

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

**KANSER İLAÇLARININ PROTEİNLER VE MEMBRANLARLA  
ETKİLEŞMELERİNİN NMR YOLUYLA İNCELENMESİ**

**Sibel KORUNUR**

**FİZİK ANABİLİM DALI**

**DOKTORA TEZİ**

**DIYARBAKIR**

**Eylül 2012**

T.C. DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ  
DİYARBAKIR

Sibel KORUNUR tarafından yapılan “Kanser İlaçlarının Proteinler ve Membranlarla Etkileşmelerinin NMR Yoluyla İncelenmesi” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından FİZİK Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri

Başkan : Prof. Dr. Ali YILMAZ  
Üye : Prof. Dr. Zülküf GÜLSÜN  
Üye : Prof. Dr. Belma TURAN  
Üye : Doç. Dr. Muzaffer AŞKIN  
Üye : Yrd. Doç. Dr. Gülten KAVAK

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 28/09/2012

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

...../...../2012

Prof. Dr. Hamdi TEMEL

Enstitü Müdürü

## TEŐEKKÖR

Doktora eğitimim süresince desteğini esirgemeyen danıőmanım ve saygıdeğer hocam sayın Prof. Dr. Ali YILMAZ'a, tez çalışmasında kullanılan membrane örneklerinin temin edilmesi ve hazırlanması konusunda yardımlarından dolayı Ankara Üniversitesi Tıp Fakóltesi Biyofizik Anabilimdalı öğretim üyesi sayın Prof. Dr. Belma TURAN ve asistanı Esmenur ZEYDANLI' ya, her türlü destek ve yardımlarından dolayı aileme, Bilgin ZENGİN'e ve sevgili eőim Murat KORUNUR'a çok teşekkür ederim.

Bu tez alıőması Dicle Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüđü (DÜBAP) tarafından 08-FF-10 nolu proje ile desteklenmiőtir.

## İÇİNDEKİLER

	<b>Sayfa</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	I
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	II
<b>ÖZET</b> .....	IV
<b>ABSTRACT</b> .....	V
<b>ÇİZELGE LİSTESİ</b> .....	VI
<b>ŞEKİL LİSTESİ</b> .....	VII
<b>KISALTMA VE SİMGELER</b> .....	XI
<b>1. GİRİŞ</b> .....	1
1.1. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Hakkında Bilgi .....	2
1.1.1 Rezonans Olayı ve Rezonans Koşulu .....	8
1.1.2 Enerji Seviyelerinin Dağılımı .....	12
1.1.3 Durulma Olayı (Durulma) .....	14
1.1.4 NMR Spektroskopisinin Çalışma Prensibi .....	16
1.1.4.1 Pulsu Spektrometreler (FT-NMR) .....	18
1.1.5. Kimyasal Kayma .....	18
1.1.5.1. Atom Çekirdeği Çevresinde Oluşan Lokal Manyetik Alanlar .....	18
1.1.5.2. Pik Yerlerinin Belirlenmesi: NMR Spektrumlarında Skala .....	22
1.1.6. NMR Ölçümü İçin Numunelerin Hazırlanması .....	24
1.1.7. Kimyasal Kaymayı Etkileyen Faktörler .....	26
1.1.8. Spin-Spin Etkileşmesi .....	27

1.1.8.1.	Spin-Spin Etkileşmesini Etkileyen Faktörler.....	29
1.1.9.	Absorpsiyon ve Rezonans.....	30
1.1.9.1.	Absorpsiyon ve Rezonans Olayının Klasik Olarak İncelenmesi .....	30
1.1.10.	Spin Sistemlerinde Durulma (Durulma).....	37
1.1.11.	Durulma Mekanizmaları .....	40
1.1.12.	Durulma (Durulma) Zamanlarının Ölçülmesi .....	46
1.1.12.1	Spin-Örgü Durulma Zamanı $T_1$ ' in Ölçümü: Inversion-Recovery Yöntemi.....	46
1.1.13.	Hücre Membranı .....	54
<b>2.</b>	<b>KAYNAK ÖZETLERİ .....</b>	<b>57</b>
<b>3.</b>	<b>MATERYAL ve METOT .....</b>	<b>63</b>
3.1.	Örneklerin Hazırlanması.....	67
3.2.	Spin-Örgü Durulma Zamanlarının ( $T_1$ ) Ölçülmesi.....	69
3.3.	Spin-Spin Durulma Zamanlarının ( $T_2$ ) Ölçülmesi.....	69
<b>4.</b>	<b>BULGULAR ve TARTIŞMA .....</b>	<b>71</b>
<b>5.</b>	<b>SONUÇ ve ÖNERİLER .....</b>	<b>117</b>
<b>6.</b>	<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>123</b>

## ÖZET

### KANSER İLAÇLARININ PROTEİNLER VE MEMBRANLARLA ETKİLEŞMELERİNİN NMR YOLUYLA İNCELENMESİ

DOKTORA TEZİ

Sibel KORUNUR

DİCLE ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
FİZİK ANABİLİM DALI

2012

Bir ilacın soğurulması, dağıtımı, metabolizması ve vücuttan atılmasıyla ilgili bilgilere ulaşma; o ilacın tedavideki başarı etkinliğini anlamak için çok önemlidir. İlaçların dağıtımını etkileyen en önemli faktör, o ilacın insan kan serumundaki albüminine bağlanma çekiciliğidir. İnsan serumunun en bol proteini albümindir. Birçok ligand bağlama yeteneği olan albümin, çeşitli ilaçları da kendisine bağlamaktadır. İlacın hedef organa ulaşabilmesi ve etkili bir tedavi sağlanması için, ilaç ile albümin arasındaki etkileşme optimum olmalıdır.

Bu tez çalışmasında, D<sub>2</sub>O ortamında çözülmüş üç farklı ilaç etken maddesine (5-Fluorouracil (5-FU), Cytosine  $\beta$ -D Arabinofuranoside (Ara-C), Cyclophosphamide-Monohydrate (CM)) farklı konsantrasyonlarda insan serum albümini eklenerek elde edilen örnekler 400 MHz NMR spektroskopisi ile incelenmiştir. Bu incelemelerde spektrumlar (pikler), kimyasal kaymalar ve piklerin durulma zamanlarına (T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub>) ait veriler kullanılmıştır. Bu verilerden elde edilen sonuçlarla protein-ilac etkileşmelerinin moleküler dinamiği üzerine bilgi edinilmiştir. Bu tez çalışmasında ayrıca; ilaç etken maddeleriyle iki tip membrane (normal ve diyabetli) etkileştirilmiş ve bu etkileşme sonrası artan ilaç konsantrasyonlarında membrane piklerinin şiddeti ve kimyasal kayma değerleri incelenmiştir.

**Anahtar Kelimeler:** NMR Spektroskopisi, ilaç-albumin etkileşmesi, T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanı, insan serum albümin, membrane, kimyasal kayma

## ABSTRACT

### INTERACTIONS OF CANCER DRUGS WITH HUMAN SERUM ALBUMIN and MEMBRANES STUDYING BY NMR SPECTROSCOPY

PhD THESIS

Sibel KORUNUR

DEPARTMENT OF PHYSICS  
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES  
UNIVERSITY OF DICLE

2012

The information on absorption, distribution, metabolism of drugs and also knowledge on the lifetime of drug in organs, are very important for the efficiency of a successful treatment. The most important factor for drugs injected to veins, is the binding affinity to human serum albumin. Human serum albumin (HSA) is the most abundant serum protein. The albumin has a binding capacity for many ligands, and it can bind drugs injected to vein. If the drugs bound to albumin are not dissociated, they may not reach to target tissue effectively. This knowledge implies that, the interaction between drug and albumin should be optimum for an effective treatment.

In this study, for three different drugs (5-Fluorouracil (5-FU), Cytosine  $\beta$ -D Arabinofuranoside (Ara-C), Cyclophosphamide-Monohydrate (CM)), drug-albumin interactions were investigated versus increasing drug and albumin concentration by 400 MHz NMR spectrometer. In this work, spectrums (peaks), chemical shifts and data related to relaxation times of peaks were used. The results obtained from these data gave us useful information about molecular dynamics of drug-albumin interactions. In this study, also, for three different drugs, drug-membrane interactions were investigated for two different membranes (normal and diabetic) versus increasing drug concentration and signal intensities and chemical shift values of membrane peaks were used.

**Keywords:** NMR Spectroscopy, drug-albumin interaction, T1 and T2 relaxation times, human serum albumin, membrane, chemical shift

## ÇİZELGE LİSTESİ

<u>Çizelge No</u>		<u>Sayfa</u>
<b>Çizelge 1.1.</b>	Bazı elementlerin jromanyetik sabitleri ve spin kuantum sayıları.....	4
<b>Çizelge 4.1.</b>	1 ml D <sub>2</sub> O içerisinde 0.05M sabit konsantrasyondaki FU etken maddesine ayrı ayrı 0g, 0.01g, 0.02g, 0.03g, 0.04g ve 0.05g albümin eklenerek elde edilen 6 farklı örneğin 25 °C (298K) sabit sıcaklıkta <sup>1</sup> H-NMR spektrumunda gözlenen her pikin 1/T <sub>1</sub> ve 1/T <sub>2</sub> durulma oranları .....	73
<b>Çizelge 4.2.</b>	1ml D <sub>2</sub> O içerisinde 0.05M sabit konsantrasyondaki FU etken maddesine 0.05g albümin eklenerek elde edilen örneğin farklı sıcaklık değerlerinde <sup>1</sup> H-NMR spektrumunda gözlenen her pikin 1/T <sub>1</sub> ve 1/T <sub>2</sub> durulma oranları.....	77
<b>Çizelge 4.3.</b>	1 ml D <sub>2</sub> O içerisinde 0.05M sabit konsantrasyondaki ARA-C etken maddesine ayrı ayrı 0g, 0.01g, 0.02g, 0.03g, 0.04g ve 0.05g albümin eklenerek elde edilen 6 farklı örneğin 25 °C (298K) sabit sıcaklıkta <sup>1</sup> H-NMR spektrumunda gözlenen her pikin 1/T <sub>1</sub> ve 1/T <sub>2</sub> durulma oranları .....	81
<b>Çizelge 4.4.</b>	0.05g sabit konsantrasyonda albümin varlığında 1ml D <sub>2</sub> O içerisine beş farklı konsantrasyonda ARA-C etken maddelerinin eklenmesiyle oluşturulan örneklerin <sup>1</sup> H-NMR spektrumunda gözlenen her pikin 25 <sup>0</sup> C (298K) sabit sıcaklıkta ölçülen 1/T <sub>1</sub> ve 1/T <sub>2</sub> durulma oranları .....	84
<b>Çizelge 4.5.</b>	1 ml D <sub>2</sub> O içerisinde 0.05M sabit konsantrasyondaki CM etken maddesine ayrı ayrı 0g, 0.01g, 0.02g, 0.03g, 0.04g ve 0.05g albümin eklenerek elde edilen 6 farklı örneğin 25 °C (298K) sabit sıcaklıkta <sup>1</sup> H-NMR spektrumunda gözlenen her pikin 1/T <sub>1</sub> ve 1/T <sub>2</sub> durulma oranları .....	89



## ŞEKİL LİSTESİ

<u>Şekil No</u>		<u>Sayfa</u>
Şekil 1.1.	Atom çekirdeğinin hareketinin şematik olarak gösterilmesi.....	3
Şekil 1.2.	Protonun manyetik alanda yönelmesi ve farklı enerji seviyelerinin gösterilişi .....	7
Şekil 1.3.	a) Proton spinlerinin manyetik alanın olmadığı bir durumda davranışı b) Proton spinlerinin homojen bir dış manyetik alanda davranışı .....	7
Şekil 1.4.	Döteryum çekirdeğinin manyetik alanda enerji seviyeleri .....	8
Şekil 1.5.	Bir atomun enerji salması ya da soğurması .....	9
Şekil 1.6.	Protonun, şiddeti farklı olan iki manyetik alanda oluşturduğu enerji seviyeleri .....	10
Şekil 1.7.	Rezonans ve durulma olaylarının şematik olarak gösterilişi .....	14
Şekil 1.8.	Durulma zamanının a) uzun b) kısa olduğu zaman piklerin görünümü.....	15
Şekil 1.9.	Süper iletken mıknatıslı FT-NMR spektrometresinin şeması .....	17
Şekil 1.10.	Dış manyetik alanın etkisi ile elektronların oluşturduğu sekonder manyetik alan.....	19
Şekil 1.11.	Tetrametilsilan sinyali ve organik bileşiklerin rezonans bölgesi.....	22
Şekil 1.12.	NMR tüpünün görünümü .....	24
Şekil 1.13.	H <sub>2</sub> molekülünde spin-spin etkileşmesinin şematik olarak gösterilişi .....	28
Şekil 1.14.	Metilen protonları arasında oluşan geminal etkileşmenin şematik olarak gösterilişi .....	28
Şekil 1.15.	Visinal etkileşen iki protonun çekirdek ve elektron spinlerinin şematik olarak gösterilişi .....	29
Şekil 1.16.	a) Manyetik alan ile paralel yönelmiş bir çekirdeğin presesyon hareketi, b) Manyetik alan ile anti paralel yönelmiş bir çekirdeğin presesyon hareketi.....	31
Şekil 1.17.	Makroskopik bir numunede paralel ve anti paralel yönelen çekirdeklerin presesyon hareketlerinin toplu bir şekilde görünümü .....	31

<b>Şekil 1.18.</b>	Manyetik momentin z ekseninde ve xy düzleminde olan bileşenleri.....	32
<b>Şekil 1.19.</b>	Makroskopik bir numunede boyuna (longitudinal) mıknatıslanma $M_0$ .....	33
<b>Şekil 1.20.</b>	Makroskopik bir numunede boyuna mıknatıslanmanın RF alanı etkisi ile y yönüne çevrilmesi .....	34
<b>Şekil 1.21.</b>	a) Normal sabit koordinatlara (Laboratuvar Koordinatları) göre dönen sistemin hareketi, b) Trossey tarafından geliştirilen döner koordinatlara göre Laboratuvar sisteminin hareketi.....	35
<b>Şekil 1.22.</b>	Mıknatıslanma vektörünün a) sabit koordinatlarda b) döner koordinatlarda hareketi.....	35
<b>Şekil 1.23.</b>	a) Makroskopik mıknatıslanma $M_0$ ile RF alanının etkileşmesi b) Mıknatıslanma $M_0$ 'ın y' eksenine çevrilmesi (Rezonans Olayı).....	36
<b>Şekil 1.24.</b>	Mıknatıslanmanın RF alanı ile etkileşmesi sonucu, y' eksenine doğru çevrilmesi ve y' yönünde bir mıknatıslanmanın oluşumu .....	37
<b>Şekil 1.25.</b>	a) Enine mıknatıslanma, b) Manyetik momentlerin sabit koordinat sisteminde dağılımı, c) Manyetik momentlerin döner koordinat sisteminde dağılımı .....	38
<b>Şekil 1.26.</b>	Makroskopik bir numunede 180° ve 90° lik pulsların şematik olarak gösterilmesi.....	47
<b>Şekil 1.27.</b>	$\pi$ pulsunun hazırlık ve gelişme safhalarının şematik olarak gösterilmesi.....	48
<b>Şekil 1.28.</b>	180 derece pulsunun uygulandığı a) spin gözlüğünden görünmesi, b) Döner sistemden görünüşü .....	48
<b>Şekil 1.29.</b>	Gelişme devresinde numune üzerine gönderilen 90° lik bir pulsun mıknatıslanmayı y veya -y doğrultusuna çevirmesi .....	49
<b>Şekil 1.30.</b>	Kloroform molekülünde protonun Inversion Recovery (IR) yöntemiyle boyuna durulma süresinin ölçülmesi .....	50
<b>Şekil 1.31.</b>	Asetilsikloheptatrien bileşiğinde protonların inversiyon-recovery (IR) yöntemiyle belirli sürelerde kaydedilen <sup>1</sup> H-NMR spektrumları .....	52
<b>Şekil 1.32.</b>	Enine mıknatıslanmanın xy düzleminde zamanla azalması .....	53
<b>Şekil 1.33.</b>	a) Hücre membranının üç tabakalı yapısını gösterir elektron mikro fotoğrafı, b) Singer-Nicolson'un hücre membranı için önerdikleri akıcı-mozaik model .....	54
<b>Şekil 2.1.</b>	Hedef proteinle etkileşime giren bir ligandın NMR parametrelerinin sonuçları .....	60
<b>Şekil 3.1.</b>	FU maddesinin 2 boyutlu ve 3 boyutlu kimyasal formülü .....	64

<b>Şekil 3.2.</b>	Ara-C maddesinin 2 boyutlu ve 3 boyutlu kimyasal formülü .....	65
<b>Şekil 3.3.</b>	CM maddesinin 2 boyutlu ve 3 boyutlu kimyasal formülü .....	66
<b>Şekil 4.1.</b>	FU örneğinin <sup>1</sup> H-NMR Spektrumu a) Tek puls b) Presaturasyon.....	72
<b>Şekil 4.2.</b>	0,007g FU+ 0,01g alb örneğinde HDO sinyalinin T <sub>1</sub> Profili .....	74
<b>Şekil 4.3.</b>	0,007g FU+ 0,01g alb örneğinde HDO sinyalinin T <sub>2</sub> Profili .....	74
<b>Şekil 4.4.</b>	FU etken maddesinde gözlenen piklerinin, 6 farklı albümin konsantrasyonuna karşı Durulma oranlarını veren grafik .....	76
<b>Şekil 4.5.</b>	FU etken maddesinde gözlenen piklerinin, 5 farklı sıcaklık değerine karşı Durulma oranlarını veren grafik .....	78
<b>Şekil 4.6.</b>	ARA-C örneğinin <sup>1</sup> H-NMR Spektrumu a) Tek Puls b) Presaturasyon .....	80
<b>Şekil 4.7.</b>	ARA-C etken maddesinde gözlenen piklerinin, 6 farklı albümin konsantrasyonuna karşı Durulma oranlarını veren grafik .....	82
<b>Şekil 4.8.</b>	0.05g albümin varlığında 1ml D <sub>2</sub> O içerisinde 5 farklı ARA-C konsantrasyonunun Durulma oranlarını veren grafik .....	85
<b>Şekil 4.9.</b>	CM örneğinin <sup>1</sup> H-NMR Spektrumu a) Tek Puls b) Presaturasyon .....	87
<b>Şekil 4.10.</b>	1ml D <sub>2</sub> O içerisinde 0.05M konsantrasyondaki CM etken maddesinde gözlenen piklerin, 6 farklı albümin konsantrasyonuna karşı Durulma oranlarını veren grafik .....	90
<b>Şekil 4.11.</b>	Buffer çözeltisi+D <sub>2</sub> O karışımı ile Membrane+ D <sub>2</sub> O karışımının NMR spektrumu (tek puls).....	91
<b>Şekil 4.12.</b>	Buffer çözeltisi ile Membrane+ D <sub>2</sub> O karışımının NMR spektrumu (presaturasyon).....	92
<b>Şekil 4.13.</b>	Normal Membrane ile FU etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (Tek puls) a) 0g FU (Co), b) 0.003g FU (C1), c) 0.007g FU (C2).....	93
<b>Şekil 4.14.</b>	Normal Membrane ile FU etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (presaturasyon) a) 0g FU (Co), b) 0.003g FU (C1), c) 0.007g FU (C2).....	95
<b>Şekil 4.15.</b>	Normal Membrane ile ARA-C etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (Tek puls) a) 0g ARA-C (Co), b) 0.012g ARA- C (C1), c) 0.024g ARA-C (C2), d) 0.036g ARA-C (C3).....	97
<b>Şekil 4.16.</b>	Normal Membrane ile ARA-C etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (presaturasyon) a)	

	0g ARA-C (Co), b) 0.012g ARA-C (C1), c) 0.024g ARA-C (C2), d) 0.036g ARA-C (C3).....	99
<b>Şekil 4.17.</b>	Normal Membrane ile CM etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (Tek puls) a) 0g CM(Co), b) 0.010g CM (C1), c) 0.020g CM (C2), d) 0.030g CM (C3).....	101
<b>Şekil 4.18.</b>	Normal Membrane ile CM etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (presaturasyon) a) 0g CM (Co), b) 0.010g CM (C1), c) 0.020g CM (C2), d) 0.030g CM (C3).....	103
<b>Şekil 4.19.</b>	a) 40µl normal membrane+960µl D <sub>2</sub> O b) 40µl diyabetli membrane+960µl D <sub>2</sub> O örneklerinin 400MHz <sup>1</sup> H-NMR spektrumu (Tek puls).....	104
<b>Şekil 4.20.</b>	a) 40µl normal membrane+960µl D <sub>2</sub> O b) 40µl diyabetli membrane+960µl D <sub>2</sub> O örneklerinin 400MHz <sup>1</sup> H-NMR spektrumu (presaturasyon).....	105
<b>Şekil 4.21.</b>	Diyabetik Membrane ile FU etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (Tek puls) a) 0 g FU (Co), b) 0.003g FU (C1), c) 0.007g FU (C2).....	106
<b>Şekil 4.22.</b>	Diyabetik Membrane ile FU etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (presaturasyon) a) 0g FU (Co), b) 0.003g FU (C1), c) 0.007g FU (C2).....	108
<b>Şekil 4.23.</b>	Diyabetik Membrane ile ARA-C etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (Tek puls) a) 0g ARA-C (Co), b) 0.012g ARA- C (C1), c) 0.024g ARA-C (C2), d) 0.036g ARA-C (C3).....	110
<b>Şekil 4.24.</b>	Diyabetik Membrane ile ARA-C etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (presaturasyon) a) 0g ARA-C (Co), b) 0.012g ARA- C (C1), c) 0.024g ARA-C (C2), d) 0.036g ARA-C (C3).....	112
<b>Şekil 4.25.</b>	Diyabetik Membrane ile CM etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (tek puls) a) 0g CM (Co), b) 0.010g CM (C1), c) 0.020g CM (C2), d) 0.030g CM (C3).....	114
<b>Şekil 4.26.</b>	Diyabetik Membrane ile CM etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (presaturasyon) a) 0g CM (Co), b) 0.010g CM (C1), c) 0.020g CM (C2), d) 0.030g CM (C3).....	116

## KISALTMA ve SİMGELER

FU	: Fluorouracil
Ara-C	: Cytosine $\beta$ -D Arabinofuranoside
CM	: Cyclophosphamide-Monohydrate
HSA	: Human Serum Albumin (İnsan serum albümin)
NMR	: Nükleer Manyetik Rezonans
RF	: Radyofrekans
SİB	: Serbest İndüksiyon Bozunması
PR	: Pulse Repetition
IR	: Inversion Recovery
RD	: Radyasyon Damping
$T_1$	: Spin-Örgü durulma zamanı
$T_2$	: Spin-Spin durulma zamanı
$\mu$	: Manyetik moment
$\gamma$	: Jiromanyetik oran
$\ell$	: Yörünge açısal momentum
S	: Spin açısal momentum
g	: Spektroskopik yarıлма çarpanı
$\mu_B$	: Bohr magnetonu
$H_0$	: Dış manyetik alan
$\nu_0$	: Rezonans frekansı
$L_0$	: Öz indüksiyon katsayısı
$\tau$	: İlgı zamanı

## 1.GİRİŞ

Manyetik rezonans adından da anlaşılabilceği üzere manyetik titreşim anlamına gelir. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR)' ın ilk olarak tanımlanması 1946 senesinde Purcell ve Bloch tarafından gerçekleştirilmiştir ve bu çalışmalarından ötürü 1952 senesinde Nobel ödülüne layık görülmüşlerdir. Bu çalışmaların yayımlanmasının hemen akabinde NMR kimyasal yapıların analizi çalışmalarında çok önemli bir yer edinmiştir. 1973 'te Lauterbur ve Mansfield fiziksel yapıların analiz edilmesinde NMR tekniğini kullanmışlardır. Bu çalışmaların hız kazanmasının ardından Manyetik Rezonans Görüntüleme (MRI) tekniği de birçok biyomedikal, kimya ve mühendislik uygulamalarında kullanılır hale gelmiştir (Ünal 2008).

1960'lı yıllarda NMR alanındaki bu hızlı gelişmeler sonucunda, manyetik alan şiddeti 1.41 (60MHz), 1.87 (80MHz) 2.20 (90MHz) ve 2.35 (100MHz) Tesla olan mıknatıslardan meydana gelen ilk NMR cihazları, 1970'li yıllardan sonra, ayırım gücü ve hassasiyeti yüksek, sıvı helyum sıcaklığında (4 K) çalışan süper iletken mıknatısların üretilmeye başlanmasıyla yerini 200, 250, 300, 400, 500, 600, 750 ve 800MHz ile çalışan cihazlara bırakmıştır (Balcı 2004).

Literatürde kanser ilaçlarının proteinlerle etkileşimini NMR ile inceleyen pek çok çalışma mevcuttur. Bu tip çalışmalarda daha çok spektrum analizi yapılmıştır. Yani protein piklerinin saptanması yapıldıktan sonra, ilaç eklemenin yeni pikler oluşturup oluşturmadığı olgusu incelenmiştir. Diğer yandan membrane-ilaç etkileşimleri de NMR da yoğunca araştırılan bir konu olmaktadır. Bu tip çalışmalarda da genellikle spektrum incelemesi yapılmaktadır. Ayrıca diyabetik zırların kanser ilaçlarıyla etkileşiminin NMR ile incelenmesi henüz yapılabilmiş değildir.

Bu tez çalışmasının birinci amacı kanser ilaç-albümin etkileşmesini,  $T_1$  ve  $T_2$  durulma zamanları yolu ile incelemek ve bu tür çözeltilerin durulma zamanlarını saptamaktır. Bu amaç için kanser ilaç-albümin etkileşimi, sabit albümin ve artan ilaç konsantrasyonlarında ve ayrıca sabit ilaç artan albümin konsantrasyonlarında

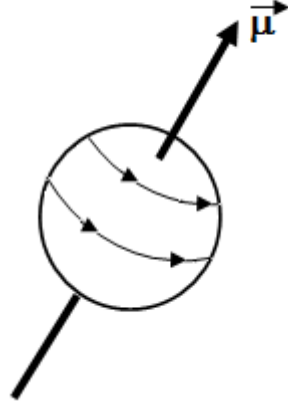
incelenmiştir. Spektrumlardaki değişiklikler saptanmıştır. Sıcaklık çalışması yolu ile durulma mekanizmaları ortaya konmuştur.

Bu tez çalışmasının ikinci amacı, ilaç-normal membrane ve ilaç-diyabetli membrane etkileşimini incelemek ve bu iki etkileşimi karşılaştırmaktır. Bu amaç için, normal ve diyabetli zar içeren ortamlara artan konsantrasyonlarda ilaç eklenmiştir. Her iki gruptan (normal ve diyabetli) elde edilen NMR spektrumları; kimyasal kayma, pik sayısı ve pik şiddeti yönünden incelenmiştir. Elde edilen bulgulara dayanılarak, ilaç-normal membrane ve ilaç-diyabetli membrane etkileşiminin farkları ortaya konmuştur.

### 1.1. Nükleer Manyetik Rezonans (NMR) Hakkında Bilgi

Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi (NMR), numunenin etrafını saran bobinden verilen radyo frekans (RF) enerjisinin absorbe edilmesiyle bazı kimyasal elementlerin ( $H^1$ ,  $C^{13}$ ,  $F^{19}$ ,  $N^{15}$ ,  $P^{31}$ ) nicel olarak gözlemlendiği bir yöntemdir (Rollas ve ark. 2005).

Nükleer Manyetik Rezonans spektroskopisinin temeli, çekirdeğin manyetik özelliğine dayanır. Atom çekirdeği (protonlar ve nötronlar) ve elektronlar, atomu oluşturan yüklü taneciklerdir. Elektronlar kendi eksenleri etrafında dönerler yani bir "spin" hareketi yaparlar. Atom çekirdeklerinin çoğu da spin hareketi yapar. Atom çekirdeği, küre biçiminde ve merkezinden geçen eksen etrafında dönen bir cisim olarak düşünülebilir. Çekirdekte proton ve nötron bulunduğundan, çekirdek pozitif (+) yüklüdür. Çekirdek kendi ekseni etrafında döndüğünden, pozitif yük de bu eksen etrafında bulunan dairesel yörüngelerde hareket edecektir. Bu yükün belli bir yörünge üzerinde hareketi, bir elektrik akımına sebep olur (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Atom çekirdeğinin hareketinin şematik olarak gösterilmesi

Her elektrik akımı, çevresinde manyetik alan oluşturur. Ekseni etrafında dönen bir atom çekirdeği de, yüklü olması nedeniyle, çevresinde bir manyetik alan meydana getirir. Bu nedenle atom çekirdekleri bir mıknatıs gibi davranırlar. Çekirdeğin oluşturduğu manyetik alanın manyetik momenti vardır (Şekil 1.1). Manyetik moment  $\vec{\mu}$  ile gösterilir ve  $\mu$  manyetik momenti bir vektördür.

Klasik fizikten bilindiği üzere, kendi ekseni etrafında dönen bir cisim,  $L$  gibi bir açısal momentuma sahiptir. Atom çekirdeği de ekseni etrafında döndüğünden, çekirdeğin de açısal momentumu vardır. Çekirdeğin ekseni etrafında dönmesi olayına çekirdek spini denir.

Bir çekirdeğin açısal momentumu ile manyetik momenti arasında

$$\vec{\mu} = \gamma \vec{L} \quad (1.1)$$

bağıntısı vardır. Burada  $\mu$  = manyetik moment,  $L$  = açısal momentum ve  $\gamma$  = Jiromanyetik orandır. Jiromanyetik sabiti  $\gamma$ , her element için ayrı değere sahiptir. NMR'da çok sık ölçülen bazı elementlerin jiromanyetik sabitleri ve spin kuantum sayıları Çizelge 1.1 de gösterilmiştir.



Çizelge 1.1: Bazı elementlerin jromanyetik sabitleri ve spin kuantum sayıları

Çekirdek	Jiromanyetik Sabiti ( $10^8 \text{s}^{-1} \text{T}^{-1}$ )	Spin kuantum sayısı (I)	Doğadaki bolluğu (%)
$^1\text{H}$	2,674	1/2	99,98
$^2\text{H}$ (D)	0,410	1	0,01
$^{10}\text{B}$	0,287	3	19,90
$^{11}\text{B}$	0,858	3/2	80,10
$^{13}\text{C}$	0,672	1/2	1,07
$^{14}\text{N}$	0,913	1	99,64
$^{15}\text{N}$	-0,271	1/2	0,36
$^{17}\text{O}$	-3,620	5/2	0,04
$^{19}\text{F}$	2,516	1/2	100,0
$^{31}\text{P}$	1,083	1/2	100,0

Elektronun ve en basit çekirdek yapıtaşları olan proton ve nötronun spin kuantum sayıları I ve spin değerleri 1/2 dir. Atom çekirdeklerinde proton ve nötron sayıları çift sayılı ise, örneğin 4He, 12C, 16O çekirdeklerinde olduğu gibi, bu çekirdeklerin fazlalık spini yoktur (I=0). Eğer çekirdekteki nötron ve proton sayıları tek sayılı ise, yani nötron ve proton sayılarının toplamı çift sayılı ise, çekirdeğin net spini tam sayı olur. Örneğin, 2H, 6Li ve 14N gibi çekirdeklerin net spini I =1' e, 10B çekirdeğinin net spini ise 3' e eşittir. Atom çekirdeğinin proton sayısı veya nötron sayısı tek sayılı ise, spini yarım tam sayılı değerler alır. Buna örnek olarak, spini 1/2 olan 1H,13C, 15N, 19F, 31P, 57Fe, spini 3/2 olan 7Li, 11B, 79Br, 81Br, 35Cl, 37CL, 23Na, 53Cr, 63Cu, 61Ni, spini 5/2 olan 55Mn, 127I ve spini 7/2 olan 59CO çekirdekleri verilebilir. Bir elementin NMR spektroskopisinde gözlenebilmesi için o elementin spin kuantum sayısının I>0 olması gerekir.

Kuantum mekaniğine göre, yüklü bir tanecik spin hareketi yapıyorsa, açısal momentu kuantumlaşmış olup bu açısal momentum belli bir eksen yönünde (2I+1) kadar bileşene sahiptir. Bu bileşenler herhangi bir manyetik alanın yokluğunda aynı enerjili olup, bunların sayısı tam sayılı I değerleri için,

$$I, I-1, \dots, 0, \dots, -(I-1), -I$$

Yarım tam sayılı I değerleri için,

I, I-1,,,,,,,1/2,-1/2,,,,,,, -(I-1), -I

kadardır. Kendi eksenini etrafında dönen yüklü bir parçacık, dönmeden dolayı dairesel bir elektrik alanı oluşturacağından, bundan dolayı meydana gelen akım, bir manyetik alan yaratacaktır. Bu durum, kendi eksenini etrafında dönen yani spin hareketi yapan yüklü bir taneciğin küçük bir mıknatıs gibi davranacağı ve dolayısıyla dıştan uygulanan bir manyetik alandan etkileneceği sonucunu ortaya çıkarır.

Spin kuantum sayısı 1/2 olan bir çekirdek için manyetik alanda,  $(2I+1)$  formülüne göre,  $2(1/2) + 1 = 2$  enerji düzeyi oluşur. Bunlardan daha kararlı yani daha düşük enerjili olanı, spin hareketi yapan çekirdeğin oluşturduğu manyetik alanın dışarıdan uygulanan manyetik alan ile aynı yönde olduğu duruma karşı gelir. Yani dış alanla aynı yönde dönen spinler düşük enerji seviyesine karşılık gelir. Daha az kararlı, yani daha yüksek enerjili olan ise iki manyetik alanın birbirine ters olduğu duruma karşı gelir. İki enerji seviyesi arasındaki fark kadar  $(E_B - E_A)$  bir enerjiyi soğuran çekirdek, spininin dış manyetik alana ters olduğu yüksek enerjili konuma gelir. Manyetik alan içinde tutulan yüklü bir taneciğin oluşturduğu manyetik dipol, bu alan içinde Larmor dönmesi hareketini yapar.

(1.1) denkleminin daha farklı bir ifadesi de

$$\vec{\mu} = \gamma \frac{h \vec{m}}{2 \pi} \quad (1.2)$$

şeklindedir. Bu bağıntıdan görüldüğü üzere, manyetik momentin değeri manyetik kuantum sayısına bağlıdır. Bunun sonucu olarak manyetik momentin kuantalı olduğu yani belirli değerler alacağı yorumu yapılabilir.

Manyetik bir dipol, şiddeti  $H_0$  olan bir manyetik alan içerisine konulduğunda, dipolde belirli bir potansiyel enerjisi meydana gelir. Bu enerji, manyetik alanın şiddetine ve dipol manyetik momentine bağlıdır ve

$$E = \vec{\mu} \cdot \vec{H}_0 \quad (1.3)$$

şeklinde yazılır. (1.2) denklemindeki manyetik moment ifadesi (1.3) denkleminde yerine yazıldığında

$$E = \gamma \frac{h H_0 m}{2 \pi} \quad (1.4)$$

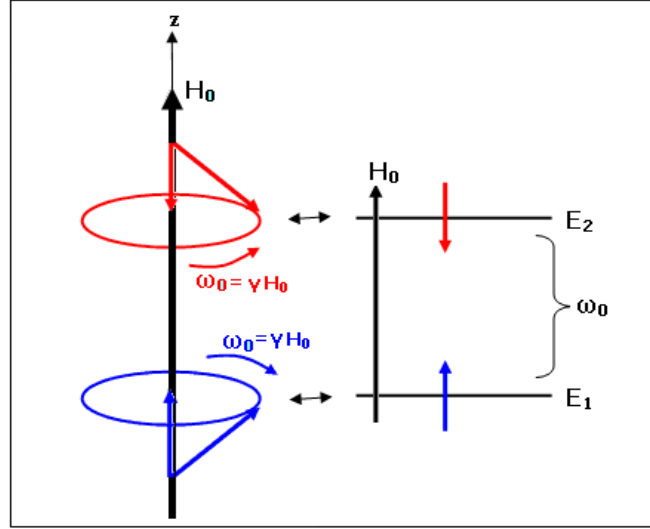
şeklinde bir enerji ifadesi elde edilir. Açısal momentum ve manyetik momentte olduğu gibi, bir dipolun manyetik alan içerisinde alabileceği enerji sayısı kuantalıdır. Başka bir deyişle, manyetik bir dipol manyetik alan içerisine getirildiği zaman, yalnız belirli enerji seviyelerine sahip olabilir. Dipolun sahip olabileceği enerji seviyesi sayısı, manyetik kuantum sayısına, dolayısıyla spin kuantum sayısına bağlıdır.

Protonun spin kuantum sayısı  $I = 1/2$  olduğundan, manyetik kuantum sayıları  $m_1 = +\frac{1}{2}$  ve  $m_1 = -\frac{1}{2}$  dir. Protonun iki farklı manyetik kuantum sayısı olduğundan, (1.4) formülüne göre, protonun manyetik alanda iki farklı enerji seviyesi vardır. Bu enerji seviyeleri, manyetik kuantum sayılarının (1.4) denkleminde yerleştirilmesi ile hesaplanır. Bu enerji seviyeleri

$$E = \gamma \frac{h H_0}{2 \pi} \left( +\frac{1}{2} \right) \quad m = +\frac{1}{2} \text{ için} \quad (1.5)$$

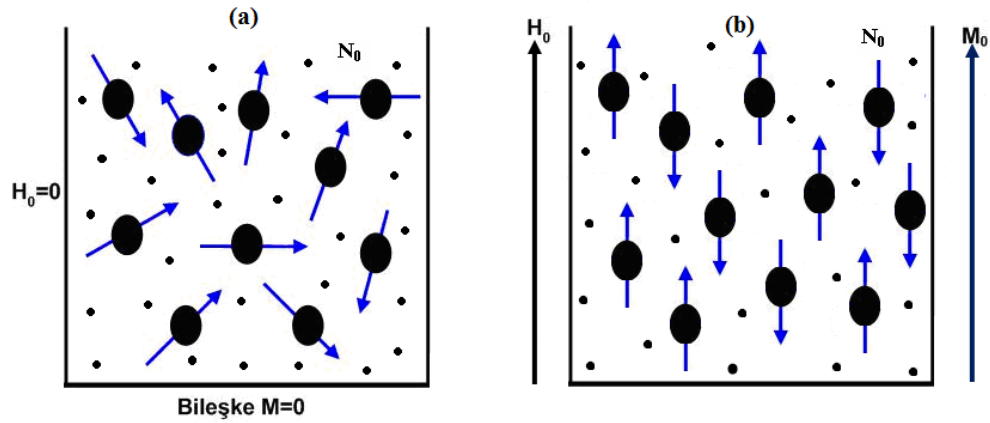
$$E = \gamma \frac{h H_0}{2 \pi} \left( -\frac{1}{2} \right) \quad m = -\frac{1}{2} \text{ için} \quad (1.6)$$

şeklinde ifade edilir. (1.5) ve (1.6) nolu formüller ile gösterilen enerji değerleri, protonun manyetik alanda oluşturduğu enerji seviyeleridir. Uygulanan dış manyetik alanın ( $H_0$ ) belli bir yönü olduğundan, protonun manyetik momenti, manyetik alanın yönü ile paralel veya antiparalel olarak yönelir. Böylece protonun manyetik alanda iki farklı yönelmesi mümkündür. Bu farklı yönelmelerde, (1.5) ve (1.6) nolu formüllerden de görüleceği gibi, protonun enerji seviyesi değişik olur. Eğer protonun manyetik momenti, dış manyetik alan ile paralel ise, protonun potansiyel enerjisi daha düşüktür (Şekil 1.2).



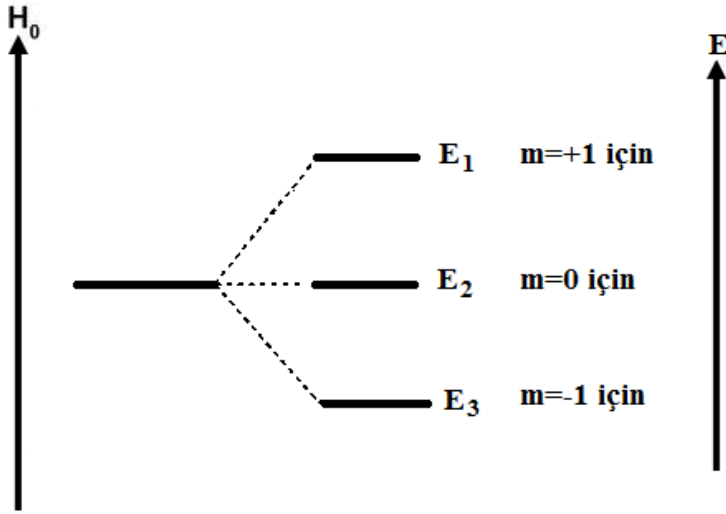
Şekil 1.2. Protonun manyetik alanda yönelmesi ve farklı enerji seviyelerinin gösterilişi

Dış manyetik alan olmadığı zaman, manyetik momentler gelişigüzel yönlenir. Bu durumda tüm protonların enerji seviyeleri yozlaşmıştır. Yani protonlar dejenere olmuştur. Proton veya herhangi bir çekirdek ( $I > 0$ ) ancak manyetik alan içerisine getirildiği zaman, farklı enerji seviyelerine yarılmalar olur. Şekil 1.3a ve b de proton çekirdeğinin, manyetik alanın olmadığı bir ortamda ve homojen bir manyetik alan içerisinde olan davranışları şematik olarak gösterilmiştir.



Şekil 1.3. a) Proton spinlerinin manyetik alanın olmadığı bir durumda davranışı b) Proton spinlerinin homojen bir dış manyetik alanda davranışı

Genel olarak, çekirdeklerin spin kuantum sayısı, dolayısıyla manyetik kuantum sayısı, o çekirdeğin manyetik alan içerisinde kaç farklı enerji seviyesine yarılacağını belirler. Spin kuantum sayısı  $I=1/2$  den farklı olan bir element için enerji seviyelerini belirleyelim. Örneğin, döteryumun ( $^2\text{H}$ ) spin kuantum sayısı  $I=1$  olduğundan, döteryumun üç ayrı manyetik kuantum sayısı vardır. Bu nedenle döteryum, homojen bir dış manyetik alan içerisine getirildiği zaman üç ayrı enerji seviyesine yarılr. Bu seviyeler Şekil 1.4'de gösterilmiştir.



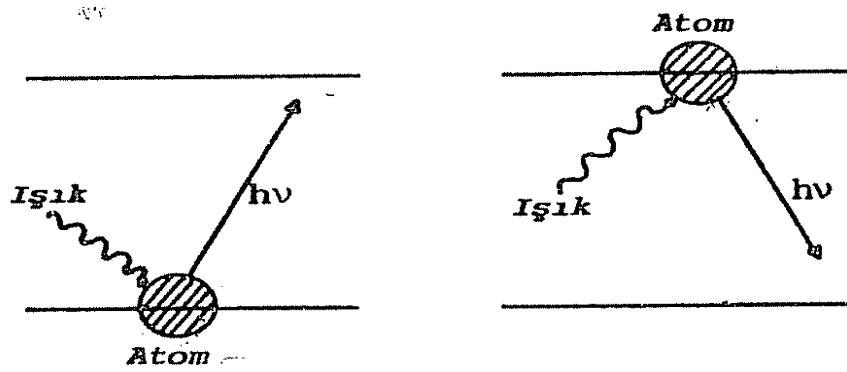
Şekil 1.4. Döteryum çekirdeğinin manyetik alanda enerji seviyeleri

### 1.1.1. Rezonans Olayı ve Rezonans Koşulu

Rezonans kavramının kökeni klasik mekanikten gelmektedir. Basit bir örnekle şöyle açıklanabilir. İki basit sarkaç düşey olarak yan yana asıldıkları zaman birisinin hareketi öteki tarafından tekrarlanır. Yani, sarkaçlardan birisi durgun ve öteki hareketli ise hareketli olandan durgun olana enerji aktarılır ve durgun olan da harekete koyulur. Sonra enerjisinin bir kesimini yeniden ilk sarkaca aktarır. Böylece, sönüm etkenlerinin olmadığı bir ortamda iki sarkaç arasında enerji akışı sürer gider.

Sarkaçların doğal frekansları birbirine eşit oldukları zaman, aralarındaki enerji alışverişi en etkin duruma ulaşır. İşte sarkaçların doğal frekanslarının birbirine eşit olduğu bu duruma rezonans denir.

Kuantum mekaniğinde rezonansa örnek olarak, ışık ile maddenin etkileşimi verilebilir. Bu durumda atom ile elektromanyetik alan birbiri ile kenetlenen iki periyodik sistem olarak düşünülür. Atomların doğal frekansları geçiş frekansları olarak bilinir ve gelen ışığın frekansı da ayarlanabilir. O halde elektromanyetik alanın frekansı, atomun doğal frekansın ayarlandığı zaman, bu kuantum mekaniksel sistem klasik mekanikteki sarkaç sistemi gibi davranır. Yani, ya elektromanyetik alandan atoma enerji aktarılır ya da başlangıçta uyarılmış durumda olan atomdan elektromanyetik alana enerji aktarılır. Bunlardan ilkinde enerji soğurulması ve ikincisine de enerji salınması denir (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Bir atomun enerji salması ya da soğurulması

Spin kuantum sayısı  $I > 0$  olan çekirdekler, manyetik alan içerisine getirildiği zaman, manyetik kuantum sayısına göre belirli enerji seviyelerine dağılırlar. Daha önceki bölümde anlatıldığı gibi protonun iki manyetik kuantum sayısı vardır. Bundan dolayı dış manyetik alanda iki farklı enerji seviyesine yarılr ve bu enerji seviyeleri

$$E_{\text{paralel}} = \gamma \frac{h H_0}{2 \pi} \left( -\frac{1}{2} \right) \quad E_{\text{antiparalel}} = \gamma \frac{h H_0}{2 \pi} \left( +\frac{1}{2} \right)$$

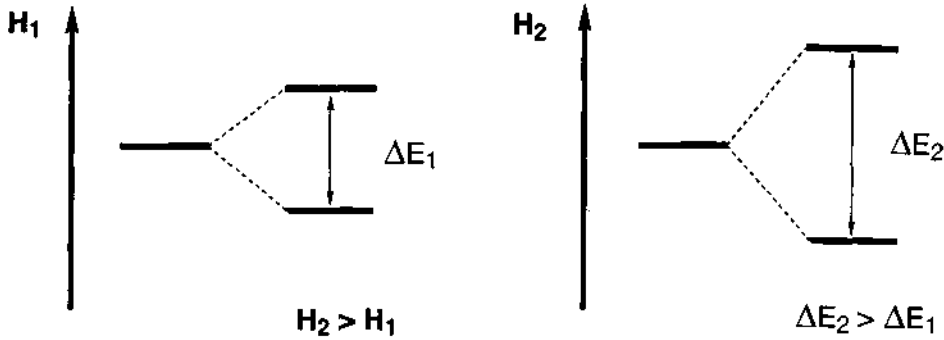
şeklinindedir. Rezonans olayı, uygulanan manyetik alan ile paralel yönlenmiş manyetik momentin, dışarıdan verilen enerji ile, anti paralel konuma geçmesidir. O halde, bu iki enerji seviyesi arasındaki fark, rezonans açısından önem kazanmaktadır. Enerji seviyeleri arasındaki enerji farkı

$$\Delta E = E_{antiparalel} - E_{paralel} = \gamma \frac{h H_0}{2 \pi} \left( \frac{1}{2} \right) - \gamma \frac{h H_0}{2 \pi} \left( -\frac{1}{2} \right)$$

şeklinde yazılır. Buradan,

$$\Delta E = \gamma \frac{h H_0}{2 \pi} \quad (1.7)$$

ifadesi elde edilir. Bu bağıntı, protonun manyetik alanda bulunduğu enerji seviyeleri arasındaki farkı göstermektedir. Plank sabiti  $h$  ve jiromanyetik sabiti  $\gamma$  değişmeyeceğine göre, değişken parametre olarak yalnız manyetik alan şiddeti  $H_0$  karşımıza çıkmaktadır. O halde, protonun enerji seviyeleri arasındaki enerji farkı, doğrudan manyetik alan şiddetine bağlıdır. Uygulanan manyetik alan şiddeti ( $H_0$ ) ne kadar güçlü ise, bu enerji seviye farkı  $\Delta E$ , o oranda fazla olacaktır. Bu fark, cihazın hassasiyeti için bir ölçü olup, seviyeler arasındaki dağılımı doğrudan etkileyen faktördür (Şekil 1.6).



Şekil 1.6. Protonun, şiddeti farklı olan iki manyetik alanda oluşturduğu enerji seviyeleri

Proton veya herhangi bir çekirdek manyetik alan içerisinde bulunmadığı zaman ( $H_0 = 0$ ), (1.7) formülünden  $\Delta E = 0$  olacağından, enerji seviyeleri arasında herhangi bir fark olmayacaktır. Böylece enerji seviyelerinin yozlaştığı sonucu ortaya çıkmaktadır. Protonda iki enerji seviyesi arasındaki enerji farkını gösterdik. Proton çekirdeklerinin rezonans olabilmesi için, çekirdeklerin alt enerji seviyesinden üst enerji seviyesine geçmesi gerekir. Bunun için protona dışarıdan  $\Delta E$  kadar bir enerjinin verilmesi gerekir. Bu enerji elektromanyetik radyasyon olarak verileceğinden, elektromanyetik dalga enerjisinin  $\Delta E$  'ye eşit olması gerekir. Elektromanyetik dalganın enerjisi

$$E = h\nu \quad (1.8)$$

formülü ile belirlenir. Rezonans koşulu için (1.7) ve (1.8) nolu enerji denklemlerini eşitlersek

$$E = h\nu = \gamma \frac{h H_0}{2\pi}$$

$$\nu = \gamma \frac{H_0}{2\pi} \quad (1.9)$$

rezonans formülünü elde ederiz. (1.9) denklemi, NMR deneylerinde rezonans için gerekli koşulu ortaya koymaktadır.

Tüm NMR deneyleri, homojen manyetik alan içerisinde, alt enerji seviyesinde bulunan bir çekirdeğin dışarıdan verilen bir enerji ile üst enerji seviyesine geçmesi ile gerçekleşir. Proton, manyetik alan içerisine getirildiği zaman, yukarıda gösterildiği gibi, iki farklı enerji seviyesine dağılır. Alt seviyede bulunan başka bir deyişle manyetik momenti dış manyetik alan ile paralel olan proton enerji alarak üst seviyeye geçer. Protonun manyetik momenti dış manyetik alanın yönü ile anti paralel yönelir. Bu olaya spin çevrilmesi veya genel olarak rezonans denir. Rezonans olayı için, dışarıdan verilen enerji miktarı iki seviye arasındaki enerji kadar olmalıdır. Şekil 1.6'da gösterildiği gibi rezonans için gerekli olan enerjinin miktarı manyetik alanın şiddetine göre değişmektedir. (1.9) denkleminde verilen rezonans ifadesinde, rezonans frekansının manyetik alan şiddetine bağlı olduğu açık olarak görülmektedir. NMR cihazlarında kullanılan mıknatısların alan şiddetleri 14100 Gauss (1.4 Tesla) ile 165000 (16.5 Tesla) arasında değişmektedir. Örneğin, alan şiddeti 1.4 Tesla olan bir cihazda rezonans için gerekli frekans 60MHz olarak bulunur. Cihazların gücü genelde kullanılan sabit frekans ile belirlenir. 60MHz'lik bir cihazın manyetik alan şiddeti 14100 Gauss'dur. Manyetik alan şiddeti 117500 Gauss olan bir cihazda protonlar 500MHz civarında rezonans olduğundan 500MHz NMR cihazından bahsedilir.



### 1.1.2. Enerji Seviyelerinin Dağılımı

Bir numune manyetik alan içerisine getirildiği zaman, protonların bir kısmının, uygulanan manyetik alanla paralel, bir kısmının ise antiparalel yönlendiğini açıklanmıştır. Rezonans olayında çekirdekler alt enerji seviyesinden üst enerji seviyesine geçiş yaptıklarından, alt enerji seviyesinde bulunan çekirdek sayısının, üst seviyede bulunan çekirdek sayısına göre daha fazla olması gerekir. Termodinamik yasalarına göre: İki seviye arasında bir enerji farkı varsa, termal bir denge oluşur. Yani, protonların bir kısmı ait seviyede, bir kısmı da üst seviyede bulunur. Seviyelerin doldurulması "popülasyon" Boltzmann dağılım yasasına göre olur. Boltzmann dağılım yasasına göre alt ve üst enerji seviyelerinde bulunan protonların sayısal oranı

$$\frac{N_{\alpha}}{N_{\beta}} = e^{-\frac{\Delta E}{kT}} \quad (1.10)$$

formülü ile ifade edilir. Burada,

$N_{\alpha}$ = Üst enerji seviyesinde (antiparalel) bulunan protonların sayısı

$N_{\beta}$ = Alt enerji seviyesinde (paralel) bulunan protonların sayısı

$\Delta E$  = iki seviye arasındaki enerji farkı

$k$  = Boltzmann Sabiti ve  $T$  = Sıcaklık

olmaktadır. (1.7) denklemindeki  $\Delta E$  ifadesi (1.10) denkleminde yerine yazılırsa

$$\frac{N_{\alpha}}{N_{\beta}} = e^{-\frac{\gamma h H_0}{2 \pi k T}} = 1 - \frac{\gamma h H_0}{2 \pi k T} \quad (1.11)$$

elde edilir. Protonların manyetik alan içerisinde oluşturduğu enerji seviyeleri arasındaki enerji farkı çok küçüktür. Örneğin; 14100 Gauss'luk manyetik alanda, protonun iki enerji seviyesi arasındaki fark (1.10) eşitliğinden  $\Delta E=0.005$  cal/mol olarak bulunur. Bu değer bize, iki enerji seviyesi arasındaki farkın, oldukça küçük olduğunu ortaya koymaktadır. Bu durumda enerji seviyelerinin popülasyonu arasındaki fark da oldukça küçüktür. Örneğin, 23500 Gauss'luk bir manyetik alanda  $\Delta E = 0.04$  J/mol'dur. Bu değeri (1.10) formülünde yerine koyarsak ( $T = 25$  °C için)

$$\frac{N_{\alpha}}{N_{\beta}} = 0.999984$$

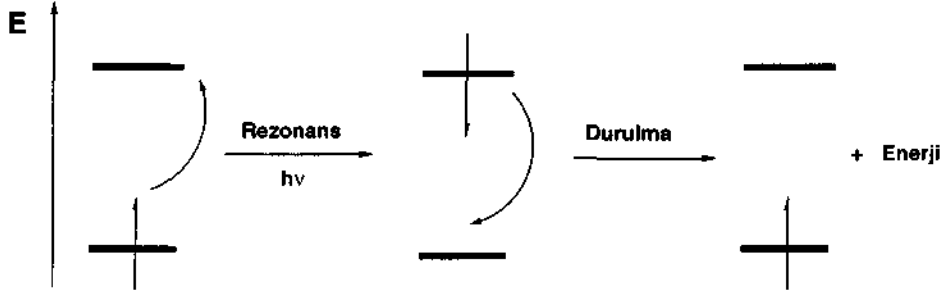
gibi sayısal bir değer elde edilir. Bu sayı şunu ifade eder. Üst seviyede bulunan proton sayısı örneğin, 200.000 ise alt seviyede bulunan proton sayısı 200.003 dür. Toplam 400.003 protondan alt seviyede olan proton sayısı, üst seviyede bulunan proton sayısından yalnızca 3 fazladır.

NMR spektroskopisinden elde edilen sinyalin şiddeti, iki enerji seviyesi arasında dağılan proton sayısının oranına bağlıdır. Rezonans olayında, enerji absorpsiyonu ile alt seviyede bulunan bir proton üst seviyeye geçer. Bu nedenle, alt seviyede olan protonların sayısı, üst seviyeye göre ne kadar fazla olursa, rezonans olasılığı o oranda artar. Ne kadar fazla proton rezonans olursa, elde edeceğimiz sinyalin şiddeti de o oranda artar. Burada sinyal şiddetinden bahsederken, yalnızca sinyalin yüksekliğini düşünmek doğru değildir. Önemli olan sinyalin altında bulunan alanın büyüklüğüdür. NMR spektrumlarının iyi yorumlanabilmesi için sinyal şiddetinin artırılması gerekir. Sinyal şiddetinin fazla olması da alt seviyede bulunan proton sayısının üst seviyeye göre fazla olmasına bağlıdır. O halde alt enerji seviyesinde bulunan protonların sayısının artırılması, NMR için çok önemli bir olaydır. Yani, çekirdeklerin popülasyonunun herhangi bir şekilde değiştirilmesi gerekir. (1.11) denkleminde göre bu oranı değiştirebilecek iki parametre vardır. Bunlar, sıcaklık  $T$  ve manyetik alan şiddeti  $H_0$ 'dır. Eğer sıcaklık düşürülürse,  $N_{\alpha}/N_{\beta}$  oranı azalır. Yani alt seviyede bulunan proton sayısı artar. NMR spektrumları genel olarak oda sıcaklığında alınır. O halde düşük sıcaklıklarda, NMR spektrumu kaydetmekle hassasiyet artırılmış olacaktır ve bu doğrudur. Ancak, bu düşük sıcaklık yöntemi, pratik olarak, hassasiyet artırmak için uygulanacak bir yöntem değildir. Çünkü NMR spektrumu kaydedilecek madde, herhangi bir çözücü içerisinde çözünür ve sonra spektrum kaydı yapılır. Numune soğutulduğu zaman bu kez karşımıza çözünürlük problemi çıkacaktır. Ayrıca alınan çözücünün aşağı sıcaklıklarda donması sorun yaratacaktır. Bunların yanı sıra, karşımıza çok daha ciddi bir problem çıkacaktır ki o da, numune içerisinde var olan dinamik dengelerin (bağ dönmesi, halka çevrilmesi v.s gibi) statik hale gelmesi ve NMR spektrumlarının görünümünü etkilemesidir. O halde sıcaklığın düşürülmesi ile hassasiyet artırılmasına gidilmesi, pratikte uygulanan bir yöntem değildir. Diğer taraftan bir bileşiğin NMR spektrumunu yüksek sıcaklıkta da kaydetmek mümkündür.

Bu kez (1.11) eşitliğine göre popülasyon ters yönde artacağından, sinyal şiddetinde azalma olur. Genel olarak farklı sıcaklıklarda yapılan NMR ölçümleri, molekül içerisindeki dinamik olayları incelemek için uygulanmaktadır. Sıcaklık ölçümü, hiç bir zaman popülasyonu etkilemek için kullanılmaz.

### 1.1.3. Durulma Olayı

NMR spektroskopisinde, rezonans olayının, alt enerji seviyesinde bulunan bir protonun enerji soğurarak, üst seviyeye geçmesi ile oluştuğunu açıkladık. Böylece rezonans sonucu, protonlar alt seviyeden üst seviyeye geçtiğinden, enerji seviyelerinin popülasyonu değişmektedir.



Şekil 1.7. Rezonans ve durulma olaylarının şematik olarak gösterilişi

Sistemdeki dengenin tekrar sağlanabilmesi için, üst enerji seviyesine geçmiş protonların, fazla enerjilerini dışarıya vererek tekrar eski konumlarına, alt enerji seviyelerine dönmeleri gerekir. Protonlar eski konumlarına dönmedikleri sürece, aynı numuneden tekrar NMR spektrumu kaydetmek mümkün değildir. Protonların, üst seviyede iken fazla enerjilerini dışarıya vererek tekrar alt seviyeye dönmelerine “durulma”, bunun için geçen zamana “durulma zamanı” denir. İki çeşit durulma vardır.

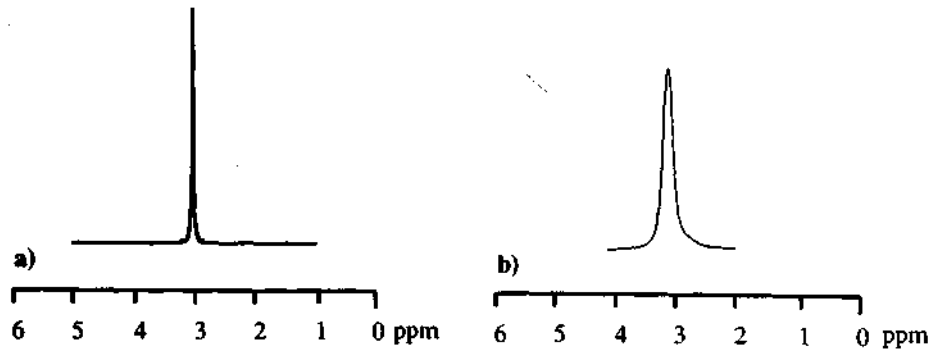
- Spin-Örgü Durulması  $T_1$
- Spin-Spin Durulması  $T_2$

Protonun, üst seviyeden alt seviyeye geçerken, fazla enerjisini (soğurduğu enerji) ışın halinde dışarıya vermesi söz konusu değildir. Işın yayma olasılığı, yayılan ışının dalga boyu ile ters orantılı olduğundan, bu olasılık radyo dalgaları bölgesinde

olanaksızdır. Çözelti içerisinde bulunan her türlü parçacığa (gaz, sıvı, katı, çözücü molekülleri) örgü denir. Bu moleküller termal hareketler sonucu çeşitli manyetik alanlar meydana getirirler. Bu yüklü taneciklerin kendilerine mahsus dönme hareketleri vardır. Bu oluşan alanların bazılarının frekansı, çekirdeğin presesyon hareketinin (kendi eksenini etrafında dönmesi) frekansına uyar ve rezonans koşulu oluştuğunda, fazla enerji örgüye verilir. Örgüye verilen enerji termal harekete, yani, kinetik enerjiye çevrilir. Spin-örgü durulması için geçen zaman  $T_1$  dir. Bu zaman sıvılarda  $10^{-2}$  ile  $10^2$  saniye arasında değişir. Spinler arasında ikinci bir etkileşim ise, spin-spin durulmasıdır.

Bu safhada bilinmesi gerekli olan tek nokta, rezonans olan bir protonun, tekrar rezonans olabilmesi için, fazla enerjisini çevreye vererek tekrar eski konumuna gelmesi şartıdır. Aksi halde, tekrar rezonans olayı gerçekleşmez. Diğer önemli bir noktada, bugün tıbbi manyetik rezonans cihazlarında yapılan ölçümün,  $T_1$  ve  $T_2$  ölçümünden başka bir şey olmamasıdır. Bu zamanların ölçülmesi ile hem katı dokular hem de yumuşak dokular ön plana çıkarılabilmektedir.

Durulma zamanı NMR spektrumlarında gözlenen piklerin genişliğini etkileyen önemli bir parametredir. Durulma zamanı uzun olduğu zaman, Şekil 1.8'den de görüleceği gibi, pikler keskin ve dar, durulma zamanları kısa olduğu zaman pikler daha geniş olarak karşımıza çıkmaktadır.



Şekil 1.8. Durulma zamanının a) uzun b) kısa olduğu zaman piklerin görünümü

Eğer iki pik birbirine çok yakınsa, durulma süresi kısaldığı zaman pik genişlemesi nedeniyle bu iki pik çakışık ve yayvan bir şekilde karşımıza çıkar ki, bu da spektrum yorumunu imkânsız kılar. Pik genişliklerinin durulma zamanı ile olan bağlantısı, Heisenberg belirsizlik prensibi ile gösterilebilir. Heisenberg belirsizlik prensibine göre

$$\Delta E \cdot \Delta t = \frac{h}{2\pi} \quad (1.12)$$

dir. Buradan

$$\frac{\Delta E}{h} = \frac{1}{2\pi \cdot \Delta t}$$

yazılabilir.  $E = h\nu$  olduğundan enerji değeri, yukarıdaki formülde yerine koyulduğunda

$$\Delta \nu = \frac{1}{2\pi \cdot \Delta t} \quad (1.13)$$

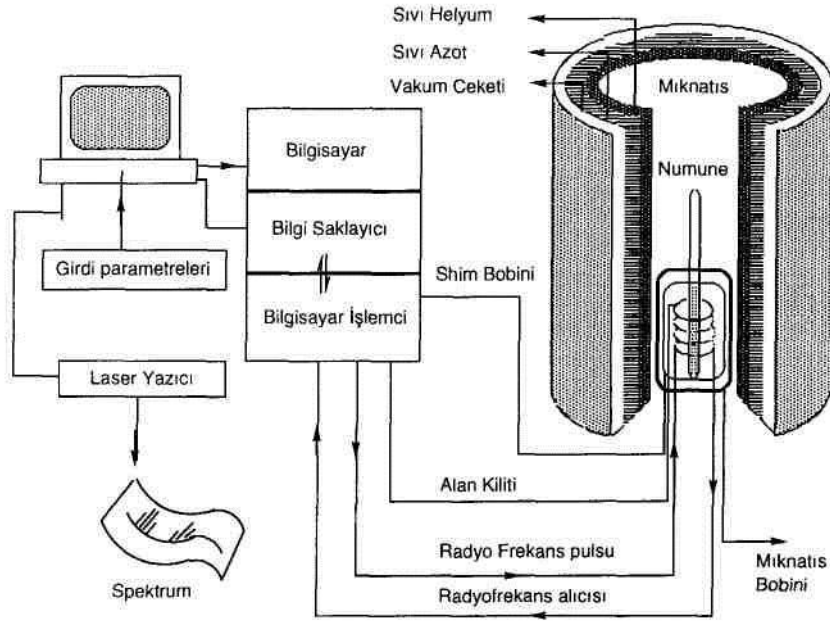
denklemini elde edilir. Bu formül pik genişliği ile duruma zamanı arasındaki bağlantıyı göstermektedir.  $\Delta t$  durulma zamanı küçük olursa,  $\Delta \nu$  o kadar büyük olacaktır. Bu da rezonansın geniş bir frekans bölgesine yayıldığını, NMR sinyalinin geniş olacağını, aksi halde ise, frekans bölgesinin küçük, sinyal genişliğinin az olacağını göstermektedir.

Çözücü içerisinde herhangi bir paramanyetik safsızlık bulunduğu zaman NMR spektrumlarının görünümü değişir. Pikler genişler ve çok detaylı bilgi veren ince yapılar gözlenmez. Bu paramanyetik safsızlıklar durulma zamanlarını kısaltır. Bu nedenle numunelerin ölçülmeden önce küçük bir filtreden geçirilerek süzülmesi tavsiye edilir. Ayrıca numune miktarının fazla alınması durumunda, oluşan çözeltinin viskozitesi artacağından, durulma zamanları kısalmaya ve pikler genişler. Bu nedenle, hazırlanacak numunenin konsantrasyonunun fazla olmamasına dikkat etmek gerekir.

#### **1.1.4. NMR Spektroskopisinin Çalışma Prensipleri**

NMR spektrometreleri temel olarak dört ana bölüme ayrılır,

- a) Kutup uçları arasında yüksek derecede homojen manyetik alan içeren mıknatıs
- b) Çok kararlı bir radyo frekans vericisi
- c) Radyo frekans alıcısı
- d) Kaydedici (Monitör)



Şekil 1.9. Süper iletken mıknatıslı FT-NMR spektrometresinin şeması

NMR spektrometresinde kullanılan mıknatıs elektromıknatıs veya sürekli mıknatıs olabilir. Elektromıknatısın manyetik alan değeri daha kolay değiştirilebildiğinden hem manyetik alan taraması hem de birkaç çekirdeğin aynı spektrometre ile incelenebilmesi mümkün olur. Ancak elektromıknatısın açığa çıkan ısı nedeniyle çok iyi soğutulması gerekir. Ayrıca elektromıknatısın kararlılığı kolayca sağlanamaz. 220MHz ve daha büyük değerleri uygulayan aletlerde süper iletken mıknatıslar kullanılır ve bunların sıvı helyum sıcaklığında (4 K) çalıştırılması gerekir. Mıknatısın kutupları arasında 2-3 cm lik bir uzaklık bulunur. Işık kaynağı olarak bir radyo frekans jeneratörü kullanılır. Radyo frekans ışını örneğe manyetik alan yönüne dik olacak biçimde uygulanır. Normal uygulamalarda radyo frekans jeneratörünün yaydığı frekansının sabit kalması sağlanır ve manyetik alan değeri uygun bir elektronik devre yardımı ile değiştirilir. Çift rezonans yönteminin uygulandığı durumlarda ise manyetik alan değeri sabit tutulur ve ana radyo frekans kaynağının yaydığı ışının frekansı taranır. Bu sırada ikinci radyo frekans kaynağı ise seçilen belli bir çekirdeği ışınlamakta kullanılır. Spektrometrenin dedektörü olarak bir radyo frekans dedektörü kullanılır. Rezonans olduğu zaman dedektör bu olayı bir gerilim düşmesi olarak algılar. NMR spektrometrelerinde ayrıca piklerin altındaki alanları ölçebilmek için pik alanlarını integre edecek elektronik bir devre yerleştirilmiştir.

### 1.1.4.1. Pulsu Spektrometreler (FT-NMR)

NMR spektrumu frekans ya da manyetik alan taraması yerine, molekülde bulunan ve çeşitli kimyasal çevrelere sahip tüm çekirdeklerin aynı anda uyarılmasını sağlayacak şekilde bir uyarma yapılarak da elde edilebilir. Bunun için geniş bir frekans aralığına sahip radyo frekans ışın demeti örneğe pulslar halinde uygulanır. Bu yöntem özellikle doğal bolluğu az olan çekirdeklerin NMR sinyallerini elde etmek için kullanılır. Bu tür çekirdekler içinde en önemlisi  $^{13}\text{C}$  çekirdeğidir. 1-30 ms süren pulsların birkaç saniye aralıklarla birbiri peşine yüzlerce kez uygulanması ile spektrum yüzlerce kez kaydedilmiş olur. Alette bulunan bir bilgisayar yardımıyla yüzlerce kez elde edilen bu bilgi kısa bir süre içinde birbirine eklenir ve  $^{13}\text{C}$  çekirdeğinin doğal bolluğunun çok az olmasından kaynaklanan duyarlık düşüklüğü böylece giderilmiş olur. Puls şeklinde uygulanan uyardan sonra elde edilen spektrum bilgisi, zaman ölçeğindedir. Bu bilginin frekans ölçeğine dönüştürülmesi amacı ile spektrometrenin bünyesinde bulunan bir bilgisayar yardımı ile ters Fourier Transformasyonu işlemi gerçekleştirilir ve frekans ölçekli spektrum elde edilir. Bu yüzden pulslu NMR spektroskopisi yöntemine FT NMR yöntemi adı da verilir.

### 1.1.5. Kimyasal Kayma

#### 1.1.5.1. Atom Çekirdeği Çevresinde Oluşan Lokal Manyetik Alanlar

Rezonans olayının meydana gelebilmesi için

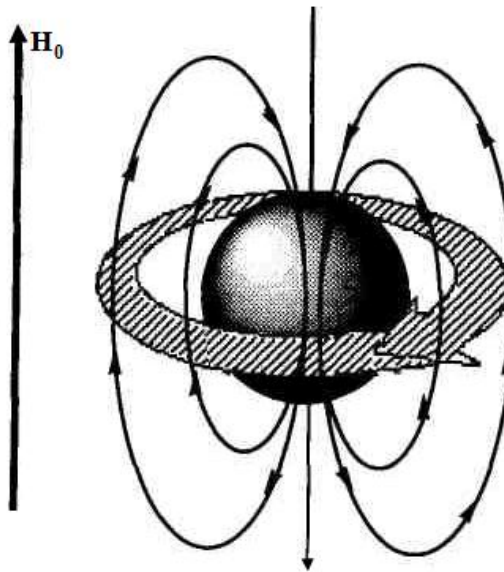
$$\nu = \gamma \frac{H_0}{2\pi} \quad (1.14)$$

eşitliğinin sağlanması gerekir. Jiromanyetik sabiti  $\gamma$ , daha önce görmüş olduğumuz gibi, her element için ayrı bir değere sahiptir. Proton için de jiromanyetik sabitinin belli bir değeri vardır (Çizelge 1.1). Protonlar farklı çevrelerde de olsa jiromanyetik sabiti değişmez, her proton için aynı değer geçerlidir. Böylece, (1.14) nolu rezonans koşulu formülü protonlara uygulandığında, sabit bir manyetik alan içerisinde bulunan herhangi bir numunenin içerdiği tüm protonların aynı yerde, belli bir frekansta rezonans olması

gerekirdi. Böyle bir durumda, NMR spektroskopisi, bize yalnız molekül içinde protonun olup olmadığı hakkında bilgi veren bir spektroskopik yöntem olurdu ki, bir molekülün yapısında protonun olup olmadığını belirleyen çok daha basit yöntemler vardır. Farklı protonların aynı frekansta Rezonans olmaması gerçeği, NMR spektroskopisinin gelişmesine yardımcı olmuş en önemli faktördür.

Protonlar, bağlı oldukları atomlara ve uzaydaki konumlarına göre farklı bölgelerde rezonans olurlar. Her ne kadar protonlar homojen ve kararlı bir manyetik alan içinde bulunurlarsa da, protonların etkisi altında buldukları manyetik alan, dış manyetik alandan farklıdır. O halde; her proton farklı manyetik alanın etkisinde kalmaktadır. Bu nedenle (1.14) nolu eşitliğe göre protonların rezonans frekansları da farklıdır. Böylece farklı protonları NMR aracılığı ile tanımak mümkün olmaktadır.

Elektronlar yüklü cisimler olduğundan, manyetik alan içine getirildiği zaman, uygulanan manyetik alanın etkisi ile ilave hareketler yaparlar. Elektronların kendi ve çekirdek etrafında meydana getirmiş oldukları dönme hareketleri, çekirdek etrafında küçük ilave manyetik alanlar meydana getirir. Lenz yasasına göre; dış manyetik alan, elektron akımı ile ikinci bir manyetik alan (sekonder manyetik alan) meydana getirirse, oluşan manyetik alanın yönü, dış manyetik alanın yönü ile zıttır. Elektronların dönme hareketi ve oluşturduğu manyetik alanın yönü Şekil 1.10' da gösterilmiştir.



Sekonder Manyetik Alanın Yönü

Şekil 1.10. Dış manyetik alanın etkisi ile elektronların oluşturduğu sekonder manyetik alan



Elektron sirkülasyonu ile oluşan manyetik alanın yönü dış manyetik alan ile zıt yönde olduğundan, dış manyetik alanın şiddeti  $H_0$ , çekirdek etrafında azalır. Dış manyetik alanın etkisinin çekirdek etrafında azalmasına perdeleme denir. Bir molekül her ne kadar homojen bir manyetik alan içine getirilirse de, çekirdekler, oluşan sekonder manyetik alanlardan dolayı, dış manyetik alandan farklı (genel olarak daha az) bir manyetik alanın etkisi altında kalırlar.

Bazı durumlarda, protonun konumuna göre, elektronlar tarafından oluşturulan sekonder manyetik alan, dış manyetik alan ile aynı yönde olabilir. Bu durumda çekirdek, dış manyetik alandan daha kuvvetli bir manyetik alan etkisi altında kalır. Sonuçta rezonans koşulunun sağlanması için manyetik alan şiddetinin azaltılması gerekir. Bu olaya anti perdeleme denir.

Elektronların meydana getirdiği sekonder manyetik alan, dış manyetik alanın etkisiyle meydana gelmektedir. Dolayısıyla oluşan sekonder manyetik alanın şiddeti  $H_{sek}$  ile dış manyetik alan  $H_0$  arasında,

$$H_{sek} = \sigma H_0 \quad (1.15)$$

ilişkisi vardır. Burada

$H_{sek}$ : Sekonder manyetik alan

$H_0$ : Dış manyetik alan

$\sigma$ : perdeleme sabitidir.

Perdeleme sabitini etkileyen en önemli faktör, protonların etrafında bulunan elektron yoğunluğudur. Protonlar, dış manyetik alanın yanı sıra elektronların oluşturduğu manyetik alanların da etkisi altında kalırlar. Protonun etkisi altında kaldığı toplam manyetik alana yerel manyetik alan denir ve

$$H_{yerel} = H_0 - H_{sek} \quad (1.16)$$

denklemini ile ifade edilir. Sekonder manyetik alanın değerini bu denklemde yerine koyarsak

$$\begin{aligned} H_{yerel} &= H_0 - \sigma H_0 \\ H_{yerel} &= H_0(1 - \sigma) \end{aligned} \quad (1.17)$$

denklemini elde edilir. Sonuçta, rezonans olayında, protonun çevresinde bulunan lokal manyetik alan önemlidir. Yerel manyetik alanın şiddeti, (1.17) nolu denklemden anlaşılacağı gibi, perdeleme sabitine bağlıdır. O halde, rezonans koşulu için perdeleme sabiti önemli bir rol oynamaktadır. Perdeleme sabiti, yalnız çekirdeğin etrafında bulunan elektron yoğunluğuna bağlı olmayıp, başka faktörlere de bağlıdır. Yerel manyetik alan, elektron yoğunluğuna bağlı olarak, her proton etrafında farklı değere sahiptir. Bu da protonların, çevredeki elektron yoğunluğuna bağlı olarak farklı bölgelerde rezonans olacağını göstermektedir.

$$\sigma = \sigma_{dia} + \sigma_{para} + \sigma_{kom} + \sigma_{kon} \quad (1.18)$$

$\sigma_{dia}$ = Diamanyetik perdeleme sabiti

$\sigma_{para}$ = Paramanyetik perdeleme sabiti

$\sigma_{kom}$ = Komşu grupların oluşumu ile meydana gelen perdeleme sabiti

$\sigma_{kon}$ = Konsantrasyondan kaynaklanan perdeleme sabiti

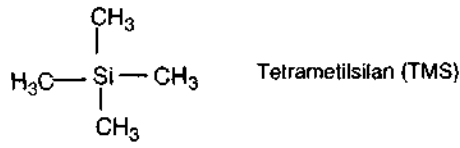
(1.18) nolu denklem perdeleme sabitinin çeşitli etkenlerin toplamından oluştuğunu göstermektedir. Şekil 1.10'da göstermiş olduğumuz ve elektronların sirkülasyon hareketleri sonucu meydana gelen perdelenmeye diamanyetik perdeleme denir. Paramanyetik perdeleme, atom ağırlığı yüksek ve düşük enerji seviyeli p orbitali içeren atomlarda gözlenir. Protonda, p orbitali bulunmadığından, paramanyetik perdeleme gözlenmez. Komşu grupların oluşturduğu perdeleme, kimyasal kayma değerlerini önemli bir ölçüde etkilemektedir. Bu konu ileride daha ayrıntılı bir şekilde incelenecektir. Ayrıca numune konsantrasyonu ve çözücü molekülleri de perdeleme sabitine katkıda bulunur. Yukarıda sıralamış olduğumuz etkenlerden, proton rezonansı için en önemlileri; yerel diamanyetik perdeleme sabiti ile komşu grupların etkisi ile oluşan perdeleme sabitidir.

Her proton için perdeleme sabiti, değişik bir değer alacaktır. Çünkü protonlarını kimyasal çevreleri ve çevrelerinde bulunan elektron yoğunluğu, eşit değildir. Bu nedenle, her protonun çevresinde etkili olacak toplam manyetik alan  $H_{yerel}$  farklı olacaktır. Böylece rezonans formülü (1.9)'a göre, farklı alanların etkisi altında bulunan protonlar da, farklı frekanslarda rezonans olacaktır. Protonların farklı bölgelerde rezonans olmalarına kimyasal kayma denir. Eğer iki protonun çevresi birbirinden

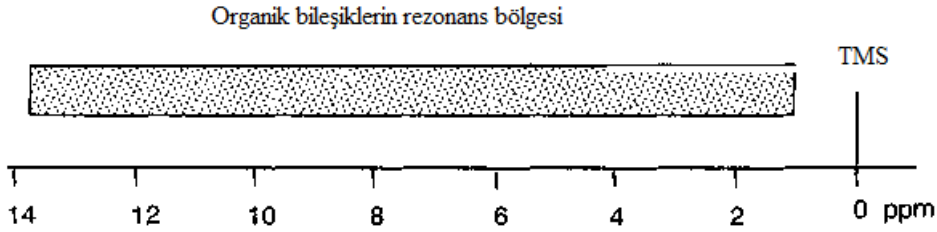
farksız ise, bu protonlar eşit manyetik alanın etkisi altında kalacaklarından, aynı bölgede rezonans olurlar ve başka bir deyimle, protonların sinyalleri çakışır.

### 1.1.5.2. Pik Yerlerinin Belirlenmesi: NMR Spektrumlarında Skala

Rezonans yerlerinin belirlenmesi için standart bir sinyal alınır ve diğer rezonansların standart sinyalinden olan uzaklığı Hz olarak verilir, böylece sinyallerin yerleri saptanmış olur. NMR ölçümlerinde standart olarak tetrametilsilan (TMS) kullanılır.



TMS' nin standart olarak kullanılması, bu bileşiğin birçok özelliğinden kaynaklanmaktadır. Standardın en büyük özelliği; organik bileşiklerin %99'dan daha fazla bir bölümünün, standart sinyalinin solunda rezonans olmasıdır. Silisyum atomu karbona göre daha elektropozitif olduğundan, silisyuma bağlı metil grupları daha fazla perdelenir. Bu nedenle, TMS sinyali oldukça yukarı alanda gözlenir.



Şekil 1.11. Tetrametilsilan sinyali ve organik bileşiklerin rezonans bölgesi

Aromatik bileşiklerin kuvvetli perdeleme bölgesinde bulunan protonlara ait sinyaller, TMS sinyalinin sağ tarafında rezonans olurlar. Tetrametilsilanın standart olarak kullanılmasını sağlayan diğer özellikleri şunlardır.

- 1) Ucuz olup temin edilmesi kolaydır.
- 2) Ölçülen bileşiklerle kesinlikle reaksiyona girmez.
- 3) Kaynama noktası  $K_n = 27 \text{ }^\circ\text{C}$  olduğundan, spektrum kaydından sonra, numunenin hafif ısıtılması veya çözücünün vakumda uçurulması ile TMS

kolayca ortamdan uzaklaştırılabilir. Bu nedenle TMS herhangi bir şekilde safsızlık oluşturmaz.

- 4) 12 tane eşdeğer protonu olduğundan, konsantrasyonu düşük tutulsa bile şiddetli bir sinyal elde edilir.

Spektrumu kaydedilecek bileşiğin çözeltisine TMS ilave edilir ve NMR spektrumu kaydedilir. Herhangi bir protonun rezonans frekansının, standardın (TMS) rezonans frekansına olan uzaklığına kimyasal kayma denir. Kimyasal kayma, bir protonun rezonans frekansı ile standardın rezonans frekansı arasındaki fark olarak da tanımlanabilir.

$$\Delta \nu = \nu_{\text{örnek}} - \nu_s \text{ tan dart} \quad (1.19)$$

Bu fark, NMR cihazının alan şiddetine göre değişir. Değişim alan şiddeti ile doğru orantılıdır. Yani, manyetik alanın gücü ne kadar fazla ise, bu fark o oranda artar. Bu fark, cihazın çalıştığı sabit frekansa bölünür ve bu değer  $10^6$  ile çarpılırsa tüm cihazlar için geçerli olan, değişmeyen sabit kimyasal kayma formülü elde edilir.

$$\delta = \frac{\nu_{\text{örnek}} - \nu_s \text{ tan dart}}{\nu_{\text{cihaz}}} \cdot 10^6 \quad (1.20)$$

$\delta$  = Kimyasal kayma

$\nu_{\text{örnek}}$  = Numunenin rezonans frekansı

$\nu_{\text{standart}}$  = Standardın rezonans frekansı

$\nu_{\text{cihaz}}$  = Cihazın çalıştığı frekans

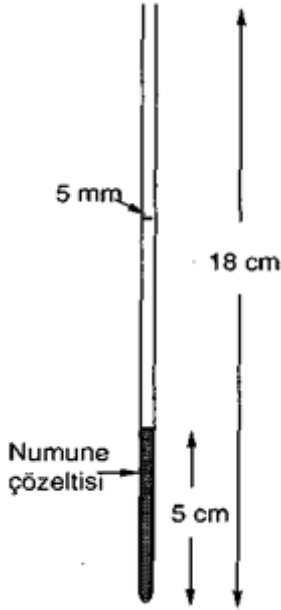
Standardın rezonans frekansı  $\nu_{\text{standart}} = 0$  olarak kabul edilirse,

$$\delta = \frac{\nu_{\text{örnek}}}{\nu_{\text{cihaz}}} \cdot 10^6 \quad (1.21)$$

denklemini elde edilir.

### 1.1.6 NMR Ölçümü İçin Numunelerin Hazırlanması

NMR spektrumlarının kaydedilmesinde numune hazırlanması önemlidir. Numunenin hazırlanmasında gösterilecek özen, iyi bir spektrum alabilmek için aranan şartlardan birisidir. Ölçülecek olan numunenin bir çözücü içerisinde çözülmesi şarttır. CW-NMR cihazlarında ölçülecek olan numunenin 10-50mg arasında olması ve bu miktarın 0.5ml çözücü içerisinde çözülmesi gerekir. FT-NMR cihazlarında ise 1mg numune ölçüm için yeterli olup, ölçüm süresi uzatıldığı zaman çok daha küçük miktarlardan spektrum kaydı mümkündür. Hazırlanan numune NMR tüpüne konur. NMR tüpü 18 cm boyunda 5mm çapında özel bir camdan imal edilmiştir (Şekil 1.12). Ölçülecek numunenin çözeltisi hazırlandıktan sonra özel cam krozeden süzülmesi tavsiye edilir. Ortamda herhangi bir yabancı maddenin olmaması gerekir. Özellikle çözelti içerisinde yüzen, çıplak gözle zor görülen çok küçük parçacıklar (örneğin; filtre kâğıdının tüyleri) manyetik alanın homojenliğini bozar ve pikler genişler.



Şekil 1.12. NMR tüpünün görünümü

Ayrıca tüpe doldurulan numune yüksekliğinin 4-5cm civarında olması gerekir. Bu noktaya özellikle dikkat etmek gerekir. Çözücü miktarı az olduğu zaman spektrum kaydı mümkün olmaz. Aşırı çözücü alındığı zaman da, hem maddenin konsantrasyonu azalmış olur, hem de pahalı çözücü boş yere kullanılmış olur. Bunun yanı sıra, aşırı çözücü ile dolu bir tüp dönme sorunu yaratır. Bu da rezülasyonu etkiler. Ölçüm

esnasında, manyetik alanda bulunan inhomojenliğin kısmen elimine edilebilmesi için, tüp basınçlı hava yardımı ile sürekli olarak belli bir hızda döndürülür.

NMR ölçümlerinde çözücü seçimi önemlidir. Alınan çözücü miktarı (500mg) ile numune miktarını (1-50mg) kıyaslandığında, çözücü miktarının 10-100 katı daha fazla olduğu görülür. Böyle bir durumda, eğer çözücü molekülleri proton içeriyorsa, bunların sinyalleri de NMR spektrumunda gözlenecek ve pik şiddetleri, numuneye ait piklerin 10-100 katı olacaktır. Bu durumda çözücü pikleri, numune pikleri ile çakışacak ve spektrum yorumu yapmak mümkün olmayacaktır.

O halde, seçilecek olan çözücüde aranacak bazı özelliklerin olması gerekir. Çözücü, ya proton içermemeli, (karbontetraklorür, tetrakloretilen, karbondisülfür gibi), ya da çözücü protonları döteryum (D) ile değiştirilmelidir. Proton içermeyen çözücülerden CCl<sub>4</sub> sık kullanılır ve en ucuz çözücüdür. Ancak, polaritesinin düşük olması, her zaman kullanım alanını sınırlamaktadır. Polar bileşiklerin çözünebilmesi için, polar çözücülerin kullanılması gerekir. FT-NMR cihazlarında, ölçüm yapılmadan önce, ölçüm esnasında alan kaymasını önlemek için, alanın kilitlemesi gerekir. Alan kilitlemede, baz sinyali olarak döteryum sinyali kullanılır. Bu nedenle, FT-NMR cihazlarında mutlaka döteryumlu çözücü kullanmak şarttır. Örneğin, CCl<sub>4</sub>, CS<sub>2</sub> gibi çözücüler, yalnız CW cihazlarında kullanılır. Eğer bu çözücülerle FT cihazlarında ölçüm yapmak isteniyorsa, bunların en az 1:1 oranında döteryumlu çözücülerle karıştırılması gerekir. En yaygın kullanılan döteryumlu polar çözücü kloroform ve sudur (CDCl<sub>3</sub>, D<sub>2</sub>O). Döteryumun spin kuvantum sayısı 1 = 1 olduğundan, döteryum da NMR’ da aktiftir. Yalnız (1.9) nolu rezonans formülüne göre, döteryumun jromanyetik sabiti, protonun jromanyetik sabitinden farklı olduğundan (Çizelge 1.1), döteryumun rezonans bölgesi farklıdır. Kimyasal kayma değerleri verildiği zaman, kullanılan çözücünün de muhakkak belirtilmesi gerekir.

NMR spektroskopisi ile dinamik süreçleri incelemek için -185 ile +200 °C arasında NMR ölçümleri yapmak gerekir. Bu durumda, çözücü seçiminde özenli olmak gerekir. Düşük sıcaklıklarda, çözücü donma noktası ve numunenin çözünürlüğü dikkate alınarak, çözücü seçimi yapılmalıdır. Çok düşük sıcaklıklarda yapılan ölçümlerde, genelde iki çözücü karışımı tercih edilir.

### 1.1.7. Kimyasal Kaymayı Etkileyen Faktörler

Diamanyetik perdeleme Şekil 1.10'da gösterildiği gibi çekirdek etrafında bulunan elektronların sirkülasyonundan oluşur ve dış manyetik alanın etkisini azaltır. Lamb yasasına göre diamanyetik etki, çekirdek ile elektronlar arasındaki mesafe ile ters orantılıdır. Buna göre s-orbitalinde bulunan bir elektron çok daha kuvvetli bir perdeleme oluştururken, p-orbitalinde bulunan bir elektron çekirdeğe olan uzaklığından dolayı daha az bir perdeleme oluşturacaktır. Hidrojen atomu çevresinde yalnız s-orbitali bulunduğundan, diamanyetik perdeleme  $^1\text{H-NMR}$  için çok önemlidir ve protonların kimyasal kayma değerlerini belirleyen faktördür. Bu nedenle diamanyetik perdeleme sabiti  $\sigma_{\text{dia}}$ 'nın  $^{13}\text{C}$ -çekirdeklerinin kimyasal kayma değerlerine önemli bir katkısı yoktur.

Paramanyetik katkı ise daha çok elektron yoğunluğunun küresel dağılmadığı çekirdeklerde gözlenir. Protonun dış yörüngesinde bulunan iki elektron s-orbitalinde küresel olarak dağılmıştır. Karbon çekirdeğinde ise iki dolu s-orbitalinin yanı sıra, kısmen dolu 2p orbitali bulunur. Bu nedenle dış yörüngede bulunan elektronlar küresel olarak, yani simetrik bir şekilde dağılmamışlardır. Elektronların simetrik dağılmaması, çekirdek etrafındaki sirkülasyon hareketini azaltmaktadır. Sirkülasyon azalınca Lenz yasasına göre oluşan  $H_1'$  in etkisi azalmaktadır. Diamanyetik perdeleme ile paramanyetik perdeleme birbirlerine göre zıt yöndedirler. Proton için paramanyetik perdeleme söz konusu değildir. Protonda paramanyetik perdeleme oluşabilmesi için s-elektronlarının uyarılması gerekir. s-elektronlarının uyarılması için gerekli enerji çok yüksek olduğundan protonların paramanyetik perdelenmesi mümkün değildir. p-Elektronlarının uyarılma enerjileri daha düşük olduğundan paramanyetik perdelemeye olan katkıları daha fazladır. Bu açıklamalar doğrultusunda,  $^{13}\text{C}$ -çekirdeklerinin kimyasal kayma değerlerini etkileyen en önemli faktörün paramanyetik perdeleme olduğunu söylenebilir. Paramanyetik perdeleme,

$$\sigma_{\text{para}} = \frac{e^2 h^2}{m^2 c^2} \Delta E^{-1} r_{2p}^{-3} [Q_{AA} + \sum Q_{AA}] \quad (1.22)$$

şeklindeki Karplus-Pople formülü ile ifade edilmektedir. Burada

$\Delta E$ = Elektronların uyarılma enerjisi

$r$ = 2p orbitali ile çekirdek arasındaki mesafe

$Q_{AA} + \sum Q_{AA} =$  Karbon etrafındaki yük yoğunluğudur.

Yukarıda verilen eşitliğin kalitatif olarak tartışılmasında fayda vardır. Elektronların uyarılma enerjileri doğrudan paramanyetik perdelemeyi etkilemektedir. Doymuş bileşiklerde  $\sigma-\sigma^*$  geçişleri enerji açısından oldukça zengin geçişlerdir (10 eV). Bu nedenle bu bileşiklerde paramanyetik perdeleme sabitinin kimyasal kaymaya fazla katkısı yoktur ve rezonanslar genelde yukarı alanda gözlenir. Çift bağlarda  $\pi-\pi^*$  geçişleri, karbonil gruplarında  $n-\pi^*$  geçişleri gözlenir ve gerekli geçiş enerjileri  $AE = 7$  ve  $8$  eV civarındadır. Uyarılma enerjisi düşünce, paramanyetik perdeleme değeri artmaktadır. Paramanyetik perdelemenin artması, rezonansların aşağı alana kayması anlamına gelir.

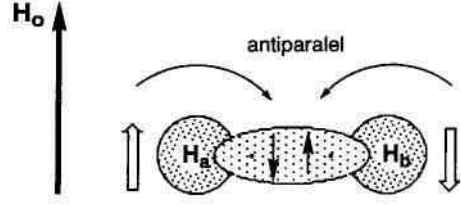
Kimyasal kayma değerlerini etkileyen diğer önemli bir parametre;  $2p$  orbitalinin çekirdekten olan uzaklığıdır. Bu mesafe sabit olmayıp çekirdeğin yüküne bağlıdır. Karbon çekirdeği etrafında yükün artması, elektrostatik itmeden dolayı  $p$ -orbitallerinin genişlemesine, dolayısıyla orbitalin çekirdekten ortalama uzaklığının artmasına sebep olur. Orbitalin çekirdeğe olan uzaklığının artması da paramanyetik perdelemeyi azaltır ve kimyasal kayma değerleri yukarı alanda gözlenir.

### 1.1.8. Spin-Spin Etkileşmesi

İki çekirdek arasında spin-spin etkileşmesi, çekirdekleri birbirine bağlayan elektronlar aracılığı ile meydana gelmektedir. Spin-spin etkileşmesi için üç ayrı mekanizma varsa da, protonlar arasında olan etkileşme için geçerli olanı, çekirdeğin manyetik momenti ile bağ elektronlarının spinleri arasındaki etkileşme mekanizmasıdır. Birbiri ile doğrudan bağlı iki proton (hidrojen molekülü) incelendiğinde, iki hidrojen atomu arasında iki elektronun oluşturduğu bir  $\sigma$ -bağı vardır. Bu elektronlardan biri, hidrojen atomlarından birine, diğeri ise diğer hidrojen atomuna daha yakındır.  $H_a$  atomunda çekirdek spininin dış manyetik alan ile paralel yönlendiği düşünüldüğünde, çekirdek spininin paralel yönlenmesi,  $\sigma$ -bağında bulunan elektronlardan daha yakın olan elektronun spinini, etkileşme sonucu anti paralel yönlenmeye zorlayacaktır. Böylece, Hund yasasına göre, ikinci elektronun spini paralel yönlenecektir. İkinci elektron,  $H_b$  atomuna daha yakın olduğundan, spin etkileşmesi sonucu,  $H_b$ 'nin çekirdek manyetik momenti anti paralel yönlenecektir. Sonuçta hidrojen atomlarından birinin ( $H_a$ ) manyetik momentinin, manyetik alanda belli bir şekilde yönlenmesi, elektronlar üzeri

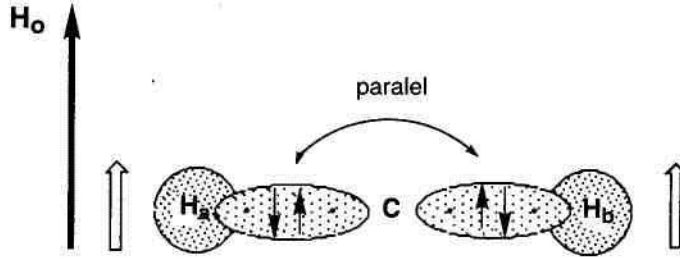


etkileşim ile ikinci çekirdeğin yönlendirmesini belirleyecektir (Şekil 1.13). Eğer  $H_a$  çekirdeği paralel yönlendirilmiş ise,  $H_b$  çekirdeği anti paralel yönlenecek, başka bir deyişle,  $H_b$  çevresinde manyetik alan şiddeti azalacaktır. Bu tür etkileşmelerde, yani tek bağ üzerinden olan etkileşmelerde ( $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ ) etkileşme sabitlerinin değerleri pozitifdir.



Şekil 1.13.  $\text{H}_2$  molekülünde spin-spin etkileşmesinin şematik olarak gösterilişi

Etkileşen protonlar arasında üçüncü bir atom bulunduğu zaman (geminal etkileşme) durum biraz farklıdır (Şekil 1.14).

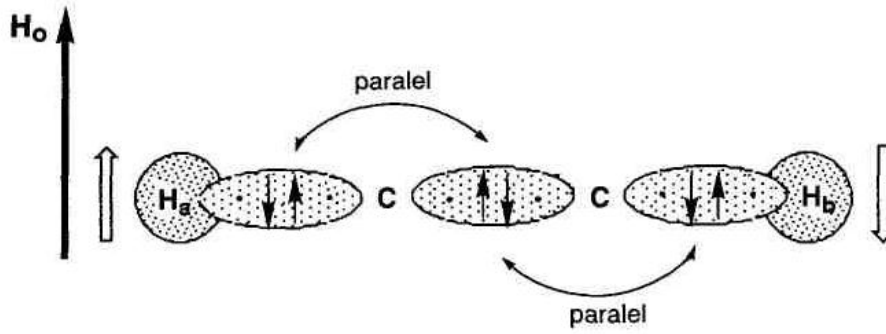


Şekil 1.14. Metilen protonları arasında oluşan geminal etkileşmenin şematik olarak gösterilişi

$H_a$  çekirdeğinin manyetik momenti dış manyetik alan ile paralel yönlendirilmiş ise, komşu elektronun spinini anti paralel yönlendirir ve karbon atomuna daha yakın olan elektron spinini de paralel yönlendirir. Hund yasasına göre; bir atom etrafında bulunan farklı orbitallerdeki elektronlardan, o atoma yakın olanların spinleri genelde paraleldir. Buna göre,  $\text{CH}_2$   $\sigma$ -bağında bulunan elektronlardan karbon atomuna daha yakın olan elektron spinini de paralel yönlendirir. Diğer elektron, aynı orbital içerisinde bulunduğu için, antiparalel yönlendirilmeye zorlanır. Bu da  $H_b$  çekirdeğinin manyetik momentini paralel yönlendirmeye zorlar. Bu nedenle geminal spin-spin etkileşmelerinde etkileşme sabitleri genel olarak negatiftir. Etkileşme sabitinin negatif veya pozitif

olması tamamen bir tanıma bağlıdır. Eğer bir çekirdeğin manyetik momenti, diğer çekirdeğin manyetik momentini anti paralel yönlenmeye zorlarsa etkileşme sabitleri pozitif, paralel yönlenmeye zorlarsa, etkileşme sabitleri negatif değerler alır.

En sık rastlanan ve yapı tayininde önemli rol oynayan etkileşme, üç bağ üzerinden olan visinal etkileşmedir. Visinal etkileşmede birinci protonun manyetik momenti, etkileştiği ikinci protonunun manyetik momentini anti paralel yönlendirmektedir (Şekil 1.15). Bu nedenle visinal spin-spin etkileşmesinde elde edilen sayısal değerler genelde pozitifdir.



Şekil 1.15. Visinal etkileşen iki protonun çekirdek ve elektron spinlerinin şematik olarak gösterilişi

### 1.1.8.1. Spin-Spin Etkileşmesini Etkileyen Faktörler

Protonlar arasındaki etkileşme sabitleri sayısal değerlerle (Hz cinsinden) ifade edilir. Bu değerlerin belirlenmesi ile molekül yapısı hakkında önemli bilgiler elde edilir.

Spin-spin etkileşmeleri, protonlar arasındaki bağ sayısına göre sınıflandırıldığında, etkileşen protonlar arasındaki bağ sayısı  $n$ , etkileşme sabiti  $J$  olmak üzere, etkileşen protonlar arasındaki bağ sayısı  $J$ 'nin sol üst köşesine, etkileşmenin hangi protonlar arasında olduğu da  $J$ 'nin sağ alt köşesine yazılarak  ${}^nJ_{ab}$ ,  ${}^nJ_{13}$  şeklinde gösterilir. Etkileşen protonlar arasındaki bağ sayısı

- $n = 1$  için yalnız  $H_2$  molekülü vardır. Hidrojenin haricinde bu gruba dahil olan başka bir molekül olmadığından, bu grubun önemi yoktur.  $H_2$  için etkileşme sabiti  ${}^1J_{HH} = 280$  Hz'dir.

- b)  $n = 2$ : Etkileşen protonlar arasındaki bağ sayısı iki ise, protonlar aynı karbon atomuna bağlı olurlar ve bu etkileşmeye geminal etkileşme denir ve  $^2J$  ile gösterilir.
- c)  $n = 3$ : Etkileşen protonlar arasındaki bağ sayısı üçtür. Organik kimyada en sık rastlanan bu etkileşmeye visinal etkileşme denir ve  $^3J$  ile gösterilir. Genel olarak komşu iki karbona bağlı olan protonlar arasında gözlenen etkileşmedir. Yalnız karbon atomları arasında tek veya çift bağ olabilir. Çift bağlar tek bağ olarak dikkate alınır.
- d)  $n = 4$ : Etkileşen protonlar arasındaki bağ sayısı dördür. Etkileşen protonlar arasındaki bağ sayısı 3'ten fazla olunca bu etkileşmelere uzun mesafe etkileşmeler denir. Daha çok çift bağ içeren sistemlerde gözlenir. Bunların tipik örneği, aromatik halkalarda meta etkileşme ve alilik sistemlerde alilik etkileşmedir.
- e)  $n = 5$ : Aralarında 5 bağ bulunan proton-proton etkileşmesi de uzun mesafe etkileşmesi olarak adlandırılır ve yaygın olarak aromatik bileşiklerde para etkileşmesi, asiklik sistemlerde ise homoalilik etkileşme olarak karşımıza çıkar.

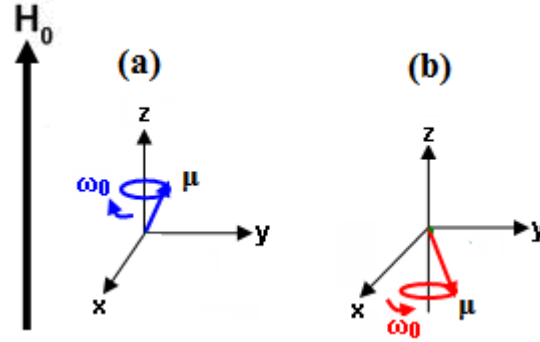
### 1.1.9. Absorpsiyon ve Rezonans

#### 1.1.9.1. Absorpsiyon ve Rezonans Olayının Klasik Olarak İncelenmesi

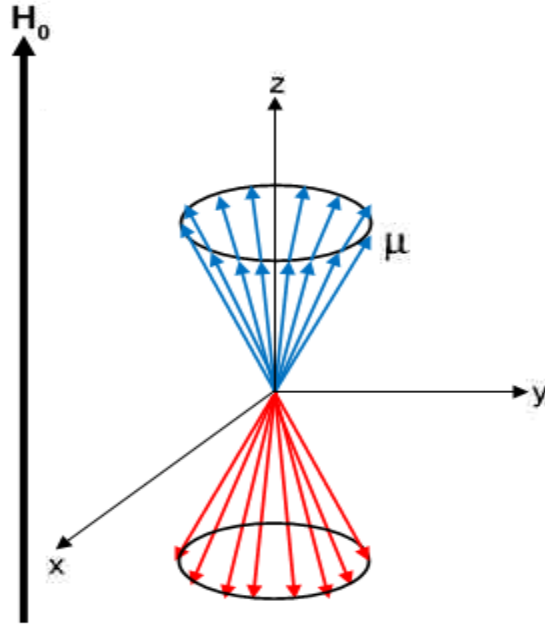
Manyetik bir dipol (atom çekirdekleri) homojen bir manyetik alan içerisine getirildiği zaman, manyetik alan ile çekirdeğin manyetik momenti arasında bir etkileşim meydana gelir. Bu etkileşimde, dış manyetik alan, çekirdeğin manyetik momentini kendisi ile aynı yöne yönlendirmek için bir etki yapar. Çekirdeğin manyetik momenti de buna karşı koymak ister ve dış manyetik alanın yönlendiği eksen etrafında bir presesyon hareketi yapar. O halde, bir çekirdek manyetik alan içerisine getirildiği zaman, çekirdeğin manyetik momenti dış manyetik alan ile statik bir yönlenme yapmaz, aksine dinamik bir presesyon hareketi uygular. Bu harekete örnek olarak Ay'ın kendi ekseni ve dünya ekseni etrafında dönüşü veya bir topacın yapmış olduğu hareket verilebilir. Topaç kendi ekseni etrafında dönerken, topaca yandan vurulan bir darbe ve yer çekimi kuvveti topacı devirmek ister. Topaç bu harekete karşı koymak için presesyon hareketi yapmaya

başlar, yani hem kendi eksenini etrafında döner hem de belli bir yörünge üzerinde ikinci bir dönme hareketi yapar.

Manyetik alan içerisine getirilen çekirdeklerin bir kısmı dış manyetik alana paralel yönlenirken bir kısmı da anti paralel yönlenir. Anti paralel yönlenen çekirdekler de yukarıda bahsedildiği gibi, bir presesyon hareketi yaparlar. Paralel ve anti paralel yönlenen çekirdeklerin presesyon hareketleri Şekil 1.16'da görülmektedir.



Şekil 1.16. a) Manyetik alan ile paralel yönlenmiş bir çekirdeğin presesyon hareketi  
b) Manyetik alan ile anti paralel yönlenmiş bir çekirdeğin presesyon hareketi



Şekil 1.17. Makroskopik bir numunede paralel ve anti paralel yönlenen çekirdeklerin presesyon hareketlerinin toplu bir şekilde görünümü

Bir numuneyi incelerken tek bir çekirdeği ele almak doğru değildir. Makroskopik bir numunede tüm çekirdekleri göz önüne almak gerekir. Boltzmann enerji dağılım yasasına göre, enerji seviyeleri yüksek olan, yani dış manyetik alanla anti paralel yönlenecek presesyon hareketi yapan çekirdeklerin sayısı, paralel yönleneceklere göre daha azdır. Aynı yönde yönlenecek olan çekirdeklerin manyetik momentleri, Şekil 1.17'de görüldüğü gibi, istatistiksel olarak bir koni üzerinde dağılırlar. Çekirdeklerin manyetik momentleri, dış manyetik alan etrafında belli bir frekans ile (belli bir hız ile) presesyon hareketi yaparlar. Bu frekansa Larmor frekansı denir. Larmor frekansı, rezonans koşulunda olduğu gibi, manyetik alanın şiddetine ve ilgili çekirdeğin jromanyetik sabitine bağlıdır.

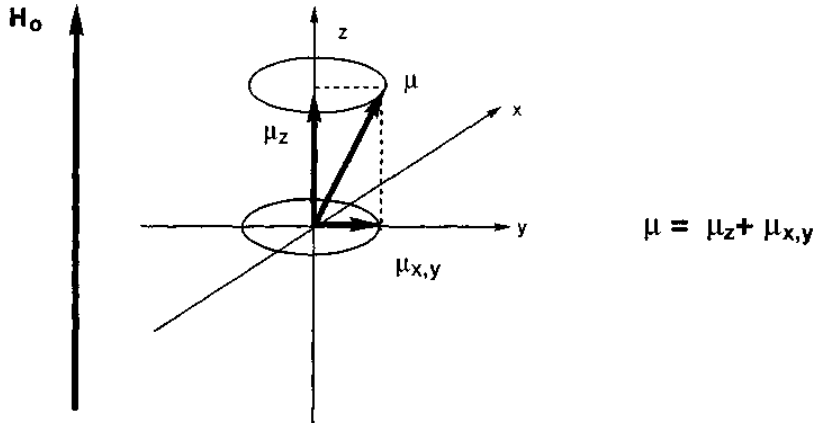
$$\omega_0 = \frac{\gamma H_0}{2\pi} \quad (1.23)$$

$\omega_0$ = Larmor frekansı

$H_0$ = Dış manyetik alan şiddeti

$\gamma$ = Jromanyetik sabiti

Manyetik moment bir vektör olduğundan, bu vektörün z yönünde ve xy düzleminde, Şekil 1.18'de görüldüğü gibi bileşenleri vardır. Makroskopik bir numunede, manyetik momentler bir koni üzerinde istatistiksel bir şekilde dağılmış olduklarından, bunların xy düzleminde bulunan bileşenleri, bu düzlem üzerinde her yönde dağılacığından, bu vektörlerin toplam değeri sıfırdır.

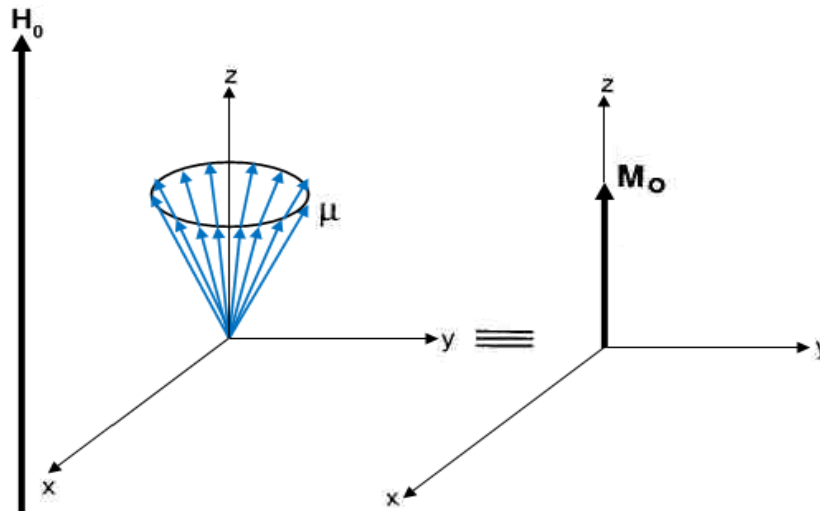


Şekil 1.18. Manyetik momentin z ekseninde ve xy düzleminde olan bileşenleri

Başka bir deyişle

$$\sum \mu_{x,y} = 0 \quad (1.24)$$

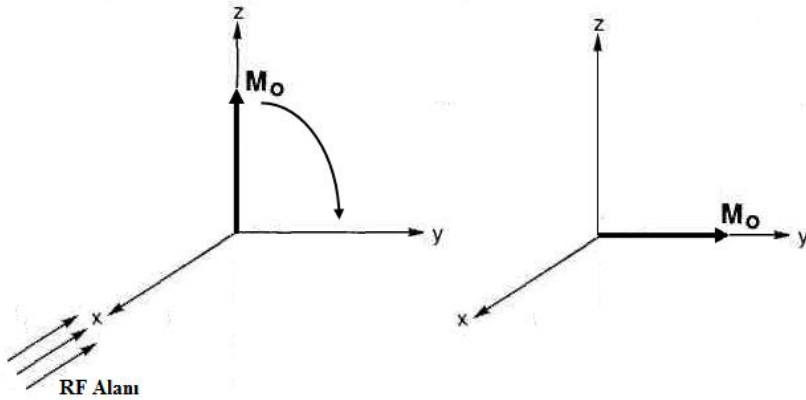
denkleminde, manyetik momentin xy düzleminde bir değeri olmadığı anlaşılır. Yani xy düzleminde bir mıknatıslanma gözlenmez. Diğer taraftan manyetik moment  $\mu$ 'nün z yönündeki bileşenlerinin tümü aynı yönde olduğundan vektörler toplanır ve Şekil 1.19'da görüldüğü gibi toplam bir mıknatıslanma  $M_0$  gözlenir. Yani, çekirdeklerin manyetik alan içerisinde oluşturduğu presesyon hareketleri sonucunda xy düzleminde herhangi bir mıknatıslanma gözlenmez ve oluşan toplam mıknatıslanma  $M_0$  z yönündedir. Bu mıknatıslanma anti paralel yönlenecek çekirdekler için de geçerlidir. Bu kez mıknatıslanma yine z doğrultusunda fakat zıt yöndedir. Burada protonların z istikametinde farklı yönleneceği sonucu zıt yönlü iki mıknatıslanma meydana gelmektedir. Ancak, paralel yönlenecek çekirdeklerin sayısı anti paralel yönlenecek çekirdeklerin sayısından her zaman için fazla olduğundan, net bir mıknatıslanma yalnız z yönünde ve dış manyetik alanla paralel oluşmaktadır. Bu mıknatıslanmaya boyuna (longitudinal) mıknatıslanma denir.



Şekil 1.19. Makroskopik bir numunede boyuna (longitudinal) mıknatıslanma  $M_0$

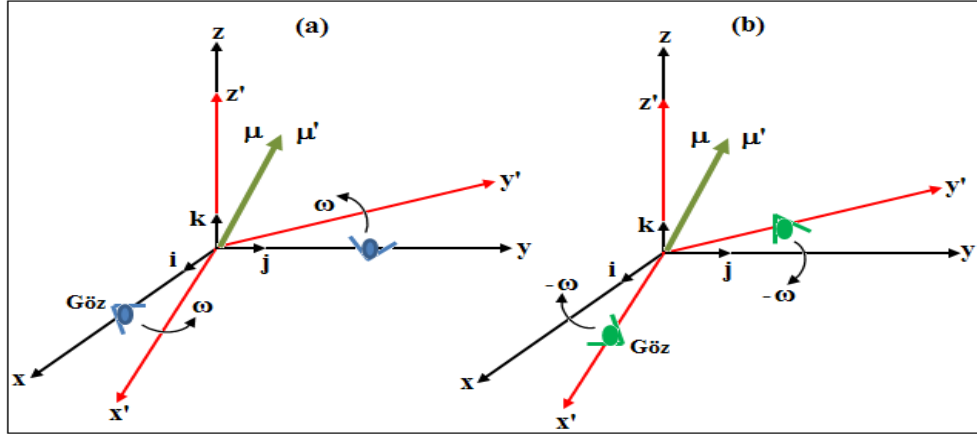
Manyetik alan içerisine getirilen çekirdeklerde önce z ekseninde boyuna mıknatıslanma oluşur. Numune üzerine x yönünden genliği düşük bir radyo-frekans alanı gönderilir. Bu radyo-frekans alanının çekirdeklerin manyetik momentleriyle

etkileşmesi için, bu xy düzleminde dönen bir alan olması ve de açısal hızının Larmor frekansı  $\omega$  ile aynı olması gerekir. xy düzleminde döner bir radyo frekans alanı oluşturmak için, x yönünden sisteme lineer polarize radyo frekans alanı gönderilir. Klasik fizikten bilindiği gibi, lineer polarize bir elektromanyetik dalga, birbirine zıt yönde hareket eden iki dairesel kutuplu elektromanyetik dalgadan oluşur. Dairesel kutuplu bileşenlerden birisi Larmor frekansı ile aynı yönde olduğundan, etkileşme yalnız bir bileşenle gerçekleşir. Bu şartlar oluştuğunda, yani çekirdeklerin Larmor frekansları ile dönen manyetik alanın açısal hızı eşit olduğunda, radyo frekans alanı ile çekirdeklerin manyetik momentleri arasında bir etkileşim olur ve daha önce z yönünde yönlenmiş olan boyuna mıknatıslanmanın ( $M_0$ ) yönü değişir. Klasik fizikten bilinen sağ el kuralına göre; etki eden manyetik alan x yönünde olduğundan, boyuna mıknatıslanma  $M_0$  Şekil 1.20'de görüldüğü gibi y yönüne doğru çevrilir. Boyuna mıknatıslanma, y eksenine doğru çevrildikten sonra, mıknatıslanma vektörü xy düzleminde Larmor frekansı ile rotasyon hareketine devam edecektir.



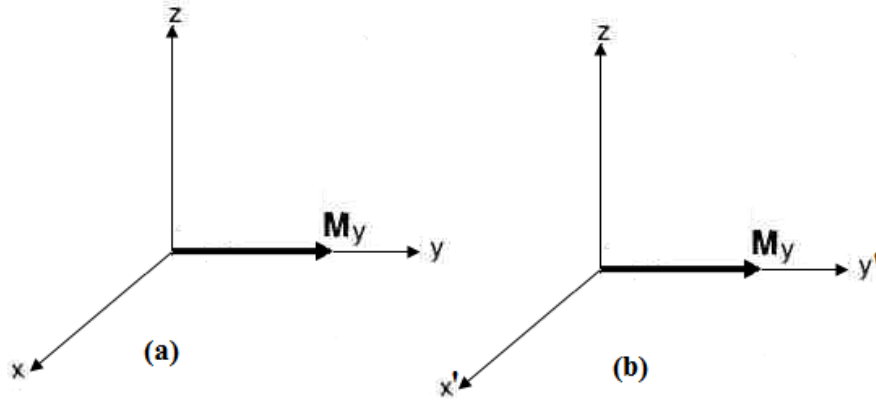
**Şekil 1.20.** Makroskopik bir numunede boyuna mıknatıslanmanın RF alanı etkisi ile y yönüne çevrilmesi

Bundan sonra gelişecek olan konuların daha iyi anlaşılabilmesi için Trossey tarafından dönen koordinat sistemi geliştirilmiştir. Döner koordinat sisteminde xy düzlemi, z eksenine etrafında Larmor frekansı ile dönmektedir (Şekil 1.21). Bu koordinat sisteminde eksenler  $x'$ ,  $y'$  ve  $z$  şeklinde gösterilir.



Şekil 1.21. a) Normal sabit koordinatlara (Laboratuvar Koordinatları) göre dönen sistemin hareketi, b) Trossey tarafından geliştirilen döner koordinatlara göre Laboratuvar sisteminin hareketi

Sabit koordinat sisteminde mıknatıslanma vektörü  $M_y$ ,  $xy$  düzleminde Larmor frekansı ile dönerken, döner koordinat sisteminde  $y'$  yönünde sabit kalmaktadır.



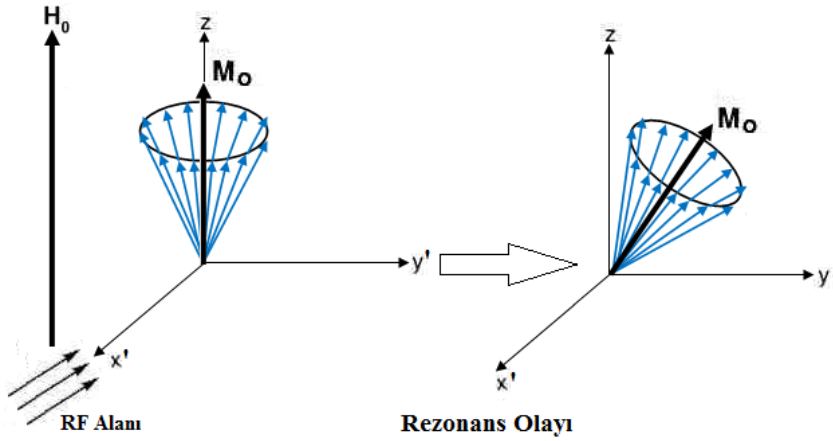
Şekil 1.22. Mıknatıslanma vektörünün a) sabit koordinatlarda b) döner koordinatlarda hareketi

Döner koordinat sisteminde  $y'$  yönünden bakıldığında, mıknatıslanma vektörü  $M_y'$  nin sabit olduğu görülür (Şekil 1.22).

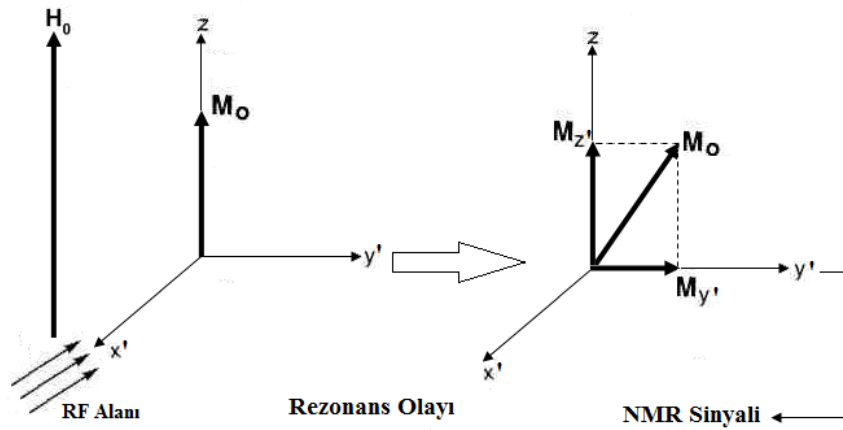
Mıknatıslanmanın RF alanının etkisi ile  $y'$  yönüne çevrilmesine rezonans olayı denir. Çekirdekler manyetik alanda yönlendiği zaman yalnız  $z$  doğrultusunda bir mıknatıslanma oluştururlar. RF alanının etkisi ile mıknatıslanmanın  $y'$  eksenine doğru çevrilir. RF alanı belli bir süre makroskopik mıknatıslanma  $M_0$  üzerine etki ederse çekirdeklerin manyetik momentlerinin oluşturduğu koni, etki süresine bağlı olarak,  $z$  ekseninden, saparak  $y'$  yönüne döner (Şekil 1.23).



Makroskopik mıknatıslanma  $M_0$ 'ın  $y'$  eksenine doğru yönelmesi ile daha önce  $y'$  eksenine doğrultusunda bir bileşeni olmayan mıknatıslanma vektörünün şimdi  $z$  ve  $y'$  eksenlerinde iki bileşeni vardır. Başka bir deyişle  $M_0$  şimdi  $M_z$  ve  $M_{y'}$  nin bileşenidir. Bu durumda daha önce  $y'$  ekseninde hiç bir bileşeni olmayan mıknatıslanma vektörünün şimdi  $y'$  doğrultusunda bir bileşeni oluşmuştur. Bu olay Şekil 1.24'de gösterilmiştir,  $y'$  yönünde bulunan bir RF alıcısı, oluşan mıknatıslanmayı, başka bir deyişle bu yönde oluşan bir voltajı, sinyal olarak kaydeder. Kaydedilen bu sinyal, NMR sinyalinden başka bir şey değildir,  $y'$  eksenine doğrultusunda gözlenen mıknatıslanma ne kadar fazla ise, gözlenen sinyalin şiddeti o oranda fazla olur. Daha sonra da göreceğimiz gibi, RF alanının etki süresi mıknatıslanma  $M_0$ 'ın  $y'$  eksenine doğru çevrilme açısını etkiler. RF alanı ne kadar uzun süre etki ederse,  $y'$  istikametinde oluşan mıknatıslanma o kadar fazla olur. Sonuçta daha şiddetli bir sinyal gözlenir.



Şekil 1.23. a) Makroskopik mıknatıslanma  $M_0$  ile RF alanının etkileşmesi b) Mıknatıslanma  $M_0$ 'ın  $y'$  eksenine çevrilmesi (Rezonans Olayı)



**Şekil 1.24.** Mıknatıslanmanın RF alanı ile etkileşmesi sonucu,  $y'$  eksenine doğru çevrilmesi ve  $y'$  yönünde bir mıknatıslanmanın oluşumu

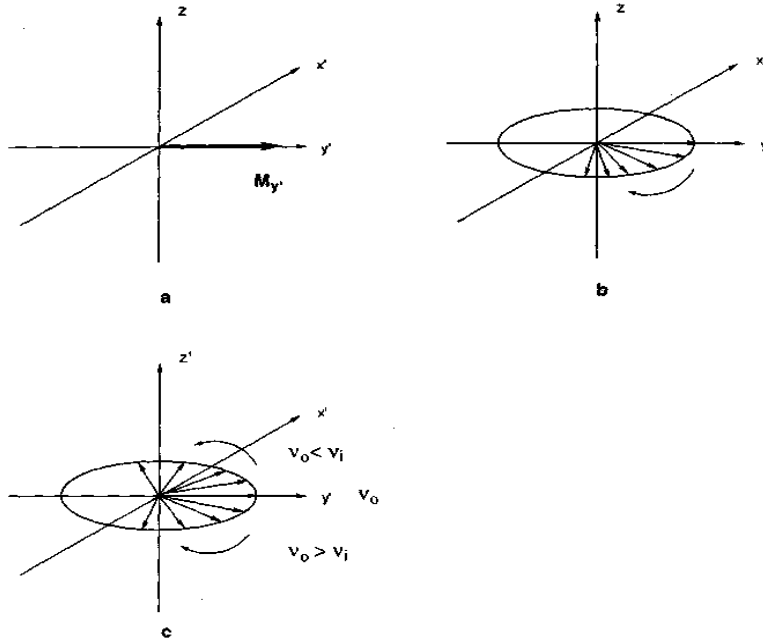
Sonuç olarak rezonans olayı, (NMR cihazında bir sinyalin oluşması) makroskopik mıknatıslanmanın  $x$  ekseninden gönderilen bir radyo frekans alanı ile etkileşerek, mıknatıslanma vektörünü  $y'$  eksenine çevirmesi ve  $y'$  ekseninde oluşan voltajın bir radyo frekans alıcısı ile sinyal olarak kaydedilmesidir. Gerek CW ve gerek FT teknikleri ile NMR sinyali kaydedildiği zaman, eğer sistemden tekrar sinyal kaydetmek isteniyorsa, spin sisteminin eski konumuna tekrar geri dönmesi gerekir.

### 1.1.10. Spin Sistemlerinde Durulma

Bir spin sisteminden bir spektrum kaydettikten sonra, aynı sistemden ikinci bir spektrum alınabilmesi için önce o sistemin tekrar eski konumuna gelmesi gerekir. Bu olaya sistemin rahatlaması anlamında durulma (durulma) denir (Poole ve Harach, 1971). Rezonans olayını incelerken, manyetik moment vektörlerinin dağıldığı koninin belli bir açı kadar  $y'$  eksenine çevrildiği Şekil 1.23'de gösterilmişti. İkinci bir spektrum kaydedebilmek için bu koninin tekrar eski konumuna gelmesi gerekir.

Spin-Örgü Durulması  $T_1$  ve Spin-Spin Durulması  $T_2$  olmak üzere iki farklı durulma olayı vardır. Rezonans olayı esnasında mıknatıslanma vektörünün  $y'$  eksenine çevrilmesi ile  $y'$  ve  $z$  ekseninde mıknatıslanmanın bileşenleri oluşmaktadır.  $z$  ekseninde daha önce de mıknatıslanma vardır, ancak, mıknatıslanma vektörünün  $y'$  eksenine doğru çevrilmesiyle  $z$  ekseninde var olan mıknatıslanma çevrilme açısına bağlı olarak

azalmaktadır.  $y'$  doğrultusunda oluşan mıknatıslanmaya enine (transversal) mıknatıslanma ve enine mıknatıslanmanın kaybolması için geçen zamana spin-spin durulma zamanı ( $T_2$ ) denir.  $y'$  ekseninde oluşan mıknatıslanmanın ( $M_{y'}$ ) azalması veya tamamen ortadan kaybolması mıknatıslanma konisinin tekrar eski haline gelmesi anlamına gelmez. Enine mıknatıslanmanın azalmasını etkileyen iki faktör vardır. Manyetik momentleri bir koni üzerine dağılmış olan çekirdekler Larmor frekansı  $\omega_0$  ile presesyon hareketi yapar. Bu açıklama tamamen doğru değildir. Manyetik alan, çözücü içerisinde hiç bir zaman tamamen homojen değildir. Manyetik alanın inhomojen oluşundan bazı çekirdeklerin manyetik momentleri biraz yavaş, bazı çekirdeklerin ise biraz hızlı olarak dönme hareketi yapmaktadır. Bu farklı dönme hareketi toplam mıknatıslanma değerini etkilememektedir. Ancak, mıknatıslanma  $M_0$ ,  $xy$  düzlemine doğru çevrilince durum farklı olacaktır.



**Şekil 1.25.** a) Enine mıknatıslanma, b) Manyetik momentlerin sabit koordinat sisteminde dağılımı, c) Manyetik momentlerin döner koordinat sisteminde dağılımı

Şekil 1.22'de görüldüğü gibi döner koordinat sisteminde mıknatıslanma vektörünün  $y'$  doğrultusunda sabit kalmaktadır. Bu durum, bütün çekirdeklerin Larmor frekanslarının aynı olması halinde geçerlidir. Makroskopik mıknatıslanma ( $M_0$ ) bir manyetik moment demeti olduğuna göre, bunların içinde Larmor frekansları hızlı ve yavaş olan çekirdekler vardır. Döner koordinatın ortalama bir Larmor frekansı ile döndüğünü düşünülürse, çekirdeklerin Larmor frekansları yavaş ve hızlı olacağından,  $y'$

doğrultusundan çekirdeklerin manyetik momentlerine bakıldığında, bunların bir yelpaze gibi açıldığı görülür (Şekil 1.25). Larmor frekansları yavaş olanlar geriye doğru hareket ederken, hızlı olanlar ileriye doğru hareket edecekler ve sonuçta belli bir zaman sonra manyetik moment demeti  $x'y'$  düzlemi üzerinde bir yelpaze gibi açılacaktır. Belli bir zaman sonra yelpaze gibi açılan bu manyetik momentler eşit bir şekilde  $x'y'$  düzlemi üzerinde dağılacak ve  $x'y'$  düzleminde mıknatıslanmanın değeri kaybolacağından,  $y'$  eksenini doğrultusunda mıknatıslanma  $M_y'=0$  olacaktır,  $y'$  eksenini doğrultusunda, mıknatıslanmanın sıfır olduğu ana kadar geçen süreye spin-spin durulma zamanı  $T_2$  denir. Bazı çekirdekler enerjilerini çevreye (örgüye) vererek tekrar eski durumlarına dönmüş olacaklardır. Bazı çekirdeklerin manyetik momentleri de hala  $x'y'$  düzleminde rotasyon hareketlerine devam edecektir,  $y'$  ekseninde manyetik momentlerin bir yelpaze gibi açılması sonucu ( $M_y'=0$ ) enine mıknatıslanma tamamen kaybolmuş olmasına rağmen, boyuna mıknatıslanma  $M_z$  henüz eski haline gelmemiştir. Çekirdeklerin enerjilerini çevreye (örgü) vererek tekrar eski konumlarına gelmeleri için geçen zamana spin-örgü durulma zamanı  $T_1$  denir. Spin-örgü durulma zamanı her zaman için spin-spin durulma zamanından büyüktür ( $T_1 > T_2$ ). Bunun aksi kesinlikle olamaz. Çünkü boyuna durulma sona ermiş ise, enine durulmanın devam etmesi mümkün değildir. Spin-spin durulması bir entropi olayıdır. Spinlerin dönme hızlarının farklı olmasından ve bunların istatistiksel dağılımından kaynaklanmaktadır. Hâlbuki spin-örgü durulması bir enerji alış verişi olduğu için tamamen bir entalpi olayıdır.

Çekirdek, soğurmuş olduğu enerjiyi dışarı vererek tekrar eski konumuna dönebilir. Bu enerjiyi elektromanyetik bir dalga olarak dışarıya vermesi mümkün değildir. Çünkü ışın yayma olasılığı, yayılan ışının frekansı ile doğru orantılıdır. Soğrulan enerji radyo dalgaları bölgesinde olduğundan bu enerjinin elektromanyetik dalga olarak tekrar dışarı verilmesi düşünülemez. O hâlde enerjinin fazlası örgüye verilir. Çözelti içerisinde bulunan her türlü parçacığa (gaz, sıvı, katı, çözücü molekülleri) örgü denir. Bu moleküller, termal hareketler sonucu çeşitli manyetik alanlar meydana getirirler. Bu yüklü taneciklerin kendilerine özgü dönme hareketleri vardır. Bu oluşan alanların bazılarının frekansı, çekirdeğin presesyon hareketinin frekansına uyar ve enerji, etkileşim sonucu örgüye aktarılır. Örgüye verilen enerji termal harekete, yani kinetik enerjiye çevrilir.

### 1.1.11. Durulma Mekanizmaları

RF pulsu uygulanması ile y yönüne yatırılan  $M_0$  mıknatıslanmasının, puls kesildikten sonra z ekseni doğrultusunda giderek artmak suretiyle, denge durumundaki değeri olan  $M_0'$  a ulaşması sürecine spin-örgü durulma zamanı denir ve  $T_1$  ile karakterize edilir. Diğer yandan y yönüne yatırılan mıknatıslanmanın giderek azalmak suretiyle sifıra inme süresine spin-spin durulma zamanı denir ve  $T_2$  süresi ile karakterize edilir.

Durulma olayı NMR spektroskopisinin en önemli konularından biridir. NMR sinyali, oluşan mıknatıslanma vektörünün zamana göre değişimidir. Başka bir ifadeyle uyarılmış çekirdeklerin durulmasıdır. Durulma zamanı, spektrum ölçümünde dikkate alınması gereken bir noktadır. Bir numune üzerine RF alanı (rezonans için gerekli enerji) gönderildiği zaman, pulsar arasında seçilecek olan bekleme süresi ve mıknatıslanmanın çevrilme açısı gibi parametreler çekirdeklerin durulma zamanlarına göre programlanır. Ayrıca durulma zamanları piklerin genişliğini belirler. Durulma zamanları, bir molekül içerisinde bulunan hidrojen bağları, moleküllerin rölatif hareketleri, sterik etki ve grupların yakınlığı hakkında bilgi verir.

Protonların durulma zamanları oldukça kısa olup, yaklaşık olarak 1s civarındadır. NMR spektroskopisinde, bir numuneden bir spektrum aldıktan sonra, aynı numuneden ikinci bir spektrum alınması gerekiyorsa (puls NMR da bu gereklidir) çekirdeklerin tümünün durulma sonucu tekrar eski konumlarına gelmiş olmaları gerekir.

Rezonans halinde olan bir çekirdeğin fazla enerjisini örgüye vererek tekrar eski konumuna gelmesi gerekir. Bunun için çekirdeğin çevresinde çekirdeğin Larmor frekansına eşit olan döner bir manyetik alanın olması gerekir. Çekirdeklerin durulması için gerekli bu döner manyetik alanlar çekirdeğin etrafında mevcuttur. Moleküllerin belli istikamette translasyon hareketleri, rotasyon hareketleri, molekül içinde bazı grupların rotasyonu, bağların titreşimi, bir molekülde gözlenebilen dinamik olaylardan bazılarıdır. Bu hareketlerin tümünü yüklü parçacıklar elektronlar ve çekirdekler oluşturduğundan, bu hareketlerin olduğu yerde belli frekanslarda döner manyetik alanlar oluşur. Örneğin, bir bağ titreşiminde elektronların hareketinden dolayı manyetik alanlar meydana gelir. Rezonans olmuş bir çekirdeğin eski konumuna gelebilmesi için, Larmor frekansına uygun frekansa sahip bu tür manyetik alanlardan biri ile etkileşmesi gerekir. Başka bir deyimle bir sistemin enerjisini başka bir sisteme devredebilmesi için her iki

sistemin frekanslarının eşit olması gerekir. Rotasyon ve translasyon hareketleri, genelde frekansları yerine, korrelasyon zamanları ( $\tau$ ) ile tanımlanır. Korrelasyon zamanı, translasyon hareketlerinde iki çarpma arasındaki ortalama zaman süresidir. Bir molekül yalnız belli bir yönde hareket etmez. Hareket yönünü, çarpmalar sonucu sürekli olarak değiştirir. Korrelasyon zamanı bir molekül için sınırlı değildir. Bu zamanın maksimum ve minimum değerleri vardır. Belli şartlarda ortalama bir zamandan bahsetmek mümkündür. Bu hareket değişimi ile molekül sürekli değişken manyetik alanlar oluşturmaktadır. Ayrıca oluşan bu manyetik alanların frekansları doğrudan korrelasyon zamanlarına bağlıdır. Rotasyon hareketlerinde ise bir radyan rotasyon için gerekli ortalama zamana korrelasyon zamanı denir. Korrelasyon zamanları; sıcaklık, molekülün büyüklüğü, molekülün şekli ve çözeltilinin viskozitesi gibi faktörlere bağlıdır. Korrelasyon zamanı  $10^{-10}$ s olan bir rotasyon hareketinin frekansı yaklaşık olarak  $10^{10}$ Hz'dir. Bu rotasyon hareketlerinden bazılarının frekansı, çekirdeğin Larmor frekansı ile aynı bölgede olacağından, çekirdek bu manyetik alanlarla etkileşerek fazla enerjisini bu sistemlere (örgüye) verir.

NMR durulma zamanları ve çizgi genişliği ölçümleri, moleküler hareketler hakkında bilgi verir. Bu moleküler hareketler alışıldığı üzere ilgi fonksiyonu ve ilgi zamanı terimleri kullanılarak tanımlanır.

Su molekülleri durumunda 1 saniyedeki Brownian çarpışma sayısı  $10^{12}$  adet olmaktadır. Her bir çarpışmanın iki anı arasındaki  $H(t_i)H(t_i+\tau_i)$  çarpımları düşünülüp bunların ortalaması alınırsa

$$\sum_{i=1}^{10^{12}} \frac{H(t_i)H(t_i + \tau_i)}{10^{12}} = \overline{H(t)H(t + \tau)} \quad (1.25)$$

elde edilir. Buradaki  $G(\tau) = \overline{H(t)H(t + \tau)}$  fonksiyonu oto-ilgi fonksiyonu olarak adlandırılır.  $\tau$ , iki çarpışma esnasında oluşan H hamiltonyenlerinin birbirine bağlı olduğu bir anı göstermektedir ve ilgi zamanı olarak adlandırılır. Brownian hareketler için  $G(\tau) = G_0 e^{-t/\tau}$  şeklindedir.  $G(\tau)$  fonksiyonunun Fourier dönüşümü ise spektral yoğunluk adını alır ve

$$J(\omega) = \int_{-\infty}^{\infty} G(\tau) e^{-i\omega\tau} d\tau \quad (1.26)$$

şeklinde yazılır.

Gözlem altındaki bir çekirdeğin görmekte olduğu manyetik alanın rastgele şekilde dalgalanmasına yol açabilecek her süreç durulmaya yol açabilir. Çekirdeğin görmekte olduğu rastgele değişebilen bir alanın kaynağı; başka bir çekirdeğin manyetik momenti, elektronların manyetik momenti, moleküler akımların sebep olduğu manyetik alanlar, molekül rotasyonunun yol açtığı akımların kurduğu alanlar ve elektrik kuadropol momentinin kurduğu alan gradyenti gibi durumlar olabilir.

Durulmaya yol açan en belirgin etkileşme türleri şöyledir:

**Dipolar Etkileşme:** Örneğe ait spinlerden, gözlem altındaki çekirdek dışındakilerin hepsi, gözlem altındaki çekirdeğin bulunduğu yerde bir manyetik alan oluşturur. Çekirdekler aynı molekülde ya da farklı moleküllerde yer alabilirler. Dipolar durulma, molekül içi (intra moleküler) ve komşu moleküller arası (inter moleküler) terimlere ayrıştırılarak

$$\frac{1}{T_1} = \left( \frac{1}{T_1} \right)_{\text{int } ra} + \left( \frac{1}{T_1} \right)_{\text{int } er} \quad (1.27)$$

şeklinde incelenebilir.

$I_1=I_2=I$  gibi eşit manyetik momente sahip iki spinli bir sistem için,

$$\left( \frac{1}{T_1} \right)_{\text{int } ra} = \frac{2\gamma^4 \hbar^2 I(I+1)}{5r^6} \left\{ \frac{\tau_r}{1+\omega^2 \tau_r^2} + \frac{4\tau_r}{1+4\omega^2 \tau_r^2} \right\}$$

$$\left( \frac{1}{T_1} \right)_{\text{int } er} = \frac{\gamma^4 \hbar^2 I(I+1)}{5r^6} \left\{ 3\tau_r + \frac{5\tau_r}{1+\omega^2 \tau_r^2} + \frac{2\tau_r}{1+4\omega^2 \tau_r^2} \right\} \quad (1.28)$$

şeklinde verilir. Aşırı daralma ( $\omega^2 \tau_r^2 \ll 1$ ) limiti altında,

$$\left(\frac{1}{T_1}\right)_{\text{intera}} = \left(\frac{1}{T_1}\right)_{\text{inter}} = \frac{2\gamma^4 \hbar^2 I(I+1)}{r^6} \tau_r \quad (1.29)$$

yazılabilir.

Benzer olmayan çekirdekler için ( $I_1$  spinine ait jromanyetik oran  $\gamma_1$  ve  $I_2$  spinine ait jromanyetik oran  $\gamma_2$  olmak üzere)  $I_1$  spininin durulmasına  $I_2$  spininin dipolar katkısı (aşırı durulma durumunda)

$$\left(\frac{1}{T_1}\right)_{\text{intera}}^{\text{benzer olmayan}} = \frac{3\gamma_1^2 \gamma_2^2 \hbar^2 I_2(I_2+1)}{r^6} \tau_r \quad (1.30)$$

şeklinde yazılabilir. Dipolar etkileşmenin şiddeti, çekirdekler arasındaki mesafenin 6. kuvveti ile ters orantılı olduğu için, bu tür etkileşmenin gerçekleşebilmesi çekirdeklerin birbirine oldukça yakın olmasıyla ilgilidir. Bu etkileşme türünü modüle eden hareketler takla hareketleri ve yer değiştirmeler olmaktadır (James 1975).

**Kimyasal kayma anizotropisi:** Bu durulma mekanizması dış magnetik alanın ( $H_0$ ) uygulanmış olmasını gerektiren tek durulma mekanizmasıdır. Uygulanan dış alan, moleküldeki akımların tercihli bir yön almasına yol açar. Küresel moleküllerde bu tip akımların kurduğu alanlar z yönündedir ve durulmaya katkı yapmaz. Küresel olmayan moleküllerde bu akımlar xy düzleminde bir alan kurar ve bu alan zamana bağlı olursa, kimyasal kayma anizotropisi durulmaya katkıda bulunur. Aşırı daralma ( $\omega^2 \tau_r^2 \ll 1$ ) limiti altında, kimyasal kayma anizotropisinden kaynaklanan durulma için,

$$\begin{aligned} \left(\frac{1}{T_1}\right) &= \frac{2\gamma^2 H_0^2 (\Delta\sigma)^2 \tau_c}{15} \\ \left(\frac{1}{T_2}\right) &= \frac{7\gamma^2 H_0^2 (\Delta\sigma)^2 \tau_c}{45} \end{aligned} \quad (1.31)$$

ifadeleri yazılabilir. Burada  $\Delta\sigma$  molekülün simetri eksenine dik ve paralel perdeleme sabitleri arasındaki farkı ifade etmektedir.



**Paramagnetik etkileşme:** Çekirdeğin magnetik dipol momentinden 1000 kat daha büyük olması dolayısıyla; elektron ile çekirdek arasındaki dipol-dipol etkileşmesi baskın bir durulma mekanizması olmaktadır. Elektronun dipol momenti, protondan 1000 kat daha şiddetlidir. Elektronla proton arasındaki dipolar etkileşim, bu nedenle oldukça şiddetlidir. Bu etkileşim çeşitli hareketlerle zamana bağlı kılınabilmektedir. Bu nedenle durulmaya çok etkin olarak katkıda bulunurlar.

2 tip elektron-çekirdek etkileşmesi vardır:

- Elektronla çekirdek arasındaki mesafeye göre değişim gösteren dipolar etkileşme;
- Çekirdekteki elektron spin yoğunluğuna bağlı olan kontak etkileşmesi

Dipolar etkileşmenin yol açtığı durulmalar;

$$\left(\frac{1}{T_{1M}}\right) = \frac{2}{15} \frac{S(S+1)\gamma^2 g^2 \beta^2}{r^6} \left\{ \frac{3\tau_c}{1+\omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{7\tau_c}{1+\omega_S^2 \tau_c^2} \right\} + 3 \frac{S(S+1)A^2}{\hbar^2} \left\{ \frac{\tau_e}{1+\omega_S^2 \tau_e^2} \right\}$$

$$\left(\frac{1}{T_{2M}}\right) = \frac{1}{15} \frac{S(S+1)\gamma^2 g^2 \beta^2}{r^6} \left\{ 4\tau_c + \frac{3\tau_c}{1+\omega_I^2 \tau_c^2} + \frac{13\tau_c}{1+\omega_S^2 \tau_c^2} \right\} + \frac{1}{3} \frac{S(S+1)A^2}{\hbar^2} \left\{ \tau_e + \frac{\tau_e}{1+\omega_S^2 \tau_e^2} \right\} \quad (1.32)$$

şeklinde verilir. Burada S elektronun spin kuantum sayısı, g elektronik g faktörü,  $\beta$  Bohr magnetonu,  $\omega_I$  ve  $\omega_s$  ( $\omega_s = 657\omega_I$ ) sırasıyla çekirdek spini ve elektron spini için Larmor açılal frekansları, r iyon-çekirdek mesafesi, A hiper ince bağlanma sabiti,  $\tau_c$  ve  $\tau_e$  ise sırasıyla dipolar ve skaler etkileşmeler için ilgi zamanlarıdır. Bu denklemlerdeki ilk terim dipolar etkileşmenin durulma sürecine katkısını; ikinci terim ise skaler etkileşmenin durulma sürecine katkısını ifade etmektedir.

**Spin Rotasyon Etkileşmesi:** Bir molekülün belli bir eksen etrafındaki dönmeleri, bazı akımlara yol açar. Bu akımların x-y düzleminde kurduğu alanların yol açtığı durulma türüne spin rotasyon etkileşmesi denir. Molekülün dönme hareketleri, moleküldeki yüklerindir akıma dönüşmesine yol açar. Yük hareketinin bir de j açılal momentumu vardır. Bu yük hareketi yani akım, gözlem altındaki spinin bulunduğu yerde bir alan kurar ve söz konusu alan ile I' nın etkileşimi spin rotasyon Hamiltonyenini verir.

Bu Hamiltonyen moleküler çarpımlar üzerinden zamana bağlı olur. İlgili Hamiltonyenin yol açtığı durulma zamanları,

$$\left(\frac{1}{T_1}\right) = \frac{2}{3} \frac{k c^2 I}{\hbar^2} (T) \left\{ \frac{\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} \right\}$$

$$\left(\frac{1}{T_2}\right) = \frac{1}{3} \frac{k c^2 I}{\hbar^2} (T) \left\{ \tau + \frac{\tau}{1 + \omega^2 \tau^2} \right\} \quad (1.33)$$

şeklinde yazılır. Spin rotasyonu mekanizmasının, diğer durulma mekanizmalarına göre önemli bir farkı, artan sıcaklıkla beraber etkileşmenin de daha baskın hale gelmeye başlanmasıdır. Yani sıcaklıkla beraber değişim göz önüne alındığında, diğer mekanizmalar ile spin rotasyon mekanizması birbirlerinin tersi davranış sergilerler. Sıcaklık arttıkça diğer mekanizmalar durulma zamanlarını arttırma eğilimindeyken, spin rotasyon mekanizması durulma zamanlarını azaltma eğilimindedir.

**Kuadropol etkileşmesi:** Kuadropol etkileşme, çekirdeğin çevresindeki elektronik yapının çekirdekte oluşturduğu elektronik alan gradienti ile çekirdek manyetik momentinin etkileşmesi sonucu oluşur. Kuadropolar etkileşmenin durulma zamanlarına katkısı, aşırı daralmada,

$$\left(\frac{1}{T_1}\right) = \left(\frac{1}{T_2}\right) = \frac{3}{40} \frac{2I+3}{I^2(2I-1)} \left\{ 1 + \frac{\eta^2}{3} \right\} \left\{ \frac{eqQ}{\hbar} \right\}^2 \tau_r \quad (1.34)$$

olarak verilir. Burada  $\frac{eqQ}{\hbar}$  kuadropol bağlanma sabiti,  $\eta$  ise asimetri parametresidir.

**Skaler etkileşme:** Skaler spin-spin bağlanması söz konusu olduğunda, bağlanan spinlerden biri çok hızlı bir durulmaya sahipse, bu durumda bu hızlı değişim öbür çekirdeğin durulmasına katkıda bulunur. Bu süreç iki yolla işleyebilir:

- Bağlanılan çekirdeğin kimyasal değiş tokuşu ki buna "birinci çeşit skaler durulma" denir.

- Bağlanılan çekirdeğin hızlı T<sub>1</sub> durulması gerçekleştirilmesi ki buna da "ikinci çeşit skaler durulma" denir.

Birinci çeşit skaler durulma, mesela protonlar hızla değiş tokuş yapan hidroksil protonlarına bağlandığında gerçekleşir.

Skaler durulma etkileşmesi gösteren iki çekirdeğin spinleri I<sub>1</sub> ve I<sub>2</sub> olsun. Bu durumda hızlı durulma gösteren I<sub>2</sub> spinin I<sub>1</sub> in durulmasına skaler etkileşmeden kaynaklanan katkısı,

$$\left(\frac{1}{T_1}\right) = \frac{8\pi^2 J^2 I_2(I_2 + 3)}{3} \left\{ \frac{(T_2)_2}{1 + (\omega_1 - \omega_2)^2 (T_2)_2^2} \right\}$$
$$\left(\frac{1}{T_2}\right) = \frac{4\pi^2 J^2 I_2(I_2 + 3)}{3} \left\{ (T_1)_2 + \frac{(T_2)_2}{1 + (\omega_1 - \omega_2)^2 (T_2)_2^2} \right\} \quad (1.35)$$

şeklinde verilir. Burada (T<sub>1</sub>)<sub>2</sub> ve (T<sub>2</sub>)<sub>2</sub> sırasıyla I<sub>2</sub> çekirdeğine ait spin-örgü ve spin-spin durulma zamanlarıdır. ω<sub>1</sub> ve ω<sub>2</sub> de sırasıyla I<sub>1</sub> ve I<sub>2</sub> çekirdeklerinin açılal frekanslarıdır.

### 1.1.12. Durulma (Durulma) Zamanlarının Ölçülmesi

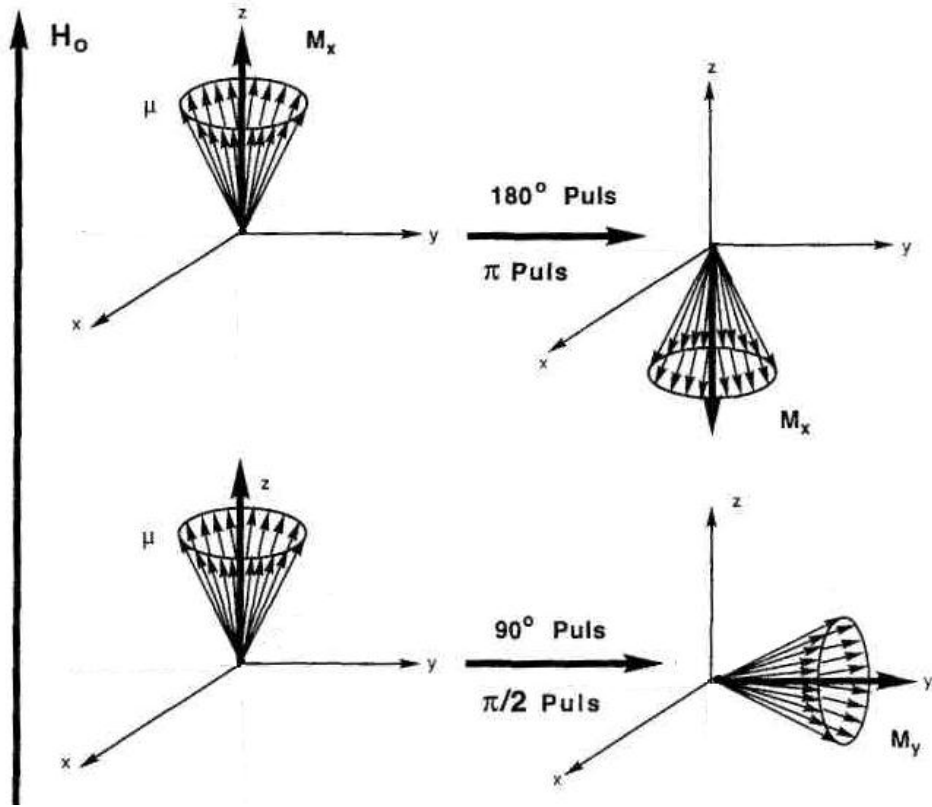
Daha önceki bölümlerde Spin-Örgü Durulması T<sub>1</sub> ve Spin-Spin Durulması T<sub>2</sub> olmak üzere iki farklı durulma zamanının olduğu vurgulanmıştı.

#### 1.1.12.1. Spin-Örgü Durulma Zamanı T<sub>1</sub>' in Ölçümü: Inversion-Recovery Yöntemi

Spin-örgü durulma süresinin ölçülmesi için bilinen en iyi yöntem Inversion-recovery yöntemidir (Vold ve ark. 1968).

Daha önce rezonans olayı altında görüldüğü gibi, makroskopik numune manyetik alan içerisine getirildiği zaman z eksenine doğrultusunda bir mıknatıslanma konisi oluşmaktadır. Bu koni üzerine etki eden radyo frekans alanı ile boyuna mıknatıslanma vektörü belli açılarla y eksenine doğru çevrilmektedir. Radyo frekans alanının etki süresini değiştirerek mıknatıslanma konisi arzu edilen derecede y eksenine doğru çevrilebilir. Mıknatıslanmayı 180° -z eksenine çevirmek için gerekli puls π puls ve 90° y eksenine çevirmek için gerekli puls da π/2 puls olarak adlandırılır (Şekil

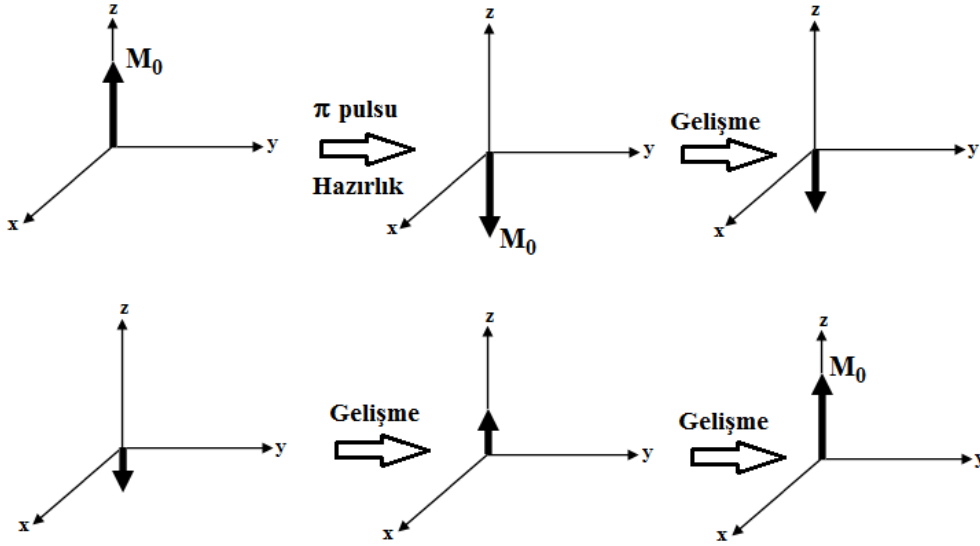
1.26). Makroskopik numune üzerine bir  $\pi/2$  pulsu gönderildiği zaman mıknatıslanma vektörü y eksenine doğru çevrilecek ve maksimum sinyal elde edilecektir,  $\pi$  pulsunda ise durum farklıdır. Mıknatıslanma -z eksenine çevrileceğinden dolayı (y ekseninde herhangi bir indüksiyon olmadığından) herhangi bir sinyal gözlenmez. NMR sinyalinin gözlenebilmesi için mıknatıslanma vektörünün xy düzleminde bir değerinin, başka bir deyimle bir bileşeninin olması gerekir.



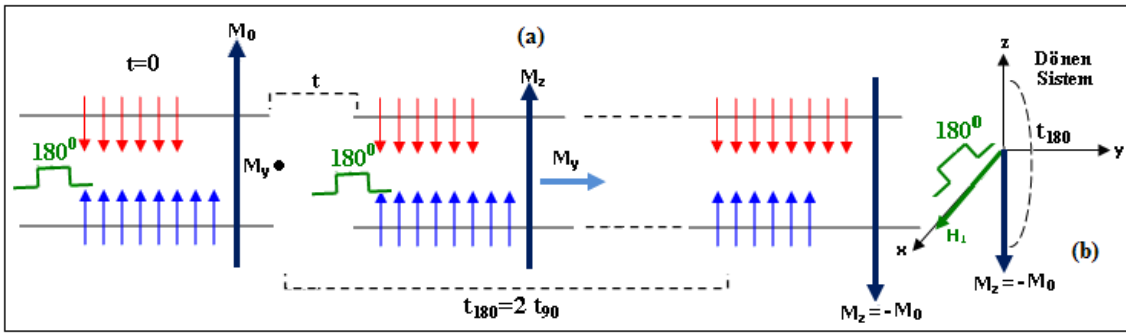
Şekil 1.26. Makroskopik bir numunedeki 180° ve 90° lik pulsların şematik olarak gösterilmesi

Numune üzerine 180° lik bir puls gönderildiğini düşünelim. Bir pulsun numune üzerine etki ettiği devreye bundan böyle hazırlık devresi adı verilir. Önce dengede olan mıknatıslanma vektörü  $M_0$ , -z eksenine doğru çevrilecektir. Sistem kendi haline bırakıldığında, spin-örgü durulma mekanizmasına göre enerjisini çevreye vererek tekrar eski haline dönmeye çalışacaktır. Bu devre gelişme devresi olarak adlandırılır. Bir müddet sonra sistem enerjisinin tamamını çevreye vererek eski konumuna dönecektir. Ancak, bu olayları, NMR ile takip etmek mümkün değildir. Çünkü bütün olaylar

(indüksiyon), Şekil 1.27'de görüldüğü gibi, z ekseninde oluşmaktadır. NMR ile yalnız xy düzleminde meydana gelen mıknatıslanmayı (indüksiyonu) takip etmek mümkündür. Çünkü NMR ölçümlerinde bu düzlemde olan mıknatıslanma ölçülmektedir.



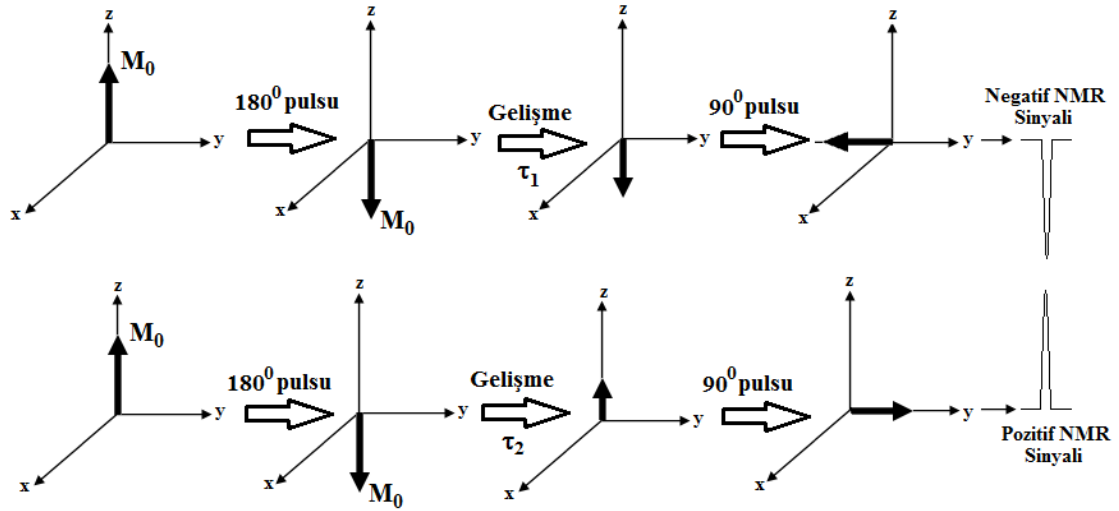
Şekil 1.27.  $\pi$  pulsunun hazırlık ve gelişme safhalarının şematik olarak gösterilmesi



Şekil 1.28. 180 derece pulsunun uygulanışının a) spin gözlüğünden görünmesi b) Dönen sistemden görünüşü

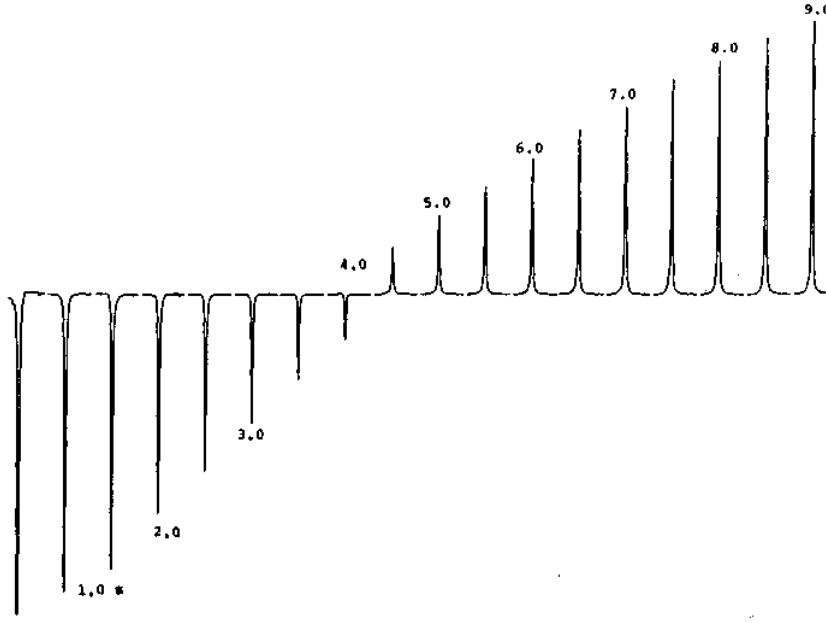
Mıknatıslanmanın -z eksenine çevrilmesinden sonra tekrar sistemin eski haline gelmesi için geçen zamana boyuna durulma denir. Bu zamanın ölçülebilmesi için gelişme safhasının takip edilebilmesi gerekir. Şekil 1.27'de görüldüğü gibi, gelişme safhasının NMR ile takip edilmesi mümkün değildir. Bu devrenin takibi için mıknatıslanmanın, tekrar xy düzlemine çevrilmesi gerekir. Bir başka ifade ile xy düzlemine okuma düzlemi adını da verilebilir. Böyle bir olayın gerçekleşmesi için,

mıknatıslanma vektörünün gelişme safhasında olduğu herhangi bir zaman biriminde, sistem üzerine ikinci bir puls gönderilir. Bu pulsun amacı z ekseninde olan mıknatıslanmayı xy düzlemine doğru çevirmektir. Bunun içinde gönderilen ikinci pulsun  $90^\circ$  lik bir puls olması gerekir. Mıknatıslanmanın o andaki durumuna göre  $\pi/2$  pulsu mevcut mıknatıslanmayı -y veya y eksenine doğru çevirir. Eğer mıknatıslanma gelişme safhasında hala -z istikametinde ise gönderilen  $\pi/2$  pulsu mıknatıslanmayı -y eksenine doğru çevirecektir. Eğer mıknatıslanma z ekseninde ise,  $M_0$  y eksenine doğru çevrilecektir. Her iki durum şematik olarak Şekil 1. 29'da gösterilmiştir.



Şekil 1.29. Gelişme devresinde numune üzerine gönderilen  $90^\circ$  lik bir pulsun mıknatıslanmayı y veya -y doğrultusuna çevirmesi

$90^\circ$ 'lik puls numune üzerine gönderildiği zaman, eğer mıknatıslanma vektörü -z ekseninde ise mıknatıslanma vektörü -y eksenine doğru çevrilir ve mıknatıslanma kayıt devresinde negatif sinyal olarak gözlenir. Eğer mıknatıslanma Şekil 1.29'un ikinci kısmında görüldüğü gibi +z eksenine doğru çevrilmiş ise,  $90^\circ$ 'lik puls mıknatıslanmayı bu kez +y eksenine doğru çevirecektir ve bu da NMR spektrumunda pozitif sinyal olarak gözlenecektir (Şekil 1.30).



**Şekil 1.30.** Kloroform molekülünde protonun inversion recovery (IR) yöntemiyle boyuna durulma süresinin ölçülmesi

Numune üzerine önce  $180^\circ$ 'lik puls gönderilmiş ve daha sonra gelişme devresinde bir süre beklenmiştir. Bu süre operatör tarafından değiştirilebilen bir parametre olduğundan, sürekli olarak değiştirilmiş ve iki puls arasındaki süre her seferinde 0.5s uzatılmıştır. Daha sonra sistem üzerine  $90^\circ$ 'lik puls gönderilerek spektrum kaydı yapılmıştır.  $180^\circ$ 'lik puls ile  $90^\circ$ 'lik puls arasındaki bekleme süresi kademeli olarak değiştirilmiştir. Sinyallerden açık olarak görüldüğü gibi,  $180^\circ$ 'lik pulsun sonrasında bekleme süresi ne kadar kısa tutulursa maksimum negatif sinyal elde edilir. Bu da mantıklı olup beklenen bir sonuçtur. Çünkü  $180^\circ$ 'lik pulsun sonrasında mıknatıslanma vektörünün tamamı -y yönündedir. Sinyal şiddetinin sıfır olduğu zaman, 4.25s'lik bir bekleme süresi sonucunda elde edilmiştir. Bu zamandan faydalanarak durulma süresinin hesaplanması mümkündür. Sistem dengede olduğu zaman mıknatıslanma vektörünü  $M_0$  ile gösterelim.  $180^\circ$ 'lik bir pulsun hemen akabinde mıknatıslanma ancak yönünü değiştirmektedir ve bu durumda olan mıknatıslanmayı da  $-M_0$  ile gösterelim. Durulma esnasında mıknatıslanma  $-M_0$  ile  $+M_0$  arasında değişecektir. Herhangi bir zaman diliminde ( $\tau$ ) ölçülen mıknatıslanmayı da  $M_z$  olarak kabul edelim. Mıknatıslanma  $\pi$  pulsunun sonra zamana göre değişeceğinden bu değişim

$$\frac{dM_z}{dt} = -\frac{M_z - M_0}{t} \quad (1.36)$$

şeklindeki Bloch denklemi ile ifade edilmektedir. Bu denklemin integrasyonu sonucu

$$\ln \frac{M_0 - M_\tau}{2M_0} = -\frac{\tau}{t} \quad (1.37)$$

denklemi elde edilir. Burada mıknatıslanmanın ölçülmesi gerekir. Mıknatıslanma, gözlenen pik şiddeti ile doğru orantılı olduğundan (1.37) nolu denklemi

$$\ln \frac{A_0 - A_\tau}{2A_0} = -\frac{\tau}{t} \quad (1.38)$$

şeklinde de yazılabilir. Burada

$M_0 = t=0$  durumundaki mıknatıslanma

$M_\tau = t=\tau$  durumundaki mıknatıslanma

$A_0 = t=0$  durumundaki pik şiddeti

$A_\tau = t=\tau$  durumundaki pik şiddetidir.

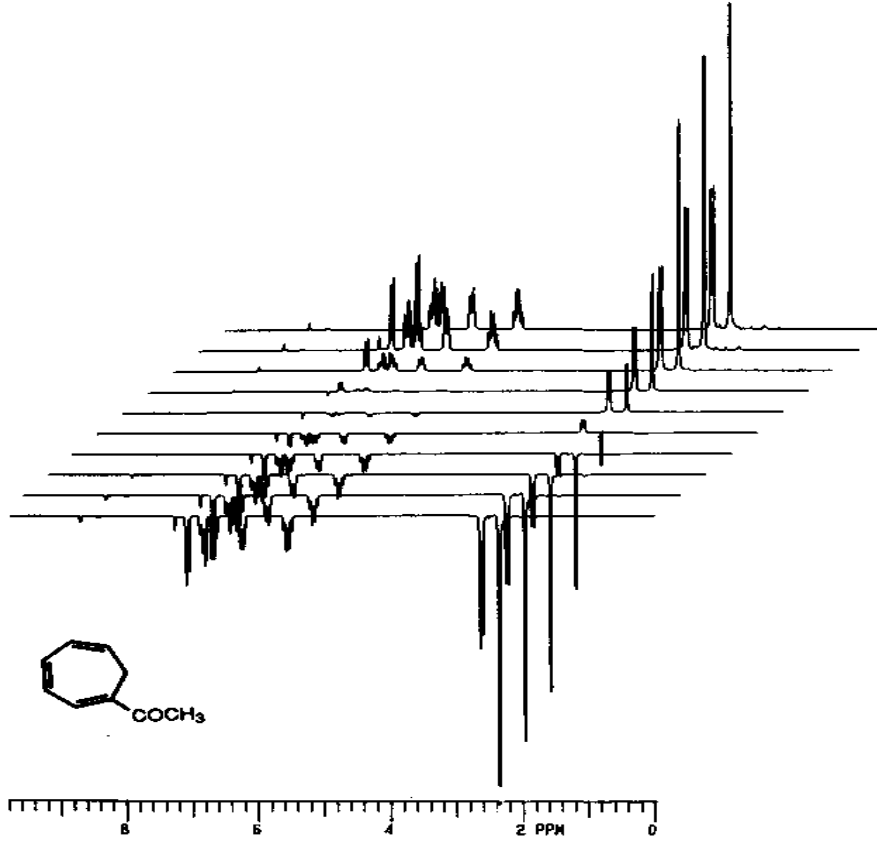
Böylece (1.38) denkleminde herhangi bir pike ait olan çekirdeğin spin-örgü durulma süresi  $T_1$  kolayca belirlenir. Bu formülün daha da sadeleştirilmesi ile durulma zamanı  $T_1$ , sinyal şiddetinin sıfır olduğu zamanın ( $\tau_0$ ) belirlenmesi sonucu

$$T_1 = \frac{\tau_0}{\ln 2} = \frac{\tau_0}{0.69} \quad (1.39)$$

formülü aracılığı ile kolayca hesaplanır.

Herhangi bir numuneye uygulanan inversiyon-recovery (IR) ölçüm tekniği ile numunede bulunan tüm çekirdeklerin durulma zamanları tek tek belirlenebilir. Şekil 1.31'de farklı proton içeren bir bileşiğin spin-örgü durulma zamanını ölçmek için uygulanan inversiyon-recovery spektrumları görülmektedir (Kazaz ve Balcı, yayınlanmamış çalışmalar). Sinyallerin dönüşüm noktalarında gözlenen farklılıklar, protonların durulma sürelerinin farklı olduğunu göstermektedir. Özellikle metilen protonlarının olefinik ve metil protonlarına göre daha erken durdukları spektrumdan nitel olarak görülmektedir.



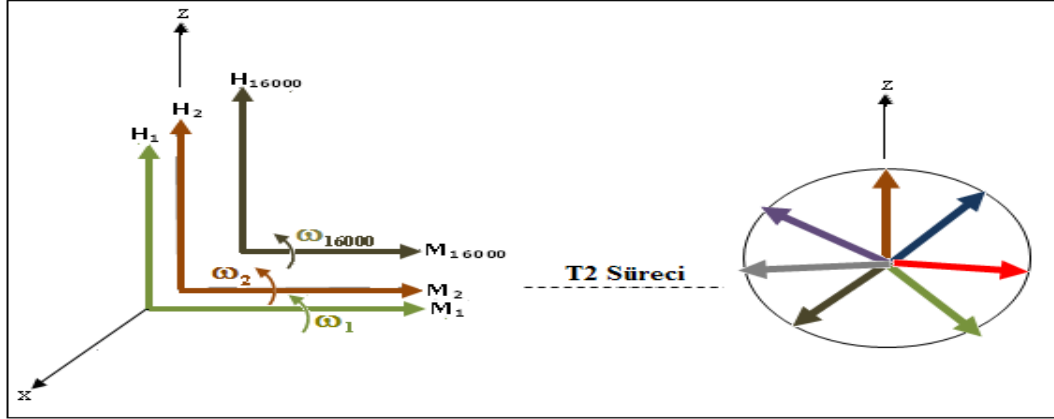


**Şekil 1.31.** Asetilsikloheptatrien bileşiğinde protonların inversiyon-recovery (IR) yöntemiyle belirli sürelerde kaydedilen <sup>1</sup>H-NMR spektrumları

### xy-Düzleminde Enine Durulma

Tek bir çekirdeği (bir proton veya bir karbon) olan makroskopik bir numuneye 90°'lik bir puls verilerek mıknatıslanma vektörü y' eksenine çevrildiğinde, döner koordinat sistemi ile çekirdeklerin Larmor frekanslarının eşit olması durumunda mıknatıslanma vektörü döner koordinat sisteminde sabit kalacaktır. Toplam mıknatıslanma, numune içerisinde dağılmış moleküllerin oluşturdukları manyetik momentlerden meydana gelmektedir. Numune içerisinde bulunan birim hücrelerde etkili olan manyetik alanın homojen olmaması nedeniyle birim hücrelerde mıknatıslanmanın Larmor frekansları farklı olabilir. Bu durumda mıknatıslanma vektörlerinin hızları döner koordinat sistemine göre hızlı ve yavaş olabilir. Daha önce spin durulması bölümünde bahsedildiği gibi, böyle bir durumda manyetik vektörler bir yelpaze gibi açılacak ve xy-düzleminde bulunan enine mıknatıslanmayı azaltacaktır (Şekil 1.32). Boyuna durulma olmamış olsa bile, enine mıknatıslanma zamanla sıfıra doğru gidecektir. Enine

mıknatıslanmanın durulması eksponansiyel olup ve  $T_2$  ile ifade edilmektedir. Şunu unutmamak gerekir ki, boyuna durulma vardır ve çekirdekler enerjilerini örgüye vererek tekrar eski konumlarına, yani z-eksenine geri dönerler. O halde enine mıknatıslanma çekirdeklerin enerjilerini örgüye vermesi ile de azalmaktadır.



Şekil 1.32. Enine mıknatıslanmanın xy düzleminde zamanla azalması

Enine durulmayı etkileyen iki önemli faktör vardır. Birincisi; manyetik vektörleri xy-düzleminde bulunan çekirdeklerin bir enerji alış verişi sonucu eski konumlarına dönüşmeleri, ikincisi; manyetik alanın homojen olmayışından dolayı çeşitli birim hücrelerde bulunan çekirdeklerin Larmor frekanslarının farklı olmasıdır. Birinci olay bir entalpi olayı (enerji alış verişi) ikinci olay ise entropi olayıdır (düzen değişimi). Manyetik alanın homojen olmaması enine durulmayı etkileyen en önemli faktörlerden biridir. Manyetik alanın enine durulmaya olan etkisinin sıfır olduğunu düşünüldüğünde, boyuna ve enine durulmaların birbirlerine eşit olması gerekir. Genel olarak inhomojenlikten kaynaklanan enine durulma dikkate alındığı zaman, enine durulma  $T_2$  ile gösterilmektedir. Manyetik momentlerin xy düzleminde yelpaze gibi açılması mıknatıslanma vektörünün değerini zamanla azaltmaktadır. Bu olay spin-eko deneyi ile önlenmektedir.

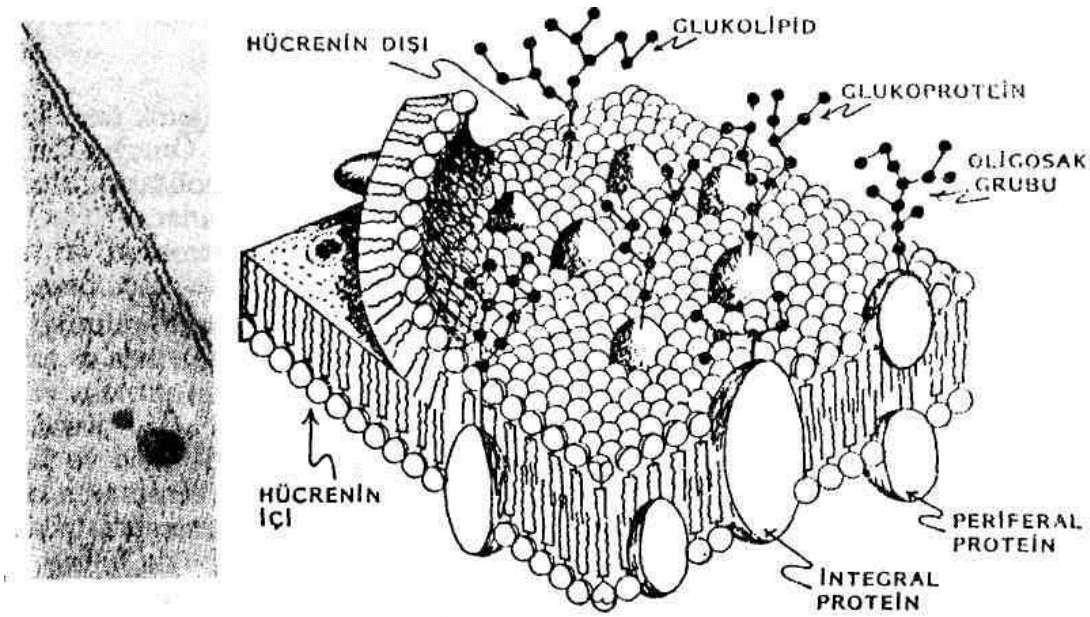
### 1.1.13. Hücre Membranı

Hücre membranı bütün hücrelerde stoplazmanın etrafında bulunan bir membrandır. Bu membran hücreye şekil verir ve hücrenin sınırını belirleyerek seçici bir bariyer vazifesi görmektedir. Bugün hücre membranının dinamik bir yapıya sahip

olduğu ve hücrede pek çok fizyolojik olayların meydana geldiği karmaşık bir yapı olduğu bilinmektedir.

Hücreye ulaşan bütün kimyasal ve elektriksel bilgiler hücreye hücre membranı tarafından aktarılmaktadır. Örneğin hormonlar ancak hücre membranı yüzeyindeki reseptörlere tutunarak aktivitelerini gösterirler. Birçok ilaç ancak hücre yüzeyi ile temas ettikten sonra etkisini gösterir. Enzimlerin pek çoğunun aktivitesi plazma membranında gerçekleşir.

Hücre membranı iki lipid tabaka ve yer yer bu lipid tabakaların dışına tutunmuş veya içine gömülmüş proteinlerden meydana gelmiştir. Bu üç tabakalı hücre membranının yapısı Şekil 1.33 de görülmektedir.



**Şekil 1.33.** a) Hücre membranının üç tabakalı yapısını gösteren elektron mikro fotoğrafı, b) Singer-Nicolson'un hücre membranı için önerdikleri akıcı-mozaik model

Kimyasal ve elektron mikroskobu ile yapılan çalışmalardan elde edilen sonuçlarda, her membranda rastlanan iki lipid tabakasındaki benzerliklerden dolayı S. Jonathan SINGER ve Garth NICOLSON 1972 yılında hücre membranı yapısı için akıcı mozaik modeli önermişlerdir. Akıcı mozaik modelin şematik yapısı Şekil 1.33 de görülmektedir. Onların önerilerine göre membranların ana yapısı ve bütünlüğünü

oluşturan yapısı iki tabakalı polar lipidden meydana gelmiştir. Bu iki tabakalı lipid akıcıdır. Çünkü polar lipid tabakalarının polar olan baş kısımları membranın iki dış yüzüne dönük fakat doymuş ve doymamış yağ asitlerinden meydana gelmiş olan hidrofobik kuyruk kısımları membranın içine dönük olup hücrenin normal sıcaklığında akıcı halde bulunmaktadır. Önerilen akıcı mozaik modelde integral membran proteinlerinin yüzeyinde hidrofobik olan amino asitler yer almıştır. Bu proteinler, iki katlı lipid tabakasının ortasındaki hidrofobik bölgede bu bölge ile bir bütünlük oluşturmaktadır. Diğer taraftan önerilen modele göre periferel yahut ekstrinsik membran proteinleri yüzeylerinde hidrofilik yan zincirleri olan amino asitleri ihtiva etmektedir. Yüzeyleri elektrik yükleri ihtiva eden bu proteinler, yine yüzeyinde bulunan polar lipid başları tarafından elektrostatik olarak çekilmekte ve bir arada tutulmaktadır. Burada dikkat edilmesi gereken bir husus vardır. Membranda yer alan protein molekülleri ve lipidler arasında bir kovalent bağ söz konusu değildir. SINGER-NICOLSON modeli membranın, pek çok fiziksel, kimyasal ve biyolojik özelliklerini açıklamaktadır. Bu nedenle lipid ve proteinden meydana gelmiş membranın en akla yakın yapısı önerildiği için de pek çok kimse tarafından kabul görmüştür.

Membranların pek çoğunda ve bu arada akıcı mozaik model membranlarda bile bir asimetri ve iki yüzleri arasında yapı ve fonksiyon bakımından bir farklılık vardır. İlk etapta membranların iç ve dışa bakan yüzlerinde polar lipidler yerleşmiştir. Bu durum hem bakteri plazma membranlarında ve hem de hayvan hücresi membranlarında görülmektedir.

Hücre membranı, hücreleri bir arada tutan inert bir yapı değildir. Hücre membranı, değişmeyen statik bir yapı da değildir. Hücre membranı inanılmaz biyolojik özelliklere, belirli ve iyi organize olmuş bir yapıya sahip olup, karmaşık dinamik fonksiyonları yerine getiren bir yapıdır. Pek çok membran üzerinde enzim bulunmaktadır.

Membranlar ayrıca elektrikçe yüklü yüzey grupları da ihtiva etmektedir. Bu gruplar sayesinde membranların iki yüzü arasında bir elektrik potansiyeli meydana getirilmektedir. Sinir hücrelerinin fonksiyonu için bu özellik çok önemlidir. Sinir impulslarının hücre gövdesinden aksonlar boyunca nakli için sinir hücrelerinin membranlarının elektrik potansiyeli göstermesi çok önemli bir özelliktir.

Hücre membranı aynı zamanda membranda açılan bir deliği de kendi kendine onarma kabiliyetine sahiptir. Eğer hücre membranı bir iğne ile delinecek veya mekanik olarak yırtılacak olursa, otomatik olarak çabucak tamir edilmektedir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Nükleer manyetik Rezonans (NMR) olgusu, onlarca yıldan beri bilinmektedir ve NMR Spektroskopisi neredeyse elli yıldır fizikokimyasal analizlerde güçlü bir araç olarak kullanılmaktadır. Teknolojinin ilerlemesiyle beraber, skanografide kullanılan analog yapılandırma programlarına benzer programlar kullanılarak, Free Induction Decay (FID sinyallerinin şekle dönüştürülmesi mümkün olmaktadır (Aweda 2003). Nükleer Manyetik rezonans çalışmalarının temelinde, çekirdeğin manyetik özelliği yatmaktadır (Balcı 2004). Elektrik akımı çevresinde bir manyetik alan oluşturur. Ekseni etrafında dönen bir atom çekirdeği de, içerisindeki elektrondan dolayı yüklü olduğundan, çevresinde bir manyetik alan oluşturur. Teknik olarak Manyetik Rezonans, mıknatıslanma özelliğine sahip olan atomların çekirdeğinin davranışlarını inceler (Sandalcı ve ark. 2007).

Protein-ilaç etkileşimi son yıllarda ortaya çıkan önemli bir konu olmaktadır. Önceki yıllarda yapılan çalışmalarda, tedavide kullanılan bazı kanser ilaçlarının, taşıma proteinine (bovine serum albumin, BSA) bağlanma mekanizmaları incelenmiştir. Bu çalışmalarda ilaçların etken maddelerinin NMR sinyallerinin kimyasal kaymaları ve çizgi genişliği üzerine, proteinin etkisi incelenmiş ve BSA' daki bağlanma yerleri bulunmuştur.

Proteinler ile ilaçların bağlanması, ilaçların tedavide kullanılan dozajlarının belirlenmesinde önemli bir rol oynamaktadır. Dolaşım sisteminde, bir ilaç genelde serum albümin ile birlikte bir kompleks olarak taşınır. Kanser tedavisi gibi uzun süreli tedavilerde genellikle çeşitli ilaçların kombinasyonu gerekmektedir. Kombine tedavide kullanılan iki ilaç için taşıma proteinine (BSA) bağlanma mekanizması incelenmiştir. UV ve NMR Spektroskopisi yardımıyla bu ilaçlar arasındaki rekabetin çeşidi tahmin edilmiştir (Sulkowska ve ark. 2004, Martini ve ark. 2006).

İlaç- protein etkileşimi ve ilacın moleküler hareketini analiz etmek için, her bir ilacın özgün proton ve karbon rezonanslarının çizgi genişliği ve kimyasal kayma değerleri, ilaç/BSA molar oranının bir fonksiyonu olarak ölçülmüştür. Kombine tedavide kullanılan ikinci bir ilacın NMR parametreleri üzerine olan etkisi tartışılmıştır (Sulkowska ve ark. 2005).

İlaçların proteinlerle bağlanma çalışmaları farmakolojide büyük bir önem taşımaktadır. Allopurinol-mercaptapurine-serum albümin kompleksinin bağlanma stokiyometrisi daha önceki yıllarda çalışılmıştır (Sulkowska ve ark. 2003).

İnsan serum albümininin (HSA) ligand bağlama özellikleri hakkında daha yeni bilgiler elde etmek için X-ray kristalografi tekniğinin kullanıldığı çalışmalar da vardır (Kragh-Hansen ve ark. 2002).

Protein-ligand bağlanmasının etkileşimin yapısal karakterleri saptanmış hatta bu bağlanmalara dayalı olarak farmakostatik çalışmalar da yapılmıştır (Fasano ve ark. 2005, Ghuman ve ark. 2005, Kandagal ve ark. 2006).

Bazı çalışmalarda protein-ligand bağlanma sabitleri hesaplanmıştır. Ancak bu tip sabitlerin hesabında kullanılan iki temel formül bulunmaktadır. Bu formüller kimyasal kayma ve durulma zamanı ölçümlerine dayanmaktadır (Yusmanov ve ark. 1996, Ma ve ark. 1999, Caravan ve ark. 2002, Fielding ve ark. 2003, Lucas ve ark. 2003, Peng ve ark. 2004, Fielding ve ark. 2005, Chekin ve ark. 2006). Bu iki önemli metot bağlanma sabitlerinin hesaplanmasında kullanılmıştır. Kompleks bağlı sistemlerde denge durumundaki bağlanma sabitlerinin teorik olarak tespit edildiği çalışmalar da mevcuttur (Blondeau ve ark. 1975).

İnsan serum albümini (HSA) ile anti-inflamatuar (anti-ateş) salicylate arasındaki etkileşimin incelenmesinde NMR difüzyon ve durulma ölçümlerinin kullanıldığı çalışmalar da vardır. Bu çalışmalarda, salisilatın (salicylate) self-difüzyon katsayıları ve spin-örgü durulma oranları konsantrasyona bağlı olarak ölçülmüştür. İlaç/HSA kompleksleri için ayırma sabiti  $K_d$  ve bağlanma yerlerinin sayısı hesaplanmıştır (Luo ve ark. 1999).

İlaç ve protein arasındaki etkileşimin incelenmesi ilaç kimyasında çok önemlidir. Serum albümin, insan kan plazmasındaki en bol protein olduğundan dolayı, çalışmalarda sıkça kullanılmaktadır. Albümin, insan kanında ilaçları taşıyan ve depolayan bir rol oynar. Son yıllarda ilaç-protein etkileşmesi NMR ve daha başka birçok fiziksel teknik kullanılarak yoğun olarak çalışılmıştır (Peters 1985, He ve ark. 1992, Ishida ve ark. 1992, Rahman ve ark.1993, Carter ve ark. 1994, Sun ve ark. 1994, Ascoli ve ark. 1995, Aubry ve ark. 1995, Epps ve ark. 1995, Castillo ve ark. 1995, Hage ve ark. 1995, Hashimoto ve ark. 1995, Cheruvallath ve ark.1996, Andrisano ve ark. 1997, Cheruvallath ve ark. 1997, Itoh ve ark. 1997). İlk NMR difüzyon çalışması  $^1H$  ve

$^{19}\text{F}$  sinyallerinin gözlenmesi yoluyla yapılmıştır (Liu ve ark. 1997). Bu çalışmada hem NMR difüzyon hem de durulma metotları, ilaç-protein etkileşmelerine uygulanmış ve aynı sonuçlar elde edilmiştir. Bu göstermiştir ki, ilaçların bağlanma kapasiteleri hakkında bilgi istendiğinde hem difüzyon hem de durulma metotlarının kullanılması uygundur.

Daha önceki diğer bir çalışmada, protein-ligand etkileşmelerinin incelenmesinde NMR metotlarını test etmek için BSA' nın bir model protein olarak kullanılabilirliği tartışılmıştır. Altı farklı ilaç için bağlanma afiniteleri izotermal titrasyon kalorimetresi ve NMR metodu kullanılarak belirlenmiştir (Fielding ve ark. 2005).

Diğer bir çalışmada, sıvı hal NMR' ın, çözeltideki küçük proteinlerin yapısını çalışmak için kabul gören bir metot olduğuna değinilmiş ve bununla birlikte, makro moleküller ile çeşitli ligandlar arasındaki etkileşmeleri incelemek için de güçlü bir araç olduğu vurgulanmıştır. Kimyasal kayma üzerinde dikkatle durulmuş, serbest ve bağlı durumların kimyasal kaymalarının farklı olacağı belirtilmiş ve bu farklılıkların sebepleri araştırılmıştır (Clarkson ve Campbell 2003).

Protein ve protein-ligand komplekslerinin yapılarının belirlenmesinde NMR değerli bir metot olarak kabul edilmektedir (Wüthrich 1986 ve Fielding 2007). NMR, proteindeki amide protonlar gibi molekül içindeki özel atomlara tahsis edilen sinyalleri ortaya çıkarmaktadır. Proton NMR' ının kullanılması çok yaygındır ve molekül hakkında en çok bilgi vermektedir. Ancak, daha büyük moleküller incelendiğinde farklı rezonanslar arasında çakışmalar da ortaya çıkar. Çok boyutlu NMR metotları, büyük molekül olması durumunda bu problemi çözebilmektedir (Kessler ve ark. 1988). NMR yoluyla yapı belirleme daima tüm rezonansların tahsis edilmesini gerektirir. Tüm çekirdekler tahsis edildiği zaman, NMR deneyleri çekirdekler arası mesafe, dihedral açılar ve moleküldeki hidrojen bağları hakkında bilgi verir (Tengel 2007).

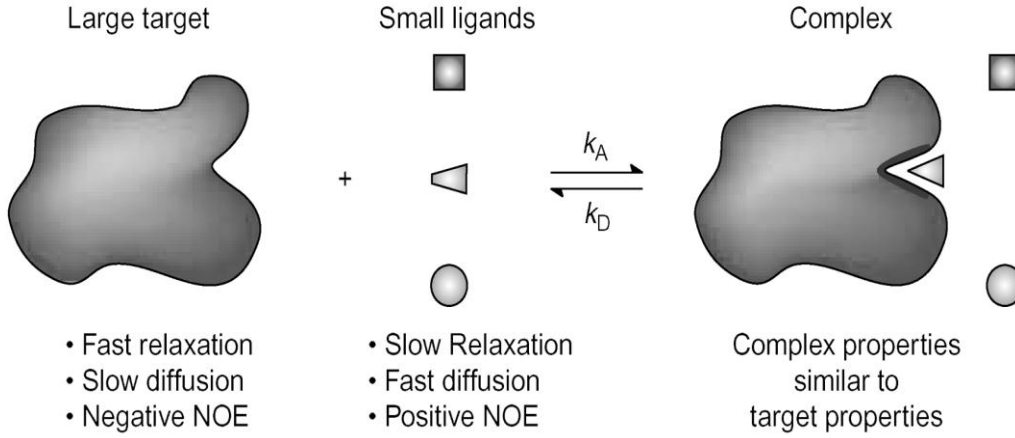
NMR daki geleneksel yapı sınırlamaları, mesafeler ve dihedral açılar hakkında bilgi verir. Proteinlerin yapısı NOESY deneyindeki çapraz piklerden türetilen mesafe sınırlamaları yoluyla belirlenmiştir (Jeener ve ark. 1979).

NMR spektroskopisi ligand-hedef bağlanmasının teşhis edilmesinde önemli bir araçtır ve diğer tekniklerin üzerinde bazı önemli avantajlar sunar. Örneğin NMR, zayıf ligand-hedef etkileşmesini ortaya çıkarabilir. Birçok biyolojik deneyin aksine NMR, incelenmesi gereken proteinin fonksiyonu hakkında hiçbir bilgi gerektirmez. Yapısal



biyolojide kullanılan diğer tekniklerin aksine NMR, bağlanma sabitlerinin belirlenmesini mümkün kılmaktadır (Fielding 2000).

Sayısız NMR parametresi geçici bağlanmayla bile değişebilir ve bu etkiler ya hedef ya da ligandın kendisi üzerinde izlenebilir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1. Hedef proteinle etkileşime giren bir ligandın NMR parametrelerinin sonuçları

Ligandın yapısının bağlanmayla değiştiği varsayılarak, dihedral açılar hakkında bilgi kazanmak için skaler çiftlenim çalışılabilir. En bilgilendirici parametreler NMR taramasında kesin olarak elde edilebilir. Daha büyük hedef molekül ile etkileşme durumunda, ligand daima serbest forma göre farklı durulma ve difüzyon oranlarına sahip olur (Tengel 2007).

Biyolojik membranlar lipid ve protein içeren dinamik sistemlerdir. Membranlar seçici geçirgen bariyer olarak görev yapar ve hücre içi ortamın yapısını düzenleyen taşıma (transport) ve yer değiştirme (translokasyon) sistemlerini, ayrıca hücre sinyalizasyon araştırmaları için de özel reseptörleri içerir (MicroCal LLC 2006).

İnsan genom dizisinin homoloji hesaplamaları, proteinlerin % 30 unun membran-bağlantılı olduğunu ortaya koymaktadır (Cooper 2004). En çok satan ilaçların neredeyse % 50 si membrane reseptörlerini hedeflediği için, membran-bağlantılı proteinler ilaç ve biyoteknoloji sanayisini ilgilendirmektedir (Terstappen ve ark. 2001).

Membrane proteinleri ile ilişkili hücre sinyalizasyonu ve taşımanın biyolojik süreçlerini anlamak önemlidir. Bu, membrane proteinleri ve ligandlar arasındaki etkileşimlerin tanımlanmasını gerektirir. Membrane proteinleri hidrofobik bölgelere

sahip olma eğilimindedir ve membrane çevreleri ile karşılaştırıldığında saflaştırılmış proteinler sulu çözelti içinde farklı bağlanma afinitelerine sahip olabilir. Protein-ligand etkileşimleri in vivo deneyler veya model membran sistemleri ile ele alınabilir, ancak çok etiketleme gerektirir (MicroCal LLC 2006). Microcalorimetri, membran proteinlerinin biyomoleküler etkileşimlerinin karakterizasyonunda yararlı olan etiket içermeyen bir yöntemdir. İzotermal Titrasyon Kalorimetre (ITC), protein ile bağlanma ortağı arasındaki bağlanma afinitelerini doğrudan ölçer ve biyomoleküler etkileşimlerin moleküler itici kuvvetleri hakkında ayrıntılı bilgi ortaya koyar. ITC, membran proteinlerinin ligand ya da inhibitöre bağlanmasının incelenmesinde kullanılabilir. Differential Scanning Calorimetry (DSC), proteininin kararlılığı ve yapısının anlaşılmasını sağlar (MicroCal LLC 2006).

Biyolojik membranlar ve membrana birleşik proteinlerle ilaçların etkileşmesinin NMR spektroskopisi ve diğer spektroskopik yöntemler kullanılarak incelenmesi son yıllarda odaklanan çalışma konularındandır (Xu ve ark. 2002, Kamp ve ark. 2003, Nielsen ve ark. 2004, Pouliquen ve ark. 2005, Thennarasu ve ark. 2005).

Biyolojik dokular üzerine ilaç etkilerinin moleküler düzeyde incelenmesinde, küçük moleküllerin membranlarla etkileşmesi konusuna büyük önem verilmiştir. Bu etkileşmeler, diğer etkileşmeleri ve organizmalardaki ilaç metabolizmalarını belirler ve modüle eder. Model membranlarda ilacın lokalize olması ve etkileşmelerdeki farklı fonksiyonel grupların ilişkisi hakkında kesin bir bilgiye sahip olmak için çeşitli spektroskopik yöntemler geliştirilmiş ve işlenmiştir (Xu ve ark.2002).

Sıvı NMR, sulu çözeltilerde kolaylıkla çözünebilen protein ve protein komplekslerinin yapılarının belirlenmesinde önemli bir metot olarak kabul edilmiştir. (Wüthrich 1986).

Membrane proteinleri lipid tabakalarına gömüldüğü zaman, sıvı NMR teknikleri kullanmak uygun değildir. Çünkü bu membrane proteinlerinin çevrelerindeki rotasyonları yavaş ve büyük ölçüde anizotropiktir. Bu durum uygun olmayan durulma ve algılanamayan çok geniş rezonans sinyallerine yol açar. Oysaki katı hal NMR, lipid tabakalarda peptit ve proteinlere bağlı membranların yüksek çözünürlüklü spektrumlarının bulunmasında başarılı bir yöntemdir (Tamm ve ark. 2006).

Membrane protein örnekleri için katı hal NMR teknolojisi hızla devam etmektedir ve lipid tabakalardaki farklı küçük proteinlerin yapıları bu metotlarla bulunmuştur (Smith ve ark. 1996, Opella ve ark. 2004, Andronesi ve ark. 2005).

### 3. MATERYAL ve METOT

Bu tez çalışmasında kullanılan ilaç etken maddeleri kemoterapi tedavisinde kullanılan ilaçlar arasından seçilmiş ve Sigma-Aldrich kataloğundan elde edilmiştir.

Kemoterapi; kanser hücresinin çoğalmasını önleyen ve toksik etkiyle bu hücreleri öldüren kimyasal ilaçlarla yapılan bir tedavi şeklidir. Bu nedenle sitotoksik (hücreleri toksik olarak öldüren) veya antineoplastik olarak da adlandırılırlar. Kemoterapide çeşitli ilaçlar kullanılır. Bunların bir kısmı tümöre doğrudan etkili kemoterapötik ilaçlar ve hormonlar, bağışıklık sistemini kuvvetlendirici biyolojik ajanlardır. Bazı ilaçlar ise tümöre doğrudan etkili ilaçların yan etkilerini azaltmak veya yok etmek amacıyla kullanılır. Kemoterapi kanser tedavisinde önemli bir yere sahiptir yaygın olarak kullanılmaktadır. Kanser çeşidine ve vücutta dağılma durumuna göre değişik 100 kadar ilaç bu tedavide kullanılmaktadır.

Bu çalışmada kullanılan ilaç etken maddeleri:

1. Etken madde: 5-Fluorouracil (5-FU)
2. Etken madde: Cytosine  $\beta$ -D Arabinofuranoside (Ara-C)
3. Etken madde: Cyclophosphamide-Monohydrate (CM)

olmaktadır. Bu etken maddeler hakkında kısaca bilgi verelim:

#### **5-Fluorouracil (5-FU)**

5- Fluorouracil, Biosyn isimli ilacın etken maddesidir. Florlu pirimidin türevidir ve antimetabolitler grubuna aittir. DNA'nın sentezini bloke eder, timidilat sentetaz ile kompleks oluşturarak hücre bölünmesini durdurur. Bunun dışında, 5-Fluorouracil Biosyn, hatalı yapıda ribonukleik asitler oluşturarak RNA sentezini inhibe eder. Bu etkiler daha çok hızlı bölünen hücrelerde belirgindir, çünkü 5- Fluorouracil Biosyn'i daha fazla absorbe ederler.

5- Fluorouracil Biosyn tek ajan olarak en fazla barsak ve rektum kanserlerinde kullanılır. Sitotoksik etkisi, birlikte folinik asit uygulanarak net bir şekilde artırılabilir.

5-Fluorouracil Biosyn'nin etkisinin bu şekilde fazlalaştırılması, klinik olarak, gastrointestinal karsinomlar, jinekolojik tümörler, prostat kanseri, pankreas ve özofagus kanserinde ilacın kullanımı artırmıştır (<http://www.ilacpedia.com>).

Molekül Ağırlığı 130.08g/mol ve kimyasal formülü  $C_4H_3FN_2O_2$  şeklindedir. 5-Fluorouracil maddesinin kimyasal formülü açık olarak 2 ve 3 boyutlu olarak Şekil 3.1 de verilmiştir (<http://www.chemspider.com>).



Şekil 3.1: FU maddesinin 2 boyutlu ve 3 boyutlu kimyasal formülü

#### Cytosine $\beta$ -D Arabinofuranoside (Ara-C)

Cytosine  $\beta$ -D Arabinofuranoside (Ara-C), Cytarabine adlı ilacın etken maddesidir. Cytarabine intraselüler olarak arabinositozin trifosfata (ARA-CTP) dönüşür. ARA - CTP kompetitif olarak, DNA polimerazı ve bazı asid kinaz enzimlerini inhibe eder. Bir nukleosid gibi hareket eder ve sitidin nukleotidin, deoksisisitidine dönüşmesinde rol oynayan enzimlerle ve aynı zamanda DNA'ya geçişte yarışır. Cytarabine'in etkisi hücre döngüsüne spesifik bir anti-neoplastik ilaçtır.

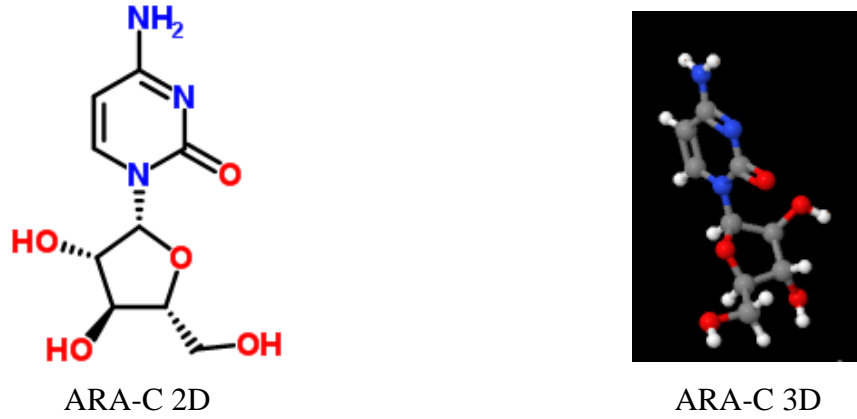
Cytarabine oral yoldan etkili değildir. Sitidin deaminaz karaciğerde toplanır ve intravenöz dozlar bifazik atılma gösterir. Dağılım ve eliminasyon yarılanma ömürleri, sırasıyla yaklaşık 10 dakika ve 1-3 saattir. 24 saat sonra dozun %80'i inaktif metaboliti olarak ya da değişmeden, çoğunlukla idrarla bir miktar da safrayla atılır.

Cytarabine hızla dokulara dağılır, kan-beyin bariyerini ve plasentayı geçer.

Cytarabine tek başına veya diğer anti-neoplastik ilaçlarla kombine olarak akut miyeloid lösemi, akut non lenfoblastik lösemi, akut lenfoblastik lösemi, eritrolösemi,

kronik miyeloid lösemi, non-Hodgkin lenfomalar, meningeal lösemi, meningeal neoplazmalar vakalarında kullanılır (<http://www.ilacpedia.com>).

Molekül Ağırlığı 243.22g/mol ve kimyasal formülü  $C_9H_{13}N_3O_5$  şeklindedir. Cytosine  $\beta$ -D Arabinofuranoside (Ara-C) maddesinin kimyasal formülü açık olarak 2 ve 3 boyutlu olarak Şekil 3.2 de verilmiştir (<http://www.chemspider.com>).



Şekil 3.2: Ara-C maddesinin 2 boyutlu ve 3 boyutlu kimyasal formülü

### Cyclophosphamide-Monohydrate (CM)

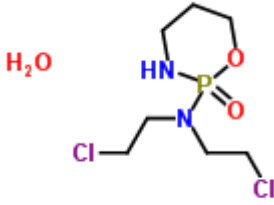
Cyclophosphamide-Monohydrate (CM), Endoksan isimli ilacın etken maddesidir. Siklofosfamid oksazafosforinler grubundan bir sitostatiktir ve kimyasal olarak azotlu hardal bileşiklerine benzemektedir.

Siklofosfamidin ortalama serum yarı ömrü yetişkinlerde 7 saat ve çocuklarda 4 saattir. Siklofosfamid ve metabolitlerinin başlıca atılım yolu böbreklerdir. Büyük oranda metabolitlerine dönüşerek atılsa da, %5-25 oranında değişime uğramadan atılır. Böbrek yetmezliği olan hastalarda metabolitleri çok yüksek düzeylere çıksa da, klinik toksisitede artış gösterilememiştir. Siklofosfamid, plasentayı geçebilir ve anne sütünde varlığı gösterilmiştir.

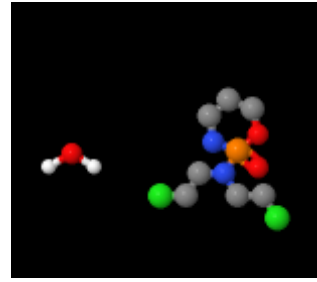
Endoksan, lösemiler (Akut ya da kronik lenfositik ya da miyelositik lösemiler), Habis lenfomalar (Hodgkin hastalığı, Hodgkin dışı lenfomalar, plasmositoma), Metastaz yapmış ya da yapmamış habis solid tümörler (Over kanseri, testiküler kanser, meme kanseri, küçük hücreli akciğer kanseri, nöroblastoma, Ewing sarkoma), Progresif "otoimmün hastalıklar" (Romatoid artrit, psoriatik artropati, sistemik lupus eritematoz,

skleroderma, sistemik vaskülit (örn. nefrotik sendrom ile), glomerülonefrit (örn. nefrotik sendrom ile), myasthenia gravis, otoimmün hemolitik anemi, soğuk aglutinin hastalıkları), Organ nakillerinde immunosupresif tedavi durumlarında, kombine bir kemoterapi protokolü içinde ya da monoterapi olarak kullanılır (<http://www.ilacpedia.com>).

Molekül Ağırlığı 279.10g/mol ve kimyasal formülü  $C_7H_{15}Cl_2N_2O_2P.H_2O$  şeklindedir. Cyclophosphamide-Monohydrate (CM) maddesinin kimyasal formülü açık olarak 2 ve 3 boyutlu olarak Şekil 3.3 de verilmiştir (<http://www.chemspider.com>).



CM- 2D



CM-3D

Şekil 3.3: CM maddesinin 2 boyutlu ve 3 boyutlu kimyasal formülü

#### 3.1. Örneklerin Hazırlanması

İlaç konsantrasyonunun sabit kaldığı buna karşılık protein konsantrasyonunun değiştiği örneklerin hazırlanma aşamasında, incelenen üç etken maddesinin her biri için altı tane karıştırma kabı hazırlanıp, bu kaplar 1 den 6 ya kadar numaralandırıldı. Daha sonra 5-Fluorouracil (FU) maddesinden 0.05M alınarak 1 den 6 ya kadar numaralandırılmış karıştırma kaplarının her birinin içerisine konuldu ve her kaba 1ml  $D_2O$  eklenerek bu maddenin  $D_2O$  içerisinde çözünmesi sağlandı. Her bir kaptaki  $D_2O$ -FU çözeltileri üzerine sırasıyla 0g, 0.01g, 0.02g, 0.03g, 0.04g ve 0.05g albümin eklenerek, albüminin bu çözelti içerisinde iyice çözünmesi sağlandı. Çözünme olayı bittikten sonra FU maddesi için hazırlanan 6 tane farklı albümin konsantrasyonlu örnek, NMR tüplerine aktarılarak gerekli ölçümler alındı.

Benzer şekilde Cytosine  $\beta$ -D Arabinofuranoside (Ara-C) maddesinden 0.05M alınarak 1 den 6 ya kadar numaralandırılmış karıştırma kaplarının içerisine konuldu ve her kaba 1ml  $D_2O$  eklenerek bu maddenin  $D_2O$  içerisinde çözünmesi sağlandı. Her bir

kaptaki D<sub>2</sub>O-Ara-C çözeltileri üzerine sırasıyla 0g, 0.01g, 0.02g, 0.03g, 0.04g ve 0.05g albümin eklenerek, albüminin bu çözelti içerisinde iyice çözünmesi sağlandı. Çözünme olayı bittikten sonra ARA-C maddesi için hazırlanan 6 tane örnek, NMR tüplerine aktarılarak <sup>1</sup>H-NMR spektrumu alınmış ve T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanları ölçümleri yapılmıştır.

Cyclophosphamide-Monohydrate (CM) etken maddesi için de aynı yol izlenerek CM maddesi için de 6 tane örnek hazırlanmış ve NMR tüplerine aktarılarak <sup>1</sup>H-NMR spektrumu alınmış ve T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanları ölçümleri yapılmıştır.

Protein-ilaç etkileşmesinin incelenmesinin diğer bir aşamasında, sabit protein konsantrasyonunda artan ilaç konsantrasyonuna bağlı olarak NMR ölçümleri yapılmıştır. Bu çalışma için D<sub>2</sub>O ortamında serbestçe çözünen Cytosine β-D Arabinofuranoside (Ara-C) maddesi kullanılmıştır. Ara-C maddesinin 5 farklı konsantrasyonunu incelemek için, 1 den 5 e kadar numaralandırılmış karıştırma kaplarının her birine sabit 0.05g albümin aktararak, her bir kaba 1ml D<sub>2</sub>O eklenmiş ve her bir kaptaki albüminin D<sub>2</sub>O içerisinde iyice çözülmesi sağlanmıştır. D<sub>2</sub>O-albümin çözeltilerinin içerisine Cytosine β-D Arabinofuranoside (Ara-C) maddesinden sırasıyla 0.05M, 0.10M, 0.15M, 0.20M ve 0.25M eklenerek bu maddelerin çözülmesi sağlandı. Çözülme işlemi tamamlandıktan sonra hazırlanan 5 örnek NMR tüplerine aktararak <sup>1</sup>H-NMR spektrumu alınmış ve T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanları ölçümleri yapılmıştır.

Protein-ilaç etkileşmesinde sıcaklığın etkisini incelemek için FU maddesi kullanılmıştır. FU maddesinden 0.05M alınarak bir karıştırma kabının içerisine konulmuş ve üzerine 1ml D<sub>2</sub>O eklenerek bu maddenin çözülmesi sağlanmıştır. D<sub>2</sub>O-FU çözeltisi içerisine 0.05g albümin ekleyip iyice çözüldükten sonra elde edilen çözelti NMR tüpüne aktarılmıştır. Bu örneğin <sup>1</sup>H-NMR spektrumu alınmış ve T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanları ölçümleri 25<sup>0</sup>C, 30<sup>0</sup>C, 35<sup>0</sup>C, 40<sup>0</sup>C ve 45<sup>0</sup>C de yapılmıştır.

Tez çalışmasının ikinci aşamasında, deneylerde kullanılan ilaç etken maddeleri membrane ile etkileştirilerek bu örneklerin NMR ölçümleri yapılmıştır.

Tez konusunun diğer bir parçası olan membrane-ilaç etkileşmeleri konusu üzerine tez çalışmasında kullanılacak olan membrane örnekleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyofizik Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Belma TURAN ve asistanı yardımıyla temin edilmiştir. Membrane örnekleri normal ve diyabetik olmak üzere iki çeşitti. Normal membrane örnekleri 4 aylık sağlıklı tavşanlardan elde edilen kalp



homojenatları, diyabetik membranlar ise 4 aylık tip 1 diyabet hastası tavşanlardan elde edilen kalp homojenatlarıdır. Bu iki tür membrane örnekleri, farklı konsantrasyondaki ilaç etken maddeleriyle etkileştirilmiştir. Sabit membrane konsantrasyonuna, değişen konsantrasyonlardaki ilaç etkisi NMR yoluyla incelenmiştir. NMR spektrumunda ortaya çıkan piklerin şiddetinin ve kimyasal kaymasının değişimi gözlenmiştir. Spektrumdaki piklerin şiddetinin değişimi ve kimyasal kaymalarının değerleri, membrane varlığında yorumlanmaya çalışılmıştır.

Membrane içeren örneklerin hazırlanması sırasında şu aşamalar takip edilmiştir.

Öncelikle normal membrane içeren örnekler hazırlanmıştır. Bu örnekleri hazırlamak için öncelikle FU etken maddesinden iki farklı konsantrasyon (0.003g ve 0.007g) alınmış ve bu iki örneğin üzerine 40µl normal membrane ve 960µl D<sub>2</sub>O eklenmiştir. Maddenin çözücü içerisinde tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra çözelti NMR tüplerine aktarılmış ve NMR ölçümleri yapılmıştır. Sabit membrane konsantrasyonuna, değişen konsantrasyonlardaki FU maddesinin etkisi NMR yoluyla incelenmiştir. NMR spektrumunda ortaya çıkan piklerin şiddetinin ve kimyasal kaymasının değişimi gözlenmiştir. Spektrumdaki piklerin şiddetinin değişimi ve kimyasal kaymalarının değerleri, normal membrane varlığında yorumlanmaya çalışılmıştır.

Daha sonra ARA-C etken maddesinden üç farklı konsantrasyon (0.012g, 0.024g ve 0.036g) alınmış ve bu üç örneğin üzerine 40µl normal membrane ve 960µl D<sub>2</sub>O eklenmiştir. Maddenin çözücü içerisinde tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra çözelti NMR tüplerine aktarılmış ve bu üç örneğin NMR ölçümleri yapılmıştır. Sabit membrane konsantrasyonuna, değişen konsantrasyonlardaki ARA-C maddesinin etkisi NMR yoluyla incelenmiştir. NMR spektrumunda ortaya çıkan piklerin şiddetinin ve kimyasal kaymasının değişimi gözlenmiştir. Spektrumdaki piklerin şiddetinin değişimi ve kimyasal kaymalarının değerleri, normal membrane varlığında yorumlanmaya çalışılmıştır.

Benzer şekilde CM etken maddesinden de üç farklı konsantrasyon (0.010g, 0.020g ve 0.030g) alınmış ve bu üç örneğin üzerine 40µl normal membrane ve 960µl D<sub>2</sub>O eklenmiştir. Maddenin çözücü içerisinde tamamen çözünmesi sağlandıktan sonra çözelti NMR tüplerine aktarılmış ve bu üç örneğin NMR ölçümleri yapılmıştır. Sabit membrane konsantrasyonuna, değişen konsantrasyonlardaki CM maddesinin etkisi

NMR yoluyla incelenmiştir. NMR spektrumunda ortaya çıkan piklerin şiddetinin ve kimyasal kaymasının değişimi gözlenmiştir. Spektrumdaki piklerin şiddetinin değişimi ve kimyasal kaymalarının değerleri, normal membrane varlığında yorumlanmaya çalışılmıştır.

Diyabetikli membrane içeren örneklerin hazırlanmasında da normal membrane içeren çözeltilerin hazırlanmasında izlenen yolun aynısı izlenmiş ve sabit diyabetikli membrane konsantrasyonuna, değişen konsantrasyonlardaki FU, ARA-C ve CM maddelerinin etkisi NMR yoluyla incelenmiştir. NMR spektrumunda ortaya çıkan piklerin şiddetinin ve kimyasal kaymasının değişimi gözlenmiştir. Spektrumdaki piklerin şiddetinin değişimi ve kimyasal kaymalarının değerleri, diyabetikli membrane varlığında yorumlanmaya çalışılmıştır.

Her iki durumda da, spektrumda gözlenen her pikin  $T_1$  ve  $T_2$  durulma zamanları ölçülmek istenmiş ancak membranların homojenize edildiği tampon çözeltideki ve membranların kendi bünyesindeki suyun yarattığı Radiation Damping sebebiyle, membrane-ilaç karışımlarının NMR spektrumundaki piklerin  $T_1$  ve  $T_2$  durulma zamanları ölçülememiştir.

### 3.2. Spin-Örgü Durulma Zamanlarının ( $T_1$ ) Ölçülmesi

Spin-Örgü Durulma zamanlarının ( $T_1$ ) ölçümleri 400MHz BRUKER NMR Spektrometresi ile yapıldı. Ölçümlerde 5mm' lik NMR tüpleri kullanıldı. Spin-örgü Durulma Zamanlarının ölçümleri ( $180-\tau-90$ ) puls adımları ve Inversion Recovery (Geri Dönüşüm) tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir ölçüm için gerekli olan  $\tau$  gecikme zamanları (delay times), spektrumda gözlenen her bir pike uygun olacak şekilde seçildi.

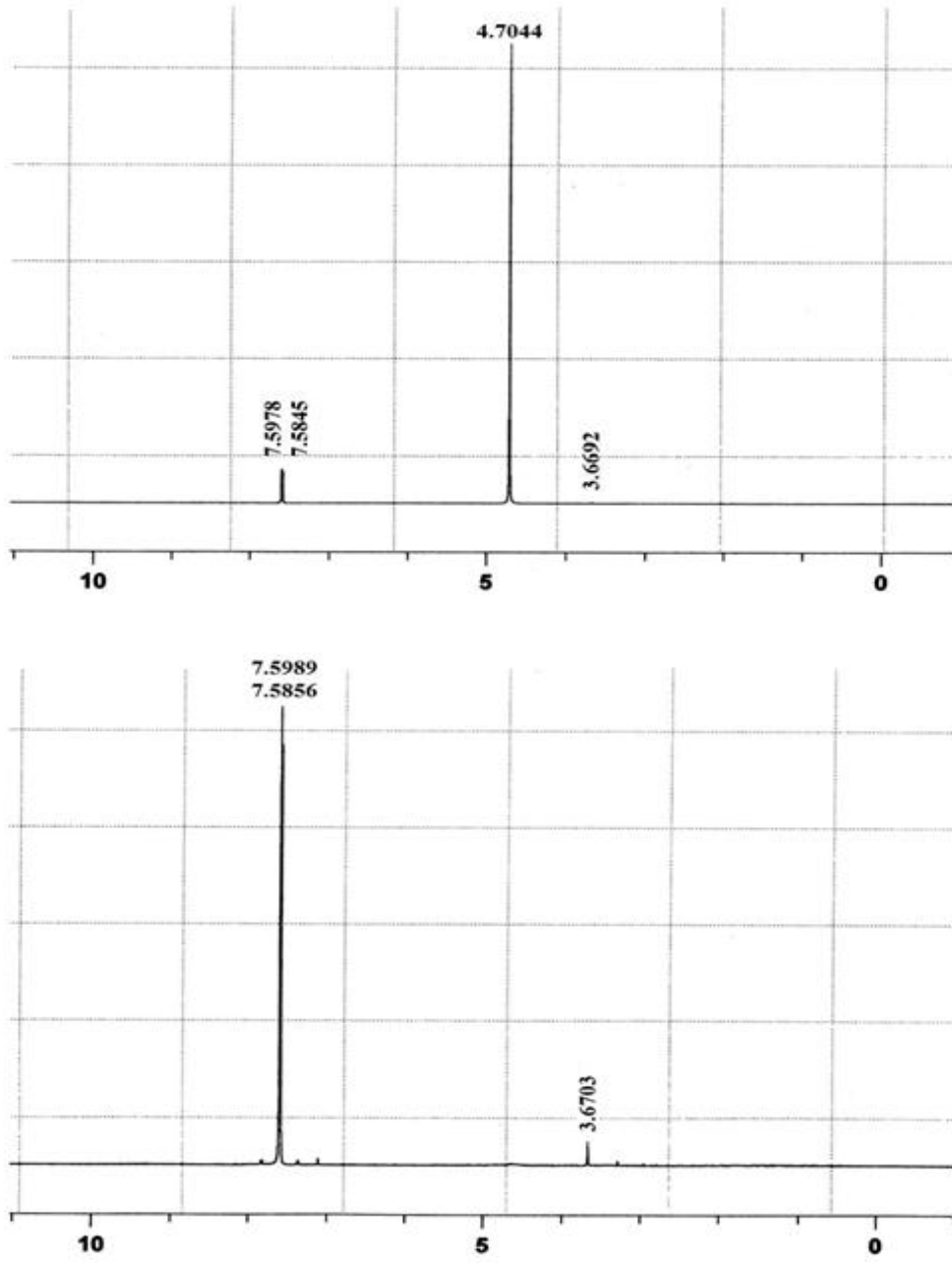
### 3.3. Spin-Spin Durulma Zamanlarının ( $T_2$ ) Ölçülmesi

Spin-Spin Durulma zamanlarının ( $T_2$ ) ölçümleri 400MHz BRUKER NMR Spektrometresi ile yapıldı. Ölçümlerde 5 mm' lik NMR tüpleri kullanıldı. Spin-Spin Durulma Zamanlarının ölçümleri ( $90-\tau-180-\tau$ ) puls adımları ve CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill) tekniği kullanılarak gerçekleştirildi. Her bir ölçüm için gerekli olan  $\tau$

gecikme zamanları (delay times), spektrumda gözlenen her bir pike uygun olacak şekilde seçildi.

#### 4. BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu tez çalışmasında kullanılan anti kanser ilaç etken maddelerinden 5-Fluorouracil (FU) maddesinin 0.05M konsantrasyonuna karşılık gelen miktarın 1ml D<sub>2</sub>O içerisinde çözdürülmesiyle elde edilen örneğin 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR spektrumu Şekil 4.1a da gösterilmiştir. Bu spektrumda 4.7044ppm değerinde gözlenen pik HDO sinyali, 7.5978ppm ve 7.5845ppm değerlerinde bir kimyasal kaymaya sahip olan dublet pik de, FU maddesinin kimyasal formülünde görülen HN' nin komşusundaki CH pikidir. CH molekülünün piki, komşuluğundaki HN molekülünden dolayı ikiye yarılmış ve bir dublet oluşturmuştur. Bu dubletin pikleri arasındaki mesafe coupling sabiti ya da çiftlenim sabitini (j) vermektedir. Şekil 4.1a da gösterilen NMR spektrumundaki HDO sinyali presaturasyon tekniği kullanılarak bastırılmış ve bu durumda ortaya çıkan <sup>1</sup>H-NMR spektrumu Şekil 4.1b de gösterilmiştir. Bu spektruma bakıldığında HDO sinyalinin tamamen ortadan kalktığı, buna karşılık CH ve 3.6703ppm de görülen sinyalin şiddetinin arttığı gözlenmiştir. Şekil 4.1a ve 4.1b de gösterilen iki spektrumun düşey eksenleri aynı skalada seçilmiş ve bu durumda karşılaştırmalar yapılmıştır.



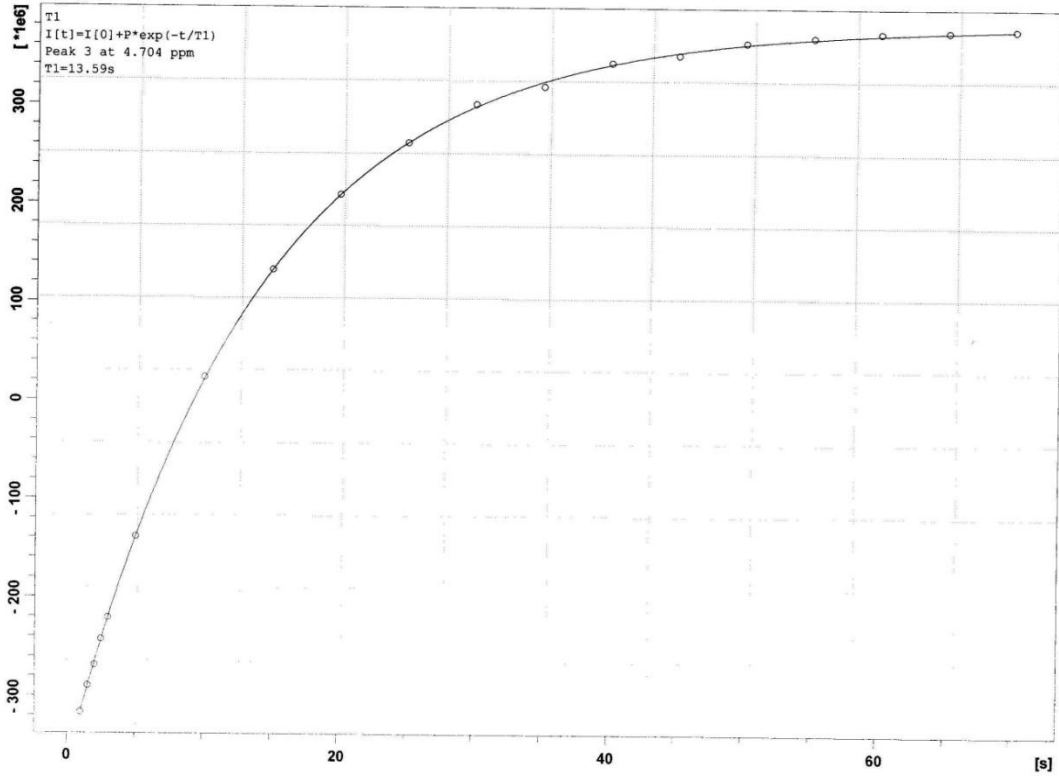
Şekil 4.1. FU örneğinin <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu a) Tek puls b) Presaturasyon

1ml D<sub>2</sub>O içerisinde 0.05M sabit konsantrasyondaki FU etken maddesine ayrı ayrı 0g, 0.01g, 0.02g, 0.03g, 0.04g ve 0.05g albümin eklenerek elde edilen 6 farklı örneğin 25 °C (298K) sabit sıcaklıkta <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen her pikin T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanları ölçülmüş ve bu değerlerden röleksivite değerleri (durulma oranları 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub>) hesaplanmıştır. Bu değerler Çizelge 4.1 de gösterilmiştir. 3.6692ppm değerinde ortaya çıkan sinyalin T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanlarının ölçümü herhangi bir sonuç vermediğinden bu pikin durulma oranları hesaplanamamıştır. Bu etken madde ve diğer iki etken madde için yapılan T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanları ölçümü sonucu elde edilen profiller benzer olduğundan, üç farklı etken maddenin her piki için ayrı ayrı T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> profillerini göstermek yerine 0.05M FU+0,01g alb örneğinde HDO sinyalinin T<sub>1</sub>ve T<sub>2</sub> profili sırasıyla Şekil 4.2 ve Şekil 4.3 de örnek olarak verilmiştir.

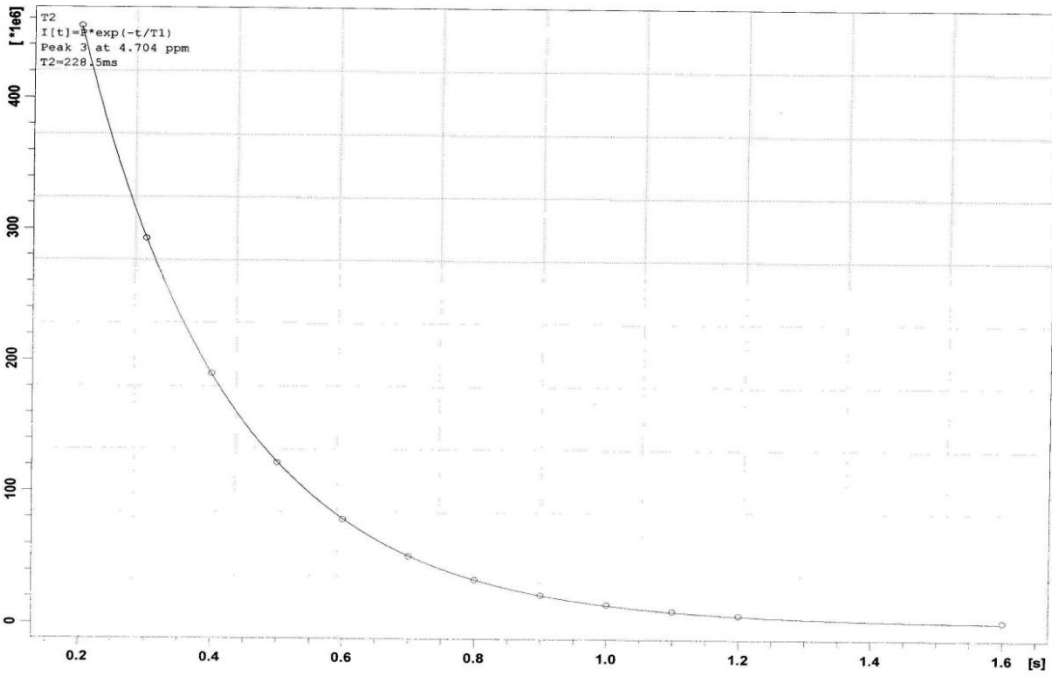
**Çizelge 4.1.** 1ml D<sub>2</sub>O içerisinde 0.05M sabit konsantrasyondaki FU etken maddesine ayrı ayrı 0g, 0.01g, 0.02g, 0.03g, 0.04g ve 0.05g albümin eklenerek elde edilen 6 farklı örneğin 25 °C (298K) sabit sıcaklıkta <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen her pikin 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub> durulma oranları

Albümin Konsantrasyonu (g/ml)	1/T <sub>1</sub> (s <sup>-1</sup> )			1/T <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> )		
	Albümin	HDO	Dublet (CH)	Albümin	HDO	Dublet (CH)
0	0,0635	0,0563	0,0771	0.3224	0.5353	0.1254
0,01	0,0871	0,0735	0,2142	0.8865	4.3764	1.7870
0,02	0,0986	0,0877	0,3446	1.0995	4.7328	3.670
0,03	0,1055	0,0987	0,4384	1.1477	6.2657	5.2970
0,04	0,1242	0,1112	0,5333	1.4524	7.1994	7.0670
0,05	0,1285	0,1279	0,5787	1.7401	8.4317	8.7570

#### 4. BULGULAR ve TARTIŞMA



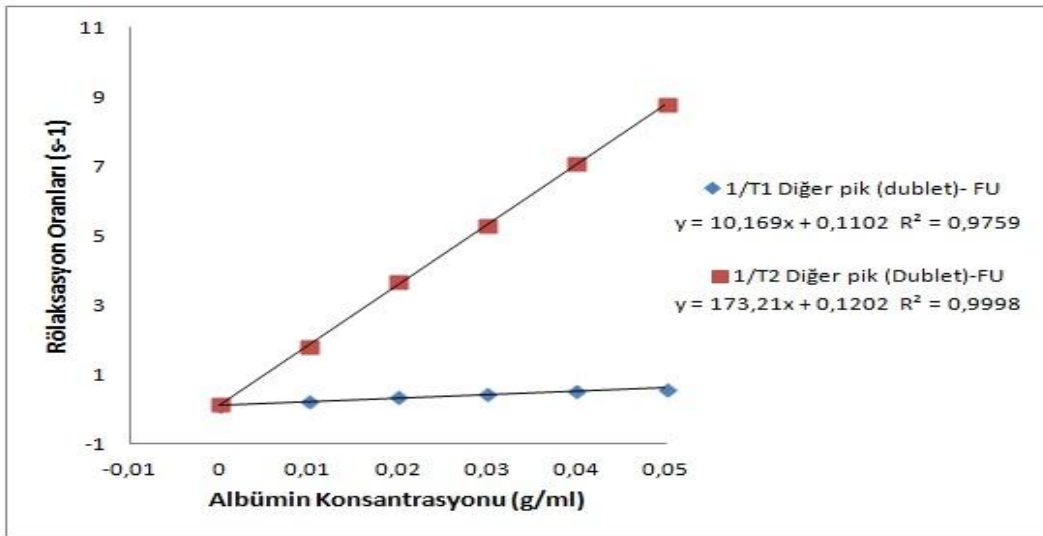
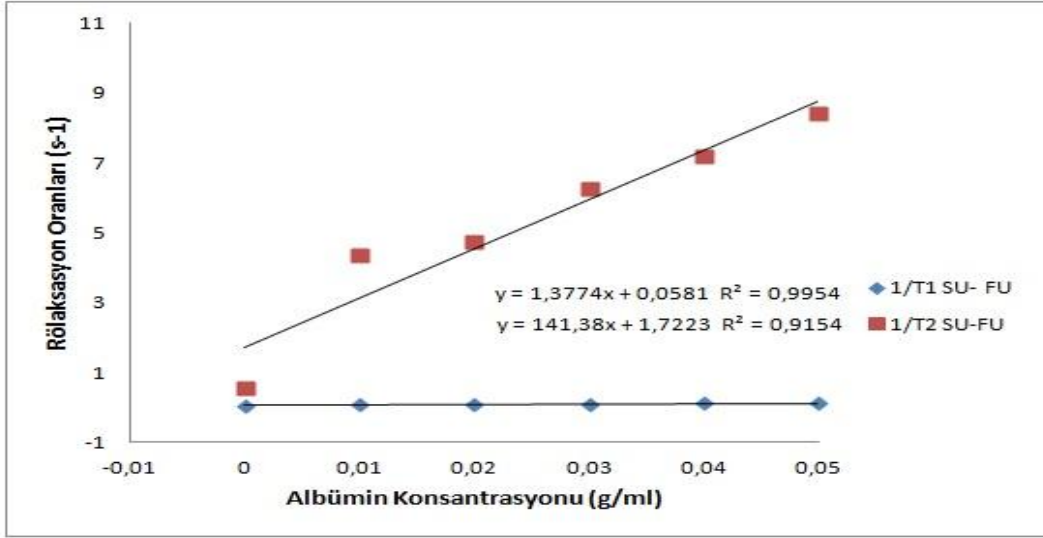
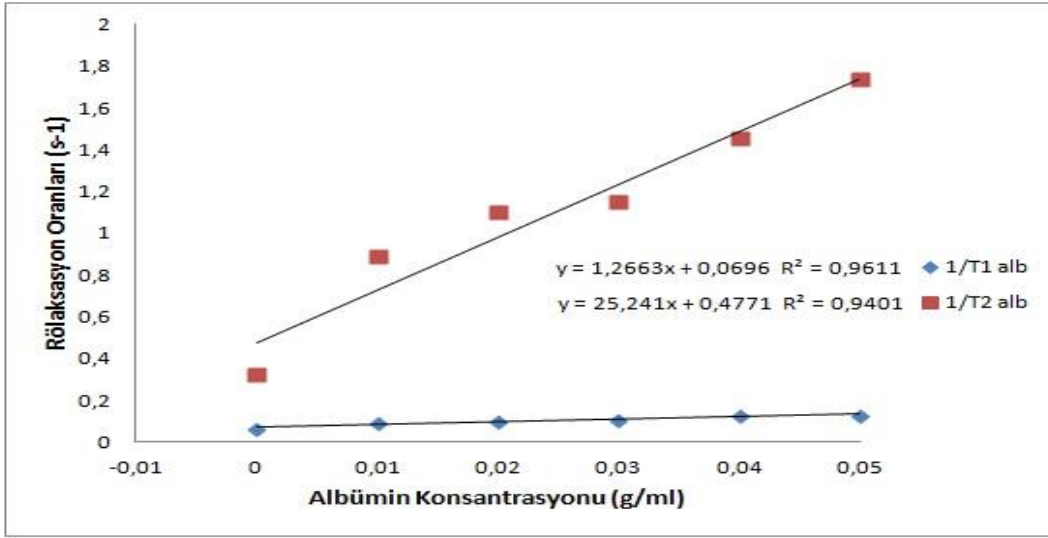
Şekil 4.2. 0,007g FU+ 0,01g alb örneğinde HDO sinyalinin  $T_1$  Profili



Şekil 4.3. 0,007g FU+ 0,01g alb örneğinde HDO sinyalinin  $T_2$  Profili

1ml D<sub>2</sub>O içerisinde 0.05M sabit konsantrasyondaki FU etken maddesine 6 farklı albümin eklenmesiyle elde edilen örneklerin, 25<sup>0</sup>C (298K) sabit sıcaklıkta <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen her pikin T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanlarından elde edilen durulma oranlarının albümin konsantrasyonuna karşı grafikleri Şekil 4.4 de gösterilmiştir. Şekil 4.4a, 6 farklı albümin konsantrasyonunun 1ml D<sub>2</sub>O içerisinde çözülmesiyle elde edilen örneklerin durulma oranlarının albümin konsantrasyonuna göre grafiğini göstermektedir. Şekil 4.4b, 1ml D<sub>2</sub>O içerisinde 0.05M sabit konsantrasyondaki FU etken maddesine 6 farklı konsantrasyonda albümin eklenmesiyle elde edilen örneklerin, 25<sup>0</sup>C (298K) sabit sıcaklıkta <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen HDO sinyalinin T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanlarından elde edilen durulma oranlarının albümin konsantrasyonuna göre, Şekil 4.4c ise 1ml D<sub>2</sub>O içerisinde 0.05M sabit konsantrasyondaki FU etken maddesine 6 farklı konsantrasyonda albümin eklenmesiyle elde edilen örneklerin, 25<sup>0</sup>C (298K) sabit sıcaklıkta <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen CH sinyalinin T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanlarından elde edilen durulma oranlarının albümin konsantrasyonuna göre grafiğini göstermektedir. Şekil 4.4b ve 4.4c de görüldüğü gibi FU etken maddesinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen HDO ve CH sinyallerinin 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub> değerleri albümin konsantrasyonuna göre lineer olarak artmaktadır.



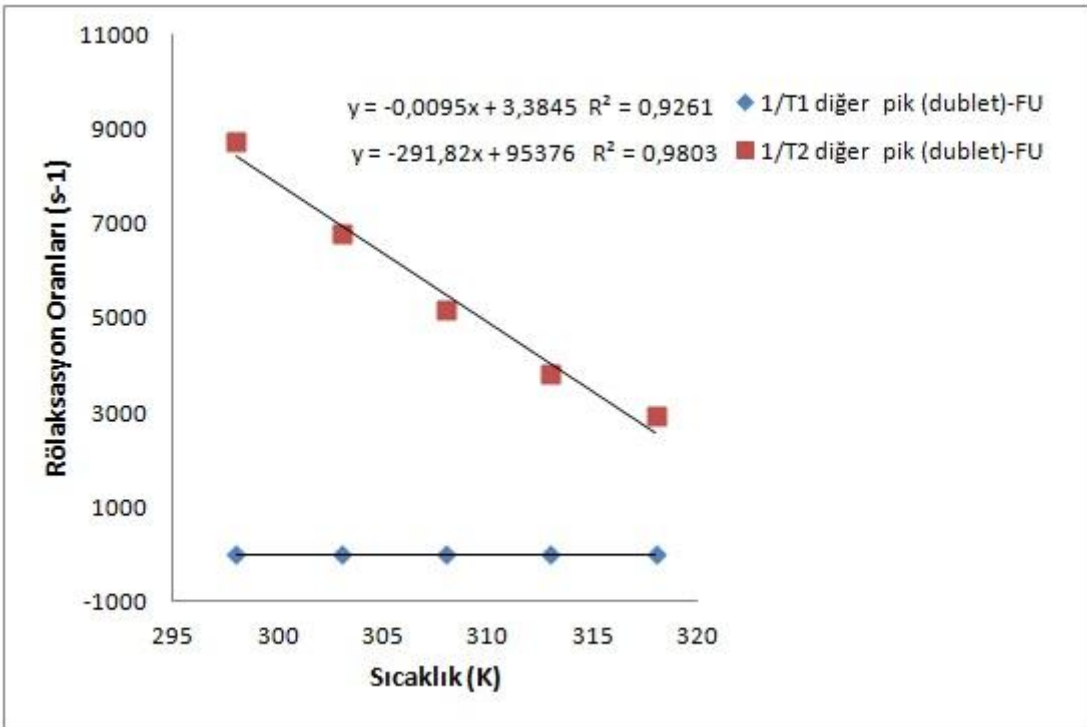
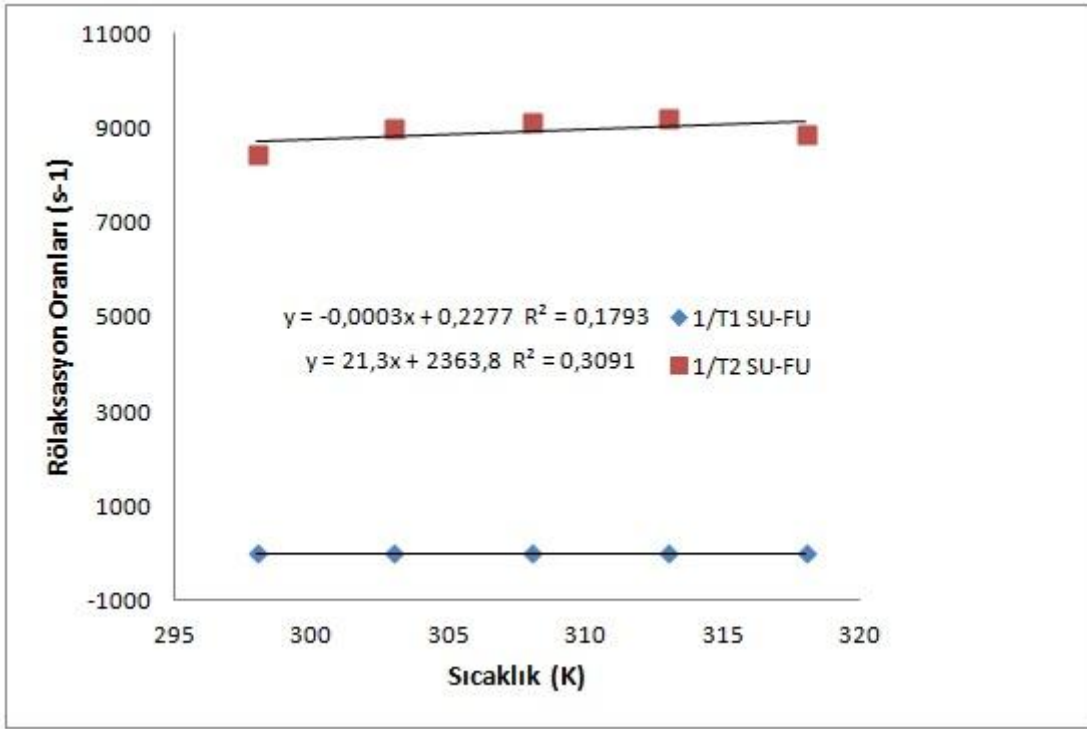


Şekil 4.4. FU etken maddesinde gözlenen piklerinin, 6 farklı albümin konsantrasyonuna karşı durulma oranlarını veren grafik

Ayrıca, 1ml D<sub>2</sub>O içerisinde 0.05M sabit konsantrasyondaki FU etken maddesine 0.05g albümin eklenerek elde edilen örneğin 298K, 303K, 308K, 313K ve 318K sıcaklık değerlerinde <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen her pikin T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanları ölçülmüş ve bu değerlerden durulma oranları hesaplanmıştır. Bu değerler Çizelge 4.2 de gösterilmiştir. Çizelge 4.2 deki değerlerin grafiğe dökülmesi sonucu Şekil 4.5 elde edilmiştir. Şekil 4.5a HDO sinyalinin T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanlarından elde edilen durulma oranlarının, Şekil 4.5b ise CH sinyalinin T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanlarından elde edilen durulma oranlarının sıcaklığa göre grafiğini göstermektedir. Şekil 4.5a da görüldüğü gibi HDO sinyalinin 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub> değerlerinde sıcaklığa bağlı olarak doğrusal bir artma ya da azalma yoktur. HDO sinyalinin 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub> değerleri sıcaklığa bağlı olarak sabit kalmıştır. Buna karşılık Şekil 4.5b de CH sinyalinin 1/T<sub>1</sub> değerleri sıcaklığa göre artmakta, 1/T<sub>2</sub> değerleri ise sıcaklığa göre azalmaktadır.

**Çizelge 4.2.** 1ml D<sub>2</sub>O içerisinde 0.05M sabit konsantrasyondaki FU etken maddesine 0.05g albümin eklenerek elde edilen örneğin farklı sıcaklık değerlerinde <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen her pikin 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub> durulma oranları

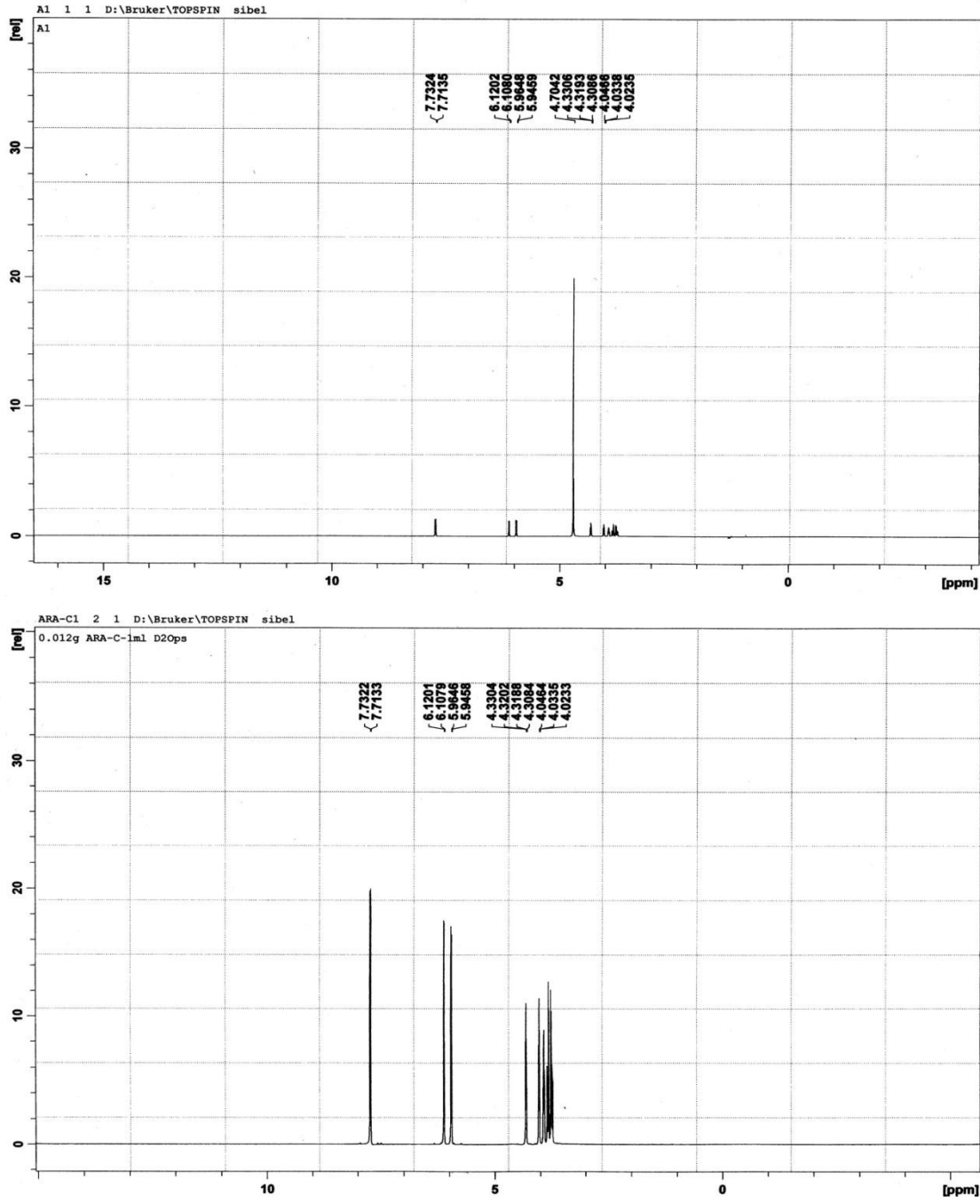
Sıcaklık (K)	1/T <sub>1</sub> (s <sup>-1</sup> )		1/T <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> )	
	HDO	Dublet (CH)	HDO	Dublet (CH)
298K	0.1279	0.5787	8.432	8.756
303K	0.1251	0.4847	9.009	6.784
308K	0.1178	0.4353	9.107	5.171
313K	0.1125	0.3886	9.208	3.825
318K	0.1256	0.3859	8.865	2.940



Şekil 4.5. FU etken maddesinde gözlenen piklerinin, 5 farklı sıcaklık değerine karşı durulma oranlarını veren grafik

Bu tez çalışmasında kullanılan anti kanser ilaç etken maddelerinden ikincisi olan Cytosine  $\beta$ -D Arabinofuranoside (Ara-C) maddesinin 0.05M konsantrasyonuna karşılık gelen miktarın 1ml D<sub>2</sub>O içerisinde çözdürülmesiyle elde edilen örneğin 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR spektrumu Şekil 4.6a da gösterilmiştir. Bu spektrumda 4.7042ppm değerinde gözlenen pik HDO sinyali (7.pik), 7.7324ppm (1.pik) ve 7.7135ppm (2.pik) değerlerinde bir kimyasal kaymaya sahip olan dublet pik de, ARA-C maddesinin kimyasal formülünde en solda görülen OH molekülünün sinyali, 6.1202ppm (3.pik) ve 6.1080ppm (4.pik) değerlerinde gözlenen dublet pik sağ halkanın altında bulunan H' nin sinyali, 5.9648ppm (5.pik) ve 5.9459ppm (6.pik) değerlerinde gözlenen dublet pik onun hemen komşuluğunda bulunan H sinyali, 4.3306ppm, 4.3193ppm ve 4.3086ppm değerlerinde gözlenen üçlü pik CH<sub>2</sub> molekülünün sinyali (8.pik), 4.0466ppm, 4.0338ppm ve 4.0235ppm değerlerinde gözlenen üçlü pik ise CH (9.pik) molekülünün sinyalidir. Şekil 4.6a da gösterilen NMR spektrumundaki HDO sinyali presaturasyon tekniği kullanılarak bastırılmış ve bu durumda ortaya çıkan <sup>1</sup>H-NMR spektrumu Şekil 4.6b de gösterilmiştir. Bu spektruma bakıldığında HDO sinyalinin tamamen ortadan kalktığı, buna karşılık diğer sinyallerin şiddetinin arttığı gözlenmiştir. Şekil 4.6a ve 4.6b de gösterilen iki spektrumun düşey eksenleri aynı skalada seçilmiştir.

#### 4. BULGULAR ve TARTIŞMA



Şekil 4.6. ARA-C örneğinin <sup>1</sup>H-NMR Spektrumu a) Tek Puls b) Presaturasyon

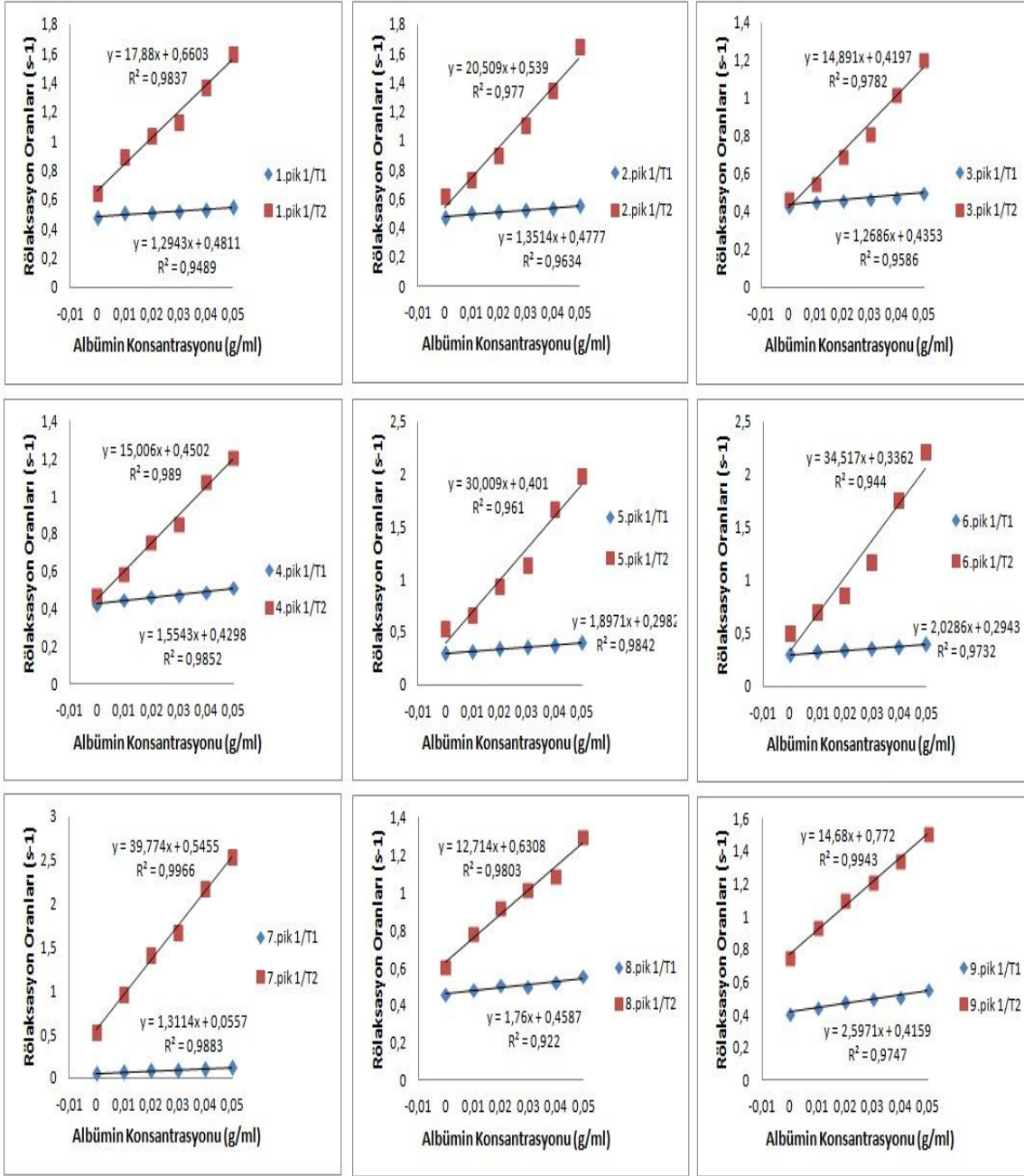
1ml D<sub>2</sub>O içerisinde 0.05M sabit konsantrasyondaki ARA-C etken maddesine ayrı ayrı 0g, 0.01g, 0.02g, 0.03g, 0.04g ve 0.05g albümin eklenerek elde edilen 6 farklı örneğin 25 °C (298K) sabit sıcaklıkta <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen her pikin T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanları ölçülmüş ve bu değerlerden röleksivite değerleri (durulma oranları 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub>) hesaplanmıştır. Bu değerler Çizelge 4.3 de gösterilmiştir. Çizelge 4.3 deki değerlerin grafik eksenine dökülmesiyle Şekil 4.7 elde edilir. Şekil 4.7, 1ml D<sub>2</sub>O içerisinde 0.05M sabit konsantrasyondaki ARA-C etken maddesine 6 farklı konsantrasyonda albümin eklenmesiyle elde edilen örneklerin, 25<sup>0</sup>C (298K) sabit sıcaklıkta <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen bütün sinyallerin T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanlarından elde edilen durulma oranlarının albümin konsantrasyonuna göre grafiğini göstermektedir. Şekil 4.7 de görüldüğü gibi ARA-C etken maddesinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen bütün sinyallerinin 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub> değerleri albümin konsantrasyonuna göre lineer olarak artmaktadır.

**Çizelge 4.3.** 1ml D<sub>2</sub>O içerisinde 0.05M sabit konsantrasyondaki ARA-C etken maddesine ayrı ayrı 0g, 0.01g, 0.02g, 0.03g, 0.04g ve 0.05g albümin eklenerek elde edilen 6 farklı örneğin 25<sup>0</sup>C (298K) sabit sıcaklıkta <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen her pikin 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub> durulma oranları

Albümin Konsantrasyonu (g/ml)	1/T <sub>1</sub> (s <sup>-1</sup> )								
	1.pik	2.pik	3.pik	4.pik	5.pik	6.pik	7.pik	8.pik	9.pik
0	0,475	0,472	0,432	0,427	0,296	0,291	0,057	0,454	0,411
0,01	0,502	0,497	0,451	0,45	0,319	0,32	0,069	0,48	0,442
0,02	0,51	0,51	0,466	0,463	0,342	0,34	0,083	0,507	0,479
0,03	0,518	0,515	0,471	0,472	0,351	0,348	0,09	0,5	0,495
0,04	0,527	0,528	0,479	0,49	0,369	0,369	0,108	0,521	0,508
0,05	0,549	0,547	0,503	0,51	0,397	0,402	0,124	0,554	0,55

Albümin Konsantrasyonu (g/ml)	1/T <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> )								
	1.pik	2.pik	3.pik	4.pik	5.pik	6.pik	7.pik	8.pik	9.pik
0	0,642	0,613	0,472	0,475	0,533	0,498	0,523	0,604	0,746
0,01	0,888	0,723	0,549	0,583	0,658	0,702	0,958	0,778	0,934
0,02	1,034	0,895	0,691	0,756	0,927	0,85	1,395	0,919	1,097
0,03	1,129	1,103	0,812	0,85	1,135	1,171	1,669	1,015	1,208
0,04	1,359	1,338	1,021	1,079	1,668	1,757	2,167	1,086	1,343
0,05	1,592	1,638	1,207	1,209	1,986	2,217	2,527	1,29	1,506

#### 4. BULGULAR ve TARTIŞMA



Şekil 4.7. ARA-C etken maddesinde gözlenen piklerinin, 6 farklı albümin konsantrasyonuna karşı durulma oranlarını veren grafik

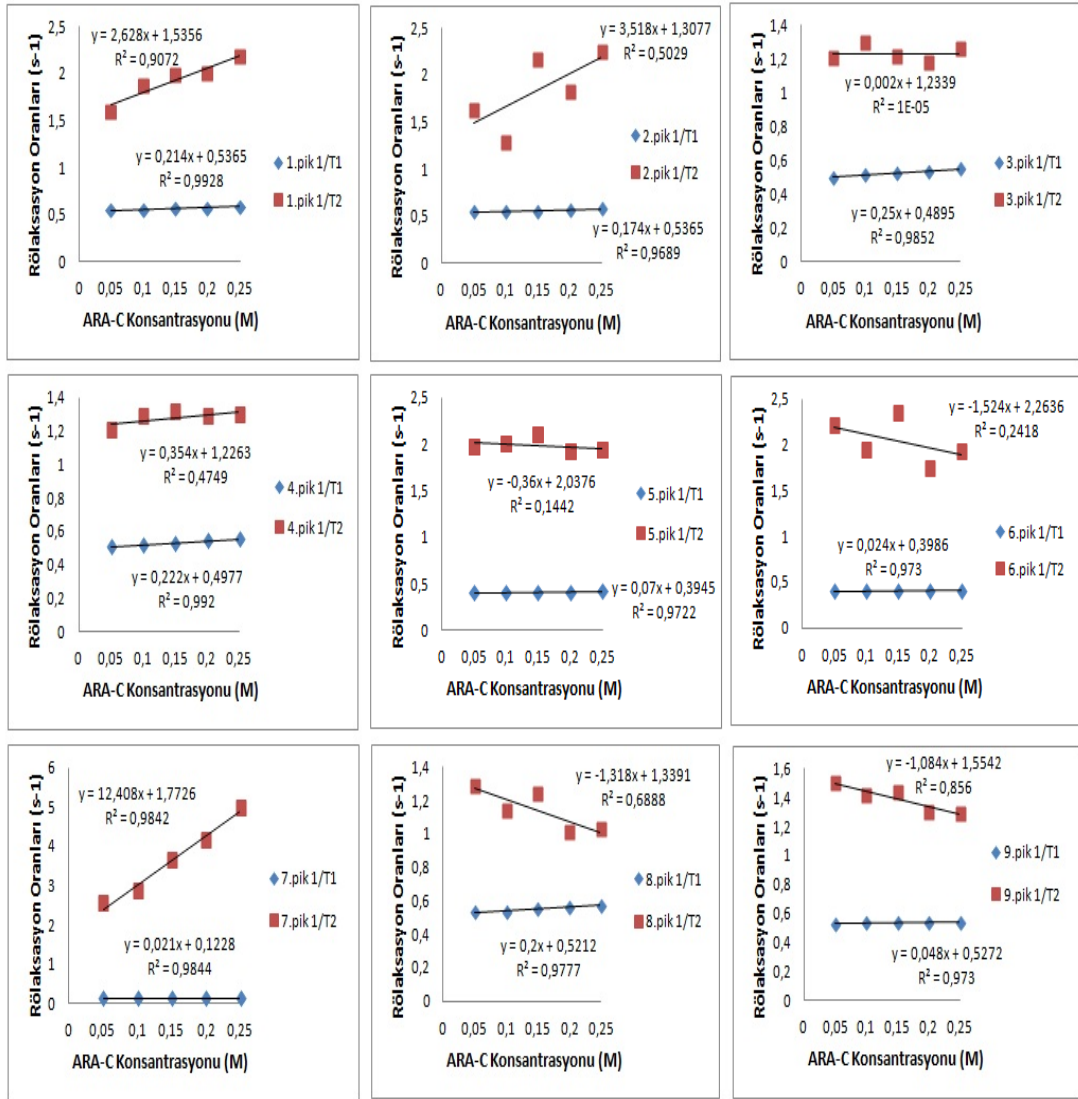
ARA-C etken maddesiyle yapılan konsantrasyona bağıllık deneylerinde, 0.05g sabit konsantrasyonda albümin varlığında 1ml D<sub>2</sub>O içerisine ayrı ayrı 0.05M, 0.10M, 0.15M, 0.20M ve 0.25M konsantrasyonlarına karşılık gelen ARA-C etken maddelerinin eklenmesiyle oluşturulan 5 farklı örneğin <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen her pikin T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanları 25<sup>0</sup>C (298K) sabit sıcaklıkta ölçülmüş ve bu değerlerden durulma oranları hesaplanmıştır. Bu değerler Çizelge 4.4 de gösterilmiştir. Çizelge 4.4 deki değerlerin grafiğe dökülmesi sonucu Şekil 4.8 elde edilmiştir. Şekil 4.8, 1ml D<sub>2</sub>O içerisinde 0.05g sabit konsantrasyonda albümin varlığında 5 farklı konsantrasyondaki ARA-C etken maddesinin 25<sup>0</sup>C (298K) sabit sıcaklıkta <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen bütün sinyallerin T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanlarından elde edilen durulma oranlarının ARA-C konsantrasyonuna göre grafiğini göstermektedir. Şekil 4.8 de görüldüğü gibi tüm piklerin 1/T<sub>1</sub> oranı, ARA-C etken maddesinin konsantrasyonuna göre doğrusal olarak artmaktadır. Buna karşılık 1/T<sub>2</sub> oranı tüm piklerde farklılık göstermektedir. 1. ve 7. pikte 1/T<sub>2</sub> oranı ARA-C konsantrasyonuna göre doğrusal olarak artmaktadır. 2. ve 4. pikte 1/T<sub>2</sub> oranı artma eğiliminde ancak tam olarak doğrusal bir artış söz konusu değildir. 6., 8. ve 9. pikin 1/T<sub>2</sub> oranı ARA-C konsantrasyonuna göre azalma eğiliminde olmakla birlikte bu azalma tam olarak doğrusal olmamaktadır. 3. ve 5. pikin 1/T<sub>2</sub> oranı ARA-C konsantrasyonuna göre sabit kalan bir dağılım göstermektedir.



**Çizelge 4.4.** 0.05g sabit konsantrasyonda albümin varlığında 1ml D<sub>2</sub>O içerisine beş farklı konsantrasyonda ARA-C etken maddelerinin eklenmesiyle oluşturulan örneklerin <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen her pikin 25<sup>0</sup>C (298K) sabit sıcaklıkta ölçülen 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub> durulma oranları

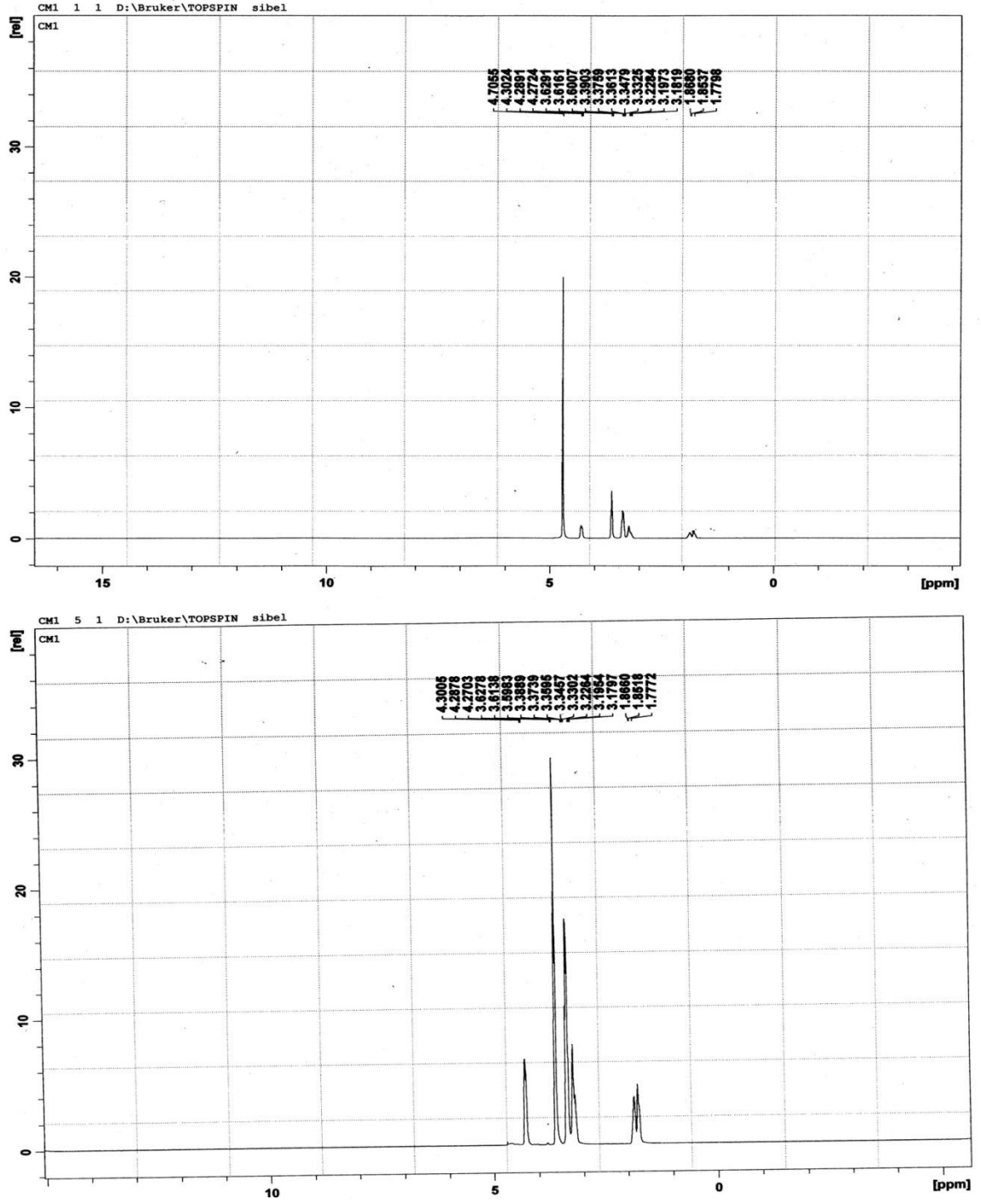
ARA-C Konsantrasyonu (M)	1/T <sub>1</sub> (s <sup>-1</sup> )								
	1.pik	2.pik	3.pik	4.pik	5.pik	6.pik	7.pik	8.pik	9.pik
0,05	0,549	0,547	0,503	0,51	0,398	0,4	0,124	0,534	0,53
0,10	0,556	0,553	0,516	0,519	0,402	0,401	0,1245	0,538	0,532
0,15	0,568	0,559	0,523	0,529	0,405	0,402	0,126	0,551	0,534
0,20	0,579	0,574	0,539	0,544	0,407	0,403	0,127	0,56	0,536
0,25	0,591	0,58	0,554	0,553	0,413	0,405	0,128	0,573	0,54

ARA-C Konsantrasyonu (M)	1/T <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> )								
	1.pik	2.pik	3.pik	4.pik	5.pik	6.pik	7.pik	8.pik	9.pik
0,05	1,592	1,638	1,207	1,209	1,975	2,217	2,527	1,29	1,506
0,10	1,874	1,297	1,297	1,289	2	1,935	2,877	1,14	1,418
0,15	1,991	2,166	1,221	1,313	2,102	2,35	3,623	1,242	1,441
0,20	2,012	1,82	1,18	1,288	1,912	1,739	4,149	1,009	1,298
0,25	2,18	2,256	1,266	1,298	1,929	1,934	4,993	1,026	1,295



Şekil 4.8. 0.05g albümin varlığında 1ml D<sub>2</sub>O içerisinde 5 farklı ARA-C konsantrasyonunun durulma oranlarını veren grafik

Bu tez çalışmasında kullanılan anti kanser ilaç etken maddelerinden sonuncusu olan Cyclophosphamide-Monohydrate (CM) etken maddesinin 0.05M konsantrasyonuna karşılık gelen miktarın 1ml D<sub>2</sub>O içerisinde çözdürülmesiyle elde edilen örneğin 400 MHz <sup>1</sup>H-NMR spektrumu Şekil 4.9a da gösterilmiştir. Bu spektrumda 4.7055ppm değerinde gözlenen pik HDO sinyali (1.pik), 4.3024ppm, 4.2891ppm ve 4.2724ppm değerlerinde bir kimyasal kaymaya sahip olan üçlü pik CM etken maddesinin kimyasal formülünde görülen O molekülünün komşusundaki CH<sub>2</sub> sinyali (2.pik), 3.6291ppm, 3.6161ppm ve 3.6007ppm değerlerinde bir kimyasal kaymaya sahip olan diğer üçlü pik Cl molekülünün komşusundaki CH<sub>2</sub> sinyali (3.pik), 3.3903ppm, 3.3759ppm ve 3.3613ppm civarındaki kimyasal kayma değerlerine sahip olan pik N molekülünün komşusundaki CH<sub>2</sub> sinyali (4.pik), 3.2284ppm, 3.1973ppm ve 3.1819ppm değerlerinde bir kimyasal kaymaya sahip olan diğer üçlü pik NH<sub>2</sub> molekülünün komşusundaki CH<sub>2</sub> sinyali (5.pik), 1.8537ppm civarında gözlenen pik ise CH<sub>2</sub> molekülünün sinyali (6.pik ve 7.pik) olarak adlandırılır.Şekil 4.9a da gösterilen NMR spektrumundaki HDO sinyali presaturasyon tekniği kullanılarak bastırılmış ve bu durumda ortaya çıkan <sup>1</sup>H-NMR spektrumu Şekil 4.9b de gösterilmiştir. Bu spektruma bakıldığında HDO sinyalinin tamamen ortadan kalktığı, buna karşılık diğer sinyallerin şiddetinin arttığı gözlenmiştir. Şekil 4.9a ve 4.9b de gösterilen iki spektrumun düşey eksenleri aynı skalada seçilmiştir.



Şekil 4.9. CM örneğinin  $^1\text{H}$ -NMR Spektrumu a) Tek Puls b) Presaturasyon

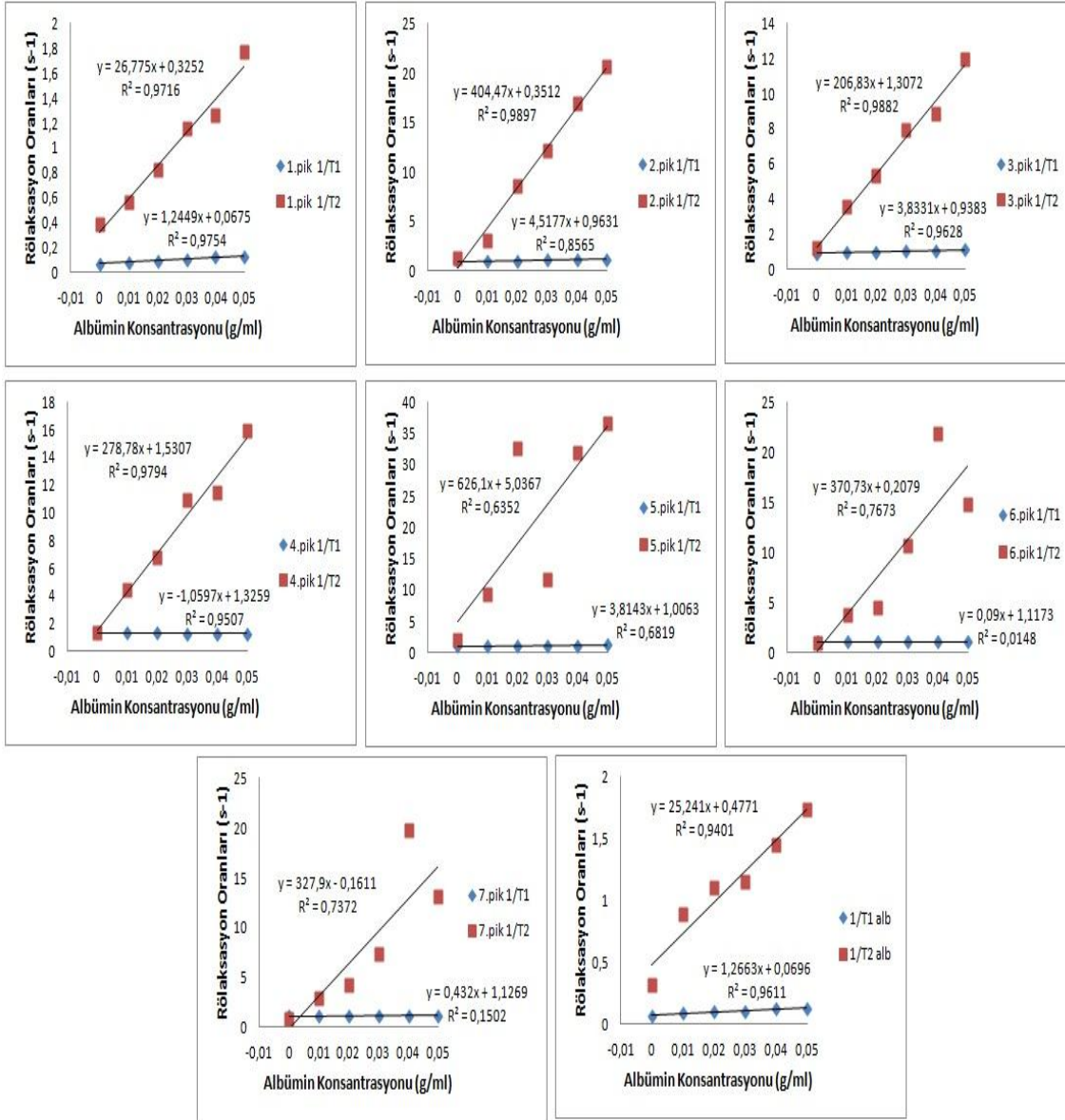
1ml D<sub>2</sub>O içerisinde 0.05M sabit konsantrasyondaki CM etken maddesine ayrı ayrı 0g, 0.01g, 0.02g, 0.03g, 0.04g ve 0.05g albümin eklenerek elde edilen 6 farklı örneğin 25 °C (298K) sabit sıcaklıkta <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen her pikin T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanları ölçülmüş ve bu değerlerden rölaksivite değerleri (durulma oranları 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub>) hesaplanmıştır. Bu değerler Çizelge 4.5 de gösterilmiştir. Çizelge 4.5 deki değerlerin grafik eksenine dökülmesiyle Şekil 4.10 elde edilir. Şekil 4.10, 1ml D<sub>2</sub>O içerisinde 0.05M sabit konsantrasyondaki CM etken maddesine 6 farklı konsantrasyonda albümin eklenmesiyle elde edilen örneklerin, 25°C (298K) sabit sıcaklıkta <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen bütün sinyallerin T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanlarından elde edilen durulma oranlarının albümin konsantrasyonuna göre grafiğini göstermektedir. Şekil 4.10 da görüldüğü gibi CM etken maddesinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen bütün sinyallerinin 1/T<sub>2</sub> değerleri albümin konsantrasyonuna göre artış göstermektedir. Ancak bu artış ilk dört pik için tam olarak doğrusal iken, 5. 6. ve 7. pikler için tamamıyla doğrusal olmamaktadır. 1/T<sub>1</sub> değerleri ise ilk 5 pik için albümin konsantrasyonuna göre artma eğilimi göstermektedir. Bu eğilim ilk dört pikte tamamen doğrusal iken 5. pikte tam doğrusallıktan bahsetmek güçtür. 6. ve 7. pikler için 1/T<sub>1</sub> oranı albümin konsantrasyonuna göre sabit kalmaktadır.

**Çizelge 4.5.** 1ml D<sub>2</sub>O içerisinde 0.05M sabit konsantrasyondaki CM etken maddesine ayrı ayrı 0g, 0.01g, 0.02g, 0.03g, 0.04g ve 0.05g albümin eklenerek elde edilen 6 farklı örneğin 25<sup>0</sup>C (298K) sabit sıcaklıkta <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen her pikin 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub> durulma oranları

Albümin Konsantrasyonu (g/ml)	1/T <sub>1</sub> (s <sup>-1</sup> )							Albümin
	1.pik	2.pik	3.pik	4.pik	5.pik	6.pik	7.pik	
0	0,0687	0,9689	0,9328	1,3238	1,0552	1,1289	1,1377	0,0635
0,01	0,0795	0,9991	0,9991	1,3191	1,0503	1,1186	1,1394	0,0871
0,02	0,0874	1,0204	0,9941	1,3086	1,0244	1,1011	1,1056	0,0986
0,03	0,1083	1,128	1,0513	1,288	1,0891	1,1242	1,1286	0,1055
0,04	0,1216	1,1913	1,0954	1,28	1,1294	1,1064	1,1693	0,1242
0,05	0,1264	1,1483	1,1319	1,2772	1,2618	1,1379	1,1454	0,1285

Albümin Konsantrasyonu (g/ml)	1/T <sub>2</sub> (s <sup>-1</sup> )							Albümin
	1.pik	2.pik	3.pik	4.pik	5.pik	6.pik	7.pik	
0	0,388	1,3412	1,2005	1,4025	2	0,9747	0,8077	0,3224
0,01	0,564	3,0912	3,5486	4,4944	9,4339	3,8053	2,9833	0,8865
0,02	0,8197	8,5984	5,3504	6,8259	32,6691	4,5766	4,2319	1,0995
0,03	1,1569	12,1802	7,9428	10,8992	11,5848	10,7609	7,3746	1,1477
0,04	1,2649	16,9348	8,8417	11,4508	31,8573	21,9177	19,7476	1,4524
0,05	1,7743	20,6313	11,9846	15,9286	36,5898	14,8214	13,0736	1,7401

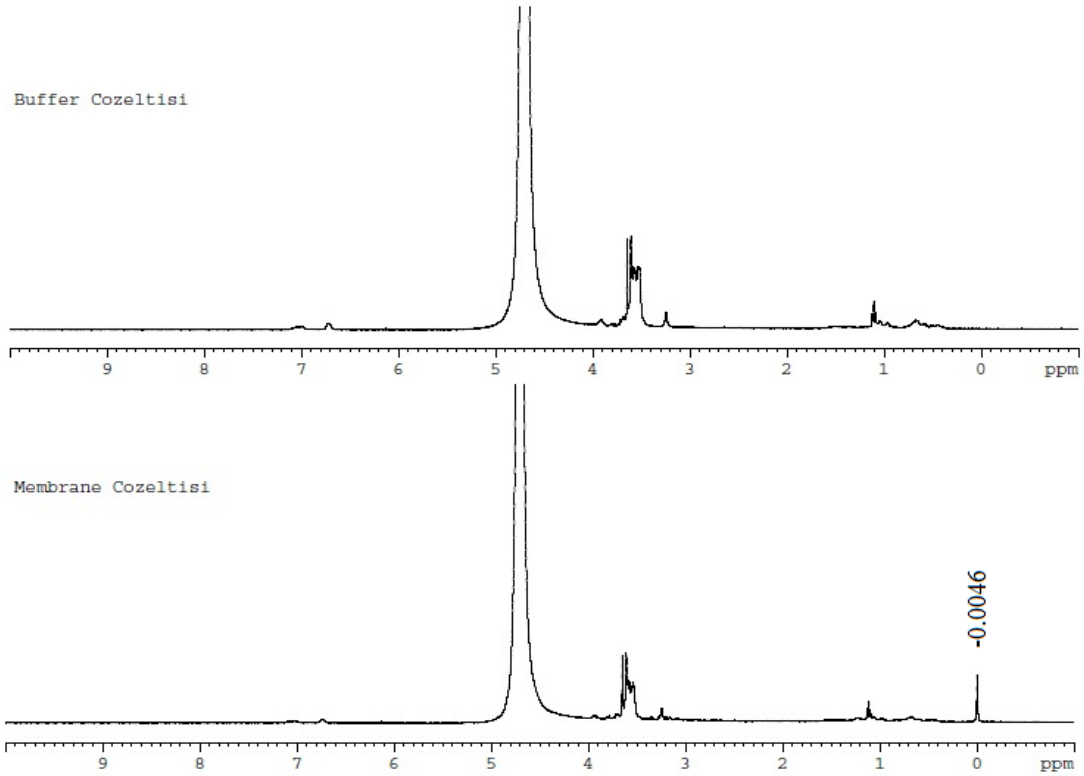
#### 4. BULGULAR ve TARTIŞMA



Şekil 4.10. 1ml D<sub>2</sub>O içerisinde 0.05M konsantrasyondaki CM etken maddesinde gözlenen piklerin, 6 farklı albümin konsantrasyonuna karşı durulma oranlarını veren grafik

Tez çalışmasının ikinci aşamasında anti kanser ilaç etken maddeleri ile normal ve diyabetik olmak üzere iki tür membrane örneği etkileştirilmiş ve bu örneklerin 400 MHz  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu incelenmiştir.

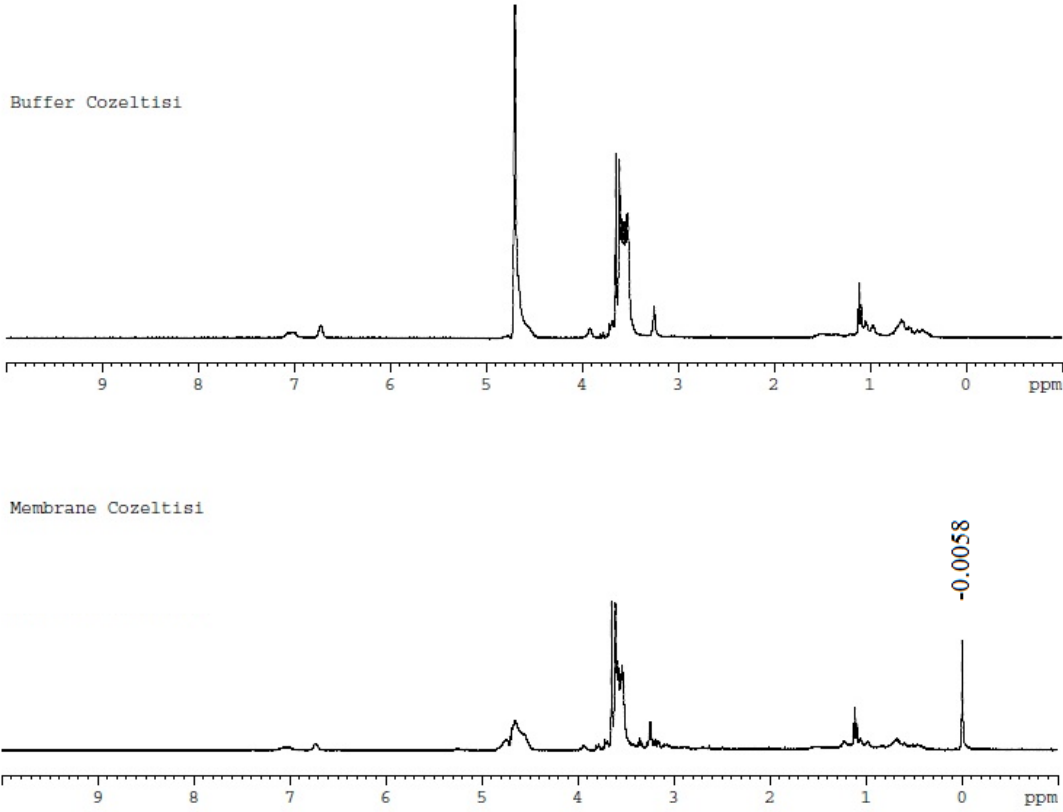
Şekil 4.11, membrane örneklerinin homojenize edildiği tampon çözelti ile membrane örneğinin 400 MHz  $^1\text{H}$ -NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.11a, 100 $\mu\text{l}$  buffer (tampon) çözelti ile 900 $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$  karışımının  $^1\text{H}$ -NMR spektrumunu, Şekil 4.11b ise 20 $\mu\text{l}$  membrane örneği ile 980 $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$  karışımının  $^1\text{H}$ -NMR spektrumunu aynı düşey skalada vermektedir. Bu iki spektrum karşılaştırıldığında tek farkın, membrane örneği ile  $\text{D}_2\text{O}$  karışımının  $^1\text{H}$ -NMR spektrumunda -0.0046ppm kimyasal kayma değerinde gözlenen sinyal olduğu görülmektedir. Bunun sonucunda membrane örneklerinde bu sinyal dikkate alınmıştır.



**Şekil 4.11.** Buffer (tampon) çözelti+ $\text{D}_2\text{O}$  karışımı ile membrane+ $\text{D}_2\text{O}$  karışımının NMR spektrumu (tek puls)

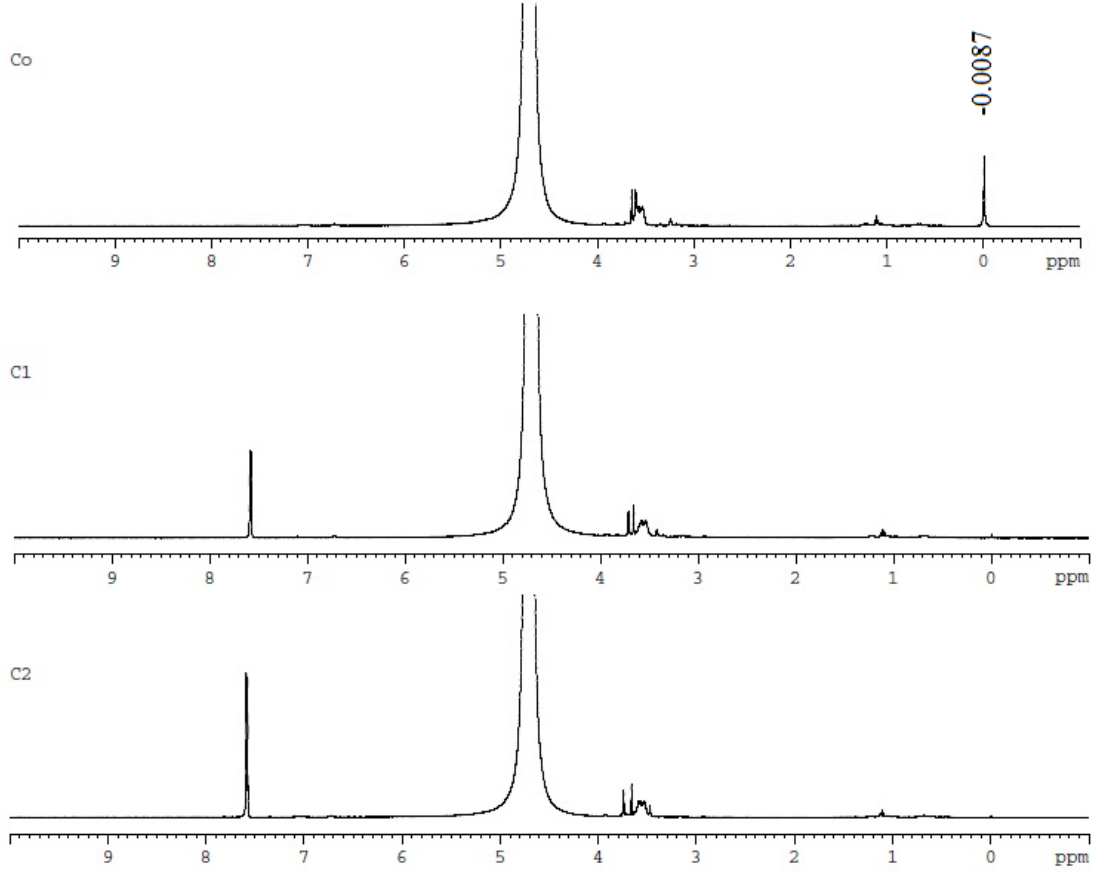


Şekil 4.12, membrane örneklerinin homojenize edildiği tampon çözelti ile membrane örneğinin 400 MHz  $^1\text{H}$ -NMR spektrumunda presaturasyon teknikleri kullanılarak HDO sinyalinin bastırılması sonucu elde edilen spektrumu vermektedir. Şekil 4.12a, tampon çözelti ile  $\text{D}_2\text{O}$  karışımının presaturasyon durumundaki  $^1\text{H}$ -NMR spektrumunu, Şekil 4.12b ise membrane örneği ile  $\text{D}_2\text{O}$  karışımının presaturasyon durumundaki  $^1\text{H}$ -NMR spektrumunu aynı düşey skalada vermektedir. Yine bu iki spektrum karşılaştırıldığında, membrane örneği ile  $\text{D}_2\text{O}$  karışımının  $^1\text{H}$ -NMR spektrumunda  $-0.0058\text{ppm}$  kimyasal kayma değerinde gözlenen sinyal olduğu görülmektedir. Şekil 11b de  $-0.0046\text{ppm}$  değerinde gözlenen bu sinyal presaturasyon durumunda  $-0.0058\text{ppm}$  değerine kaymıştır.



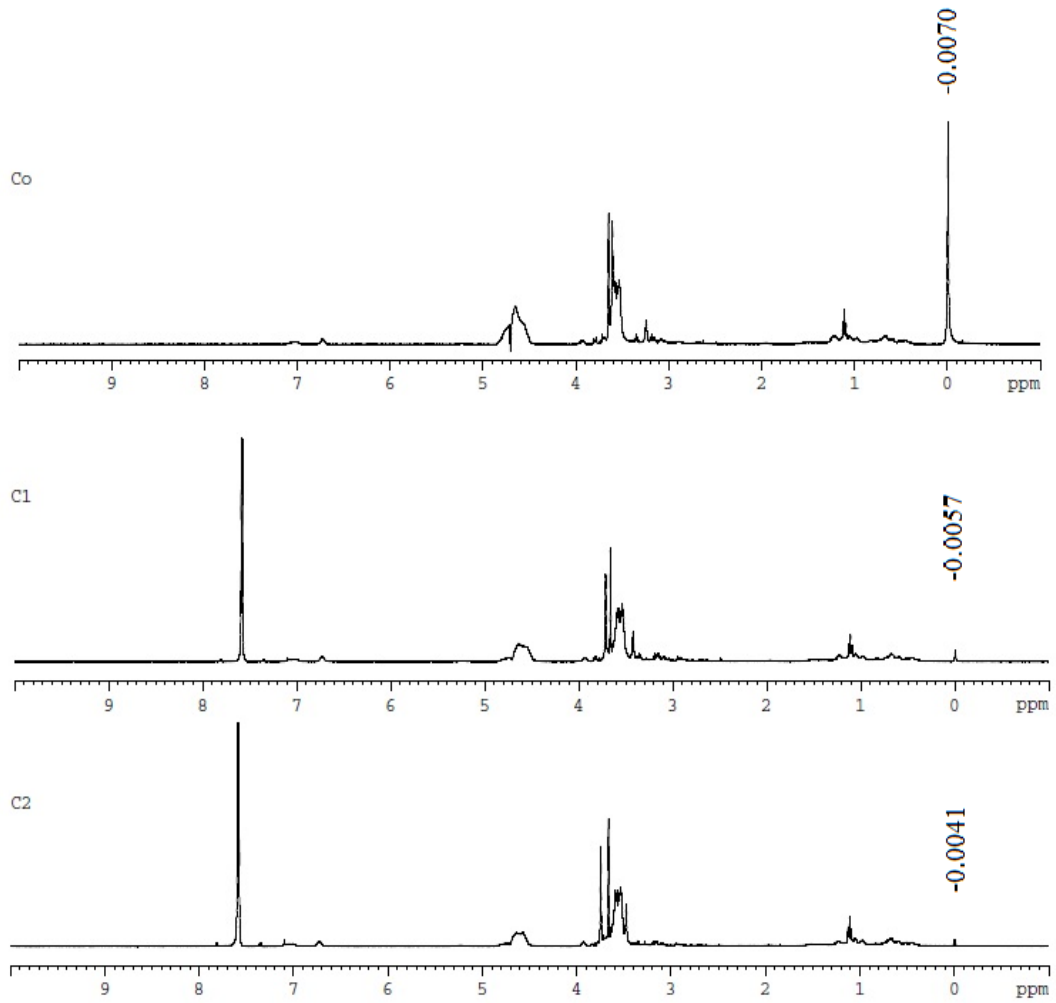
**Şekil 4.12.** Buffer (tampon) çözelti+ $\text{D}_2\text{O}$  karışımı ile membrane+ $\text{D}_2\text{O}$  karışımının NMR spektrumu (presaturasyon)

Şekil 4.13, 40µl sabit konsantrasyonda normal membrane varlığında, FU etken maddesinin üç farklı konsantrasyonu ile 960µl D<sub>2</sub>O karışımının <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.13a; 40µl normal membrane çözeltisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0g FU etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.13b; 40µl normal membrane çözeltisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.003g FU etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 13c ise 40µl normal membrane çözeltisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.007g FU etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir.Şekil 4.13a da -0.0087ppm değerinde gözlenen membrane sinyalinin şiddeti, etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla büyük ölçüde azalıp sıfıra gitmektedir.



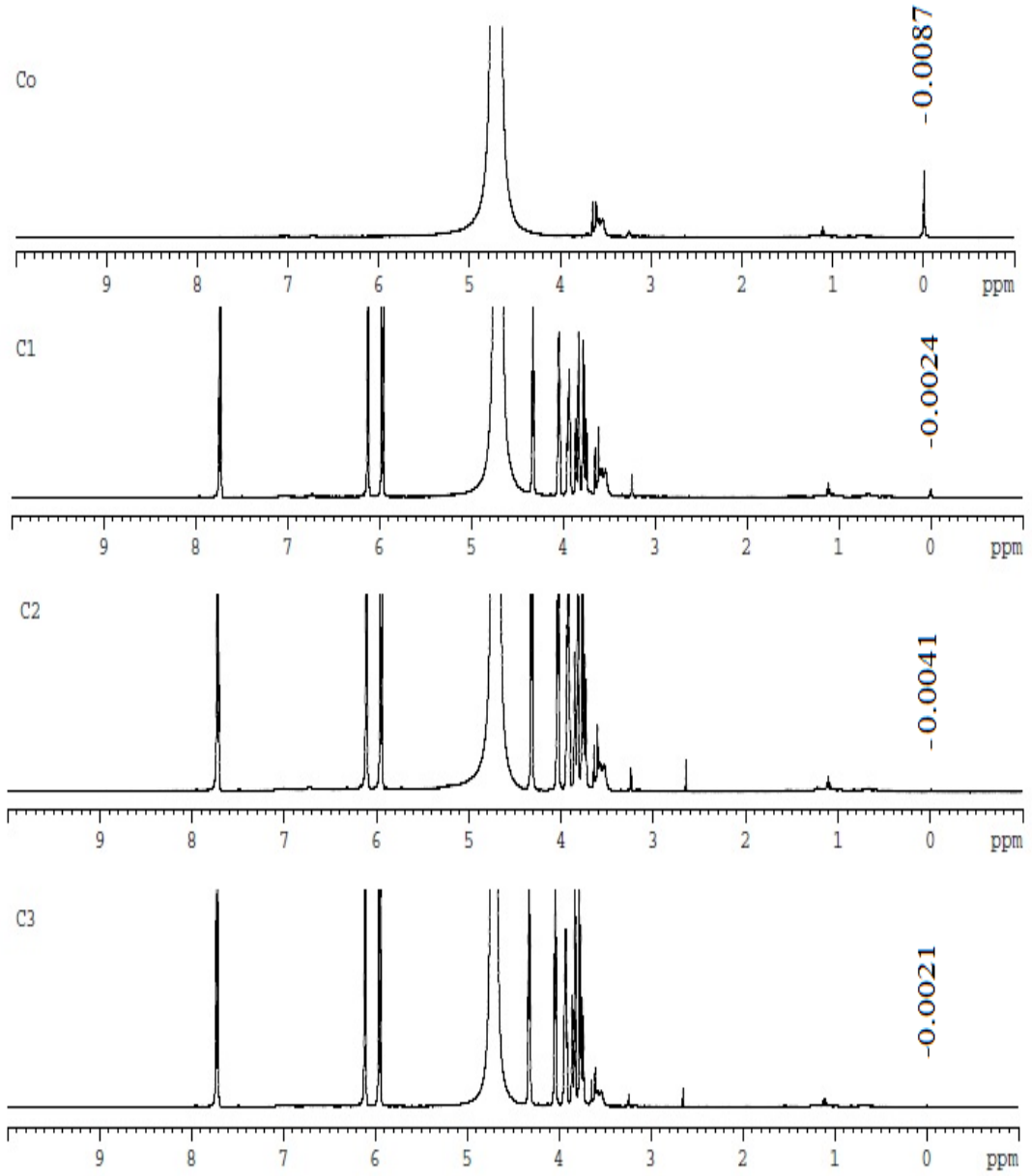
**Şekil 4.13.** Normal Membrane ile FU etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (Tek puls) a) 0g FU (Co), b) 0.003g FU (C1), c) 0.007g FU (C2)

Şekil 4.14, 40µl sabit konsantrasyonda normal membrane varlığında, FU etken maddesinin üç farklı konsantrasyonu ile 960µl D<sub>2</sub>O karışımının presaturasyon durumundaki <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.13 de gözlenen HDO sinyali presaturasyon tekniği ile bastırılmış ve bunun sonucunda diğer piklerin şiddeti artmıştır. Şekil 4.14a, 40µl normal membrane çözeltisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0g FU etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.14b 40µl normal membrane çözeltisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.003g FU etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.14c ise 40µl normal membrane çözeltisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.007g FU etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin presaturasyon durumundaki <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.13a da -0.0087ppm değerinde gözlenen membrane sinyalinin şiddeti Şekil 4.14a da görüldüğü gibi da büyük olmakta ve bu sinyalin kimyasal kayma değeri de -0.0070ppm değerine kaymış olmaktadır. Şekil 4.14a da -0.0070ppm değerinde gözlenen membrane sinyalinin şiddeti etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla büyük ölçüde azalıp sifıra gitmekte ve sinyal kimyasal kaymaya uğramaktadır.



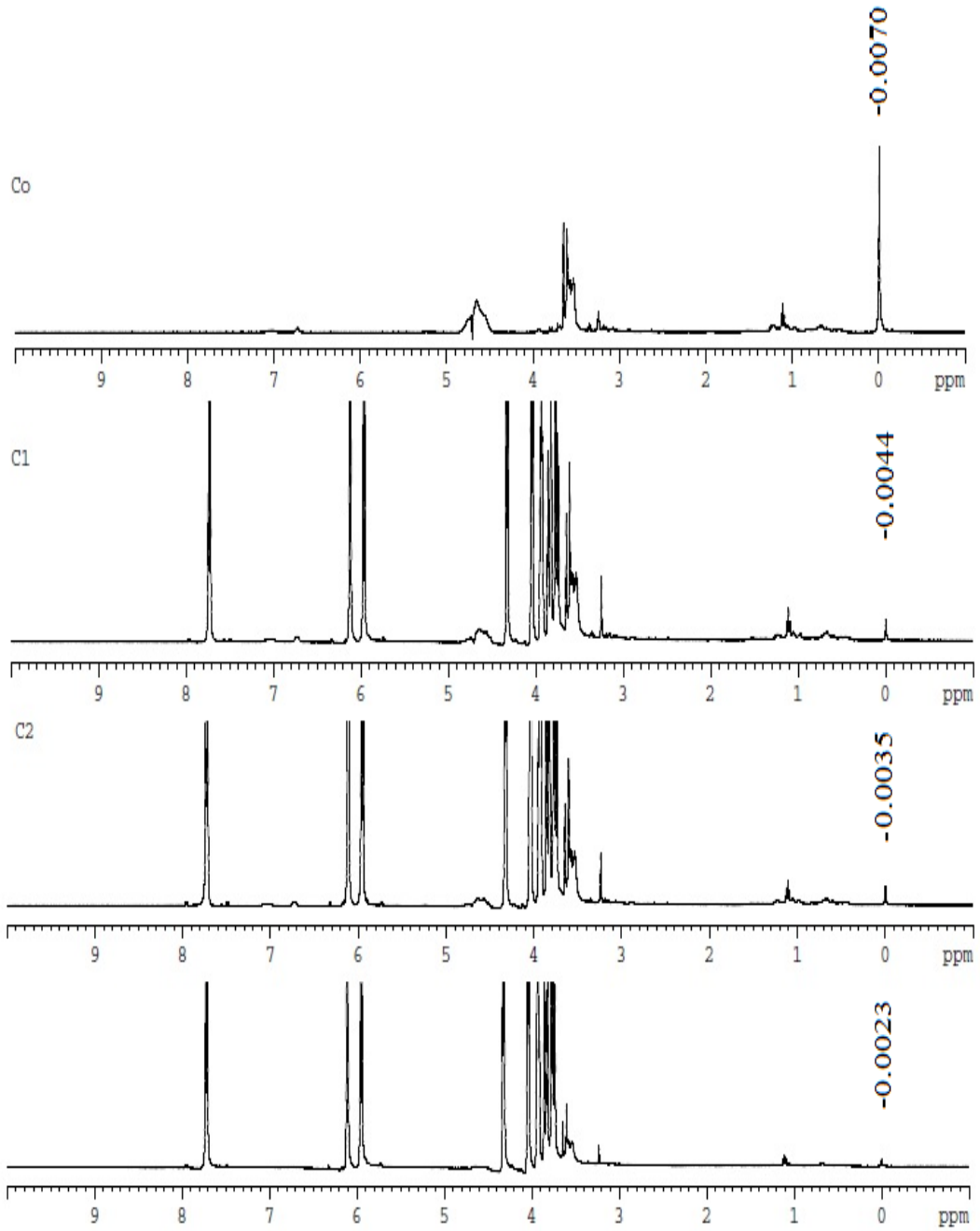
**Şekil 4.14.** Normal Membrane ile FU etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (presaturasyon) a) 0g FU (Co), b) 0.003g FU (C1), c) 0.007 g FU (C2)

Şekil 4.15, 40µl sabit konsantrasyonda normal membrane varlığında, ARA-C etken maddesinin dört farklı konsantrasyonu ile 960µl D<sub>2</sub>O karışımının <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.15a, 40µl normal membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0g ARA-C etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.15b 40µl normal membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.012g ARA-C etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.15c ise 40µl normal membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.024g ARA-C etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin ve Şekil 4.15d ise 40µl normal membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.036g ARA-C etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.15a da -0.0087ppm değerinde gözlenen membrane sinyalinin şiddeti, etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla büyük ölçüde azalıp sıfıra gitmektedir.



**Şekil 4.15.** Normal Membrane ile ARA-C etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (Tek puls) a) 0g ARA-C (Co), b) 0.012g ARA- C (C1), c) 0.024g ARA-C (C2), d) 0.036g ARA-C (C3)

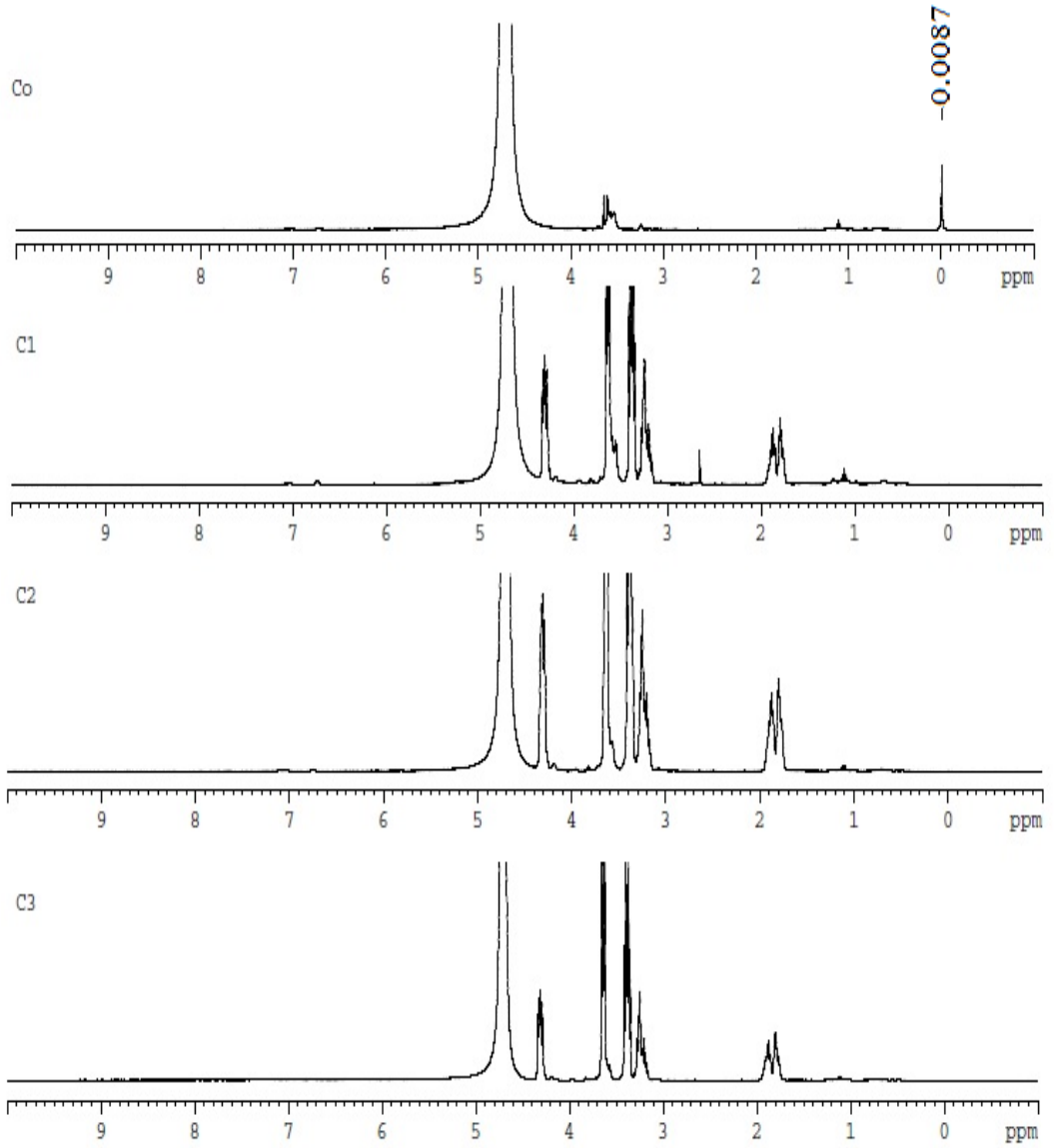
Şekil 4.16, 40µl sabit konsantrasyonda normal membrane varlığında, ARA-C etken maddesinin dört farklı konsantrasyonu ile 960µl D<sub>2</sub>O karışımının presaturasyon durumundaki <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.15 de gözlenen HDO sinyali presaturasyon tekniği ile bastırılmış ve bunun sonucunda diğer piklerin şiddeti artmıştır. Şekil 4.16a, 40µl normal membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0g ARA-C etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.16b 40µl normal membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.012g ARA-C etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.16c 40µl normal membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.024g ARA-C etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin ve Şekil 4.16d ise 40µl normal membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.036g ARA-C etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin presaturasyon durumundaki <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.15a da -0.0087ppm değerinde gözlenen membrane sinyalinin şiddeti Şekil 4.16a da görüldüğü gibi da büyük olmakta ve bu sinyalin kimyasal kayma değeri de -0.0070ppm değerine kaymış olmaktadır. Şekil 4.16a da -0.0070ppm değerinde gözlenen membrane sinyalinin şiddeti, etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla büyük ölçüde azalıp sıfıra gitmekte ve sinyal kimyasal kaymaya uğramaktadır.



**Şekil 4.16.** Normal Membrane ile ARA-C etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (presaturasyon) a) 0g ARA-C (Co), b) 0.012g ARA-C (C1), c) 0.024g ARA-C (C2), d) 0.036 g ARA-C (C3)

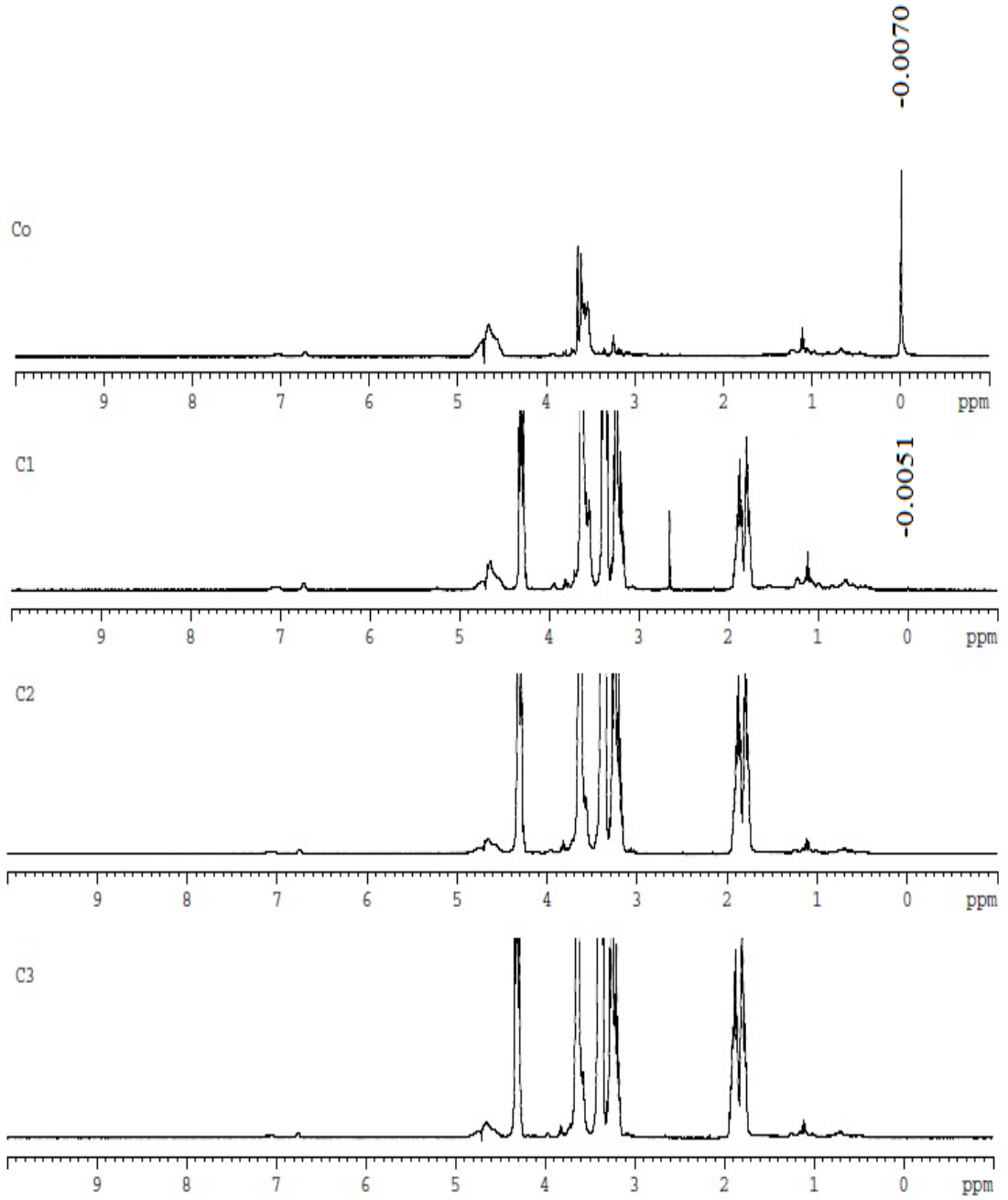


Şekil 4.17, 40µl sabit konsantrasyonda normal membrane varlığında, CM etken maddesinin dört farklı konsantrasyonu ile 960µl D<sub>2</sub>O karışımının <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.17a, 40µl normal membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0g CM etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.17b 40µl normal membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.010g CM etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.17c 40µl normal membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.020g CM etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin ve Şekil 4.17d ise 40µl normal membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.030g CM etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.17a da -0.0087ppm değerinde gözlenen membrane sinyalinin şiddeti, etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla azalıp sıfıra gitmektedir.



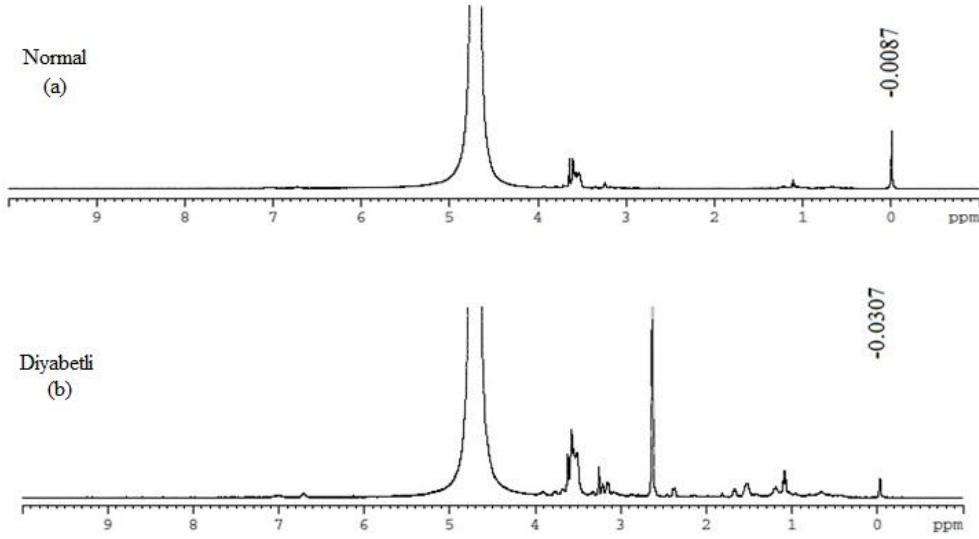
**Şekil 4.17.** Normal Membrane ile CM etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (Tek puls) a) 0g CM (Co), b) 0.010g CM (C1), c) 0.020g CM (C2), d) 0.030g CM (C3)

Şekil 4.18, 40µl sabit konsantrasyonda normal membrane varlığında, CM etken maddesinin dört farklı konsantrasyonu ile 960µl D<sub>2</sub>O karışımının presaturasyon durumundaki <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.17 de gözlenen HDO sinyali presaturasyon tekniği ile bastırılmış ve bunun sonucunda diğer piklerin şiddeti artmıştır. Şekil 4.18a, 40µl normal membrane çözeltisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0g CM etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.18b 40µl normal membrane çözeltisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.010g CM etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.18c 40µl normal membrane çözeltisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.020g CM etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin ve Şekil 4.18d ise 40µl normal membrane çözeltisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.030g CM etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin presaturasyon durumundaki <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.17a da -0.0087ppm değerinde gözlenen membrane sinyalinin şiddeti Şekil 4.18a da görüldüğü gibi da büyük olmakta ve bu sinyalin kimyasal kayma değeri de -0.0070ppm değerine kaymış olmaktadır. Şekil 4.18a da -0.0070ppm değerinde gözlenen membrane sinyalinin şiddeti, etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla tamamen azalıp sifıra gitmektedir.

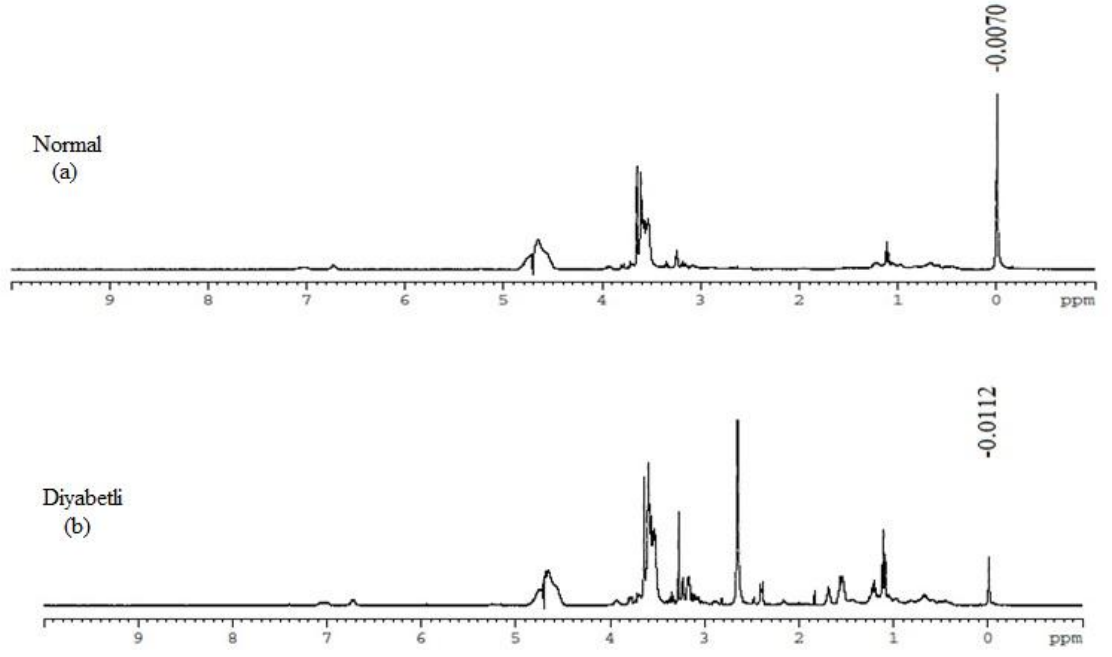


**Şekil 4.18.** Normal Membrane ile CM etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (presaturasyon) a) 0g CM (Co), b) 0.010g CM (C1), c) 0.020g CM (C2), d) 0.030g CM (C3)

Normal ve diyabetikli olmak üzere iki çeşit membrane örneklerinin her birinden 40µl alınarak elde edilen örneklerin 400MHz  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu karşılaştırılmalı olarak Şekil 4.19 da verilmiştir. Görüldüğü üzere diyabetiklik, normal membranın yapısını değiştirmekte ve membrane pikinin yerini kaydırmaktadır. Aynı örneklerin presaturasyon durumundaki  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu da Şekil 4.20 de verilmiştir. Bu şekilde görüldüğü üzere her iki örneğin tek puls deneyinden elde edilen NMR spektrumlarındaki membrane piklerinin şiddeti artmış ve kimyasal kayma değerleri değişmiştir.

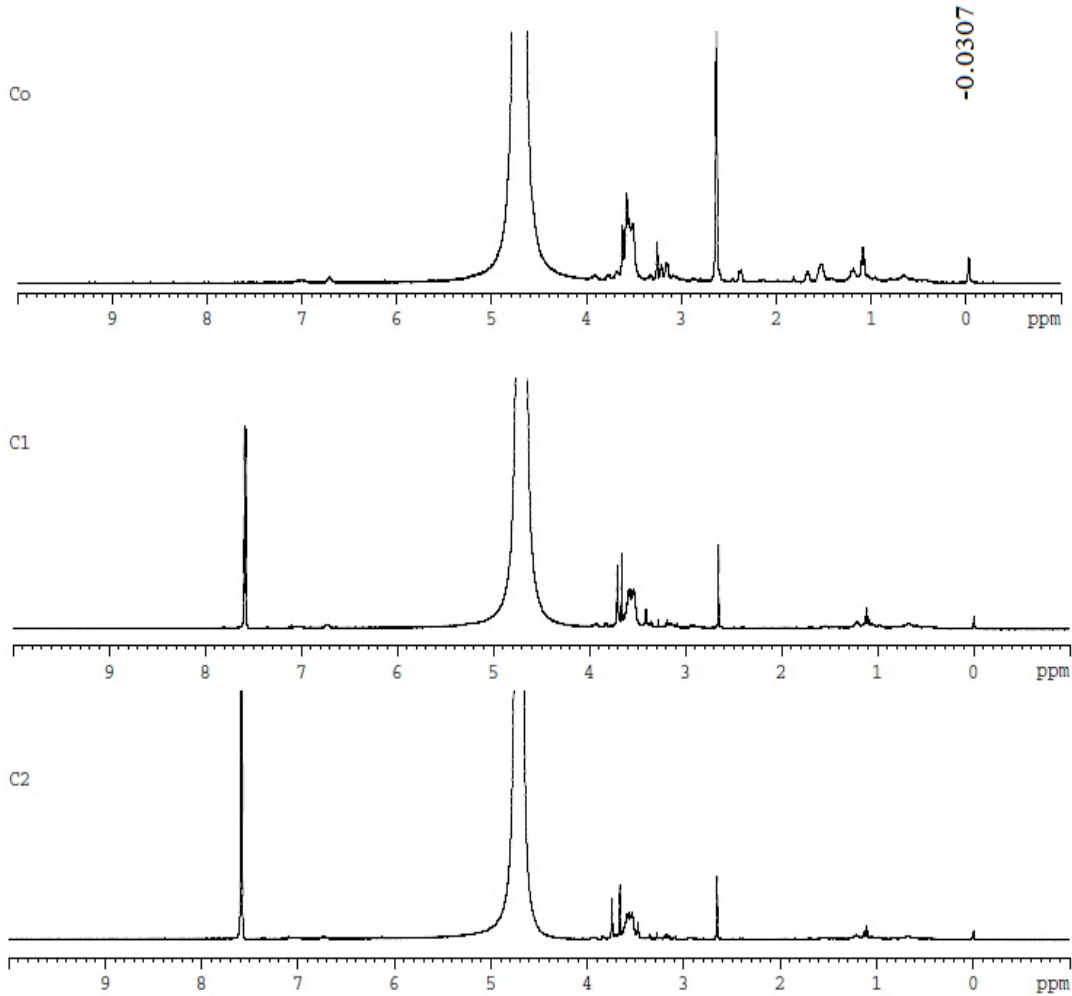


**Şekil 4.19.** a) 40µl normal membrane+960µl D<sub>2</sub>O b) 40µl diyabetli membrane+960µl D<sub>2</sub>O örneklerinin 400MHz  $^1\text{H}$ -NMR spektrumu (Tek puls)



**Şekil 4.20.** a) 40µl normal membrane+960µl D<sub>2</sub>O b) 40µl diyabetli membrane+960µl D<sub>2</sub>O örneklerinin 400MHz <sup>1</sup>H-NMR spektrumu (presaturasyon)

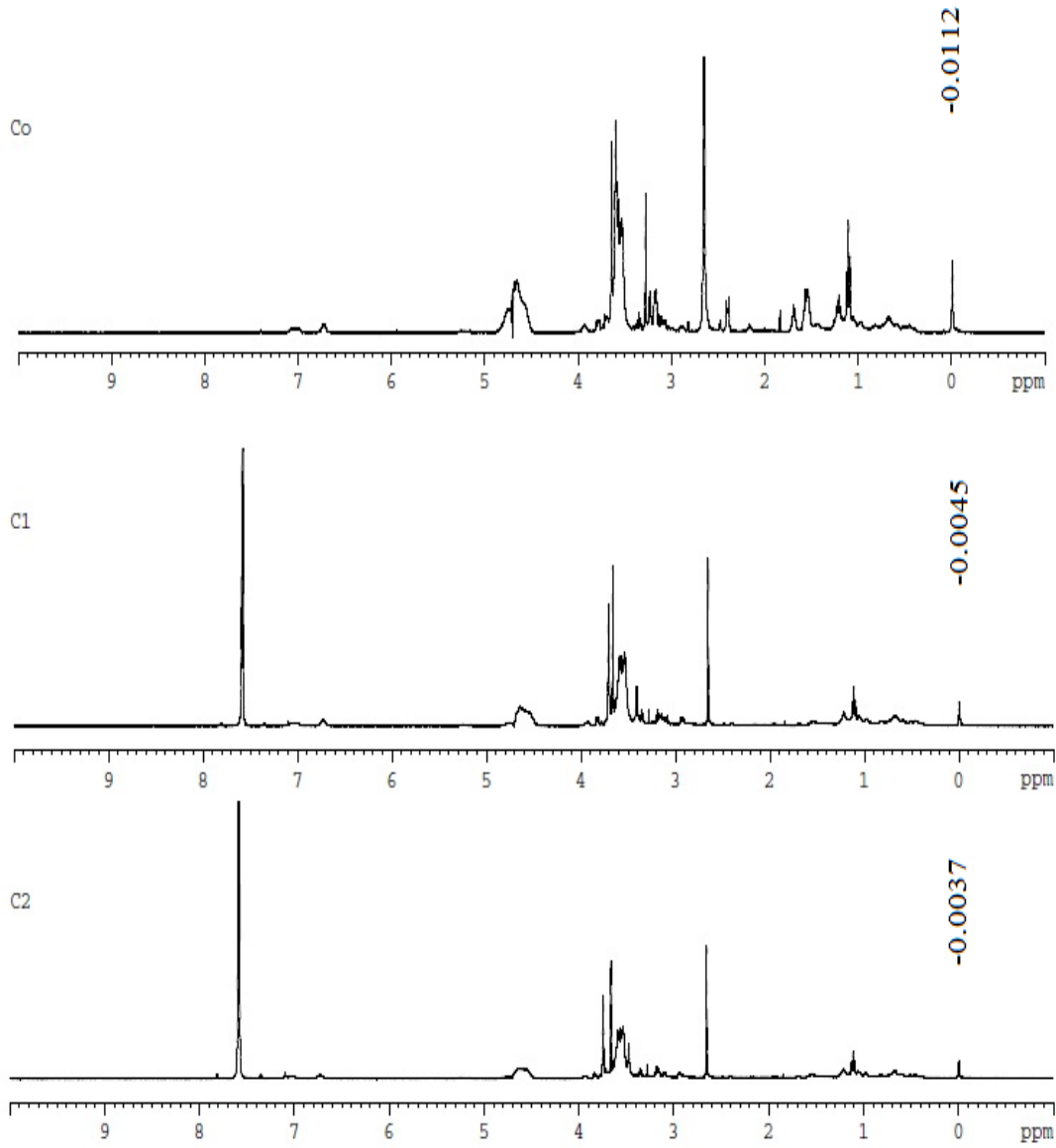
Şekil 4.21, 40µl sabit konsantrasyonda diyabetik membrane varlığında, FU etken maddesinin üç farklı konsantrasyonu ile 960µl D<sub>2</sub>O karışımının <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.21a, 40µl diyabetik membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0g FU etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.21b 40µl diyabetik membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.003g FU etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.21c ise 40µl diyabetik membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.007g FU etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.21a da -0.0307ppm değerinde gözlenen diyabetik membrane sinyalinin şiddeti, etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla büyük ölçüde azalıp sıfıra gitmektedir.



**Şekil 4.21.** Diyabetik Membrane ile FU etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (Tek puls) a) 0g FU (Co), b) 0.003g FU (C1), c) 0.007 g FU (C2)

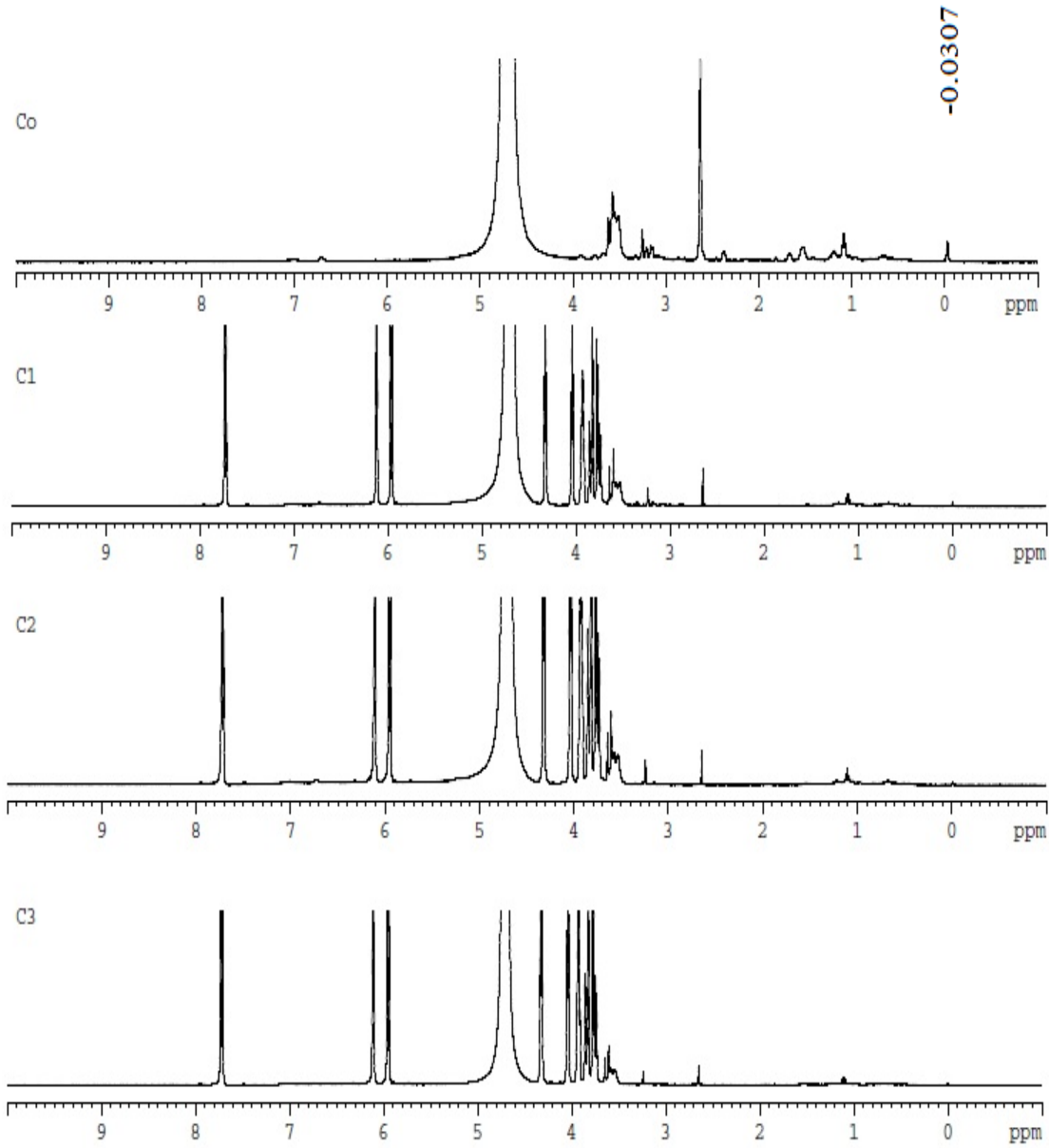
Şekil 4.22, 40µl sabit konsantrasyonda diyabetik membrane varlığında, FU etken maddesinin üç farklı konsantrasyonu ile 960µl D<sub>2</sub>O karışımının presaturasyon durumundaki <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.21 de gözlenen HDO sinyali presaturasyon tekniği ile bastırılmış ve bunun sonucunda diğer piklerin şiddeti artmıştır. Şekil 4.22a, 40µl diyabetik membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0g FU etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.22b 40µl diyabetik membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.003g FU etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.22c ise 40µl diyabetik membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.007g FU etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin presaturasyon durumundaki <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.21a da -0.0307ppm değerinde gözlenen diyabetik membrane sinyalinin kimyasal kayma değeri -0.0112ppm değerine kaymış olmaktadır. Şekil 4.22a da -0.0112ppm değerinde gözlenen diyabetik membrane sinyalinin şiddeti etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla büyük ölçüde azalıp sifıra gitmekte ve sinyal kimyasal kaymaya uğramaktadır.





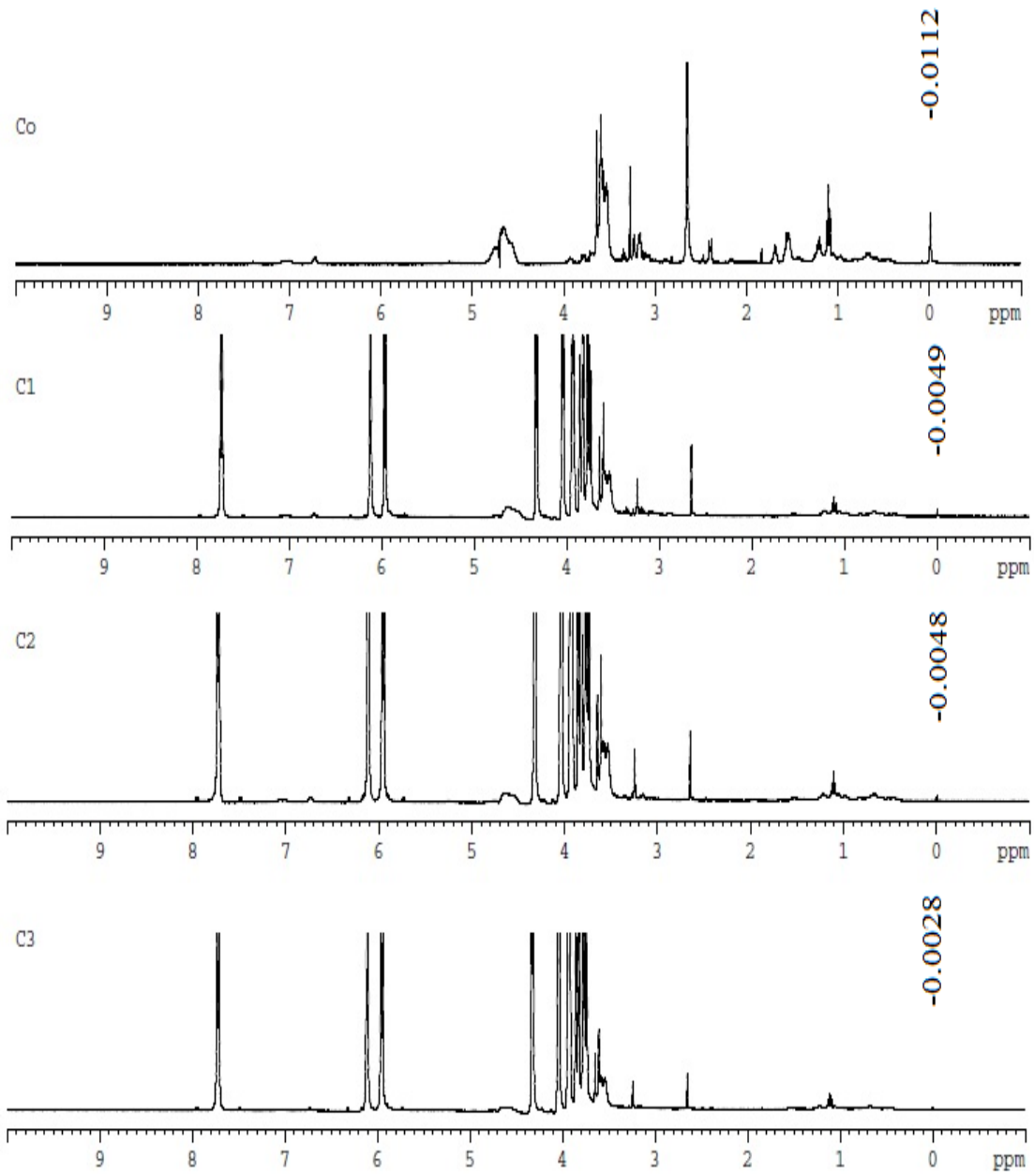
**Şekil 4.22.** Diyabetik Membrane ile FU etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (presaturasyon) a) 0g FU (Co), b) 0.003g FU (C1), c) 0.007g FU (C2)

Şekil 4.23, 40µl sabit konsantrasyonda diyabetik membrane varlığında, ARA-C etken maddesinin dört farklı konsantrasyonu ile 960µl D<sub>2</sub>O karışımının <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.23a, 40µl diyabetik normal membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0g ARA-C etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.23b 40µl diyabetik membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.012g ARA-C etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.23c 40µl diyabetik membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.024g ARA-C etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin ve Şekil 4.23d ise 40µl diyabetik membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.036g ARA-C etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.23a da -0.0307ppm değerinde gözlenen diyabetik membrane sinyalinin şiddeti, etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla büyük ölçüde azalıp sıfıra gitmektedir.



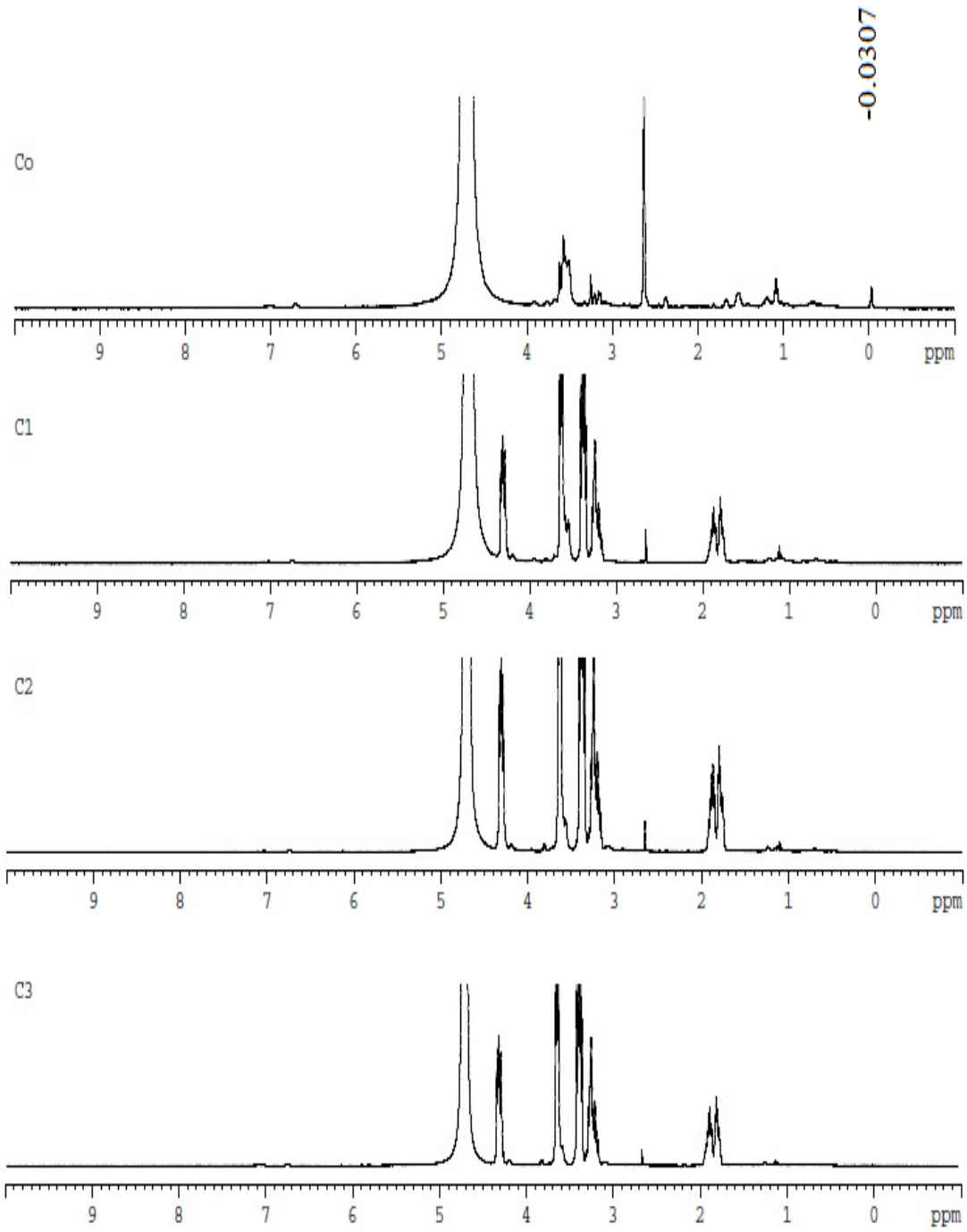
**Şekil 4.23.** Diyabetik Membrane ile ARA-C etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (Tek puls) a) 0g ARA-C (Co), b) 0.012g ARA- C (C1), c) 0.024g ARA-C (C2), d) 0.036 g ARA-C (C3)

Şekil 4.24, 40µl sabit konsantrasyonda diyabetik membrane varlığında, ARA-C etken maddesinin dört farklı konsantrasyonu ile 960µl D<sub>2</sub>O karışımının presaturasyon durumundaki <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.23 de gözlenen HDO sinyali presaturasyon tekniği ile bastırılmış ve bunun sonucunda diğer piklerin şiddeti artmıştır. Şekil 4.24a, 40µl diyabetik membrane çözültisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0g ARA-C etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.24b 40µl diyabetik membrane çözültisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.012g ARA-C etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.24c 40µl diyabetik membrane çözültisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.024g ARA-C etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin ve Şekil 4.24d ise 40µl diyabetik membrane çözültisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.036g ARA-C etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin presaturasyon durumundaki <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.23a da -0.0307ppm değerinde gözlenen diyabetik membrane sinyalinin kimyasal kayma değeri -0.0112ppm değerine kaymış olmaktadır. Şekil 4.24a da -0.0112ppm değerinde gözlenen diyabetik membrane sinyalinin şiddeti, etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla büyük ölçüde azalıp sifıra gitmekte ve sinyal kimyasal kaymaya uğramaktadır.



**Şekil 4.24.** Diyabetik Membrane ile ARA-C etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (presaturasyon) a) 0g ARA-C (Co), b) 0.012g ARA- C (C1), c) 0.024g ARA-C (C2), d) 0.036g ARA-C (C3)

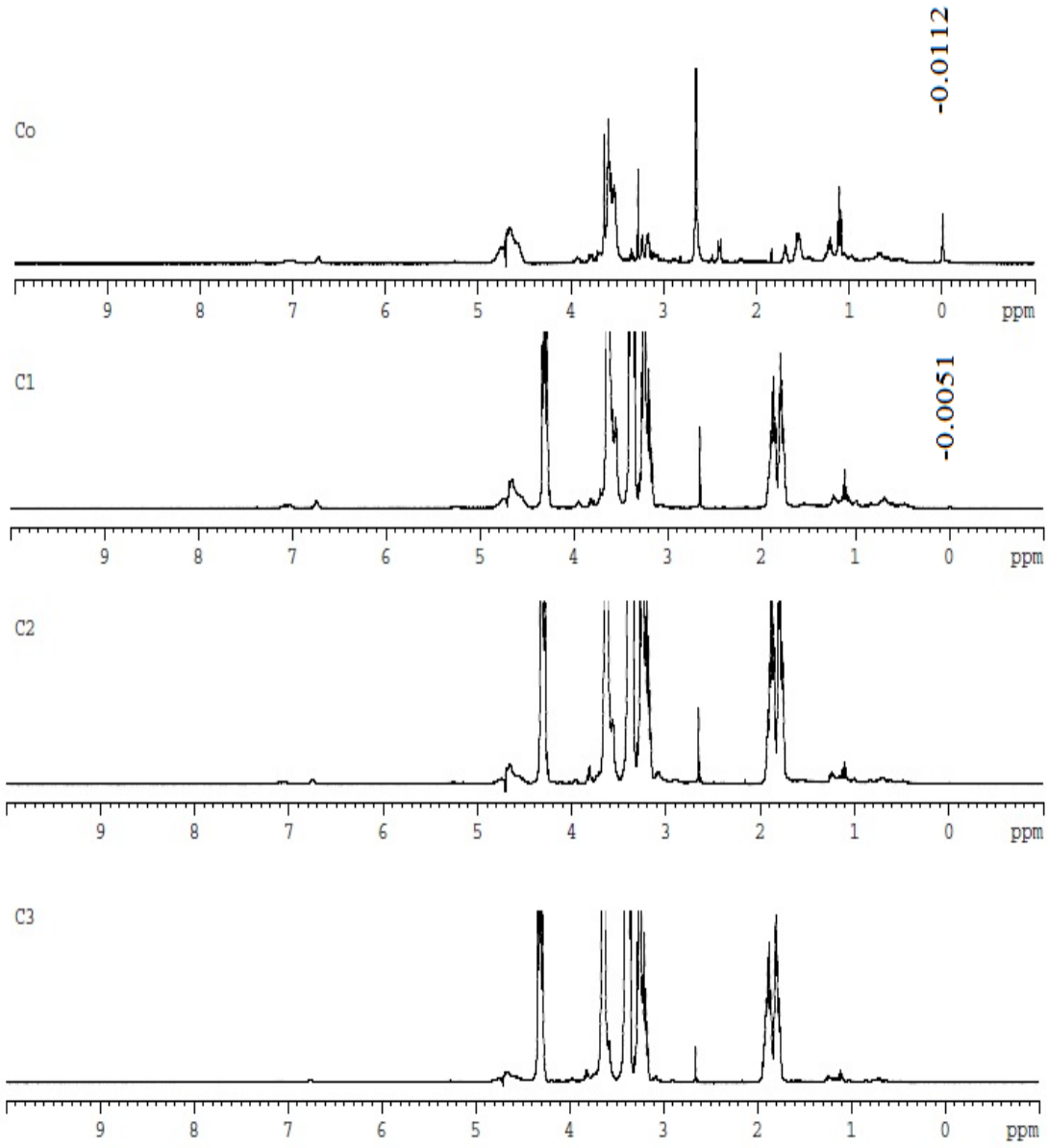
Şekil 4.25, 40µl sabit konsantrasyonda normal membrane varlığında, CM etken maddesinin dört farklı konsantrasyonu ile 960µl D<sub>2</sub>O karışımının <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.25a, 40µl normal membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0g CM etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.25b 40µl normal membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.010g CM etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.25c 40µl normal membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.020g CM etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin ve Şekil 4.25d ise 40µl normal membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.030g CM etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.25a da -0.0307ppm değerinde gözlenen membrane sinyalinin şiddeti, etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla tamamen azalıp sıfıra ulaşmaktadır.



**Şekil 4.25.** Diyabetik Membrane ile CM etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (tek puls) a) 0g CM (Co), b) 0.010g CM (C1), c) 0.020g CM (C2), d) 0.030g CM (C3)

Şekil 4.26, 40µl sabit konsantrasyonda diyabetik membrane varlığında, CM etken maddesinin dört farklı konsantrasyonu ile 960µl D<sub>2</sub>O karışımının presaturasyon durumundaki <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.25 de gözlenen HDO sinyali presaturasyon tekniği ile bastırılmış ve bunun sonucunda diğer piklerin şiddeti artmıştır. Şekil 4.26a, 40µl diyabetik membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0g CM etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.26b 40µl diyabetik membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.010g CM etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin, Şekil 4.26c 40µl diyabetik membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.020g CM etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin ve Şekil 4.26d ise 40µl diyabetik membrane çözeltilisine 960µl D<sub>2</sub>O ve 0.030g CM etken maddesi eklenerek hazırlanmış örneğin presaturasyon durumundaki <sup>1</sup>H-NMR spektrumunu vermektedir. Şekil 4.25a da -0.0307ppm değerinde gözlenen diyabetik membrane sinyalinin kimyasal kayma değeri -0.0112ppm değerine kaymış olmaktadır. Şekil 4.26a da -0.0112ppm değerinde gözlenen diyabetik membrane sinyalinin şiddeti, etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla tamamen azalıp sıfıra gitmektedir.





**Şekil 4.26.** Diyabetik Membrane ile CM etken maddesinin farklı konsantrasyonlardaki karışımının NMR spektrumu (presaturasyon) a) 0g CM (Co), b) 0.010g CM (C1), c) 0.020g CM (C2), d) 0.030g CM (C3)

## 5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, D<sub>2</sub>O ortamında çözülmüş üç farklı ilaç etken maddesine (5-Fluorouracil (5-FU), Cytosine  $\beta$ -D Arabinofuranoside (Ara-C), Cyclophosphamide-Monohydrate (CM)) farklı konsantrasyonlarda insan serum albümini eklenerek elde edilen örnekler 400 MHz NMR spektroskopisi ile incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar şöyledir.

- 1ml D<sub>2</sub>O içerisinde 0.05M sabit konsantrasyondaki FU etken maddesine 6 farklı konsantrasyonda albümin eklenmesiyle elde edilen örneklerin, 25<sup>0</sup>C (298K) sabit sıcaklıkta <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen HDO ve CH sinyallerinin T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanlarından elde edilen durulma oranlarının albümin konsantrasyonuna göre grafiği incelendiğinde her iki pikin de 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub> değerleri albümin konsantrasyonuna göre lineer olarak artmaktadır. 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub> değerlerinin albümin konsantrasyonuna göre lineer olarak artması, durulma mekanizmasının dipolar mekanizma olduğunun göstergesidir.
- 1ml D<sub>2</sub>O içerisinde 0.05M sabit konsantrasyondaki FU etken maddesine 0.05g albümin eklenerek elde edilen örneğin 298K, 303K, 308K, 313K ve 318K sıcaklık değerlerinde <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen HDO ve CH sinyallerinin T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanlarından elde edilen durulma oranlarının sıcaklığa göre grafiği incelendiğinde HDO sinyalinin 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub> değerlerinin sıcaklığa bağlı olarak sabit kaldığı buna karşılık CH sinyalinin 1/T<sub>1</sub> değerlerinin sıcaklığa göre arttığı, 1/T<sub>2</sub> değerlerinin ise sıcaklığa göre azaldığı görülmektedir. Bu sonuca göre T<sub>1</sub> durulma mekanizmasının dipolar, T<sub>2</sub> durulma mekanizmasının spin-rotasyon olduğu söylenebilir.
- 1ml D<sub>2</sub>O içerisinde 0.05M sabit konsantrasyondaki ARA-C etken maddesine ayrı ayrı 0g, 0.01g, 0.02g, 0.03g, 0.04g ve 0.05g albümin eklenerek elde edilen 6 farklı örneğin 25<sup>0</sup>C (298K) sabit sıcaklıkta <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda gözlenen her pikin rölaksivite değerlerinin (durulma oranları 1/T<sub>1</sub> ve 1/T<sub>2</sub>) albümin konsantrasyonuna göre grafiği incelendiğinde ARA-C etken maddesinin <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda

gözlenen bütün sinyallerinin  $1/T_1$  ve  $1/T_2$  değerleri albümin konsantrasyonuna göre lineer olarak artmaktadır. Bu lineer artış durulma mekanizmasının dipolar mekanizma olduğunun bir göstergesidir.

- ARA-C etken maddesiyle yapılan konsantrasyona bağlılık deneylerinde, 1ml  $D_2O$  içerisinde 0.05g sabit konsantrasyonda albümin varlığında 5 farklı konsantrasyondaki ARA-C etken maddesinin  $25^{\circ}C$  (298K) sabit sıcaklıkta  $^1H$ -NMR spektrumunda gözlenen bütün sinyallerin  $T_1$  ve  $T_2$  durulma zamanlarından elde edilen durulma oranlarının ARA-C konsantrasyonuna göre grafiği incelendiğinde Şekil 4.8 de görüldüğü gibi tüm piklerin  $1/T_1$  oranı, ARA-C etken maddesinin konsantrasyonuna göre doğrusal olarak artmaktadır. Buna karşılık  $1/T_2$  oranı tüm piklerde farklılık göstermektedir. 1. ve 7. pikte  $1/T_2$  oranı ARA-C konsantrasyonuna göre doğrusal olarak artmaktadır. 2. ve 4. pikte  $1/T_2$  oranı artma eğiliminde ancak tam olarak doğrusal bir artış söz konusu değildir. 6., 8. ve 9. pikin  $1/T_2$  oranı ARA-C konsantrasyonuna göre azalma eğiliminde olmakla birlikte bu azalma tam olarak doğrusal olmamaktadır. 3. ve 5. pikin  $1/T_2$  oranı ARA-C konsantrasyonuna göre sabit kalan bir dağılım göstermektedir.
- 1ml  $D_2O$  içerisinde 0.05M sabit konsantrasyondaki CM etken maddesine 6 farklı konsantrasyonda albümin eklenmesiyle elde edilen örneklerin,  $25^{\circ}C$  (298K) sabit sıcaklıkta  $^1H$ -NMR spektrumunda gözlenen bütün sinyallerin  $T_1$  ve  $T_2$  durulma zamanlarından elde edilen durulma oranlarının albümin konsantrasyonuna göre grafiği incelendiğinde Şekil 4.10 da görüldüğü gibi CM etken maddesinin  $^1H$ -NMR spektrumunda gözlenen bütün sinyallerinin  $1/T_2$  değerleri albümin konsantrasyonuna göre artış göstermektedir. Ancak bu artış ilk dört pik için tam olarak doğrusal iken, 5. 6. ve 7. pikler için tamamıyla doğrusal olmamaktadır.  $1/T_1$  değerleri ise ilk 5 pik için albümin konsantrasyonuna göre artma eğilimi göstermektedir. Bu eğilim ilk dört pikte tamamen doğrusal iken 5. pikte tam doğrusallıktan bahsetmek güçtür. 6. ve 7. pikler için  $1/T_1$  oranı albümin konsantrasyonuna göre sabit kalmaktadır.

- Membrane örneklerinin homojenize edildiği tampon çözelti ile membrane örneğinin 400 MHz  $^1\text{H-NMR}$  spektrumunun karşılaştırılması sonucunda membrane örneklerinde dikkate alınacak sinyal kararlaştırılmıştır. Tek puls ve presaturasyon deneylerinde bu sinyalin kimyasal kayma değerleri ve şiddeti incelenmiştir.
- 40 $\mu\text{l}$  sabit konsantrasyonda normal membrane varlığında, FU etken maddesinin üç farklı konsantrasyonu ile 960 $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$  karışımının  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu incelendiğinde Şekil 4.13a da -0.0087ppm değerinde gözlenen membrane sinyalinin şiddetinin, etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla büyük ölçüde azalıp sıfıra gittiği görülmektedir.
- 40 $\mu\text{l}$  sabit konsantrasyonda normal membrane varlığında, FU etken maddesinin üç farklı konsantrasyonu ile 960 $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$  karışımının presaturasyon durumundaki  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu incelendiğinde tek puls spektrumunda gözlenen HDO sinyali presaturasyon tekniği ile bastırılmış ve bunun sonucunda diğer piklerin şiddeti artmıştır. Şekil 4.13a da -0.0087ppm değerinde gözlenen membrane sinyalinin şiddeti Şekil 4.14a da görüldüğü gibi da büyük olmakta ve bu sinyalin kimyasal kayma değeri de -0.0070ppm değerine kaymış olmaktadır. Şekil 4.14a da -0.0070ppm değerinde gözlenen membrane sinyalinin şiddeti etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla büyük ölçüde azalıp sıfıra gitmekte ve sinyal kimyasal kaymaya uğramaktadır.
- 40 $\mu\text{l}$  sabit konsantrasyonda normal membrane varlığında, ARA-C etken maddesinin üç farklı konsantrasyonu ile 960 $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$  karışımının  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu incelendiğinde -0.0087ppm değerinde gözlenen membrane sinyalinin şiddeti, etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla büyük ölçüde azalıp sıfıra gittiği görülmektedir.
- 40 $\mu\text{l}$  sabit konsantrasyonda normal membrane varlığında, ARA-C etken maddesinin üç farklı konsantrasyonu ile 960 $\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$  karışımının presaturasyon durumundaki  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu incelendiğinde. Şekil 4.15 de gözlenen HDO sinyali presaturasyon tekniği ile bastırılmış ve

bunun sonucunda diğer piklerin şiddeti artmıştır. Şekil 4.15a da -0.0087ppm değerinde gözlenen membrane sinyalinin şiddeti Şekil 4.16a da görüldüğü gibi da büyük olmakta ve bu sinyalin kimyasal kayma değeri de -0.0070ppm değerine kaymış olmaktadır. Şekil 4.16a da -0.0070ppm değerinde gözlenen membrane sinyalinin şiddeti, etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla büyük ölçüde azalıp sifıra gitmekte ve sinyal kimyasal kaymaya uğramaktadır.

- 40µl sabit konsantrasyonda normal membrane varlığında, CM etken maddesinin üç farklı konsantrasyonu ile 960µl D<sub>2</sub>O karışımının <sup>1</sup>H-NMR spektrumu incelendiğinde -0.0087ppm değerinde gözlenen membrane sinyalinin şiddeti, etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla büyük ölçüde azalıp sifıra gittiği görülmektedir.
- 40µl sabit konsantrasyonda normal membrane varlığında, CM etken maddesinin üç farklı konsantrasyonu ile 960µl D<sub>2</sub>O karışımının presaturasyon durumundaki <sup>1</sup>H-NMR spektrumu incelendiğinde. Şekil 4.17 de gözlenen HDO sinyali presaturasyon tekniği ile bastırılmış ve bunun sonucunda diğer piklerin şiddeti artmıştır. Şekil 4.17a da -0.0087ppm değerinde gözlenen membrane sinyalinin şiddeti Şekil 4.18a da görüldüğü gibi da büyük olmakta ve bu sinyalin kimyasal kayma değeri de -0.0070ppm değerine kaymış olmaktadır. Şekil 4.18a da -0.0070ppm değerinde gözlenen membrane sinyalinin şiddeti, etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla büyük ölçüde azalıp sifıra gitmekte ve sinyal kimyasal kaymaya uğramaktadır.
- 40µl sabit konsantrasyonda diyabetik membrane varlığında, FU etken maddesinin üç farklı konsantrasyonu ile 960µl D<sub>2</sub>O karışımının <sup>1</sup>H-NMR spektrumu incelendiğinde Şekil 4.19a da -0.0307ppm değerinde gözlenen diyabetik membrane sinyalinin şiddeti, etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla büyük ölçüde azalıp sifıra gitmektedir.
- 40µl sabit konsantrasyonda diyabetik membrane varlığında, FU etken maddesinin üç farklı konsantrasyonu ile 960µl D<sub>2</sub>O karışımının

presaturasyon durumundaki  $^1\text{H-NMR}$  spektrumunda Şekil 4.19 da gözlenen HDO sinyali presaturasyon tekniği ile bastırılmış ve bunun sonucunda diğer piklerin şiddeti artmıştır. Şekil 4.19a da  $-0.0307\text{ppm}$  değerinde gözlenen diyabetik membrane sinyalinin kimyasal kayma değeri  $-0.0112\text{ppm}$  değerine kaymış olmaktadır. Şekil 4.20a da  $-0.0112\text{ppm}$  değerinde gözlenen diyabetik membrane sinyalinin şiddeti etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla büyük ölçüde azalıp sıfıra gitmekte ve sinyal kimyasal kaymaya uğramaktadır.

- $40\mu\text{l}$  sabit konsantrasyonda diyabetik membrane varlığında, ARA-C etken maddesinin dört farklı konsantrasyonu ile  $960\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$  karışımının  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu incelendiğinde Şekil 4.21a da  $-0.0307\text{ppm}$  değerinde gözlenen diyabetik membrane sinyalinin şiddeti, etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla büyük ölçüde azalıp sıfıra gittiği görülmektedir.
- $40\mu\text{l}$  sabit konsantrasyonda diyabetik membrane varlığında, ARA-C etken maddesinin üç farklı konsantrasyonu ile  $960\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$  karışımının presaturasyon durumundaki  $^1\text{H-NMR}$  spektrumunda Şekil 4.21 de gözlenen HDO sinyali presaturasyon tekniği ile bastırılmış ve bunun sonucunda diğer piklerin şiddeti artmıştır. Şekil 4.21a da  $-0.0307\text{ppm}$  değerinde gözlenen diyabetik membrane sinyalinin kimyasal kayma değeri  $-0.0112\text{ppm}$  değerine kaymış olmaktadır. Şekil 4.22a da  $-0.0112\text{ppm}$  değerinde gözlenen diyabetik membrane sinyalinin şiddeti, etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla büyük ölçüde azalıp sıfıra gitmekte ve sinyal kimyasal kaymaya uğramaktadır.
- $40\mu\text{l}$  sabit konsantrasyonda diyabetik membrane varlığında, CM etken maddesinin dört farklı konsantrasyonu ile  $960\mu\text{l}$   $\text{D}_2\text{O}$  karışımının  $^1\text{H-NMR}$  spektrumu incelendiğinde Şekil 4.23a da  $-0.0307\text{ppm}$  değerinde gözlenen diyabetik membrane sinyalinin şiddeti, etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla büyük ölçüde azalıp sıfıra gittiği görülmektedir.

- 40µl sabit konsantrasyonda diyabetik membrane varlığında, CM etken maddesinin dört farklı konsantrasyonu ile 960µl D<sub>2</sub>O karışımının presaturasyon durumundaki <sup>1</sup>H-NMR spektrumunda Şekil 4.23 de gözlenen HDO sinyali presaturasyon tekniği ile bastırılmış ve bunun sonucunda diğer piklerin şiddeti artmıştır. Şekil 4.23a da -0.0307ppm değerinde gözlenen diyabetik membrane sinyalinin kimyasal kayma değeri -0.0112ppm değerine kaymış olmaktadır. Şekil 4.24a da -0.0112ppm değerinde gözlenen diyabetik membrane sinyalinin şiddeti, etken maddenin konsantrasyonunun artmasıyla büyük ölçüde azalıp sıfıra gitmekte ve sinyal kimyasal kaymaya uğramaktadır.

Bu tez çalışmasını farklı yollarla geliştirmek mümkündür.

- Bu tez çalışmasında kullanılan ilaç etken maddeleri D<sub>2</sub>O ortamı yerine su içerisinde çözdürülüp bu örneklerin 400 MHz spektrumu incelenebilir.
- D<sub>2</sub>O içerisinde kolayca çözünebilen ilaç etken maddeleri araştırılıp bu maddelerle deneyler yapılabilir.
- Bu tez çalışmasında insan kanında en bol miktarda bulunan protein olan albümin kullanılmıştır. Daha farklı proteinler kullanılarak, bu proteinlerle ilaç etken maddelerinin etkileşimleri incelenebilir.
- Membrane-ilaç örneklerinin düşük sıcaklıklarda T<sub>1</sub> ve T<sub>2</sub> durulma zamanları ölçülebilir.
- Membrane-ilaç etkileşimi, başka ilaçlar kullanılarak da yapılabilir.

## 6. KAYNAKLAR

Andrisano, V., Booth, T. D., Cavrini, V., Wainer, I. W. 1997. Enantioselective separation of chiral arylcarboxylic acids on an immobilized human serum albumin chiral stationary phase. *Chirality*, 9: 178-183.

Andronesi, O.C., Becker, S., Seidel, K., Heise, H., Young, H.S., Baldus, M. 2005. Determination of Membrane Protein Structure and Dynamics by Magic-Angle-Spinning Solid-State NMR. *J. Am. Chem. Soc.*, 127: 12965-12974.

Apaydın, F. 1996. Magnetik Rezonans, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

Ascoli, G., Bertucci, C., Salvadori, P. 1995. Stereospecific and competitive binding of drugs to human serum albumin: a difference circular dichroism approach. *J.Pharm. Sci.*, 84: 737-741.

Aubry, A. F., Markoglou, N., McGann, A. 1995. Comparison of drug binding interactions on human, rat and rabbit serum albumin using high-performance displacement chromatography. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol Toxicol Endocrinol.*, 112: 257-266.

Aweda, M. A. 2003. Assessment of glycerol, gelatin and agar gels as equivalent materials for mammalian organs in proton nuclear magnetic resonance imaging. *West African Journal of Radiology*, 10: 24-30.

Balcı, M. 2004. Nükleer Manyetik Rezonans Spektroskopisi. ODTÜ Geliştirme Vakfı Yayıncılık ve İletişim A.Ş. Yayınları, ISBN: 975-7064-23-8, Ankara

Binbay, E., N. 2008. 400 MHz NMR kullanılarak Crown eter türevlerinin T1 ve T2 durulma zamanlarının sıcaklığa bağlı olarak incelenmesi, Doktora Tezi, Dicle Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Diyarbakır.



Blondeau, J. B., Robel, P. 1975. Determination of protein-ligand binding constants at equilibrium in biological samples. *Eur. J. Biochem.*, 55: 375–384.

Caravan, P., Cloutier, N. J., Greenfield, M. T., McDermid S. A. 2002. The interaction of ms-325 with human serum albumin and its effect on proton relaxation rates. *J. Am. Chem. Soc.*, 124: 3152-3162.

Carter, D. C., Ho, J. X. 1994. Structure of serum albumin. *Adv Protein Chem.*, 45: 153-203.

Castillo, M., Smith, P. C. 1995. Disposition and reactivity of ibuprofen and ibufenac acyl glucuronides in vivo in the rhesus monkey and in vitro with human serum albumin. *Drug Metab. Dispos.*, 23: 566-572.

Characterization of membrane protein interactions with isothermal titration calorimetry and differential scanning calorimetry, Erişim:  
[<http://www.microcal.com/documents/membrane-protein-interactions.pdf>], MicroCal, LLC 2006.

Chekin, F., Bordbar, M., Fathollahi, Y., Alizadeh, N. 2006. The interaction between ketamine and some crown eters in common organic solvents studied by nmr: the effect of donating atoms and ligand structure. *Soectrochimica Acta Part A*, 63: 370-376.

Cheruvallath, V. K., Riley, C. M., Narayanan, S. R., Lindenbaum, S., Perrin, J. H. 1996. The effect of octanoic acid on the binding of the enantiomers of ibuprofen and naproxen to human serum albumin: a chromatographic implication. *Pharm Res.*, 13: 173-178.

Cheruvallath, V. K., Riley, C. M., Narayanan, S. R., Lindenbaum, S., Perrin, J. H. 1997. A quantitative circular dichroic investigation of the binding of the enantiomers

of ibuprofen and naproxen to human serum albumin. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 15: 1719-1724.

Clarkson, J., Campbell, I.D., 2003. Studies of protein ligand interactions by NMR. *Biochemical Society Transactions*, 31: 1006-1009.

Cooper, M. A. 2004 Advances in membrane receptor screening and analysis. *J. Mol. Recognit.*, 17: 286-315.

Epps, D. E., Raub, T. J., Kezdy, F. J. 1995. A general, wide-range spectrofluorometric method for measuring the site-specific affinities of drugs toward human serum albumin. *Anal Biochem.*, 227: 342-350.

Fasano, M., Curry, S., Terrono, E., Galliano, M., Fanali, G., Narciso, P., Notari, S., Ascenzi, P. 2005. The extraordinary ligand binding properties of human serum albumin. *IUBMB Life*, 57(12): 787-796.

Fielding, L. 2000. Determination of Association Constants (K<sub>a</sub>) from Solution NMR Data. *Tetrahedron*, 56 (34): 6151-6170.

Fielding, L., 2007. NMR methods for the determination of protein-ligand dissociation constants. *Progress in magnetic resonance spectroscopy*, 51: 219-242

Fielding, L., Fletcher, D., Rutherford, S., Kaur J., Mestres, J. 2003. Exploring the active site of human factor xa protein by nmr screening of small molecule probes. *Org. Biomol.Chem.*, 1: 4235-4241.

Fielding, L., Rutherford, S., Fletcher, D. 2005. Determination of protein-ligand binding affinity by nmr: observations from serum albumin model systems. *Magn.Reson.Chem.*, 43: 463-470.

Fielding, L., Rutherford, S., Fletcher, D., 2005. Determination of protein-ligand binding affinity by NMR: observations from serum albumin model systems. *Magnetic resonance in Chemistry*, 43: 463-470.

Ghuman, J., Zunszain, P. A., Petitpas, I., Bhattacharya, A. A., Otagiri, M., Curry, S. 2005. Structural basis of the drug-binding specificity of human serum albumin. *J. Mol. Biol.*, 353: 38–52.

Gözükara, E. M. 2001. Biyokimya Cilt-1. Nobel Tıp Kitabevleri, İstanbul

Hage, D. S., Noctor, T. A. G., Wainer, I. W. 1995. Characterization of the protein binding of chiral drugs by high-performance affinity chromatography. Interactions of R- and S-ibuprofen with human serum albumin. *J. Chromatogr. A.*, 693: 23-32.

Hashimoto, S., Yabusaki, T., Takeuchi, H., Harada, I. 1995. Structure and ligand-binding modes of human serum albumin studied by UV resonance raman spectroscopy. *Biospectroscopy*, 1: 375-385.

He, X. M., Carter, D. C. 1992. Atomic structure and chemistry of human serum albumin. *Nature*, 358: 209-215.

<http://www.chemspider.com>

<http://www.ilacpedia.com>

Ishida, S., Kinoshita, M., Sakiya, Y., Taira, Z., Ichikawa, T. 1992. Glycyrrhizin binding site on human serum albumin. *Chem. Pharm. Bull.*, 40: 275-278.

Itoh, T., Saura, Y., Tsuda, Y., Yamada, H. 1997. Stereoselectivity and enantiomer-enantiomer interactions in the binding of ibuprofen to human serum albumin. *Chirality.*, 9: 643-649.

James, T., L. 1975. Nuclear Magnetic Resonance in Biochemistry, Academic Press, New York

Jeener, J., Meier, B. H., Bachmann, P., Ernst, R. R. 1979. Investigation of exchange processes by two-dimensional NMR spectroscopy. *J. Chem. Phys.*, 71: 4546-4553.

Kamp, F., Kizilbash, N., Corkey, B. E., Berggren P., Hamilton, J. A. 2003. Sulfonylureas rapidly cross phospholipid bilayer membranes by a free-diffusion mechanism. *Diabetes*, 52: 2526-2531.

Kandagal, P.B., Ashoka, S., Seetharamappa, J., Shaikh, S.M.T., Jadegoud, Y., Ijare, O.B. 2006. Study of interaction of an anticancer drug with human and bovine serum albumin: spectroscopic approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 393-399.

Kazaz, C., Balcı, M. Yayınlanmamış çalışmalar

Kessler, H., Gehrke, M., Griesinger, C. 1988. Two-Dimensional Nmr-Spectroscopy-Background and Overview of the Experiments. *Angewandte Chemie-International Edition in English*, 27 (4): 490-536.

Kragh-Hansen, U., Tuan, V., Chuang, G., Otagiri, M. 2002. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.*, 25(6): 695-704.

Liu, M. L., Nicholson, J. K., Lindon, J. C. 1997. Analysis of drug-protein binding using nuclear magnetic resonance based molecular diffusion measurements. *Anal. Commun.*, 34: 225-228.

Lucas, L. H., Yan, J., Larive, C. K., Zartler, E. R., Shapiro, M. J. 2003. Transferred nuclear overhauser effect in nuclear magnetic resonance diffusion measurements of ligand-protein binding. *Anal. Chem.*, 75: 627-634.

Luo, R.S., Liu, M.L., Mao, X.A., 1999. NMR diffusion and relaxation study of drug-protein interaction. *Spectrochimica Acta Part A*, 55: 1897-1901.

Ma, Y., Liu, M., Mao, X., Nicholson, J. K., Lindon, J. C. 1999. NMR spectroscopic diffusion, chemical shift and line-width measurements of low-affinity binding of ibuprofen enantiomers to human serum albumin. *Magn.Reson.Chem.*, 37: 269-273.

Martini, S., Bonechi, C., Casolaro, M., Corbini, G., Rossi, C. 2006. Drug-protein recognition processes investigated by NMR relaxation data A study on corticosteroid-albumin interactions. *Biochemical Pharmacology*, 71: 858-864.

Nielsen, N., Malmendal, A., Vosegaard, T., 2004. Techniques and applications of NMR to membrane proteins. *Molecular Membrane Biology*, 21: 129-141.

NMR Spektroskopisi, Erişim:

<http://w3.gazi.edu.tr/~mkaracan/enstrumental/NMR%20spektroskopisi.ppt#25>

Opella, S. J., Marassi, F. M. 2004. Structure determination of membrane proteins by NMR spectroscopy. *Chem Rev.*, 104: 3587-3606.

Peng, J. W., Moore, J., Abdul-Manan, N. 2004. NMR experiments for lead generation in drug discovery. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 44: 225-256.

Peters, T. Jr. 1985. Serum albumin. *Adv. Protein Chem.*, 37: 161-245.

Poole, C. P., Harach, H. 1971. Relaxation in Magnetic Resonance, Academic Press, New York

Pouliquen, D., Bellot, G., Guihard, G., Fichet, P., Meflah, K., Vallette, F. M. 2005. Mitochondrial membrane permeabilization produced by PTP, Bax and apoptosis: a  $^1\text{H}$ -NMR relaxation study. *Cell Death and Differentiation*,: 1-10.

Rahman, M. H., Yamasaki, M., Shin, Y. H., Lin, C. C., Otagiri, M. 1993. Characterization of high affinity binding sites of non-steroidal anti-inflammatory drugs with respect to site-specific probes on human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.*, 16: 1169-1174.

Rollas, S., Küçükgül, Ş. G., Küçükgül, İ. 2005. Sistematik İlaç Analizi. Marmara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Kimya Anabilim Dalı, İstanbul

Sandalcı, M., Kınalıbalaban, B., Sünbül, F., Beyhan, G. 2007. Aynı bölgeye ait zemin numunelerinin fiziksel özelliklerinin NMR ve zemin mekaniği deneyleri ile incelenmesi. International Earthquake Symposium, 22-26 October 2007, Kocaeli, 513-517.

Slichter, C., P. 1996. Principles of Magnetic Resonance, New York , U.S.A.

Smith, S. O., Aschheim, K., Groesbeek, M. 1996. Magic angle spinning NMR spectroscopy of membrane proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 29: 395-449.

Sulkowska, A., Bojko, B., Rownicka, J., Rezner, P., Sulkowski, W. 2005. The competition of drugs to serum albumin in combination chemotherapy: NMR study. *Journal of Molecular Structure*, 744-747: 781-787.

Sulkowska, A., Bojko, B., Rownicka, J., Sulkowski, W. 2004. Competition of drugs to serum albumin in combination therapy. *Biopolymers*, 74: 256-262.

Sulkowska, A., Rownicka, J., Bojko, B., Sulkowski, W. 2003. Interaction of anticancer drugs with human and bovine serum albumin. *Journal of Molecular Structure*, 651-653: 133-140.

Sun, P., Hoops, A., Hartwick, R. A. 1994. Enhanced albumin protein separations and protein-drug binding constant measurements using anti-inflammatory drugs as run buffer additives in affinity capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B Biomed. Appl.*, 661: 335-340.

Tamm, L. K., Liang B. 2006. NMR of membrane proteins in solution. *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*, 48: 201–210.

Tengel, T. 2007. Studies of protein structure, dynamics and protein-ligand interactions using nmr spectroscopy., Doctoral Thesis, Umea University ; Umea, Sweden

Terstappen, G.C., Angelo, R. 2001. In silico research in drug discovery. *Trends Pharmac. Sci.*, 22: 23-26.

Thennarasu, S., Lee, D., Poon, A., Kawulka, K. E., Vederas, J. C., Ramamoorthy, A. 2005. Membrane permeabilization, orientation and antimicrobial mechanism of subtilisin A. *Chemistry and Physics of Lipids*, 137: 38-51.

Ünal, D. 2008. Tıpta kullanılan görüntüleme teknikleri, Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Gazi Eğitim Fakültesi Orta Öğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi Bölümü Fizik Eğitimi Anabilim Dalı; Ankara

Vold, R. L., Waugh, J. S., Klein, M. P., Phelps, D. E. 1968, *J. Chem. Phys.*, 48, 3831.

Wüthrich, K. 1986. NMR of Proteins and Nucleic Acids, Wiley, New York.

Xu, Y., Yushmanov, V. E., Tang, P. 2002. NMR Studies of drug interaction with membranes and membrane-associated proteins. *Bioscience Reports*, 22: 175-190.

Yılmaz, A., Korunur, S. 2012. Basılmamış Ders Notları, Diyarbakır, Türkiye

Yusmanov, V. E., Tominaga, T. T., Borissevitch, I. E., Imasato H., Tabak, M. 1996. Binding of manganese and iron tetraphenylporphine sulfonates to albumin is relevant to their contrast properties. *Magnetic Resonance Imaging*, 14: 255-261



## ÖZGEÇMİŞ

### **Kişisel Bilgiler:**

**Adı Soyadı** : Sibel KORUNUR

**Doğum Yeri** : ANTAKYA

**Doğum Tarihi** : 30.01.1980

**Yabancı Dili** : İngilizce

### **Eğitim Durumu**

Lise – Antakya Kurtuluş Lisesi

Lisans – Mersin Üniversitesi

Yüksek Lisans – Mersin Üniversitesi

**Çalıştığı Kurum/Kurumlar** Dicle Üniversitesi, Fen Fakültesi, Fizik Bölümü,  
Araştırma Görevlisi, 2005 – Devam ediyor