T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

TIBBİ ÖNEME SAHİP BAZI LOKAL ANESTEZİK MADDELERİN PROTONASYON SABİTLERİNİN FARKLI YÖNTEMLERLE KARŞILAŞTIRMALI TAYİNLERİ

Zeynep ALTINORDU

Yüksek Lisans Tezi
Kimya Anabilim Dalı

Danışman
Yrd. Doç. Dr. S. Beniz GÜNDÜZ

Konya
2010

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

TIBBİ ÖNEME SAHİP BAZI LOKAL ANESTEZİK MADDELERİN PROTONASYON SABİTLERİNİN FARKLI YÖNTEMLERLE KARŞILAŞTIRMALI TAYİNLERİ

Zeynep ALTINORDU

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

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

2010,105 Sayfa

Jüri
Yrd. Doç. Dr. S. Beniz GÜNDÜZ
Prof.Dr. Güleren ALSANCAK
Prof. Dr. Yunus ÇENGELOĞLU

Sinir dokusuna uygun konsantrasyonda uygulandıklarında, sinir iletimini bloke eden ilaçlara " lokal anestezikler " adı verilir. Lokal anestezikler genellikle bir benzen halkası olan bir lipofilik grup ve bir tersiyer amin olan bir hidrofilik gruptan oluşur. Bu iki grup ester veya amit yapıda olan bir ara zincir ile bağlıdır. Lipofilik grup (serbest baz) solüsyonun sinir membranına penetrasyonunu sağlar. Hidrofilik grup (katyonik form) ise farmakolojik olarak aktif olan kısımdır. Lokal anesteziğin pKa'sı ne kadar fizyolojik pH'ya yakınsa etkisi o kadar çabuk başlar. Lokal anestezik ilaçların pKa' larının her bir iyonik formu için tayin edilmesi, bu ilaçların fizyolojik etkinliklerinin incelenmesi ve etki mekanizmalarının belirlenmesinde çok büyük bir öneme sahiptir.

Bu tezde, dibukain, prokain ve tetrakainin belirli yüzdelerdeki asetonitril-su ve metanol-su karışımlarında florimetrik parametreleri optimize edilmiş, daha sonra pH ve çözücü yüzdesinin florimetrik parametrelere etkisi incelenmiş, optimum uyarma ve emisyon dalga boyları ve çözücü yüzdelerinde pH-floresans şiddeti grafikleri çizilerek pKa değerleri belirlenmiştir. Spektroflorimetrik yöntem ile belirlenen pKa değerleri, nötral ve iyonik türlerin farklı absorbans özellikleri olmasına dayanan spektrofotometrik yöntemle elde edilenlerle ve online teorik pKa hesaplama programı olan SPARC sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler:: Lokal anestezik, bupivakain, dibukain, prokain, tetrakain, pKa, protonasyon sabitleri, spektroflorimetri, spektrofotometri

ABSTRACT

MS. THESIS

DETERMINATION OF PROTONATION CONSTANTS OF SOME MEDICALLY IMPORTANT LOCAL ANHESTETIC COMPOUNDS BY USING DIFFERENT COMPARATIVE METHODS

Zeynep ALTINORDU

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

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

2010,105 Pages

Jury
Asst. Prof. Dr. S. Beniz GÜNDÜZ
Prof.Dr. Güleren ALSANCAK
Prof. Dr. Yunus ÇENGELOĞLU

Local anaesthetics produce reversible depression of nerve conduction when applied to the nerve fibre. They are usually composed of a benzene ring which is a lipophilic group and a hydrophilic group which is a tertiary amine. These two groups are connected with an intermediary structure composed of an esther or amide. Lipophilic group (free base) provides the penetration of the solution through the nerve membrane. Hydrophilic group (cationic form) is the pharmacologically active part. The pKa which is the pH formed by the base (lipophilic group) and the cationic form (hydrophilic group), is different in every agent.

In this thesis, the fluorimetric parameters of some local anesthetics such as bupivacaine, dibucaine, procaine and tetracaine in certain percentages of acetonitrile-water and methanol-water mixtures were optimizied and then the pH and solvent percentage effects on fluorimetric parameters were investigated. In the optimal excitation and emission wavelengths and solvent percentage, pKa values of these compounds have been determined by plotting the pH-fluorescence intensity graphs in each solvent media. The pKa values determined by the spectrofluorimetric method will been compared with those obtained by the spectrophotometric method which depends on different absorbance properties of neutral and ionic species, and the results of SPARC-online pKa calculated program.

Keywords: Local anhestetics, dibucaine, procaine, tetracaine, pKa, protonation constants, spectrofluorimetry, spectrophotometry

ÖNSÖZ

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

Bu çalışma aynı zamanda S.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından FBE 09201060 no' lu proje olarak desteklenmiştir.

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

Tez çalışmalarım boyunca bana laboratuar imkanı sağlayan Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. İbrahim KARATAŞ' a ve Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde görev yapan çok değerli hocalarıma teşekkür ederim. Laboratuar çalışmalarım boyunca beni yalnız bırakmayan çalışma arkadaşlarım Şükran KÜÇÜKKARTALLAR'a ve Eda EDİZ'e, yaşamım boyunca hep yanımda olan; sevgi ve desteklerini esirgemeyen aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım..

Zeynep ALTINORDU
KONYA-2010

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **vi**

ABSTRACT ..... **vii**

ÖNSÖZ ..... **viii**

İÇİNDEKİLER ..... **ix**

ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **xi**

Çizelgeler Listesi ..... **xiv**

1. GİRİŞ **1**

2.TEORİK KISIM **2**

2.1. Floresans Spektroskopisi 2
2.1.1. Floresans 3
2.1.2. Fosforesans 5
2.1.3. Lüminesans Spektrofotometreleri 6
2.1.4. Floresansı Etkileyen Faktörler 8
2.1.5. Fotolüminesans Teorisi 13
2.2. Protanasyon Sabiti Tayini 17
2.2.1. Spektrofotometrik Yöntemle Protanasyon Sabitlerinin Tayini 17
2.2.2. Spektroflorimetrik Yöntemle Protanasyon Sabitlerinin Tayini 21
2.3. Lokal Anestezik Maddeler 27
2.3.1. Tetrakain 29
2.3.2. Prokain 33
2.3.3. Dibukain 37

3. Literatür Özeti **42**

4. DENEYSEL KISIM **55**

4.1. Materyal **55**

4.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler **55**

4.2.2. Kullanılan Çözücüler 55
4.2.3. Lokal Anestezik Maddelerin Çözeltilerinin Hazırlanması 56
4.2.4. Kullanılan Tampon Çözeltilerin Hazırlanışı 58
4.2.5. Kullanılan Cihazlar 58
4.3. Yöntem 58
4.3.1. Florimetrik Yöntemle Çalışmalar 59
4.3.2. Spektrofotometrik yöntemle çalışmalar 60

5. SONUÇ VE DEĞERLENDİRME **61**

5.1.1. Lokal Anestezik Maddelerin Yüzde Metanol-Su Ortamlarındaki Florimetrik Yöntemle Elde Edilen % Çözücü-Floresans Şiddeti Grafikleri 61
5.1.2. Lokal Anestezik Maddelerin Yüzde ACN-Su Ortamlarındaki Florimetrik Yöntemle Elde Edilen % Çözücü-Floresans Şiddeti Grafikleri 62
5.1.3. Lokal Anestezik Maddelerin Yüzde Metanol-Su Ortamlarındaki Uyarma ve Emisyon Dalga Boylarının Belirlenmesi ve Karşılaştırması 64
5.1.4. Lokal Anestezik Maddelerin Farklı pH' lardaki Emisyon Spektrumları 69
5.1.5. Lokal Anestezik Maddelerin Farklı Yüzdedeki Asetonitril -Su Ortamlarındaki pH-Floresans Şiddeti Grafikleri 78
5.1.5. Lokal Anestezik Maddelerin Farklı Yüzdedeki Metanol -Su Ortamlarındaki pH-Floresans Şiddeti Grafikleri 81
5.2.1. Lokal Anestezik Maddelerin Farklı Yüzdedeki Asetonitril -Su Ortamlarındaki pH-Absorbans Grafikleri 83
5.2.2. Lokal Anestezik Maddelerin Farklı Yüzdedeki Metanol -Su Ortamlarındaki pH-Absorbans Grafikleri 86

6. SONUÇ 89

7. KAYNAKLAR 91

ÖZGEÇMİŞ 94

ŞEKİLLER

Şekil 2. 1. Elektromagnetik spektrum 2
Şekil 2. 3. Jablonski diyagramı 4
Şekil 2. 4. Fotolüminesans ölçümleri için kullanılan cihaz. 6
Şekil 2. 5. Antrasenin uyarma, lüminesans ve senkron lüminesans spektrumları 7
Şekil 2. 6. Molekül üzerine düşen enerjinin dağılımı 16
Şekil 2. 7. Spektroskopik bir çalışmada (a) A - λ/nm ve (b) log absorbans farkı - pH grafikleri (A': moleküler türün absorbansı; A": iyonik türün absorbansı) 20
Şekil 2. 8. Kafeik asitin %30 ACN ortamında elde edilen spektroskopik verileri 20
Şekil 2. 9. Bromonaftalin mavisinin çeşitli pH'larda spektrumları ve bu spektrumlardan pH-konsantrasyon grafiğinin çizilmesi ve pKa değerinin hesaplanması 21
Şekil 2. 10. Asitik ve bazik hallerin enerji seviyeleri 25
Şekil 2. 11. Asidik ve bazik formda floresans şiddetinin eğrileri 26
Şekil 2. 12. Tetrakain için α- pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi 32
Şekil 2. 13. Tetrakain için α- pH ilişkisi ve 2. türev eğrisi 32
Şekil 2. 14. Prokain için α- pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi 36
Şekil 2. 15. Prokain için α- pH ilişkisi ve 2. türev eğrisi 36
Şekil 2. 16. Dibukain için α- pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi 41
Şekil 2. 17. Dibukain için α- pH ilişkisi ve 2. türev eğrisi 41

Şekil 3. 1. a) Yasuda Shedlovsky yönteminde bazı asidik fonksiyonel gruplar b) Yasuda Shedlovsky yönteminde bazı bazik fonksiyonel gruplar 45
Şekil 3. 2. a ve b çözeltilerin pK_a değerleri ile asitlerin ve bazlar için %20 MDM su karışımlarının psK_a değerleri arasındaki lineer ilişkiyi göstermektedir. 46
Şekil 3. 3. Suda çeşitli yüzdelerde çalışılan MeCN'de Difloksasin'nin deneysel ve teorik pH karşılaştırması 48
Şekil 3. 4. Enfloksasin'nin suda pH ve λ 'a karşılık deneysel absorbans değerleri 48
Şekil 3. 5. Tetracylinin Yapısı 49
Şekil 3. 6. Bir Asitik Çözeltinin iyonlaşmamış moleküllerinin fo, k kesirlerinin pH'la ilişkisi. 51
Şekil 3. 8. Sülfonamitlerin elektroforetik mobilite pH ilişkileri 54

Şekil 5. 1. Tetrakainin yüzde metanol-su ortamlarındaki % çözücü-floresans şiddeti grafiği 61
Şekil 5. 2. Prokainin yüzde metanol-su ortamlarındaki % çözücü-floresans şiddeti grafiği 62
Şekil 5. 3. Dibukainin yüzde metanol-su ortamlarındaki % çözücü-floresans şiddeti grafiği 62
Şekil 5. 4. Tetrakainin yüzde ACN-su ortamlarındaki % çözücü-floresans şiddeti grafiği 63
Şekil 5. 5. Prokainin yüzde ACN-su ortamlarındaki % çözücü-floresans şiddeti grafiğ 63

Şekil 5. 6. Dibukainin yüzde ACN-su ortamlarındaki % çözücü-floresans şiddeti grafiği 64
Şekil 5. 7. Tetrakainin % 10- % 90 metanol ortamındaki emisyon spektrumları 65
Şekil 5. 8. Tetrakainin % 10- % 90 ACN ortamındaki emisyon spektrumları..... 65
Şekil 5. 9. Prokainin % 10- % 90 metanol ortamındaki emisyon spektrumları 66
Şekil 5. 10. Prokainin % 10- % 90 ACN ortamındaki emisyon spektrumları..... 67
Şekil 5. 11. Dibukainin % 10- % 90 metanol ortamındaki emisyon spektrumları 68
Şekil 5. 12. Dibukainin % 10- % 90 ACN ortamındaki emisyon spektrumları..... 68
Şekil 5. 13. Dibukainin %30 ACN-%70 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 347,87 nm). 69
Şekil 5. 14. Prokainin %50 ACN-%50 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 279,34 nm). 70
Şekil 5.15. Tetrakainin %50 ACN-%50 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 267,87 nm). 70
Şekil 5. 16. Dibukainin % 10 metanol-%90 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 346,12 nm) 71
Şekil 5. 17. Dibukainin %20 metanol-%80 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 345,46 nm). 71
Şekil 5. 18. Dibukainin %30 metanol-%70 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 346,16 nm). 72
Şekil 5. 19. Dibukainin %40 metanol-%60 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 346,16 nm). 72
Şekil 5. 20. Dibukainin %50 metanol-%50 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 346,16 nm). 73
Şekil 5. 21. Prokainin %10 metanol-%90 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 305,43 nm). 73
Şekil 5. 22. Prokainin %20 metanol-%80 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 305,43 nm). 74
Şekil 5. 23. Prokainin %30 metanol-%70 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 305,43 nm). 74
Şekil 5. 24. Prokainin %40 metanol-%60 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 305,43 nm). 75
Şekil 5. 25. Prokainin %50 metanol-%50 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 305,43 nm). 75
Şekil 5. 26. Tetrakainin %10 metanol-%90 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 266,56 nm). 76
Şekil 5. 27. Tetrakainin %20 metanol-%80 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 266,56 nm). 76

Şekil 5. 28. Tetrakainin %30 metanol-%70 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 266,56 nm). 77
Şekil 5. 29. Tetrakainin %40 metanol-%60 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 266,56 nm). 77
Şekil 5. 30. Tetrakainin %50 metanol-%50 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 266,56 nm). 78
Şekil 5. 31. %10 - %50 ACN sulu karışımlarında dibukainin pH-Floresans Şiddeti grafiği 79
Şekil 5. 32. %10 - %50 ACN sulu karışımlarında prokainin pH-Floresans Şiddeti grafiği..... 79
Şekil 5. 33. %10 - %50 ACN sulu karışımlarında tetrakainin pH-Floresans Şiddeti grafiği 80
Şekil 5. 34. %10 - %50 metanol sulu karışımlarında dibukainin pH-Floresans Şiddeti grafiği..... 81
Şekil 5. 35. %10 - %50 ACN sulu karışımlarında prokainin pH-Floresans Şiddeti grafiği..... 82
Şekil 5. 36. %10 - %50 ACN sulu karışımlarında tetrakainin pH-Floresans Şiddeti grafiği 82
Şekil 5. 37. %10 - %50 ACN sulu karışımlarında dibukainin pH-Absorbans grafiği (λ=247 nm)..... 84
Şekil 5. 38. %10 - %50 ACN sulu karışımlarında prokainin pH-Absorbans grafiği (λ=227 nm) 84
Şekil 5. 39. %10 - %50 ACN sulu karışımlarında tetrakainin pH-Absorbans grafiği (λ=313 nm) 85
Şekil 5. 40. %10 - %50 Metanol sulu karışımlarında dibukainin pH-Absorbans grafiği (λ=317 nm) 87
Şekil 5. 41. %10 - %50 Metanol sulu karışımlarında prokainin pH-Absorbans grafiği (λ=222 nm)..... 87
Şekil 5. 42. %10 - %50 Metanol sulu karışımlarında tetrakainin pH-Absorbans grafiği (λ=228 nm) 88

Çizelgeler Listesi

Çizelge 2. 1. Benzenin floresans özelliğine sübstitüsyonların etkisi (etanol içinde). 9

Çizelge 2. 2. Emisyon dalga boyu ve floresans ışın şiddetine birkaç sübstitüentin etkilerinin listesi. 10

Çizelge 3. 1. Sülfonamitlerin kapiler elektroforez yöntemiyle belirlenen pKa değerleri 54

Çizelge 4. 1. Bu çalışmada kullanılan lokal anestezik maddeler 55

Çizelge 4. 2. Çalışmada kullanılan çözücüler..... 55

Çizelge 4. 3. Kullanılan çözücülerin özellikleri ve solvatokromik parametreleri (α, β, π*, DN, AN)..... 56

Çizelge 5. 1. Tetrakainin farklı çözücü yüzdelerindeki floresans özellikleri ([Tetrakain]=10^{-5}M) 66

Çizelge 5. 2. . Prokainin farklı çözücü yüzdelerindeki floresans özellikleri ([Prokain]=10^{-6} M)..... 67

Çizelge 5. 3. Dibukainin farklı çözücü yüzdelerindeki floresans özellikleri ([Dibukain]=10^{-5} M)..... 69

Çizelge 5. 4. Lokal anesteziklerin % 10-50 asetonitril-su ortamlarındaki SPARC teorik pKa değerleri ile karşılaştırmalı pKa değerleri (n=3, n.d.= Bu çalışmada tayin edilemedi)..... 80

Çizelge 5. 5. Lokal anesteziklerin % 10-50 metanol-su ortamlarındaki SPARC teorik pKa değerleri ile karşılaştırmalı pKa değerleri (n=3, n.d.= Bu çalışmada tayin edilemedi)..... 83

Çizelge 5. 6. Lokal anesteziklerin % 10-50 asetonitril-su ortamlarındaki SPARC teorik pKa değerleri ile karşılaştırmalı pKa değerleri (n=3, n.d.= Bu çalışmada tayin edilemedi)..... 86

Çizelge 5. 7. Lokal anesteziklerin % 10-50 metanoll-su ortamlarındaki SPARC teorik pKa değerleri ile karşılaştırmalı pKa değerleri (n=3, n.d.= Bu çalışmada tayin edilemedi)..... 88

1. GİRİŞ

Sinir dokusuna uygun konsantrasyonda uygulandıklarında, sinir iletimini bloke eden ilaçlara " lokal anestezikler " adı verilir. Lokal anesteziklerin önemli avantajı, yarattıkları etkinin tersinir oluşudur. Lokal anestezikler genellikle bir benzen halkası olan bir lipofilik grup ve bir tersiyer amin olan bir hidrofilik gruptan oluşur. Bu iki grup ester veya amit yapıda olan bir ara zincir ile bağlıdır. Lipofilik grup (serbest baz) solüsyonun sinir membranına penetrasyonunu sağlar. Hidrofilik grup (katyonik form) ise farmakolojik olarak aktif olan kısımdır. Sinir hücresi içinde non-iyonize (lipofilik, serbest baz) ve iyonize (hidrofilik, katyonik form) kısım denge haline gelir, iyonize kısım reseptörle etkileşir, farmakolojik olarak aktif olan kısımdır. Bu ilaçlar sinir sisteminin her yerinde ve her tip sinir lifi üzerinde etkili olurlar. Lokal anestezik ilacın etki başlama süresinde en önemli faktör ajanın pKa'sıdır. pKa, baz (lipofilik grup) ile katyonik formun (hidrofilik grup) eşit olduğu hidrojen iyon konsantrasyonu (pH) olup her ajan için farklıdır. Lokal anesteziğin pKa'sı ne kadar fizyolojik pH'ya yakınsa etkisi o kadar çabuk başlar. Lokal anestezik ilaçların pKa' larının her bir iyonik formu için tayin edilmesi ve bu amaçla üç farklı yöntemin karşılaştırmalı olarak uygulanması, bu ilaçların fizyolojik etkinliklerinin incelenmesi ve etki mekanizmalarının belirlenmesinde çok büyük bir öneme sahiptir. Lokal anesteziklerin fizyolojik etkinliğinde pKa'larının oldukça önemli olması, bu maddelerin pKa' larının doğru bir şekilde tayin edilmesi gerekliliğini de ortaya koymaktadır. Literatürde bazı ilaçların pKa değerleri bulunmaktadır. Ancak bu çalışmada, hem pKa değerleri bulunmayan hem de bilindiği halde daha kesin olarak belirlenmesinin uygun olacağı düşünülen bazı lokal anestezik ilaçların etken maddelerinin pKa' larının, su ve organik çözücü-su ikili karışımlarında iki farklı yöntem (spektrofotometrik ve spektroflorimetrik yöntem) ile tayini amaçlanmıştır. Aynı zamanda, lokal anestezik maddelerin pKa değerlerinin doğru ve hassas olarak belirlenmesinin, bunların etkinliklerinin ve etki sürelerinin daha iyi anlaşılması hususunda farmakologlara yardımcı olacağına inanılmaktadır.

Bu tezde yer alan lokal anestezik maddelerin pKa sabitleri geniş bir aralıkta tayin edilerek, hem sıvı kromatografisi ve kapiler elektroforez gibi ayırma yöntemlerinde analitik prosedürün optimizasyonunda, hem de bileşiklerin çözünürlük, absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve eliminasyon gibi fizikokimyasal davranışları hakkında önemli bilgiler sağlayacaktır.

2.TEORİK KISIM

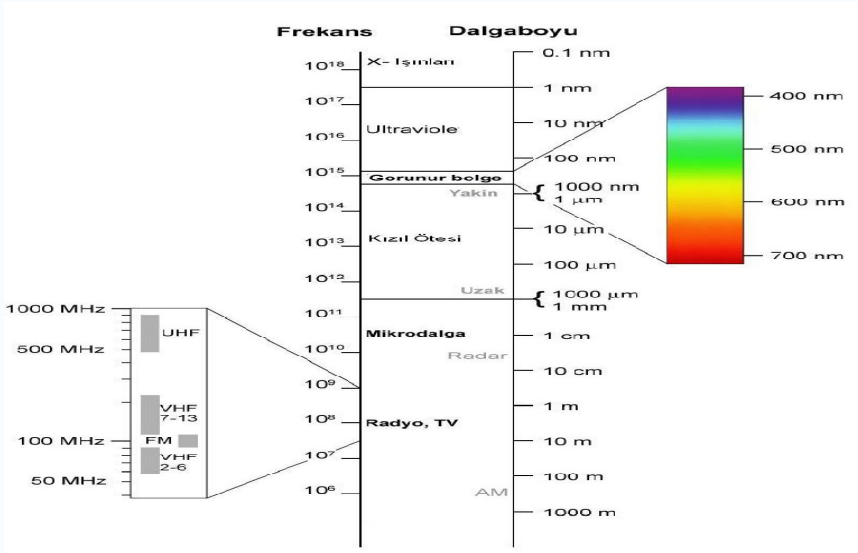
2.1. Floresans Spektroskopisi

Spektroskopi, maddenin özelliklerinin soğrulan ve salınan parçacıklar, ışık veya ses aracılığı ile incelenmesidir. Spektroskopi fizik/fotonik/optik bazlı teknikler bütünüdür ve uygun düştüğü her yerde kullanılmaktadır; örneğin astrofizikte kullanılmaktadır, ancak maksat kimyasal analiz olmayabilmektedir.

Spektroskopi ayrıca ışık ile maddenin etkileşiminin incelenmesi olarak da tanımlanabilir. Spektroskopi, analitik kimyada ve moleküler biyolojide maddelerin ışık aracılığı ile tanımlanmaları amacıyla kullanılmaktadır.

Spektroskopik analiz yöntemlerinde örnek üzerine bir uyarıcı tanecik gönderilir ve örneğin bu uyarıcı taneciğe (elektron, nötron, proton, atom, molekül, gibi) karşı davranışı ölçülür. Bunlar dışında, elektromanyetik olan ve olmayan ışınım da kullanılmaktadır (mikrodalgalar, radyo dalgaları, X ışınları, vs. gibi).

Spektroskopik yöntemlerde maddenin elektromanyetik radyasyonu yayması, absorblaması, saçması, saptırması, genel olarak maddenin elektromanyetik radyasyonla etkileşimi ve bu etkileşimin sonuçları analitik amaçlara dönük olarak incelenir. Spektroskopi, gökbilim ve uzaktan algılamada da ayrıca yoğun olarak uygulanan yöntemlerdendir. (http://tr.wikipedia.org/wiki/Spektroskopi, 2010)



Şekil 2. 1. Elektromagnetik spektrum

Bir atom veya molekülün en kararlı elektron konfigürasyonu; elektronların en düşük enerjili orbitallere Hund kuralına göre yerleşimi ile ortaya çıkar ve bu durum

atomun veya molekülün temel enerji düzeyini veya temel halini oluşturur. Elektronların daha üst enerji düzeylerine yerleşmesi ile atom veya molekül uyarılmış hale gelir. Maddenin floresans özelliği üzerine kurulmuş olan tayin metoduna florimetri veya floresans spektroskopisi denir.

Floresans özelliği, maddenin gaz, sıvı ve katı hallerinde görülebilir. En basit floresans, seyreltik atom buharları tarafından meydana getirilir. (Gündüz B., 1995)

Moleküler floresans spektroskopisi, optik yöntemlerden biri olan spektrofotometri ile ilgili analitik bir yöntemdir. Üzerine uygun dalga boyunda ışın yollanan molekül bu enerjiyi 10^{-5} saniye gibi çok kısa bir sürede soğurmakta ve uyarılmış duruma geçmektedir. Bu uyarılmış durumda molekül kararsızdır. Uyarılmış haldeki molekül, fazla enerjisinin bir kısmını ya da tamamını kaybetmeden; ancak 10^{-7} - 10^{-8} saniye kadar bu halde kalabilir. Uyarılmış durumundaki birçok molekül fazla enerjilerini komşu moleküllerle çarpışarak ısısal dağıtma ile harcar. Bazı moleküller ise bu fazla enerjilerini ışıma yaparak harcar ve temel duruma dönerler. Soğurulmuş ısının yeniden yayınması genel olarak fotolüminesans veya lüminesans olarak tanımlanır. (Lakowicz J.R. ve ark., 1986)

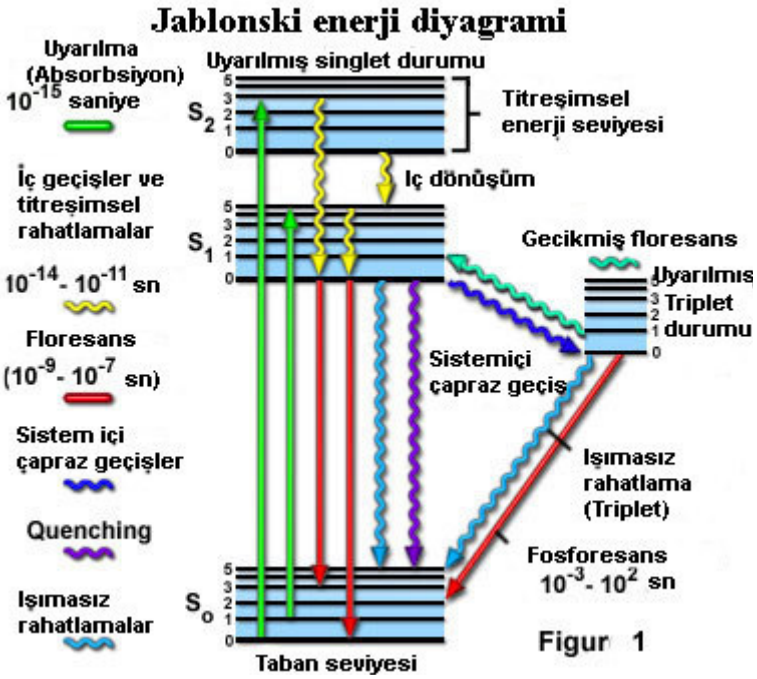
Birçok madde lüminesans özelliği gösterir. Lüminesans bir maddenin absorpladığı ışını geri vermesi özelliğidir. Bu özellik floresans ve fosforesans olmak üzere iki kısma ayrılır. (Gündüz B., 1995)

2.1.1. Floresans

Uyarılmış bir singlet sistemden temel haldeki singlet bir sisteme geçiş sırasında yayılan ışığa floresans (hv_2) denir:

$S_0 + hv_1 \rightarrow {}^1S^*_{II}$ (uyarılma)

${}^1S^*_I \rightarrow {}^1S_0 + hv_2$ (floresans)



Şekil 2. 2. Jablonski diyagramı

Bir molekül soğurum ile temel elektronik ve titreşimsel durumdan uyarılmış haline geçer. Molekül uyarılmış durumda iken titreşimsel enerjisinin fazlası moleküller arası çarpışmalarla dağıtılır. Daha sonra molekül temel enerji seviyesine bir ışın yayarak floresans oluşturur.

Floresans olayında yayılan ışığın frekansı ile sistemi uyaran ışığın frekansı birbirine eşit ise buna rezonans floresansı denir. Rezonans floresans olayı atomlarda ve moleküller arası çarpışmanın olmadığı bazı katı maddelerde de olabilir. Çözeltide oluşan uyarılmış moleküller ise fazla enerjilerinin bir kısmından ışımasız yoldan kurtuldukları için bunlardan gözlenen floresansın dalgaboyu, molekülü uyaran fotonların dalga boylarından daha uzundur. Fosforesans olayında gözlenen dalgaboyları ise, floresans olayında gözlenen dalga boylarından daha da uzundur. (Gündüz B., 1995)

Birçok organik ve anorganik maddelerin kalitatif ve kantitatif analizleri moleküllerin floresans spektroskopisi ile yapılabilmektedir. Bu yöntemin en önemli özelliği duyarlı olması, yani çok daha az miktarlardaki maddelerin analizinin yapılabilmesidir. Floresans gösteren maddelerin de çok fazla sayıda olmaması bir yandan yöntemin seçici olduğunu gösterirken, diğer yandan da uygulama alanını sınırlandırmaktadır.

Moleküler floresans olayı moleküldeki bağ elektronlarının bir foton ile etkileşmesinden oluşmaktadır.

2.1.2. Fosforesans

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

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

$^1S^*_I \rightarrow {}^3T^*$ (sistemlerarası geçiş)

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

Fosforesans, floresansla ilişkili bir çeşit ışıldama şeklidir. Floresanstan farklı olarak fosforesant maddeler soğurdukları enerjiyi hızlıca geri vermezler. Triplet durumdaki elektronlar eski dönüş yönünü kazandıktan sonra normal yörünge düzenindeki diğer elektronların yanına dönebilirler. Bu arada elektron çok daha yüksek bir yörüngede fırlatmada işlev gören enerji, ışık enerjisi olarak geri verilir. Bu olay fosforesans olarak isimlendirilir.

Işık ışınlarının absorpsiyonu, molekülü temel halin en düşük titreşim seviyesinden, uyarılmış bir singlet durumun titreşim düzeylerinden birini uyarır. Bu geçiş 10^{-15} sn mertebesinde meydana gelir. Uyarma enerjisinin fazlasını atmak için;

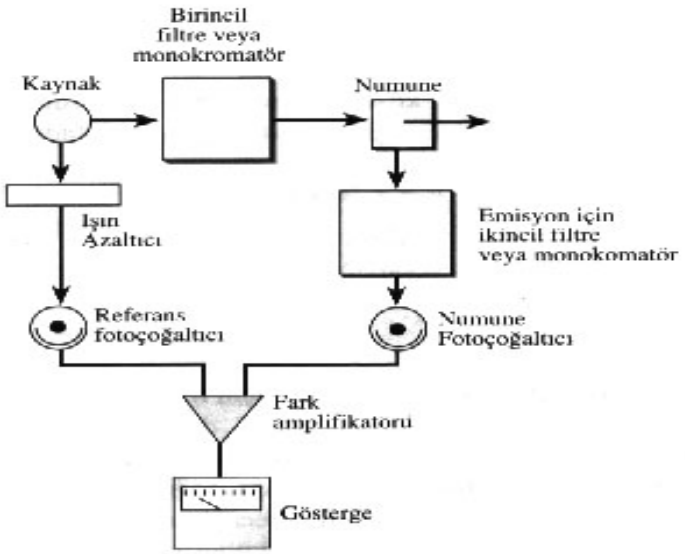
1- Floresans oluşturarak birinci uyarılmış singlet durumunun en düşük enerji düzeyine dönebilir ya da;

2- Uyarılmış bir triplet hale titreşim düzeylerinden birine geçer ve sonra uyarılmış triplet durumunun en düşük enerji düzeyine inebilir.

Molekül birinci uyarılmış durumdan temel hale daha önce söylendiği gibi ışıma oluşturmadan veya floresans yayarak dönebilir.

Molekül birinci uyarılmış triplet durumunda ise ışığın emisyonu ile temel hale dönüş zordur. Sonuç olarak; oldukça yavaş bir emisyonla temel hale dönülür. Uyarılmadan 10^{-4} bir kaç sn lik bir süreye kadar oluşan bu ışımalı dönüşte fosforesans meydana gelir. (Gündüz T., 1999)

2.1.3. Lüminesans Spektrofotometreleri



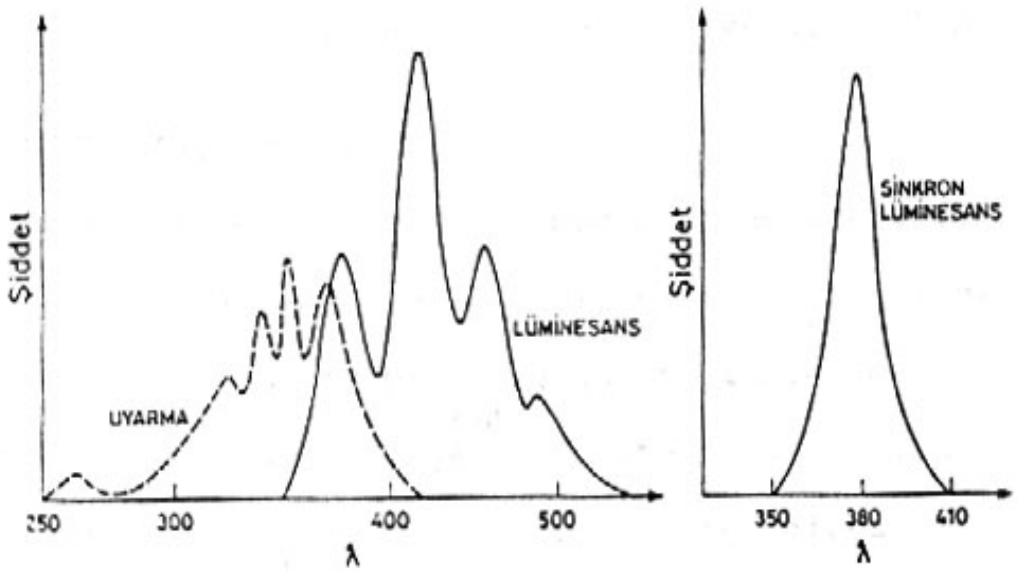
Şekil 2. 3. Fotolüminesans ölçümleri için kullanılan cihaz.

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

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

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

Uyarma dalgaboyu sabit tutulup emisyon monokromatöründeki dalgaboyu ayarı değiştirilirse, örnek için lüminesans spektrumu elde edilir. Lüminesans spektrumu, uyarma spektrumundan daha uzun dalgaboyu bölgesindedir. Hem uyarma hem de emisyon monokromatöründeki dalgaboyu ayarları aralarında belli bir dalgaboyu farkı, $\Delta\lambda$, uygulanarak ve aynı hızda birlikte değiştirilerek lüminesans ölçümü yapılabilir. Bu tür spektrum elde etme yöntemine senkron spektroflorimetri yöntemi denir ve bu yöntem özellikle birden fazla floresent madde içeren karışımların nicel analizinde kullanılır.



Şekil 2. 4. Antrasenin uyarma, lüminesans ve senkron lüminesans spektrumları

Özellikle fosforesans ölçümlerinde birden fazla bileşenin birarada nicel analizini gerçekleştirebilecek bir başka yöntem de ışık kaynağı belli bir süre kapatıp fosforesans şiddetini zamanla azalmasını ölçmektir. Işık kaynağının önüne bir ışık bölücü konarak veya ışığı örneğe pulslar halinde gönderip lüminesansı pulstan belli bir süre sonra ölçerek fosforesansın zamanla değişimi incelenebilir. İkili bir fosforesant karışımında

bileşenlerden birinin fosforesansı daha çabuk sönüyorsa, fosforesans kısa sürelerde her iki bileşenden, uzun sürelerde ise sadece bir bileşenden kaynaklanır.

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

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

2.1.4. Floresansı Etkileyen Faktörler

2.1.4.1. Molekül yapısının etkisi

Moleküllerde düzlemsellik, dönmenin engellenmiş olması, konjugasyon ve halka sayısının artması genellikle floresans verimini arttırır. (Gündüz B., 1995)

En şiddetli floresans özelliğine, içinde aromatik halkalar bulunan sistemlerde rastlanır. Bilindiği gibi bunlarda daha çok $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişleri söz konusudur. Bunlardan başka karbonil grubu içeren alifatik ve alisiklik bileşiklerle çok sayıda çifte bağ içeren konjuge sistemler de floresans özelliği gösterirler. Bu özellikleri aromatik halkaların kondesasyonuyla daha da artar. Piridin, tiyofen, pirol, furan gibi heterosiklik halkalar floresans özelliği göstermezler.

Azot içeren basit heterosiklik halkalarda $n \rightarrow \pi^*$ düşük enerjili elektronik geçişleri olduğundan, bunlarda haller arası geçiş daha kolay olur ve uyarılmış singlet hal kolayca uyarılmış triplet hale dönüşür. Triplet halden temel hale dönüş ise fosforesans yayma yoluyla olur ve fosforesansın olduğu yerde de floresans azalır veya yok olur. Buna karşılık azotlu bir aromatik halka olan piridin, aromatik bir halkaya kondense olursa, kinolinde görüldüğü gibi floresans özelliği görülür. İndol, izokinolin gibi azot içeren kondense bileşikler de floresans özelliği gösterirler. (Gündüz T., 1999)

2.1.4.2. Sübsititüent Etkisi

Floresans verimine sübstitüentlerin etkisini benzen halkası ve benzen halkasına bazı sübstitüentler üzerinde incelenecek olursa, benzen halkasının sübstitüsyona uğradığı hem absorpsiyon, hem de floresans bandında bir değişmenin olduğu ve

floresans şiddetinin de çoğu kez değiştiği görülür. Buna bazı örnekler Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Lüminesent bir bileşikteki, bileşiğin pi (π) elektronlarını delokalize edebilen sübstitüentler genellikle, uyarılmış singlet hal ve temel hal arasında oluşan muhtemel bir ışık geçişini arttırır. Bu sonuç floresansı da arttırır. Genellikle orto-, para-pozisyonundaki sübstitüentler halkaya elektron verirler ve muhtemelen oluşacak floresansı arttırırlar. Meta- pozisyonundaki sübstitüentler halkadan elektron çekerler ve muhtemel floresansı azaltırlar. Aromatik bileşiklerin floresansına bilinen bazı sübstitüentlerin etkileri Çizelge 2.2'de verilmiştir.

Çizelge 2. 1. Benzenin floresans özelliğine sübstitüsyonların etkisi (etanol içinde).

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

Çizelge 2. 2. Emisyon dalga boyu ve floresans ışın şiddetine birkaç sübstitüentin etkilerinin listesi.

Sübstitüent	**Dalga Boyuna Etkisi**	**Işın şiddetine etkisi**
Alkil	Etkilemez	Önemsiz ölçüde artar
COOH,CHO,COOR,CRO	Artar	Azalır
OH,OMe,OEt	Artar	Artar
CN	Etkilemez	Artar
NH_2,NHR,NR_2	Artar	Artar
NO_2,NO	Büyük ölçüde artar	Büyük ölçüde artar veya tam söndürme (quenching)
SH	Artar	Azalır
SO_3H	Etkilemez	Etkilemez
F,Cl,Br,I	Artar	azalır

Molekülün bünyesinde veya molekülün çözündüğü çözücüde bulunan bir ağır atom (I veya Br gibi) molekülün floresans verimini azaltır, triplet oluşumu verimini arttırır ve bu nedenle genellikle fosforesans verimi artar. (Gündüz B., 1995)

2.1.4.3. Sıcaklık ve Çözelti Etkisi

Sıcaklığın yükselmesi çarpışmayı artırdığı ve dönüşmeyi kolaylaştırdığı için floresans ışıması azalır. Çözücünün viskozitesinin düşmesi de çarpışmayı kolaylaştırdığından floresans ışımasını düşürür.

Kullanılan çözücüler floresans şiddetinin veya floresansın görüldüğü dalga boyunun değişmesine neden olabilir. Çözücünün genellikle uyarılmış durumundaki moleküller ile H bağı oluşturması temel hale ışımasız dönüş işleminin hızını arttırdığından floresansın şiddetinde azalma olur.

Çözücünün polarlığının artmasıda floresansı etkiler. Çünkü, polar çözücüler $n\rightarrow\pi^*$ geçişlerinde enerji farkını genellikle artırarak floresans ışımasını azaltır. Bazı hallerde $\pi\rightarrow\pi^*$geçişinin enerjisi $n\rightarrow\pi^*$ geçişininkinin altına bile düşer.

İçinde ağır atomlar içeren çözücüler, örneğin, karbontetraklorür ve etiliyodür, floresans ışımasının şiddetini azaltır. Ağır atomlar floresant madde üzerinde olduğu

zaman da aynı özelliği gösterirler. Atom numarası arttıkça spin ve toplam orbital momentleri arasındaki etkileşmeler büyür ve uyarılmış triplet hale dönüşmesi olasılığı artar. Triplet hal fosforesansı artırıp, floresansı azaltır.

2.1.4.4. pH etkisi

Proton aktarımı tepkimeleri çok hızlı tepkimeler olduğundan, proton aktarımının temel durumdaki moleküllerle olduğu gibi, uyarılmış moleküllerle de gerçekleşme olasılığı çok yüksektir. Ortamın pH'ındaki değişmeler, hem temel hem de uyarılmış molekülleri etkileyeceği için pH, bir floresans verimini etkileyen bir faktör olabilir.

Asit veya baz grubu içeren maddelerin iyonlaşmış ve iyonlaşmamış hallerinin floresans ışımalarının dalga boyları ve şiddetleri birbirlerinden farklıdır. Bunlara anilin ve fenolün molekül ve iyon halleri örnek verilebilir. Bu olay, asit ve baz indikatörlerinin pH ile değişmesine benzer. Bundan yararlanarak renkli çözeltilerin titre edilmeleri teklif edilmiştir. Örneğin 1-naftol-4-sülfonik asidin fenol şeklinin floresansı ultraviyole alanında olduğundan görülmez. Ama, fenolat halinin yaydığı floresant ışınları gözle görülür. Bu değişme çok küçük bir pH aralığında gerçekleşir. İşin en ilginç yönü, bu değişmenin fenol protonundan beklenenden daha aşağı bir pH da gerçekleşmesidir. Bunun nedeni uyarılmış halin asitin sabitinin, temel halin asit sabitinden daha büyük olmasıdır. Uyarmayla asit ve baz sabitinin değişmesi çok rastlanan bir olaydır. Bu değişme bazı hallerde temel hal sabitinin yüzbin katına kadar çıkabilir. Söylenenlerden de anlaşılacağı gibi floresans özelliğinden yararlanarak yapılan analitik işlemlerde pH kontrolü yapılması gerekir.

2.1.4.5. Konsantrasyonun Etkisi

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

2.1.4.6. Yapısal rijiditenin etkisi

Rijitlik, molekülün esnek olmama özelliği olarak ifade edilebilir. Bir molekülün yapısının rijid olması onun floresans özelliğini arttırır. Floresans özelliği gösteren bir

boya bir yüzeyde absorbe edilince emisyon şiddeti daha da artar. Bunun nedeni, boyanın tutulduğu yüzeyde rijiditesinin artmasıdır.

Rijit olmayan moleküllerde iç dönüşme daha kolay olduğundan ışın yaymaksızın enerji kaybı olma ihtimali çok daha fazladır. Bu hal, bilindiği gibi floresans şiddetini azaltır. Bundan başka, rijit olmayan bir molekülün bir tarafı diğer tarafına göre daha zayıf bir enerjiyle uyarılmış olabilir. Bu da floresans verimini azaltabilir.

Örneğin; Fluoresein çözelti içinde kuvvetli floresans göstermesine karşılık moleküler katılık göstermeyen fenolftaleinin böyle bir özelliği yoktur. Floressein molekülü rijit bir yapıya sahip olduğu halde fenolftalein molekülü rijit değildir. Bu nedenle fenolftalein uyarıldığı zaman temel hale dönmek için iç dönüşümü tercih edilir. (Şahin H., 2006)

2.1.4.7.Viskozite etkisi

Sıcaklığın artması ve çözücünün viskozitesinin azalması, uyarılmış molekül ile diğer moleküllerin çarpışması ve ayrıca sistemler arası geçişlerin olasılığını arttırmaktadır. Düşük sıcaklıkta ve yüksek viskoziteli ortamda ise dinlenme zamanı uyarılmış durumun ömründen daha uzun olmakta ve floresans artmaktadır. (Türker Şener L., 2006)

2.1.4.8. Çözünmüş oksijen, paramagnetikler ve ağır atomlar

Çözünmüş oksijen genellikle floresans ışımasının şiddetini azaltır. Moleküler oksijen paramagnetik olduğundan, singlet halin triplet hale dönüşmesini kolaylaştırıp floresans azaltır. Bu nedenle analizden önce çözeltiden çözünmüş havanın uzaklaştırılması uygun olur.

Oksijenden başka Fe^{+3}, CO^{+2}, N^{+2}, Cu^{+2} gibi paramagnetik ve dış d orbitalleri dolmamış geçiş elementleri de floresansı söndürmektedir. Bunların etkileri de oksijende olduğu gibidir. Hg^{+2}, Au^{+2} gibi diyamagnetik atomlarda floresansı azaltmaktadır. Na^{+}, K^{+}, Ca^{+2}, Mg^{+2} gibi diyamagnetik hafif metaller floresansı değiştirmezler. (Türker Şener L., 2006)

2.1.4.9. Gelen ışının dalga boyunun ve şiddetinin etkisi

Lüminesans verimi, sadece iç dönüşüm, sistemler arası geçiş ve enerji aktarımı gibi fiziksel olaylarla değil, uyarılmış düzeylerde ortaya çıkabilecek bağ kopması ve ürün oluşması gibi olaylar yüzünden de azalabilir. Ayrıca gelen ışının şiddetinin artması floresansı arttırır. (Gündüz B., 1995)

Floresans ışıması meydana getiren dalga boylarının alt sınırı 250 nm kadardır. Bu nedenle $\sigma^* \rightarrow \sigma$ geçişine tekabül eden floresanslara pek rastlanmaz. Anılan dalga boyuna kadar olan ışınlar ancak $\pi \rightarrow \pi^*$ ve $\pi \rightarrow n$ geçişleri meydana getirebilirler. 200 nm'lik bir ışının enerjisi 140 kcal/mol kadardır. Bu büyüklükteki enerji floresans ışıması yapan molekülün bağlarından bir kısmını koparır.

Bir molekülün uyarılması ne kadar enerjili olursa olsun, en düşük uyarılmış hale titreşim relaksasyonuyla veya iç dönüşüyle gelir ve ondan sonra floresans ışıması yapar. Gelen ışının şiddetinin (yoğunluğunun) artması, floresansı artırır.

2.1.5. Fotolüminesans Teorisi

Fotolüminesans boyunca yayılan radyasyonun miktarı, absorblanan radyasyonun (ışığın) miktarına bağlıdır. Mümkün olan uyarılmış bir molekül radyasyonsuz bir enerji kaybıyla temel enerji düzeyine geri döndüğü için, yayılan radyasyonun fotonlarının sayısı genellikle absorblanan radyasyonunun fotonlarının sayısından daha az olur. Yayılan foton sayısının, absorplanan foton sayısına oranı o molekülün kuantum verimini, ϕ, verir.

$$\Phi = \frac{\text{floresans gösteren kuanta sayısı}}{\text{toplam uyarılmış kuanta sayısı}}$$

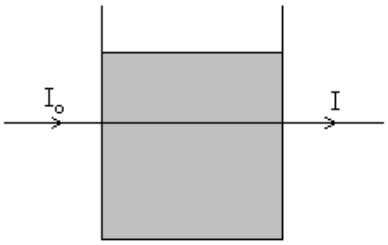
Kuantum verimi, floresansın normal formları boyunca biri geçmemelidir. Belirlenen deney şartlarında belli bir maddenin kuantum verimi sabittir. Yayılan radyasyonun ışık şiddeti F, kuantum veriminin ve absorblanan radyasyonun şiddeti cinsinden şöyle yazılabilir.

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

Absorblanan radyasyonun ışık şiddeti Ia, gelen uyarıcı radyasyonun (ışığın) I0 ve geçen radyasyonun (ışığın) I arasındaki farka eşittir. Buradan,

$$Ia = I_0 - I \qquad (2)$$

elde edilir.



Geçen ışığın (radyasyonun) şiddeti Beer yasasından hesaplanabilir.

$$A = \varepsilon lC = -\log \frac{I}{I_o} \quad (3)$$

Burada,

ε : Maddenin molar absorblanma katsayısı

C : Çözeltideki çözünen maddenin molar konsantrasyonu

l: optik ışık yolu

Geçen ışık şiddetine göre Beer yasasının çözümü verilirse:

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

Eşitlik 1' de I yerine yukarıdaki eşitlikteki değeri yazılırsa

$$F = \phi\left[I_o - Ie^{-2,303\varepsilon lC}\right] \quad (5)$$

şeklini alır.

Yukarıdaki eşitlikteki üstel ifadeler sonsuz seriler şeklinde yazılırsa;

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

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

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

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

Seyreltik çözeltiler için absorbans (εlC) küçüktür. (εlC), 0,05 e eşitse Eşitlik 2.25 deki serilerin ikinci terimi, birinci terimin % 2,5'u kadardır ve bunu takip eden terimler daha küçük veya eşittir. Analitin konsantrasyonu sabit alınmak suretiyle absorbans

0,05'den küçük tutulursa birinci terim hariç serilerdeki terimlerin tümü, ihmal edilir ve Eşitlik (8) şu şekilde basitleştirilir.

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

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

$$F = 2,303 fR \phi I_o \varepsilon l C$$

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

$$F = KI_0C \qquad (11)$$

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

$$F = K'C$$

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

Yani floresans konsantrasyonla orantılı olarak artmaz. Bunun nedeni:

1) Self-söndürme ve

2) Self absorpsiyondur.

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

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

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

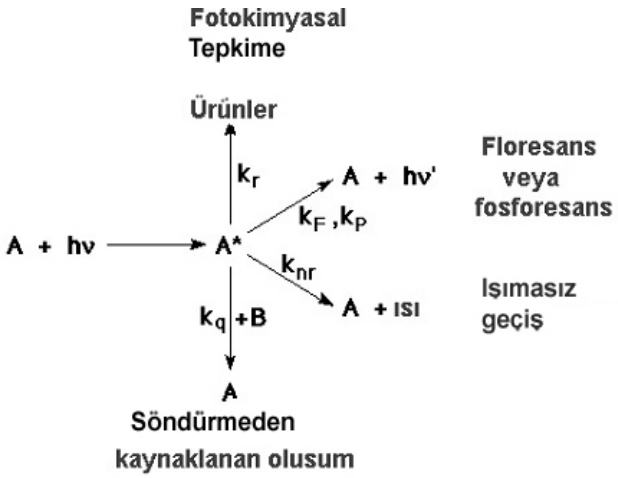
$$F = \phi I_o \quad (12)$$

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

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

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

Bir molekülün floresans etki gösterebilmesi için önce üzerine gönderilen ışımayı soğurması gerekmektedir.



Şekil 2. 5. Molekül üzerine düşen enerjinin dağılımı

A: Örnek

B: Söndürme sonrası örnek

A*: Uyarılmış örnek

h: Plank sabiti

n: Frekans

n': Enerji salınımı sırasındaki frekans

k: kuanta sayısı

2.2. Protanasyon Sabiti Tayini

2.2.1. Spektrofotometrik Yöntemle Protanasyon Sabitlerinin Tayini

Spektrofotometrik yöntem çok az madde miktarına gereksinim duyar. Bu nedenle çözünürlüğü az olan bileşiklerin su-organik çözücü ikili karışımlarındaki pK_a değerleri spektrofotometrik metotla tayin edilmiştir.

Bilindiği gibi iyonlaşma sabitlerinin tayininde ilk yöntem potansiyometridir. Bu yöntem 3 mM derişimi gerektirir. Bu derişimin sağlanamadığı durumlarda potansiyometrik yöntemden yararlanmak mümkün değildir.

Bu durumda sıklıkla spektrofotometrik yöntemden yararlanılır. 10^{-5} -10^{-6} M derişim pH etkisinde absorbanstaki farklılığı belirleyebilmemizi sağlar.

Absorbanstaki değişim yeterli değilse ve bileşiğin yapısında floresans özellik içeren gruplar varsa florimerik yöntemle iyonlaşma sabitleri tayin edilebilir. Molar absorplama katsayısı biliniyorsa hesaplama kolaydır. Ancak pK değerleri birbirine çok yakınsa bilgisayar programları kullanmayı gerektirir. Spektrum taramalarını kullanarak pK hesaplayabilen bilgisayar programları geliştirilmiştir. $pK_2 - pK_1 \geq 4$ olması durumunda değerler rahatlıkla hesaplanabilir.

Spektroskopik yöntemlerde, moleküler ve iyonik hallerin farklı absorbsiyon özelliklerinden yararlanılır. Su-organik çözücü karışımlarında spektroskopik yöntemle iyonlaşma sabiti tayininde önceleri tamponlar kullanılarak elektrot kalibre edilmekte takiben farklı pH değerlerinde moleküler ve iyonik formların absorbans değerleri kaydedilmekteydi. Günümüzde elektrot standardizasyonu yapılarak işleme başlanmaktadır. Bu tip bir çalışma akış hücreli bir spektrofotometre gerektirir.

Moleküler absorpsiyonun uygulama alanlarından birisi, denge sabitlerinin tayinidir. Bir zayıf asitte iyonlaşan ve iyonlaşmayan türlerin kendilerine özel dalga boylarında absorbsiyon yaptığını biliyoruz. Her 2 türün de her bir dalga boyundaki absorbansa katkı verdikleri bilinmektedir. Bu durumda

$$A = \varepsilon_{HA}.l.[HA] + \varepsilon_{A}.l.[A^-]$$

bağıntısı geçerlidir. Kütle denkliğini ifade edelim.

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

İlk ifadede HA yerine kütle denkliğinden gelen değerini koyalım.

$$A = \varepsilon_{HA}.l.(C - [A^-]) + \varepsilon_A.l.[A^-] = \varepsilon_{HA}.l.C - \varepsilon_{HA}.l.[A^-] + \varepsilon_A.l.[A^-]$$

$$A = A_{HA} + l.[A^-](\varepsilon_A - \varepsilon_{HA})$$

$$[A^-] = \frac{A - A_{HA}}{l.(\varepsilon_A - \varepsilon_{HA})}$$

Benzer şekilde hareketle HA için bağıntı türetilir.

$$[HA] = \frac{A_A - A}{l.(\varepsilon_A - \varepsilon_{HA})}$$

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

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

Spektrofotometrik titrasyonlarda en basit yaklaşım 3 çözelti ile gerçekleştirilir.

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

❖ İkinci çözeltide pH iyice bazik bölgeye getirilir. Bu koşulda ölçülen absorbans iyonlaşmış türle ilgilidir (A_A).

❖ Üçüncü çözeltide pH ara değerde tutulur. Buradaki absorbansa hem iyonlaşmış hem de iyonlaşmamış türlerin katkısı vardır (A). Yukarıdaki bağıntıda ara pH değerine ait hidronyum derişimi için değerler yerine konarak sabit hesaplanır.

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

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

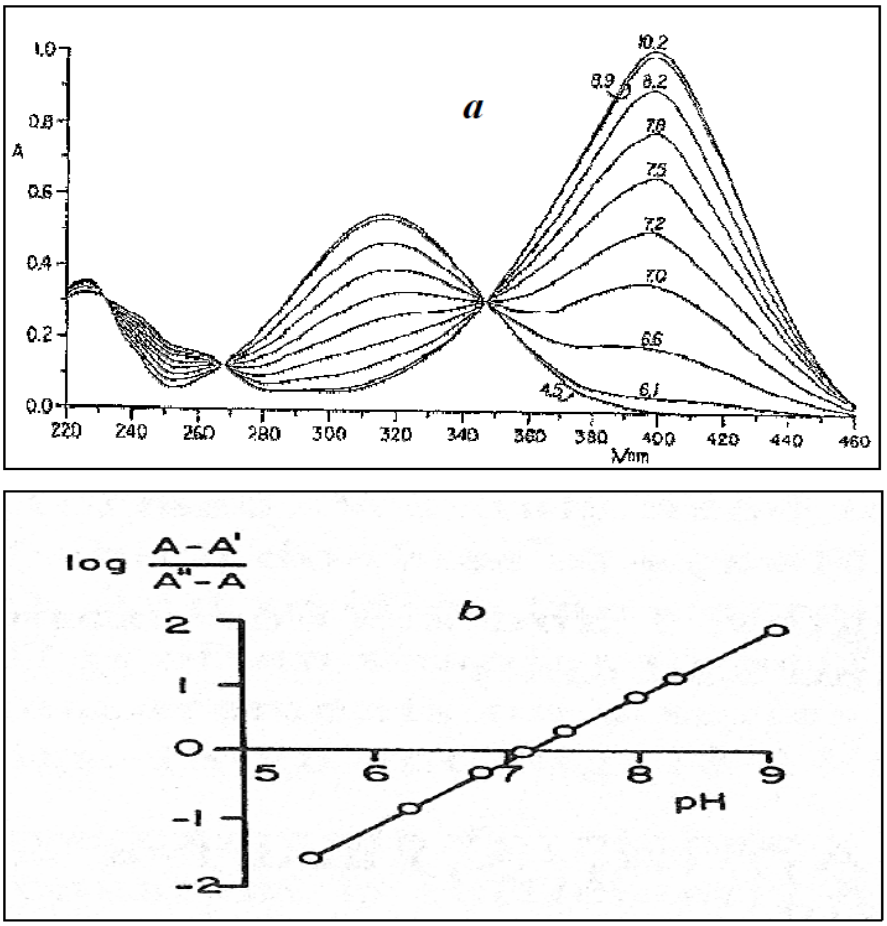
$\log (A- A_{HA})/ (A_A –A)$ y ekseninde ve pH, x ekseninde kullanılarak hazırlanan doğrusal grafiğin x eksenini kestiği değer, $-pK_a$ dır.

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

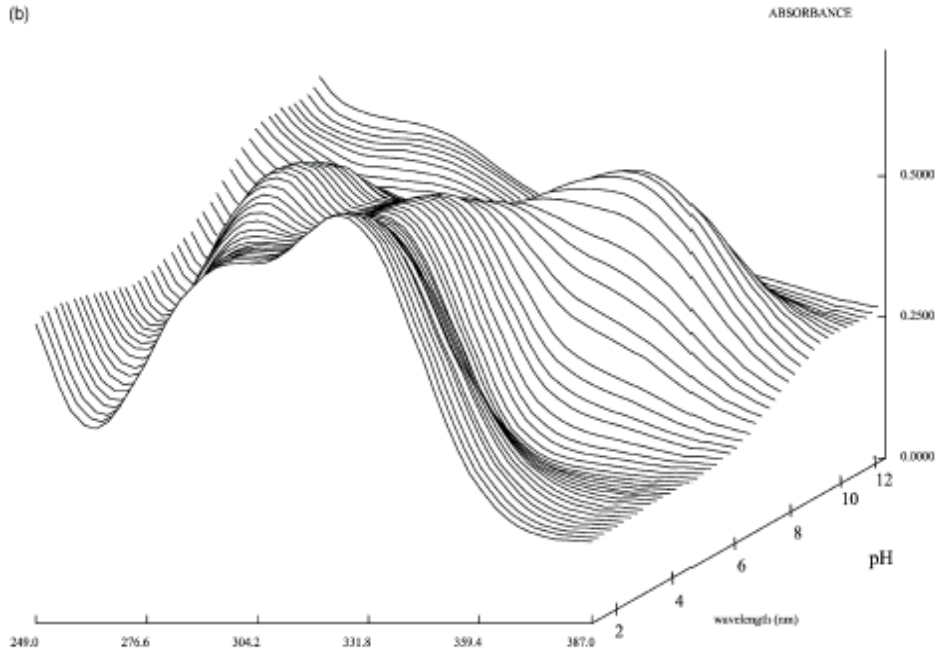
Elde edilen sonuçların güvenilirliği için 50-150 pH değerinde spektrum taraması yapılır. Sonuçların değerlendirilmesi, bu amaç için hazırlanmış bilgisayar programı ile gerçekleştirilir. Potansiyometriden daha düşük derişimde analit yeterlidir.

Çözücünün absorbansının analitin absorbansını etkilememesi için uygun bir koşul hazırlanır. Spektrum taramasının bazik bölgeyi de kapsayacak genişlikte alınması durumunda ikinci ve üçüncü iyonlaşma sabitlerinin tayinlerine de imkân tanır. (Altınordu Z., 2008)

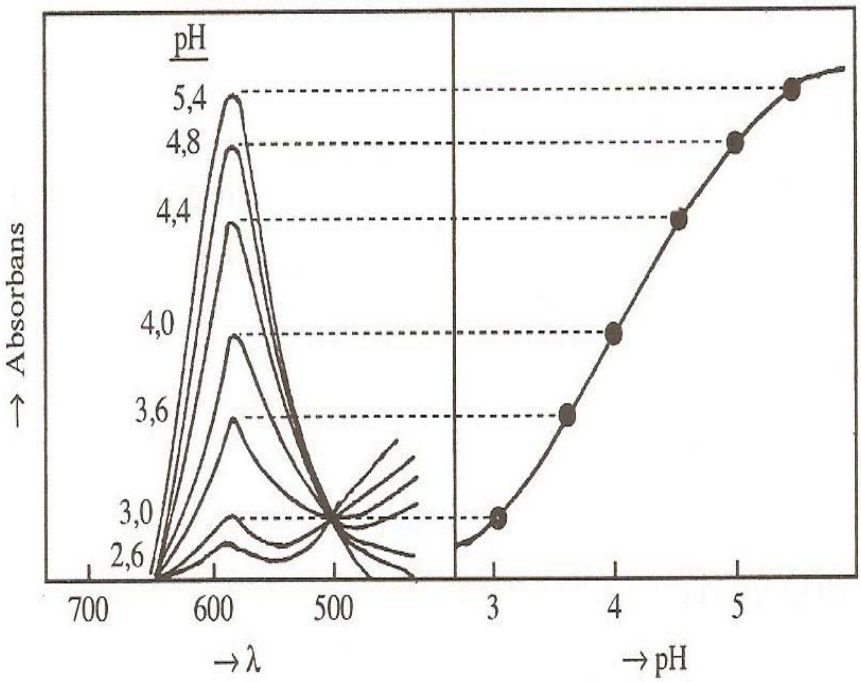
Aşağıda çeşitli çalışmalardan alınmış örnek grafikler gösterilmiştir:



Şekil 2. 6. Spektroskopik bir çalışmada (a) A - λ/nm ve (b) log absorbans farkı - pH grafikleri (A': moleküler türün absorbansı; A": iyonik türün absorbansı)



Şekil 2. 7. Kafeik asitin %30 ACN ortamında elde edilen spektroskopik verileri



Şekil 2. 8. Bromonaftalin mavisinin çeşitli pH'larda spektrumları ve bu spektrumlardan pH-konsantrasyon grafiğinin çizilmesi ve pKa değerinin hesaplanması

2.2.2. Spektroflorimetrik Yöntemle Protanasyon Sabitlerinin Tayini

Floresans ölçmek için yapılan aletlere florimetreler denir. Florimetreler bazı bakımlardan fotometrelere ve spektrofotometrelere benzerler.

Spektroflorimetreler iki tiptir. Birinci tip spektroflorimetrelerde ışın kaynağından çıkan ışınlar uygun bir filtreden, buna karşın, çözeltiden gelen floresant ışın da bir prizma monokramotordan veya gratingden geçirirlir. birçok spektrofotometreler çeşitli adaptörler takılarak spektroflorimetre olarak kullanılacak şekilde yapılmışıtır. Bu adaptörler,

1-Işın kaynağı

2-Filtre kabı

3-Sel hücresi

4-Floresant ışını monokramatörün giriş silitine düşüren bir cihaz

İkinci tip spektroflorimetreler, monokramatorla donatılmış cihazlardır. Bunlarla çalışmalar daha iyi sonuçlar verir. Ancak günlük işler söz konusu olduğu zaman birinci

tip florimetreler de ikinci tipler kadar iyi sonuçlar verebilirler. Birinci tip spektroflorimetrelere florimetreler, ikinci tiplere de spektroflorimetreler denir.

2.2.2.1. Florimetrik Analizler

İnorganik maddeler arasında doğrudan doğruya floresans özelliği veren maddeler veren pek azdır. Katyonlar uygun şeletlaştırıcı maddelerle floresant kompleksler verebilir. Bu şekilde floresant kompleksler veren katyonlar renksiz katyonlardır ve bunların kompleksleri genellikle renksizdirler. Renkli kompleksler bilindiği gibi absorpsiyon yaparlar. Renksiz kompleksleri tayin etme olanağı vermesi nedeniyle floremetreye spektroflorimetrenin tamamlayıcısı da denebilir.

Besin endüstrisinde, farmakolojide ve klinik numunelerinde önemli olan pek çok organik madde floresant özelliği gösterdiklerinden, florimetri bu alanda çok büyük bir uygulama alanı bulmuştur.

2.2.2.2. İnorganik Maddelerin Florimetrik Tayinleri

İnorganik florimetrik yöntemler iki tiptir. Doğrudan yöntemler floresans yapan bir şelet oluşmunu ve onun emisyonunun ölçülmesini içerir. İkinci grup yöntemler tayin edilecek maddenin söndürme etkisiyle oluşan floresanstaki uzanmaya dayanır. Son teknik anyon analizleri için yaygın olarak kullanılmaktadır.

2.2.2.3. Floresans Yapan Şelatlar Oluşturan Katyonlar

Floresans yapan şelatlar oluşturan geçiş metali iyonlarının sayısını başlıca iki faktör sınırlar. Birincisi bu iyonların çoğu paramanyetiktir; bu özellik, sistemler arası geçişle triplet hale geçiş hızını artırır. Böylece floresans ile sönüm muhtemel değildir ve fosforesans gözlenebilir. İkinci bir faktör geçiş metali komplekslerinin, iç dönüşümle sınırı artıran birbirine yakın çok sayıda enerji seviyeleri ile karaktarize edilmeleridir. Geçiş elementi olmayan metal iyonları, diğer sönüm işlemlerine daha az hassastır; bu yüzden florometrenin başlıca inorganik uygulamalarında yer alırlar.

2.2.2.4. Organik Türlerin Florimetrik Yöntemleri

Organik bileşiklerin bir bölümü kendiliğinden doğal olarak lüminesenttir. Bunlara en iyi örnek polisiklik aromatik hidrokarbonlardır (benzen, naftalen, fenantren, antrasen, pentosen, perilen v.b.çoklu halkalı bileşikler). Lüminesent olmayan organik ve biyokimyasal bileşikler, floresans veya fosforesans özelliğe sahip bir türevi kantitatif olarak hazırlanabiliyorsa florimetrik veya fosforimetrik olarak tayin edilebilir. Bazı durumlarda bir metal iyonu, floresent bir kompleks oluşturmak üzere, organik bileşiğe ilave edilerek reaksiyon verir. Bu tip metal komplekslerine (şelat bileşikleri) örnek olarak alüminyum-III ve magnezyum-II iyonlarının hidrosikinolinle verdikleri kompleksler verilebilir.

Diğer durumlarda ise organik bileşiğin konjugasyonu büyütmek için kondenzasyon reaksiyonu gibi bir türevlendirme reaksiyonu kullanılır ve bu da lüminesansa sebep olur. Analit ve reaktif genellikle bazı tür kondenzasyon reaksiyonuyla, iki molekülden su veya HCl gibi küçük moleküllerin ayrılması suretiyle birbirine bağlanır.

Spektrofotometrede absorbansı ölçülecek çözelti içine giren ışık; çözeltiden doğrudan geçebildiği gibi, kullanılan ışığın dalga boyuna ve madde konsantrasyonuna bağlı olarak kısmen ya da tamamen absorbe edilebilir. Işığın çözelti tarafından absorbsiyonu ile birlikte ortamdaki moleküllere enerji transfer edilir. Foton (kuantum) enerjisinin moleküldeki π elektronları tarafından absorbsiyonu ile birlikte, molekülde titreşim, dönme veya floresans gibi enerji değişimleri meydana gelir. Normal durumdaki, diğer bir deyisle temel enerji düzeyindeki moleküllerde elektronlar zıt spinlidir. Singlet durum adı da verilen zıt spinli durumda elektronlar en düşük vibrasyon (titreşim) düzeylerinden birinde bulunur. Foton enerjisinin moleküldeki π elektronları tarafından absorpsiyonu ile birlikte π elektronu daha yüksek bir vibrasyonal enerji seviyelerinden birine uyarılma (eksitasyon) sonucunda sıçrar. Uyarılmış bu yüksek enerjili elektron fazla enerjisini diğer moleküller ile çarpışarak ya da kendi titreşim ve dönme hareketleri ile dışarı vererek düşük titreşim düzeyli temel enerji düzeyine döner. Temel enerji düzeyindeki elektronu uyarabilmek için gerekli enerji, bu enerji düzeyindeki elektronun enerjisinden daha yüksektir. Uyarılmış durumdaki elektron 10^{-9} veya 10^{-5} saniye içinde emisyon adı verilen bir olayla foton enerjisi salıvererek temel enerji düzeyinde bulunan düşük titreşimli enerji düzeylerden birine döner. Bu emisyona

floresans adı verilmektedir. Floresans olayı ile dışarı verilen foton enerjisi uyarılma için gerekli olana göre daha düşüktür ve dolayısıyla daha uzun dalga boyunda bir ışın ortama salınır. Çift bağ ya da konjuge çift bağ içeren moleküller ortama floresans verme özelliğindedir. Uyarılma ve emisyonun maksimum dalga boyları arasındaki farka *Stokes kayması* adı verilir. Her molekül için spesifik bir uyarılma ve emisyon dalga boyu vardır.

Belirli konsantrasyondaki standartlar ve rölatif floresansları arasında standart bir eğri çizilerek, örneğin vermiş olduğu floresanstan konsantrasyonu hesaplanabilir. Floresans özelliği gösteren bileşiğin artan konsantrasyondaki standartları ile floresans şiddeti arasında doğru bir orantı vardır. Doğrusallık korunduğu sürece tek bir standart kullanılarak örneğin floresansından konsantrasyonu aşağıda verilen eşitlikle hesaplanabilir.

Örneğin floresansı / iç standardın floresansı = Örneğin konsantrasyonu / iç standardın konsantrasyonu

Floresans şiddeti konsantrasyon dışında pH, sıcaklık, viskozite ve diğer bileşiklerin interferanslarından etkilenir.

2.2.2.5. Floresans ve denge sabitlikleri arasındaki ilişki

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

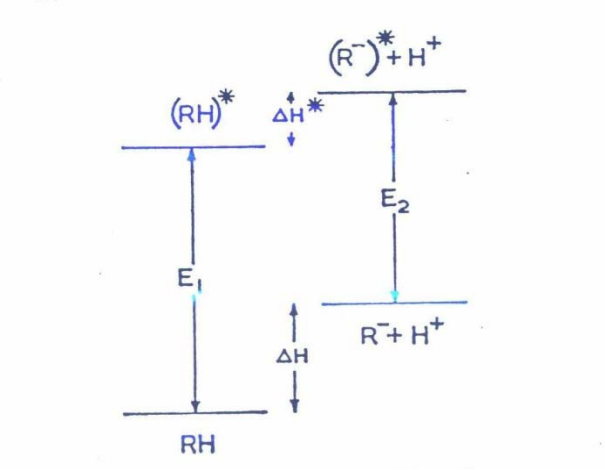
Bu relaksasyonların sonucunda temel durumda kararlı konfigürasyon ve ilk uyarılan durum arasında enerji farklılıkları oluşur. İlk uyarılma halinde enerji absorpsiyon için hν'den daha az, fakat emisyon için hν'den daha fazladır.

İlk uyarılmış singlet halinde enerji için en iyi ölçüm elde edildi ve bu da iki değerle ifade edildi.

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

Absorpsiyon ve emisyon bantları hiç titreşimsel bir yapı göstermediklerinde, 0-0 geçişlerinin konumunu bulmak mümkün değildir. Es için en iyi ölçüm, yukarıdaki eşitliğin $h\nu_{abs}$ ve $h\nu_{em}$ maksimum spektrumlarından elde edildi. Es' nin kullanılan bu

değerlerini gösteren şekildeki enerji diyagramından temel hal ile uyarılmış hal arası enerji geçişlerini bulabiliriz.



Şekil 2. 9. Asitik ve bazik hallerin enerji seviyeleri

Örneğin β-naftol gibi bileşiklerde uyarılmış halindeki molar entalpi değeri (ΔH*), temel haldeki molar entalpi (ΔH) değerinden daha azdır. Bu ters durum ilerde de göreceğimiz birkaç sistem için doğrudur.

Bu durumda ; E_1-E_2 =ΔH- ΔH* elde edilir.

Bu uygulamalar ΔH ve ΔH* ' in kesin değerlerinin pozitif, nötr ve negatif olduğu durumlarda uygulanır. Biz temel ve uyarılmış halde bir reaksiyon entropisinin varlığını varsayarsak, (elde edilen gerçek değerleri doğrulayan bir varsayım);

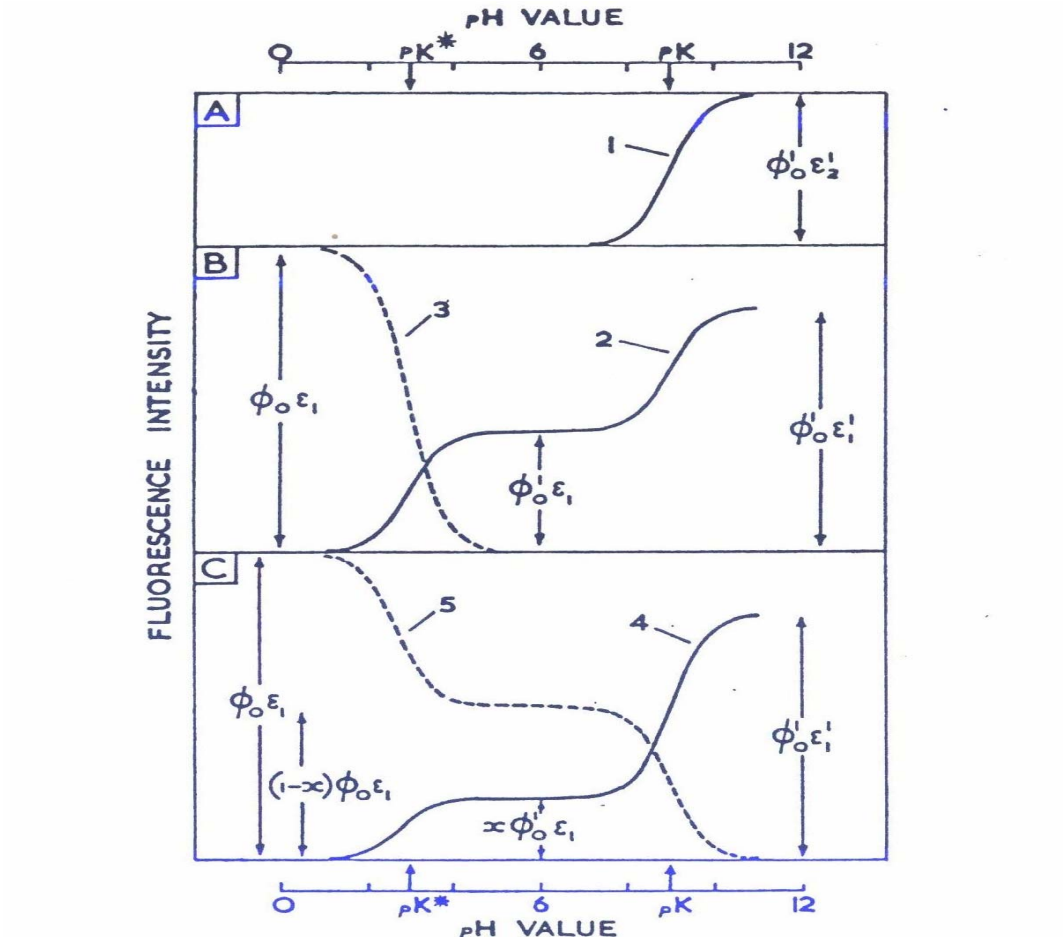
ΔG= ΔH - T ΔS = - RTInK

$$\log(K/K^*) = \frac{E1 - E2}{2{,}3RT} = \frac{Nh(\Delta\upsilon)}{2{,}3RT}$$

burada ; Planck sabitini yerine koyar , mikrona çevirirsek;

$$pK^* = pK - \frac{6{,}25x10^3}{T}(\Delta\bar{\upsilon})$$

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



Şekil 2. 10. Asidik ve bazik formda floresans şiddetinin eğrileri

- R^- bazik formunun (düz çizgiyle gösterilmiş eğriler) en düşük singlet uyarılmış düzeye sahip olduğu farzedilir ve RH asidik formunun (kesik çizgiyle gösterilmiş eğriler) absorpsiyon yapmadığı (ışığı tamamen geçirdiği), λ_2 dalga boyunda absorpsiyon yaptığı görülür.
- ε_2', R^- anyonunun λ_2 'deki sönüm katsayısıdır.
- ε_1' ve ε_1 daha kısa dalga boyu λ_1 ' de R^- ve RH'ın sönüm katsayılarıdır.
- Φ_o' ve 'ın dalga boyundan bağımsız olduğu farzedilir.
- Grafikteki eğriler; ε_1' =1.6 ε_2'=2 ε_1 ve Φ_o=2.5 Φ_o' olan bir sistem için çizilmiştir.
- Blok A, λ_2 'deki uyarmayla ilgilidir.
- Blok B ve C ise λ_1 ' deki uyarmayla ilgilidir.
- B ' de floresans dikkata değer ölçüde oluşmadan önce bütün pH değerlerinde denge kurulur.

- C ‘de floresans oluşmadan önce , pH 6’da ayrışan asitin oranı χ’in 0.5 olduğu farzedilir.

- Bu eğrilerin şekli aşağıdaki faktörlere bağlıdır.

a) pK ve pK* değerlerine,

b) Asitik (ε_1) ve bazik (ε_2) formun kısa dalga boyu ekzitasyonundaki sönüm katsayıları ile bazik formun uzun dalga boyu ekzitasyonundaki sönüm katsayısına (ε_2'),

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

d) Asitik ve bazik formun floresans verimlerine Φ_o ve Φ_o' bağlıdır.

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

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

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

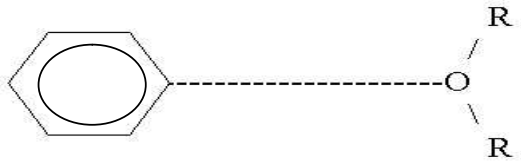
$F = \omega I_o \varepsilon \Phi_o c$

Burada ω: enstrümental sabit c : konsantrasyon

I_o: uyaran ışın şiddeti Φ_o: floresans verimi

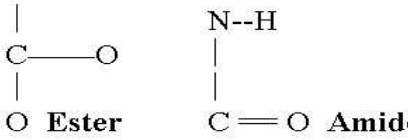
2.3. Lokal Anestezik Maddeler

Lokal anestezikler, sinir dokusuna uygun konsantrasyonda uygulandıklarında sinir iletimini bloke eden ilaçlara denir. Lokal anesteziklerin yarattıkları etkinin tersinir oluşu son derece önemlidir. Bu ilaçlar sinir sisteminin her yerinde ve her tip sinir lifi üzerinde etkili olurlar. İlk olarak keşfedilen lokal anestezik kokaindir, sonrasında benzoik asitin türevleri keşfedilmiştir. Lokal anestezik maddelerin genel yapısı şöyledir:



Aromatik kısmı →Ester ya da Amid → Amin kısmı

Genellikle benzen halkası olan bir lipofilik grup ve bir tersiyer amin olan bir hidrofilik gruptan oluşurlar. Bu iki grup ester veya amid yapıda olan bir ara zincir ile bağlıdır



Lipofilik grup (serbest baz) solüsyonun sinir membranına penetrasyonunu sağlar. Hidrofilik grup (katyonik form) ise farmakolojik olarak aktif olan kısımdır. Sinir hücresi içinde non-iyonize (lipofilik, serbest baz) ve iyonize (hidrofilik, katyonik form) kısım denge haline gelir, iyonize kısım reseptörle etkileşir, farmakolojik olarak aktif olan kısımdır.

Lokal anestezik ilaçlar ara zincirin yapısına göre ester ve amid olarak 2 temel gruba ayrılırlar:

1-Ester grubu lokal anestezikler: Kokain, prokain, klorprokain, tetrakain, benzokain

2-Amid grubu lokal anestezikler: Lidokain, prilokain, mepivakain, bupivakain, dibukain, ropivakain

Lokal anestezik ilacın etki başlama süresinde en önemli faktör ajanın pKa'sıdır. pKa; baz (lipofilik grup) ile katyonik formun (hidrofilik grup) eşit olduğu hidrojen iyon konsantrasyonu (pH) olup her ajan için farklıdır. Lokal anesteziğin pKa'sı ne kadar fizyolojik pH'ya yakınsa etkisi o kadar çabuk başlar. Genellikle lokal anestezik ajanların pKa değerleri 7.5-9 arasında değiştiğinden dokuda (pH 7.4) lokal anestezikler daha çok katyon formunda bulunmaktadır. (Prilokain 7.7, lidokain 7.9, bupivakain 8.1). Lokal anesteziklerin alkali solüsyonları sinir iletimini daha etkin biçimde bloke ederler. Ajanın enjekte edildiği bölgenin pH'sı da bu olayı etkilemektedir. Enfekte bir bölgede pH'nın azaldığı düşünülürse pKa ile aradaki fark artacağından diffüze olabilen miktar azalacaktır.

Lokal anesteziklerin alkali solüsyonları sinir iletimini daha etkin biçimde bloke ederler. Ester türü lokal anesteziklerin pKa değerleri (8.5–8.9), amid türlerine (7.6–8.1) göre daha yüksektir ve fizyolojik pH düzeyinde daha fazla iyonize olurlar.

Lokal anestezik ajanlarda aranan özellikler:

-Düşük yoğunlukta etkin olabilmeli

-Dokulara penetrasyonu iyi olmalı

-Etki başlama zamanı hızlı olmalı

-Etki süresi uzun olmalı

-Düşük sistemik toksititesi olmalı

-İrritan olmamalı

-Etkisi geri döndürülebilmeli

-Kolay sterilize edilebilmeli

Lokal anestezikler etkinlikleri ve etki süreleri yönünden de üç gruba ayrılabilirler:

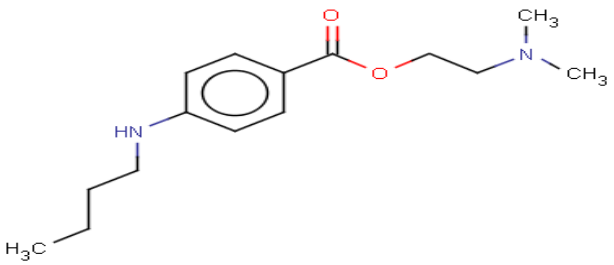
1-Zayıf güçte - Kısa etkili - Procaine (Novokain)

2-Orta etkinlikte - Orta etki süreli - Lidocaine (Aritmal), Prilocaine(Citanest)

3-Güçlü ve uzun etkili - Bupivakain (Marcaine) (Uyar M., 2009)

2.3.1. Tetrakain

Uzun etkili bir amino ester lokal anesteziktir. Metabolizması yavaş olduğundan toksik etkileri fazladır. Uzun etkili anestezi gerektiğinde spinal yolla kullanılır. En sık kullanılan lokal anesteziklerden biridir. (Bökesoy T., 2000)



Bileşiğin Adı- Benzoik Asit, 4-(bütilamino)-,2-(dimetil amino)etil ester
CAS Number - 94246380

2.3.1.1.Tetrakain Hidroklorür

$C_{15}H_{24}N_2O_2.HCl$

Benzoik Asit, 4-(bütilamino)-,2-(dimetil amino)etil ester, monoklorit

MA: 300,82

CAS :136-47-0

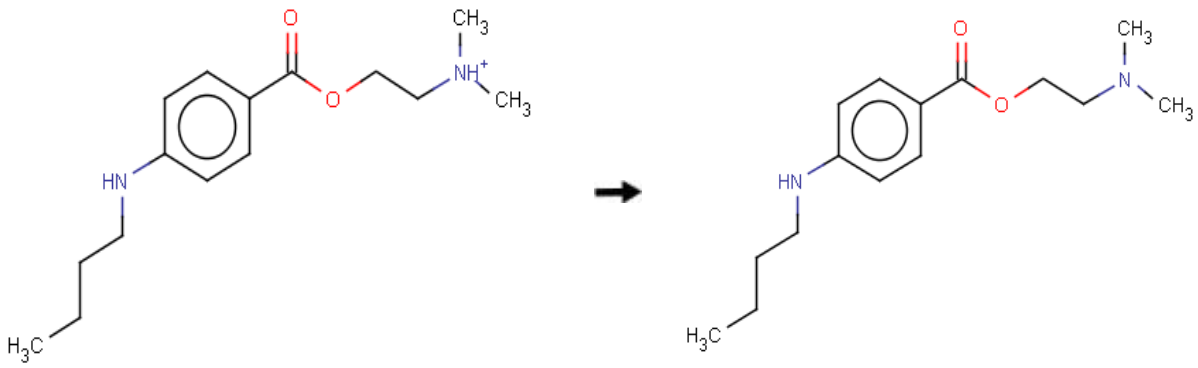
US: Toxic EU: Toxic

Tetrakain hidroklorür 98,5-101,0 oranları arasında $C_{15}H_{24}N_2O_2.HCl$' dan oluşur, susuz bazda hesaplanmıştır. Sıkı bir şekilde koruma altına alınmalıdır, ışık geçirmeyen kaplarda saklanmalıdır.

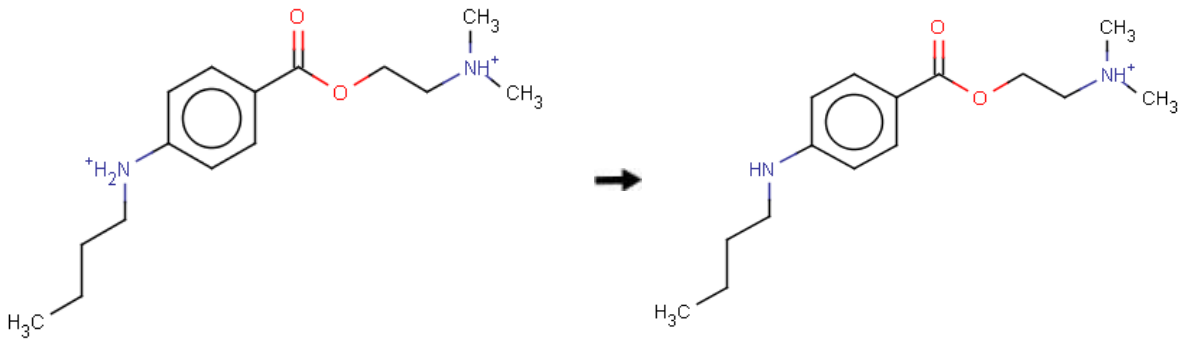
2.3.1.2. Tetrakainin SPARC Programı ile Hesaplanan İyonlaşma Sabitleri

Lokal anestezik maddelerde, molekül yapılarından da görüleceği gibi, protonlanabilen bazik özelliğe sahip fonksiyonlu gruplar bulunmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı da iyonlaşan grubun özelliğine bağlı pKa değerlerine sahiplerdir. Bu bileşiklerin teorik pKa değerleri SPARC (Performs Automated Reasoning in Chemistry) on-line pKa hesaplama programı ile kolaylıkla hesaplanabilmektedir.

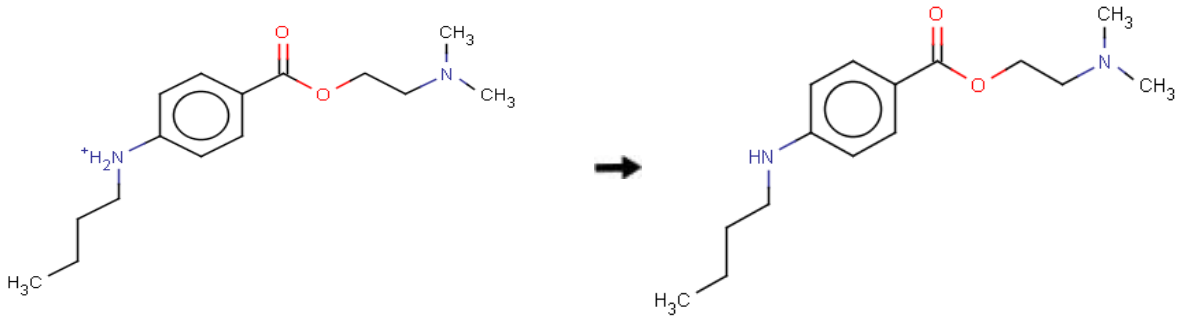
Tetrakainin iyonlaşma dengeleri ve bu dengelerden hesaplanan pKa değerleri;



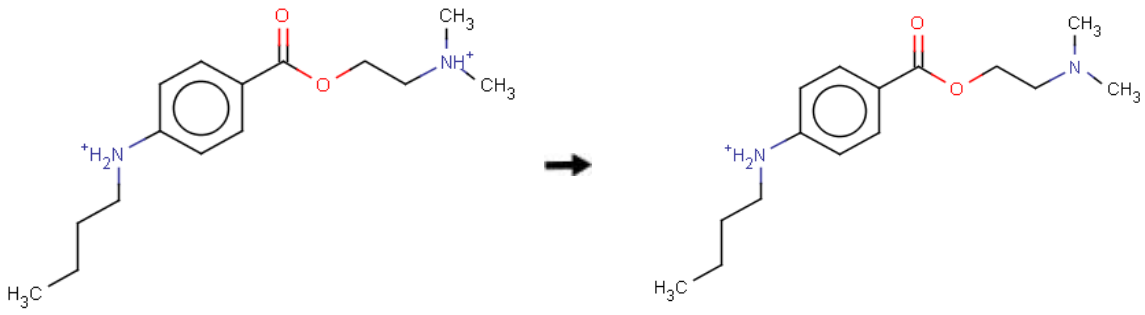
pKa = 8.78



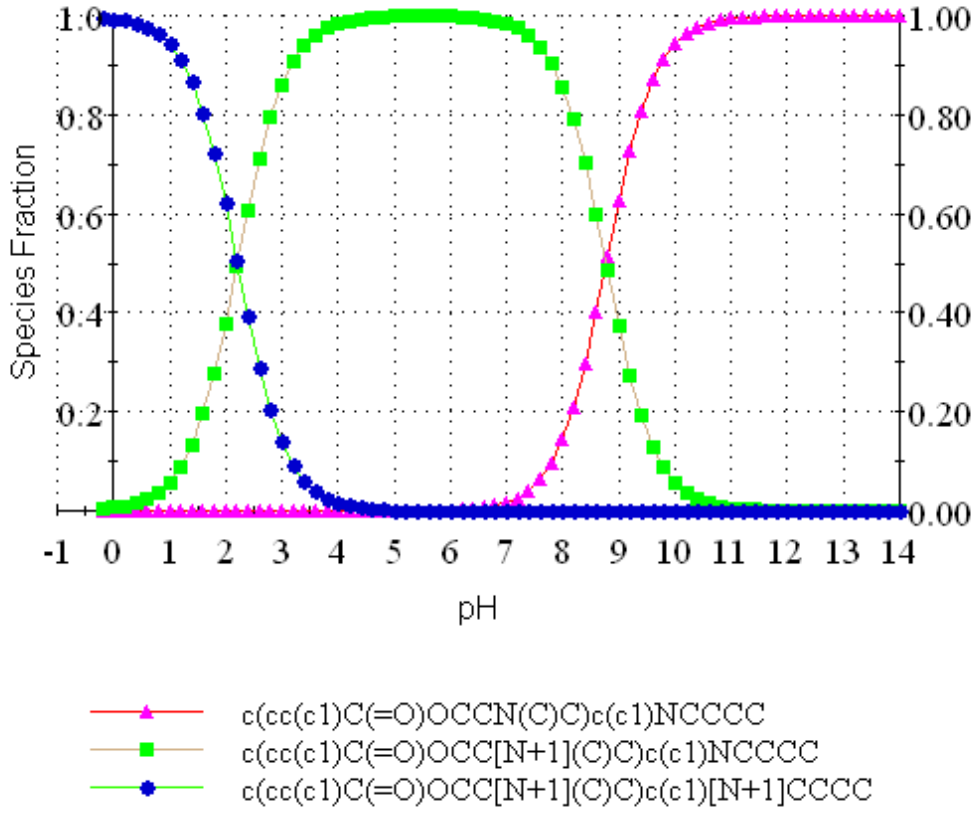
pKa = 2.23



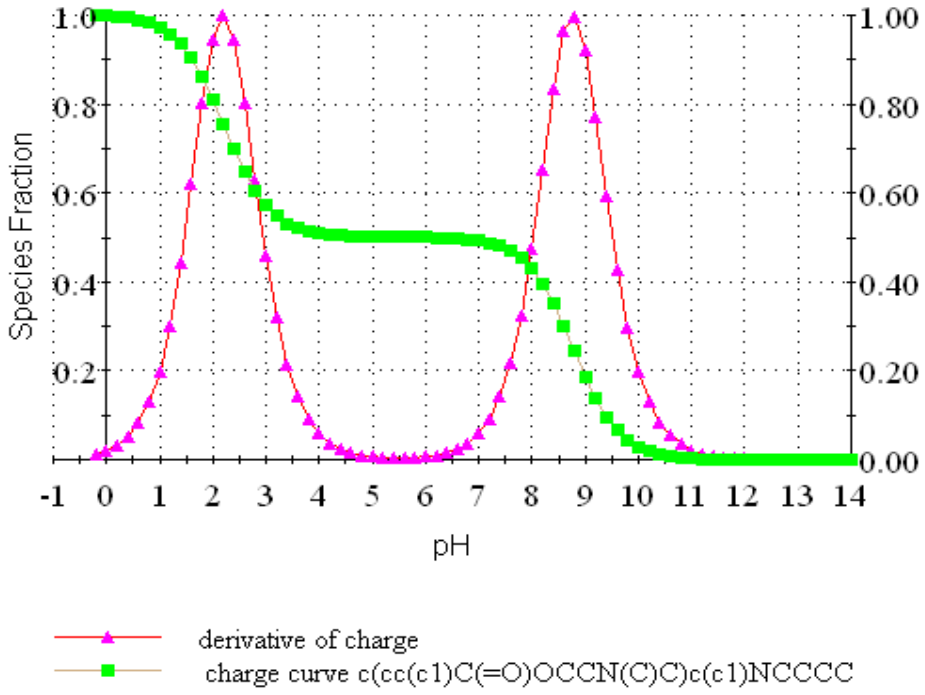
pKa = 2.89



pKa = 8.08

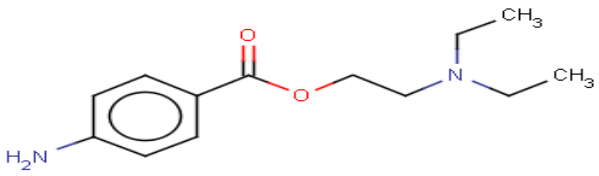


Şekil 2. 11. Tetrakain için α- pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi



Şekil 2. 12. Tetrakain için α- pH ilişkisi ve 2. türev eğrisi

2.3.2. Prokain



Bileşiğin Adı: Benzoik Asit, 4-Amino-,2-(Dietilamino)Etil Ester

CAS Numarası - 59461340

Prokain PABA'nın dietilaminoetanol ile yaptığı esterdir. Hidroklorür tuzunun solüsyonu halinde kullanılır. Prokain sentez edilen ilk lokal anesteziktir. Vücutta, esterazlar tarafından PABA ve dietilaminoetanole hidroliz edilir. Etki gücü fazla olmadığından ve etkisi geç başladığından, daha sonra çıkan amid türevi lokal anestezikler prokainin yerini almışlardır. İnfiltrasyon anestezisi için kullanılır. Toksik etkileri azdır.

2.3.2.1. Prokainamit Hidroklorür

$C_{13}H_{21}N_{3O},ClH$

MA: 271,79

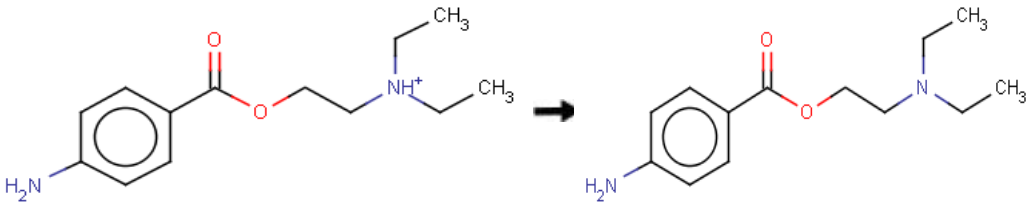
CAS: 614-39-1

US: Tahriş Edici EU: Zararlı

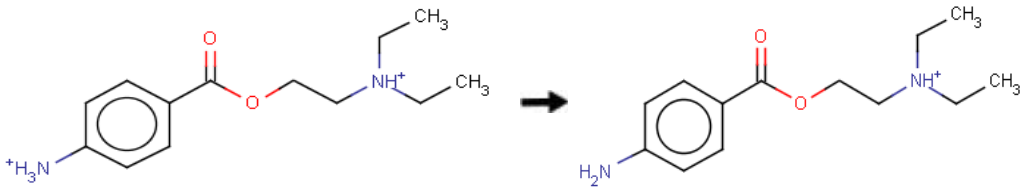
Prokainamit hidroklorür 98.0-101.0 oranları arasında 4-amino-N-[2-(dietilamino)etil]benzamithidroklorid içerir, susuz numune baz alınarak hesaplanmıştır. Beyaz ya da çok açık sarı renkte, kristal yapıda, higroskopik, suda çözülebilir, alkolde çözülebilir, asetonda az çözülebilir ve eterde çözünmez. 166^{o}C ile 170^{o}C arasında erime noktası vardır. Hava geçirmeyen bir kapta saklanmalı, ışıktan korunmalıdır.

2.3.2.2. Prokainin SPARC Programı ile Hesaplanan İyonlaşma Sabitleri

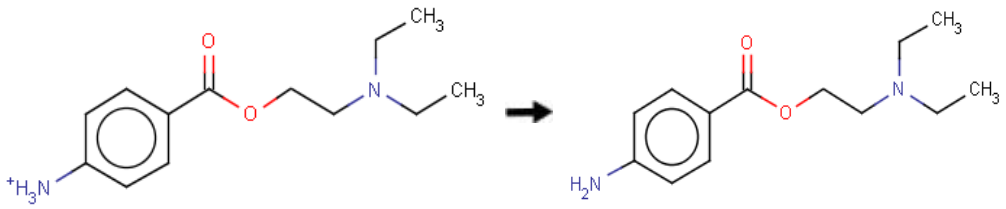
Prokainin iyonlaşma dengeleri ve bu dengelerden hesaplanan pKa değerleri;



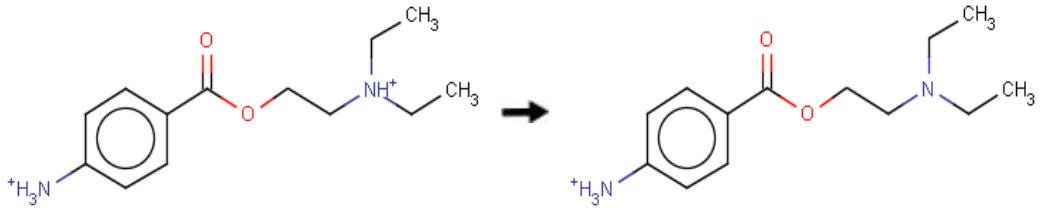
pKa = 8.84



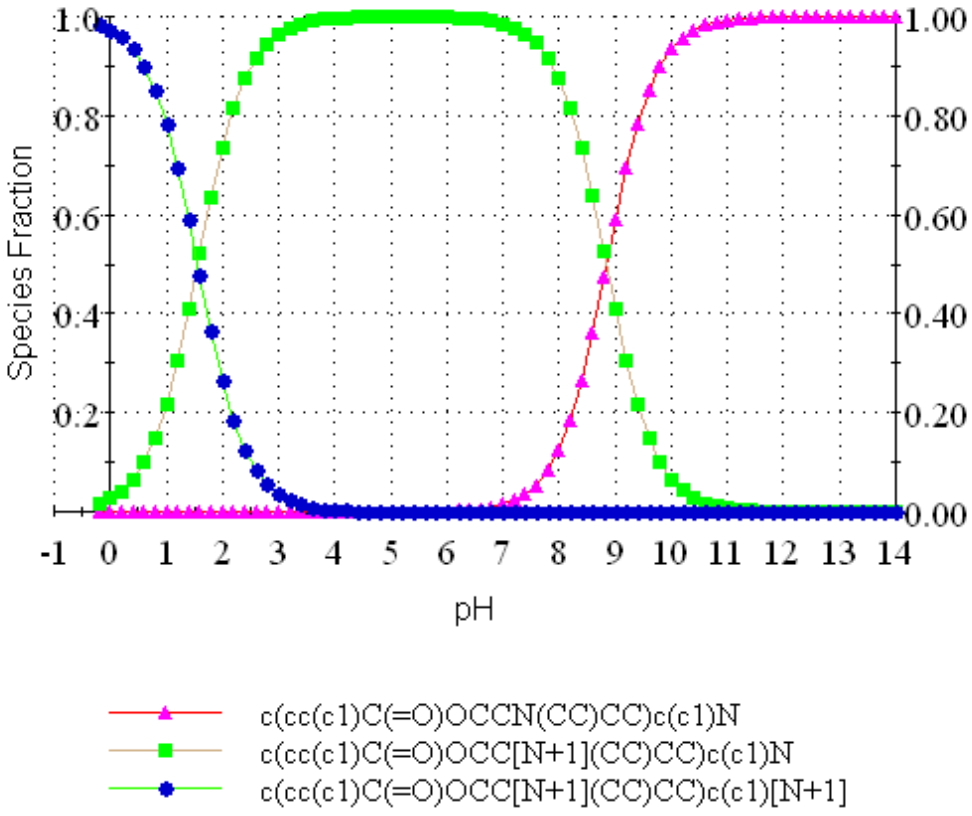
pKa = 1.58



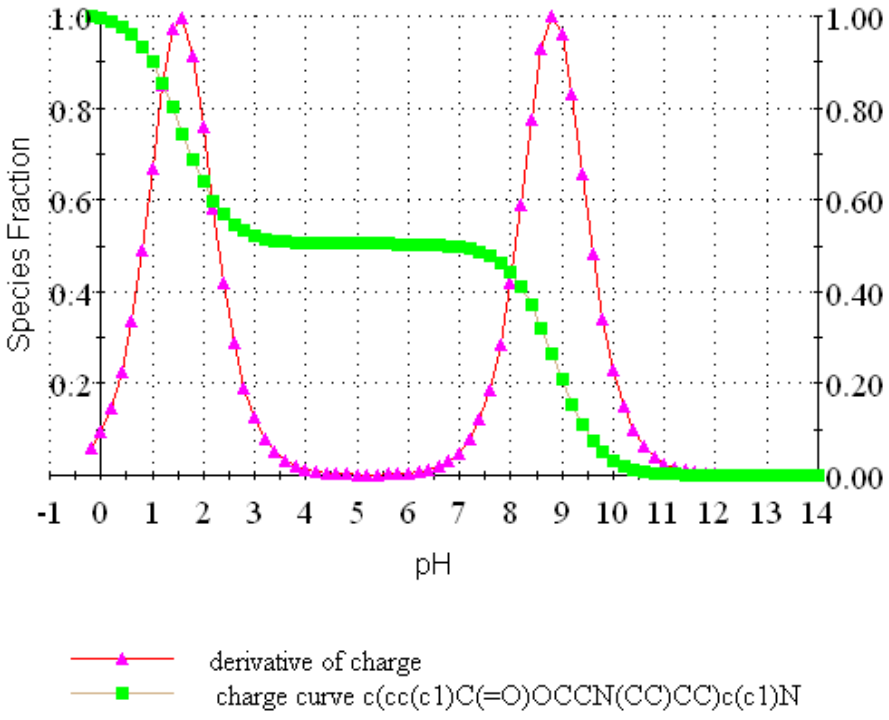
pKa = 2.24



pKa = 8.15

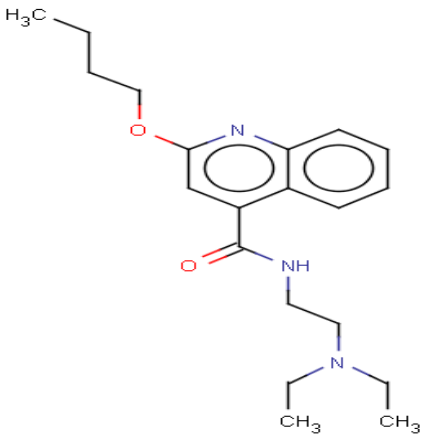


Şekil 2. 13. Prokain için α- pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi



Şekil 2. 14. Prokain için α- pH ilişkisi ve 2. türev eğrisi

2.3.3. Dibukain



Bileşiğin Adı - Dibukain

CAS:85-79-0

$C_{20}H_{29}N_3O_2$

MA: 343,5

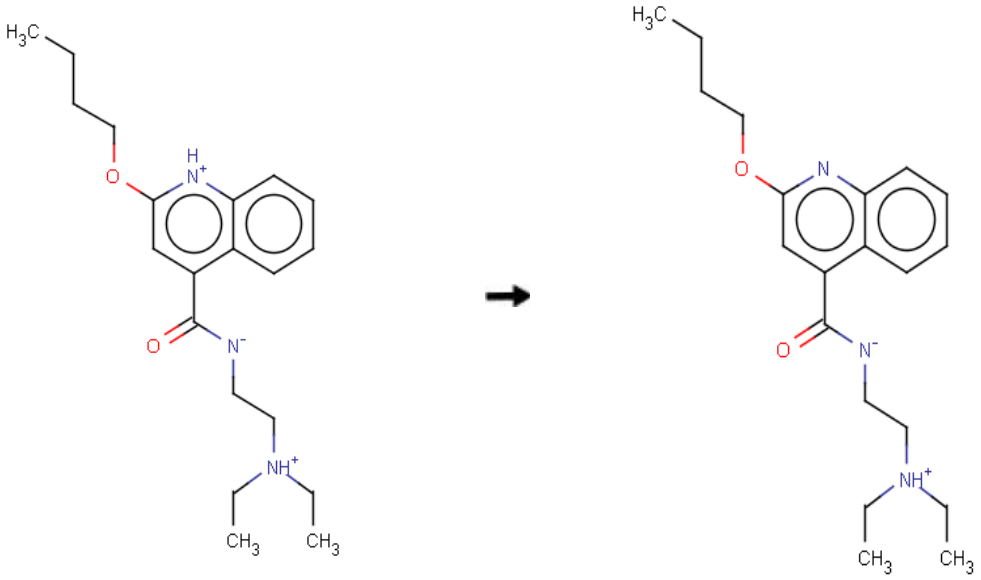
EC: 201-632-1 WGK: 3

US: Toxic EU: Zararlı

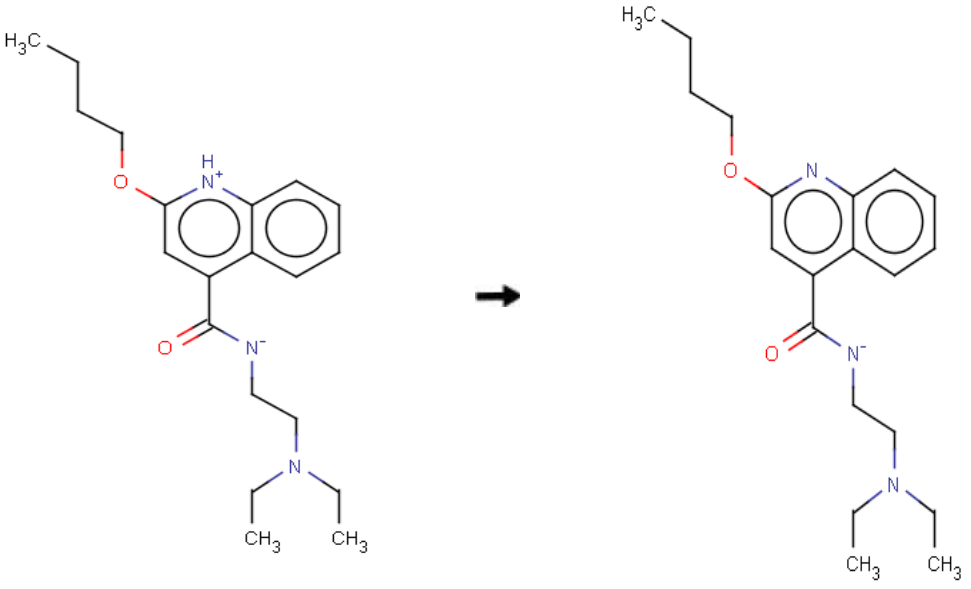
Sadece topikal uygulamada kullanılırlar. Krem veya solüsyonlar şeklindeki formülasyonları cilde ve mukoz membranlara topikal olarak uygulanır.

2.3.3.2. Dibukainin SPARC Programı ile Hesaplanan İyonlaşma Sabitleri

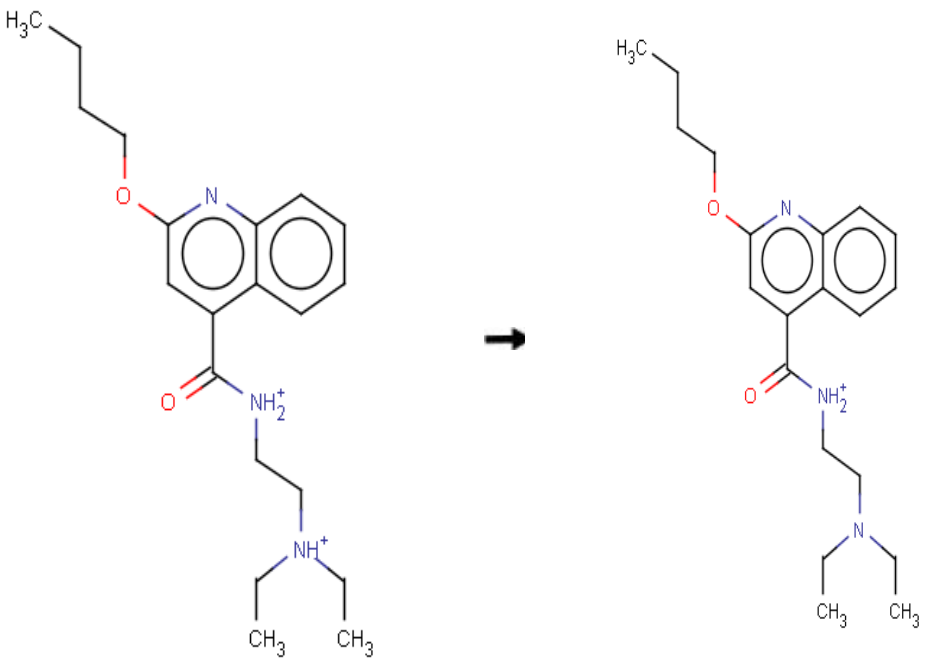
Prokainin iyonlaşma dengeleri ve bu dengelerden hesaplanan pKa değerleri;



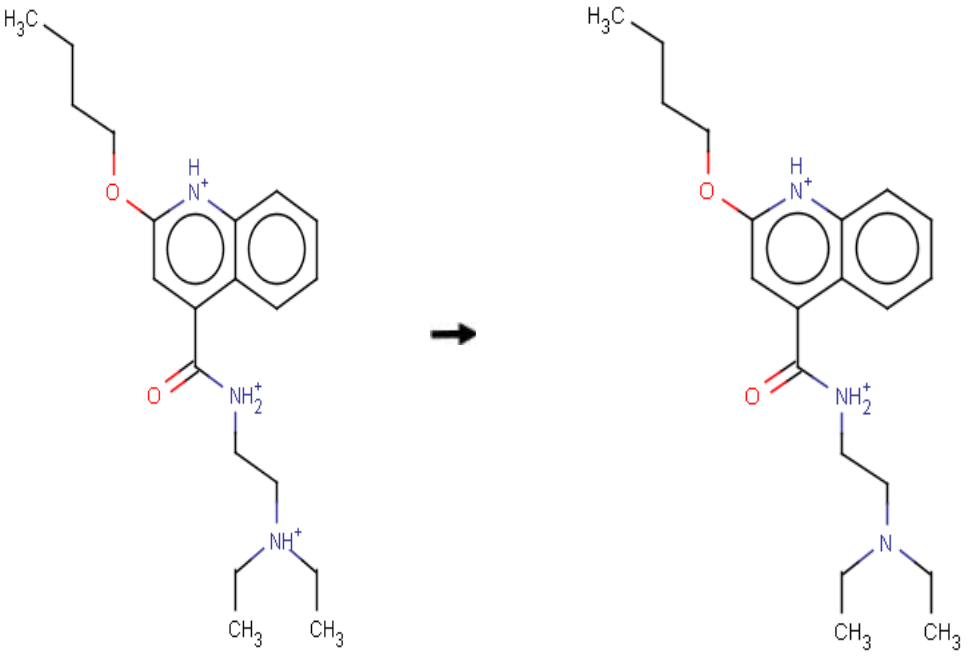
pKa = 3.35



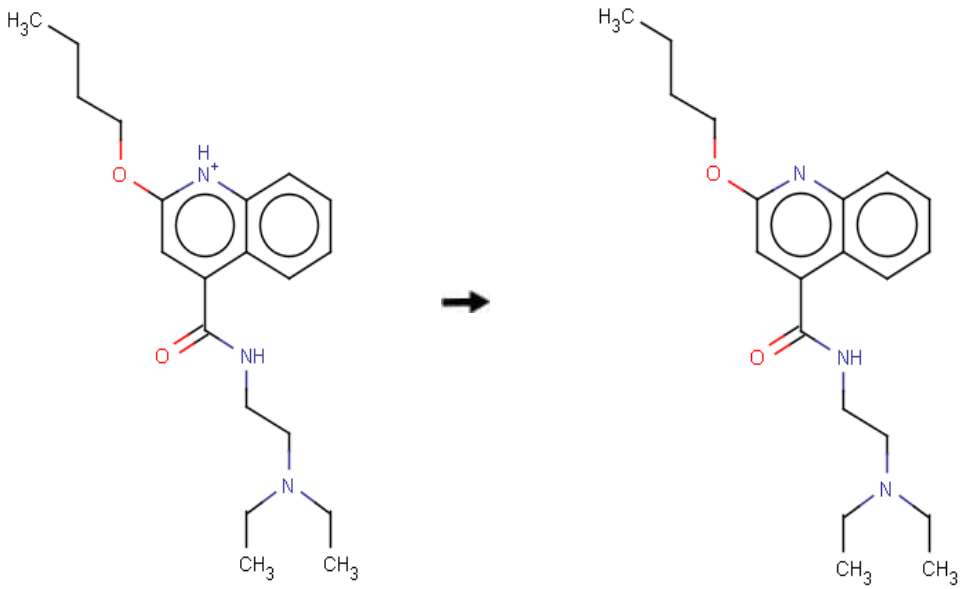
pKa = 4.37



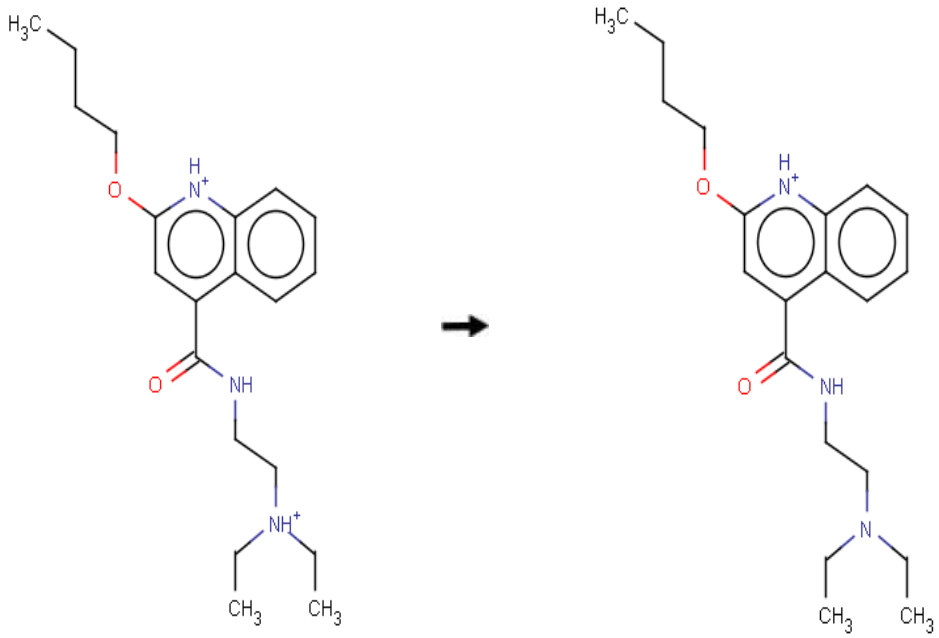
pKa = 6.43



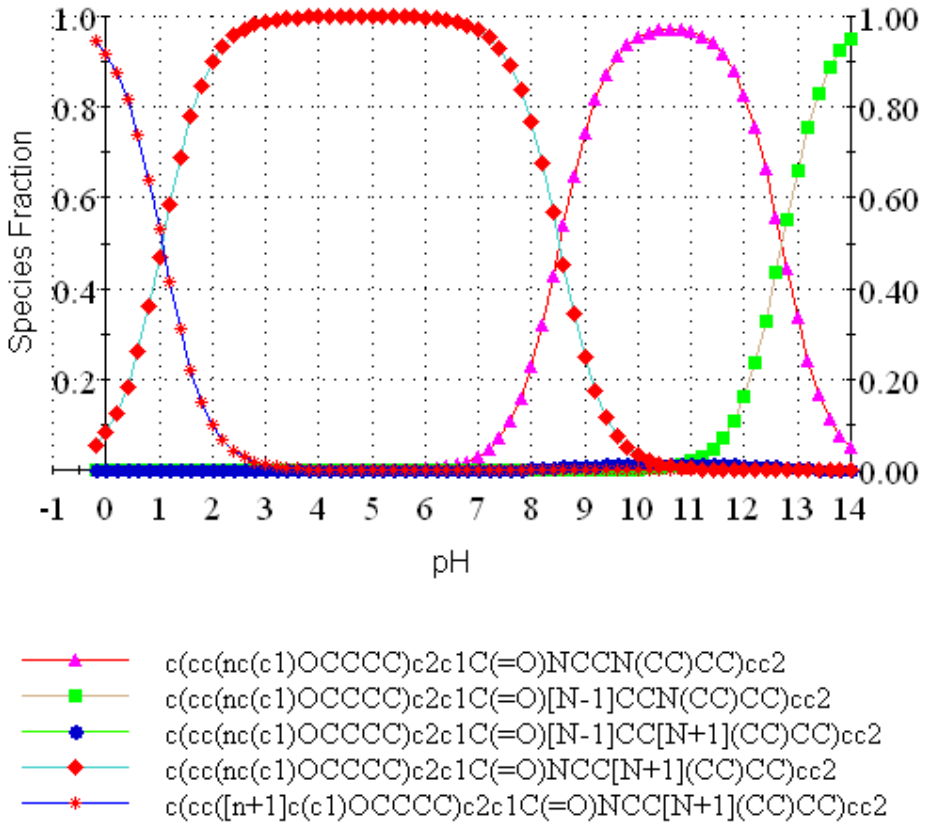
pKa = 4.94



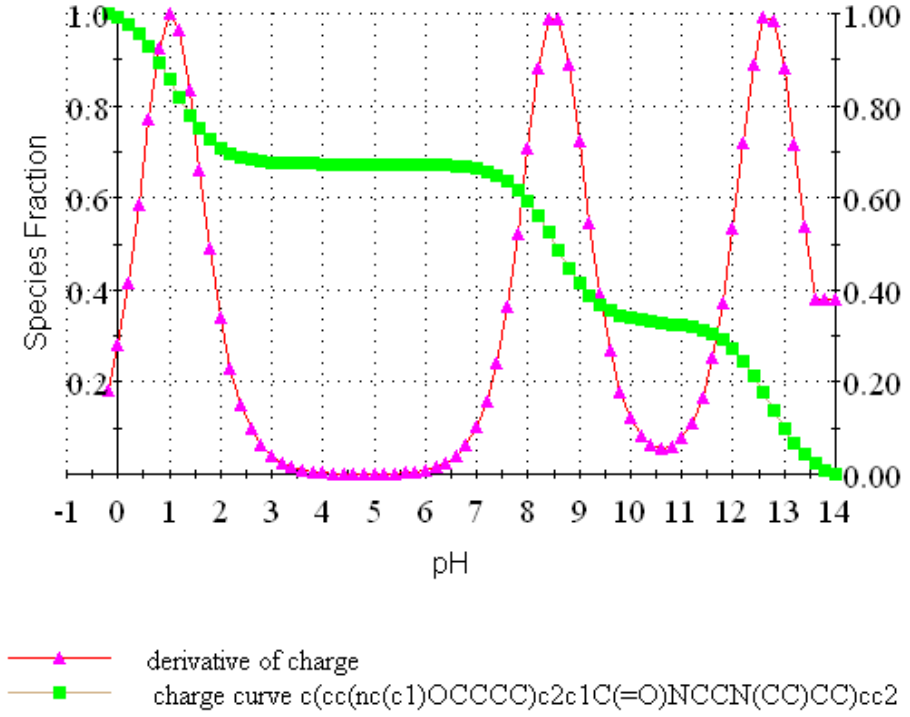
pKa = 2.24



pKa = 7.04



Şekil 2. 15. Dibukain için α- pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi



Şekil 2. 16. Dibukain için α- pH ilişkisi ve 2. türev eğrisi

3. Literatür Özeti

N. Şanlı ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları " Çileklerde Polifenolik Asitlerin Ayrımının Optimizasyonu, Kromatografik Alıkonması ve pKa Değerlerinin Hesaplanması" başlıklı çalışmada, polifenolik asitlerin biyolojik özelliklerinden dolayı son yıllarda büyük ilgi çeken bileşiklerin kompleks grupları oldukları ifade edilmiştir. Bu çalışmada, organik modifiyerin (dönüştürücü) ve hareketli faz olarak kullanılan asetonitril-su karışımlarının pH'ı, bir seri polifenolik bileşiği ayırmak için optimize edilmiştir. Tek çözücü polarite parametresine dayalı formüle edilmiş lineer solvatasyon (çözücü molekülleriyle sarılma) enerjisi, ETN, bağıntısı eluentteki (yıkayıcı çözücü) asetonitrilin yüzdesinin bir fonksiyonu olarak kromatografik davranışlarını tahmin etmek için kullanılmıştır. Ayrıca, alıkonma ve su-organik hareketli fazın pH'ı arasında kurulan korelasyon (ilişki), hareketli fazın pH'ını optimize etmek için kullanılmıştır. Optimize edilen hareketli faz, asetonitril ve pH 4,25'e ayarlanmış formik asitten oluşturulmuş %12'lik (v/v) asetonitrildir. Aynı zamanda, asetonitril-su karışımlarındaki polifenolik asitlerin pKa değerleri kromatografik veriler kullanılarak tayin edilmiş ve optimize edilen koşulları onaylamak için, bir seri polifenolik bileşik çileklerde çalışılmıştır. (Şanlı N. ve ark., 2002)

J. L. Beltrán ve arkadaşlarının 2003 yılında yaptıkları "Suda ve Asetonitril-Su Ortamında Polifenolik Asitlerin Spektrofotometrik, Potansiyometrik ve Kromatografik pKa Değerleri" başlıklı çalışmada, dokuz polifenolik asit maddesinin pKa değeri suda ve asetonitril-su karışımlarında, potansiyometrik, spektrofotometrik ve sıvı kromatografik (LC) ölçümler kullanılarak tayin edilmiştir. Aynı zamanda, daha önce elde edilen kromatografik piklerin maksimumundaki absorbans piklerine dayalı yeni bir metot uygulanmıştır. Bu metodun LC-UV (diode array dedeksiyon (DAD))' den elde edilen verilere uygulanabileceği ve LC ve spektrofotometrik metotların, saf olmayan örneklerle çalışma olasılığı gibi, bütün avantajlarını muhafaza ettiği ifade edilmiştir. Sonuç olarak, dokuz polifenolik asitin pKa değerlerinin tayini için farklı metotların avantajları, suda ve asetonitril-su ortamlarında önerilen metotların uygulanabilirliğini doğrulamak için anlatılmıştır. (Beltran J. L. ve ark., 2003)

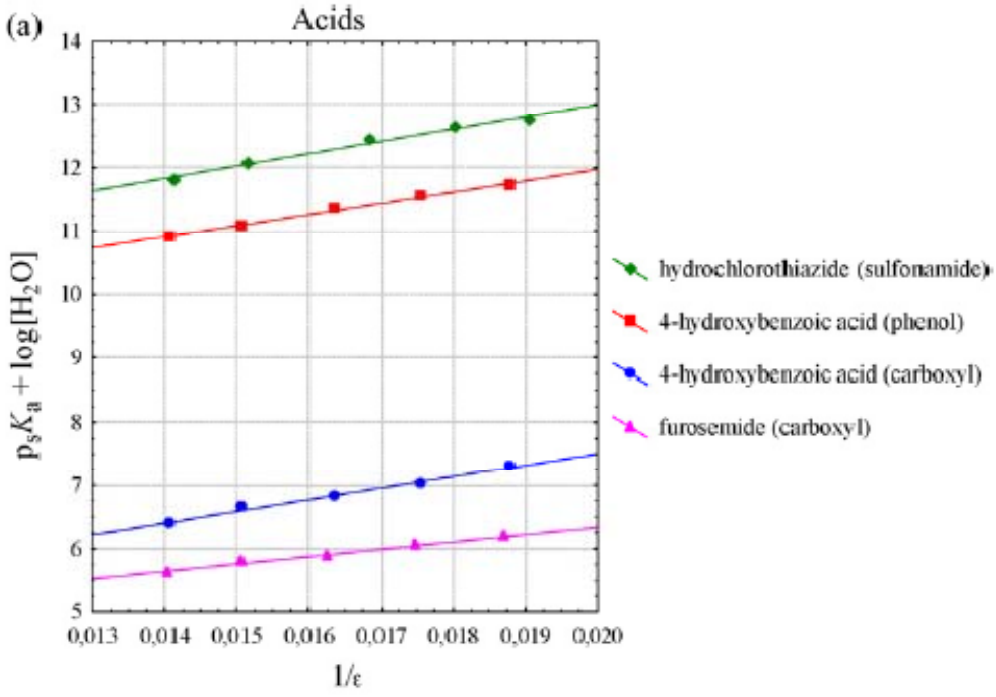
N. Şanlı ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları "Polifenolik Asitlerin Sıvı Kromatografisinde Alıkonmaları Modellenerek Çözücü Bileşimi ve Hareketli Fazın pH'nın Tahmini" başlıklı çalışmada, , bir seri polifenolik asidin alıkonma davranışı, bu bileşikler arasındaki kromatografik rezolüsyonu (ayırımsal çözünürlük) optimize etmek

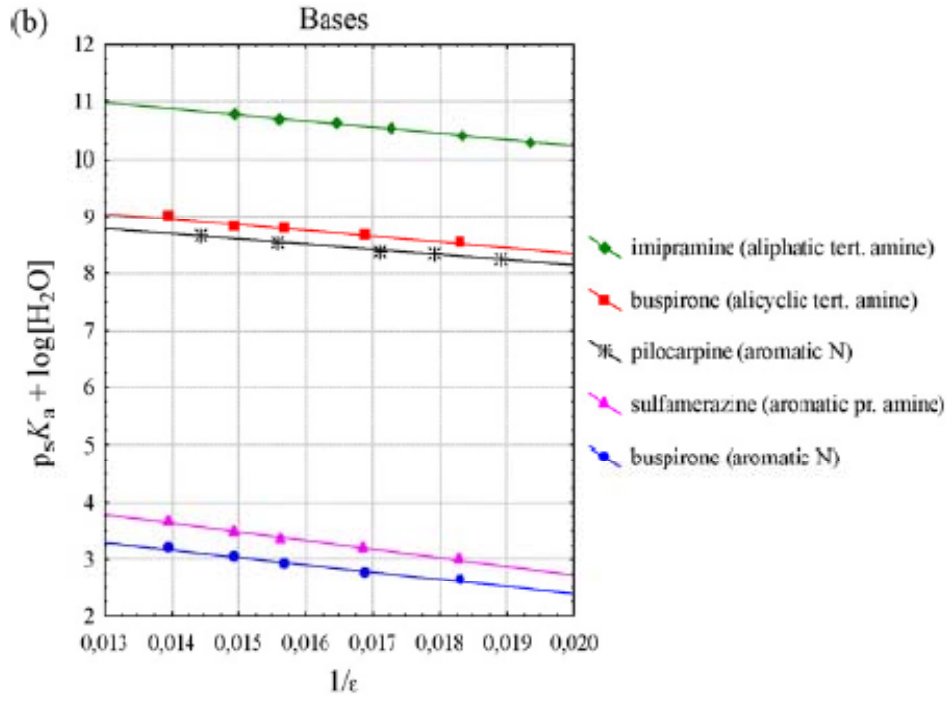
için su-asetonitril hareketli fazlarında modellenmiştir. Alıkonma modelinin, pH ile çözünenlerin alıkonma faktörleri ve hareketli fazın solvatokromik parametresi (ETN) arasındaki ve bileşiklerin çözünürlük çarpımları ve organik modifiyerin (değiştiricinin) mol kesri (fraksiyonu) arasındaki bağıntıya dayandığı ifade edilmiştir. Bu iyonlaşabilen bileşiklerin alıkonması, 3,5–7,0 arasında değişen altı farklı pH'da ve üç farklı asetonitril yüzdesinde (%10, 20 ve 30) çalışılmıştır. Çalışmada, üç farklı uydurma (tasarlanmış, kurgulanmış) işlem uygulanmıştır: model I, bütün veri noktaları için doğrusal olmayan bir regresyon içerir, hâlbuki model II ve III sırasıyla yalnızca aşırı pH / ETN değerlerinden alınan dört ve iki veri noktası kullanır. Bu modellerden elde edilen sonuçlar, model I için yaklaşık % 5 ve model II ve III için de yaklaşık % 10 hata ile her bir bileşik için gerçek ve tahmini alıkonma faktörleri iyi bir uyuşum göstermiştir. Bağıl olarak geniş bir pH ve asetonitril aralıklarının yüzdesinde alıkonma davranışını anlatmak üzere, her bir bileşik için yalnızca iki deneye ihtiyaç duyulduğundan dolayı model III'ün sonuçlarının özel ilgiye sahip olduğu; bunun özellikle de çeşitli bileşiğin kromatografik ayırımı için hareketli fazın optimizasyonunda değerli olduğu belirtilmiştir. (Şanlı N. ve ark., 2005)

X. Subirats ve arkadaşlarının 2006 yılında yaptıkları "HPLC'de İyonlaşabilen Bileşiklerin Alıkonması-XVI. Sulu Tampon pH'sı ve Analit pKa' sından Asetonitril / Su Hareketli Fazlarla Alıkonmanın Hesaplanması" başlıklı çalışmada, pH, hareketli fazda ölçüldüğü zaman, asit-baz analitler için pH'nın bir fonksiyonu olarak elde edilen alıkonma zamanının, farklı ortam tamponları kullanıldığında, pH'nın, sulu tamponda ölçüldüğü zamankinden çok daha uygun olduğu gösterilmiştir. Bununla birlikte, bazı örneklerde organik modifiyerin (dönüştürücü) ilavesinden önce sulu tamponda pH ölçmek için çok daha pratik olabilir. Böylece, sulu tamponda ölçülen pH'dan asit-baz analitlerin kromatografik alıkonmalarının tahminine imkan sağlayan açık bir metodoloji sunulmuştur. Bu modelin, sudaki pH ve pKa değerlerinden, belirli bir asetonitril/su harekatli fazında, tamponun pH'sı ve analitin pKa'sının hesaplarını sunduğu ifade edilmiştir. Analitin alıkonmasının, çözünenin pKa'sına yakın bir tampon pH'sında, bu değerlerden ve analitin saf asidik ve bazik şekillerinin (formlarının) alıkonmasından kolaylıkla hesaplanabileceği belirtilmiştir. Çoğu örnekte, sudaki analit pKa değerleri bilinmediği için, metodoloji, birçok kimyacını erişebileceği, kimyasal yapıdan analit pKa değerlerini hesaplayan, internet software yazılımı kullanılarak da test edilmiştir. Yaklaşım bazı farmasotik ilaçlar için başarıyla test edilmiştir. (Sübirats X. ve ark.,

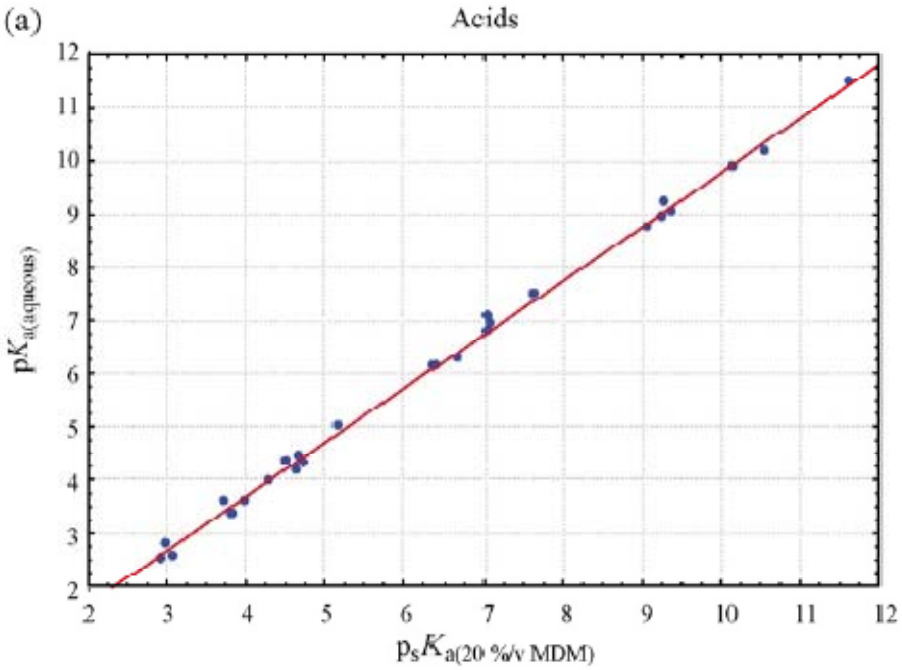
2006)

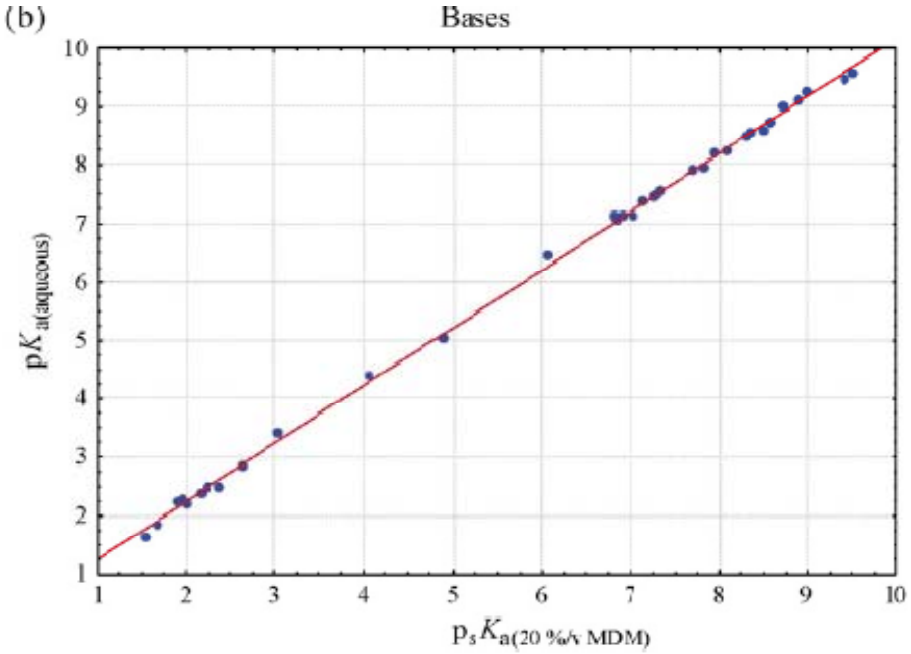
G. Völgyi ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları "Suda Çözünmeyen Bileşiklerin Potansiyometrik ve Spektrofotometrik pKa Tayini: Yeni Bir Ortak Çözücü Sisteminde Onaylama Çalışması" başlıklı çalışmada, MDM-su karışımlarında pKa tayinini doğrulaması yapılmaya çalışılmıştır. MDM-su karışımı, suda az çözünen bileşiklerin geniş bir aralığını çözen, yeni birçok bileşenli ortak çözücü karışımıdır (organik çözücüler olarak, metanol, dioksan ve asetonitrilin eşit hacimlerini içerir). Kimyasal olarak farklı 50 bileşiğin ortak çözücü disosyasyon (ayrıştırma) sabitleri (pKa), potansiyometrik ve spektrofotometrik titrasyon ile ağırlıkça % 15-56'lık MDM-su karışımlarında ölçülmüş ve sudaki pKa değerleri ekstrapolasyon ile elde edilmiştir. Üç farklı ekstrapolasyon işlemi, suda çözünebilen 30 bileşiğin bir alt takımı kullanılarak MDM-su karışımında en iyi ekstrapolasyonunu seçmek için karşılaştırılmıştır. Ektrapole edilmiş sonuçların, sulu ortamda ölçülen pKa değerleriyle iyi uyuşum içinde olduğu ifade edilmiştir. Bu ekstrapolasyon işlemleri arasında önemli bir fark olmadığı, böylece geniş şekilde kullanılan Yasuda-Shedlovsky çiziminin (plot) MDM ortak çözücü için de önerilebileceği belirtilmiştir. Ayrıca, genel kalibrasyon eşitliği kullanarak hacimce %20 MDM-karışım içinde ölçüme dayalı tek nokta hesaplamasının, ilaç araştırmasının erken döneminde hızlı pKa tayini için uygun olabileceği ifade edilmektedir. Aşağıda bu literatürden alınmış bir takım grafikler gösterilmiştir. (Völgyi G. ve ark., 2007)





Şekil 3. 1. a) Yasuda Shedlovsky yönteminde bazı asidik fonksiyonel gruplar b) Yasuda Shedlovsky yönteminde bazı bazik fonksiyonel gruplar





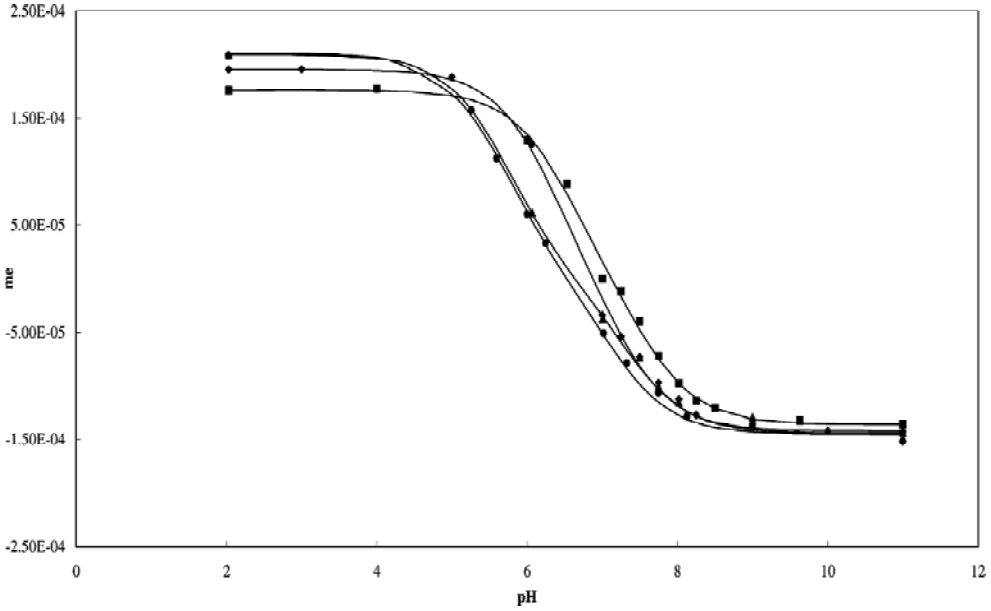
Şekil 3. 2. a ve b çözeltilerin pK_a değerleri ile asitlerin ve bazlar için %20 MDM su karışımlarının psK_a değerleri arasındaki lineer ilişkiyi göstermektedir.

F. Z. Erdemgil ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları "LC Metodoloji Ve Potansiyometriyle Metanol-Su İkili Karışımlarında Bazı Hidroksillenmiş Benzoik Asitlerin pKa Değerlerinin Tayini" başlıklı çalışmada, metanol-su ikili karışımlarında pKa değerlerinin doğru hesaplanmasının, bu çözücü karışımlarının kullanıldığı sıvı kromatografisi ve kapiler elektroforez gibi birkaç ayırma tekniği için çok önemli olduğu ifade edilmiştir. Bu çalışmada, 11 tane polifenolik asidin pKa değerleri, potansiyometri, sıvı kromatografisi (LC) ve LC-DAD metodoloji yöntemleriyle metanol-su ikili karışımlarında (%10, %20 ve %30 (v/v)) tayin edilmiştir. Aynı zamanda, pKa değerleri ve metanolün mol fraksiyonu arasında elde edilen lineer bir bağıntı sağlayan organik modifiyerin (değiştiricinin) derişiminin artmasıyla arttıkları için, sonuçların bütün çalışılan bileşiklerin pKa değerleriyle benzer eğilim gösterdikleri belirtilmiştir. Sulu ortamda elde edilen pKa değerleri, literatürde verilenlerle ve on-line pKa hesaplayıcısı SPARC ile hesaplanan değerlerle de karşılaştırılmıştır. Elde edilen veriler, pKa değerleri ve karışımlardaki organik ortak çözücü fraksiyonu arasındaki bağıntıdan metanol-su ortamındaki dissosyasyon (ayrışma) sabitlerinin hesaplamasının yapılabilirliğini test etmek için kullanılmıştır. (Erdemgil F. Z., ve ark., 2007)

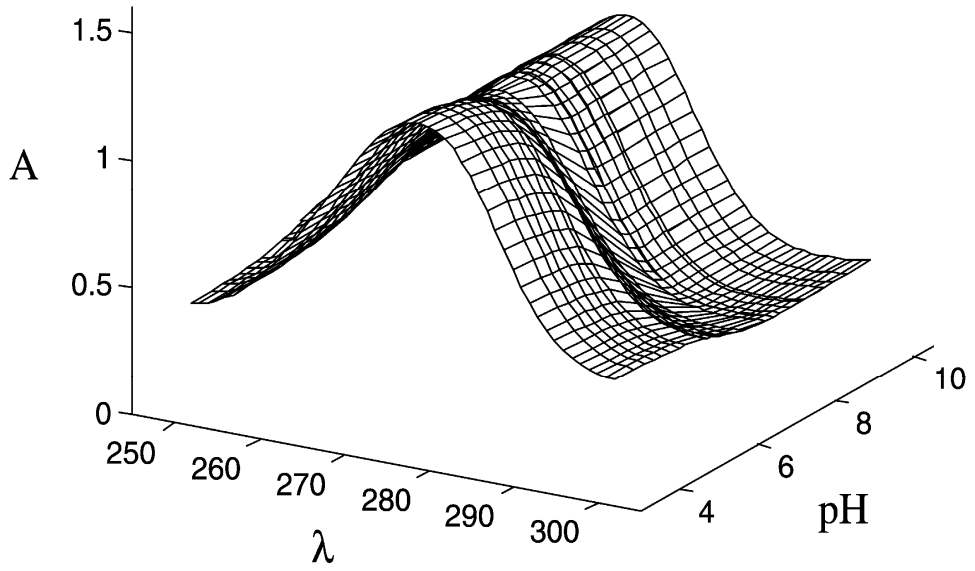
Wan H. ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları " Kısa-son Enjeksiyon ile Birleştirilmiş Basınç-destekli Kapiler Elektroforezle İlaçların pKa Değerlerinin Hızlı Görüntülenmesi" başlıklı çalışmada, kısa-son enjeksiyon ile birleştirilmiş basınç-destekli kapiler elektroforez uygulanarak bir yöntem, ilaçların pKa değerlerinin hızlı görüntülenmesi için geliştirilmiştir. Elektroforetik ayırma, uygulanan basınç altında kısa-son enjeksiyon ile kısa bir kapiler uzunluğunda yapılmıştır ve etkin hareketlilik, sabit iyonik şiddetle (I = 50.05) 10 farklı tamponun bir serisinde ölçülmüştür. Basınç uygulanmasının yalnızca, göç zamanını özellikle daha düşük pH tamponlarında azaltmadığı, aynı zamanda etkin hareketlilik ölçümlerinin tekrarlanabilirliğini düzelttiği belirtilmiştir. Etkin hareketlilik üzerine basıncın etkisi çeşitli pH değerlerinde incelenmiştir. İlk önce pH asidik analitler için pK'nın üzerinde olduğunda, basınçtaki bir artışı etkin hareketlilik üzerinde az bir azalmaya sebep olduğu, ayrıca pH pK'nın altındayken basıncın arttırılmasıyla etkin hareketlilik artışı gözlenmiştir. Bununla birlikte, basınç uygulamasıyla gözlenen etkin hareketlilik kaymasının, pKa değerlerinin tayininde önemli ölçüde etkin olmadığı ifade edilmektedir. Tayin edilen pKa değerlerinin, yayınlanan verilerle iyi bir uyum içinde olduğu belirtilmiştir. Ayrıca bir yığma (istif) koşulu, duyarlılığı arttırmak için uygulanmış ve iç çapı 50 μm olan bir kapiler kullanarak UV dedeksiyonu ile 2 μM'ın altındaki derişim kolaylıkla saptanabilmiştir. Bu teknik, özellikle suda az çözünen bileşiklerin pKa değerlerinin ölçülmesi için uygundur. Yöntem, genel olarak kullanılan sodyum hidroksit ve suyla ön şartlandırma basamaklarını da yapmamaktadır (ihmal etmektedir). Aşırı ön şartlandırma basamaklarının dışlanması ve basınç kullanımı toplam çevrimsel analiz süresini azaltır ve doğruluğu kaybetmeksizin bileşik başına 40 dakikadan az bir sürede pKa tayinini mümkün kılar. (Wan H. ve ark., 2002)

J.Barbosa ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları "Asetonitril-Su Karışımlarında Zwitterionic İlaçların pKa Değerlerinin Belirlenmesinde Kapiler Eloktroforez, Sıvı Kromatografisi, Potansiyometrik ve Spektrofotometrik Teknikler Kullanılarak Birbirleriyle Karşılaştırılması " adlı çalışmada, kapiler elektroforez, sıvı kromatografisi, potansiyometri ve UV-visible spektrofotometreleri sık sık maddelerin pKa değerlerinin tespitinde kullanıldıklarından, bu çalışmada asetonitril - su karışımlarında bir dizi zwitterionic quinolanesinin pKa değerlerinin belirlenmesinde farklı teknikleri uygulayarak karşılaştırmalar yaptıklarından bahsetmişlerdir. Sulu ortam ve su -organik ortamlarında büyük oranda ilaçlar kullanmışlardır. Denge sabitlerinin belirlenmesinde

kapiler elektroforezin avantajları vurgulanmıştır. (Barbosa J. ve ark., 2001)



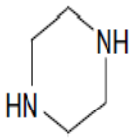
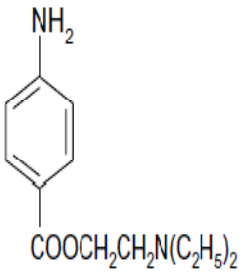
Şekil 3. 3. Suda çeşitli yüzdelerde çalışılan MeCN'de Difloksasin'nin deneysel ve teorik pH karşılaştırması

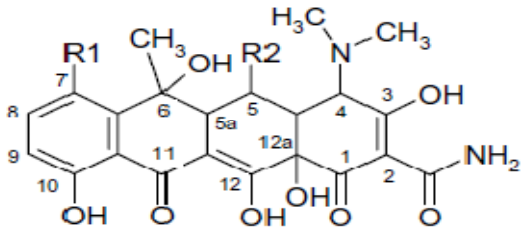


Şekil 3. 4. Enfloksasin'nin suda pH ve λ 'a karşılık deneysel absorbans değerleri

Sandra Babic ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları "Aktif Farmasötik Maddelerin pKa Değerlerinin Belirlenmesi" başlıklı çalışmada iyonlaşma sabitleri maddelerin çalışma alanlarının belirlenmesinde ve maddelerle yapılacak geniş uygulamalarda önemli olan fizikokimyasal parametreler oldukları, asit ayrıştırma

sabitlerinin tayini için, ilaç aktif maddelerinin ve pKa değerlerinin belirlenmesi özel bir vurgu ile yayınlanan yöntemle gözden geçirilmiştir. Aşağıda bu literatürden alınmış bazı maddelerle ilgili bilgiler gösterilmiştir. (Babic S. ve ark., 2007)

Bileşiğin adı	Kimyasal yapı	pK_a	Metot
Piperazine		5.33; 9.73 9.71 3.23 ± 0.30; 6.76 ± 0.12 9.70	CE Potentiometry (acetonitrile-water) Potentiometry Calculated (SPARC)
Procaine		2.28 ± 0.08; 9.02 ± 0.01 8.84 2.24; 8.84	UV/pH titration CE Calculated (SPARC)

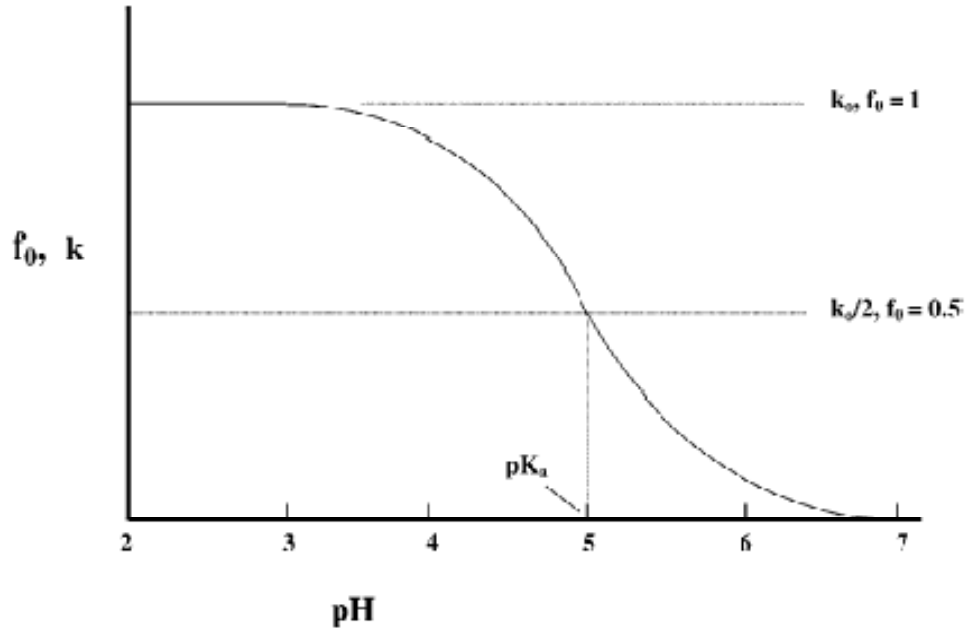


Şekil 3. 5. Tetracylinin Yapısı

Christa A.Currie ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları " pKa Değerlerinin Kapiler Elektroforez ve Dolaylı Floresans Algılama Mikroçip Kullanılarak Belirlenmesi" adlı çalışmada, mikroçip kapiler elektroforez (CE), dolaylı floresan algılama ile birleştirilerek floresans olmayan bileşiklerde pKa değerlerini belirlemek amacıyla kullanılmıştır. CE yöntemi, çalışılan tamponun bir pH fonksiyonu olarak analitin elektroforetik hareketlilik farklılıklarına dayanmaktadır. İçerisinde farmatik olarak pKa değerleri 10,3 ile 4,6 arasında olan maddeler içeren dokuz tane bileşikte test edilmiştir. Literatür değerleri 0,2'den farklı olmayan tüm metotlarda denenmiştir. Tek şeritli çip pKa değerleri için uygun bir yöntem olarak görülmüştür. Ancak, pratik olarak kullanılmak üzere verimlilik artışı sağlamak için bir multilane çip kullanılması gerektiği söylenmiştir. (Christa Currie A. ve ark., 2005)

Bileşik	Literatür pKa	Mikroçip pKa	Fark
Sulfanilamide	10.31[a]	10.48	0.17
Ethosuximide	9.50[b]	9.52	0.02
Uracil	9.20[c]	9.19	−0.01
Procaine HCl	8.80[b]	8.84	0.04
Ranitidine	8.40[c]	8.54	0.14
Prilocaine HCl	7.90[b]	8.12	0.22
2,4,6-Collidine	7.33[c]	7.36	0.03
Cimetidine	6.73[c]	6.73	0.00
Aniline	4.61[a]	4.54	−0.07

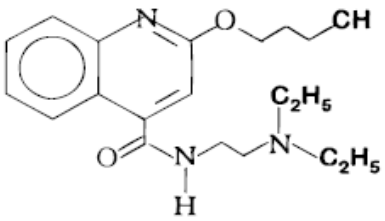
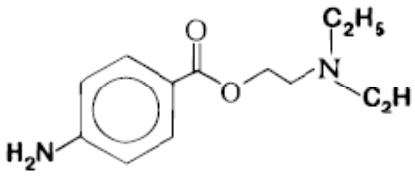
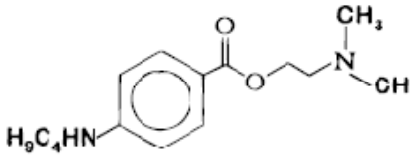
Roman Kaliszan ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları "Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi ile Lipofiliklik ve pKa Belirlenmesi" adlı çalışmada elüsyon eğimlerinin lineer çözücü kuvvet modeli ile lipofiliklik parametreleri belirlenmeye ve örnek kimyasalların, bir dizi ilaçların asitlik sabitleri tespit edilmeye çalışılmıştır. Kesin pKa değerleri ve $\log k_w$ değerleri 2-3 kez denenmiştir. İlk deneyde (ya da bir iki deneyde) analitin iyonlaşmasının pH ile değiştiği geniş oranda organik modifiyerler kullanılarak tespit edilmiştir. Bu deneyin sonucunda; mobil fazın (%B) organik modifiyerlerin miktarını tespit edilmesini sağlamıştır. İyonize olmayan analitlerde k katsayı oranı belirlenmiştir. Devamında yapılan deneyler sonraki %B 'yi oluşturmuştur ve sulu ortamda analitlerin mümkün olan pKa değerlerini tespit etmede önemli ipuçları olmuştur. İlk olarak tamponun pH'ı analitin iyonize olmayan formundan seçmek için kullanılmıştır. Sonuçta katsayı zamanı % B seçilmesindeki çözücünün pKa'sını tahmin edilmesini sağlamıştır. Aynı zamanda log k_w değerleri tahmin edilmiştir. $\log k_w$ parametreleri HPLC'den elde edilen değerler ile standart değerlerin karşılaştırılması sonucu elde edilmiştir. log k_w ve referans parametreler (logP) bir dizi önemli yapıya sahip çeşitli ilaçlarda ve analitlerde test edilmiştir. Koordinasyon kimyasında yapıldığı gibi kompleks karışımların özel çözücülerinin lipofiliklik hızlı bir tarama sonucu tespit edilmiştir. Anilin ve türevleri üzerindeki çalışmaları sonucu bulunan pKa değerleri literatürdeki pKa data bilgileriyle uyumlu olmuştur. pKa tahmin değerlerinin genel işlemleri desteklenmesi sonucu, bir dizi ilacın korrelasyonunun normalden daha az olacağı tespit edilmiştir. (Kaliszan R. ve ark., 2002)



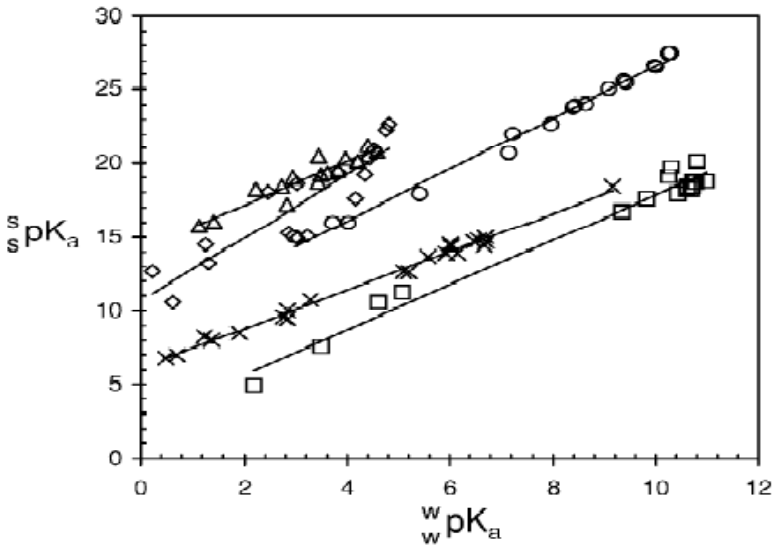
Şekil 3. 6. Bir Asitik Çözeltinin iyonlaşmamış moleküllerinin fo, k kesirlerinin pH'la ilişkisi.

Maria Jose Medina-Hernande ve arkadaşlarının 1998 yılında yaptıkları "Lokal Anesteziklerin Misellar Sıvı Kromatografisi İle Kantitatif Oran-Yapı ve Oran-Aktiflik İlişkileri" adlı çalışmada; bileşiklerin oranının micellar sıvı kromatografisinde (MLC) hidrofobik ve elektrostatik kuvvetler tarafından yönetildiğinden, iyonik bileşikler için her ikisinin de etkili olduğunun kabul edildiğinden bahsediliyor. İlk sonuçlarda numunenin oranının bileşiklerin hidrofiliklik ile ilişkili olduğunu ve molar oranın bileşiklerin yükleriyle ilişkili olduğu görülmüştür. Mobil faz gibi iyonik olmayan yüzey çözeltileri kullanılarak iyonlaşmanın farklı dereceleri ile lokal anesteziklerin kapasite faktörlerinin logaritması ve bunun yapısal parametreleri arasında yüksek bir korrelasyon elde edilmiştir. Multiple lineer regresyon yoluyla deneysel değişiklikler yapılmış ve fizikokimyasal parametrelerin bir fonksiyon oranı kurulmuştur. Dahası, lokal anesteziklerin hidrofiliklik tahmin sonuçları tahmini bir örnek olarak önerilmiştir. Sonunda , MLC ile bu bileşiklerde kantitatif ve kalitatif oran-aktiflik ilişkisi araştırılmıştır.. MLC'de kapasite faktörleri ve lokal anesteziklerin anestezik potansiyelleri arasında muhteşem bir korrelasyon elde edimiştir. (Medina-Hernande M. J. ve ark., 1998)

Literatürde çalışılmış bazı lokal anestezik maddelerin yapıları, logk ve log P değerleri

dibucaine		8.85	4.40
procaine		8.80	2.24
tetracaine		8.6	3.73

Martı Roses ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları "Asetonitril-Su Mobil Faz Ortamında 14. Asit-Baz pK_a Değerlerinin Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi ile İyonlaşabilen Bileşiklerin Oranı" adlı çalışmada; asetonitril-su karışımlarının ${}_s^s pK_a$ değerleri ve saf su ${}_w^w pK_a$ değerleri arasındaki lineer ilişkisi beş tane bileşik grubunda incelenmiştir; alifatik karboksilik asitler, aromatik karboksilik asitler, fenoller, aminler ve piridinler. Lineer korrelasyon parametrelerinin asetonitril-su karışımlarıyla ilişkili olduğu söylenmiştir. Önerilen eşitlikler çalışılan grupların her asetonitril-su karışımları için %60 asetonitril içeren her çözelti için doğru tahminler verdiği gözlenmiştir. Buna karşılık aynı eşitlikler çalışılan asetonitril-su mobil fazlarından elde edilen kromatografi pKa değerleri ile sulu ortam pKa değerlerinin tahmin edilmesinde de kullanılmıştır. pKa değerlerinin hesapları literatürdeki kromatografik datalarla test edilmiştir. (Roses M. ve ark., 2002)

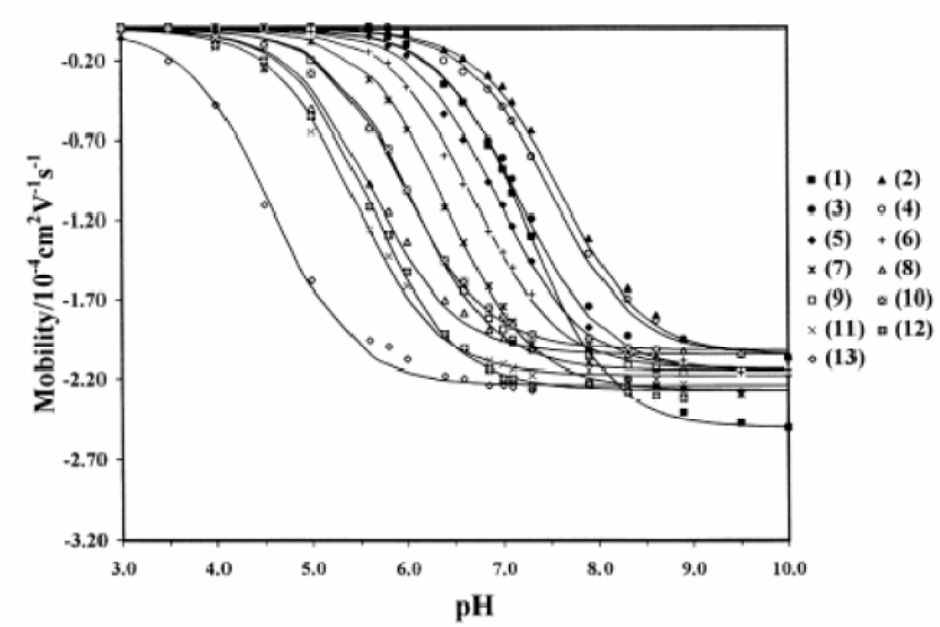


Şekil 3.7. Saf asetonitrilin $^{s}_{s}pK_a$ değeri ile saf suyun $^{w}_{w}pK_a$ değerinin karşılaştırılması. Semboller: (◊)alifatik karboksilik asitler, (Δ)aromatik karboksilik asitler, (○)fenoller, (□)aminler, (×)piridinler

Nurullah Şanlı'nın 2007 yılında yaptığı "Bazı sülfonamitlerin sıvı kromatografi yöntemi ile tayini"adlı doktora tezi çalışmasında pKa değerlerinin asetonitril – su ikili karışımlarında doğru olarak bilinmesi, bu çözücü karışımını kullanan sıvı kromatografi ve kapiler elektroforez gibi ayırma yöntemleri için çok önemli olduğundan bahsedilmiştir.Bu tezde, 7 adet sülfonamitin (sülfodiazin, sülfatiazol,sülfamerazin, sülfametazin, sülfadoksin, sülfamonometoksin, sülfametaksazol) pKa değerleri, % 50 (v/v) asetonitril - su ikili karışımında potansiyometrik, % 50- %40- %30 (v/v) asetonitril - su ikili karışımlarında sıvı kromatografik (LC) ve LC-DAD yöntemleri ile tayin edilmiştir. Deneysel olarak hesaplanan pKa değerleri, SPARC on-line programı ile hesaplanan pKa değerleriyle karşılaştırılmıştır. Optimum ayırma koşulu, pH ve organik modifiyer derişiminin etkisi dikkate alınarak belirlenmiştir. (Şanlı N., 2007)

Çizelge 3. 1. Sülfonamitlerin kapiler elektroforez yöntemiyle belirlenen pKa değerleri

Bileşik Adı	pK_{a1}	pK_{a2}
(1)sülfotiyazol	2.08	7.07
(2)sülfometazin	2.28	7.42
(3)sülfometoksipiridazin	2.09	6.95
(4)sülfisomidin	2.68	7.26
(5) sülfomerazin	2.17	6.77
(6)sülfometer	1.87	6.57
(7)sülfodiazin	2.10	6.28
(8)sülfaquinoksalin	1.86	5.56
(9)sülfomonometoksin	1.98	5.96
(10) sülfodimetoksin	1.87	5.86
(11)sülfokloropiridazin	1.90	5.40
(12)sülfometaksazol	1.83	5.57
(13)sülfisaksazol	1.66	4.71



Şekil 3. 7. Sülfonamitlerin elektroforetik mobilite pH ilişkileri

Literatürde, çoğunlukla lokal anestezik maddelerin kantitatif tayinleriyle ilgili çalışmalar bulunmaktadır ve protonasyon sabitlerinin veya pKa değerlerinin tayini ile ilgili sadece birkaç tane (lidokaine ait) çalışmaya rastlanmıştır. Lokal anestezik maddelerin pH değerlerinin doğru olarak belirlenmesi, etki mekanizmalarının belirlenmesinde ve etkinliklerinin attırılmasında son derece önemli olduğundan protonasyon sabitlerinin doğru bir şekilde belirlenmesi ve literatüre kazandırılması gerekmektedir.

4. DENEYSEL KISIM

4.1. Materyal

4.1.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Bu çalışmada kullanılan lokal anestezik maddeler, CAS numaraları, bileşiğin formülü, molekül ağırlıkları ve etkileri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4. 1. Bu çalışmada kullanılan lokal anestezik maddeler

Maddenin Adı	CAS Numaraları	Bileşiğin Formülü	Molekül Ağırlığı	Etkileri
Tetrakain Hidroklorür	136-47-0	$C_{15}H_{24}N_2O_2HCl$	300,82	US: Toksik EU: Toksik
Prokainamit Hidrolorür	614-39-1	$C_{15}H_{21}N_3OClH$	271,79	US: Tahriş Edici EU: Zararlı
Dibukain	85-79-0	$C_{20}H_{29}N_3O_2$	343,5	US: Toksik EU: Zararlı

4.2.2. Kullanılan Çözücüler

Bu çalışmamızda kullandığımız çözücülerin adları, firma adları ve saflık dereceleri Tablo 4.2 'de gösterilmiştir. Çalışmalarda laboratuarımızda bulunan Pure Lab Option-Q ELGA DV25 marka cihazdan elde edilen ultra saf su kullanılmıştır.

Çizelge 4. 2. Çalışmada kullanılan çözücüler

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

Çizelge 4. 3. Kullanılan çözücülerin özellikleri ve solvatokromik parametreleri (α, β, π*, DN, AN)

Çözücü	D[a]	μ[b]	η[c]	α	β	π*	DN[d]	AN[e]	$E_T^{(30)}$	λex, nm	λem,nm	F.I. (A.U)
Su	78.39	1.84	0.89	1.17	0.47	1.09	18.0	54.8	63.1	260	285	27.77
Metanol	38.70	1.66	0.54	0.98	0.66	0.60	30.0	41.3	55.4	260	404	120.92
Asetonitril	37.50	3.37	0.34	0.19	0.40	0.66	14.1	18.9	45.6	260	405	99.2

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

[b] Çözücünün dipol momenti (debye biriminde)

[c] Çözücünün viskozitesi (centipoise biriminde)

[d] Gutman'ın donör sayısı

[e] Gutman-Mayer akseptör sayısı

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

β = Kamlet-Taft Lewis-bazlık parametresi

π* =Kamlet-Taft polarlık /polarizlenebilirlik parametresi

4.2.3. Lokal Anestezik Maddelerin Çözeltilerinin Hazırlanması

4.2.3.1. Tetrakainin metanol-su ortamındaki çözeltisi: 10^{-4} M tetrakainin metanoldeki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0007 g tetracaine hidroklorit tartılmıştır. Daha sonra 25 mL' lik balon jojeye aktarılarak bir miktar metanolde çözülmüş ve hacim 25 mL'ye metanolle tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M'a seyreltilerek hazırlanmıştır. Yüzde çözücü çalışmalarında, uygun hacimlerde metanol ve su kullanarak çözeltiler hazırlanmıştır.

4.2.3.2. Tetrakainin asetonitril-su ortamındaki çözeltisi: 10^{-4} M tetrakainin asetonitrildeki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0007 g tetrakain hidroklorit tartılmıştır. Daha sonra 25 mL'lik balon jojeye aktarılarak bir miktar asetonitrilde çözülmüş ve hacim 25 mL'ye asetonitrille tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M'a seyreltilerek hazırlanmıştır. Yüzde çözücü çalışmalarında, uygun hacimlerde asetonitril ve su kullanılarak hazırlanmıştır.

4.2.3.3. Tetrakainin su ortamındaki çözeltisi: 10^{-4} M tetrakainin sudaki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0007 g tetrakain hidroklorit tartılmıştır. Daha sonra 25 mL'lik balon jojeye aktarılarak bir miktar suda çözülmüş ve hacim 25 mL'ye tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M'a seyreltilerek hazırlanmıştır.

.**4.2.3.4. Prokainin metanol-su ortamındaki çözeltisi:** 10^{-4} M prokainin metanoldeki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0006 g prokanamit hidroklorit tartılmıştır. Daha sonra 25 mL'lik balon jojeye aktarılarak bir miktar metanolde çözdükten sonra hacim 25 ml'ye metanolle tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-6} M'a seyreltilerek hazırlanmıştır. Yüzde çözücü çalışmalarında, uygun hacimlerde metanol ve su kullanılarak hazırlanmıştır.

4.2.3.5. Prokainin asetonitril-su ortamındaki çözeltisi: 10^{-4} M prokainin asetonitrildeki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0006 g prokanamit hidroklorit tartılmıştır. Daha sonra 25 mL'lik balon jojeye aktarılarak bir miktar asetonitrilde çözdükten sonra hacim 25 mL'ye asetonitrille tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-6} M ' a seyreltilerek hazırlanmıştır. Yüzde çözücü çalışmalarında, uygun hacimlerde asetonitril ve su kullanılarak hazırlanmıştır.

4.2.3.6. Prokainin su ortamındaki çözeltisi: 10^{-4} M prokainin sudaki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0006 g prokanamit hidroklorit tartılmıştır. Daha sonra 25 mL'lik balon jojeye aktarılarak bir miktar suda çözdükten sonra hacim 25 mL'ye suyla tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M'a seyreltilerek hazırlanmıştır.

4.2.3.7. Dibukainin metanol-su ortamındaki çözeltisi: 10^{-4} M dibukainin metanoldeki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0008 g dibukain tartılmıştır. Daha sonra 25 mL'lik balon jojeye aktarılarak bir miktar metanolde çözdükten sonra hacim 25 mL'ye metanolle tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M'a seyreltilerek hazırlanmıştır. Yüzde çözücü çalışmalarında, uygun hacimlerde metanol ve su kullanılarak hazırlanmıştır.

4.2.3.8. Dibukainin asetonitril-su ortamındaki çözeltisi: 10^{-4} M dibukainin asetonitrildeki stok çözeltisini hazırlamak için 0,0008 g dibukain tartılmıştır. Daha sonra 25 mL'lik balon jojeye akatarılarak bir miktar asetonitrilde çözdükten sonra hacim 25 mL'ye asetonitrille tamamlanmıştır. Çalışma çözeltileri, stok çözeltisinden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M'a seyreltilerek hazırlanmıştır. Yüzde çözücü çalışmalarında, uygun hacimlerde asetonitril ve su kullanılarak hazırlanmıştır.

4.2.3.9. Dibukainin su ortamındaki çözeltisi: Dibukain suda çözünmemiştir.

4.2.4. Kullanılan Tampon Çözeltilerin Hazırlanışı

4.2.4.1. Fosfat tampon çözelti pH 2.0 : 8,95 g disodyum hidrojen ortofosfat ve 3,40 g potasyum dihidrojen ortofosfat yeterli miktarda suda çözülmüş, hacim suyla 1000 ml'ye tamamlanmıştır. Gerektiği durumda pH' ı ortofosforik asitle ayarlanmıştır.

4.2.4.2. Fosfat tamponu pH 3.0 : 34 g potasyum dihidrojen ortofosfat 250 ml suda çözülmüş ve pH'ı 3.0 olacak şekilde ortofosforik asitle ayarlanmıştır.

4.2.4.3. Fosfat tamponu pH 4.0 : 5,04 g disodyum hidrojen ortoosfat ve 3,01 g potasyum dihidrojen ortofosfat yeterli miktarda suda çözülmüş, hacim suyla 1000 mL' ye tamamlanmıştır.. pH'ı glasial asetik asitle ayarlanmıştır.

4.2.4.4. Asetat tamponu pH 5.0 : 13,6 g sodyum asetat ve 6 ml glasial asetik asit yeterli miktarda suda çözülmüş ve hacim suyla 1000 mL' ye tamamlanmıştır.

4.2.4.5. Fosfat tampon çözelti pH 6.0 : 6,8 g sodyum dihidrojen ortofosfat yeterli miktarda suda çözülmüş ve hacim suyla 1000 ml'ye tamamlanmıştır. 10 M sodyum hidroksit ile pH 'ı ayarlanmıştır.

4.2.4.6. Fosfat tamponu pH 7.0 : 0,50 g anhidrit disodyum hidrojen ortofosfat ve 0,301 g potasyum dihidrojen ortofosfat yeterli miktarda suda çözülmüş ve hacmi suyla 1000 mL'ye tamamlanmıştır.

4.2.4.7. Fosfat tampon çözelti pH 8.0 ,0,1 M : 0,523 g potasyum dihidrojen ortofosfat ve 16,73 g dipotasyum hidrojen ortofosfat yeterli miktarda suda çözülmüş ve hacmi suyla 1000 ml' ye tamamlanmıştır.

4.2.5. Kullanılan Cihazlar

Çalışmada spektroflorimetrik ölçümler, Perkin Elmer LS 55 marka Lüminesans Spektrofotometre kullanılarak yapılmıştır. Spektrofotometrik ölçümlerde, Schimadzu UV-1700 marka UV Spektrofotometre kullanılmıştır. Çözeltileri pH ölçümleri için ORION 520 A(+) marka pH metre kullanılmıştır.

4.3. Yöntem

Çalışmada, bazı lokal anestezik maddelerin metanol-su ve asetonitril-su gibi karışım çözücülerde protonasyon sabitleri (pKa değerlerinin), spektrofotometrik ve florimetrik yöntemler kullanarak tayin edilmiş, birbirleriyle ve teorik olarak SPARC ile hesaplanan sabitlerle karşılaştırması yapılmıştır. Teorik olarak iyonlaşma davranışlarını incelemek üzere kantitatif yapı aktivite ilişkilerini esas alan SPARC (Sparc Performs Automated Reasoning in Chemistry) adlı on-line hesap programı kullanılmıştır. Bu

hesap programı sübstitüe grupların etkisini de inceleyerek olası iyonlaşma formlarını ve bunların bağıl derişimlerini vermektedir.

Bu amaçla, öncelikle lokal anestezik maddelerin çözündüğü ve tayin yöntemlerinde kullanılabilecek en uygun çözücü karışım yüzdeleri belirlenmiştir. Daha sonra diğer deneysel parametreler (uyarma ve emisyon dalga boyları, çözücü ortamı ve molar absorbtivite katsayısı gibi) optimize edilerek, en uygun deney koşulları saptanmış ve spektrofotometrik titrasyonlarla ise belli bir dalga boyu aralığında kaydedilen absorbans verilerinden yararlanılıp, maksimum absorbansın olduğu dalga boyunda, absorbans pH' a karşı grafiğe geçirilerek veya log ((A-A')/(A''-A))–pH grafikleri ile doğrusallaştırılarak x eksenini kesim noktasından pKa değerleri bulunmuştur. İkinci aşamada, çeşitli pH'larda (pH=2-9 arasında) çözeltiler hazırlanarak, her birinin optimum koşullardaki floresans şiddetleri ölçülerek pH-floresans şiddeti grafiğinden yararlanılarak protonasyon sabitleri tayin edilmiştir.

4.3.1. Florimetrik Yöntemle Çalışmalar

Lokal anestezik maddelerin (tetrakain, prokain, dibukain) asetonitril, metanol, su, asetonitril-su ve metanol-su ortamlarında hazırlanan çözeltilerinin, spektroflorimetrede uyarma dalga boyu 200-360 nm arasında 10 nm aralıklarla değiştirilerek çoklu emisyon spektrumları alınmıştır. Daha sonra organik çözücü yüzdesi %10-%90 aralığında değiştirilerek, 10^{-5} M derişiminde hazırlanan çözeltilerin de aynı şekilde emisyon spektrumları alınmıştır. Bu çoklu spektrum taramalarından yararlanılarak maksimum floresans şiddeti elde edilen uyarma ve emisyon dalga boyları belirlenmiştir.

pH' ları ayarlanan çözeltilerin floresans şiddetlerini tayin etmede ise şöyle bir yol izlenmiştir. Öncelikle pH değerleri 2-9 arasında değişen çözeltileri hazırlamak için, 50 ml'lik beherlere sırasıyla lokal anestezik maddelerin %10-%50 asetonitril-su ve metanol-su ortamlarında hazırlanan çözeltilerinden herbiri için 1'er mL alınarak üzerlerine 1'er mL tampon ve 1'er mL çözücü ilave edilmiştir. pH değerleri 1 M HCl ve 1 M NaOH kullanılarak ayarlanmıştır. Çözeltiler 10 ml'lik balon jojelere alınarak uygun yüzdedeki çözücü karışımlarıyla hacme tamamlanmıştır. Her bir çözeltinin uyarma dalga boyu 200-360 nm arasında 10 nm aralıklarla değiştirilerek çoklu emisyon spektrumları alınarak, optimum uyarma ve emisyon dalga boyları ve floresans şiddetleri tespit edilmiştir. Böylece organik çözücü yüzdesinin ve pH değerlerinin lokal anestezik maddelerin floresans özelliklerine etkileri değerlendirilmiştir. Aynı zamanda herbir pH

değerinde ölçülen floresans şiddetleri grafiğe geçirilerek, bu grafiklerden lokal anesteziklerin protonasyon sabitleri (pKa değerleri) tayin edilmiştir.

4.3.1.1. Uyarma ve Emisyon Dalga Boyunun Belirlenmesi

Hazırlanan çalışma çözeltilerinin en uygun uyarma ve emisyon dalga boylarını belirlemek amacıyla, uyarma dalga boyu 200-360 nm aralığında 10'ar nm aralıklarla değiştirilerek 400-800 nm aralığında emisyon spektrumları alınmıştır. Maksimum floresans şiddeti gözlenen uyarma ve emisyon dalga boyları belirlenmiştir.

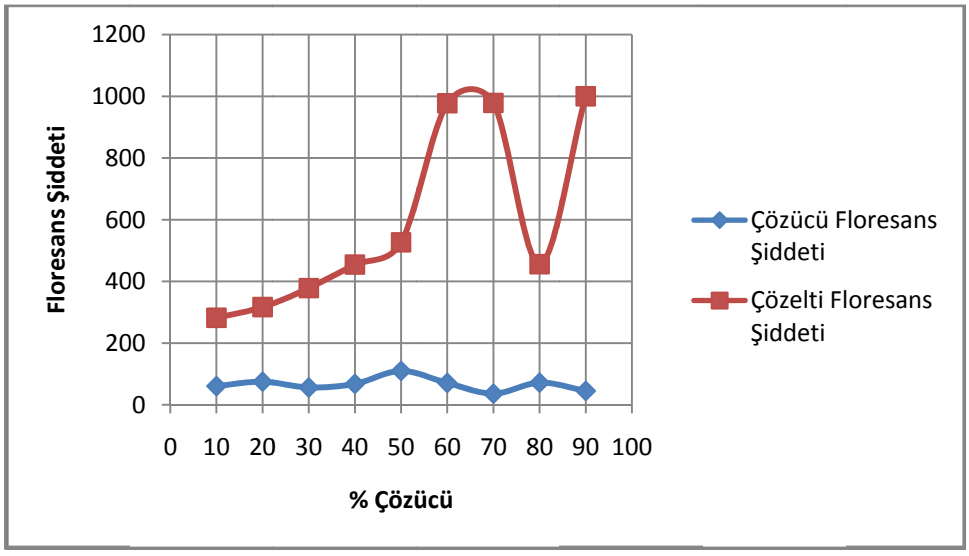
4.3.2. Spektrofotometrik yöntemle çalışmalar

pH' ları ayarlanan çalışma çözeltileri Lüminesans Spektrofotometri cihazında taratıldıktan sonra aynı gün UV Spektrofotometresinde de taratılmıştır. Absorpsiyon dalga boyları ve absorbans değerleri kaydedilerek, pH'a karşı absorbans değerleri grafiğe geçirilmiştir. Bu grafiklerden yararlanarak da lokal anestezik maddelerin pKa değerleri belirlenmiştir.

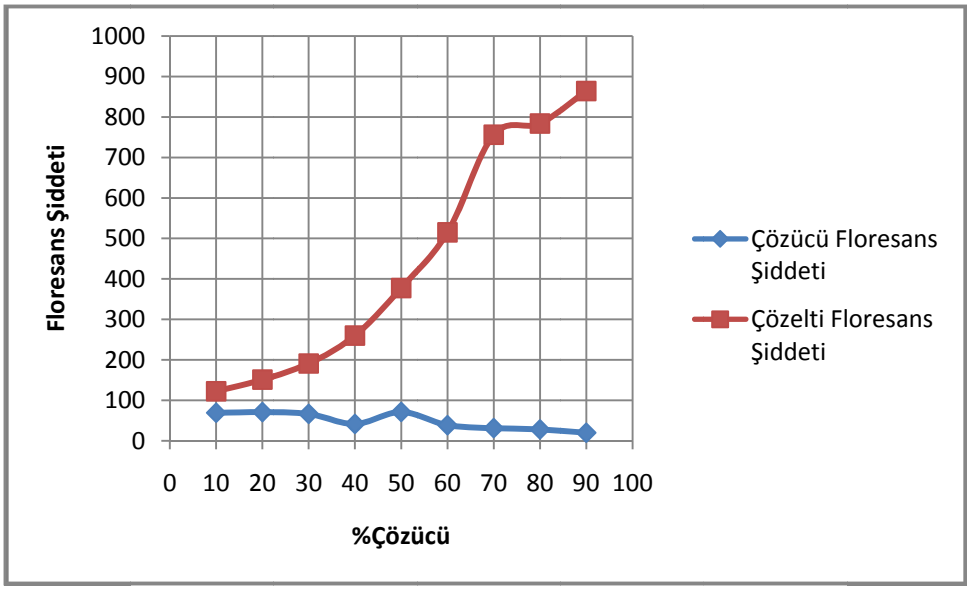
5. SONUÇ VE DEĞERLENDİRME

5.1.1. Lokal Anestezik Maddelerin Yüzde Metanol-Su Ortamlarındaki Florimetrik Yöntemle Elde Edilen % Çözücü-Floresans Şiddeti Grafikleri

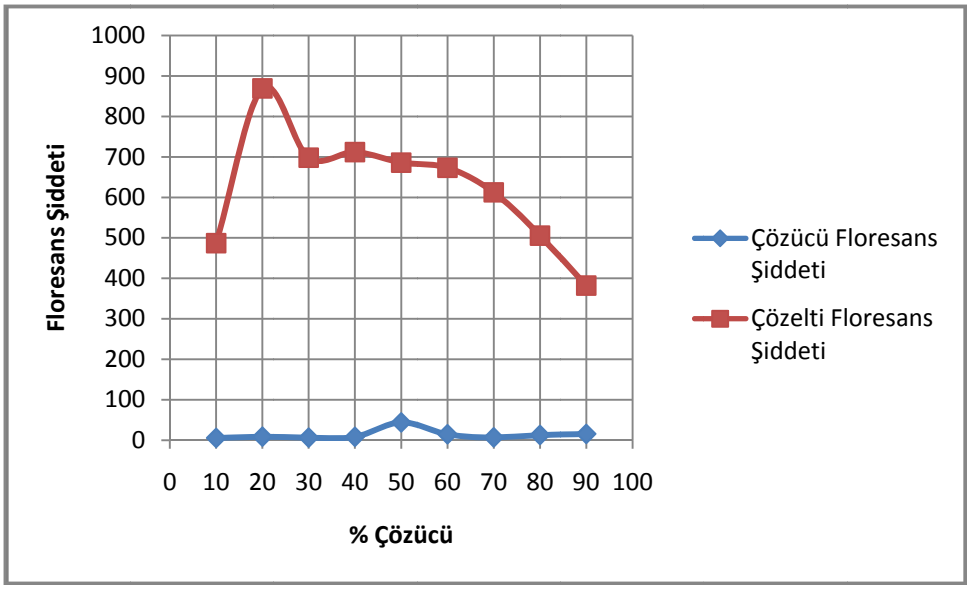
Çalışılan lokal anestezik maddelerin %10-%90 metanol-su ortamlarında elde edilen %çözücü-Floresans şiddeti grafikleri Şekil 5.1- 5.3'de verilmiştir. Lokal anestezik maddelerin bu ortamlardaki derişimleri tetrakain ve dibukain için 10^{-5} M, prokain için ise 10^{-6} M'dır.



Şekil 5. 1. Tetrakainin yüzde metanol-su ortamlarındaki % çözücü-floresans şiddeti grafiği



Şekil 5. 2. Prokainin yüzde metanol-su ortamlarındaki % çözücü-floresans şiddeti grafiği

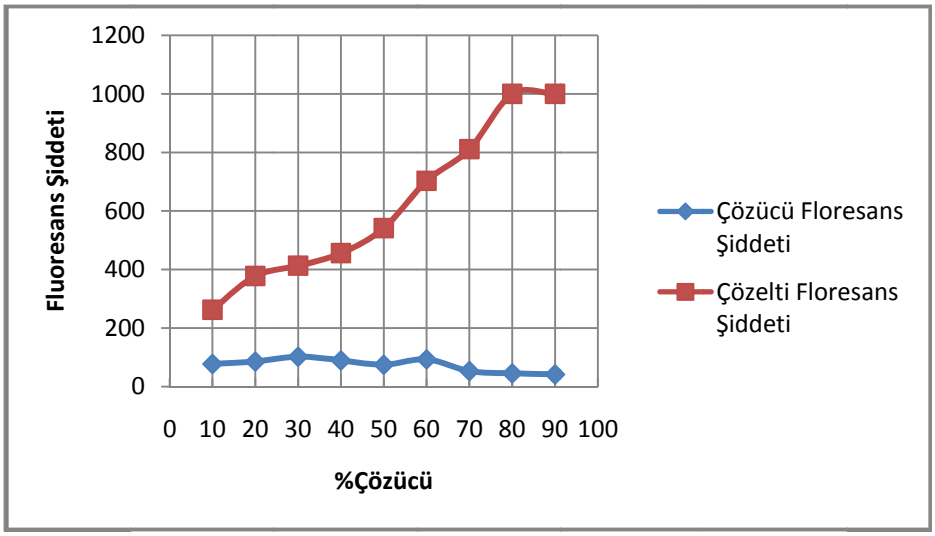


Şekil 5. 3. Dibukainin yüzde metanol-su ortamlarındaki % çözücü-floresans şiddeti grafiği

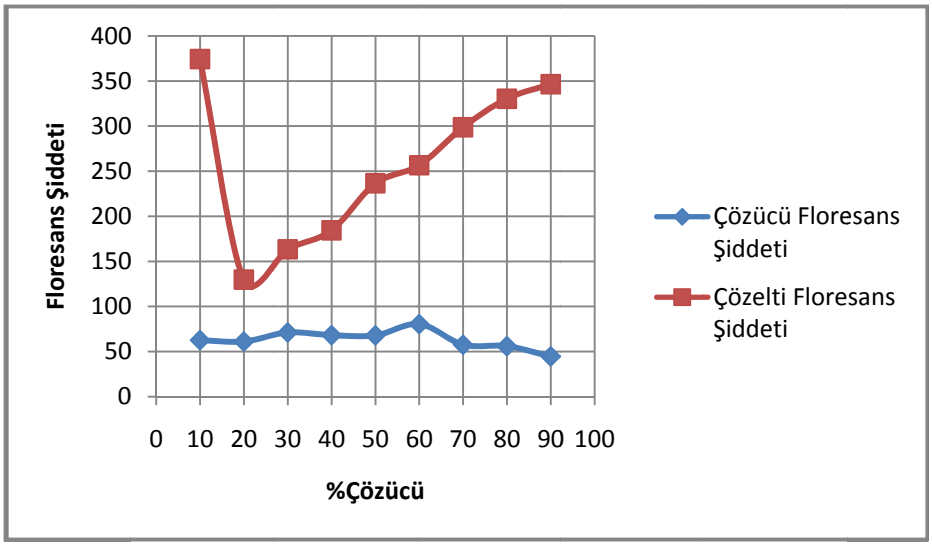
5.1.2. Lokal Anestezik Maddelerin Yüzde ACN-Su Ortamlarındaki Florimetrik Yöntemle Elde Edilen % Çözücü-Floresans Şiddeti Grafikleri

Çalışılan lokal anestezik maddelerin %10-%90 ACN-Su ortamlarında elde edilen %çözücü-Floresans şiddeti grafikleri Şekil 5.4-5.6'da verilmiştir. Lokal anestezik

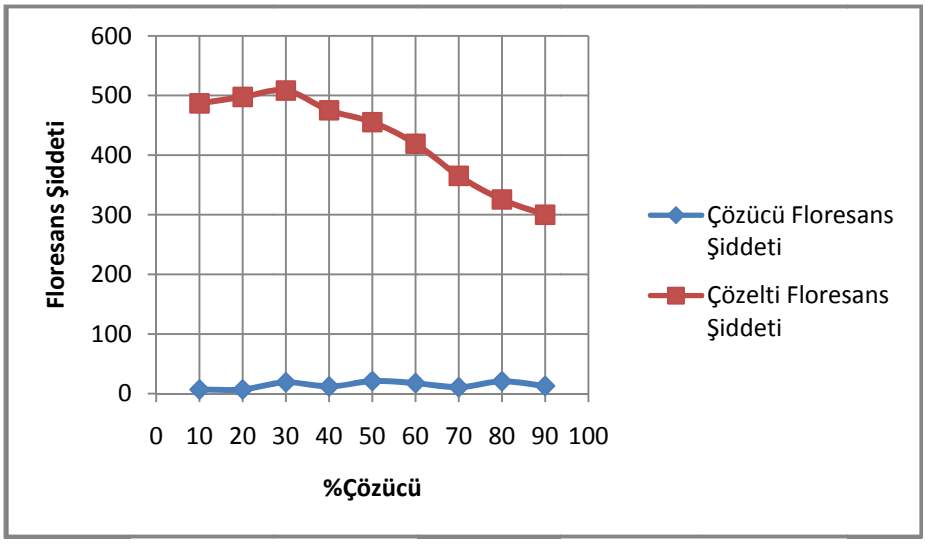
maddelerin bu ortamlardaki derişimleri terakain ve dibukain için 10^{-5} M, prokain için ise 10^{-6} M'dır.



Şekil 5. 4. Tetrakainin yüzde ACN-su ortamlarındaki % çözücü-floresans şiddeti grafiği



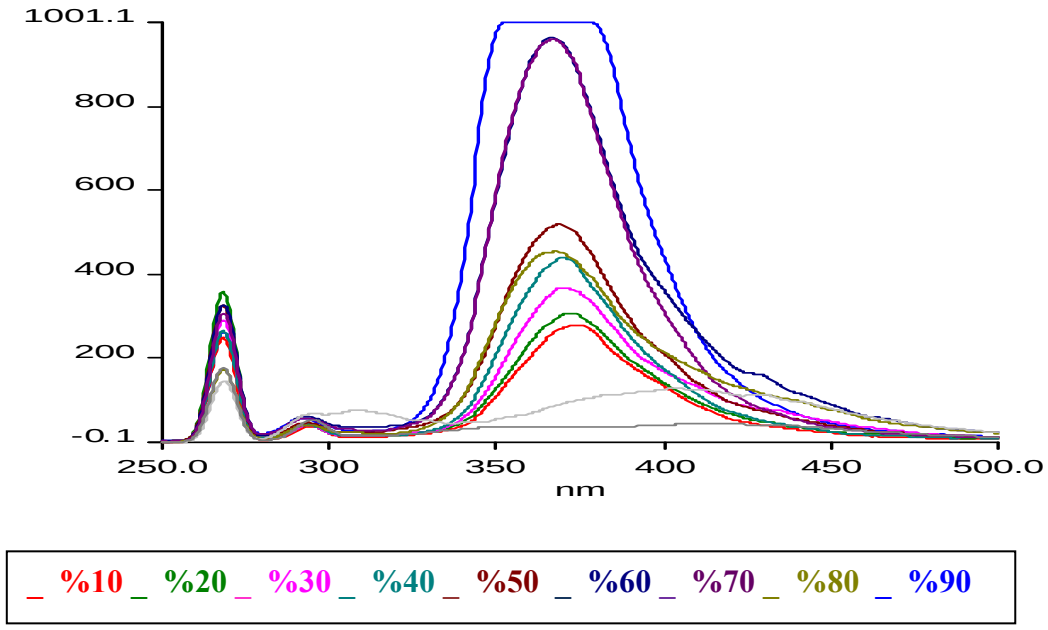
Şekil 5. 5. Prokainin yüzde ACN-su ortamlarındaki % çözücü-floresans şiddeti grafiğ



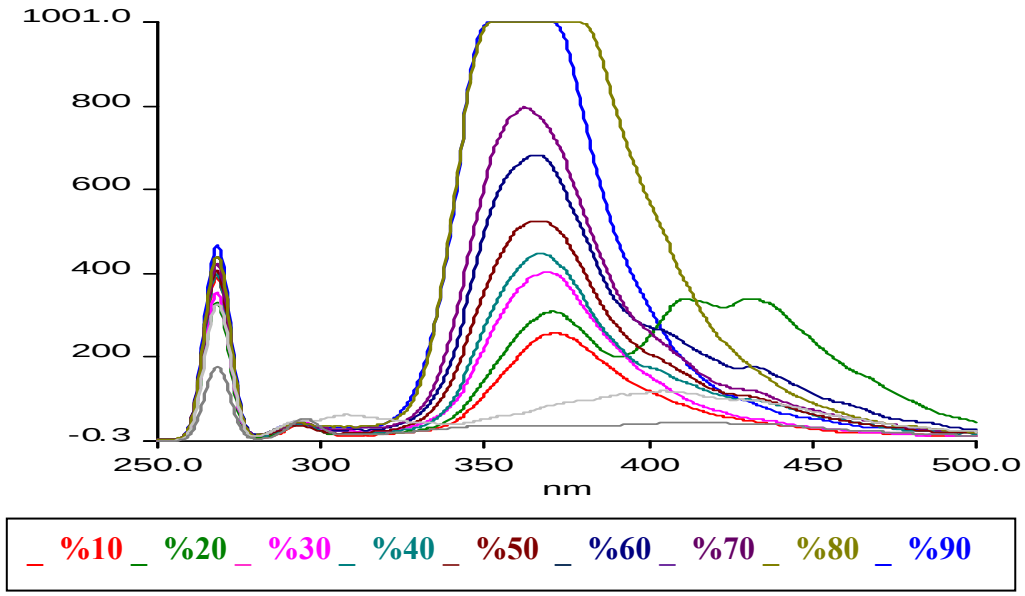
Şekil 5. 6. Dibukainin yüzde ACN-su ortamlarındaki % çözücü-floresans şiddeti grafiği

5.1.3. Lokal Anestezik Maddelerin Yüzde Metanol-Su Ortamlarındaki Uyarma ve Emisyon Dalga Boylarının Belirlenmesi ve Karşılaştırması

Farklı yüzdelerde organik çözücü içeren sulu çözücü karışımlarında, lokal anestezik maddelerin floresans özelliklerinin değişimi incelenmiş, bu amaçla oraganik çözücünün yüzde oranı %10-%90 arasında değiştirilerek hazırlanan bir seri çözeltinin emisyon spektrumları alınmıştır (Şekil 5.7- Şekil 5.12). Bu spektrumlar incelendiğinde, emisyon dalga boylarında oldukça az bir kayma olmasına karşın floresans şiddetlerinde önemli değişiklikler olduğu gözlenmiştir (Çizelge 5.1- Çizelge 5.4).



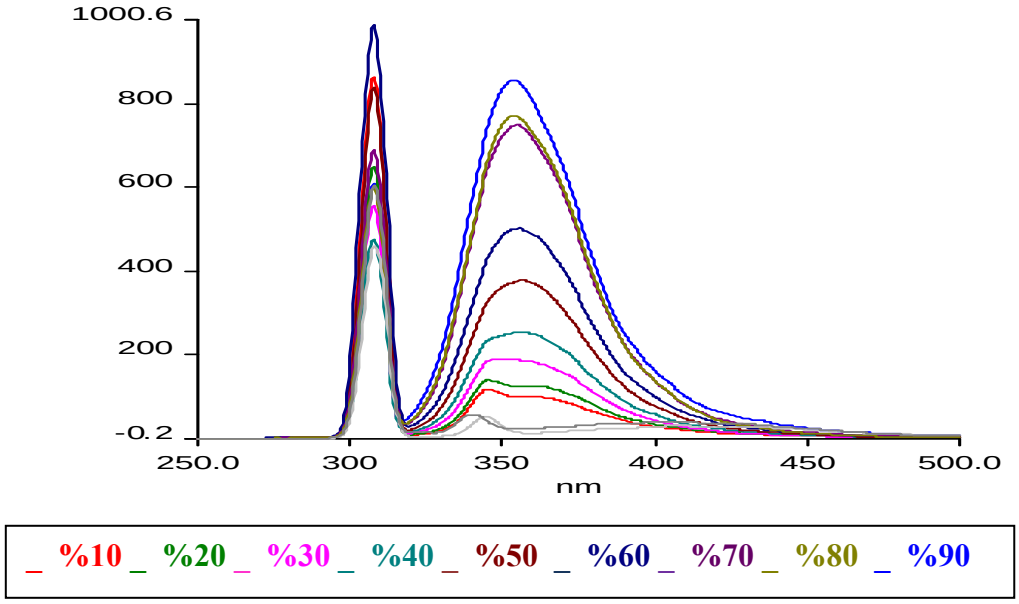
Şekil 5. 7. Tetrakainin % 10- % 90 metanol ortamındaki emisyon spektrumları



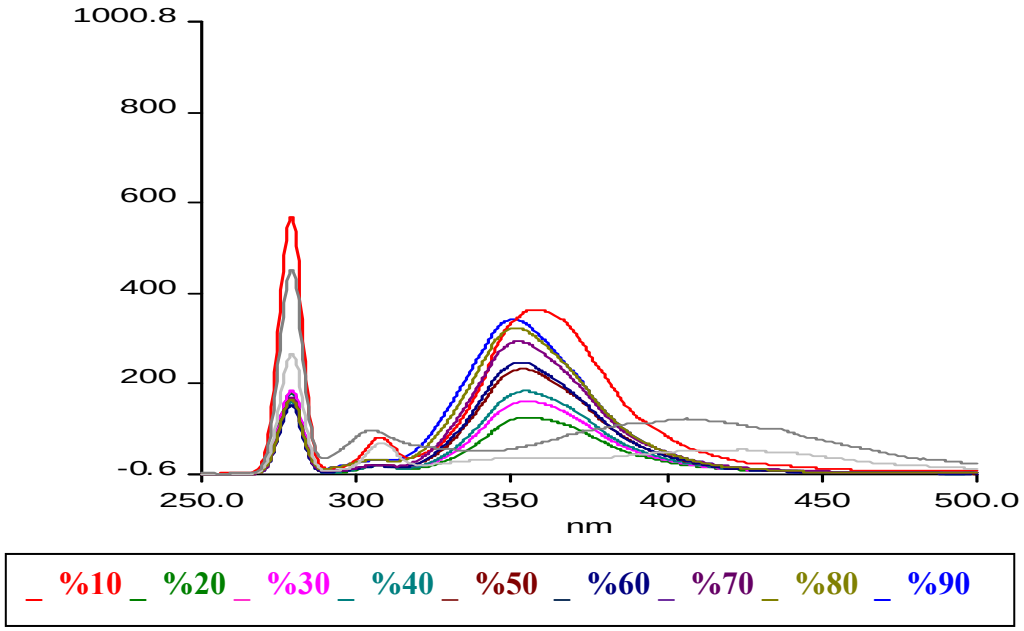
Şekil 5. 8. Tetrakainin % 10- % 90 ACN ortamındaki emisyon spektrumları

Çizelge 5. 1. Tetrakainin farklı çözücü yüzdelerindeki floresans özellikleri ([Tetrakain]=10^{-5}M)

% metanol	λ_{uy} nm	λ_{ems} nm	Floresans Şiddeti	% ACN	λ_{uy} nm	λ_{ems} nm	Floresans Şiddeti
10	268,52	374,32	281,64	10	268,06	370,58	262,28
20	268,17	371,72	316,33	20	267,66	372,77	377,86
30	268,52	370,71	377,93	30	267,66	366,73	413,08
40	268,52	371,91	454,32	40	267,87	364,83	455,97
50	268,52	368,30	526,37	50	267,87	366,12	541,22
60	268,57	368,02	977,26	60	268,57	366,30	702,74
70	268,52	365,09	978,40	70	268,52	361,09	810,95
80	268,52	365,90	455,41	80	268,52	365,90	>1000
90	268,52	364,70	>1000	90	267,87	361,59	>1000



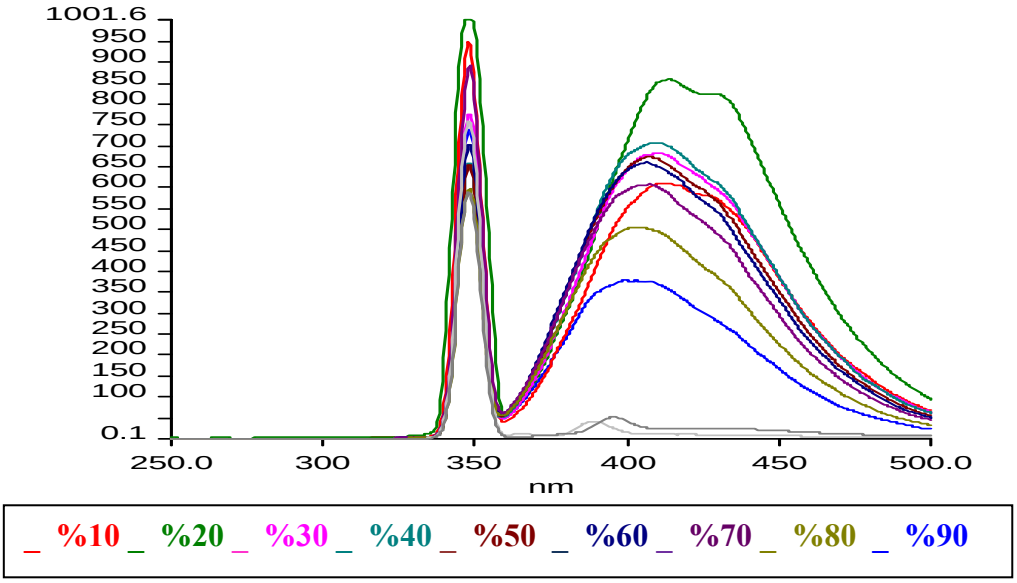
Şekil 5. 9. Prokainin % 10- % 90 metanol ortamındaki emisyon spektrumları



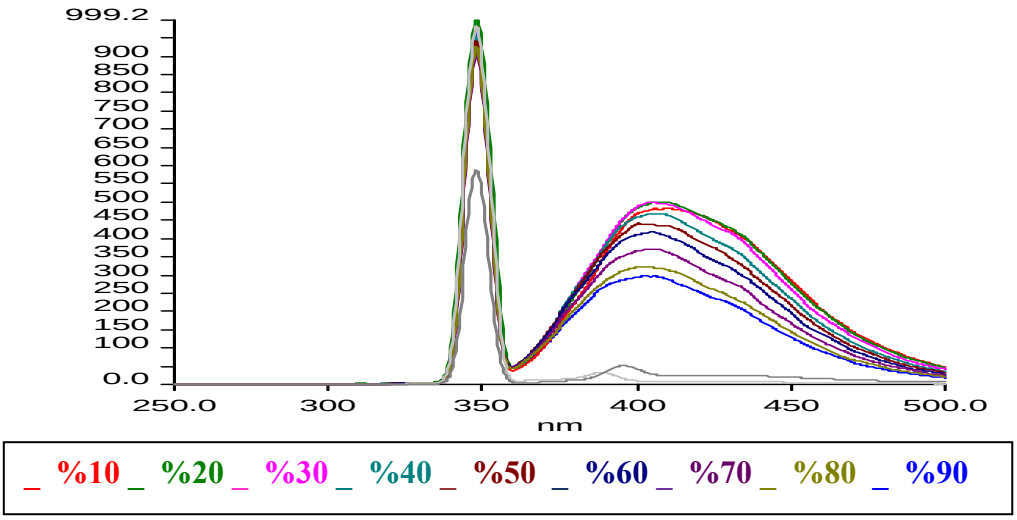
Şekil 5. 10. Prokainin % 10- % 90 ACN ortamındaki emisyon spektrumları

Çizelge 5. 2. . Prokainin farklı çözücü yüzdelerindeki floresans özellikleri ([Prokain]=10^{-6} M)

% metanol	λ_{uy} nm	λ_{ems} nm	Floresans Şiddeti	% ACN	λ_{uy} nm	λ_{ems} nm	Floresans Şiddeti
10	308,19	343,78	122,30	10	279,34	357,24	374,37
20	306,99	345,46	151,21	20	279,34	353,31	129,74
30	307,53	346,19	190,95	30	279,34	353,71	163,43
40	306,99	354,65	259,89	40	279,34	354,52	184,47
50	306,99	354,65	377,55	50	279,34	350,90	236,58
60	306,99	352,68	515,05	60	279,34	353,31	256,57
70	306,99	353,44	756,25	70	279,34	353,06	298,68
80	306,99	353,88	783,98	80	279,34	351,47	330,32
90	306,99	354,65	864,35	90	279,34	351,77	346,51



Şekil 5. 11. Dibukainin % 10- % 90 metanol ortamındaki emisyon spektrumları



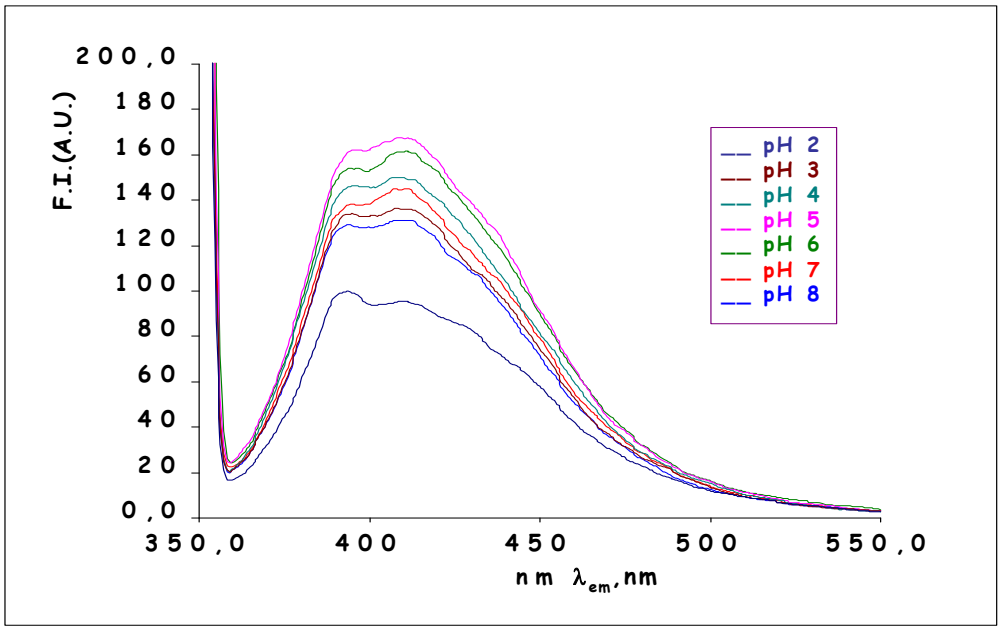
Şekil 5. 12. Dibukainin % 10- % 90 ACN ortamındaki emisyon spektrumları

Çizelge 5. 3. Dibukainin farklı çözücü yüzdelerindeki floresans özellikleri ([Dibukain]=10^{-5} M)

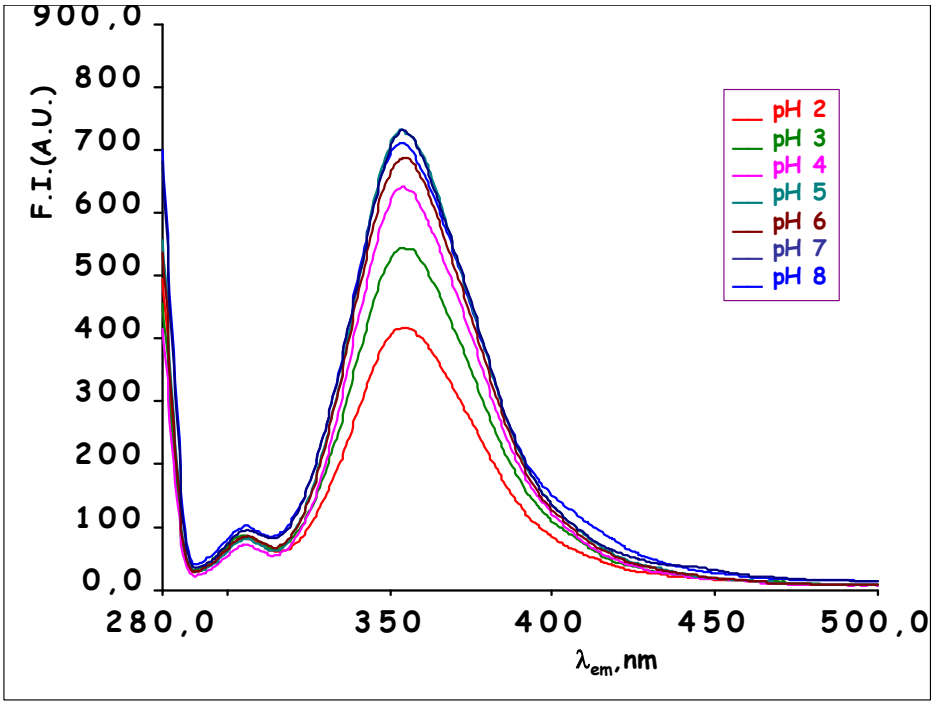
% metanol	λ_{uy} nm	λ_{ems} nm	Floresans Şiddeti	% ACN	λ_{uy} nm	λ_{ems} nm	Floresans Şiddeti
10	347,87	407,98	486,93	10	349,07	407,98	486,93
20	347,87	412,79	869,57	20	347,87	406,78	497,60
30	347,28	412,79	698,17	30	347,28	401,97	508,47
40	347,28	407,98	711,92	40	347,28	407,99	475,27
50	347,28	407,98	685,92	50	347,28	401,97	455,33
60	347,28	404,37	675,21	60	347,28	406,78	419,11
70	347,28	405,57	612,43	70	347,87	406,78	365,25
80	347,28	403,17	505,47	80	347,28	398,36	325,61
90	347,28	400,76	381,94	90	347,28	404,37	299,33

5.1.4. Lokal Anestezik Maddelerin Farklı pH' lardaki Emisyon Spektrumları

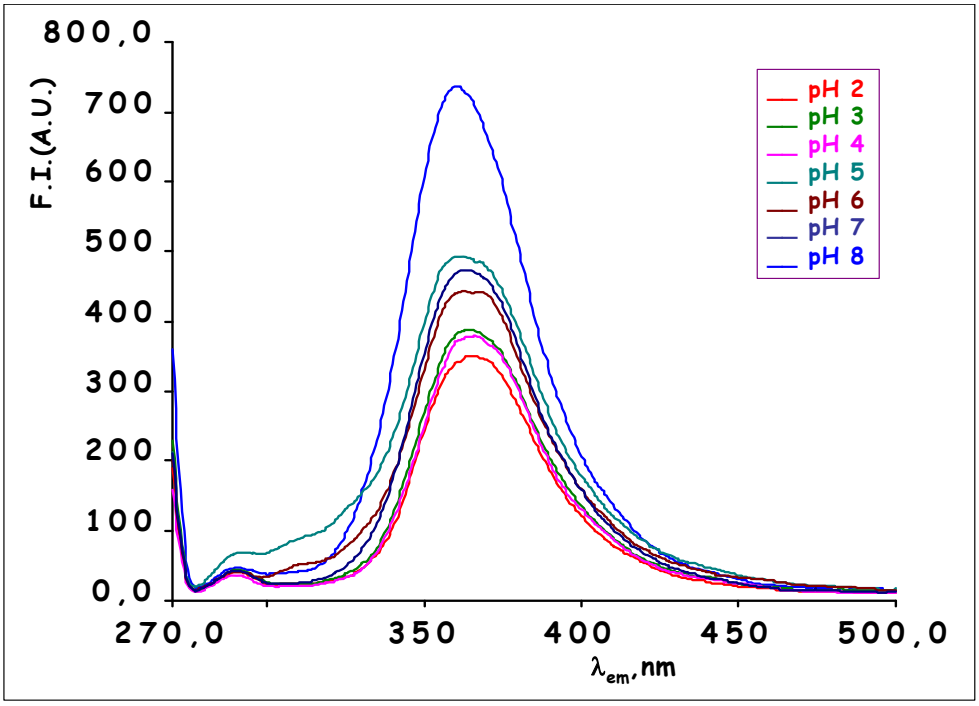
Lokal anestezik maddelerin %10-40 asetonitril ve metanol sulu karışımlarında, pH 2-9 arasında emisyon spektrumları alınarak asidik ve bazik iyonik türlerin floresans özelliklerinin değişimi incelenmiş, optimum dalga boyları belirlenmiştir. Spektrumlar incelendiğinde lokal anestezik maddelerin asidik ortamdaki iyon formlarının, bazik ortamdaki iyon formlarından daha düşük floresans şiddetine sahip oldukları gözlemlenmiştir.



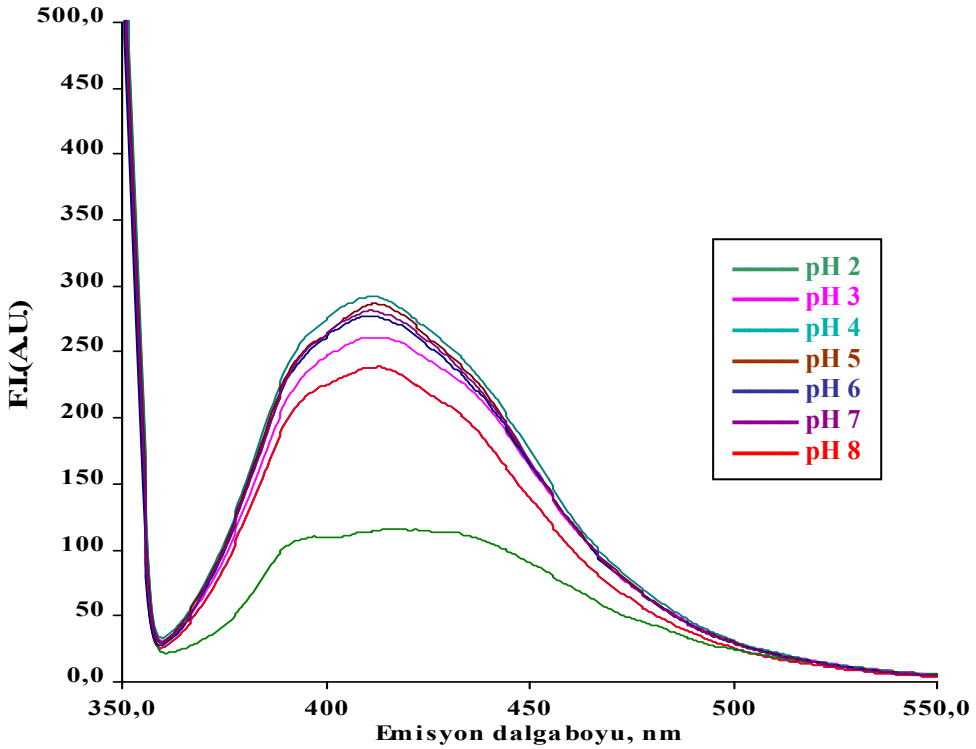
Şekil 5. 13. Dibukainin %30 ACN-%70 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 347,87 nm).



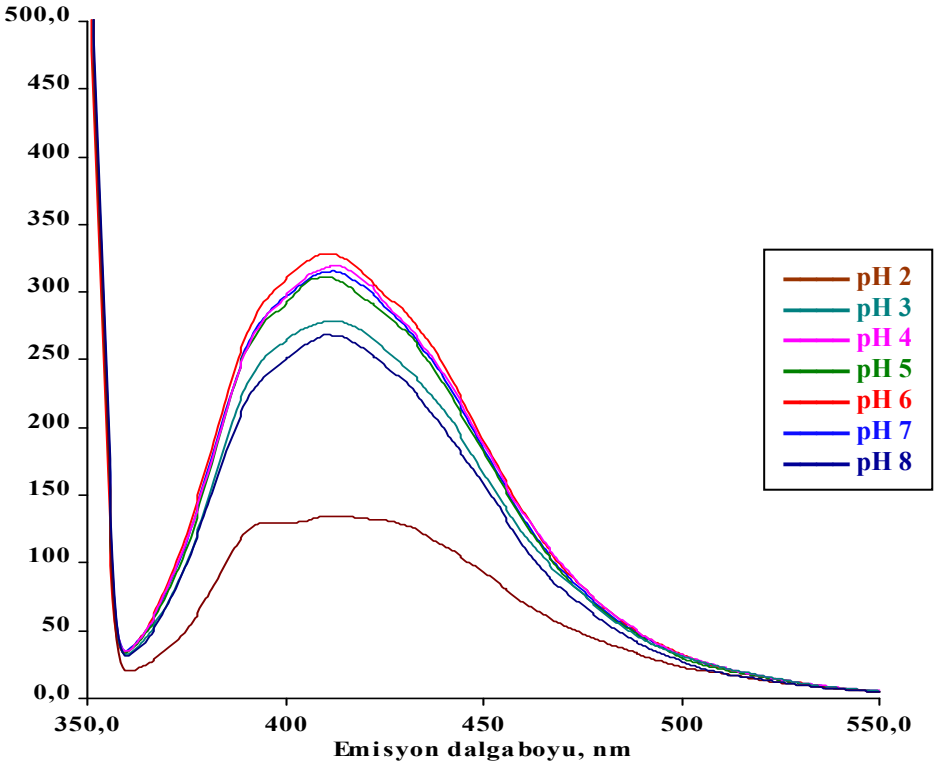
Şekil 5. 14. Prokainin %50 ACN-%50 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 279,34 nm).



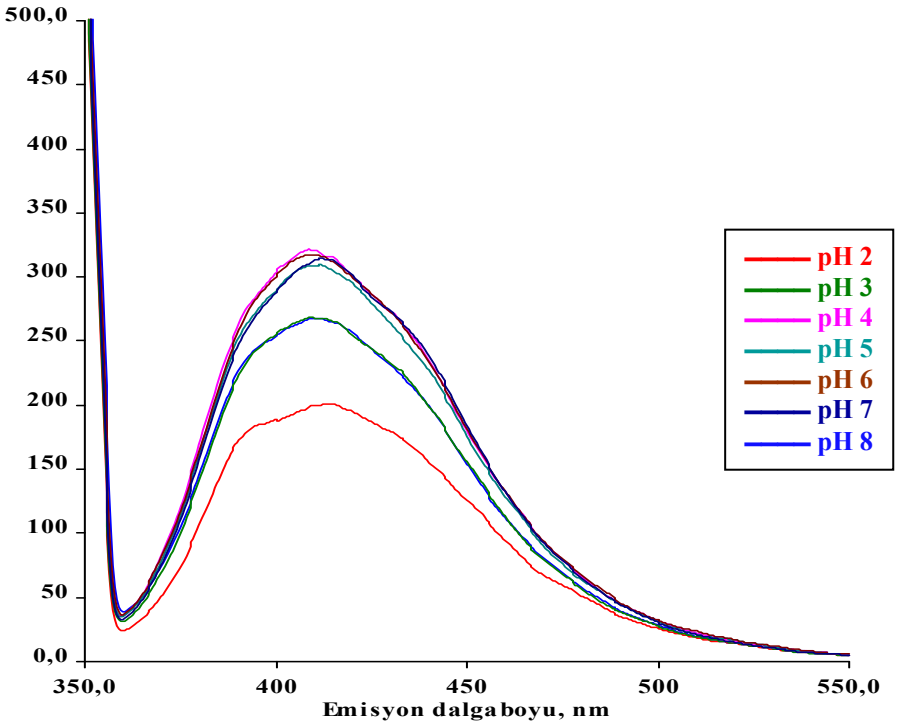
Şekil 5.15. Tetrakainin %50 ACN-%50 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 267,87 nm).



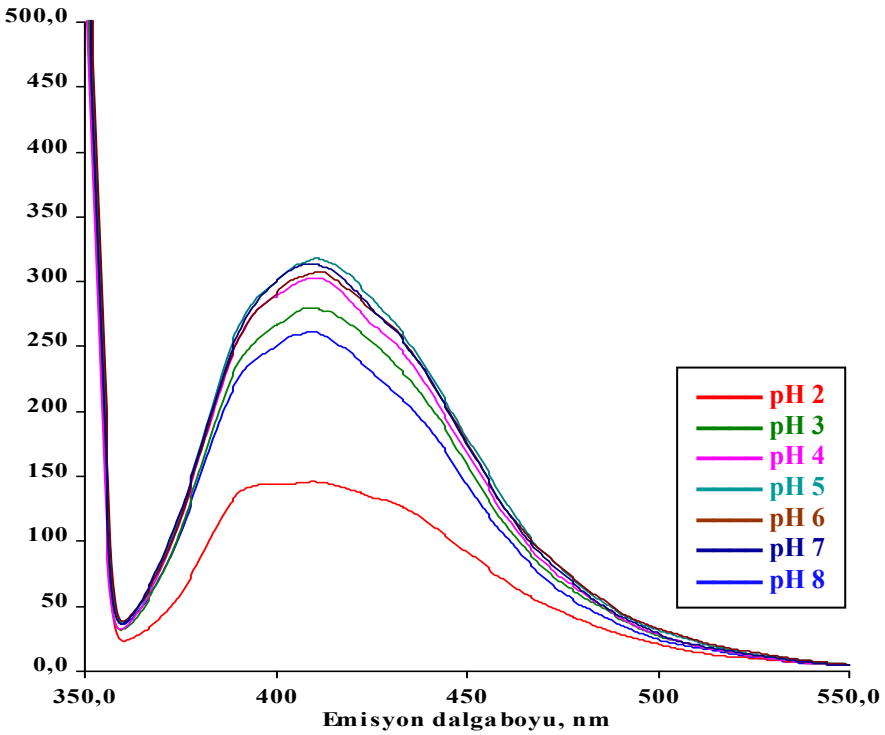
Şekil 5. 16. Dibukainin % 10 metanol-%90 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 346,12 nm)



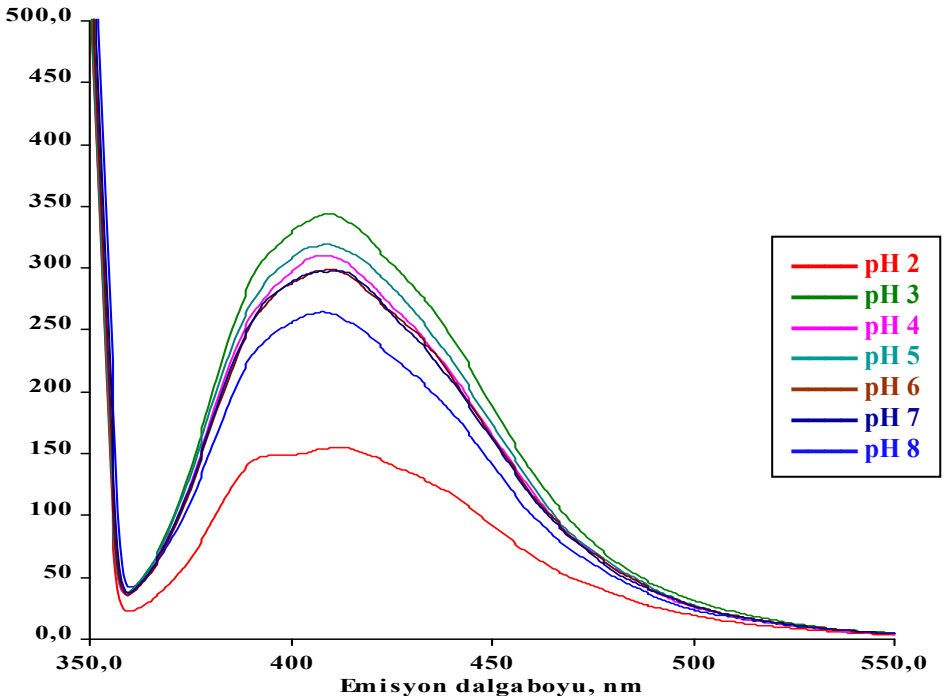
Şekil 5. 17. Dibukainin %20 metanol-%80 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 345,46 nm).



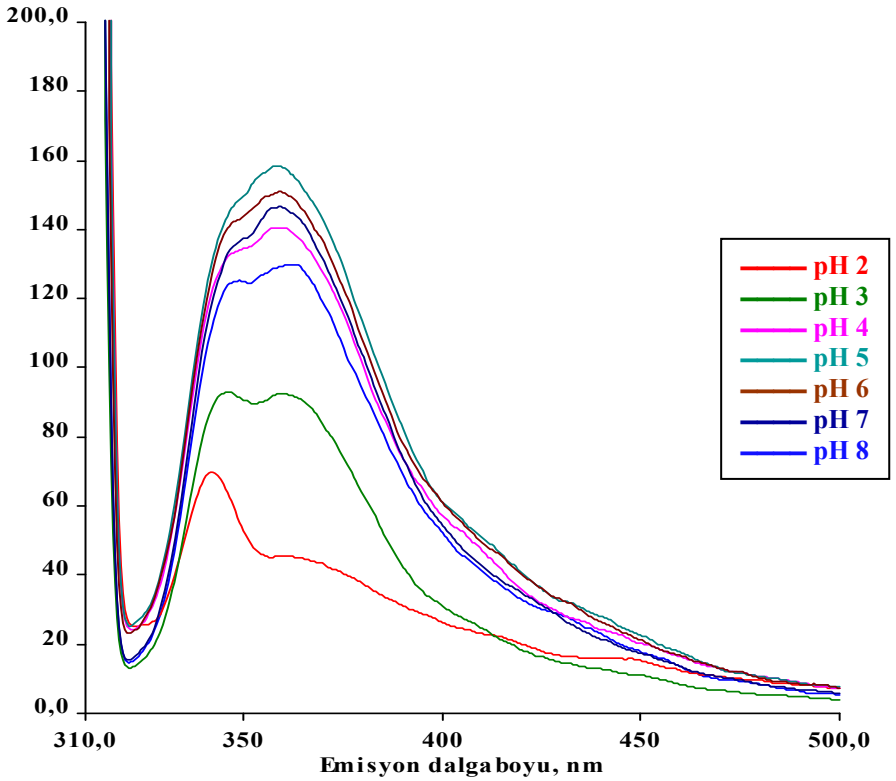
Şekil 5. 18. Dibukainin %30 metanol-%70 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 346,16 nm).



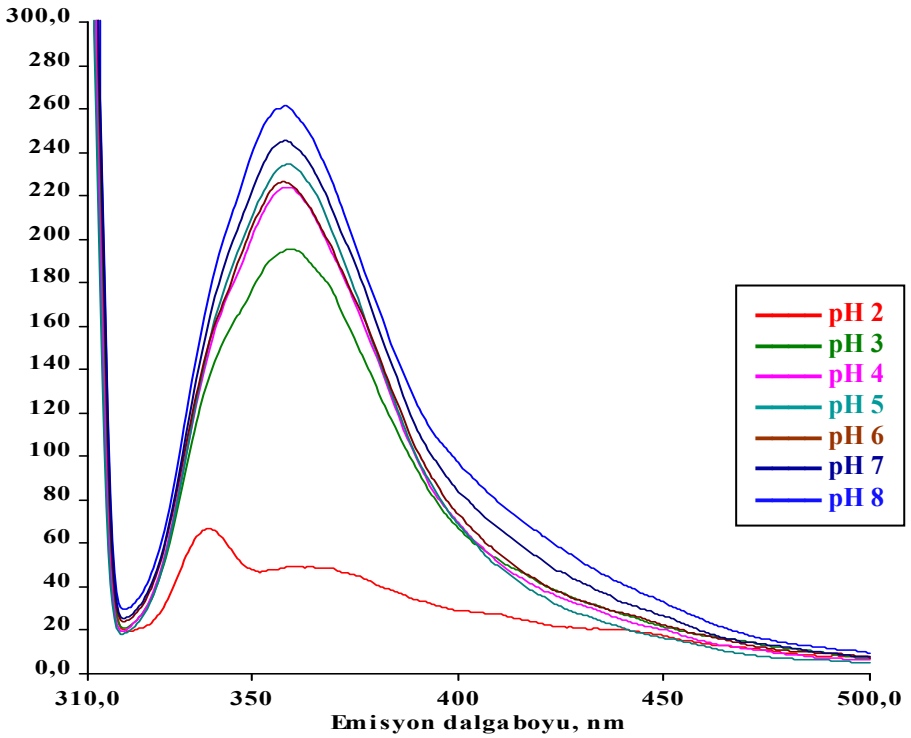
Şekil 5. 19. Dibukainin %40 metanol-%60 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 346,16 nm).



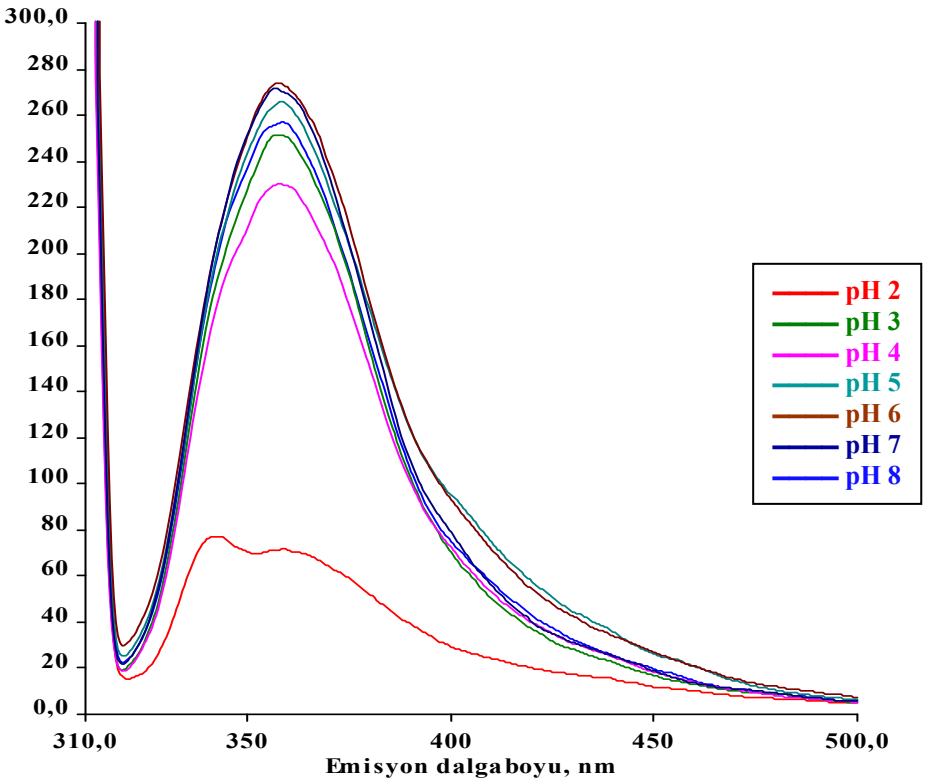
Şekil 5. 20. Dibukainin %50 metanol-%50 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 346,16 nm).



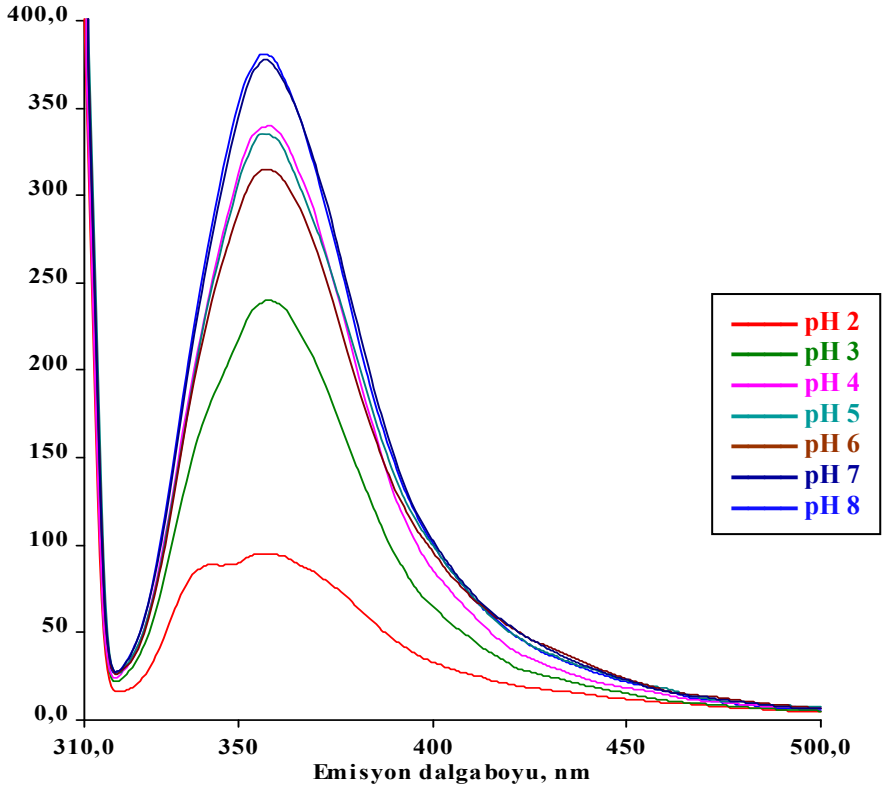
Şekil 5. 21. Prokainin %10 metanol-%90 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 305,43 nm).



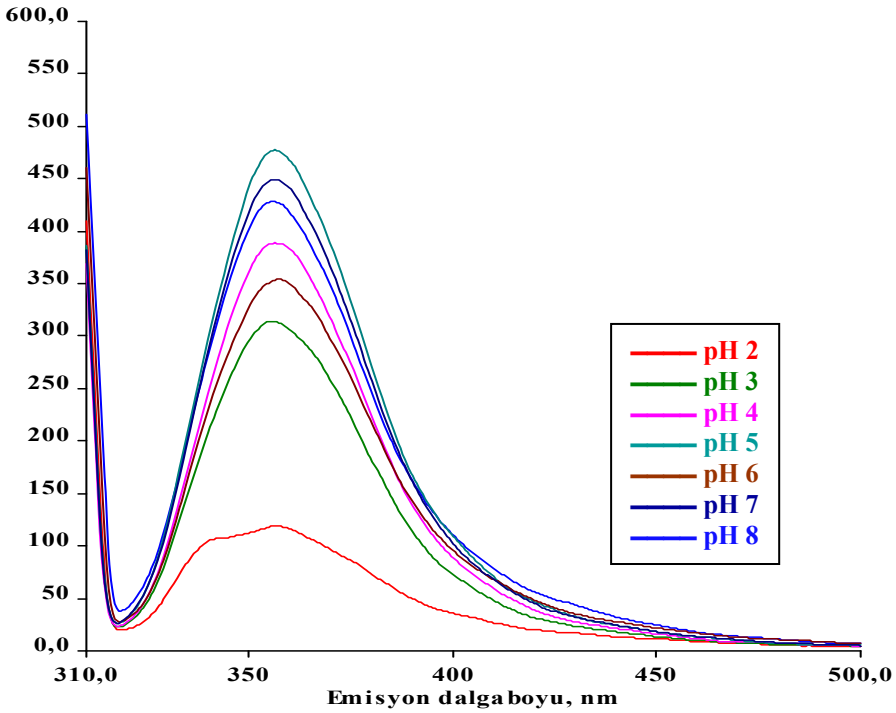
Şekil 5. 22. Prokainin %20 metanol-%80 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 305,43 nm).



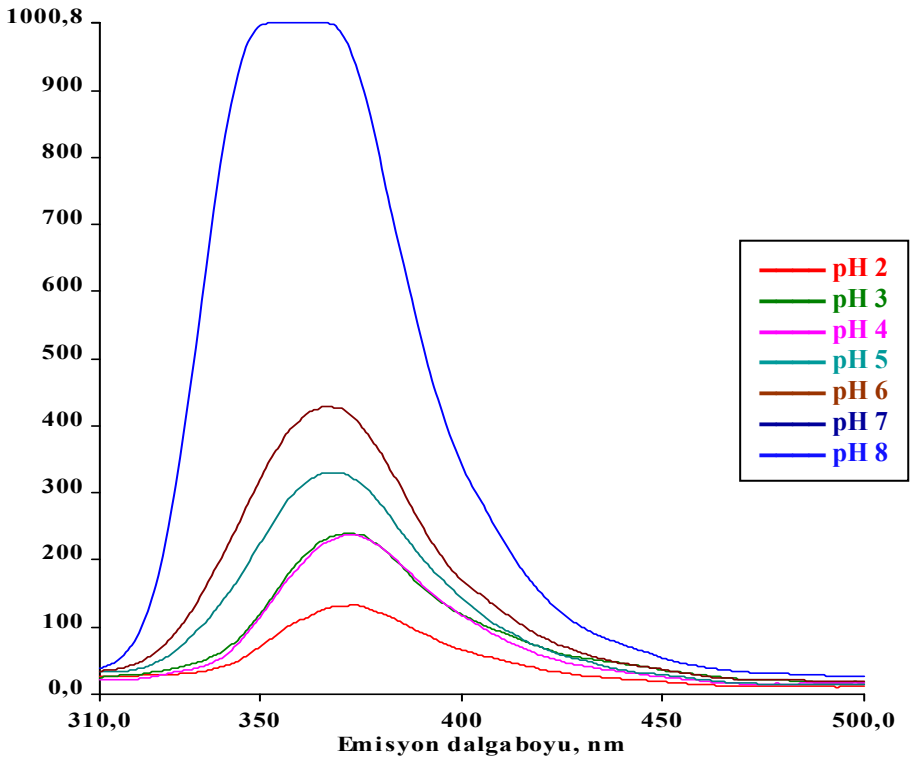
Şekil 5. 23. Prokainin %30 metanol-%70 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 305,43 nm).



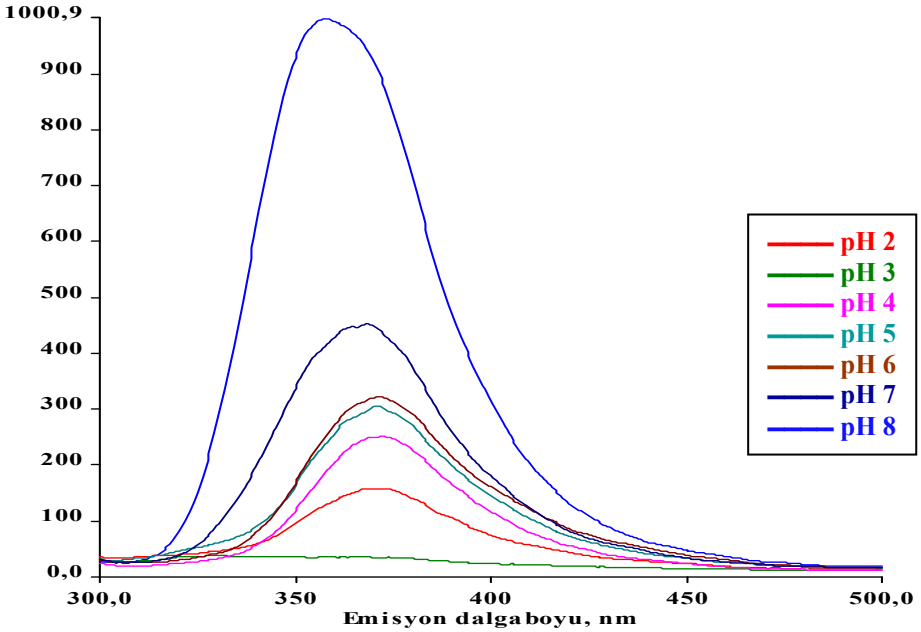
Şekil 5. 24. Prokainin %40 metanol-%60 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 305,43 nm).



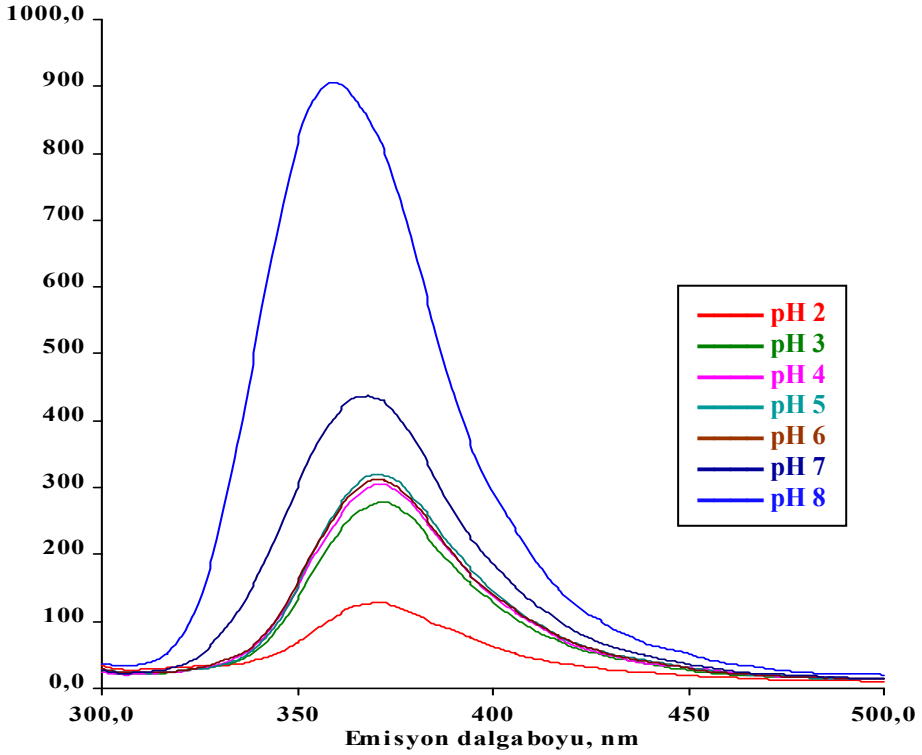
Şekil 5. 25. Prokainin %50 metanol-%50 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 305,43 nm).



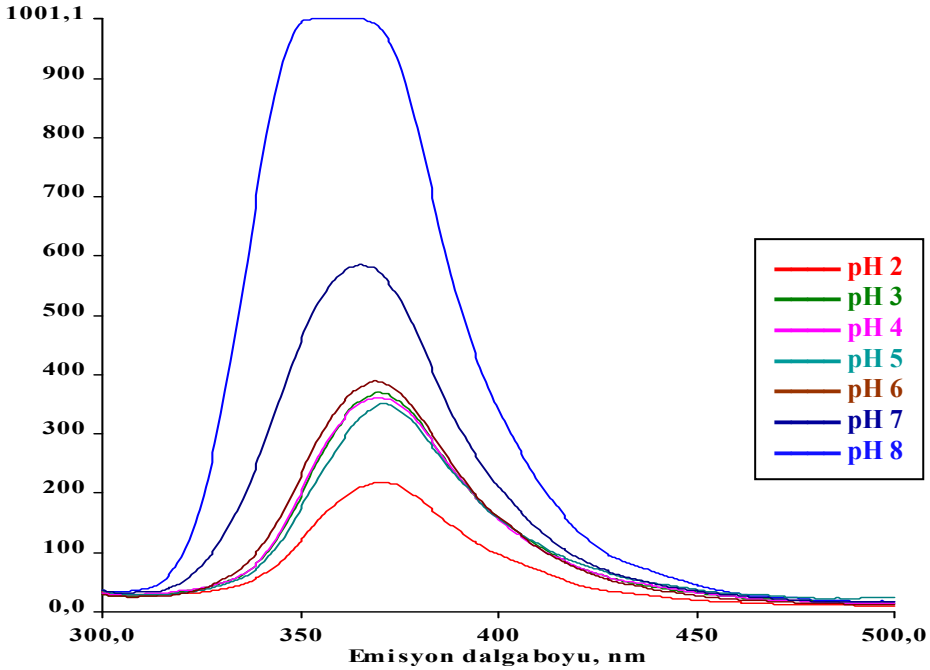
Şekil 5. 26. Tetrakainin %10 metanol-%90 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 266,56 nm).



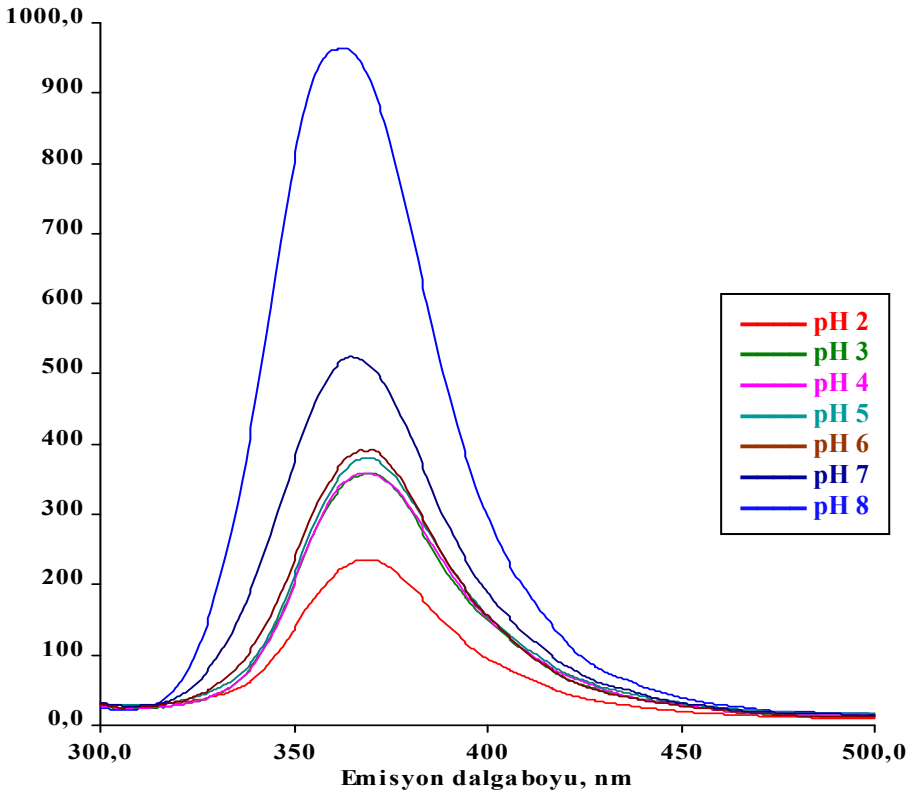
Şekil 5. 27. Tetrakainin %20 metanol-%80 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 266,56 nm).



Şekil 5. 28. Tetrakainin %30 metanol-%70 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 266,56 nm).



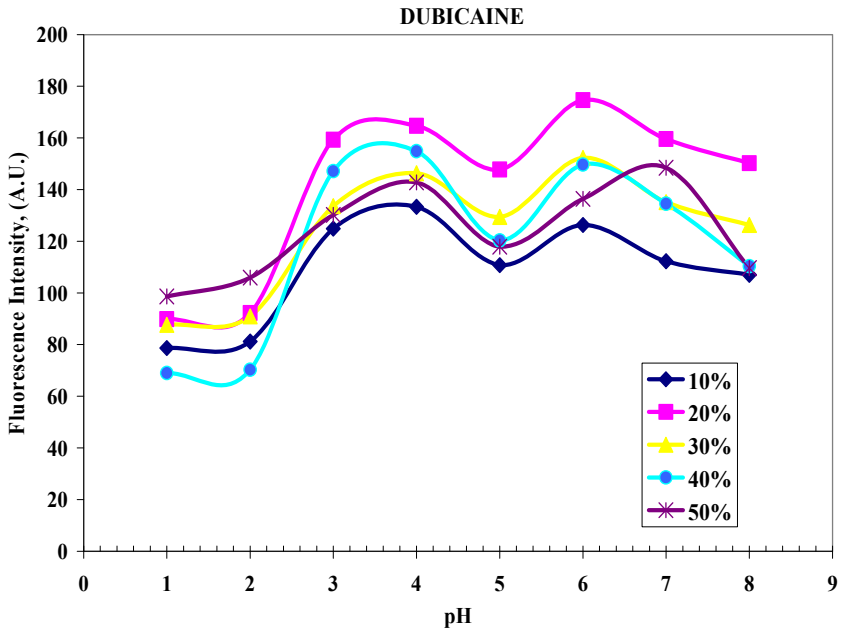
Şekil 5. 29. Tetrakainin %40 metanol-%60 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 266,56 nm).



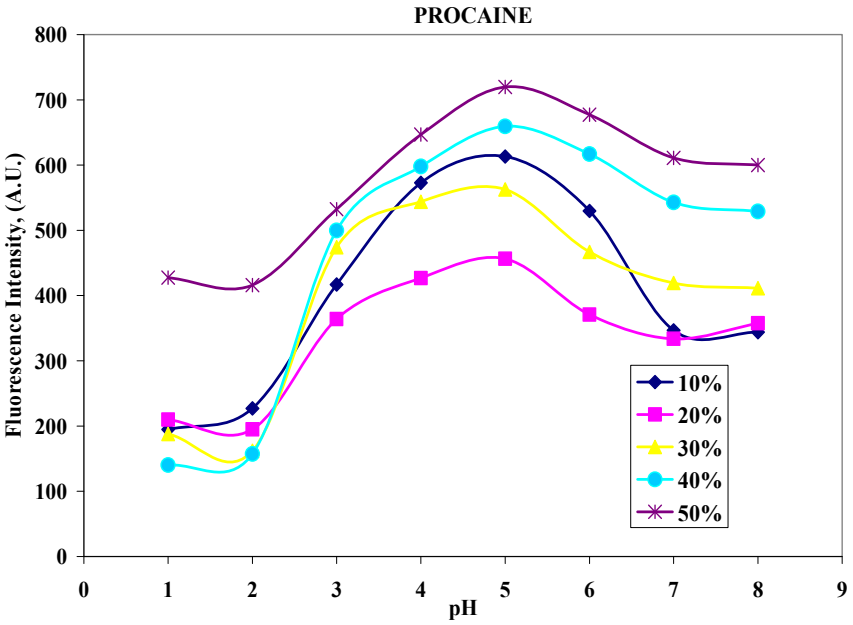
Şekil 5. 30. Tetrakainin %50 metanol-%50 su ortamlarında farklı pH değerlerindeki emisyon spektrumları (λuy= 266,56 nm).

5.1.5. Lokal Anestezik Maddelerin Farklı Yüzdedeki Asetonitril -Su Ortamlarındaki pH-Floresans Şiddeti Grafikleri

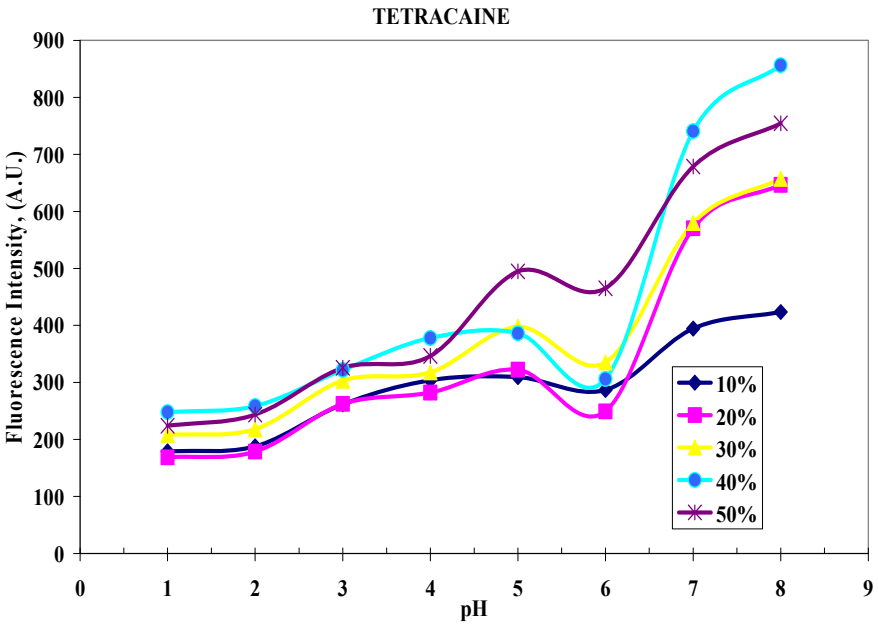
Lokal anestezik maddelerin %10-50 asetonitril sulu karışımlarında, pH 2-9 arasında optimum dalga boylarında floresans spektrumları alınarak, pH değerleri floresans şiddetine karşı grafiğe geçirilmiştir. Bu grafiklerden lokal anestezik maddelerin pKa değerleri belirlenmiştir ve deneysel pKa değerlerinin SPARC pKa hesaplama programından elde edilen değerlere de çok yakın olduğu görülmüştür.



Şekil 5. 31. %10 - %50 ACN sulu karışımlarında dibukainin pH-Floresans Şiddeti grafiği



Şekil 5. 32. %10 - %50 ACN sulu karışımlarında prokainin pH-Floresans Şiddeti grafiği



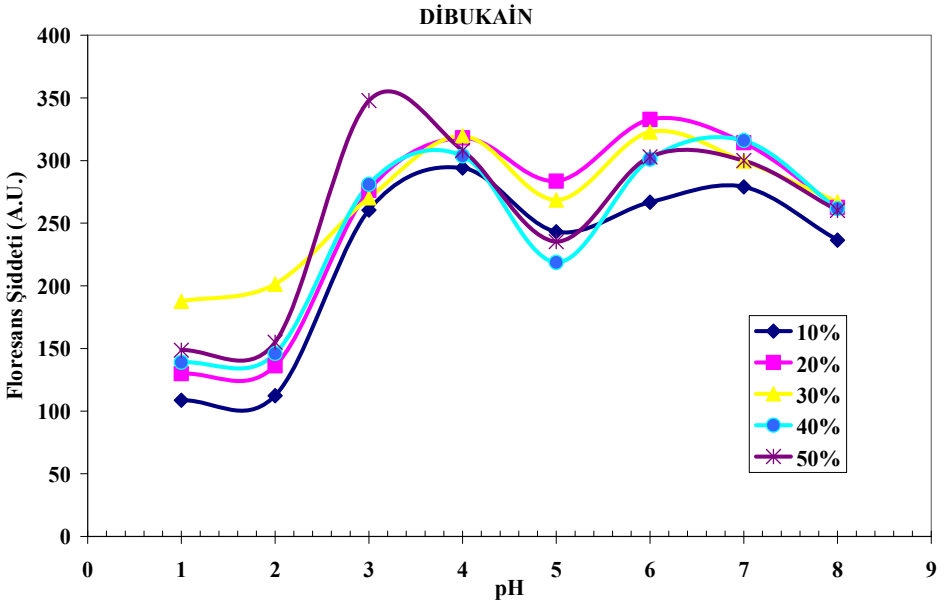
Şekil 5. 33. %10 - %50 ACN sulu karışımlarında tetrakainin pH-Floresans Şiddeti grafiği

Çizelge 5. 4. Lokal anesteziklerin % 10-50 asetonitril-su ortamlarındaki SPARC teorik pKa değerleri ile karşılaştırmalı pKa değerleri (n=3, n.d.= Bu çalışmada tayin edilemedi).

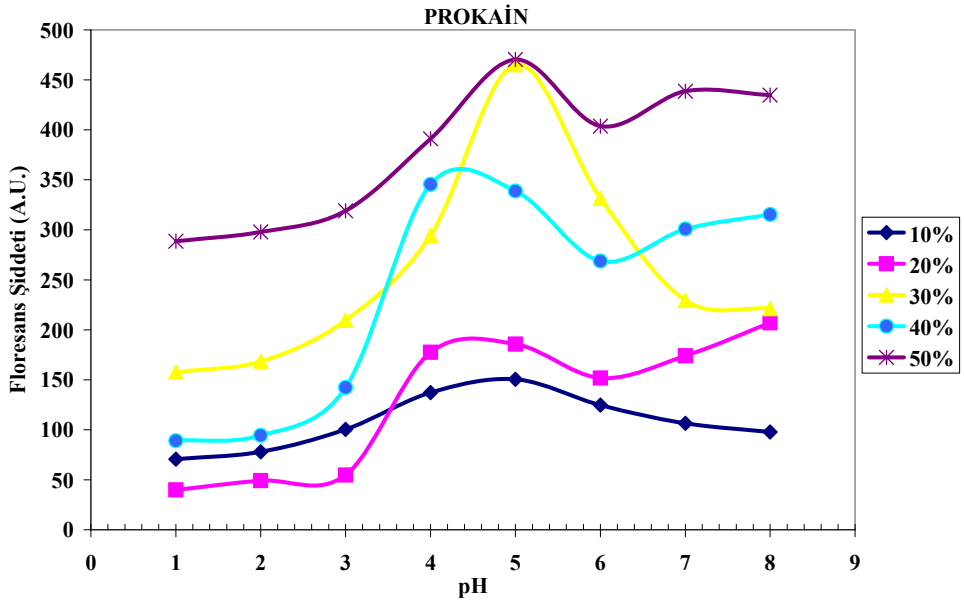
Bileşik	pKa Sayısı	SPARC pKa	Asetonitril Yüzdesi (% v/v)				
			10	20	30	40	50
Dibukain	1	3.35	2.80±0.07	2.53±0.04	3.25±0.06	2.52±0.09	3.05±0.05
	2	4.37	7.25±0.10	n.d.	n.d.	4.54±0.05	4.50±0.08
	3	4.94	n.d.	n.d.	n.d.	5.56±0.13	n.d.
	4	6.43	n.d.	n.d.	6.45±0.05	6.50±0.03	6.06±0.10
	5	7.02	7.22±0.08.	7.03±0.12	n.d.	7.52±0.12	7.52±0.12
	6	8.36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Prokain	1	2.24	2.83±0.05	2.50±0.06	2.63±0.07	2.54±0.09	3.62±0.05
	2	8.15	4.52±0.13	4.55±0.10	4.65±0.12	5.25±0.14	5.64±0.14
	3	8.85	6.62±0.08	7.50±0.04	6.58±0.08	7.22±0.08	6.67±0.15
Tetrakain	1	2.23	2.82±0.04	2.44±0.06	2.64±0.06	3.17±0.09	2.52±0.12
	2	2.89	n.d.	4.42±0.08	5.60±0.10	5.54±0.11	4.64±0.08
	3	8.08	7.24±0.14	7.42±0.12	7.23±0.08	7.74±0.15	7.44±0.05
	4	8.78	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

5.1.5. Lokal Anestezik Maddelerin Farklı Yüzdedeki Metanol -Su Ortamlarındaki pH-Floresans Şiddeti Grafikleri

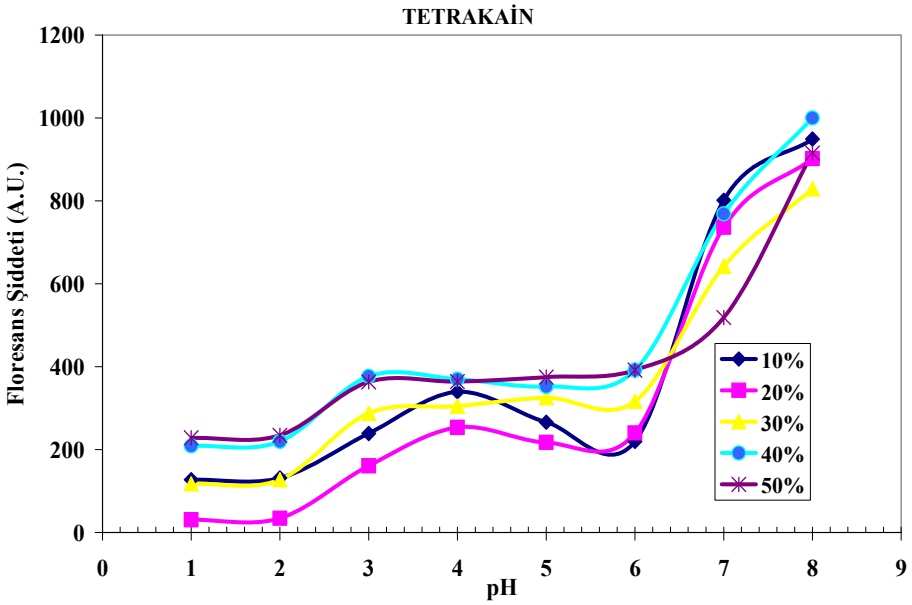
Lokal anestezik maddelerin %10-50 metanol sulu karışımlarında, pH 2-9 arasında optimum dalga boylarında floresans spektrumları alınarak, pH değerleri floresans şiddetine karşı grafiğe geçirilmiştir. Bu grafiklerden lokal anestezik maddelerin pKa değerleri belirlenmiştir ve deneysel pKa değerlerinin SPARC pKa hesaplama programından elde edilen değerlere de çok yakın olduğu görülmüştür.



Şekil 5. 34. %10 - %50 metanol sulu karışımlarında dibukainin pH-Floresans Şiddeti grafiği



Şekil 5. 35. %10 - %50 ACN sulu karışımlarında prokainin pH-Floresans Şiddeti grafiği



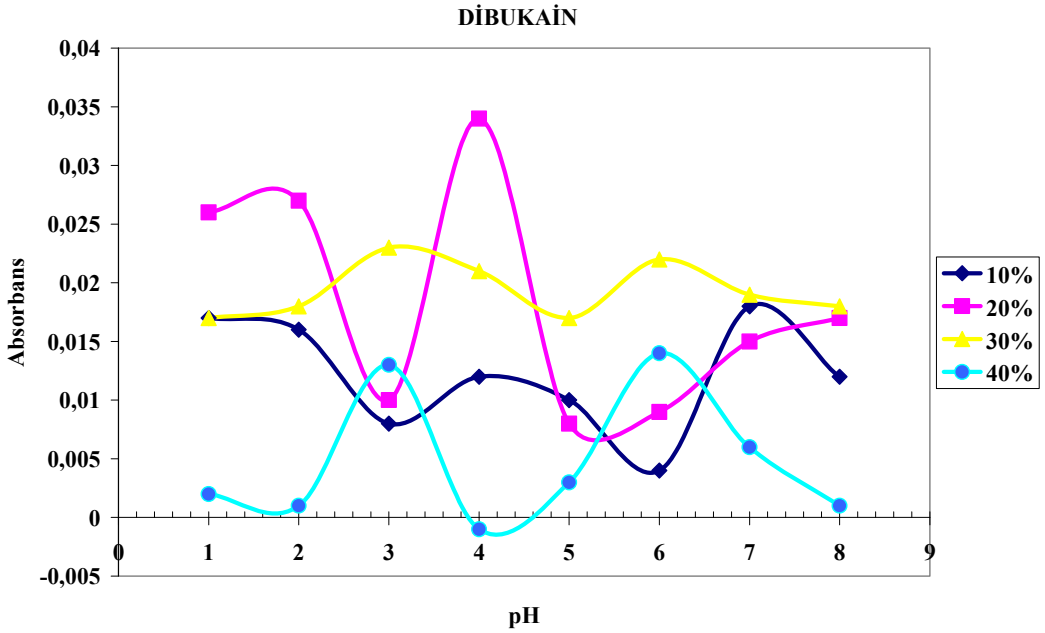
Şekil 5. 36. %10 - %50 ACN sulu karışımlarında tetrakainin pH-Floresans Şiddeti grafiği

Çizelge 5. 5. Lokal anesteziklerin % 10-50 metanol-su ortamlarındaki SPARC teorik pKa değerleri ile karşılaştırmalı pKa değerleri (n=3, n.d.= Bu çalışmada tayin edilemedi).

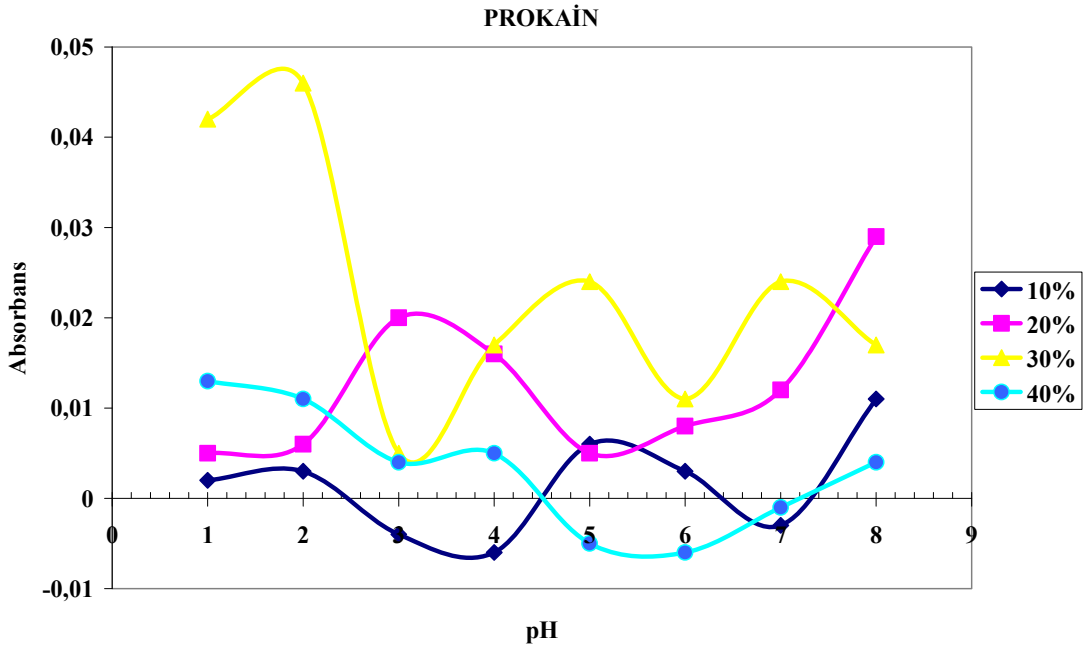
Bileşik	pKa Sayısı	SPARC pKa	Metanol Yüzdesi (% v/v)				
			10	20	30	40	50
Dibukain	1	3.35	2.85±0.06	2.85±0.08	3.23±0.05	2.65±0.04	2.83±0.05
	2	4.37	7.53±0.09	5.40±0.07	4.57±0.10	4.55±0.03	3.55±0.06
	3	4.94	n.d.	n.d.	5.64±0.15	5.54±0.11	4.50±0.09
	4	6.43	n.d.	n.d.	n.d.	6.64±0.08	5.52±0.16
	5	7.02	n.d.	7.25±0.12	7.03±0.08	7.57±0.10	7.50±0.11
	6	8.36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Prokain	1	2.24	3.51±0.07	2.53±0.09	2.84±0.05	2.43±0.08	3.22±0.07
	2	8.15	6.42±0.15	4.52±0.18	5.24±0.10	4.55±0.15	5.44±0.14
	3	8.85	n.d.	7.24±0.05	n.d.	5.84±0.08	7.40±0.16
Tetrakain	1	2.23	2.45±0.09	2.40±0.08	2.61±0.07	2.60±0.10	2.64±0.17
	2	2.89	5.02±0.16	4.62±0.05	n.d.	n.d.	n.d.
	3	8.08	7.64±0.19	7.52±0.15	7.27±0.13	7.25±0.18	7.28±0.14
	4	8.78	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

5.2.1. Lokal Anestezik Maddelerin Farklı Yüzdedeki Asetonitril –Su Ortamlarındaki pH-Absorbans Grafikleri

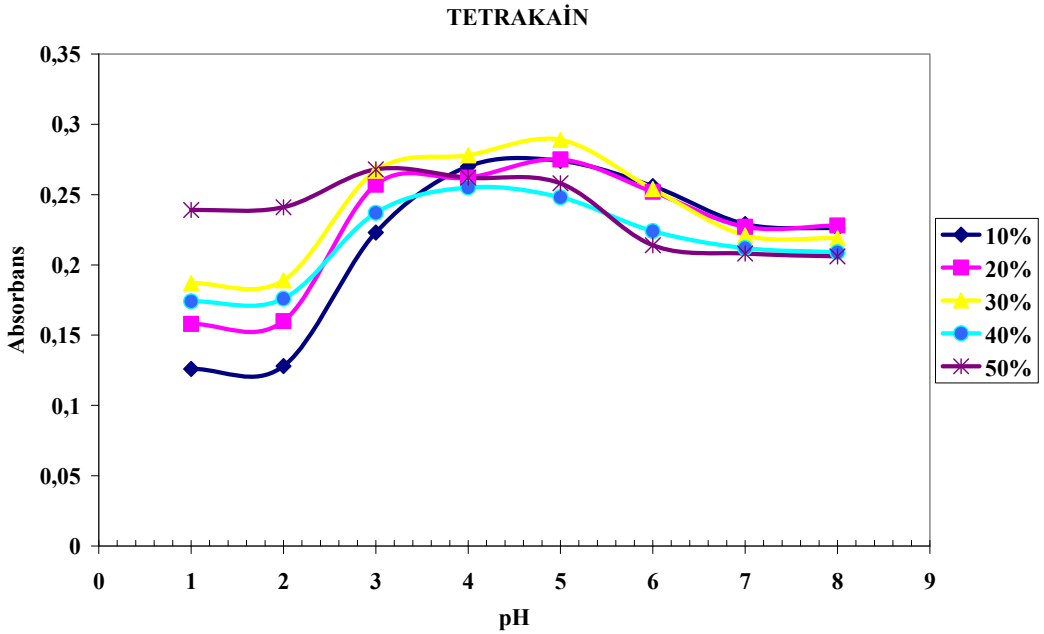
Lokal anestezik maddelerin %10-50 asetonitril sulu karışımlarında, pH 2-9 arasında optimum absorbans dalga boyunda absorpsiyon değerleri ölçülerek, pH değerleri absorbansa karşı grafiğe geçirilmiştir. Bu grafiklerden lokal anestezik maddelerin pKa değerleri belirlenmiştir ve deneysel pKa değerlerinin SPARC pKa hesaplama programından elde edilen değerlere de çok yakın olduğu görülmüştür.



Şekil 5. 37. %10 - %50 ACN sulu karışımlarında dibukainin pH-Absorbans grafiği (λ=247 nm)



Şekil 5. 38. %10 - %50 ACN sulu karışımlarında prokainin pH-Absorbans grafiği (λ=227 nm)



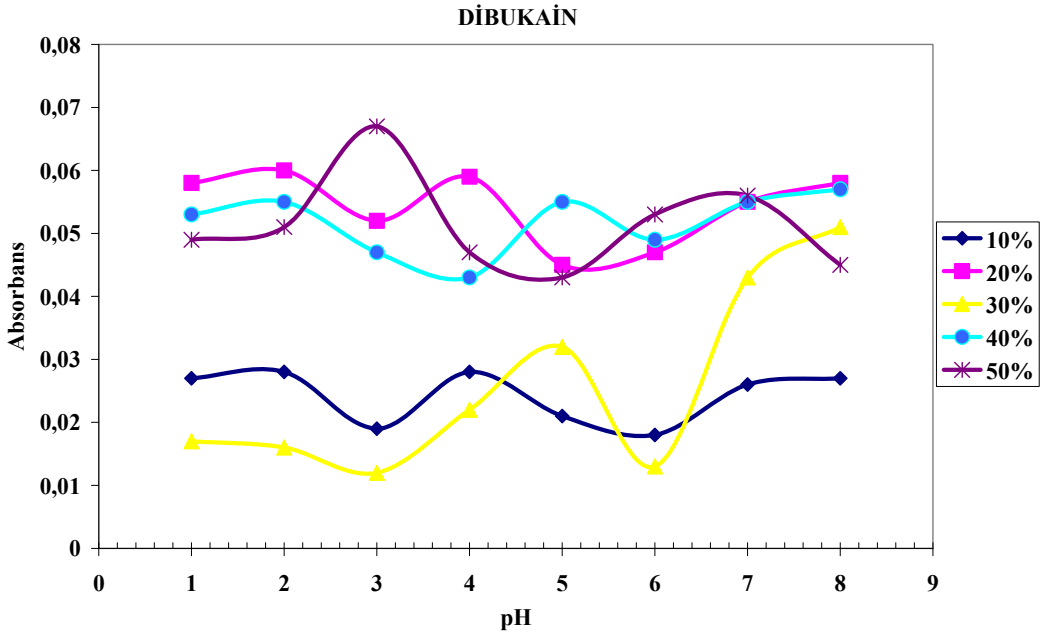
Şekil 5. 39. %10 - %50 ACN sulu karışımlarında tetrakainin pH-Absorbans grafiği (λ=313 nm)

Çizelge 5. 6. Lokal anesteziklerin % 10-50 asetonitril-su ortamlarındaki SPARC teorik pKa değerleri ile karşılaştırmalı pKa değerleri (n=3, n.d.= Bu çalışmada tayin edilemedi).

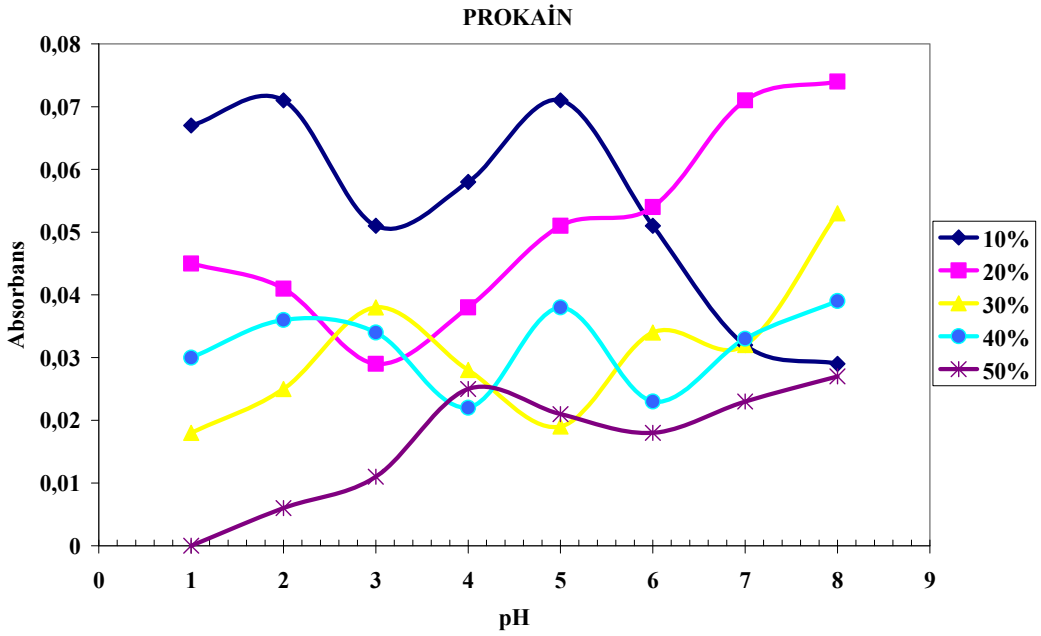
Bileşik	pKa Sayısı	SPARC pKa	Asetonitril Yüzdesi (% v/v)				
			10	20	30	40	50
Dibukain	1	3.35	2.50	2.50	3.50	2.40	
	2	4.37	3.50	3.50	4.20	3.50	
	3	4.94	5.20	4.50	5.50	5.20	
	4	6.43	6.70	6.50	n.d.	n.d.	
	5	7.02	7.50	n.d.	7.00	6.80	
	6	8.36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	
Prokain	1	2.24	2.90	2.50	2.40	2.50	
	2	8.15	6.20	6.20	6.50	4.60	
	3	8.85	7.60	7.50	7.50	7.00	
Tetrakain	1	2.23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	2.89	2.80	2.60	2.60	2.60	2.60
	3	8.08	6.60	6.50	6.20	6.00	5.80
	4	8.78	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

5.2.2. Lokal Anestezik Maddelerin Farklı Yüzdedeki Metanol -Su Ortamlarındaki pH-Absorbans Grafikleri

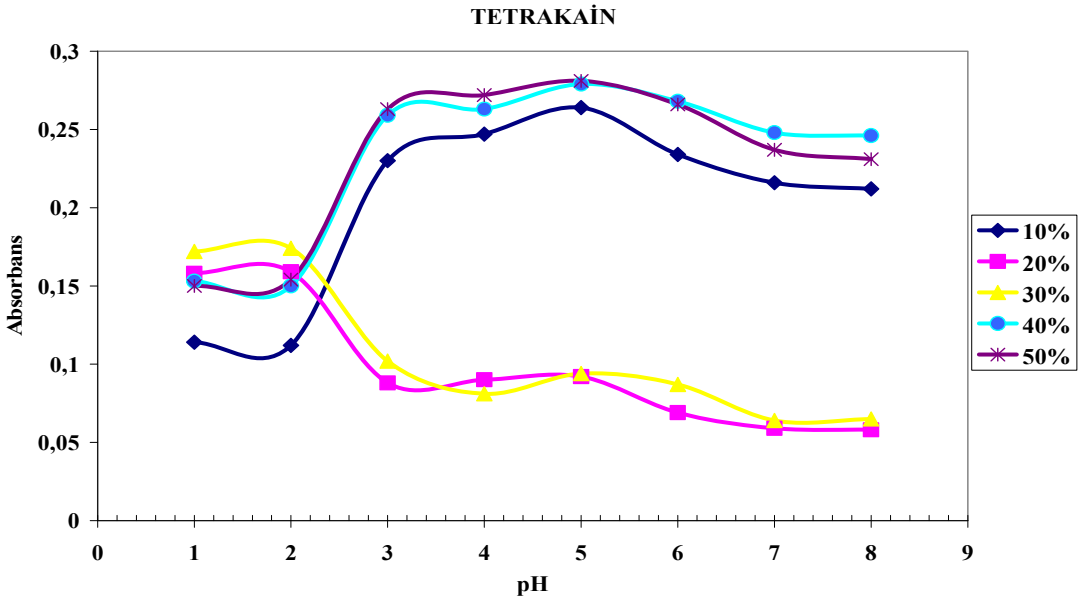
Lokal anestezik maddelerin %10-50 metanol sulu karışımlarında, pH 2-9 arasında optimum absorbans dalga boyunda absorpsiyon değerleri ölçülerek, pH değerleri absorbansa karşı grafiğe geçirilmiştir. Bu grafiklerden lokal anestezik maddelerin pKa değerleri belirlenmiştir ve deneysel pKa değerlerinin SPARC pKa hesaplama programından elde edilen değerlere de çok yakın olduğu görülmüştür.



Şekil 5. 40. %10 - %50 Metanol sulu karışımlarında dibukainin pH-Absorbans grafiği (λ=317 nm)



Şekil 5. 41. %10 - %50 Metanol sulu karışımlarında prokainin pH-Absorbans grafiği (λ=222 nm)



Şekil 5. 42. %10 - %50 Metanol sulu karışımlarında tetrakainin pH-Absorbans grafiği (λ=228 nm)

Çizelge 5. 7. Lokal anesteziklerin % 10-50 metanoll-su ortamlarındaki SPARC teorik pKa değerleri ile karşılaştırmalı pKa değerleri (n=3, n.d.= Bu çalışmada tayin edilemedi).

Bileşik	pKa Sayısı	SPARC pKa	Metanol Yüzdesi (% v/v)				
			10	20	30	40	50
Dibukain	1	3.35	2.50	2.50	2.40	2.40	2.50
	2	4.37	3.50	3.50	4.00	3.50	3.50
	3	4.94	5.00	4.50	5.50	5.20	5.50
	4	6.43	6.50	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	5	7.02	n.d.	6.80	6.80	6.80	n.d.
	6	8.36	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	7.20
Prokain	1	2.24	2.50	2.40	2.00	3.40	2.40
	2	8.15	4.00	4.20	4.10	4.50	5.20
	3	8.85	6.20	6.70	7.50	7.00	7.20
Tetrakain	1	2.23	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	2	2.89	2.80	2.40	2.80	2.80	2.80
	3	8.08	6.00	6.00	6.50	6.40	6.40
	4	8.78	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

6. SONUÇ

Bu çalışma; hem pKa değerleri bulunmayan hem de bilindiği halde daha kesin olarak belirlenmesinin uygun olacağı düşünülen bazı lokal anestezik ilaçların etken maddelerin pKa' larının tayin edilmesi amacıyla yapılmıştır. Bu amaçla çok sayıda lokal anestezik madde kullanılmış, ancak bunlardan benzer molekül yapısına sahip olmasından dolayı tetrakain, prokain ve dibukain ile çalışılmıştır. Lokal anestezik ilacın etki başlama süresinde en önemli faktör ajanın pKa'sıdır ve lokal anesteziğin pKa'sı ne kadar fizyolojik pH'ya yakınsa etkisi o kadar çabuk başlar. Bu nedenle çalışılan lokal anestezik maddelerin pKa'larının doğru bir şekilde tayin edilmesi için uygun çözücüde ve uygun konsantrasyonda çalışılmaya dikkat edilmiştir. Lokal anestezik maddelerin floresans özelliklerine dayalı olan bu çalışma, az zaman alması, daha az reaktif ve çözücü gerektirmesi, daha duyarlı, güvenilir ve tekrarlanabilir olmasından dolayı yöntemi seçici kılmıştır.

Lokal anestezik maddeler molekül yapılarından da görüleceği gibi, primer, sekonder ve tersiyer amino fonksiyonlu gruplarına sahiplerdir. Lokal anestezik maddelerin pH 1-8 aralığında, farklı florimetrik özelliklere sahip iyonlaşmış türler oluşturdukları gözlenmiştir. Tetrakainin özellikle asetonitril-su ortamlarında hemen hemen bütün iyonik türleri, dibukain ve prokainin ise asidik türleri floresent iken, dibukain ve prokainin bazik türleri floresent olmadığı tespit edilmiştir. Metanol-su ortamlarında, asetonitril ortamlarındakinden biraz daha farklı durumlar söz konusudur. Bu ortamlarda bazı iyonik türler asetonitril-su ortamlarındakinin tam tersi bir davranış sergilemiştir. Ancak buna rağmen her iki ortamda da elde edilen sonuçlar birbirine oldukça yakındır. Ayrıca spektroflorimetrik yöntemle tayin edilen pKa değerlerinin, SPARC on-line pKa hesaplama programında elde edilen değerlere de yakın olduğu görülmüştür. Lokal anestezik maddelerin pKa değerleri spektrofotometrik olarak da tayin edilmiş ve elde edilen sonuçların florimetrik yöntem ile elde edilenlerle ve SPARC sonuçlarıyla yakın olduğu belirlenmiştir. Tez önerisinde üçüncü bir yöntemin uygulanacağı ifade edilmişdi, ancak tezin oldukça kapsamlı olması, lokal anestezik maddelerin standartlarının elimizde çok az miktarda olması ve tez süresinin kısıtlı olmasından dolayı yapılamamıştır.

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

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

7. KAYNAKLAR

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

Akbay N., 2009, Yeni Floresan Probların Dsdna İle Bağlanma Mekanizmaları: Spektral Lüminesans Yöntemleri İle Çalışmalar, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi, Ankara.

Altınordu Z., 2008, Su Ve Su-Organik Çözücü İkili Karışımlarında İyonlaşma Sabitlerinin Tayini, Yüksek Lisans Semineri, Konya.

Babic´ S., Horvat Alka J.M., Mutavdz˘İc´ Pavlovic´ D., Kas˘Telan-Macan M., 2007. Determination Of Pka Values Of Active Pharmaceutical İngredients. Trends İn Analytical Chemistry, Vol., 26, No. 11.

Barbosa, J., Berges, R., Sanz-Nebot, V., 1996. "Solvatochromic parameter values and pH in aqueous-organic mixures used in liquid chromatography. Prediction of Retention of a Series of Quinolones." Journal of Chromatography A, 719, 27-36

Barbosa J., Barrón D. , Jiménez-Lozano E., Sanz-Nebot V., 2001. Comparison Between Capillary Electrophoresis, Liquid Chromatography, Potentiometric And Spectrophotometric Techniques For Evaluation Of Pka Values Of Zwitterionic Drugs İn Acetonitrile–Water Mixtures. Analytica Chimica Acta, 437, 309–321.

Barbosa, J., Barron, D., Beltran, J., L., Sanz-Nebot, V., 1995. Pkpot, A Program For Potentiometric Study Of İonic Equilibria İn Aqueous And Non-Aqueous Media. Analitica Chimica Acta, 317, 75-81.

Barbosa, J., Toro, I., Sanz-Nebot, V., 1998b. Secondary Chemical Equilibria İn High - Performance Liquid Chromatography: Influence Of İonic Strenght and pH on retention of peptides. Journal of Chromatography A, 823, 497-509.

Beltran, J., L., Sanli, N., Fonrodona, G., Barron, D., Ozkan, G., Barbosa, J., 2003. Spectrophotometric, Potentiometric And Chromatographic Pka Values Of Polyphenolic Acids İn Water And Acetonitrile-Water Media. Analitica Chimica Acta, 484, 253-264.

Bökesoy T., A; Çakıcı İ.; Melli M.; 2000, Farmokoloji Ders Kitabı, Gazi Kitabevi, Ankara.

Currie Christa A. , Heinemana William R., Halsall H. Brian , Seliskar Carl J., Limbach Patrick A. , Arias F., Wehmeyer Kenneth R., 2005. Estimation Of Pka Values Using Microchip Capillary Electrophoresis And İndirect Fluorescence Detection. Journal Of Chromatography B, 824, 201–205.

Erdemgil F. Z., Şanli S., Şanli N., Özkan G., Barbosa J., Guiteras J. and Beltrán J. L., 2007, "Determination Of Pka Values Of Some Hydroxylated Benzoic Acids İn Methanol-Water Binary Mixtures By Lc Methodology And Potentiometry" Talanta, Volume 72, Issue 2, Pages 489-496.

Escuder-Gilabert L., Sagrado S., Villanueva-Camanas R. M., Medina-Herna´Ndez M. J., 1998. Quantitative Retention-Structure And Retention-Activity Relationship Studies Of Local Anesthetics By Micellar Liquid Chromatography. Anal. Chem., 70, 28-34.

Espinosa S., Bosch E., Rose´S M., 2002, Retention Of İonizable Compounds İn High-Performance Liquid Chromatography 14. Acid–Base Pk Values İn Acetonitrile–Water Mobile Phases. Journal Of Chromatography A, 964, 55–66.

Günaydın B., Demiryürek A.T., 2003, Effects Of Tetracaine And Bupivacaine On Chemiluminescence Generated By Formly-Methionly-Leucyl- Phenylalanine - Stimulated Human Leykocytes And Cell- Free Systems. International Immuropharmocology 3, 757-764.

Gündüz B. S., 1995, Fotolüminesans Ve Analitik Uygulama Alanları, Doktora Semineri, Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.

Gündüz, T., 1999. İnstrümental Analiz, Gazi Kitabevi, Ankara

http://tr.wikipedia.org/wiki/Spektroskopi, 2010

http://www.clinchem.net/Lab/Yontem/Analitik%20Yontemler/Fotometrik/calisma_prensibi.htm

Kaliszan R. , Haber P., Baczek T. , Siluk D. , Valko K., 2002. Lipophilicity And Pk Estimates From Gradient High-Performance A Liquid Chromatography. Journal Of Chromatography A, 965, 117–127.

Kılıç E.; Köseoğlu F.; Yılmaz H.; Enstrümental Analiz İlkeleri, Bilim Yayıncılık.

Köksal N. A., 2006, Bazı Triazoltiyon Ve Oksadiazoltiyon Türevlerinin Protanasyon Ve Kompleks Kararlılık Sabitlerinin Potansiyometrik Ve Spektrofotometrik Yöntemlerle Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Elazığ.

Lakowicz, J.R., Principles Of Fluorescence Spectroscopy, Plenum Press, New York And London, (1986)

Lorite G. S., Nobre T. M., Zaniquelli M. E. D., Paula E., Cotta M. A. , 2009, Dibucaine Effecets On Structural And Elastic Properties Of Lipid Bilayers, Biophysical Chemistry 139, 75-83.

Mert T., 1997, Lokal Anesteziklerin Tonik Ve Fazik Etkilerinin Sukroz-Gap Tekniği İle İncelenmesi, Master Tezi, Çukurova Üniversitesi, Adana.

Subirats X., Bosch E., Rosés M., 2006, "Retention Of İonisable Compounds On High-Performance Liquid Chromatography Xvı. Estimation Of Retention With Acetonitrile/Water Mobile Phases From Aqueous Buffer Ph And Analyte Pka", Journal Of Chromatography A, Volume 1121, Pages 170-177.

Şahin H., 2006, Schiff Bazları Kullanarak Bazı Metal İyonlarının Spektrofotometrik Ve Spektrofluorometrik Yöntemle Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Konya.

Şanlı N., 2007, Bazı Sülfonamitlerin Sıvı Kromatografi Yöntemi İle Tayini , Doktora Tezi, Isparta.

Şanlı N., Fonrodona G., Barbosa J., Ozkan G., Beltran J. L., 2005, "Modelling Retention İn Liquid Chromatography Of Polyphenolic Acids-Prediction Of Solvent Composition And Ph Of The Mobile Phase", Analytica Chimica Acta, 537, 53-61.

Şanlı N., Fonrodona G., Barrón D.,Özkan G., and Barbosa J., 2002, "Prediction Of Chromatographic Retention, Pka Values And Optimization Of The Separation Of Polyphenolic Acids İn Strawberries" Journal Of Chromatography A, Volume 975, Issue 2, Pages 299-309.

Takacs-Novak, K., Box, K., J., Avdeef, A. 1997. Potentiometric Pka Determination Of Water-İnsoluble Compounds: Validation Study İn Methanol/Water Mixtures. International Journal Of Pharmaceutics, 151, 235-248.

Türker Şener L., 2006, Floresans Spektroskopisi Yöntemlerinin Biyolojik Etkileşimlerinin Ve Enzimatik Etkinliklerinin İncelenmesinde Kullanımı. Yüksek Lisans Tezi, İstanbul.

Uyar M., Ders Notları.

Volgyi G. , Ruiz R. , Boxc K., Comerc J., Bosch E., Tak´Acs-Nov´Ak K., 2007. Potentiometric And Spectrophotometric Pka Determination Of Water-İnsoluble Compounds: Validation Study İn A New Cosolvent System. Analytica Chimica Acta, 583, 418–428.

Wan H., Holmén A., Någård M., Lindberg W., 2002, "Rapid Screening Of Pk Values Of Pharmaceuticals By Pressure- Assisted Capillary Electrophoresis Combined With Short-End İnjection", Journal Of Chromatography A, Volume979, Pages 369-377.

www.gazi.edu.tr

www.istanbul.edu.tr

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : Zeynep ALTINORDU
Uyruğu : TC
Doğum Yeri ve Tarihi : KIZILCAHAMAM 20.09.1984
Telefon : 0554 318 78 36
Faks :
e-mail : zeynep_altin_ordu@hotmail.com

EĞİTİM

Derece			**Bitirme Yılı**
Lise	:	Etlik Lisesi (Süper Lise)	2002
Üniversite	:	Selçuk Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü	2007
Yüksek Lisans	:	Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü	
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
	-	

UZMANLIK ALANI Spektroskopik Yöntemler

YABANCI DİLLER İngilizce

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

KATILDIĞI BİLİMSEL TOPLANTILAR

- VIII Ulusal Kromatografi Kongresi, 9-11 Haziran, Isparta, 2008
- 1st International Türkiye-Pakistan Chemistry Days, 27-28 Nisan, Konya-Türkiye, 2007