılmış singlet durumdan triplet duruma geçiş hızı artırılır. Buradan temel duruma geçiş genellikle radyasyon yaymaksızın çarpışmalar ile olur [24].

Benzer bir etki de Hg^{+2} , Au^+ , Tl^{+3} gibi diyamanyetik fakat ağır atomların floresans üzerine olumsuz etkileridir. Bunlar da benzer şekilde sistemler arası geçişi hızlandırmakta ve floresansı azaltmaktadır. Na^+ , K^+ , Ca^{+2} , Mg^{+2} gibi diyamanyetik hafif metaller floresansı değiştirmezler.

2.2.7 Işık Soğurumu

Moleküllerin ışığı soğurma özellikleri, soğurum (absorbsiyon) spektrometresinin esasını oluşturur. Moleküllerin soğurma özellikleri, yapıları ve bulundukları ortama göre değişir. Böylece soğurum spektrometresi moleküllerin yapıları ve çevrelerine ilişkin önemli bilgiler verir. Ayrıca belirli bir dalga boyundaki ışığın, içinden geçtiği çözeltide soğurulan miktarı maddenin çözeltideki derişimi ile orantılıdır [25]. Bu özellik sözkonusu maddenin çözeltideki içeriğinin belirlenmesine imkan tanır. Soğurum (A), Bouger-Lambert-Beer yasasıyla:

$$A = \log (I_0 / I) = \epsilon \cdot C \cdot D \quad (2.2)$$

şeklinde ifade edilmiştir. Burada ϵ , molar soğurum(ekstinksiyon) katsayısı ($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$) C, derişim ve d, ışığın kuvet boyunca geçtiği yol (cm)'dur. Bu eşitlik kullanılarak ϵ değeri bilinen ve soğurum değeri ölçülen bir çözeltinin derişimi hesaplanır.

Floresans kuantum verimi (q), yayılan ışığın yüzdesini gösteren bir ifadedir ve floresans boyaların kalitesini belirleyen bir tanımdır (2.2). Deneysel olarak q, kuantum verimi belirli bir standartla kıyaslanarak belirlenir.

$$q = \text{yayılan fotonların sayısı} / \text{absorblanan fotonların sayısı} \quad (2.3)$$

Belli bir dalgaboyunda floresans emisyon veren fotonların ışık şiddetlerinin uyarma dalgaboylarına göre dağılımı floresans uyarma grafiğidir ve bu, soğurum grafiğinin bir analogudur.

2.2.8 Floresans Yayılım Grafiği

Floresans yayılım bilgileri, floroforun kimyasal yapısı ve içinde bulunduğu çözücü ortamına bağlı olarak değişiklik gösteren yayılım spektrum aracılığıyla elde edilir. Floresans yayılım spektrumu, floresans ışık şiddetinin dalga boyu ya da dalga

sayısına göre değişimdir. Floresans kuantum verimi ışık soğurumu sonucu yayılan foton sayısının soğurulana oranı olarak tanımlanır. Uyarılmış seviyedeki molekülün temel elektronik seviyeye geçmeden önce geçirdiği zaman floresans yaşam süresi (lifetime)olarak tanımlanır ve τ ile gösterilir. Floresans enerji aktarımı: uyarılmış elektronik seviyedeki kromofor (floresans özellik taşıyan grup) enerjisini, doğrudan etkileşimde olmadığı diğer bir kromofora aktarabilir.

Floresansın şiddeti ile floresans yayan maddendin konsantrasyonu arasında çizilecek grafik düşük konsantrasyonlar için doğrusaldır. Absorbansın 0.05'ten fazla olduğu konsantrasyonlarda doğrusallık bozulur.

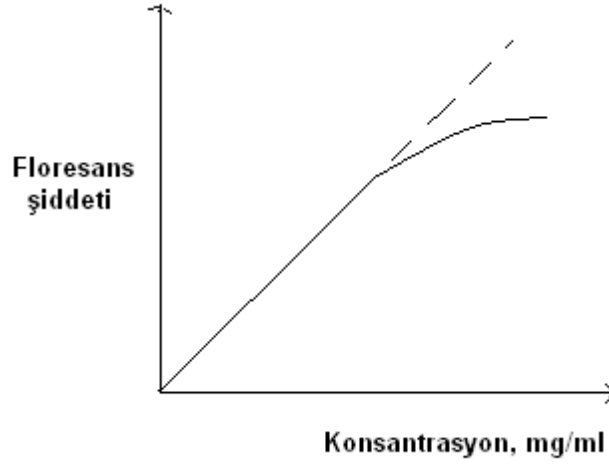
Floresans ışının şiddeti gelen ışının şiddetine doğrudan bağlıdır. Bu durumda gelen ışının şiddetinin artırılması ile duyarlılık kolayca artırılabilir. Fakat gelen ışının şiddeti arttıkça hem fotodekompozisyon olabilir hem de çözücü ve bazı kirliliklerden oluşabilen floresans da bu sırada artar. Bu nedenle florometrik ölçümlerde teşhis sınırı boş deneme çözeltisinin floresans şiddeti ile sınırlıdır [22].

Işık kaynağını şiddeti zaman zaman değişebileceğinden floresans sinyalleri mutlak değerler olarak ölçülemez. Bu nedenle floresans şiddeti gerçek değerden çok bağlı floresans değerleri ile ifade edilir. Ölçmeler bazı standart maddelerin floresans şiddetine bağlı olarak yapılır. Bu amaçla en çok kullanılan standart maddeler kininsülfat, diklorfluorescein, rhodamin B gibi maddeler veya cam referanslardır.

Floresansın şiddeti molar absobtivite ile orantılıdır. Bu nedenle uyarıcı ışının dalga boyunun maksimum absorbsiyonunun dalga boyunda olması gerekir.

Kantitatif analiz çalışmalarında analiz edilen maddenin bilinen konsantrasyonlardaki çözeltilerinin floresans değerleri ölçülür ve standart maddelere oranlanır. Konsantrasyonlar ile bunlara eşdeğer bağlı floresans şiddetleri arasında çizilen standart eğri yardımıyla bilinmeyen konsantrasyon bulunur. Tüm ölçmelerde uyarıcı ışık kaynağı, çözücü, sıcaklık, pH vb. deney koşulları aynı olmalıdır.

Yayılan floresans ışının çözeltideki bileşenler tarafından absorbe edilmesi nedeniyle şiddetinin azalması olayına söndürme (quenching) denir. Bu etki doğrudan doğruya maddenin kendisi tarafından oluşturuluyorsa kendi kendini söndürme (self quenching) söz konudur. Konsantrasyonun artması ile bu durum ortaya çıkar. Şekil 2.28' de naftalenin floresans şiddetinin kendi kendini söndürme nedeniyle azalması görülmektedir [23].



Şekil 2.28: Naftalende konsantrasyonun floresans şiddeti üzerine etkisi

Söndürme uyarılmış durumdaki moleküllerin safsızlık olarak bulunan yabancı moleküller ile çarpışması sonucu ışınsız enerji kaybıyla da olabilir. Bu olaya safsızlık söndürmesi (impurity quenching) denir. Ayrıca ortamda bulunan çözünmüş haldeki oksijen, ağır metaller veya paramanyetikler sistemler arası geçiş hızını etkilediklerinden sönmeye neden olabilirler.

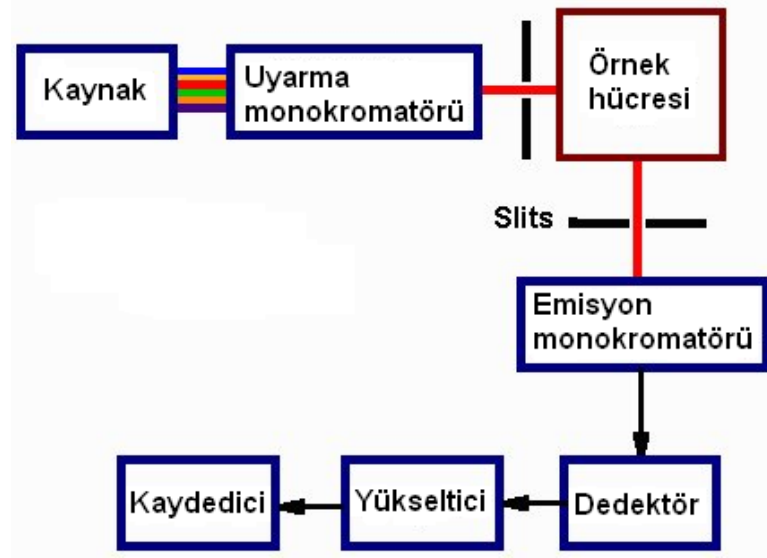
Florimetrik çalışmalar için hazırlanmış özel saf çözücülerin kullanılması ile sönmeye sebep olan bazı etkenler önenebilir. Sıcaklık ve pH değişimleri de sönmeye neden olabilir. Maddenin uzun süre UV ışına maruz bırakılması sonucu fotokimyasal reaksiyon olabileceğinden floresans azalır.

2.2.9 Florometre ve Spektrofluorometre Aleti

Floresans analizlerinde floresans ışının şiddetini ölçmek için kullanılan aletin başlıca kısımları ışık kaynağı, örnek küveti, uyarma ve emisyon dalga boylarını seçecek bir çift filtre veya monokromatör ve floresansı ölçecek dedektördür. (Şekil 2.29)

Işık kaynağından çıkan UV veya görünür alandaki ışın, analiz edilecek örneğe gelmeden önce bir yarık ve sonra monokromatörden geçirilir. Örnek çözeltisinden her yöne dağılan floresans ışın belli bir açıdan, önce bir yarıktan ve sonra emisyon filtresi veya monokromatöründen geçirildikten sonra fototüpe gelir. Yükselticiden geçirildikten sonra floresans ışının şiddeti göstergeden okunur veya yazıcıda bir pik halinde kaydedilir. Bazı aletlerde ise ışık kaynağının şiddetindeki ve dedektör cevabındaki değişiklikleri gidermek üzere çift ışınlı (double beam) düzenek kurulmuştur. Burada ışık kaynağından çıkan ışın monokromatörden geçtikten sonra

ikiye ayrılır. Işınlardan biri örnek çözeltisinden geçtikten sonra, diğeri ise doğrudan doğruya fototüpe gelir. Bu şekilde çalışılarak ışık kaynağının şiddetindeki değişiklikler giderilebilmektedir. Ancak çift ışınlı deyimi absorpsiyon spektrofotometresinde kullanıldığı anlamda değildir. Çözücü veya belirteçlerden ileri gelebilecek floresans yayma veya katı parçacıklardan yayılabilecek ışınlar bu şekilde giderilemez. Bunun için blank floresansının ayrıca ölçülerek örneğinkinden çıkarılması gerekir [21].



Şekil 2.29: Florometre cihazı

Floresans ışının şiddeti gelen ışının şiddetine bağlı olduğundan duyarlılık bakımından ışık kaynağının kuvveti önemli olmaktadır.

En çok kullanılan ışık kaynakları cıva ark lambası ve ksenon ark lambasıdır. Ksenon lamba değişik dalga boylarında çok fazla değişmeyen bir emisyon gösterirken, cıva lamba belirli dalga boylarında yüksek şiddette bandlar halinde emisyon yaymaktadır. Ksenon lambanın devamlı ve yakın şiddetteki emisyonu genellikle farklı dalga boylarında çalışıldığında tercih edilir. Fakat analiz edilen maddenin numunenin uyarılma maksimumunun cıvanın emisyon bantlarından birine uyması halinde floresans şiddeti daha fazla olacağından cıva lamba ile daha hassas analizlerin yapılması mümkün olacaktır.

Cıva ark lamba ile emisyon spektrumu alınabilir. Fakat emisyonu devamlı olmadığından uyarılma spektrumu alınamaz. Bu nedenle spektrofluorometrelerde 200-700 nm arasında ve düzenli emisyonu olan ksenon lamba kullanılarak hem uyarılma hem de emisyon spektrumu alınabilmektedir.

Son yıllarda ultraeser analizlerde ışın kaynağı olarak güçlü lazer ışınından da yararlanılmaktadır.

Uyarılma ve emisyonun seçiciliğini sağlamak üzere gelen ışın ile örnek çözeltisi arasına ve örnek çözeltisi ile dedektör arasına filtreler veya monokromatörler yerleştirilmiştir. Monokromatörler filtrelerle kıyasla daha dar aralıkta bir ışın demeti geçirirler. Florometrelerde filtreler, spektrofluorometrelerde ise monokromatörler kullanılır. Florometrelerde kullanılan filtreler çeşitlidir. Genellikle eksitasyon filtresi istenen dalga boyundan daha büyük dalga boyundaki ışınları geçirmeyecek şekilde seçilir. Böylece ışın kaynağından dağılarak dedektöre gelebilecek ışınlar önlenir. Cıva lamba ile çalışılırken özel plastik filtreler kullanılarak 300 nm'nin üzerindeki emisyon absorblanır ve sadece 254 nm'deki radyasyon elde edilir. İnterferans filtreler tek tek cıva bandlarını seçmek için kullanılır. Band-pass filtreler ise belirli birkaç bandı geçirir. Cıva lamba fosfor ile kaplanarak kesik kesik olan emisyonu devamlı hale getirilebilir [22].

Spektrofluorometrelerde özellikle görünür alanda prizmaya karşı daha iyi bir ayırım sağlayan difraksiyon şebekeli monokromatörler (grating monochromator) kullanılır.

Yarık aralığının uygun bir genişlikte seçilmesi gerekir. Genellikle geniş yarık hassasiyeti artırırken girişim gösteren dağılan ışınların görünmesine yani ayırmanın azalmasına neden olur. Uyarılma spektrumu anlıyorsa uyarılma yarığı iyi ayırma için dar tutulurken emisyon yarığı daha yüksek hassasiyet için daha geniş ayarlanır. Emisyon spektrumu alınırken ise aksi yapılır.

Dedektör olarak genellikle foto çoğaltıcı tüpler kullanılır. Dedektöre gelen ışın burada elektrik enerjisi haline dönüştürülür ve yükselticiden geçirildikten sonra akım şiddetinin değeri göstergeden okunur veya yazıcıda kaydedilir.

Örnek çözeltilerini içeren küvetler kuvarz veya camdan yapılmıştır. Uyarmanın 320 nm'nin altında olması halinde kuvarz küvetler kullanılır.

Örnek çözeltisinin yerleştirildiği bölümün içi gelen ışının yansımaları önlemek üzere siyah renge boyanmıştır.

2.2.10 Uyarılma ve Emisyon Spektrumları

Çift monokromatörlü bir spektrofluorometre ile analiz edilecek maddenin uyarılma ve emisyon spektrumu alınabilir. Bunun için örnek önce herhangi bir dalga boyunda ışın

ile uyarılarak maksimum emisyon gösterdiği dalga boyu saptanır. Madde çözeltisi ile dedektör arasındaki emisyon monokromatörü sabit tutulurken ışık kaynağı ile madde çözeltisi arasındaki uyarılma monokromatörü 200 nm yakınlarından başlanarak otomatik olarak değiştirilir. Bu şekilde yazıcıda çizilen, maddenin uyarılma spektrumudur. Daha sonra uyarılma monokromatörü, uyarılma spektrumundan saptanan maksimum dalga boyunda sabit tutulurken, emisyon monokromatörü değiştirilir. Böylece maddenin emisyon spektrumu elde edilir. Uyarılma spektrumu, uyarılma dalga boyu ile floresans ışınındaki değişmelerin kaydedilmesi ile alınır. Emisyon spektrumu ise floresans yaymanın spektral dağılımıdır.

Analitik uygulamalarda emisyon spektrumu kullanılmaktadır. Ancak analiz edilecek maddenin en uygun uyarılma dalga boyunun saptanması için uyarılma spektrumunun alınması uygundur. Maddenin uyarılma spektrumu absorpsiyon spektrumu ile aynıdır. Maddenin floresans yayma ile kaybettiği enerji, absorpsiyon ile kazandığından daha az olduğundan emisyon spektrumu uyarılma spektrumuna kıyasla daha uzun dalga boyunda ortaya çıkar.

Filtreli florometreler ile çalışılırken ölçme işleminden önce uygun filtrelerin seçilmesi gerekir. Bunun için örneğin çalışılacak konsantrasyonda bir çözeltisinin ve blank'in floresansı çeşitli primer filtreler denenerek ölçülür. Blank için en düşük, örnek için en yüksek floresansın ölçüldüğü filtre saptanır. Bu seçilen primer filtre ile bu defa sekonder filtreler değiştirilerek en yüksek floresansın okunduğu filtre saptanır. Ölçümlerde bu filtreler kullanılır [23].

2.2.11 Floresans Uygulamaları

Floresans gösteren bir maddenin yaydığı ışının maksimum dalga boyu o madde için karakteristik olduğundan floresans analizleri ile maddelerin kalitatif analizleri mümkün olmaktadır. Kantitatif analizler ise belli bir konsantrasyon aralığında floresans şiddeti ile konsantrasyon arasındaki ilişkinin doğrusal olmasından yararlanılarak yapılmaktadır. Floresans özellik gösteren fakat örnekteki miktarları çok az olduğundan kolorimetrik veya spektrofotometrik yöntemler ile tayin edilemeyen pek çok madde, çok düşük konsantrasyonlardaki çözeltilerinden (10^{-4} - 10^{-9} M) florometrik yöntem ile tayin edilebilirler.

Floresans analizlerinin hem organik hem anorganik maddelerin özellikle biyokimya, farmasötik kimya, çevre kirliliği analizlerinde çok geniş bir uygulama alanı vardır [24].

2.2.11.1 Anorganik Maddelerin Analizi

Çözeltileri halindeyken floresans gösteren az sayıda anorganik iyon bulunmaktadır. Bunlardan en iyi bilineni uranil iyonudur. Bundan başka krom(III), seryum (III), talyum(I) iyonları da floresans gösterdiklerinden florometrik olarak tayin edilebilirler.

Az sayıda anorganik iyon doğrudan doğruya floresans göstermesine rağmen, pek çok sayıda anorganik iyon bazı aromatik yapıda maddeler ile şelat oluşturarak kuvvetli floresans yayan bileşikler oluştururlar. Böylece pek çok elementin hassas bir şekilde mümkün olmaktadır. Örneğin alüminyum, 8-OH kinolin veya 2,2'-bipridin gibi bileşikler ile kuvvetli floresans gösteren kompleksler oluşturur. Bu ligandların bir kısmı zayıf floresans gösterir, bir kısmı hiç göstermez [25].

Siyanür ve florür gibi bazı anyonlar floresans söndürme özelliklerinden yararlanılarak analiz edilebilirler.

2.2.11.2 Organik Maddelerin Analizi

Biyokimya, farmasötik kimya ve çevre kirliliğinden pek çok maddenin analizi florometrik olarak yapılmaktadır. Yöntemin hassasiyeti ve özellikle seçiciliği pek çok biyolojik kaynaklı maddenin kompleks karışımlarından dahi analizine olanak sağlar.

Triptofan, tirozin ve fenilalanin gibi bazı aromatik yapıli aminoasitler floresans gösterirler. Diğer çok sayıda asit ve protein floresans göstermemesine rağmen bunlar, bazı uygun maddeler ile türevlendirilerek floresans gösteren bileşiklerine dönüştürüldükten sonra analiz edilebilirler. Örneğin fenilalaninin floresansı zayıftır. Ninhidrin ve Cu(II) ile kuvvetli floresans gösteren türevi haline dönüştürüldükten sonra analiz edilir. Bu amaçla en çok kullanılan belirteçler şunlardır:

Aminoasitler için, dansilklorür, NBD klorür, o-ftaldialdehit, feniltiohidantoin; amin grubu içeren maddeler için floreskamin, kinolin-8-sülfonil klorür, asetilbenzaldehit; alkol grubu içeren maddeler için 3-kloroformil-7-metoksikumarin'dir.

pH'a bağılı olarak farklı şiddette floresans gösteren pirimidin, purin ve nukleik asitler de doğrudan doğruya veya türevlendirildikten sonra tayin edilirler. Enzim kinetiğinin ve mekanizmalarının aydınlatılması çalışmalarında, enzimlerin kalitatif ve kantitatif analizlerinde de florimetriden yararlanılmaktadır.

Dozaj formlarındaki etken maddeler genellikle hassasiyet gerektirmeyecek miktarlarda bulunmaktadır. Fakat kan, idrar gibi biyolojik sıvılarda etken madde ve bunların metabolitleri çok az miktarlardadır. Bu nedenle ilaç absorpsiyonu, metabolizması ve atılımının hız ve mekanizmalarının araştırıldığı çalışmalarda floresans analizlerinden yararlanılmaktadır.

Vitaminler, steroidler, sedatifler, tranklizanlar, analjezikler, antihistaminikler gibi bir çok ilaç maddesi florometrik yöntem ile tayin edilebilmektedir. Vitaminlerden, B₁: tiamin analizi en bilinenidir. Tiamin floresans özellik göstermez, fakat oksidasyon ürünü thiocrome kuvvetli floresans özelliktedir. Tiamin analizi oksidasyon işleminden sonra yapılır. Reserpin de floresans gösterir. Fakat analizi genellikle daha kuvvetli floresans veren oksidasyon ürünü üzerinden yapılır.

Hem hava hem de su kirliliğine neden olan bazı maddelerin analizi de florometrik yöntem ile yapılabilir. Hava kirliliğine neden olan aromatik maddelerden en çok tanınanı kanserojen etkili benzopirendir. Benzopiren nanogram seviyede sigara dumanı, egsoz dumanı gibi etkenlerle kirlenmiş hava örneklerinde kalitatif veya kantitatif amaçla analiz edilebilmektedir.

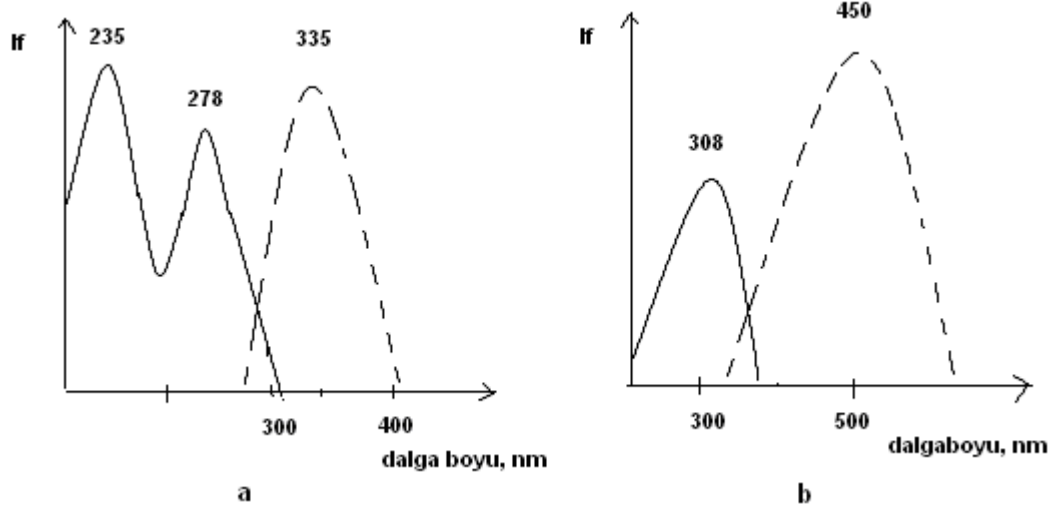
Su ve havadaki kirliliklerin izlenmesinde radyoaktif izleyiciler yerine floresans gösteren bileşiklerin kullanılması, kullanıldıkları miktarlarda sağlığa zararlı olmamaları bakımından çok daha uygun olmaktadır. Bu amaçla rhodamin B'den çok yararlanır. Bu çalışmalar ile çevrede ortaya çıkan kirlilikler izlenebilmektedir.

Floresans gösteren birçok maddenin florometrik analizi, yöntemin seçiciliği nedeniyle doğrudan yapılabilmesine rağmen karışımlarda birden fazla floresans gösteren maddenin bulunması durumunda analizde bazı hususlara dikkat edilmelidir.

Floresans gösteren iki maddeden analiz edilecek olan, diğerinden farklı dalga boyundaki ışını absorbe ediyorsa, uyarılma filtresinin ayarlanması ile sadece bu maddenin uyarılması mümkün olur. Her iki madde aynı alanda absorblama yapıyor fakat farklı alanda floresans yayıyorsa bu defa emisyon filtresi veya monokromatörü ayarlanarak sadece analiz edilen maddenin emisyonu saptanır. Bu şekilde iki

değişkenin ayarlanması ile bir ayırma yapmaksızın basit karışımların analizi mümkün olmaktadır.

Aspirin tabletlerindeki asetilsalisik asit miktarı, kirlilik olarak bulunan salisilik asit yanında tayin edilebilir. Bu iki maddenin eksitasyon ve emisyon spektrumları Şekil 2.30 de görülmektedir.



Şekil 2.30: a) Asetilsalisilik asidin, b) Salisilik asidin eksitasyon ve emisyon spektrumları

İki maddenin uyarılma maksimumlarının farklı olmasından yararlanılır. Örnek 235 nm'de uyarılırsa, asetilsalisik asit uyarılacak, örnekte az miktarda bulunan salisilik asit bu dalga boyundaki ışıktan pek etkilenmeyecektir. Floresans ışının şiddeti 335 nm'de ölçüldüğünde ise salisilik asidin bu dalga boyunda emisyonu olmadığından bu dalga boyunda rahatlıkla çalışılabilir.

Bazı durumlarda dış koşullar ayarlanarak ölçüm yapılabilir. Örneğin floresansın pH ile değişmesinden yararlanılarak o-, m-, p- hidroksi benzoik asit bir aradayken analiz edilebilir. p-benzoik asit floresans göstermezken m-benzoik asit pH=12'de, o-benzoik asit ise pH'ı 5.5 ve daha yukarı olan çözeltilerde floresans göstermektedir. İlk olarak pH'ı 5.5 olan çözeltide çalışılarak o- ve m- bileşiklerinin toplam miktarı bulunur. İlk çalışma ile aradaki farktan m-benzoik asit hesaplanır. Diğer taraftan bir başka uygun yöntemle üçünün analiz sonucundan p-benzoik asit hesaplanabilir.

Daha kompleks karışımlardan floresans ölçmeleri sadece uyarılma ve emisyon dalgaboylarının ayarlanması ile yapılamaz. Yakın dalga boylarında floresans yayan birçok maddenin yanında analiz edilecek maddenin floresansının ölçülmesi, herhangi bir kromatografik ayırma yöntemini takiben yapılabilir. Birçok organik madde

yüksek basınçlı sıvı kromatografisi, kağıt ve ince tabaka kromatografisi gibi tekniklerle ayrılmalarından sonra floresans ölçümleri ile tanınmakta veya tayin edilmektedir [22].

Floresans gösteren birçok organik madde, kağıt veya ince tabaka kromatografisi uygulandıktan sonra 254 ve 366nm'deki cıva lambası ile aydınlatıldığında floresans gösteren lekeler halinde görülürler. İnce tabaka kromatografisinde ayrıca anorganik fosforlar içeren adsorbanlar da kullanılmaktadır. İncelenecek maddeler fosforlu tabakanın floresans yaymasını söndürdüğünden parlak zemin üzerinde karanlık lekeler halinde görülürler.

İnce tabaka üzerinde kalitatif analizden başka maddelerin kantitatif analizi de yapılabilmektedir. Florodansitometrik yöntem denilen bu yöntemde florometre aletine bir ince tabaka tarayıcısının takılması ile hazırlanan düzenekte, floresans gösteren lekelerin floresans şiddeti ölçülür. Floresans şiddeti lekedeki madde miktarı ile orantılıdır. Böylece karışımın başarılı bir şekilde ayrılmasından sonra madde miktarı tayin edilebilmektedir.

Florodansitometrik yöntemde iki şekilde çalışılabilir. Doğrudan doğruya kendileri veya bazı belirteçler ile oluşturdıkları türevleri floresans ışın yayan maddeler, emisyon yaymayan ince tabaka üzerinde ölçülebilir. Madde miktarı arttıkça yayılan floresans ışınının şiddeti artar. Diğer bir yöntem olan quenching yönteminde ise UV ışını absorblayan fakat floresans yaymayan maddeler analiz edilir. Uygun floresans indikatörleri ile floresan özellik kazanan ince tabakanın floresansındaki azalmadan maddelerin miktarı tayin edilebilir. madde miktarı arttıkça söndürme artacağından floresans şiddeti azalacaktır. İlk yöntem ikinciye kıyasla daha yaygın olarak kullanılmaktadır. Maddeler floresans gösteren bileşikleri haline uygun bir belirteç kullanılarak dönüştürülebilirler. Bu reaksiyon kromatografi işleminden önce yapılabileceği gibi, kromatografik ayırmadan sonra tabaka üzerine belirteç çözeltisi püskürtülerek de yapılabilir.

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi aletinde florometrik bir dedektörün kullanılması ile karışımdaki maddelerin sütunda ayrılmaları sonrasında eluat floresans ölçümü yönünden izlenir. Böylece floresans gösteren bileşiklerin kalitatif veya kantitatif analizleri mümkün olmaktadır.

Florometrik analizlerin spektrofotometrik analizlere kıyasla iki üstünlüğü, daha düşük konsantrasyonlarda ölçme yapılabilmesi nedeniyle yüksek duyarlılığı ve hem uyarılma hem de emisyon dalga boyunun değiştirilebilmesi sayesinde yüksek seçiciliğinin olmasıdır. Genel olarak floresans analizleri 10^{-8} - 10^{-9} M konsantrasyona kadar duyarlıdır. Sadece belirli yapıda maddelerin floresans göstermesi, bir yandan yönteme seçicilik kazandırırken diğer yandan bir dezavantajdır. Ancak belirli yapıda maddelerin analiz edilebilmesi yöntemin uygulama alanının sınırlı kalmasına neden olmaktadır. Ayrıca uyarılmış durumdaki molekülün floresansını söndüren pek çok faktör olması titiz bir şekilde çalışmayı gerektirmektedir.

2.3 Floresans Problar: Prensipler Ve Uygulamaları

Canlı hücrelerin doğal bileşenleri olan ve biyopolimerlerin yapıtaşı olan aromatik bileşiklerin yanı sıra, moleküler biyoloji ve hücre biyolojisinde yapay etiketler ve problar da keşfedilmiştir [26].

Çoğunlukla şu amaçlarla kullanılırlar:

1. Molar absorpsiyona ve floresans kuantum verimine bağlı olan hassasiyeti arttırmak
2. Floresans ölçümlerinin görünür bölge ve yakın IR bölgesinde yapılmasına olanak sağlama,
3. Floresans ömrünü arttırma,
4. Belirli moleküler etkileşimleri inceleyebilme (hidrofobik bağlanma vb.)
5. Aromatik gruplar arasındaki uzaklıkları, uyarılma enerji transferi ile belirleyebilme.

Problar genellikle floresans özellik gösteren organik yapılardır. Floresans problar ise genelde aromatik heterosiklik bileşiklerdir.

Floresans probların suda zayıf çözünürlükleri ve hidrofobik bağlanma bölgelerine yüksek ilgileri vardır. Bu yüzden, sıvı-sıvı ve sıvı-katı yüzeyler, proteinler, biyomembranlar ve onların fosfolipid modelleri, ince filmler, miseller ve ters miseller gibi mikroskopik olarak heterojen sistemlerin incelenmesinde önemli bir araç haline gelmektedirler. Floresans rengini değiştiren floresans problar rağbet görür.

Floresans problar proteinlerin ligand bağlanma bölgelerinin ve değişik koşullardaki konformasyonel değişimlerinin karakterizasyonu gibi bir çok konunun

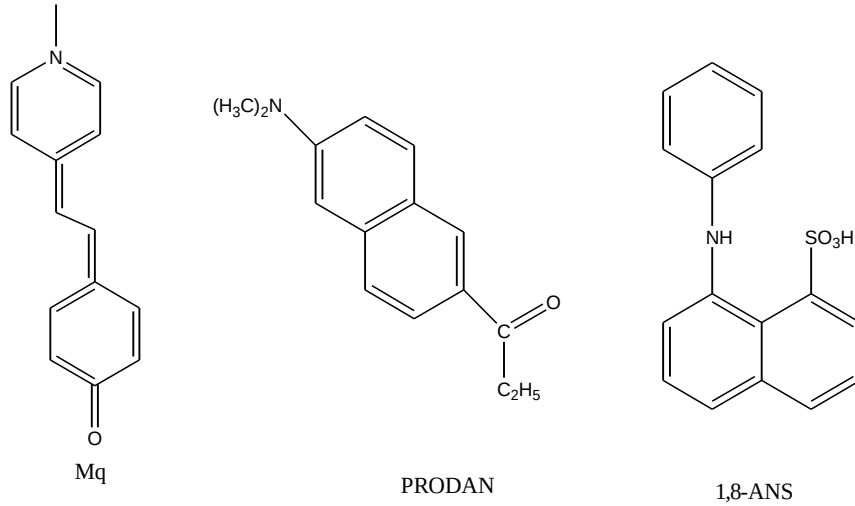
incelenmesinde de yaygın olarak kullanılmaktadırlar [27]. Bunlar doğal ligandların ve ilaçların analogu olabilir ya da çeşitli ligandlar ile gerçekleştirilen yarışım deneylerinde bağlanma bölgesi işaretleyicisi olarak görev alabilirler.

Probların en ilgi çekici özelliği, uyarılmış halde belirli bir reaksiyon göstermeleri (izomerizasyon, elektron veya proton transferi) sonucu floresans parametrelerinde (spektral pozisyon, polarizasyon, kuantum verimi) değişim göstermeleridir.

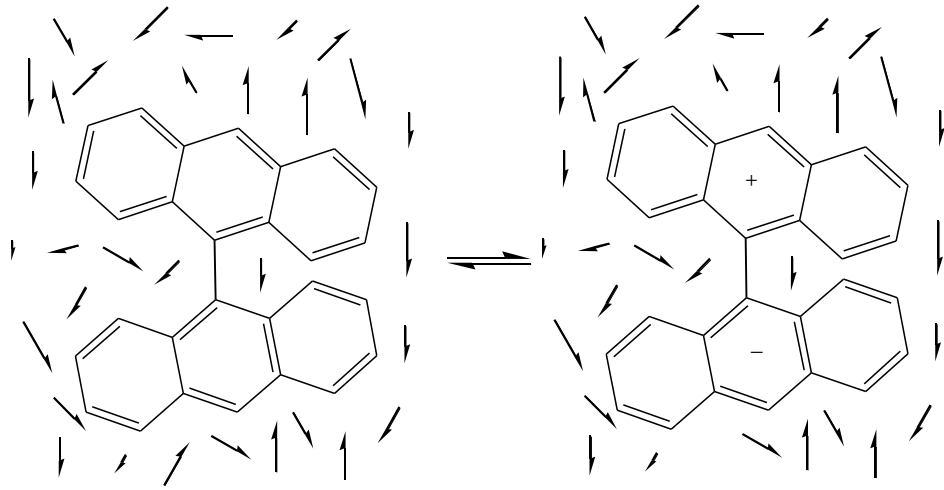
Floresans tabanlı bir moleküler prob veya sensörde en çok aranan özellik, uygulanan pertürbasyona yüksek seçicilikte ve hassasiyette, emisyon renginde etkili değişiklikle cevap vermesidir.

Etiketler (labels) ve problar arasındaki fark; etiketler kovalent bağ ile bağlanırken, probların kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanmasıdır.

İlk grup floresan problar, elektronik uyarılma sonucu, dipol momentlerinde büyük farklılık gösterirler (Şekil 2.31). Genel olarak dipol momentleri artar fakat dipol momentin azaldığı örnekler de mevcuttur, Mq buna güzel bir örnektir. Bunun sebebi elektronik yükün uyarılmış halde tekrar dağılımıdır. Bu yük dağılımı antrasen dimerinde(biantril) çarpıcı olarak görülür(Şekil 2.32). Biantrildeki elektron transfer reaksiyonu çevrede bulunan dipolar moleküller veya atom gruplarının hareketleriyle kontrol edilmiştir [28].

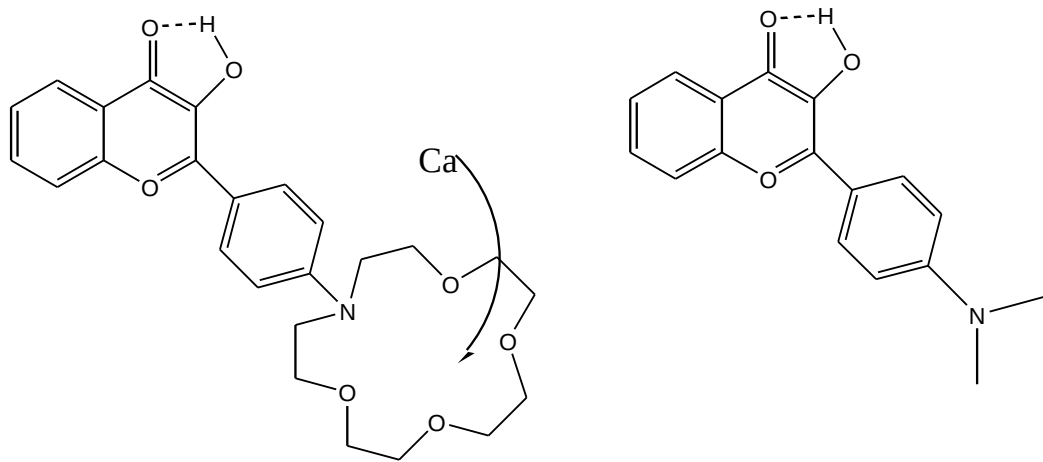


Şekil 2.31: Elektronik uyarılma sırasında dipol momentleri değişen floresans problara örnekler; Mq: stilbazolium betain, PRODAN: 6-propionil-2-metilaminonaftalen, 1,8-ANS: 1-anilinonaftalen-8-sulfonikasıit.



Şekil 2.32: Biantrildeki yük dağılımı

Prob moleküllerine diğer bir önemli örnek 3-hidroksi flavon ailesidir. Sentezlenmiş olan 3HK (3-hidroksikromon) türevi problemlerin konfigürasyonel izomerizasyonu söz konusu değildir, bu, uyarılmış seviyedeki molekülün yapı konfigürasyonunun farklı olduğu ikinci bir molekülün de oluşması anlamına gelmektedir ve kromon halkası dönüşlere izin vermeyecek özelliktedir. Bu moleküller, floresans spektrasını önemli ölçüde değiştiren, uzun dalga boylarına spektral kaymaya neden olan, molekül içi proton transferi gerçekleştirmektedirler. Crown-süstitüye ve dimetilamino süstitüye 3-hidroksiflavonlar elektron ve proton transferine olanak sağlarlar. Proton transferine bağlı olarak floresans spektrumunda belirgin bir kayma gözlenirken, aynı zamanda bu reaksiyon, elektron transferine bağlı olarak, diğer moleküllerle etkileşimleriyle de kontrol edilebilir. Ca problemlerinin dizaynında bu yol izlenir (Şekil 2.33).



Şekil 2.33: 3-hidroksiflavon problemlere örnekler

2.3.1 Yeni Floresan Probların Dizaynı

Modern biyokimya ve moleküler biyolojideki gelişmelerle birlikte, yeni floresan problemlerin gerekliliği ortaya çıkmıştır.

Floresan prob, iki kısımdan oluştuğu düşünülen bir moleküldür:

- Florofor
- Sensör

Sensör, floroforla etkileşimi sonucu, molekülü çeşitli çevresel parametrelere hassas hale getirir: katyon veya anyon konsantrasyonları, mikroviskozite, polarite, biyomembranın elektrik potansiyeli vb. İyi bir prob tasarımı için, her iki kısmın gereklilikleri de yerine getirilmelidir. Florofor için, yüksek floresans kuantum verimi, ekstinksiyon katsayısı, fotostabilite vb., sensör için ise, seçicilik, hassasiyet, florofor üzerinde güçlü etki gereklidir [29].

2.3.1.1 İyon tanıma için kullanılan problemler:

Emisyon ve/veya uyarılma spektrumlarında kaymaya neden olan veya band görünümünde değişiklikler yaratan problemler, sadece floresans şiddetini değiştiren problemlere tercih edilir. Kalibrasyon sonrası, floresans şiddetlerinin iki belirli (emisyon veya eksitasyon) dalga boyundaki oranı, prob konsantrasyonundan bağımsız olarak, prob konsantrasyonundan bağımsız ve ışık şiddetine duyarsız olan iyon veya molekül konsantrasyonu hakkında bilgi verir.

2.3.1.2 Membran potansiyeli için kullanılan problemler:

Yanıt verme mekanizmalarına göre ikiye ayrılırlar:

Fast response problemler: Elektronik yapıları ve dolayısıyla floresans özellikleri (elektrokromik özellikleri) ile tanınırlar. Ve içinde bulundukları elektrik alanın değişimine cevap verirler. Optik yanıtları, sinir hücreleri ve kardiyak hücreler gibi hücrelerde potansiyel değişimleri takip edebilecek kadar hızlıdır. Fakat potansiyelle bağımlı floresans değişimlerinin büyüklükleri genelde küçüktür. Bu problemler 100 mV için %2-10 floresans değişimi gösterirler.

Slow-response problemler: Transmembran dağılımlarında floresans değişimle birlikte, potansiyelle bağımlı değişim gösterirler. Optik yanıtlarının büyüklüğü genel olarak fast-response problemlerden fazladır.

Elektrokromik mekanizmanın en büyük avantajı, bir kromoforun, sentezlenmeden önce, kalitatif olarak, basit moleküler orbital metodlarla analiz edilebilmesidir. Böylece, probun, ihtiyaçları karşılayıp karşılamayacağı, membran potansiyeline cevabı, sentezlenmeden önce öğrenilebilir. Öncelikle problemler model membran sistemlerde-lipozomlarda karakterize edilmeli ve uygun sonuçlar alındığı takdirde gerçek biyomembran sistemlerinde çalışmalara başlanmalıdır.

Lipozom, hücre zarının basit bir modelidir ve yeni moleküler problemler etkin bir şekilde bu sisteme dahil edilebilirler. Lipid çift tabaka yapının, belirli sıcaklıklarda (transition point) jelden likid kristal yapıya dönüştüğü bilinmektedir. Kalorimetri ve diğer uygulamalar, bu örnekleri karakterize etmek ve tranzisyon noktasını belirlemek için kullanılabilir. Floresans problemler lipid çift tabakadaki yapısal değişimlere ait önemli bilgiler vermektedir [30].

Membran potansiyeline bağımlı problemlere örnek olarak 3-hidroksiflavon türevleri verilebilir. Proben florofor kısmını, 3-hidroksiflavon oluşturur. Sahip olduğu eşsiz floresans özellikleri ESIPT reaksiyonundan ileri gelmektedir, ki bu da güçlü oransal yanıt veren membran-potansiyel problemler için gereklidir. Lipozomlardaki yapısal değişimler, polarite, hidrasyon, viskozite gibi birçok parametreye bağımlıdır. Bu da her iki flavonol floresans bandında değişimle sonuçlanır.

Membran potansiyeli, floresansa bağımlı olarak kolaylıkla ölçülebilen bir membran parametresidir. En kullanışlı membran potansiyel problemleri, oransal (ratiometric) yanıt verenlerdir [31].

Elektron spektrumunda değişiklik gösteren problemler ratiometrik olarak adlandırılır. Çünkü bu problemler seçilen iki dalga boyunda ışık şiddeti oranının belirlenmesi ile emisyon spektrumundaki değişimlerin kantitatif olarak karakterize edilmesini sağlar.

Orantısal (Ratiometrik) problemler iki grupta sınıflandırılabilirler.

1. Birinci grup orantısal (ratiometrik) etkili gruplar: Etkileri spektrum kaymaları ile gözlemlenir. Genellikle bu kaymaların temelinde prob molekülünün uyarılmış durum elektronik yük transferi (ESCT) vardır. Bu ESCT çevredeki atom grupları ve moleküllerle probun etkileşimlerinin moleküler düzeydeki değişimleri tarafından indüklenir. Biyomembran potansiyeline duyarlı boyalar elektrokromik kaymalar gösterirken, polariteye duyarlı problemler solvatokromik kaymalara dayanır.

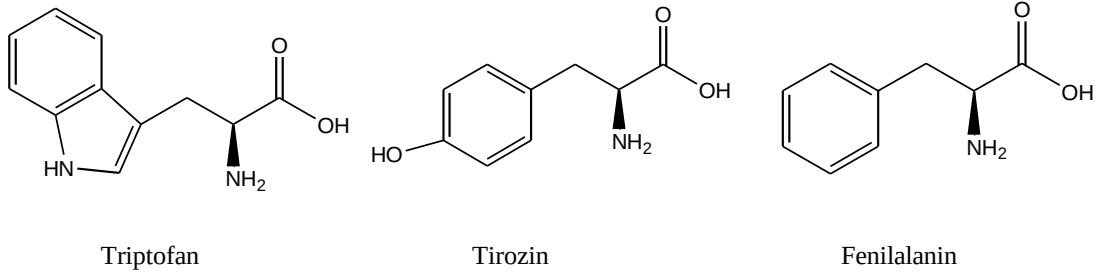
2. İkinci grup orantısız (ratiometrik) problemler: İki ya da daha fazla banttan meydana gelen floresans spektrumu ve bu bantlar arasında ışık şiddeti değişimleri gözlemlenir. Bu, problemin katılımıyla uyarılmış durum reaksiyonunun bir sonucu olarak meydana gelebilir.

Floresans problemler proteinlerin ligand bağlama bölgelerinin ve değişik koşullardaki konformasyonel değişimlerinin karakterizasyonu gibi bir çok konunun incelenmesinde de yaygın olarak kullanılmaktadırlar.

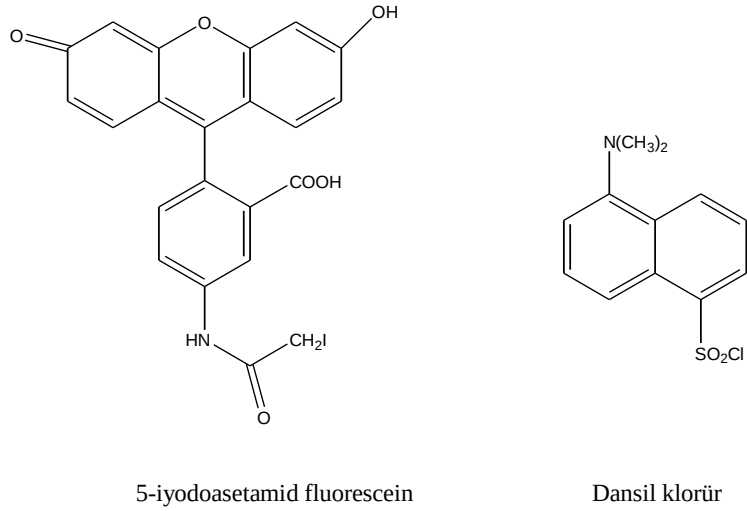
Bazı floresans maddelere örnekler aşağıda verilmiştir.

a) Doğal floresans maddeler (Şekil 2.34)

b) Yapay floresans maddeler (Şekil 2.35)



Şekil 2.34: Doğal floresans maddelere bazı örnekler

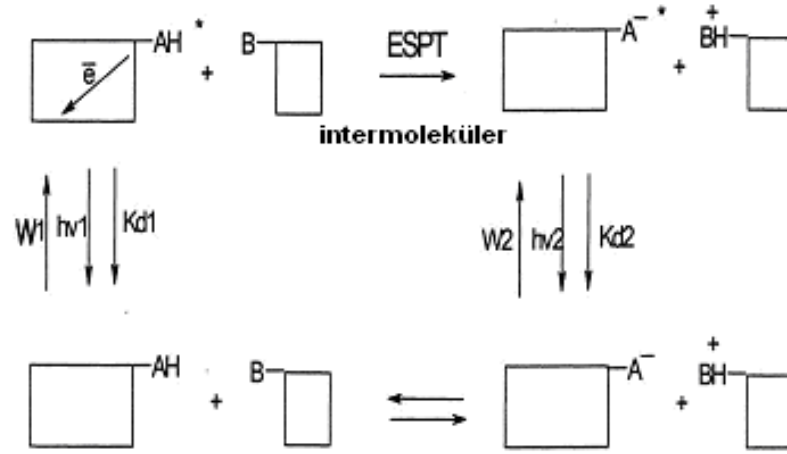


Şekil 2.35: Yapay Floresans maddelere örnekler

2.4 Uyarılmış Seviye Yük Aktarımı Reaksiyonu (ESCT)

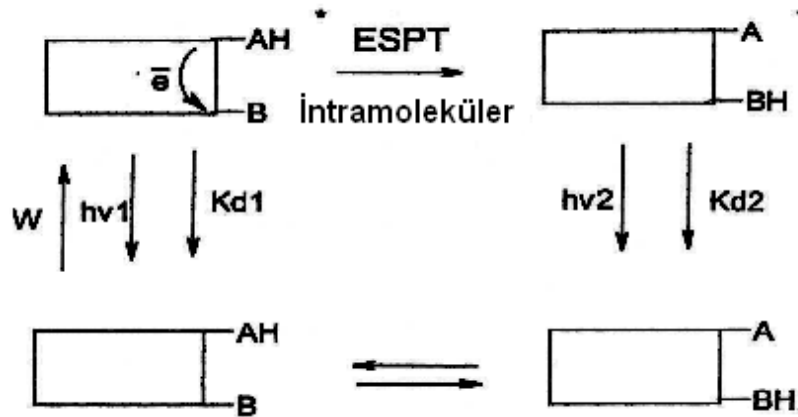
Molekülün izomerizasyonuna ek olarak iki yayılım bandı eldesine imkan tanıyan diğer bir reaksiyon, Uyarılmış Seviye yük Aktarımı reaksiyonudur (ESCT). Uyarılmış Seviye yük Aktarımı reaksiyonları iki şekilde gerçekleşebilir.

1. Intermoleküler: Dipol moment farkı yaratarak yük transferi gerçekleştiren problarda, uyarılmış seviyedeki prob molekülünün iki bölgesi arasındaki elektron yoğunluğu farkı fazla olabilmektedir. Bir bölgesi elektronca fazla yüklü iken diğeri zayıf olabilir. Böyle bir durumda uyarılmış seviyede elektron yoğunluğu fazla olan bölgeden az olana bir elektron akışı söz konusudur. Elektron, yüklü bir parçacık olduğundan molekülün dipol momentini büyük ölçüde değiştirir. Büyüyen dipol momentini ortamla daha güçlü etkileşir ve etkileşimdeki bu değişim yayılma grafiğinin kaymasına sebep olur, bu da iki bantlı floresans yayılmasına sebep olur (Şekil 2.36). Moleküller arası yük transferi gerçekleştiren problara örnek olarak ANS (8-anilinonaphthalenesulfonic) asit verilebilir.



Şekil 2.36: İntermoleküler yük aktarım reaksiyonu

2. Intramoleküler: Bir diğer ESCT reaksiyonu olan intramoleküler Uyarılmış Seviye Moleküliçi Elektron Aktarımı reaksiyonunda molekül içi donör ve akseptörler arasında proton aktarımı gerçekleştiren proplar söz konusudur(Şekil 2.37).



Şekil 2.37: İntramoleküler yük transfer reaksiyonu

Bu tip Uyarılmış Seviye Molekületi Elektron Aktarımı reaksiyonu veren maddelere örnek olarak 3-Hidroksikroman ailesi gösterilebilir [32].

Proton aktarımının gerçekleşebilmesi için proton aktarımı sonucu oluşan tautomerik formun uyarılmış seviyedeki (T^*) enerjisi ile normal formun uyarılmış seviyedeki (N^*) enerjisi karşılaştırılabilir yakınlıkta olmalıdır. Temel seviyede gerçekleşen proton aktarımı sonucu oluşan T^* formun dipol momenti N^* formundakinden daha küçüktür ve bunun sonucu bu forma ait floresans bandında çözücüye bağlı oluşan kayma N^* formu ile oluşana göre daha düşüktür.

ESIPT sonucu iki bantlı floresans yayılma veren floresans problemlerin taşınması gereken özellikler vardır. Bunlardan en önemlileri;

- Çalışmayı elverişli kılacak yükseklikte kuantum verimi,
- iki iyi ayrılmış floresans yayılma bandı,
- iki bandın ışık şiddeti oranının karşılaştırılabilir olması,
- floresans yayılması sonucu elde edilen iki bandın floresans parametrelerinin birbirinden bağımsız olmaları ve bunun sonucu çok parametrelili bir analize imkan tanımasıdır.

İstenen tüm bu özellikleri potansiyel olarak sağlayan florophore ailesi 3HF'lardır. Bu aile normal uyarılmış durum (N^*) ve de photo-tautomer (T^*) reaksiyon ürünü veren iki emisyon bandının uyarılmış durum intramoleküler proton transferi (ESIPT) yapma özelliği gösterir. İkinci bant çarpıcı bir şekilde yüksek dalga boyuna kayarak birbirinden ayrı iki tane emisyon yapan bant gözlenir. Bu iki bandın şiddetleri arasındaki oranlar farklı perturbasyonlara karşı oldukça duyarlıdır. Bu yüzden 3HF türevlerinin ters miseller, fosfolipid ve doğal membranlar alanında kullanımları oldukça yaygındır [33]. 3HF kromoforlarının spektroskopik özelliklerini artırmak amacıyla yeni stratejiler geliştirilmektedir. Absorpsiyonun, floresan spektrumunun yüksek dalga boyuna kaydırılması, kuantum veriminin artırılması ve de istenilen aralıktaki çift dalga boyu hassasiyetinin artırılması yapılan çalışmalar arasındadır.

3 HF kromoforunun en farklı özelliği ise çevresinde gerçekleşen durumlara anında verdiği tepkilerdir. Uyarılmış durumda heterosiklik π elektronik sistemi yük dağılımında yüksek bir asimetric artışa sebep olur. Bu durum da solvokromik ve elektrokromik boyaların floresan spektrumunda kaymalara sebep olur, ancak N^* ve

T* gibi iki farklı emisyon bandı olduğundan dolayı mikro çevrelerinde gerçekleşen polarite ve elektrik alan pertürbasyonlarından etkilenme duyarlılıkları farklıdır. Düşük kararlılıkta hidrojen bandı oluşturan beş zincirli halkadaki 3-hidroksil ve 4-karbonil grupları ESIPT reaksiyonunun yoğunlaştığı bölgedir. Kromofor ve ESIPT reaksiyonunun asimetrik yapısından dolayı çevrenin ve belirli bir elektriksel alanın anizotropik özellikleri floresan spektrumunu etkiler. Membran içerisinde kromofor gruba belirli bir lokasyon veya oryantasyon sağlanmadığı takdirde yapılan çalışmalar anlamlı olmaz. Kromofor grubun katman içerisinde yerleşebileceği en iyi nokta pozitif yüklü gruptur. Proben kararlılığını artırabilmek için yapılabilecekler arasında probun özelliğini lipid yapının özelliğine benzetmek üzere probun yapısına farklı uzunluklarda hidrokarbon zincirleri yerleştirmek olacaktır [34].

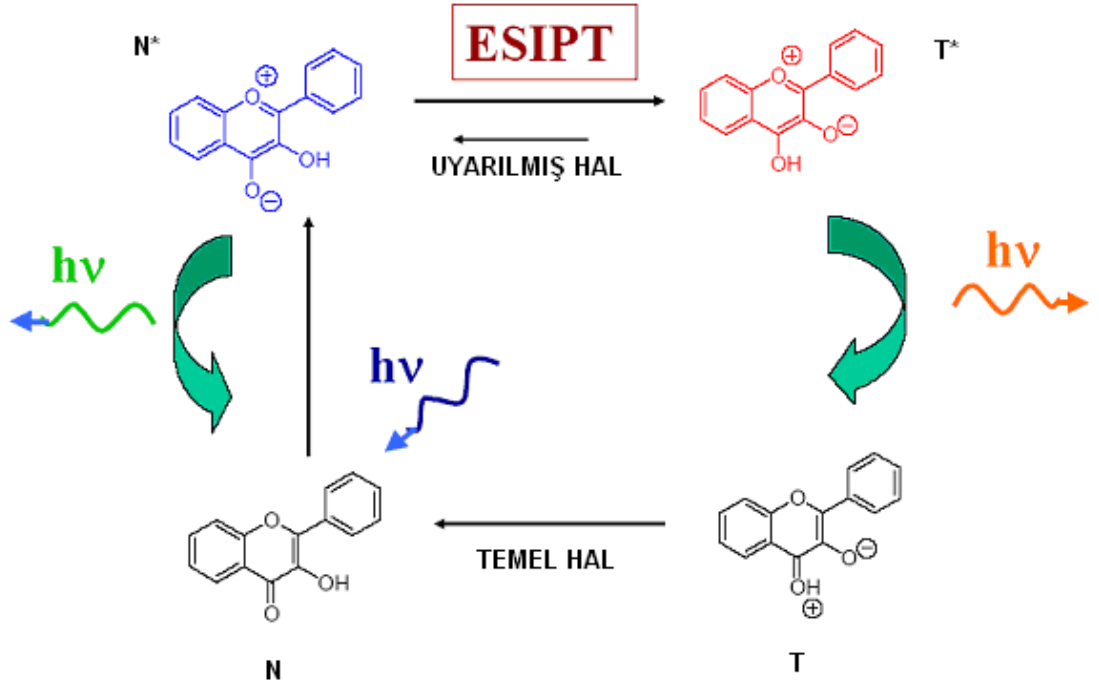
2.5 Biyolojik Sistemlerde 3-Hidroksi Flavonların Prob Olarak Önemi

3-hidroksiflavon ve 3-hidroksikromonlar, dikkate değer floresans özelliklere sahip bileşenlerdir. Bunların türevleri uyarılmış durum molekül içi proton transfer reaksiyonu gösterir. (Excited State Intramolecular Proton Transfer, ESIPT) (Şekil 2.38). ESIPT reaksiyonu sonucu reaktan ve reaksiyon ürünü için iki farklı uyarılmış bölge yayını gözlemlenebilir. Bu emisyon bantları dalga boyu skalasında iyi ayrılmış iki bant şeklindedir. Mavi bölgedeki bant normal uyarılmış durumdan (N*) kaynaklanır. Önemli ölçüde kırmızıya kayan diğer bant ise uyarılmış tautomer durumdan (T*) kaynaklanır. Bu bantların ışık şiddetlerindeki farklılık gibi spektroskopik davranışlar 3-hidroksiflavon ve 3-hidroksikromonların yapısına ve onların mikro çevre parametrelerine önemli ölçüde bağlıdır. 3-hidroksiflavonlar hidrojen bağı etkileşimlerine duyarlıdır [35].

Bu bantların ışık şiddeti oranları ve pozisyonları çözücü molekülleri ile yaptığı hidrojen bağı ya da çözücü polaritesine göre değişiklik gösterir. Bu nedenle 3-hidroksiflavon ve 3-hidroksikromonların bazı türevleri, daha avantajlı floresans özelliklerinden dolayı misellerde, model membranlarda ve protein moleküllerinde kullanılmaya elverişlidir [36].

3-hidroksiflavon ve 3-hidroksikromon türevlerinin daha geniş alanlarda uygulanması bazı problemler nedeniyle kısıtlanmıştır. Bu problemlerden biri, maksimum absorpsiyon dalgaboyunun, kısa dalga boylarında olması ve düşük kuantum verimidir. Daha uzun absorban maksimum dalga boyu elde etmek ve kuantum

verimini arttırmak için 3-hidroksiflavonun 2-fenilgrubuna benzo ve naftofuril gruplar yerleştirilmiştir. Diğer bir problem ise ESIPT reaksiyonundaki iki emisyon bandı arasındaki ışık şiddetleri oranının istenen aralıklarda olmamasıydı. 3-hidroksiflavonlarda elektron donör 4-dialkilamino grubun varlığı I_{N^*}/I_{T^*} ışık şiddeti oranını önemli ölçüde artırmıştır. 3-hidroksi flavon ailesinin protik çözücülerde hidrojen bağı yapması çok önemli bir özelliktir [37].



Şekil 2.38: 3-Hidroksiflavonlarda uyarılmış hal molekülüçi proton transferinin gösterimi (ESIPT)

2.5.1 Prob-Çözücü Etkileşimleri

Özellikle aromatik halkalarda polar süstitüentler içeren çok sayıda floroforun emisyon spektrumunun, çözücülerin fiziksel ve kimyasal özelliklerine duyarlı olduğu bilinmektedir. Floresans spektruma çözücü etkileri, genel ve spesifik çözücü etkileri olmak üzere ikiye ayrılır. Genel çözücü etkileri ile kastedilen etkiler, kırınım indeksi (n) ve dielektrik sabitten (ϵ) kaynaklanır. Bu fiziksel sabitler çözücü moleküllerindeki elektronların hareket serbestliği ve bu moleküllerin dipol momentini işaret etmektedir. Spesifik çözücü etkileri, kompleksleşme ve hidrojen bağı gibi florofor ve çözücü molekülleri arasındaki spesifik kimyasal etkileşimleri gösterir. Hem genel hem de spesifik çözücü etkileşimleri önemli spektral kaymalara neden olabilir. Bu etkilerin iki kategoriye ayrılması spektral kaymaların farklı orjinleri nedeniyle. Genel çözücü etkilerinin oluşması her zaman beklenen bir

durumdur. Buna karşılık spesifik çözücü etkileri çözücü ve floroforun özel kimyasal yapılarına bağlı olacaktır [38].

Biyokimyasal araştırmalarda rutin olarak kullanılan floroforlar genellikle spesifik çözücü etkileşimleri yaparlar. Bu nedenle çözücü etkileşimlerini uygun bir bilgi sağlayıcı olarak iki kategoriye ayırabiliriz.

Bu çalışmada kullanılan 3-hidroksiflavon ailesi özellikle protik çözücülerle moleküller arası hidrojen bağı yapabilme özelliğine sahiptir. Daha önce yapılan titrasyon çalışmalarında ortamdaki protik çözücünün % derişimi arttıkça I_{N^*}/I_{T^*} oranının arttığı gözlenmiştir [39].

2.5.2 Prob-Ters(reverse) Misel Etkileşimleri

Ters miseller, güçlü birleşimler göstermek zorunda olan moleküler bileşimlerin dinamik ve düzenliliğinde bir integral sistemidir. Prob bileşikleri farklı yerlerden bu yapıya eklenir ve bölgesel polarite, viskozite, dinamikler hakkında bilgiyi sağlayabilirler.

Suda çözülebilen bazı moleküller tarafından indüklenen, misel organizasyonundaki değişikliklere artan bir duyarlılık gösteren floresans probolar oldukça rağbet görmektedir. Bu yüzden, 3HF türevleri çok ilgi çekmektedir. Yayınım spektrumunda, ESİPT reaksiyonundan kaynaklanan iki bant gösterirler. Bu bantlardan biri normal forma ait (N^*), diğeri fototautomer (T^*) forma aittir. Her iki formda yüksek yayılım gösteren spektral bantlar, dalga boyu skalasında iyi ayrılmış ve bantlar arasındaki şiddet oranları çeşitli hidrojen bağı, polarite gibi etkenlere karşı oldukça hassastır. Ana 3HF probu bu özellikleri göstermektedir. AOT [Aerosol OT, sodyumbis(2-etilhekzil)sulfoksinat] kimyasal içerikli bir madde olup ters misel olarak kullanılmaktadır. Dolayısıyla 3-hidroksiflavonlara da, AOT kullanılarak ters misel çalışmaları yapılmıştır. Misel içinde su molekülünün doğası ve miktarına karşı ilginç hassasiyetleri gözlenmektedir. Özellikle titrasyon deneylerinde farklı molar derişimlerde suyun eklenmesi ile N^* bandı ışık şiddetinin azaldığı gözlenmiştir, ayrıca yine N^* bandının kırmızıya kaydığı bildirilmektedir. Bu özellik yaygın çözücü-polarite etkisinin tersi bir etkidir.

2.5.3 Probların Fosfolipid keselerdeki Floresans Özellikleri

Probların kesecikler içerisine nüfuz etmesi floresans şiddetinde artışa sebep olur. Bu durum da suyla karşılaştırıldığında kuantum veriminin oldukça yüksek olduğu

gözlenir. Çalışılan tüm prob tiplerinde fosfolipid keseciklerdeki uyarılma spektrumunun büyük ölçüde absorpsiyon spektrumu ile aynı olduğu ve de N^* ve T^* emisyon bandlarının maksimumunun çok farklı olmadığı gözlenir.

Yeni geliştirilen 3-hidroksiflavon türevleri sahip oldukları 500 nm civarındaki mavi-yeşil ve 600 nm civarındaki sarı-kırmızı emisyon bandları ile spektral pozisyonlar bağlı şiddetleri sayesinde mikroçevrelerinde olan olaylara karşı son derece hassastırlar. Bu değişimler atomik mesafelerde gerçekleştiğinden dolayı bu problemlerin konumlarının belirlenmesi ve oryantasyonlarının gerçekleşmediği durumlarda mutlak bir hassasiyet beklenemez. İki band gösteren 3-HF problemleri hücre içine yollandıklarında bulundukları konuma bağlı olarak onları tanımlayan bir çok parametre belirlenmiştir [40].

3. DENEYSEL BÖLÜM

3.1 Genel Teknikler

3.1.1 Kromatografi

3.1.1.1 Kolon kromatografisi

Kolon kromatografisi yöntemi, sentez ürünlerinin fraksiyonlandırılarak ayrılması amacı ile kullanıldı. Adsorban olarak Merck firmasının, Kieselgel 100 (0.063-0.200mm, 70-230 mesh ASTM) alındı. Adsorban, dibine az miktarda pamuk yerleştirilmiş cam kolonlara, yürütücü çözelti sistemiyle karıştırılarak konulur, ayrılacak madde, adsorban üzerine konulan deniz kumu üzerine düzgün bir şekilde ilave edilir. Ve fraksiyonlar ayrılarak kolondan toplanır.

3.1.1.2 İnce Tabaka Kromatografisi

Reaksiyon ilerleyişini kontrol etmek amacıyla bu yöntemden sıklıkla yararlanılmıştır. Çalışmalarda (G.Merck 5554) hazır plaklardan yararlanıldı. Sentezler süresince reaksiyonlardaki gelişmeler ve elde edilen maddelerin saflıkları, ince tabaka kromatografisi ile (TLC), değişik çözücü sistemleri kullanılarak kontrol edilmiştir. Kromatogramlar UV ışık altında incelendiğinde maddelere ait lekeler çeşitli renklerde gözlenmiştir.

3.1.2 Spektrometreler

3.1.2.1 Ultraviyole (UV) Spektrofotometresi

Spektrumlar Shimadzu 1601 cihazında 1 cm' lik kuvars küvetlerde alındı. Ölçümler bileşiklerin farklı çözeltilerinde yapıldı.

3.1.2.2 ¹H NMR Spektrometresi

¹H NMR spektrumları Bruker, 250 MHz AC Aspect 3000 aletlerinde alınmıştır. Referans bileşik olarak Tetrametilsilan (TMS), çözücü olarak ise CDCl₃ kullanılmıştır.

3.1.2.3 Floresans Spektrofotometresi

Probların çözücüler içindeki floresans spektrumları; Quanta Master (PTI) spektrometresi ile alınırken, membran çalışmaları sırasında veziküller içindeki spektrumları da SLM 48000 (SLM-Aminco) spektrometresi ile alınmıştır.

3.2 Çözücüler Ve Kullanılan Kimyasal Maddeler

Derişik HCl (Fluka), 2-hidroksi asetofenon (Aldrich), 2,4-dihidroksiasetofenon (Aldrich), 1-iyodooktan(Aldrich), potasyumkarbonat(Sigma), POCl₃(Aldrich), H₂O₂ (%30'luk) Fluka, sodyum karbonat (Sigma), DMF (Acros), magnezyumsülfat (Aldrich), sodyummetoksit (Aldrich), etanol (Merck), hekzan (Merck), diklorometan (Merck), asetonitril (Merck), kloroform (Merck), etil asetat (Merck).

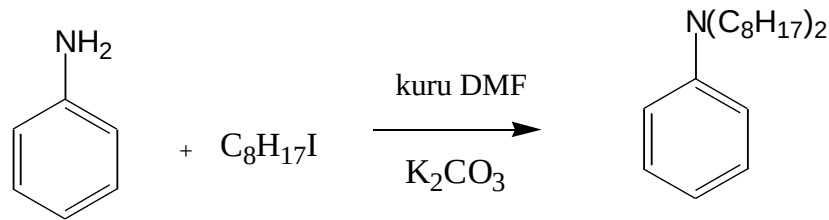
Absorpsiyon ve floresans ölçümleri için kullanılan tüm çözücüler Aldrich ve Fluka'dan alınmış olup, spektroskopi için kullanılacak saflıktadır.

3.3 Kullanılan Elektronik Aletler

Ultraviyole Spektrofotometre	Shimadzu UV-1601
Spektrofotometre	Cary 3 Bio (Vanan)
NMR Spektrometre(¹ H)	Bruker, 250 MHz AC Aspect 3000
Floresans spektrofotometre	Quanta Master (PTI) ve SLM 48000 (SLM-Aminco)

3.4 Deney Prosedürü

3.4.1 Anilin'in Oktilyodür ile Reaksiyonu - Dioktilaminobenzen eldesi



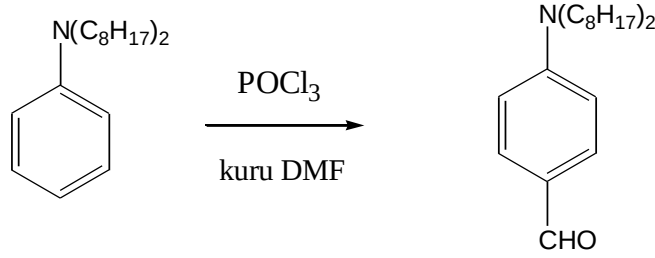
Şekil 3.1: Dioktilaminobenzen sentezi

0.72mL anilin(1 mol), 5mL DMF içerisinde, önceden 120 °C' ye ayarlanmış yağ banyosunda karışmaya bırakılır, üzerine 5mL 1-iodooktan (3.5 mol) ve 2.18 gram K₂CO₃ (2 mol) konularak en az 6 en çok 12 saat, kuru ortamda, TLC ile kontrol edilerek, karıştırılır(reflux) (Şekil 3.1). Ürün diklorometan (CH₂Cl₂) ile ekstrakte

edilir ve MgSO_4 ile kurutulur. 4/1 Hekzan/diklorometan çözücü sisteminde kolon kromatografisi uygulanır.

Saflandırma işleminden sonra, incelenen NMR spektrumuna göre: ^1H -NMR (200 MHz, CDCl_3), 7.17 ppm (2H, d, $J=2.5\text{Hz}$), 6.67ppm (2H, d, $J=8$), 6.4ppm (1H, t, $J=2.3$), 3.25ppm (4H, t, $J=7.3$), 1.8ppm (30H, m)

3.4.2 Dioktilaminobenzaldehit eldesi (Vilsmeier Formulation)

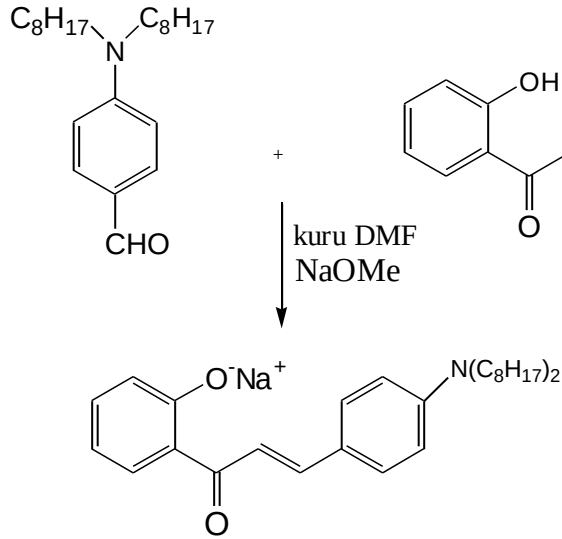


Şekil 3.2: Dioktilaminobenzaldehit sentezi

Bir balona alınan 10mL DMF'e buz banyosunda 6.8 mL POCl_3 ilave edilir. Açık sarı renkteki karışımda, yoğun gaz çıkışı gerçekleşir. Bu yüzden balonun ağzına CaCl_2 tüpü takılmalıdır. Gaz çıkışı bitene kadar, karışım buz banyosunda karıştırılır. Oda sıcaklığında 0.5 g dioktilaminobenzen ilave edilir ve ayrı bir yerde hazırlanan 60 $^\circ\text{C}$ su banyosunda, en az 2 en çok 4 saat karışmaya bırakılır (Şekil 3.2), reaksiyon ilerleyişi TLC ile kontrol edilir. Buz ilave edilerek reaksiyon tamamlanır. Diklorometan ile ekstrakte edilip MgSO_4 ile kurutulur. 2/1 Hekzan/diklorometan çözücü sisteminde kolon kromatografisi uygulanır.

Saflandırma işleminden sonra, incelenen NMR spektrumuna göre: ^1H -NMR (200 MHz, CDCl_3), 9.6 ppm (1H, s), 7.7ppm (2H, d, $J=8.5$), 6.6ppm (2H, d, $J=8.5$), 3.35ppm (4H, t, $J=7.6$).

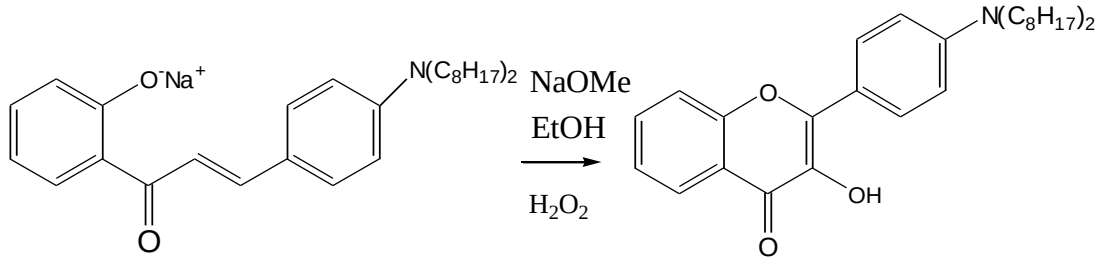
3.4.3 Çalkon Sentezi için Genel Prosedür (FN8)



Şekil 3.3: Çalkon eldesi

0.3 g dioktilaminobenzaldehit (1 mol), 0.105mL 2-hidroksiasetofenon (1 mol), 5 mL DMF ve 0.18 g NaOMe (4 mol), oda sıcaklığında 1 gün boyunca karışmaya bırakılır (Şekil 3.3). Reaksiyon ilerleyişi TLC ile kontrol edilir. Kırmızı-turuncu renkli “çalkon” elde edilir.

3.4.4 FN8 (2-(4-(dioktilamino)fenil)-3-hidroksi-4H-kromen-4-on)eldesi, Flavon oluşum(halka kapama) reaksiyonu



Şekil 3.4: FN8 sentezi

Oluşan kırmızı renkli çalkona 20 mL etanol ve 0.7 g NaOMe ilave edilerek karıştırılır. Soğutulan balona 0.3 mL H₂O₂ eklenip daha önceden 120 °C’ye getirilmiş yağ banyosunda, üzerine geri soğutucu takılarak, 5-10 dakika kaynatılır(Şekil 3.4). Köpürerek sarıya dönen karışım, içinde yaklaşık 100 mL su bulunan bir behere konur. HCl çözeltisi ile nötralize edilir ve diklorometan ile ekstrakte edilir. Na₂SO₄ ile kurutulur.

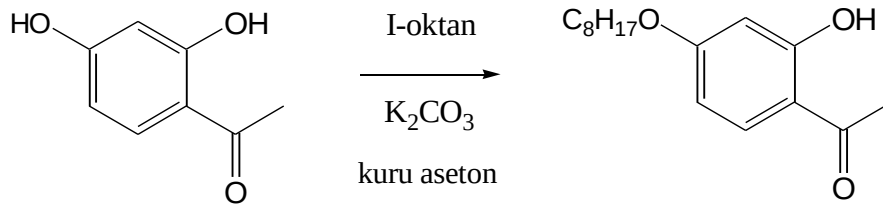
Dikkat edilmesi gereken noktalar:

1. Çalkon oluşumunda kullanılan DMF miktarının 3-5 katı kadar EtOH kullanılır.
2. Her zaman H_2O_2 miktarından daha fazla mol oranında NaOMe kullanılır (12 mol $H_2O_2 \rightarrow 15$ mol NaOMe).
3. 1 mol aldehit ile en az 10 mol, en çok 15 mol H_2O_2 (%35) kullanılmalıdır.
4. Az miktarda madde ile çalışırken, çok miktarda H_2O_2 (15 mol); çok miktarda madde ile çalışırken, az miktarda H_2O_2 (12 mol) kullanılmalıdır.

Saflandırma işlemi için 6/1 Hekzan/EtOAc çözücü sisteminde kolon kromatografisi uygulanır.

Saflandırma işleminden sonra, incelenen NMR spektrumuna göre: 1H -NMR (200 MHz, $CDCl_3$), 8.22 ppm (1H, d, $J=7$ Hz), 8.1ppm (1H, d, $J=7$ Hz), 6.7ppm (2H, d, $J=7$ Hz), 7.5ppm (1H, d, $J=7$ Hz), 7.6ppm(1H, dd), 7.4ppm(1H, t), 3.35ppm (4H, t, $J=7.1$).

3.4.5 2-hidroksi-4-oktiloksiasetofenon Eldesi için Genel Yöntem



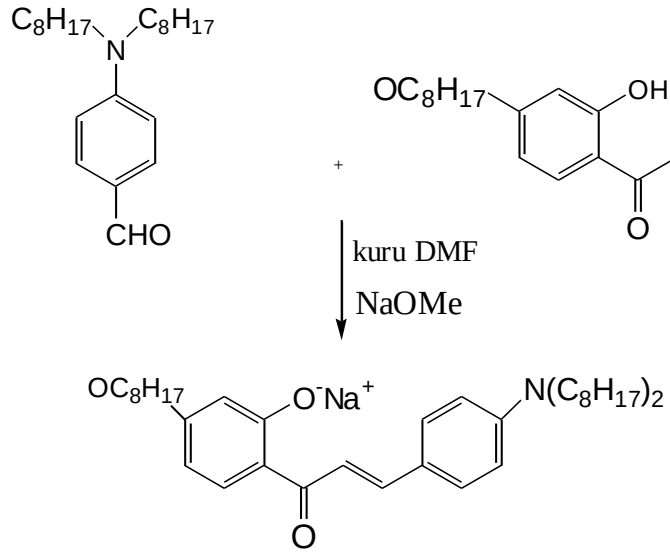
Şekil 3.5: 2-hidroksi-4-oktiloksiasetofenon sentezi

5 g 2,4-dihidroksiasetofenon, 5.9 mL oktiliyodür ve 5 g K_2CO_3 20 mL aseton içerisinde 3 saat boyunca karıştırılır (reflux edilir) (Şekil 3.5). (Reaksiyon ilerleyişi TLC ile kontrol edilebilir fakat bunun için önce reaksiyon karışımından bir damla alınarak su içerisine konur, nötralize edilir ve ekstrakte edildikten sonra TLC uygulanabilir. Bu işlem uygulanmadığı takdirde 2,4-dihidroksiasetofenon, tuz formunda olduğundan TLC’ de görünmeyecektir.)

Reaksiyon karışımı soğutulduktan sonra su eklenir ve etilasetat ile ekstrakte edilir. $MgSO_4$ ile kurutulur.

Saflandırma işlemi için diklorometan ile kolon kromatografisi uygulanır.

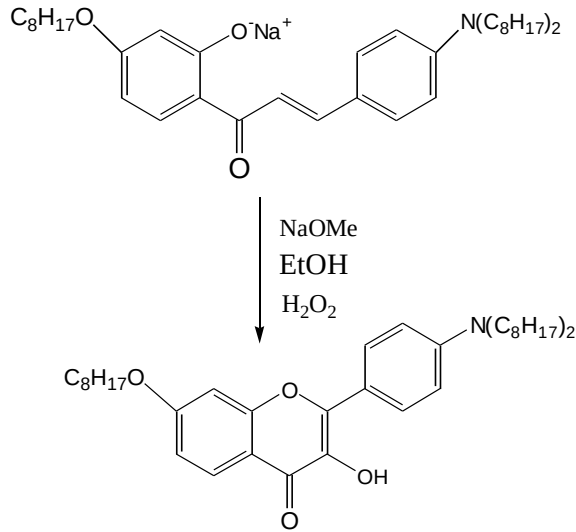
3.4.6 OFN8 için Çalkon Sentezi



Şekil 3. 6: Çalkon sentezi (OFN8)

Bölüm 3.4.3'te anlatılan, FN8 için çalkon senteziyle aynı prosedür uygulanmıştır(Şekil 3.6).

3.4.7 OFN8 eldesi, Flavon oluşum(halka kapama) reaksiyonu

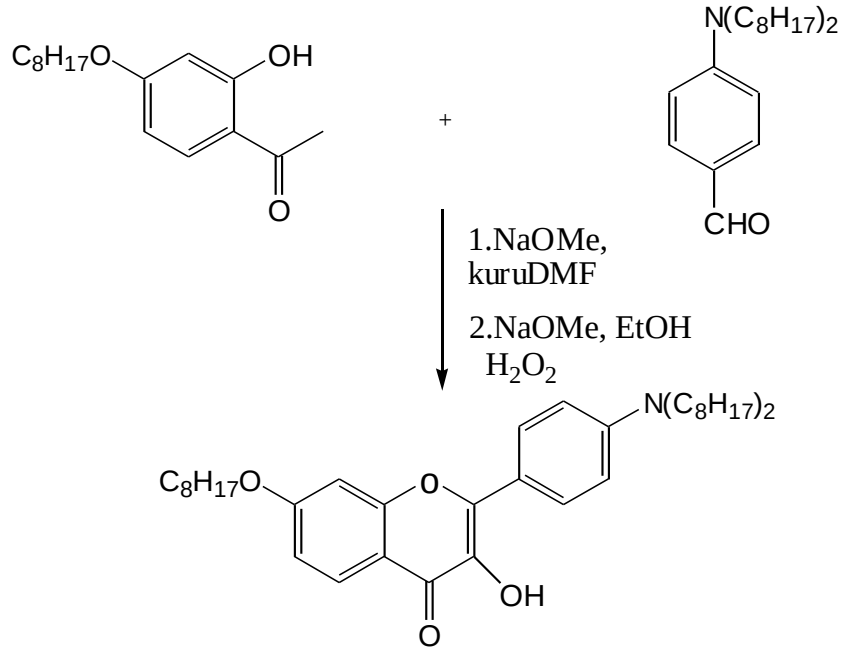


Şekil 3.7: OFN8 sentezi

Bölüm 3.4.4' teki prosedüre göre H₂O₂ ile halka kapatma işlemi yapılır. OFN8 elde edilir(Şekil 3.7).

Saflandırma işlemi için 6/1 Hekzan/EtOAc çözücü sisteminde kolon kromatografisi uygulanır.

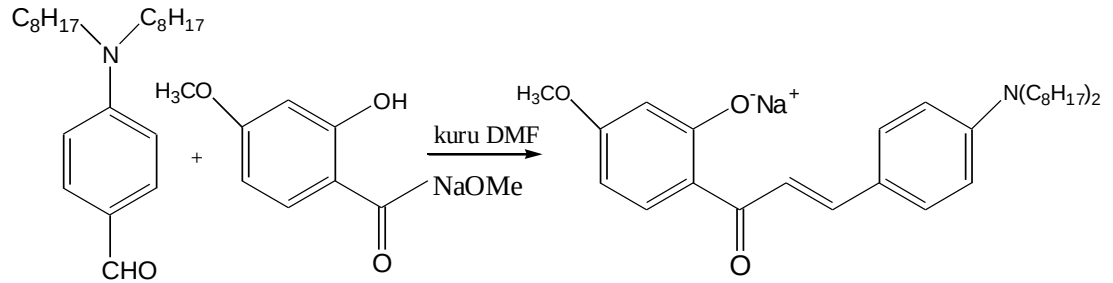
OFN8 için çalkon oluşumu ve halka kapama reaksiyonları aşağıdaki gibi özetlenebilir (Şekil 3.8)



Şekil 3.8: OFN8 için özet sentez reaksiyonu

Saflandırma işleminden sonra, incelenen NMR spektrumuna göre: ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃), 8.1 ppm (3H, d, J=7Hz), 6.9ppm (2H, d, J=2.5), 6.7ppm (2H, d, J=7Hz), 4.02 (2H, t, J=6.5), 3.35ppm (4H, t, J=7.1).

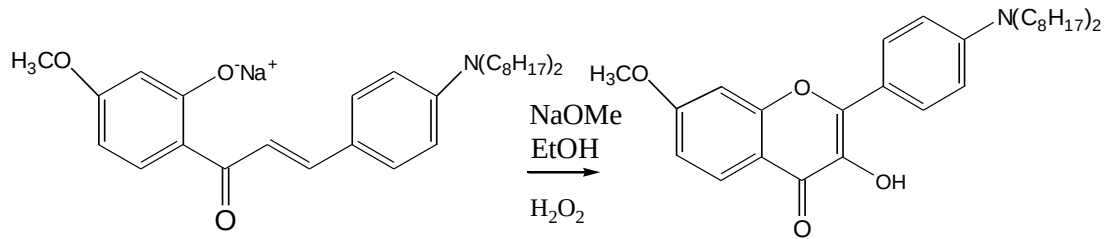
3.4.8 Çalkon Sentezi için Genel Prosedür (MFN8)



Şekil 3.9: MFN8 için çalkon eldesi

Bölüm 3.4.3'te anlatılan, FN8 için çalkon senteziyle aynı prosedür uygulanmıştır(Şekil 3.9).

3.4.9 MFN8 eldesi, Flavon oluşum(halka kapama) reaksiyonu

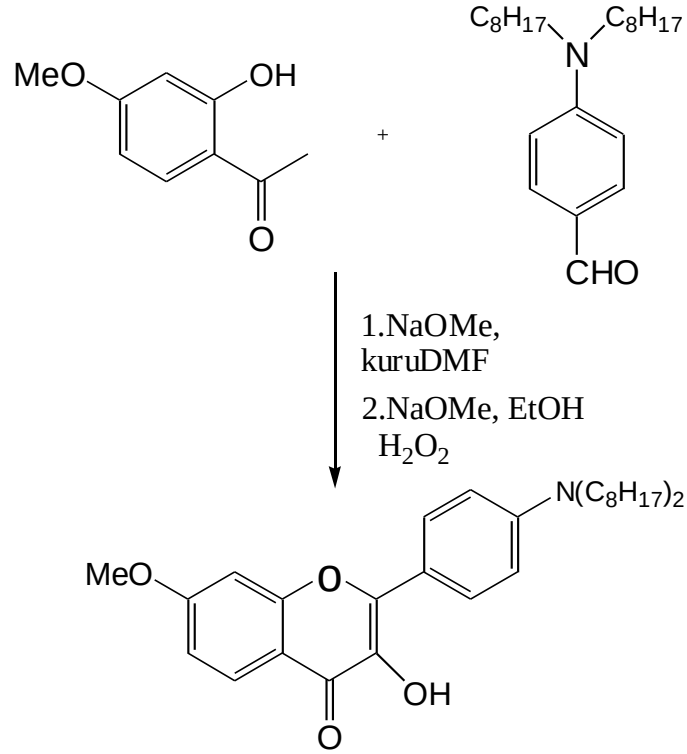


Şekil 3.10: MFN8 halka kapama reaksiyonu

Bölüm 3.4.4' teki prosedüre göre H₂O₂ ile halka kapatma işlemi yapılır. MFN8 elde edilir(Şekil 3.10).

Saflandırma işlemi için 6/1 Hekzan/EtOAc çözücü sisteminde kolon kromatografisi uygulanır.

MFN8 için çalkon oluşumu ve halka kapama reaksiyonları aşağıdaki gibi özetlenebilir (Şekil 3.11)



Şekil 3.11 MFN8 için özet sentez reaksiyonu

Saflandırma işleminden sonra, incelenen NMR spektrumuna göre: ¹H-NMR (200 MHz, CDCl₃), 8.22 ppm (3H, d, J=8Hz), 6.96ppm (2H, d, J=2.5), 6.7ppm (1H, d, J=8Hz), 6.9ppm (2H, m) 3.9 (3H, s), 3.35ppm (4H, t, J=7.1), 2.5 (4H).

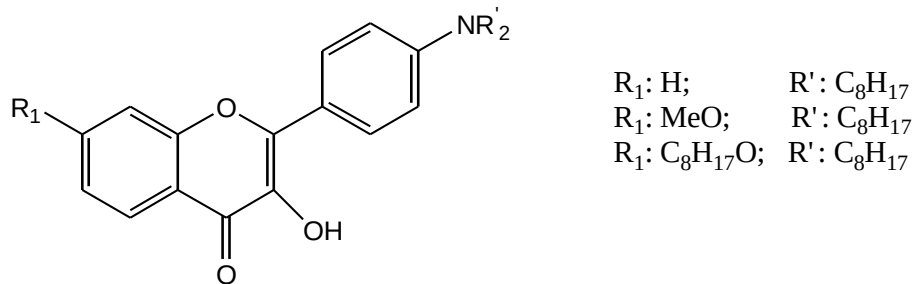
4. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

3-hidroksiflavonlar, dikkate değer floresans özelliklere sahip bileşiklerdir ve en belirgin özellikleri çevrelerinde gerçekleşen küçük değişimlere çok hassas olmaları ve bu değişimlere, birbirinden oldukça iyi ayrılmış iki emisyon bandıyla yanıt vermeleridir. İki floresans band verebilmeleri, bu moleküllerin uyarılma durumunda, iç proton transferi (Excited state intramolecular proton transfer, ESIPT) yapabilmelerinden kaynaklanmaktadır. Bu yüzden misel ve fosfolipid kesecikler gibi biyolojik sistemlerde floresans sensör olarak kullanılabilirler.

Özelliklerinin geliştirilmesi amacıyla bazı analogları yakın zamanda sentezlenmiş ve floresan kuantum verimlerinin artması ve istenilen aralıktaki çift dalga boyu hassasiyetinin artırılması yanında, absorpsiyon ve floresan spektrumlarında kırmızıya kayma gözlenmiştir.

Bunun yanında, özellikle biyolojik sistemlerde daha iyi iletişime girecek floresan sensörler geliştirmek için yeni 3-hidroksiflavon analoglarının sentez edilmesi önem taşımaktadır. Proben kararlılığını artırabilmek için yapılabilecekler arasında, proben özelliğini lipid yapının özelliğine benzetmek üzere proben yapısına farklı uzunluklarda hidrokarbon zincirleri yerleştirmek olacaktır. Bu amaçla bu çalışmada, 3-hidroksiflavon'un yağsı özelliğini artıran, uzun "oktil" zincirlerinin çeşitli 3-hidroksiflavon türevlerine takılması amaçlanmıştır. Nonpolar özelliği artacak olan sensörün, biyolojik sistemlerle daha iyi iletişime girmesi ve hücre hakkında daha fazla bilgi edinilmesi planlanmıştır.

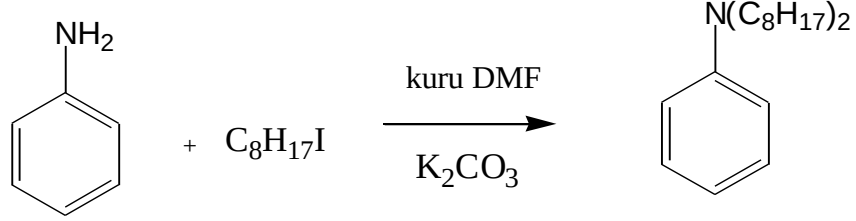
Sentezlenen 3-hidroksiflavon türevleri aşağıdaki gibi özetlenebilir (Şekil 4.1).



Şekil4.1: Sentezlenen 3-hidroksiflavon türevleri

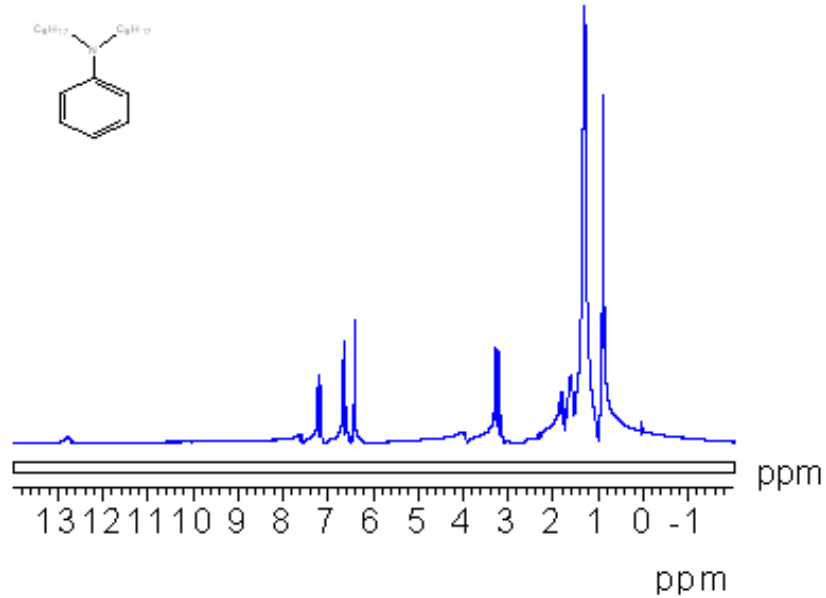
4.1 Gerçekleştirilen Reaksiyonlar

4.1.1 Anilin'in Oktilyodür ile Reaksiyonu - Dioktilaminobenzen eldesi



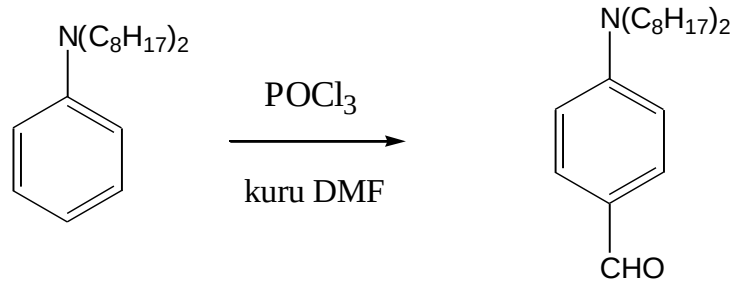
Şekil 4.2: Dioktilaminobenzen sentezi

Şekil 4.2’de şematize edilen dioktil aminobenzen eldesi reaksiyonu, bölüm 3.4.1’de anlatılan prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Ürüne ait ^1H -NMR spektrumunda(Şekil 4.3), Aromatik halkaya ait protonlar, 7.17 ve 6.67 ppm’de dublet olarak görülmektedirler. Her ikisinde de 2H bulunmaktadır. 6.4 ppm’de ise yine aromatik protona ait bir triplet bulunmaktadır. Azota komşu proton 3.25ppm’ de bir triplet şeklindedir(4H). 1.8 ppm’de ise bir multiplet şeklinde uzun hidrokarbon zincirine ait protonlar görülmektedir(30H).



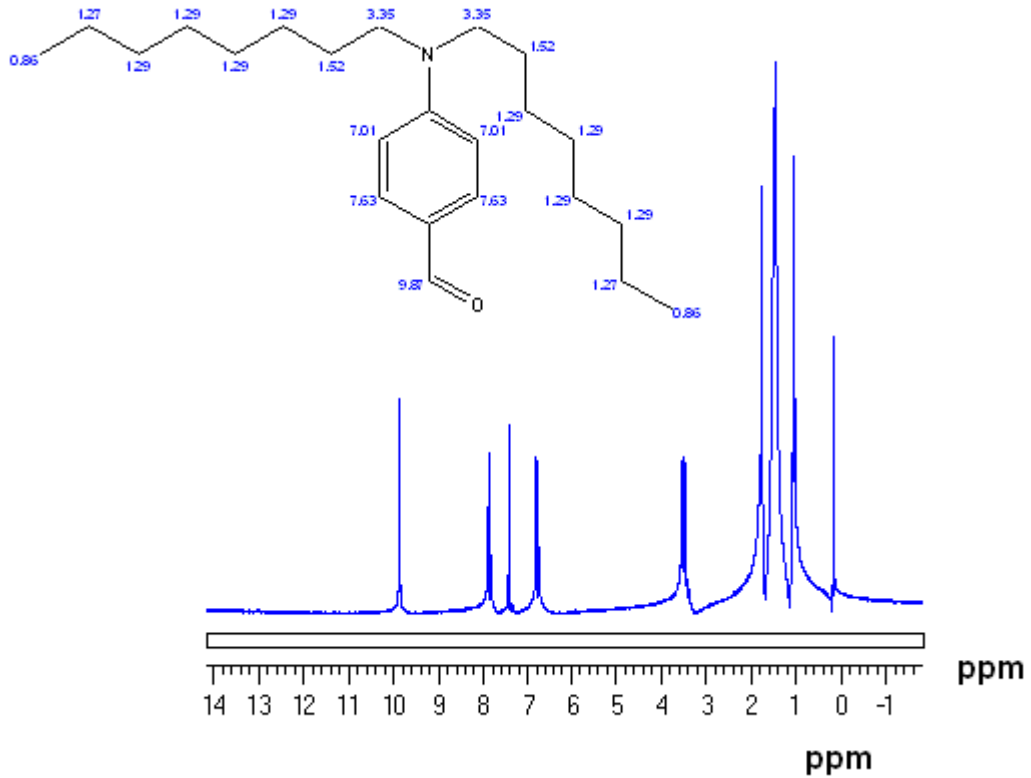
Şekil 4.3: Dioktilaminobenzen’ e ait H-NMR spektrumu

4.1.2 Dioktilaminobenzaldehit eldesi (Vilsmeier Formulation)



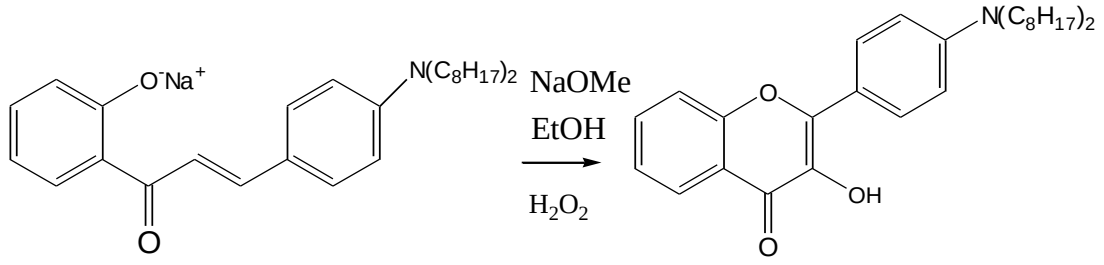
Şekil 4.4: Dioktilaminobenzaldehit sentezi

Şekil 4.4’de şematize edilen dioktil aminobenzaldehit eldesi reaksiyonu, bölüm 3.4.2’de anlatılan prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Ürüne ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumunda (Şekil 4.5), 9.6ppm’de karbonile komşu protona ait bir singlet, 7.7ppm ve 6.6 ppm’de aromatik halkaya ait protonların dubletleri (4H), 7.2ppm’de CDCl_3 piki, 3.35 ppm’de ise azota bağlı protona ait bir triplet görülmektedir.



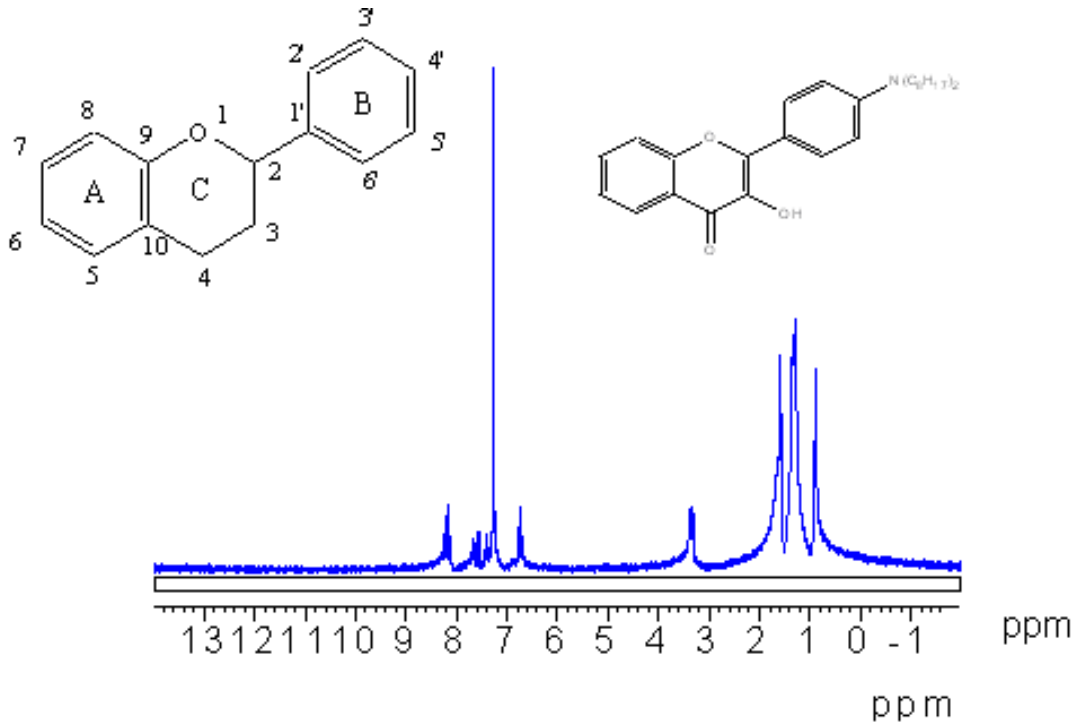
Şekil 4.5: Dioktilaminobenzaldehite ait $^1\text{H-NMR}$ spektrumu

4.1.3 FN8 eldesi, Flavon oluşum(halka kapama) reaksiyonu

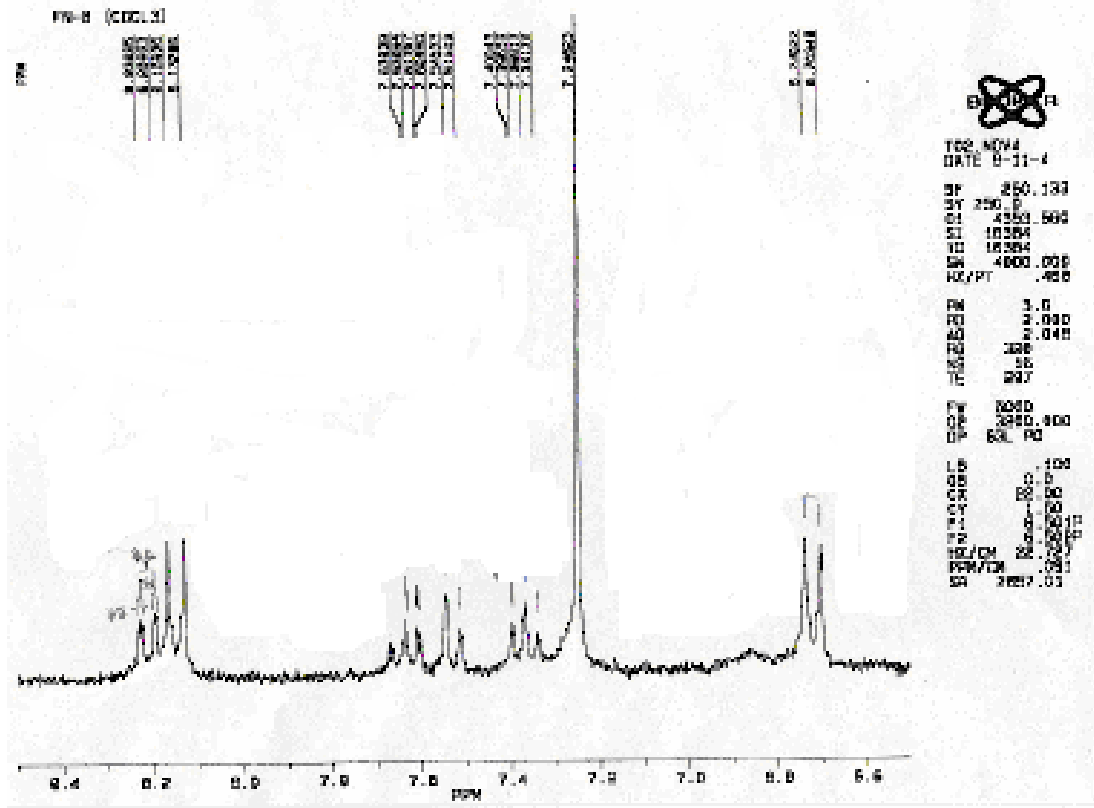


Şekil 4.6: FN8 sentezi

Şekil 4.6’da şematize edilen FN8 eldesi reaksiyonu, bölüm 3.4.4’de anlatılan prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Ürüne ait ^1H -NMR spektrumu ve bu spektrumda piklere ait integral alanları yapıyı doğrulamaktadır(Şekil 4.7 ve Şekil 4.8). 8.1ppm’de 2’ ve 6’ protonlarına ait bir dublet (2H), 8.22ppm’de 5 protonuna ait bir dublet (1H), 6.7ppm’de 3’ ve 5’ protonlarına ait bir dublet görülmektedir. 7.4 ppm’de 6 no’lu protona ait triplet, 7.5ppm’de 8 no’lu protona ait bir dublet ve 7.6ppm’de 7 no’lu protona ait pikler görülmektedir, 3.35ppm’ de azota komşu protona ait bir triplet bulunmaktadır (4H).

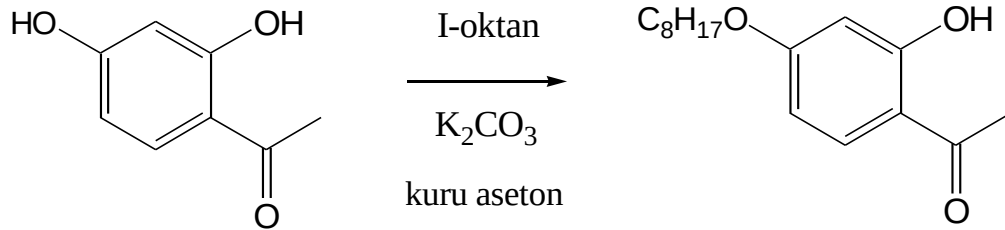


Şekil 4.7: FN8’e ait ^1H -NMR spektrumu



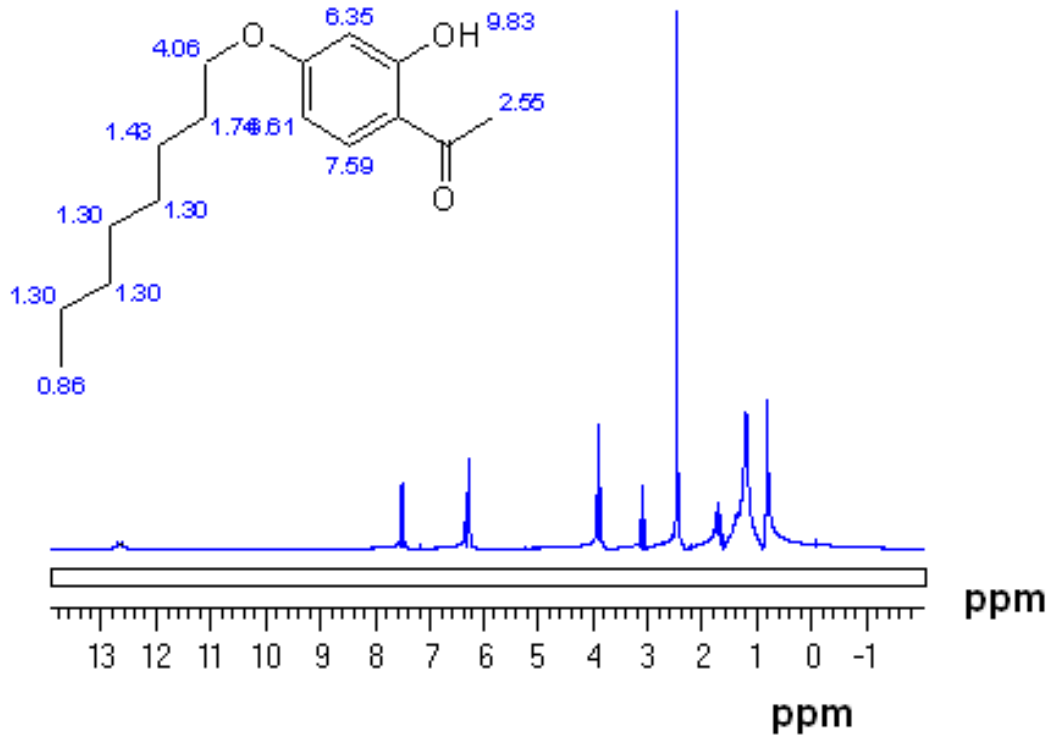
Şekil 4.8: FN8'e ait ^1H -NMR Spektrumu(8.4-6.6ppm)

4.1.4 2-hidroksi-4-oktiloksiasetofenon Eldesi için Genel Yöntem



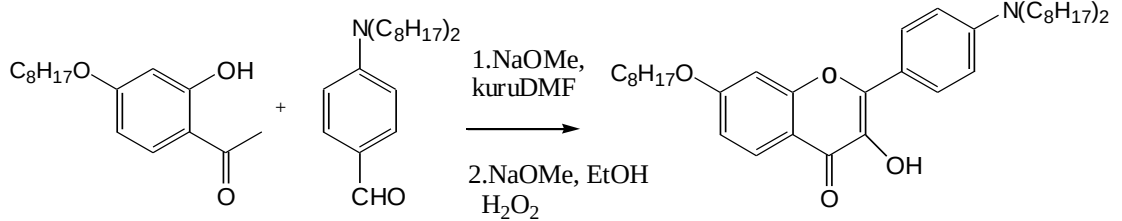
Şekil 4.9: 2-hidroksi-4-oktiloksiasetofenon sentezi

Şekil 4.9'de şematize edilen 2-hidroksi-4-oktiloksiasetofenon eldesi reaksiyonu, bölüm 3.4.5'de anlatılan prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Ürüne ait ^1H -NMR spektrumu yapıyı doğrulamaktadır(Şekil 4.10). Aromatik halkaya ait protonlar, 7.5 ppm'de dublet, 6.6 ppm'de dublet ve 6.3 ppm'de görülmektedir. $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{O}$ grubuna ait, oksijene bağlı metilen protonları 4.06 ppm'de triplet halde görülmektedir. Piklere ait integral alanları yapıdaki proton sayısını desteklemektedir.



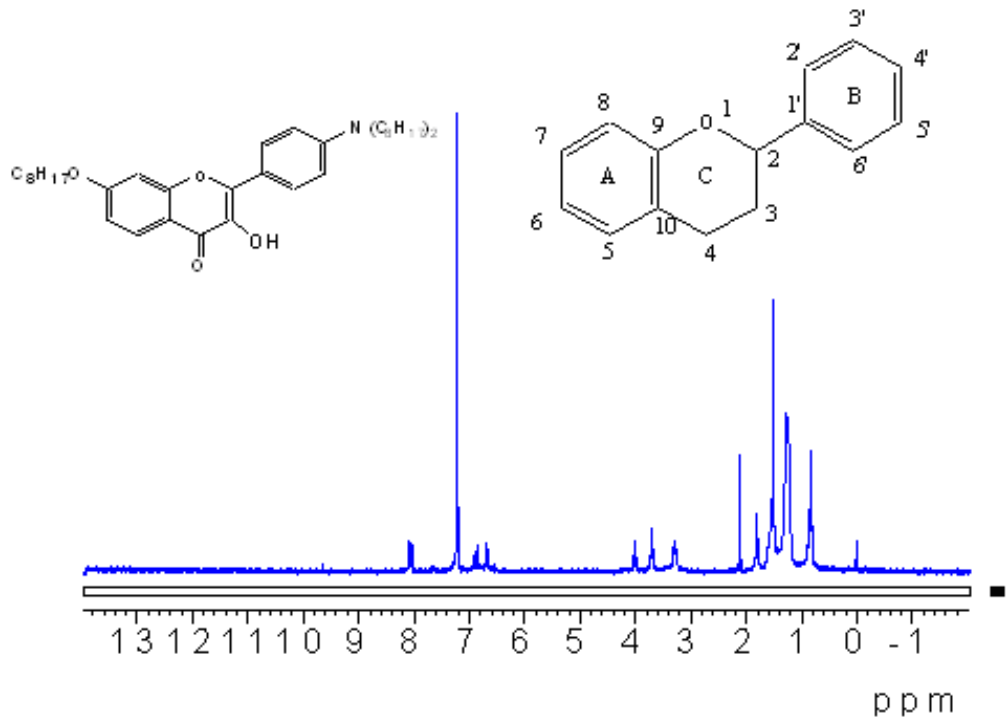
Şekil 4.10: 2-hidroksi-4-oktiloksiasetofenona ait ^1H -NMR spektrumu

4.1.5 OFN8 eldesi, Flavon oluşum(halka kapama) reaksiyonu

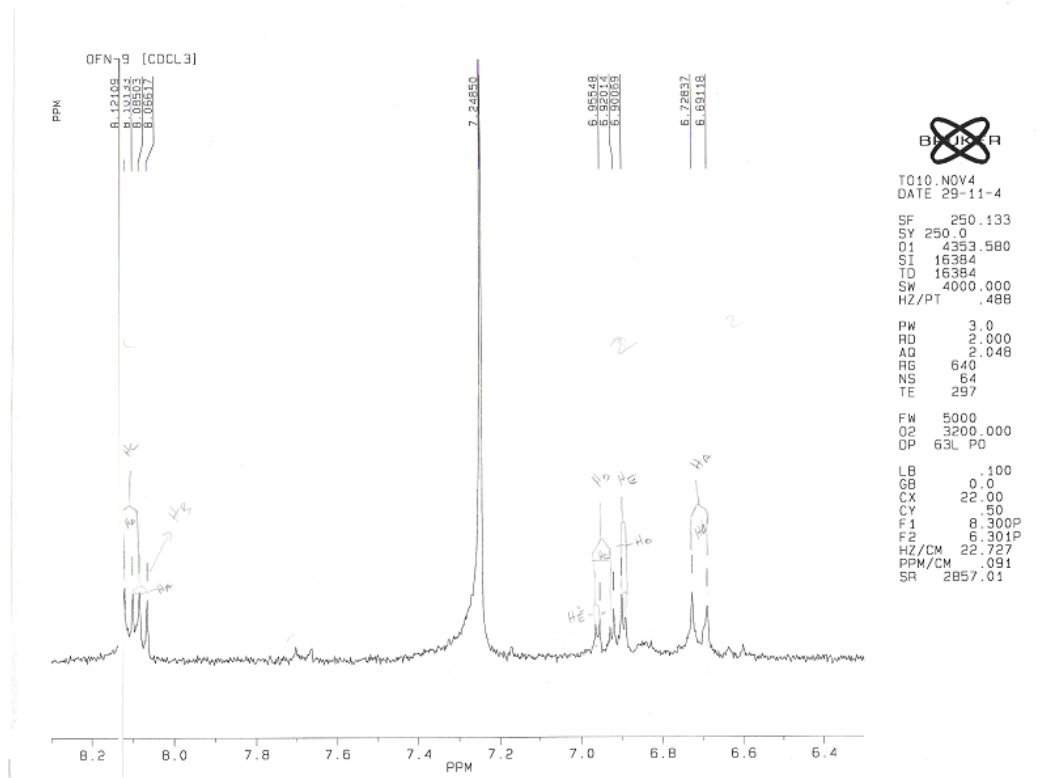


Şekil 4.11: OFN8 için özet sentez reaksiyonu

Şekil 4.11’da şematize edilen OFN8 eldesi reaksiyonu, bölüm 3.4.7’de anlatılan prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Ürüne ait ^1H -NMR spektrumu ve bu spektrumda piklere ait integral alanları yapıyı doğrulamaktadır (Şekil 4.12 ve Şekil 4.13). 8.1ppm 2’ ve 6’ protonlarına ait dublet, 8.22 ppm’de 5 numaralı protona ait bir dublet görülmektedir. 6.9 ppm’ daki dublet 6 ve 8 numaralı protonlara aittir, 6.7 ppm’ de ise 3’ ve 5’ protonlarının dubleti görülmektedir (2H). 4.02 ppm’de $\text{C}_8\text{H}_{17}\text{O}$ grubunda oksijene bağlı protonun tripleti (4H), 3.35ppm’de ise azota komşu protona ait triplet bulunmaktadır (4H).

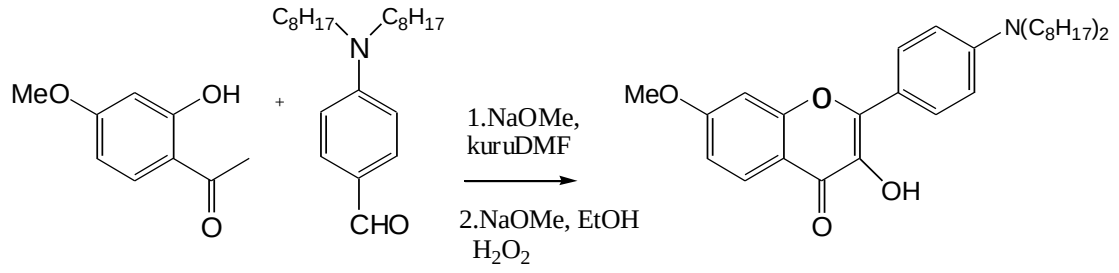


Şekil 4.12: OFN8'e ait ¹H-NMR spektrumu



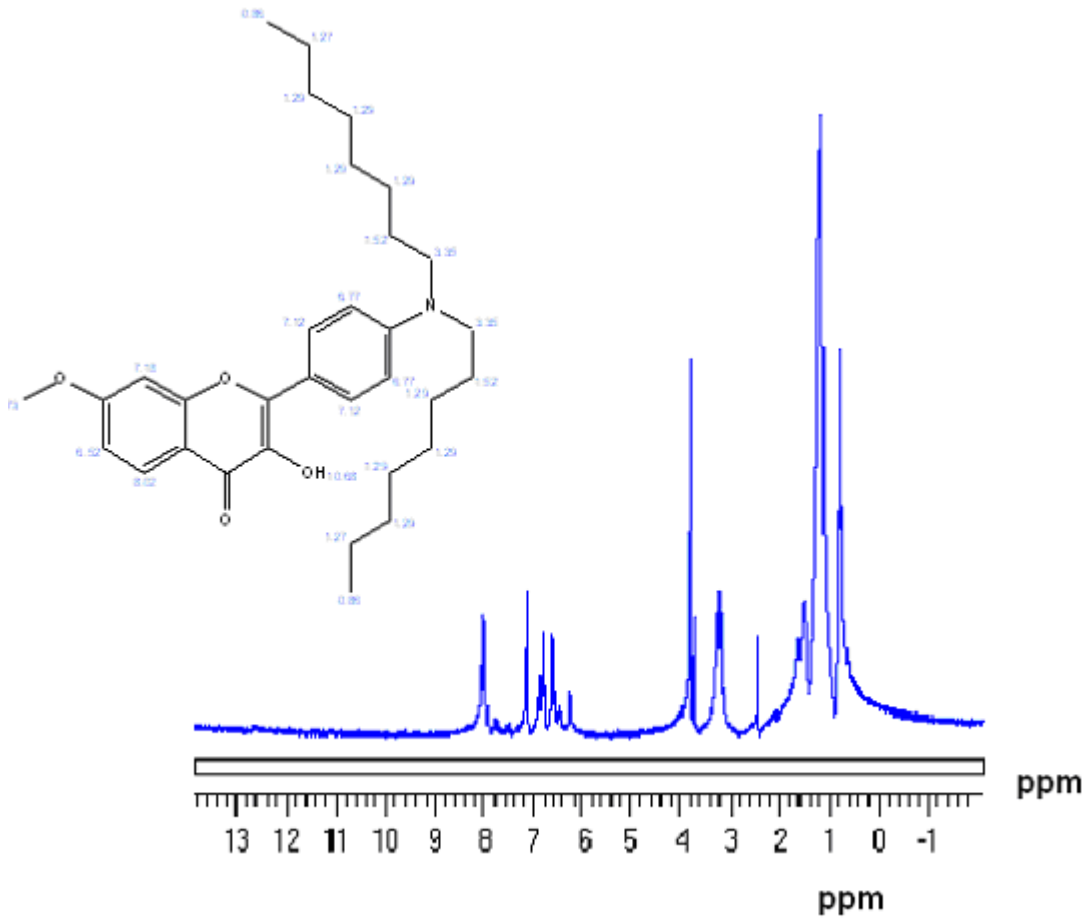
Şekil 4.13: OFN8'e ait ¹H-NMR spektrumu(8.2-6.4ppm)

4.1.6 MFN8 eldesi, Flavon oluşum(halka kapama) reaksiyonu

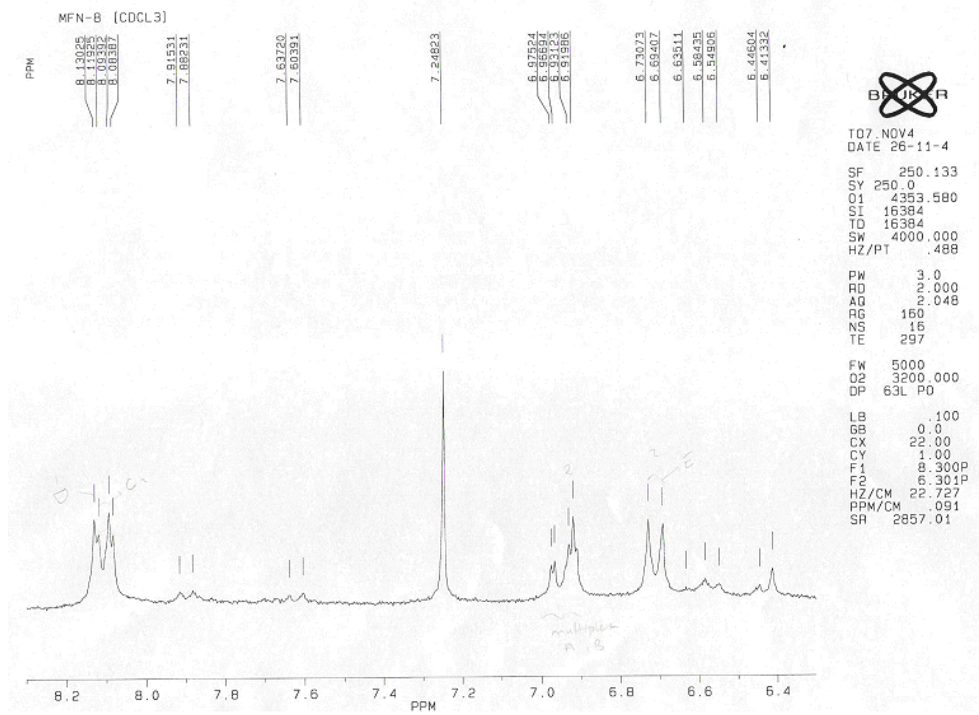


Şekil 4.14: MFN8 için özet sentez reaksiyonu

Şekil 4.14'da şematize edilen MFN8 eldesi reaksiyonu, bölüm 3.4.9'da anlatılan prosedüre göre gerçekleştirilmiştir. Ürüne ait ¹H-NMR spektrumu ve bu spektrumda piklere ait integral alanları yapıyı doğrulamaktadır(Şekil 4.15, Şekil 4.16). 8.1ppm'de 2' ve 6' protonlarının dubleti, 8.15ppm'de 6 no'lu protonun dubleti, 6.96ppm'de 7 ve 9 numaralı protonların dubleti(2H), 6.7ppm'de 3' ve 5' protonlarının dubleti (2H) görülmektedir. 3.9ppm'de CH₃O grubundaki protonların singleti(3H), 3.35'de azota bağlı protonların tripleti görülmektedir.



Şekil 4.15: MFN8'e ait ¹H-NMR spektrumu



Şekil 4.16: MFN8'e ait ¹H-NMR spektrumu (8.2-6.4 ppm)

Sentezlenen probalar Tablo 4.1' de gösterilmektedir.

Tablo 4.1: Sentezlenen probalar (FN8, MFN8, OFN8)

Sentezlenen probun ismi	Sentezlenen Probun Yapısı
FN8	
MFN8	
OFN8	

4.2 Sentezlenen Problara ait Floresans ve Absorbsiyon Ölçümleri

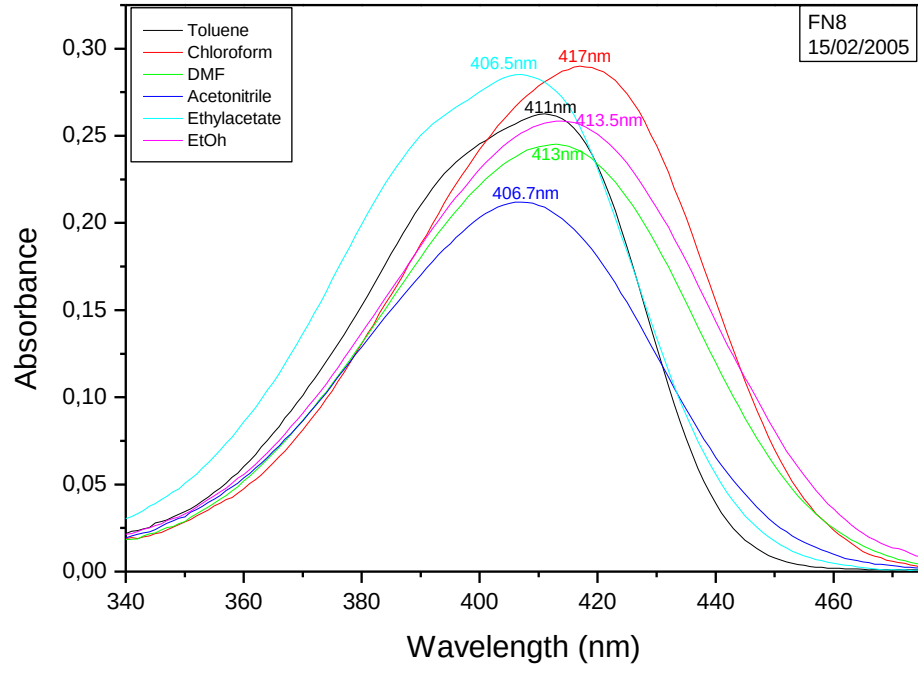
3-hidroksiflavonlar uyarılmış halde molekül içi proton transferi yaptıklarından dolayı (excited state intramolecular proton transfer, ESIPT), floresans spektrumlarında, uyarılmış durum normal (N*) form ve fototautomer(T*) forma ait iki emisyon bandı gösterirler. Bu emisyon bantları dalga boyu skalasında iyi ayrılmış iki bant şeklindedir. Mavi bölgedeki bant normal uyarılmış durumdan (N*), kırmızıya kayan diğer bant ise uyarılmış tautomer durumdan (T*) kaynaklanır. İkinci bant çarpıcı bir şekilde yüksek dalga boyuna (kırmızıya) kayarak bandlar arasında iyi bir ayrım sağlanır.

Bu bantların ışık şiddetlerindeki farklılık, absorpsiyon ve floresans maksimumlarının pozisyonları, floresans kuantum verimleri gibi spektroskopik davranışlar, 3-hidroksiflavon ve 3-hidroksikromonların yapısına ve onların mikro çevre parametrelerine önemli ölçüde bağlıdır. 3-hidroksiflavonlar hidrojen bağı etkileşimlerine duyarlıdır. Bu bantların ışık şiddeti oranları ve pozisyonları çözücü molekülleri ile yaptığı hidrojen bağı ya da çözücü polaritesine göre değişiklik gösterir. Bu nedenle floresans ölçümleri farklı polaritelere sahip çözücüler içinde gerçekleştirilmiştir.

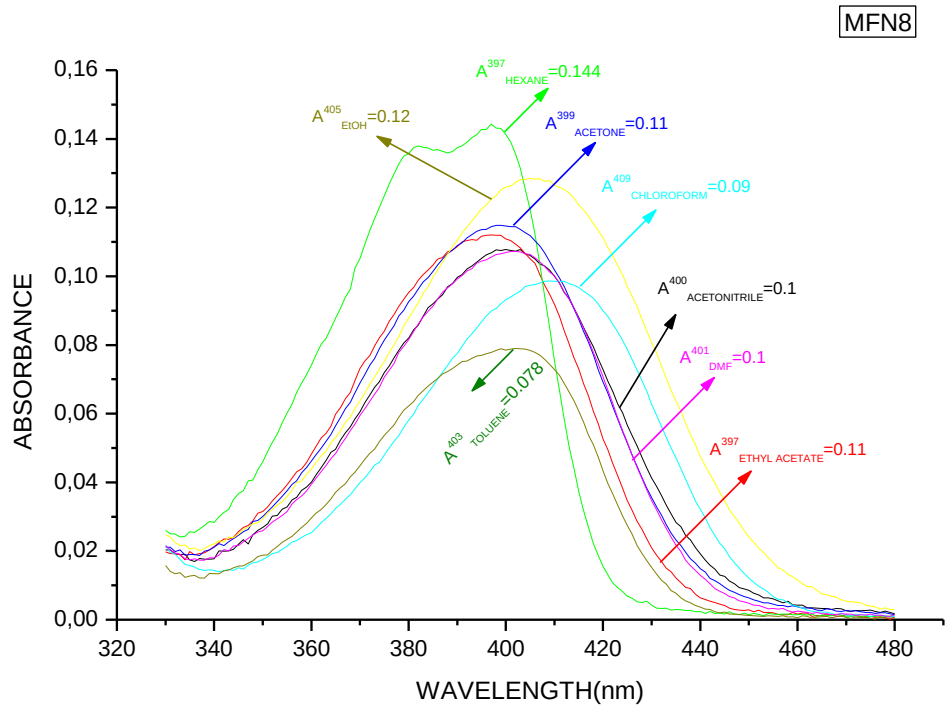
Sentezlenen moleküllerin absorpsiyon ve floresans spektrumlarında çözücüye bağlı kaymalar görülmüştür (solvatokromizm ve solvato florokromizm). Absorpsiyon ölçümleri farklı polaritedeki solventlerde yapılmıştır.

Tüm solventlerde, absorpsiyon spektrumunda kırmızıya kayma gözlenmiştir. Bu kırmızıya kayma, π -elektron donör, dioktilamino grubunun ana yapıya ilavesiyle gerçekleşmiştir. FN8, MFN8 ve OFN8 moleküllerine ait absorpsiyon spektrumları Şekil 4.17, Şekil 4.18 ve Şekil 4.19'da verilmektedir.

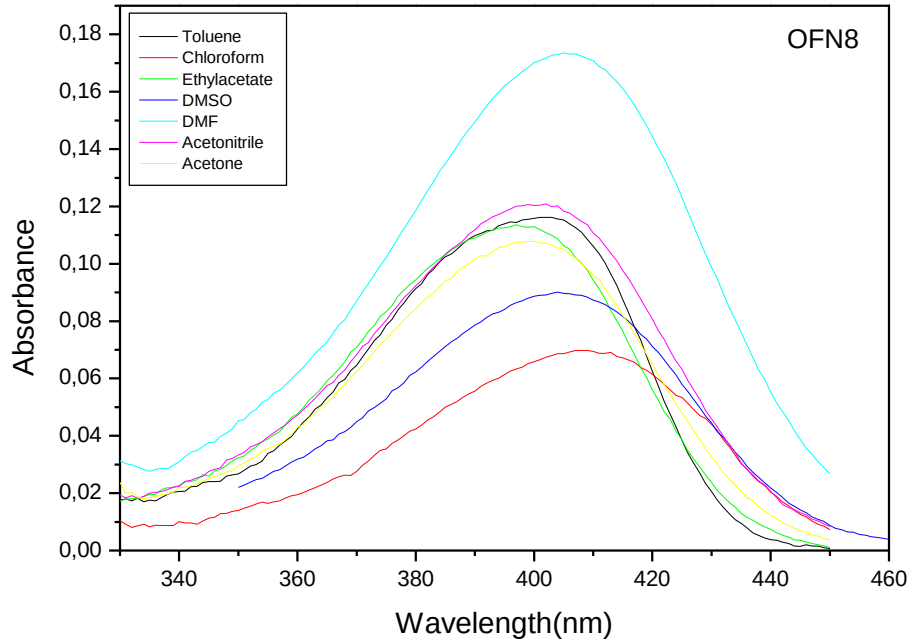
Çözücü polaritesi arttıkça absorpsiyon maksimumu, $\lambda_{\max}^{\text{abs}}$, uzun dalga boylarına kaymaktadır. Bu, elektronik uyarılma sırasında dipol momenti artan kromoforların tipik özelliğidir. Oksijen içeren çözücülerde (dibütileter, dietileter, THF, etil asetat) bu özellikten sapmalar söz konusudur ve daha düşük dalga boylarında yerleşirler. Bu sapma, proba ait 3-OH ile solvent moleküllerine ait proton akseptör oksijen atomları arasında oluşan moleküller arası hidrojen bağının (ki bu da temel hale fazladan kararlılık kazandırır) sonucu olarak ortaya çıkar.



Şekil 4.17: FN8'e ait absorpsiyon spektrumu



Şekil 4.18: MFN8'e ait absorpsiyon spektrumu



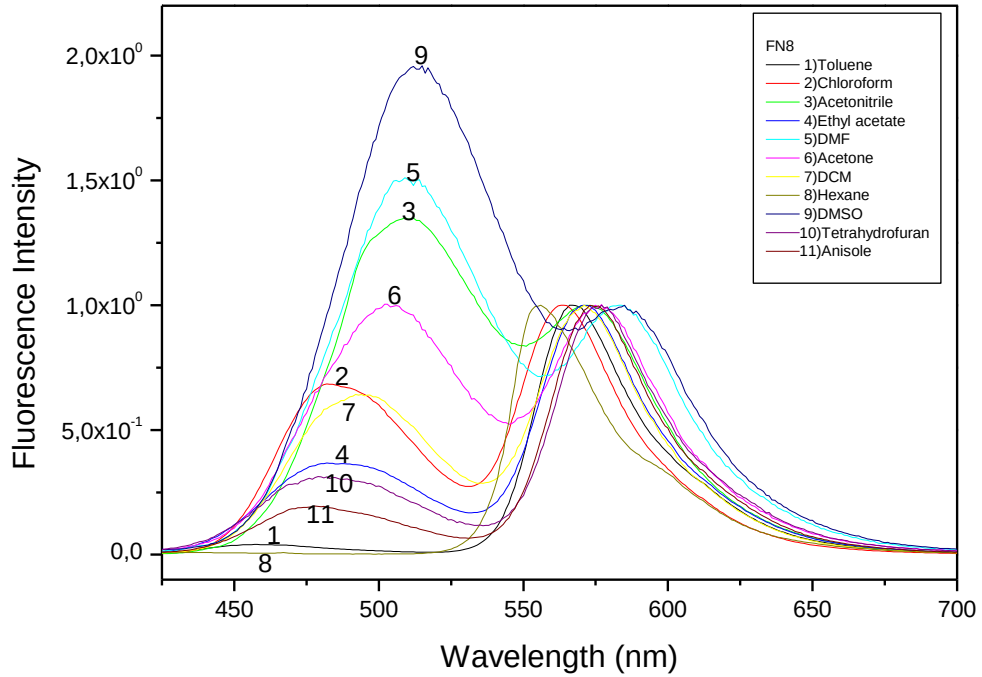
Şekil 4.19: OFN8'e ait absorpsiyon spektrumu

Floresans ölçümleri için, öncelikle absorpsiyon spektrumlarına bakılarak maksimum absorpsiyon dalga boyu bulunmuştur. Bu dalga boyunda uyarılan molekülün floresans spektrumları incelenmiştir. Farklı polaritelerdeki çözücülerde yapılan floresans ölçümlerinde, beklenildiği gibi, normal (N^*) ve tautomer(T^*) forma ait iki band görülmüştür.

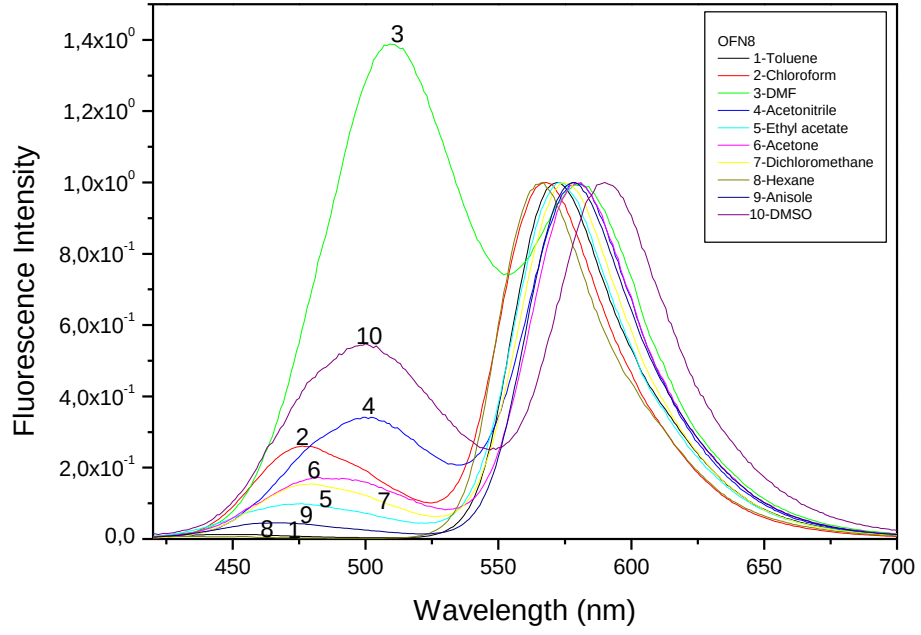
Yeni sentezlenen 3-HF türevleri, düşük polaritedeki çözücülerde yapılan floresans ölçümlerinde, belirgin bir şekilde çözücüye bağımlı değişim göstermektedir. Birbirinden iyi ayrılmış iki emisyon bandının rölatif şiddetlerinin (intensity) değişmesi sonucu, hekszanda çok düşük şiddete sahip, düşük dalga boylu N^* bandı, polaritesi daha yüksek olan etilasetatta daha baskın hale gelmektedir. 3-HF'lar için karakteristik olan uyarılmış hal molekül içi proton transferinin yüksek polariteye sahip çözücülerde daha etkili olduğu düşünülmektedir.

Farklı polaritedeki çözücülerde yapılan floresans ölçümlerinde, çözücü polaritesi arttıkça emisyon bandlarında kırmızıya, yüksek dalga boyuna kayma gözlenmiştir. Hekzanda T^* 'ye ait uzun dalga boylu emisyon bandı, kısa dalga boylu N^* bandına göre oldukça baskındır. Polarite arttıkça, N^* bandının büyüklüğünde de artış görülmektedir.

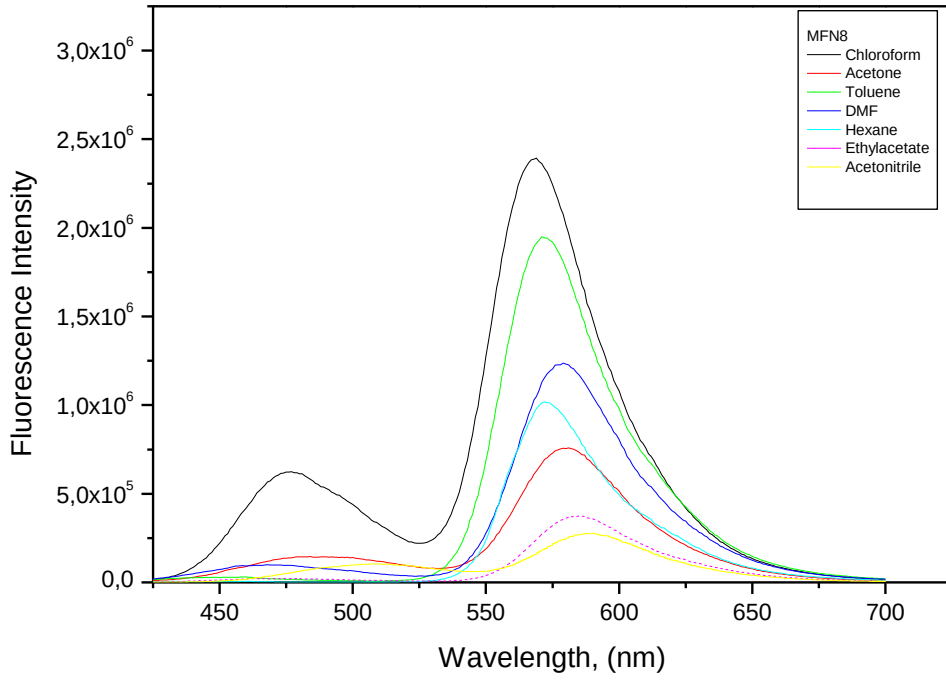
3-HF türevleriyle yapılan çalışmalar sonucu, N* ve T*'ye ait bandların, çözücü polaritesinin bir fonksiyonu olarak floresans spektrumunda kaydığı ve N* bandındaki kaymanın T*'ye göre daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır. Bunun nedeni, N* formunun dipol momentinin daha büyük olmasının sonucu, çözücü molekülleriyle etkileşimde oluşan dielektrik kararlılığının daha fazla olmasıdır. Çalışılan çözücülerin çoğunda, bandlarda iyi ayırım gözlenmiştir. Fakat N* bandındaki güçlü kaymadan dolayı, yüksek polaritedeki solventlerde girişim (overlap) söz konusudur. T* bandının şiddetinin, N* bandının şiddetinden küçük olduğu durumlarda bu girişim belirgin hale gelir. FN8, OFN8 ve MFN8 problemlerine ait floresans şiddeti-dalgaboyu grafikleri Şekil 4.20, Şekil 4.21 ve Şekil 4.22'de verilmektedir.



Şekil 4.20: FN8 probuna ait, farklı polaritedeki çözücülerde incelenen, T* bandına göre normalize edilmiş floresans spektrumu



Şekil 4.21: OFN8 probuna ait, farklı polaritedeki çözücülerde incelenen, T* bandına göre normalize edilmiş floresans spektrumu

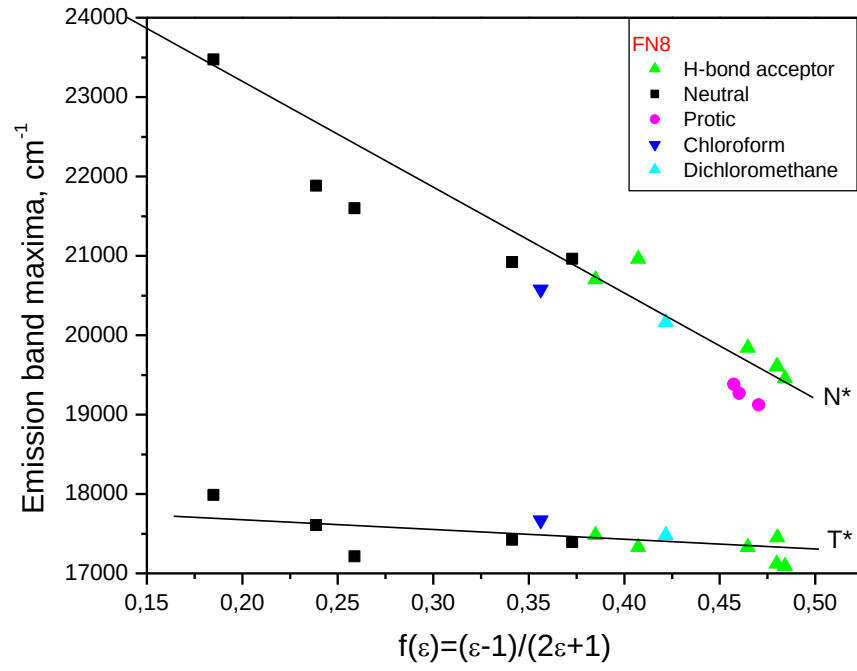


Şekil 4.22: MFN8 probuna ait, farklı polaritedeki çözücülerde incelenen, floresans spektrumu

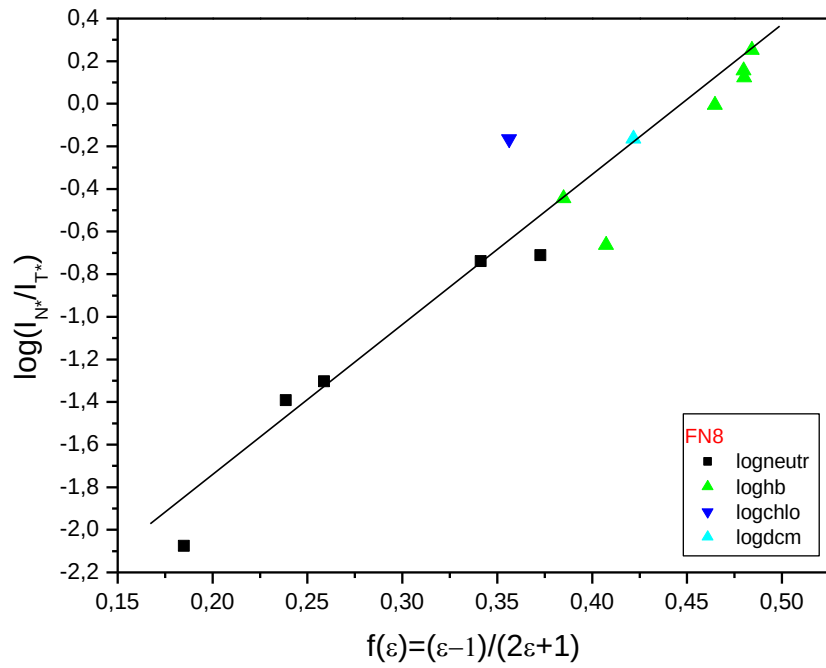
Son yıllarda yapılan çalışmalar sonucu, çözelti içindeki organik kromoforların elektronik spektrayı çeşitli yönlerden etkilediği ortaya çıkmıştır. Çözücü parametreleri ve absorpsiyon-emisyon spektraları arası bağlantının çok parametrelili olduğu bilinmektedir. Elektronik ve nükleer solvent polarizasyonlarıyla belirlenen, çözücü-çözünen etkileşimleri, en basit yaklaşımla, refraktif indeks n , $f(n)=(n^2-1)/(2n^2+1)$, ve düşük frekans dielektrik sabitinin, ϵ , $f(\epsilon)=(\epsilon-1)/(2\epsilon+1)$, fonksiyonları olarak tanımlanabilirler. Bu etkileşimlerin temelinde H-bağı gibi spesifik etkileşimler vardır. Spektra üzerindeki etkileri, solvent moleküllerinin H-bağında çözünene donör veya akseptör olarak davranmasına göre farklılık gösterir. Tüm bu faktörlerin elektronik spektrada işaret ve büyüklük olarak farklılık göstermesi sonucu, absorpsiyon ve floresans spektrası, moleküller arası etkileşimlerde daha yeterli bilgiye ulaşılmasını sağlar [39].

Çözücüye bağımlı değişen N^* bandı, dielektrik sabiti ϵ ile iyi bir korelasyon sağlamaktadır ve $f(\epsilon)$ ile lineer bir fonksiyon vermektedir (Şekil 4.23, Şekil 4.25, Şekil 4.27). T^* bandının pozisyonu $f(\epsilon)$ ya da $f(n)$ ile yüksek korelasyon sağlamaz. Dikkat edilmesi gereken nokta protik solventlerde N^* ve T^* bandlarının davranışlarıdır. N^* bandı kırmızıya kayarken, T^* bandı maviye kaymaktadır. Bunun sonucu olarak N^* ve T^* bandları birbirlerine yaklaşmaktadır.

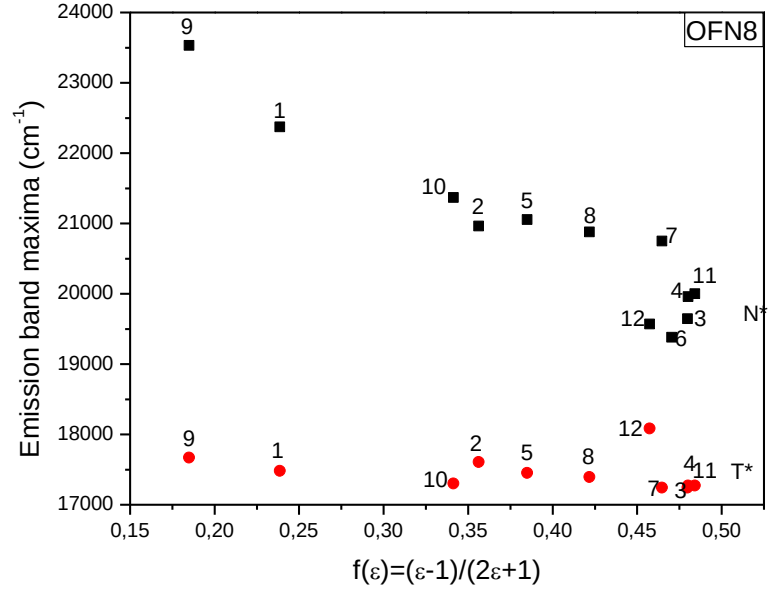
En belirgin çözücüye bağımlı değişimler I_{N^*}/I_{T^*} şiddet oranlarında görülmektedir. Ölçümler sonucunda, I_{N^*}/I_{T^*} şiddet oranlarının $f(\epsilon)$ ile korelasyon gösterdiği bulunmuştur. Çözücü polaritesinin artışı, N^* bandının etkisini belirgin bir şekilde artırmaktadır.



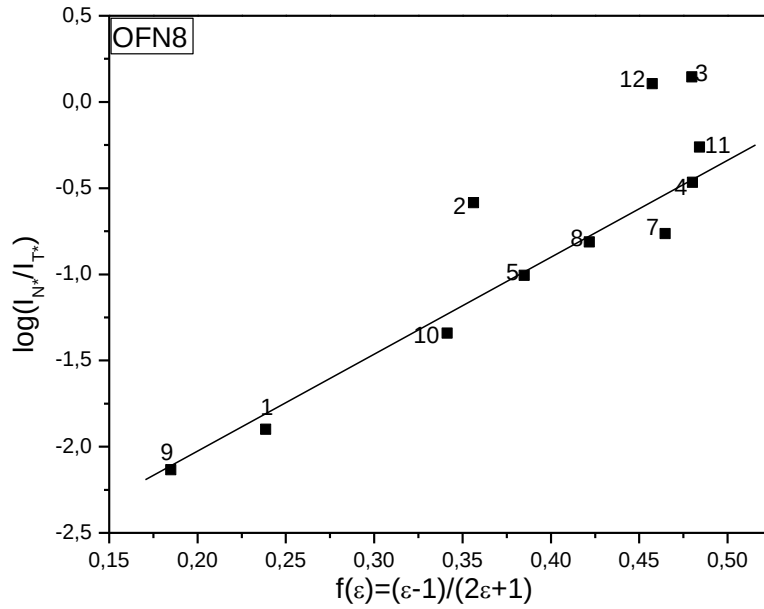
Şekil 4.23: FN8 probuna ait farklı polaritedeki çözücülerde alınan emisyon band maksimumlarına karşı $f(\epsilon)$ grafiği



Şekil 4.24: FN8 probuna ait farklı polaritedeki çözücülerde alınan $\log(I_{N^*}/I_{T^*})$ şiddet oranlarına karşı $f(\epsilon)$ grafiği



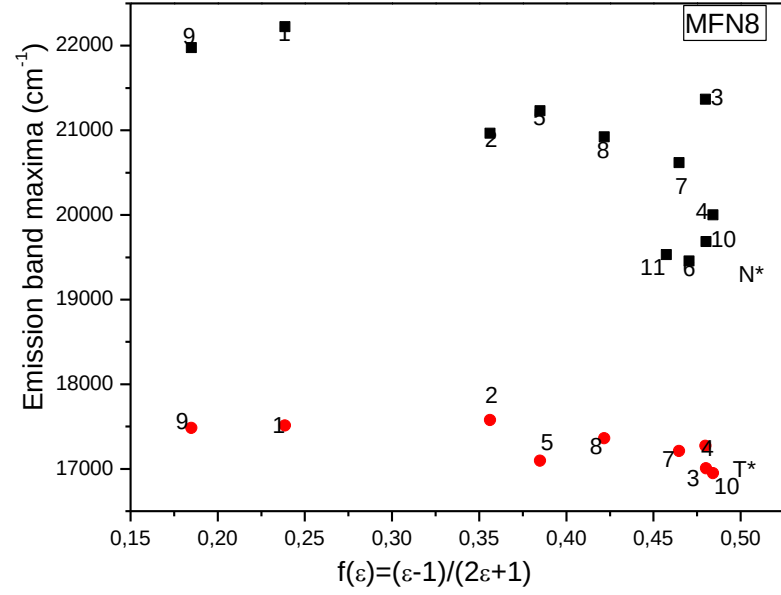
Şekil 4.25: OFN8 probuna ait farklı polaritedeki çözücülerde alınan emisyon band maksimumlarına karşı $f(\epsilon)$ grafiği



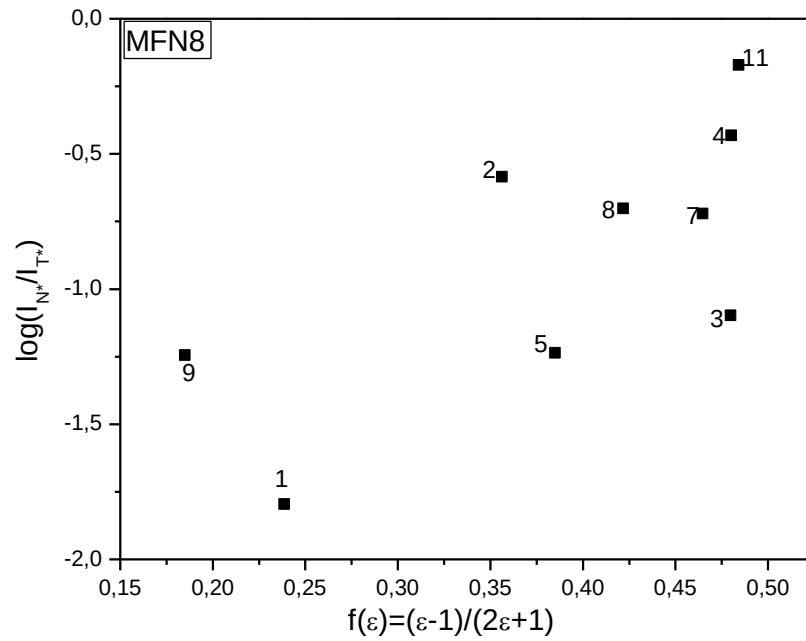
Şekil 4.26: OFN8 probuna ait farklı polaritedeki çözücülerde alınan $\log(I_{N^*}/I_{T^*})$ şiddet oranlarına karşı $f(\epsilon)$ grafiği

OFN8 proba ait, floresans ölçümlerinde kullanılan farklı polaritedeki çözücüler, numaralarıyla birlikte şu şekilde sıralanmaktadır: 1. Toluen 2. Kloroform, 3. DMF, 4.

Asetonitril, 5. Etilasetat, 6. EtOH, 7. Aseton, 8. Diklorometan, 9. Hekzan, 10. Anisol, 11. DMSO, 12. n-BuOH, 13. MeOH



Şekil 4.27: MFN8 probuna ait farklı polaritedeki çözücülerde alınan emisyon band maksimumlarına karşı $f(\epsilon)$ grafiği



Şekil 4.28: MFN8 probuna ait farklı polaritedeki çözücülerde alınan $\log(I_{N^*}/I_{T^*})$ şiddet oranlarına karşı $f(\epsilon)$ grafiği

MFN8 proba ait, floresans ölçümlerinde kullanılan farklı polaritedeki çözücüler, numaralarıyla birlikte aşağıda verilmektedir.

1.Toluen, 2. Kloroform, 3. DMF, 4. Asetonitril, 5. Etilasetat, 6. ETOH, 7. Aseton, 8. Diklorometan, 9. Hekzan, 10. DMSO, 11. n-BuOH, 12. MeOH (1,9: Nötral, 3,4,5,7,11: H-bağı akseptor, 6,12,13: Protik)

FN8, OFN8 ve MFN8 problemlerine ait farklı çözücülerde hesaplanmış floresans özellikleri Tablo 4.2, Tablo 4.3 ve Tablo 4.4’de verilmektedir.

Tablo 4.2: OFN8 probuna ait, farklı çözücülerde hesaplanmış floresans özellikleri

Numara	Solvent	ϵ	$\lambda_{absmax}(nm)$	$\lambda_{N*max}(nm)$	$\lambda_{T*max}(nm)$	I_{N*}/I_{T*}
1	Toluene	42315	402	447	572	0,099
2	Kloroform	64000	409	477	568	0,259
3	DMF	63137	405	509	580	0,386
4	Asetonitril	43897	401	501	579	0,46
5	Etilasetat	50146	398	475	573	0,228
6	Etanol	42406	407	516	...	0,654
7	Aseton	39218	399	482	580	0,355
8	Diklorometan	42118	406	479	575	0,309
9	Hekzan	41050	396	425	566	0,009
10	Anisol	41680	403	468	578	0,198
11	DMSO	36284	404	500	579	0,144
12	n-BuOH	36940	411	511	553	0,586
13	MeOH	43682	409	520	...	0,762

Toluen içerisinde ölçülen floresans kuantum verimi: $Q_F = 0,32$

Tablo 4.3: MFN8 proba ait, farklı çözücülerde hesaplanmış floresans özellikleri

Number	Solvent	λ_{absmax}	$\lambda_{maxN*}(nm)$	$\lambda_{maxT*}(nm)$	ϵ
1	Toluen	403	450	571	23767
2	Kloroform	409	477	569	30044
3	Aseton	399	485	581	35041
4	DMF	401	468	579	30471
5	Hekzan	397	455	572	42660
6	EtOH	405	514	-	36565
7	MeOH	408	520	-	35684
8	Asetonitril	400	508	588	30470
9	Etil asetat	397	471	585	33518

$Q_F(\text{Toluen})=0.28$, $Q_F(\text{Etanol})= 0.47$

Tablo 4.4: FN8 proba ait, farklı çözücülerde hesaplanmış floresans özellikleri

Numara	Solvent	$\lambda_{\text{abs max}}(\text{nm})$	$\lambda_{\text{max N}}^*(\text{nm})$	$\lambda_{\text{max T}}^*(\text{nm})$	ϵ
1	Toluen	402	447	572	42315
2	Kloroform	409	477	568	64000
3	Aseton	399	482	580	39218
4	DMF	405	509	580	63137
5	MeOH	409	520	-	43682
6	EtOH	407	516	-	42406
7	BuOH	411	511	553	36940
8	Asetonitril	401	501	579	43897
9	Etil asetat	398	475	573	50146
10	Anisol	403,5	467	578	41680
11	Dikloromethan	406	479	575	42118
15	DMSO	404	500	589	36284
16	Hekzan	396	425	566	41050

$Q_F(\text{Toluen})=0.10$

4.3 MFN8' e ait Biyolojik Çalışmalar

Sentezlenen probalar, dimetilsülfoksit (DMSO) içinde çözülerek stok çözeltiler elde edilmiştir. Çözeltilerin konsantrasyonları taramalı UV-VIS spektrofotometrede absorbans pikleri ölçülerek ve ϵ değerleri kullanılarak hesaplanmıştır.

L929 fibroblast hücreleri deney günü tripsin ile tutundukları petri kaplarından kaldırılmış, 150 μl içinde 300.000 hücre olacak şekilde sayılarak süspanse edilmiştir. Hücreler, deneye kadar geçen sürede buz üzerinde tutulmuşlardır.

Cihaz, emisyon taraması modunda çalıştırılmıştır. Uyarılma dalga boyu 405 nm iken 415-600 nm arası emisyon taraması yapılmıştır. Slitler: Em 2/Ex:4'dür. Deneyler 2.85 ml fosfat tamponu (PBS) içine hücreler ya da probaların eklenmesi ile başlatılmıştır.

MFN8 için 1 ila 3 nM konsantrasyonlarda yapılan ilk deneyler, probaların sulu çözeltide aggrage olduğunu ve hücrelerle etkileşmediğini göstermiştir. Bunun üzerine, suda çözünmeyen probaları hücrelere yerleştirmede sık kullanılan, bir tür deterjan olan Pluronic F-127 kullanılmıştır.

2.4 nM MFN8 ile yapılan deneylerde Pluronic varlığında probun spektasının zamana bağlı olarak hızla arttığı belirlenmiş ve oluşan spektranın Triton X-100 eklenmesi ile oluşanlara çok yakın olduğu gözlenmiştir. Hücrelerin eklenmesi bu probun spektrasında değişime yol açmakta; 575 nm’de artış olmakta 500 nm piki ise değişmemektedir.

Sonuç olarak, biyolojik deneyler sonucunda, MFN8’in floresans şiddetinde (intensity), hücre varlığında artma gözlenmiştir. Bunun nedeni, problemlerin su içinde aggrege olmaları ve çözünmemeleri nedeni ile floresans göstermemeleridir. Hücrelerin varlığında ise, problemler hücre duvarlarına tutunmakta ve floresans kuantum verimleri artmaktadır. Bu probun önemli bir avantajı da, hücre duvarına tutunduğunda, iki emisyon bandında yüksek ayırım göstermesidir (80 nm’ye kadar). Bu, hücre çeşidinin tanımlanmasında önemli avantaj sağlayabilir. Normal bandın (1. band) tautomer banda (2. band) göre daha az şiddet gösterdiği gözlenmiştir. Geliştirilen problemlerden biyolojik deneyleri yapılan MFN8’in, hücrelerin belirlenmesi ve nicel ölçüm yapılmasına olanak sağlayabileceği belirlenmiştir. Diğer yandan, tam çözünmemeyen bir problem, Pluronic F-127 ve Triton X-100 gibi deterjanların, yaklaşık 0.01 % konsantrasyonlarda ortamda bulunmalarının, floresans artışına neden olmasıdır. Bunun nedeni, deterjanın problemlere, hücrelerde olduğu gibi, çözünürlük sağlayarak floresans göstermelerini sağlamasıdır. Dolayısı ile, yüksek miktarlarda deterjan kullanıldığında, biyolojik kirlenmenin belirlenmesinde problemlerin kullanılması mümkün olmamaktadır. Diğer yandan, emisyon band oranları, hücre içinde, deterjanlara göre oldukça fark göstermektedir. Bu, deterjan varlığı ile oluşan istenmeyen yan etkiyi kısmi olarak çözecek niteliktedir. Karşılaşılan diğer bir problem, problemlerin hücre içine yavaş girmeleridir, (yaklaşık 10 dak.) Bu, problemlerin düşük polariteye sahip olmaları nedeniyle suda “aggregate” olmaları ve hücre içine yavaş girmeleri şeklinde açıklanabilir.

4.4 Sonuç

Sonuç olarak, bu çalışmada, 3-hidroksiflavon’un yağsı özelliğini artırmak üzere, elektron verici grup olarak benzaldehitin para pozisyonuna dioktil amino grupları takılmıştır. Nonpolar özelliği artan sensörün, biyolojik sistemlerle daha iyi iletişime girmesi, biyolojik kirliliği belirleme özelliklerinin geliştirilmesi, seçici olarak hücrelere duyarlılığının artırılması ve hücre hakkında daha fazla bilgi edinilmesi

planlanmıştır. Bu amaçla, sentezlenen FN8, OFN8 ve MFN8 problemleri ile ilgili, biyolojik çalışmalar ve floresans özelliklerinin belirlenmesi ile ilgili çalışmalar grubumuzca sürdürülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] **Guliyev, V.B. ve Harmandar, M.**, 1999. Flavonoidler, Bakanlar Matbaacılık, İstanbul.
- [2] **Swain, T.**, 1975. The Flavonoids, Chapman and Hall. London.
- [3] **Harborne, J. B. ve Mabry, T. J.**, 1982. The Flavonoids: Advances in Research, Chapman and Hall, London.
- [4] **Smith, D. A. ve Banks, S. W.**, 1986, Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationship, pp.113-124, Chapman and Hall. London.
- [5] **Zaat, S. A. J., Vanbrussel A. A. N., Tak T., Pees E., Lugtenberg B. J. J. ,** 1987. Flavonoids Induce Rhizobium-Leguminosarum to Produce NodABC Gene-Related Factors That Cause Thick, Short Roots And Root Hair Responses On Common Vetch, *Journal Of Bacteriology*, **169**, 3388-3391.
- [6] **Zaat S. A. J., Wijffelman, C. A., Spalink, H. P., et al.** 1987. Induction of the NodA Promoter of Rhizobium-Leguminosarum Sym Plasmid PRL1JI by Plant Flavanones and Flavones, *Journal of Bacteriology*, **169**, 198-204.
- [7] **Moroney, M.A., Alcaraz, M.J., Forder, R.A., et al.**, 1988. Selectivity of Neutrophil 5-Lipoxygenase And Cyclo-Oxygenase Inhibition by an Anti-Inflammatory Flavonoid Glycoside and Related Aglycone Flavonoids, *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 40 787-792
- [8] **Pratt, D. E. ve Hudson, B. J. F.**, 1990. Food Antioxidants, Elsevier, London.
- [9] **Deschner, E.E., Ruperto J., Wong G., et al.**, 1991. Quercetin and Rutin as Inhibitors of Azoxymethanol-Induced Colonic Neoplasia, *Carcinogenesis*, **12** ,1193-1196.
- [10] **Verma, A.K., Johnson, J.A., Gould, M.N., et al.**, 1988. Inhibition of 7,12-Dimethylbenz(A)Anthracene-Induced and N-Nitrosomethylurea-Induced Rat Mammary-Cancer by Dietary Flavonol Quercetin, *Cancer Research*, **48**, 5754-5758.

- [11] **Bohm, B. A.**, 1992. The Flavonoids : Advances in Research, Harborne J. B. Chapman and Hall, London.
- [12] **Dhar, D. N.**, 1981. The Chemistry of Chalcone and Related Compounds, Wiley-Interscience, New York.
- [13] **Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., Cross, C.E.**, 1992. Free-Radicals, Antioxidants, And Human-Disease - Where Are We Now, *Journal Of Laboratory And Clinical Medicine*, **119**, 598-620.
- [14] **Yen GC, Chen HY.**, 1995. Antioxidant Activity Of Various Tea Extracts In Relation To Their Antimutagenicity, *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*, **43**, 27-32.
- [15] **Selway, J. W. T.**, 1986. Flavonoids In Biology And Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-Activity Relationships, Alan R. Liss., New York.
- [16] **Ioku K, Tsushida T, Takei Y, et al.**, 1995. Antioxidative Activity Of Quercetin And Quercetin Monoglucosides In Solution And Phospholipid-Bilayers, *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes*, **1234**, 99-104.
- [17] **Yagi A, Uemura T, Okamura N, et al.**, 1994. Antioxidative Sulfated Flavonoids In Leaves Of Polygonum-Hydropiper, *Phytochemistry*, **35**, 885-887.
- [18] **Shi ZL, Min L, Francis FJ.**, 1992. Anthocyanins Of Tradescantia-Pallida Potential Food Colorants, *Journal Of Food Science*, **57**, 761-765.
- [19] **Cody, V., Middleton, E. and Harborne, J. B.**, 1986. Plant Flavonoids in Biology and Medicine: Biochemical, Pharmacological and Structure-activity Relationship, Alan, R., Liss, New York.
- [20] **Klymchenko, A., Öztürk, T., Demchenko, A.**, 2003. Synthesis of furanochromones: a new step in improvement of fluorescence properties, *Tetrahedron Letters*, **43**, 7079-7082.
- [21] **Rendell, D.**, 1987. Fluorescence and Phosphorescence, Published on behalf of ACOL, Thames Polytechnic, London.
- [22] **Lakowicz, I.R.**, 1986. Principles of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, New York and London.
- [23] **Skoog, D.A., West, M.D.**, 1980. Principles of Instrumental Analysis, 2nd. Ed., Saunders College, Philadelphia.

- [24] **Bauer, H.H., Christian, G.D., O'Reilly, J.E., Scheiik, Ed. G.II,** 1978. Instrumental Analysis, Allyn and Bacon, Inc. Boston.
- [25] **Ewing, G.W.,** 1985. Instrumental Methods of Chemical Analysis, 5 nd. Ed., Mc Graw-Hill Book Comp., New York.
- [26] **R. Haugland.** 1996. Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals. 6th Edition, Molecular Probes, Eugene, Oregon.
- [27] **Demchenko, A.P.,** 1994, New generation of Fluorescent probes exhibiting charge transfer reactions, *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.*, **2137**, 588-599.
- [28] **Volovik, Z.N., Demchenko, A.P., Skursky S.I.,** 1994. Solvent Dependant photophysics of nonsymmetric polymethine dyes as fluorescence probes: Dual emission and inhomogeneous broadening, *Proc. SPIE-Int. Soc. Opt. Eng.*, **2137**, 600-607.
- [29] **Valeur, B.,** 1994. Principles of Fluorescent Probes Design for Ipn Recognition. Topics in Fluorescent Spectroscopy, v.4.
- [30] **Loew, L.M.,** 1982. Design and characterization of electrochromic membrane probes. *J. Biochem. Biophys. Methods*, **6**, 243-260
- [31] **Klymchenko, A.S., Öztürk T., Pivovarenko, V.G., Demchenko, A.P.,** 1999. Design of Fluorescent Probes Sensitive to Membrane Potential Based on Intramolecular Excited State Proton Transfer. *3rd Fluorescence Conference*, Prague, June 20-23.
- [32] **Duportail, G., Klymchenko, A., Mely, Y., et al.,** 2001. Neutral fluorescence probe with strong ratiometric response to surface charge of phospholipid membranes, *FEBS Letters*, **508**, 196-200.
- [33] **Ercelen, S., Klymchenko, A. S., Demchenko, A.P.,** 2002. Ultrasensitive fluorescent probe for the hydrophobic range of solvent polarities, *Analytica Chimica Acta*, **464**, 273-287 .
- [34] **Klymchenko, A. S, Pivovarenko, V. G, Demchenko, A.P.,** 2003. Elimination of the hydrogen bonding effect on the solvatochromism of 3-ydroxyflavones, *Journal of Physical Chemistry*, **107**, 4211-4216.
- [35] **Ercelen, S., Klymchenko, A.S, Demchenko, A.P.,** 2003. Novel two-color fluorescence probe with extreme specificity to bovine serum albumin, *FEBS Letters*, **538**, 1-3.

- [36] **Demchenko A.P., Klymchenko A.S., Ercelen S.**, 2002. Fluorescent probes with dramatic change of emission color, *Biophysical Journal*, **82**, 2074.
- [37] **Klymchenko, A.S., Duportail, G, Öztürk,T, et al.**, 2002. Novel two-band ratiometric fluorescence probes with different location and orientation in phospholipid membranes, *Chemistry & Biology*, **9**, 1199-1208.
- [38] **Klymchenko, A.S, Demchenko, A.P.**, 2002. Electrochromic modulation of excited-state intramolecular proton transfer: The new principle in design of fluorescence sensors, *Journal Of The American Chemical Society*, **124**, 12372-12379.
- [39] **Klymchenko, A.S., Demchenko, A.P.**, 2003. Multiparametric probing of intermolecular interactions with fluorescent dye exhibiting excited state intramolecular proton transfer, *Physical Chemistry Chemical Physics*, **5**, 461-468.
- [40] **Klymchenko, A.S., Öztürk, T., Pivovarenko, V.G., Me1y,Y. ve Demchenko, AP.**, 2001, A 3-hydroxychromone with dramatically improved fluorescence properties, *Tetrahedron Letters*, **42**, 7967-7970.
- [41] **Topçu, G., Eris. C., Kurucu, S. and Ulubelen, A.**, 1996. A new flavanone from Teucrium alyssifolium, *Tr. J of Chemistry*, **20**, 265-267.
- [42] **Klymchenko AS, Ozturk T, Pivovarenko VG, et al.**, 2001. Synthesis and spectroscopic properties of benzo- and naphthofuryl-3-hydroxychromones, *Canadian Journal Of Chemistry-Revue Canadienne De Chimie*, **79**, 358-363.
- [43] **Das, N.P.**, 1989. Flavonoids in Biology and Medicine III, National University of Singapore, Singapore.

ÖZGEÇMİŞ

23 Mart 1982 tarihinde Ankara’da doğdum. 1992-1999 yılları arasında, Bandırma Kültür Eğitim Vakfı Özel Lisesi’nde ortaöğrenim ve liseye devam ettim. 1999 yılında İstanbul Teknik Üniversitesi, Kimya Bölümü’nü kazanarak, Kimyagerlik lisans programından 2003 yılında mezun oldum. Aynı yıl İ.T.Ü Kimya Bölümü’nde yüksek lisans çalışmalarına başladım.