



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI ANTİENFLAMATUAR İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE İYONLAŞMA SABİTLERİNİN TAYİNİ

Sema Melike ERDEN (GÜZEL)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalını

2016

KONYA

Her Hakkı Saklıdır

TEZ BİLDİRİMİ

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

DECLARATION PAGE

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

İmza

SEMA MELİKE ERDEN(GÜZEL)

Tarih:

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI ANTİENFLAMATUAR İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE İYONLAŞMA SABİTLERİNİN TAYİNİ

Sema Melike ERDEN (GÜZEL)

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya anabilim Dalı

Danışman: Doç.Dr. S. Beniz GÜNDÜZ

Yıl, … Sayfa (Örnek: 2016, 92 Sayfa)

Jüri
Danışmanın Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI

Steroid olmayan (nonsteroid) antienflamatuvar ilaçlar (NSAEİ'ler) aspirin ailesindeki ilaçları da kapsayan çok geniş bir ilaç grubudur. Çeşitli artrit türlerinde inflamasyonu azaltmak ve ağrı, şişlik ve katılığı kontrol altına almak için reçete edilirler. Narkotik olmayan analjeziklere göre bu grup ilaçların farmakolojik etki profiline uygun düşen bir adla steroid olmayan (nonsteroid) antienflamatuvar ilaçlar (NSAEİ'ler) veya kısaca antienflamatuvar analjezikler denilmektedir. Nonsteroid antienflamatuar ilaçların özellikle de oksikamların iyonlaşma sabitlerinin birkaç uygun yöntem ile tam olarak tayini, etki mekanizmalarının anlaşılmasında ve biyoyararlanabilirlikleri açısından oldukça önemlidir. Farmakolojik açıdan bu kadar önemli olan bu ilaç grubunun, iyonlaşma sabitlerinin doğru ve hassas bir şekilde tayin edilmesi de büyük bir önem arz etmektedir.

Bu tez kapsamında öncelikle NSAEİ'lerin organik çözücü-su ortamlarında florimetrik parametreleri (uyarma ve emisyon dalga boyu, floresans şiddeti) belirlenmiştir. Florimetrik parametrelerin belirlenmesi için, öncelikle saf asetonitril, metanol, DMF, THF ve su içerisinde, daha sonra %10 - %50 organik çözücü su karışımlarında ilaç etken maddelerinin uygun derişimlerdeki çözeltileri hazırlanarak, uyarma dalga boyları 10' ar nm aralıklarla değiştirilip emisyon spektrumları alınmış ve her bir ilaç etken maddesinin, her bir organik çözücü-su ortamında maksimum floresans şiddetine sahip oldukları uyarma ve emisyon dalga boyları belirlenmiştir. NSAEİ'ler molekül yapılarında fenolik (-OH) ve amin (-NH) grupları gibi, asidik ve bazik fonksiyonlu gruplara sahip olduklarından, optimum koşullarda %10-40 asetonitril-su ortamlarında, bu ilaç etken maddelerinin iyonlaşma sabitleri spektroflorimetrik ve spektrofotometrik yöntemlerle hem pH-floresans şiddeti grafiklerinden hem de pKa değerlerini deney koşullarında hesaplayan bir bilgisayar programı olan STAR programıyla iyonlaşma sabitleri tayin edilmiştir. Deneysel yöntemlerle elde edilen pKa değerleri, SPARC programından (online teorik pKa hesaplama programı) hesaplanan teorik pKa değerleriyle karşılaştırılmıştır. Ancak tenoksikam dışında diğerleri (meloksikam ve piroksikam) için, spektroflorimetrik yöntem kullanılarak iyonlaşma sabitleri tam olarak belirlenememiştir.

Anahtar Kelimeler: Steroid olmayan antienflamatuar ilaçlar, oksikamlar, meloksikam, piroksikam, tenoksikam, pKa, Spektroflorimetri, Spektrofotometri

ABSTRACT

MS THESIS

DETERMINATION OF THE IONIZATION CONSTANTS OF SOME ANTI-INFLAMMATORY DRUG ACTIVE SUBSTANCES BY USING SPECTROSCOPIC METHODS

Sema Melike ERDEN (GÜZEL)

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

Advisor: Doç.Dr. S. Beniz GÜNDÜZ

2016, 92 Pages

Jury
Advisor Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI

Non-steroidal antiinflammatory drugs (NSAI) is a wide group of medications which contain drugs of the aspirin family. They are prescribed for the various forms of arthritis to reduce the inflammation and control the pain, edema and rigidity. They are termed as non-steroidal antiinflammatory or shortly antiinflammatory analgesics due to their pharmacological profile compared to non-narcotic analgesics. It is important to determine the exact ionization constants of non-steroidal antiinflammory drugs especially the oxicams using several suitable methods is essential for understanding the mechanism of action and bioavailability. Also the exact and precise determination of the ionization constants of these pharmacologically important drugs is of upmost importance.

For this reason in this study, the fluorimetric parameters of NSAEIs in organic solvent-water media are determined. In order to specify the fluorimetric parameters (excitation and emission wavelength, fluorescence intensity), the efficient drug components were prepared at suitable concentrations primarily in acetonitrile, methanol, DMF, THF and in pure water, and then in 10-50 % organic solvent-water mixtures. The emission spectra were obtained by changing the excitation wavelength at 10 nm intervals and the excitation and emission wavelengths were determined for every efficient drug molecule, in every organic solvent-water medium in which they had the maximum fluorescence intensity. Since NSAEIs contain acidic and basic functional groups such as phenolic (-OH) and amine (-NH) groups, under optimum conditions, 10-40 % acetonitrile-water medium, the effective drug materials' ionization constants were determined by spectrofluorimetric and spectrofluorimetric methods both from the pH-fluorecence intensity graphics and from the STAR programme which calculates the pKa values during experimental conditions. The pKa values obtained experimentally were compared to theoretic pKa values obtained from SPARC programme (online theoretic pKa calculation programme). However except tenoxicam, the ionization constants using spectrofluorimetric method could not be exactly determined for the other drugs (meloxicam and piroxicam).

Key Words: Nonsteroidal anti-inflammatuary drugs, oxicams, meloxicam, piroxicam, tenoxicam, pKa, Spectrofluorimetry, Spectrofotometry.

ÖNSÖZ

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

Öncelikle tez çalışmamın planlanmasında, araştırılmasında, yürütülmesinde ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, yönlendirme ve bilgilendirmeleriyle çalışmamı bilimsel temeller ışığında şekillendiren, bana çalışmamın belli bir bölümünü Barselona Üniversitesinde (Universitat de Barcelona) devam ettirme şansı veren sayın hocam Doç Dr. S. Beniz GÜNDÜZ'e, Barselona'da bulunduğum süre içerisinde benden yardımlarını esirgemeyen Dr. José Luis Beltrán Abadía' ya ve tezimin yazımında emeği olan Orkide ÖZHAVZALI'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ayrıca tüm eğitim hayatım boyunca maddi ve manevi destekleri ile her zaman yanımda olan sevgili aileme de teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tez çalışmamın benden sonraki arkadaşlarıma yardımcı olmasını ümit ediyorum.

Sema Melik ERDEN

Konya, 2016

İÇİNDEKİLER

TEZ KABUL VE ONAYI ..... **II**
TEZ BİLDİRİMİ ..... **III**
ÖZET ..... **IV**
ABSTRACT ..... **V**
ÖNSÖZ ..... **VI**
İÇİNDEKİLER ..... **VII**
ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **X**
ÇİZELGELER LİSTESİ ..... **XI**
SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **xii**
1.GİRİŞ **1**
2.TEORİK KISIM **3**
2.1. Nonsteroid (steroid olmayan) antienflamatuvar ilaçlar (NSAEİ'ler) 3
2.1.1. Oksikam türevleri 3
2.1.1.1. Piroksikamın fiziksel ve kimyasal özellikleri 3
2.1.1.2. Piroksikamın Kimyasal Yapısı ve SPARC Programı İle Hesaplanan Maksimum pKa Değerleri 4
2.1.1.3. Piroksikam için miktar tayini ve tanıma yöntemleri 6
2.1.1.4. Tenoksikamın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri 6
2.1.1.5. Tenoksikamın Kimyasal Yapısı ve SPARC Programı İle Hesaplanan Maksimum pKa Değerleri 7
4-hidroksi-2-metil-N-2-piridil-2 H-tieno(2,3-e)-1,2-tiazin-3-karboksamid-1,1 dioksit 7
2.1.1.6. Meloksikam 8
2.1.1.7. Meloksikamın Kimyasal Yapısı ve SPARC Programı İle Hesaplanan Maksimum pKa Değerleri 9
2.2. İyonlaşma Sabiti Tayin Yöntemleri 11
2.2.1. Potansiyometrik yöntemle pKa tayini 12
2.2.2. Spektrofotometrik yöntemle pKa tayini 13
2.2.3. Florimetrik pKa tayini 15
2.2.4. Sıvı Kromatografik Yöntemler 18
2.2.5. Elektroforetik Yöntemler 18
2.3. Spektroflorimetri 19
2.3.1. Moleküler lüminesans spektroskopisi 19

2.3.1.1. Floresans 22
2.3.1.2 Fosforesans 23
2.3.1.3. Moleküler floresansın özellikleri 25
2.3.1.4. Rezonans floresansı 27
2.3.1.5. Stokes kayması 27
2.3.1.6. Oda sıcaklığında S_1 halinin deaktivasyonu 28
a. İç dönüşüm (Işımasız durulma) 30
b. Dissosyasyon 31
c. Dış dönüşüm 31
d. Sistemler arası çapraz geçiş 32
e. Titreşim relaksasyonu 33
f. Çarpışmalı söndürme 34
g. Titreşimsel durulma 34
2.3.2. Lüminesans Spektrofotometreleri 35
2.3.2.1. Işık kaynakları 37
2.3.2.2. Filtreler ve Monokromatörler 38
2.3.2.3. Dedektörler 38
2.3.2.4. Hücreler ve Hücre bölmeleri 38
2.3.3. Floresansı Etkileyen Faktörler 38
2.3.3.1. Molekül yapısının etkisi 39
a. Konjügasyon etkisi 40
b. Molekülün rijitliğinin ve düzlemselliğinin etkisi 41
c. Moleküldeki sübstitüentlerin etkisi 44
2.3.3.2. Sıcaklık 46
2.3.3.3. Çözücü etkisi 46
2.3.3.4. pH etkisi 46
2.3.3.5. Konsantrasyonun etkisi 48
2.3.3.6. Viskozite etkisi 48
2.3.3.7. Çözünmüş oksijen ve paramagnetikler 48
2.3.3.8. Gelen ışının dalga boyunun ve şiddetinin etkisi 48
3. KAYNAK ARAŞTIRMASI 50
4. METERYAL VE YÖNTEM 55
4.1. Kimyasal Maddeler 55

4.1.1. Non-Steroidal Antienflamatuarlar (Oksikamlar) 55
4.1.2. Kullanılan çözücüler 56
4.1.3. Non-Steroidal Antienflamatuar (Oksikam) çözeltilerinin hazırlanması 57
4.1.4. Titrant çözeltisinin hazırlanması 57
4.1.4.1. Titrant baz çözeltisinin ayarlanması 58
4.1.4.2. Titrant asit çözeltisinin ayarlanması 58
4.3. Kullanılan Cihazlar 59
4.4. Deneysel Yöntem 60
5. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 61
5.1. Oksikamların Spektroflorimetrik Özelliklerinin Belirlenmesi 61
5.1.1. Meloksikamın emisyon spektrumları 63
5.1.2. Piroksikamın emisyon spektrumları 65
5.1.3. Tenoksikamın emisyon spektrumları 67
5.2. Oksikamların İyonlaşma Sabitlerinin Tayini 69
5.2.1. Spektroflorimetrik yöntemle tenoksikamın iyonlaşma sabitlerinin tayini 69
6. SONUÇ VE ÖNERİLER 71
7. KAYNAKLAR 74
ÖZGEÇMİŞ 77

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 1: 2.1. Piroksikamın açık formülü. 4
Şekil 2: 2.2. Tenoksikamın kimyasal formülü. 7
Şekil 3: 2.3. Meloksikamın kimyasal formülü 9
Şekil 4: 2.4. Asidik ve bazik hallerin enerji seviyeleri 16
Şekil 5: 2.5. Asidik ve bazik formda floresans şiddetinin eğrileri 17
Şekil 6: 2.6. Bir atomun uyarılmış halleri 20
Şekil 7: 2.7. Floresans emisyonunun şematik diyagramı (Jablonski diyagramı). Aşağıdaki süreçler sonunda oluşan bazı enerji değişimlerini gösteren enerji düzeyi şeması: a)moleküler absorpsiyon, b) ışımasız durulma, c) moleküler türlerin floresansı. 25
Şekil 8: 2.8. Bir fotolüminesans molekülünün kısmi bir enerji seviyesi diyagramıdır .. 29
Şekil 9: 2.9. Fotolüminesans ölçümleri için kullanılan cihaz 35
Şekil 10: 2.10. Antrasenin uyarma, lüminesans ve senkron lüminesans spektrumları . 36
Şekil 11: 4.1. 0,1 M KOH çözeltisinin %10 asetonitril-su ortamında potasyum asit ftalat ile ayarlanmasına ait PKPOT programında çizilen titrasyon grafiği 58
Şekil 12: 4.2. 0,1 M HCl çözeltisinin %10 asetonitril-su ortamında ayarlı 0,1 M ayarlı KOH çözeltisiyle ayarlanmasına ait PKPOT programında çizilen titrasyon grafiği 59
Şekil 13: 4.2. Oksikamların titrasyonunda kullanılan sıcaklık kontrollü reaksiyon hücresi 60
Şekil 14: 5.1. Meloksikamın %10-%50 MeOH-Su ortamlarındaki emisyon spektrumları 63
Şekil 15: 5.2. Meloksikamın %10-%50 DMF-Su ortamlarındaki emisyon spektrumları 64
Şekil 16: 5.3. Meloksikamın %10-%50 THF-Su ortamlarındaki emisyon spektrumları 64
Şekil 17: 5.4. Piroksikamın asetonitril, metanol, su ortamlarındaki emisyon spektrumları 65
Şekil 18 5.5. Piroksikamın %10-%50 THF-Su ortamlarındaki emisyon spektrumları .. 66
Şekil 19: 5.6. Piroksikamın %10-%50 DMF-Su ortamlarındaki emisyon spektrumları 66
Şekil 20: 5.7. Tenoksikamın %10-%50 DMF-Su ortamlarındaki emisyon spektrumları 67
Şekil 21: 5.8. Tenoksikamın %10-%50 THF-Su ortamlarındaki emisyon spektrumları 68
Şekil 22: 5.9. Tenoksikamın %10-%50 Asetonitril-Su ortamlarındaki emisyon spektrumları 68
Şekil 23: 5.10. Tenoksikamın %10 asetonitril-%90 su karışımında pH=2-12 arasındaki emisyon spektrumları (λex= 336 nm). 70
Şekil 24: 5.11. Tenoksikamın %10 asetonitril-%90 su karışımında pH=2-12 arasındaki Ph Floresans şiddeti (F.I.) grafiği (λex= 336 nm, λem= 435 nm). 70

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 1: 2.1. Benzenin floresans özelliğine sübstitüentlerin etkisi (etanol içinde). 44
Çizelge 2: 2.3. Emisyon dalga boyu ve floresans şiddetine sübstitüentin etkilerinin listesi. 45
Çizelge 3: 4.1. Deneylerde kullanılan NSAI'ların bazı kimyasal özellikleri 56
Çizelge 4: 4.2. Kullanılan çözücülerin özellikleri ve solvatokromik parametreleri 57
Çizelge 5: 5.1. Oksikamların, asetonitril, metanol, DMF, THF ve su ortamlarında çözünme durumu..... 62
Çizelge 6: 6.1. Tenoksikamın %10 asetonitril içeren su karışımlı ortamda teorik ve deneysel iyonlaşma sabitleri (n=3). 72

SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısatlmalar

NSAEİ: Nonsteroid (steroid olmayan) antienflamatuvar ilaçlar
DMF: Dimetilformamit
THF: Tetrahidrofuran
STAR: pKa değerlerini deney koşullarında hesaplayan bir bilgisayar program
SPARC: Online teorik pKa hesaplama programı
PKPOT: Potansiyometrik pKa tayini
COX-1 ve COX-2: Siklooksijenaz enzimleri
IUPAC: Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği
IR: Infra-red
TLC: İnce tabaka kromatografisi
HPLC: Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi
LC: Sıvı kromatografisi
KOH: Potasyum hidroksit
CE: Kapiler elektrofez
DAD: Diode Array Dedektör
EPA: Etanol ve etil eter-izopentan-etanol karışımı
MeOH: Metanol
ACN: Asetonitril

Simgeler

A: Absorbans
Å: Angstorm (10^{-10} m)
b: Işığın çözelti içinde kat ettiği yol (cm)
C: Derişimi (mol / L)
$^{\circ}$C: Santigrat derece
E: Enerji
g: Gram
h: Planck sabiti
kg: Kilogram
K: Kelvin
L: Litre
M: Molarite
T: Kelvin cinsinden termodinamik sıcaklık
mg: Miligram
nm: Nanometre
s: Saniye
ν: Frekans
µg: Mikrogram
µM: Mikromolar

ε:	Molar absortive katsayısı (L / mol. cm)
λ:	Dalgaboyu
ΔS:	Entropi değişimi
ΔG:	Gibbs serbest enerjisindeki değişim
ΔH* :	Uyarılmış halindeki molar entalpi değeri
ΔH:	Temel haldeki molar entalpi
ω:	Enstrümental sabit
τ:	Floresans ömrü
c ve C:	Konsantrasyon
I_0;	Uyaran ışın şiddeti
Φ_0:	Floresans kuantum verimi

1.GİRİŞ

NSAEİ'ler analjezik, antipiretik ve antienflamatuvar etkili ilaçlardır. Ağrı, ateş ve inflamasyonu azaltırlar. NSAEİ'lerin popüler olmasında opoidlere göre çok az bağımlılık potansiyeli taşıması ve sedasyon veya solunum depresyonu yapmaması büyük rol oynamaktadır. NSAEİ'ler siklooksijenaz enzimlerini (COX-1 ve COX-2) non-selektif olarak inhibe ederek etkirler. Siklooksijenaz, arasidonik asitten tromboksan ve prostaglandin yapımında katalizör görevi görür. Prostaglandinler inflamasyon oluşum sürecinde diğer görevli maddelerle birlikte iletim molekülü olarak rol oynar (Gençbay, 2004; Burke, 2006; Page, 2006; Sweetman, 2007). Periferik nösiseptörlerin aktivasyonunu ve hassasiyetini azaltırlar, inflamatuvar yanıtı azaltırlar, bağımlılık yapmazlar, opioidlerle sinerjizm gösterirler, opiod koruyucu etkiye sahiptirler, multimodal (çok biçimi ve yolu olan) analjezinin bir parçası olabilirler, koruyucu (önleyici) analjezide kullanılabilirler, respiratuar depresyona yol açmazlar, bulantı ve kusmaya az neden olurlar, uzun etkilidirler, bazı ağrılarda opioidlere üstündürler, pupiller değişikliğe neden olmazlar, algılama (kognitif) fonksiyonlarında bozulma ve sedasyona neden olmazlar, suistimal oranları düşüktür, barsak ve mesane fonksiyonlarını etkilemezler. NSAEİ'ler genellikle ağrı ve inflamasyonun olduğu yerdeki akut ve kronik durumun tedavisinde endikedir. Kolorektal kanserin önlenmesi ve kanser ile kardiyovasküler hastalık gibi diğer durumların tedavisindeki önleme potansiyelleri ile ilgili çalısmalar sürmektedir. NSAEİ'ler genellikle şu durumlarda semptomatik rahatlama için endikedirler: Romatoid artrit (Juvenil romatoid artrit dahil), osteoartrit (dejeneratif eklem hastalıgı), enflamatuvar artropatiler (ankilozan spondilit, psöriyatik artrit, Reiter sendromu), akut gut, dismenore, metastatik kemik ağrısı, iltihaplanma ve doku zedelenmesi yüzünden hafif dereceden orta dereceye kadar olan ağrılar, böbrek sancısı (böbrek koligi), başağrısı ve migren, ameliyat sonrası ağrı, ateş.

Farmakolojik açıdan bu kadar önemli olan bu ilaç grubunun, iyonlaşma sabitlerinin doğru ve hassas bir şekilde tayin edilmesi de büyük bir önem arz etmektedir.

Anti-enflamatuar ilaçlar olan oksikamların iyonlaşma sabitlerinin birkaç uygun yöntem ile tam olarak tayini, etki mekanizmalarının anlaşılmasında ve biyoyararlanabilirlikleri açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle bu bileşiklerin çeşitli çözücü ortamlarında floresans özelliklerinin incelenmesi ve daha sonra aynı ortamlarda

florimetrik ve spektrofotometrik yöntemlerle iyonlaşma sabitlerinin yüksek doğrulukla tayiniyle literatüre katkıda bulunulacağı ve ilaçların etki mekanizmaları ile ilgili çalışmalara da ışık tutacağı düşünülmektedir. Aynı zamanda, literatürde uygulamasına pek rastlanmayan spektroflorimetrik yöntemin, son yıllarda geliştirilen kromatografik pKa tayin yöntemi gibi, geleneksel pKa tayin yöntemlerine (potansiyometrik ve spektrofotometrik) bir yenilik getireceğine de inanılmaktadır.

Bu nedenle bu çalışmada öncelikle, bu bileşiklerin çeşitli çözücü ortamlarında floresans özellikleri incelenmiş, daha sonra aynı ortamlarda florimetrik ve spektrofotometrik yöntemlerle iyonlaşma sabitleri tayin edilmiştir. Deneysel yöntemlerle elde edilen veriler teorik verilerle, SPARC (online teorik pKa hesaplama programı) sonuçlarıyla ve literatür verileriyle karşılaştırılmıştır.

2.TEORİK KISIM

2.1. Nonsteroid (steroid olmayan) antienflamatuvar ilaçlar (NSAEİ'ler)

Nonsteroid (steroid olmayan) antienflamatuvar ilaçlar (NSAEİ'ler) aspirin ailesindeki ilaçları da kapsayan çok geniş bir ilaç grubudur. Çeşitli artrit türlerinde inflamasyonu azaltmak ve ağrı, şişlik ve katılığı kontrol altına almak için reçete edilirler. Narkotik olmayan analjeziklere göre bu grup ilaçların farmakolojik etki profiline uygun düşen bir adla non-steroidal (steroid olmayan) antienflamatuvar ilaçlar (NSAEİ'ler) veya kısaca antienflamatuvar analjezikler denilmektedir. Çoğu NSAEİ'ler zayıf asidiktirler ve pKa'ları 3-5 aralığındadır. Mide ve bağırsak mukozasından iyi emilirler. Plazma proteinlerine çok yüksek oranda bağlanırlar (>95%). Genellikle albumine bağlanarak taşınırlar böylece dağılım hacimleri yaklaşık olarak plazma hacmine çok yakın değerdedir. Çoğu NSAEİ'ler karaciğerde oksidasyon ve konjugasyon ile inaktif metabolitlerine metabolize olurlar ve tipik olarak idrarla atılırlar. Bazı NSAEİ'ler (oksikamlar) çok uzun yarı ömre sahiptirler (örnegin 20-60 saat). Oksikamlar kimyasal yapısından dolayı NSAEİ sınıfındandır. Oksikam türevleri; piroksikam, lornoksikam, meloksikam, tenoksikamdır.

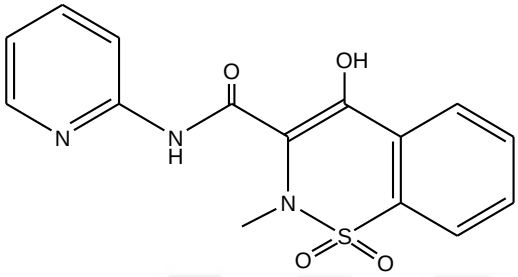
2.1.1. Oksikam türevleri

2.1.1.1. Piroksikamın fiziksel ve kimyasal özellikleri

Kapalı formülü $C_{15}H_{13}N_3O_4S$ olup molekül ağırlığı 331.35 g/mol'dür. Piroksikam beyaz-açık sarı renkli, kokusuz ve ışığa duyarlı kristal yapıda bir tozdur. Suda çözünürlüğü çok zayıftır, etanol ve alkali sulu çözeltilerinde hafif çözünür. Erime sıcaklığı 198-200°C'dir. pKa' sı 6.3'dür (The Merck Index, 1989, s: 1346; Zahedi ve Li, 2007). Herzfeldt ve Kümmel (1983) adlı araştırmacılar, piroksikamın pKa değerini 5.3 olarak rapor etmişlerdir. 1.8 ve 5.1 olmak üzere iki pKa değerinin ifade edildiği kaynaklar da mevcuttur (Trissel, 1996, s:206; PDR 2004, s: 2594; Karataş ve ark., 2005; Branchu, 2007). Piroksikam polimorfizm gösterir (European Pharmacopoeia 6, 2008; British Pharmacopoeia 1999). Piroksikamın 3 kristal formu vardır. β (I) polimorfu, en yüksek erime noktasında görülür, mekanik ve termal stres altında stabildir. α (II) polimorfu metastabildir. III polimorfu ise stabil değildir, hızla diğer polimorflara dönüşür (Validazeh ve ark, 2007)

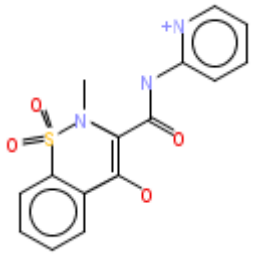
2.1.1.2. Piroksikamın Kimyasal Yapısı ve SPARC Programı İle Hesaplanan Maksimum pKa Değerleri

4-hidroksi-2-metil-N-2-pridinil-2H-1,2-benzotiazin-3-karboksamid 1,1-dioksit; 3,4-dihidro-2-metil-4-okso-N-2-piridil-2H-1,2-benzotiazin-3-karboksamid 1,1-dioksit (The Merck Index, 1989, s: 1346).

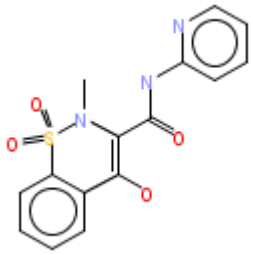


Şekil 1: 2.1. Piroksikamın açık formülü.

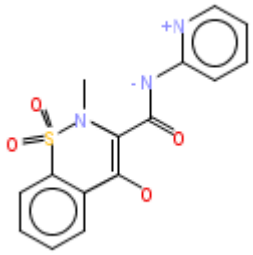
1. İyonlaşma reaksiyonları:



Maks Fraksiyon = 1.00



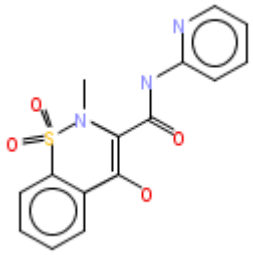
Maks Fraksiyon = 0.92



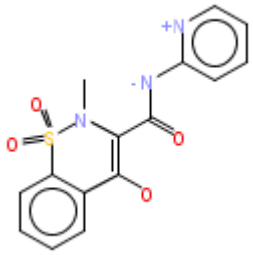
Maks Fraksiyon = 0.08

Makro pK_a= 2.20

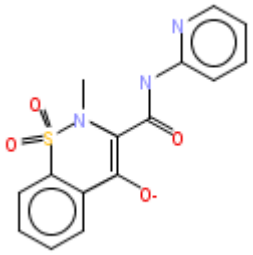
2. İyonlaşma reaksiyonları:



Maks Fraksiyon = 0.92



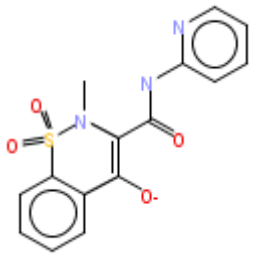
Maks Fraksiyon = 0.08



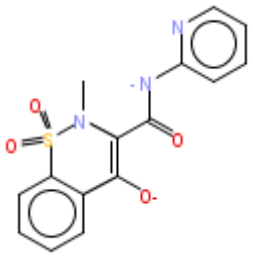
Maks Fraksiyon = 0.98

Makro pK_a = 7.72

3. İyonlaşma reaksiyonları:



Maks Fraksiyon = 0.98



Maks Fraksiyon = 0.98

Makro pK_a = 12.25

2.1.1.3. Piroksikam için miktar tayini ve tanıma yöntemleri

Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi: Piroksikamın tayini plazmada 500 ng/ml hassasiyet ile sağlanmaktadır (Clarke's Isolation and identification of drugs, 1986, s:911).

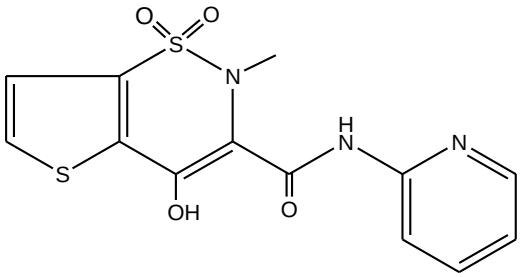
Etken maddenin saflığı ve tanınması için IR (Infra-red) spektofotometrisi, kütle spektofotometrisi, ince tabaka kromatografisi (TLC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), renk testleri (Koppanyi-Zwikker test ve Liebermann test) yöntemleri kullanılabilmektedir (Clarke's Isolation and identification of drugs, 1986, s: 911).

2.1.1.4. Tenoksikamın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Kapalı formülü $C_{13}H_{11}N_3O_4S_2$ olup, molekül ağırlığı 337.4 g/mol'dür. İnce sarı renkli toz halinde, kendine has özel kokulu, hafif acı lezzetlidir. Erime noktası 209-213ºC' dir ve bu sıcaklıkta bozunmaktadır. Hidrofilik asit karakterde olup sudaki dissosiyasyon sabitleri; UV spektrofotometrik yöntem ile pK_{a1}=1.07, pK_{a2}=5.34 olarak verilmektedir. 1:1 oranında su-etanol karışımında ise potansiyometrik yöntemler ölçülen dissosiyasyon sabitinin pK_{a2}=4.95±0.02 olduğu, titrasyon sürecinde çökme görüldüğünden pK_{a1} için herhangibir ölçüm yapılamadığı da bildirilmektedir. Tenoksikamın çözünürlüğü incelendiğinde; suda, metanolde, etanolde, asidik çözeltilerde ve etil asetatta çok az çözünürlüğe sahip olduğu, buna karşılık N,N-dimetilformamid, dimetilsülfoksid ve kuvvetli bazlarda daha kolay çözünebildiği gözlenmiştir. Çözünürlüğün pH 5.3 de 13 mg /100 mL su, pH 7.5 de ise 279 mg/100 mL olduğu bildirilmektedir. Diğer non-steroidal antienflamatuvar ilaçlara göre daha zayıf lipofilik özelliklere sahiptir.

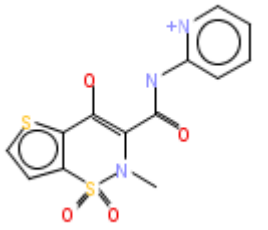
2.1.1.5. Tenoksikamın Kimyasal Yapısı ve SPARC Programı İle Hesaplanan Maksimum pKa Değerleri

4-hidroksi-2-metil-N-2-piridil-2 H-tieno(2,3-e)-1,2-tiazin-3-karboksamid-1,1 dioksit

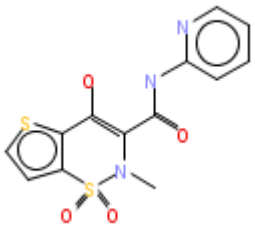


Şekil 2: 2.2. Tenoksikamın kimyasal formülü.

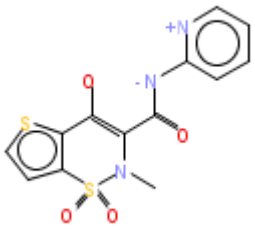
1. İyonlaşma reaksiyonları:



Maks Fraksiyon = 0.99



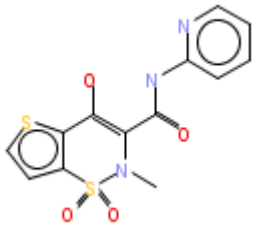
Maks Fraksiyon = 0.92



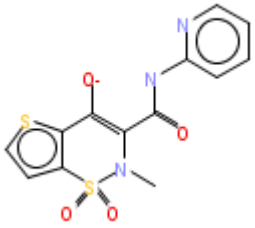
Maks Fraksiyon = 0.07

Makro pK_a = 1.92

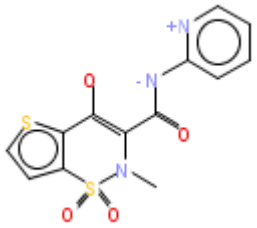
2. İyonlaşma reaksiyonları:



Maks Fraksiyon = 0.92



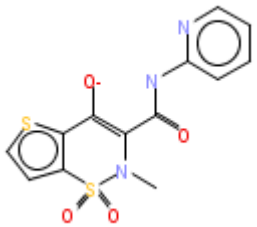
Maks Fraksiyon = 0.99



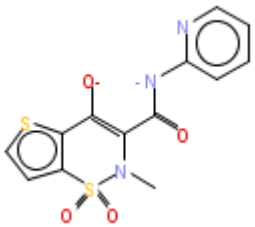
Maks Fraksiyon = 0.07

Makro pK_a = 6.62

3. İyonlaşma reaksiyonları:



Maks Fraksiyon = 0.99



Maks Fraksiyon = 0.99

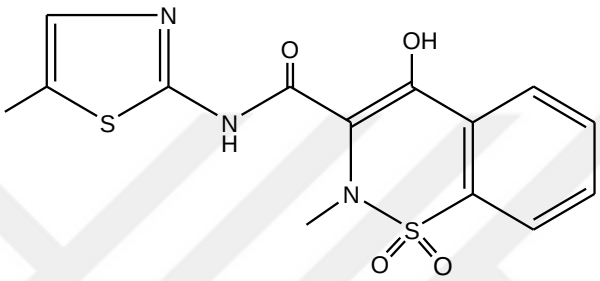
Makro pK_a = 12.01

2.1.1.6. Meloksikam

Meloksikam ameliyat sonrası ağrı, romatoid artrit ve osteoartrit semptomlarını azaltmak için kullanılan bir non steroidal antienflamatuar ilaç etken maddesidir. Piroksikamla çok benzeşmektedir. Bir selektif COX-2 inhibitörü olan non-streoid antienflamatuvar bir ilaçtır. COX-2 spesifik ürünler gibi miyokardiyal prostasiklini

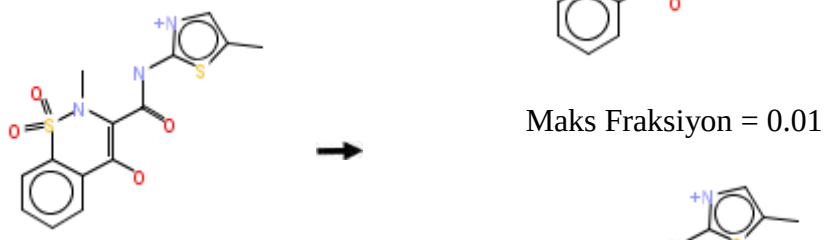
inhibe etmediği için hipertansiyona ve ödeme neden olmaz. Kardiyovasküler risk açısından oldukça güvenli bir alternatiftir. Meloksikam'ın, bazı klasik NSAE ilaçlar tarafından indüklenen trombosit agregasyonu inhibisyonu sonucu oluşan kanama zamanının uzaması üzerine etkisi yoktur.

2.1.1.7. Meloksikamın Kimyasal Yapısı ve SPARC Programı İle Hesaplanan Maksimum pKa Değerleri



Şekil 3: 2.3. Meloksikamın kimyasal formülü

1. İyonlaşma reaksiyonları:



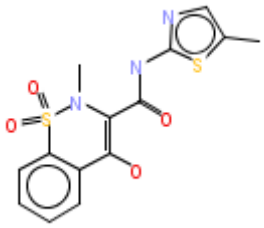
Maks Fraksiyon = 0.99

Maks Fraksiyon = 0.01

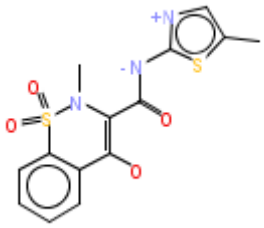
Maks Fraksiyon = 0.98

Makro pK_a = 1.91

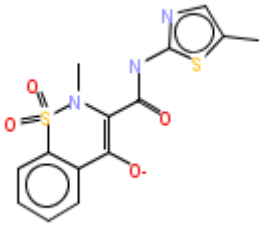
2. İyonlaşma reaksiyonları:



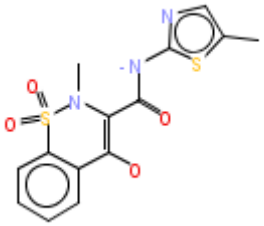
Maks Fraksiyon = 0.01



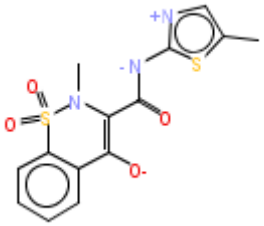
Maks Fraksiyon = 0.98



Maks Fraksiyon = 0.08



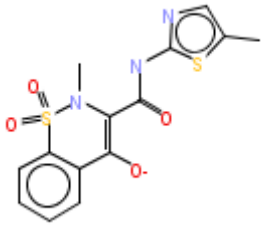
Maks Fraksiyon = 0.02



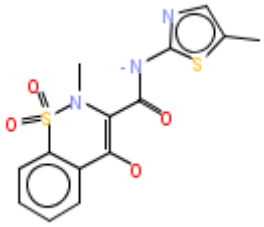
Maks Fraksiyon = 0.81

Makro pK_a = 8.42

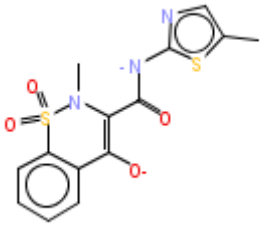
3. İyonlaşma reaksiyonları:



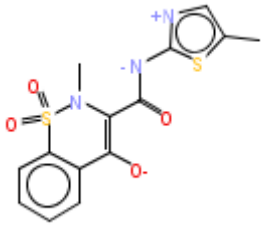
Maks Fraksiyon = 0.08



Maks Fraksyion = 0.02



Maks Fraksiyon = 1.00



Maks Fraksiyon = 0.81

Makro pK_a = 10.97

2.2. İyonlaşma Sabiti Tayin Yöntemleri

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

olmayan ve su ortamında iyonlaşma sabitleri tayin edilemeyen bileşiklerin bu sabitlerinin tayinlerinde sıklıkla su-organik çözücü ikili karışımları kullanılırlar.

İyonlaşma sabitlerinin tayininde;

- ✓ Potansiyometrik yöntemler,
- ✓ Spektroskopik yöntemler,
- ✓ Sıvı kromatografik yöntemler,
- ✓ Elektroforetik yöntemler kullanılmaktadır.

2.2.1. Potansiyometrik yöntemle pKa tayini

Potansiyometrik yöntemler, İyonlaşma sabitlerinin tayininde bilinen ilk yöntemdir. Potansiyometrik titrasyon düzeneği, sıcaklık kontrollü ve inert atmosfer uygulanabilir şekilde hazırlanır. Çok eski yıllardan bu yana sıklıkla kullanılan ve çalışılan ortamda bir çalışma ile karşılaştırma elektrodu arasındaki gerilim farkının ölçülmesi esasına dayanan yöntemlerdir.

Bu yöntemler,

a) Kullanılan cihazın basit olması ve her laboratuvarda bulunması, titrasyon için basit bir düzeneği gerektirmesi ve sonuçların yorumlanabilmesindeki kolaylık nedeniyle tercih edilirler. Ancak kullanılan elektrodun kararlı ve çalışılan ortama uygun olması gereklidir. Son zamanlarda elektrot teknolojisindeki gelişmeler tekrarlanabilirlik ve uyarlığı yeterli hale getirmiştir. Ancak elektrot standardizasyonun yapılmaması durumunda elde edilen iyonlaşma sabitleri, bağıl değerlerdir. Genellikle yapıdaki bütün fonksiyonel grupların pKa tayinlerine olanak sağlar.

b) Bu teknikle yeterli doğruluk ve kesinlikte tayin mümkündür.

c) Çalışılan bileşiklerin mutlaka saf olmaları gereklidir

d) Genellikle 10^{-3} M derişimde çalışılır. Bunu sağlayamayan çözünürlük problemlerinde teknikten yararlanılamaz.

e) Titrantın ayarlı olması ve karbonat hatası getirmeyecek şekilde hazırlanması gereklidir.

f) Elektrot sistemi çalışılan ortama uygun şekilde kalibre edilmelidir.

Bu yöntemde kullanılan elektrodun kararlı ve çalışılan ortama uygun olması gereklidir. Su-organik çözücü karışımlarında IUPAC'ın önerdiği titrant KOH'dir. Ayarlı olması gerekir, Son zamanlarda su-organik çözücü karışımlarında elektrot standardizasyonları yapılabilmektedir ve elde edilen iyonlaşma sabitleri termodinamik değerlerdir. Sigmoidaller öncelikle mL-pH ilişkisi kullanılarak hazırlanmaktadır.

Ayrıca tüm titrasyon koşullarını, iyonik şiddet de dahil olmak üzere dikkate alan ve sistematik yaklaştırmayı temel alan non-lineer regresyon programları bu amaçla kullanılmaktadır. Su-organik çözücü karışımlarının özelliklerinin bilinmesi, elde edilen iyonlaşma sabitlerinin yorumlanmasını sağlamaktadır. 3-5 mM derişim yeterlidir.

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

2.2.2. Spektrofotometrik yöntemle pKa tayini

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

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. İyonlaşma sabitleri spektrometrik ölçümler ile de tayin edilebilir. Bunun için belli bir dalga boyu aralığında kaydedilen absorbans verilerinden yararlanılır.

Bu durumda :

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

bağıntısı geçerlidir. Kütle denkliğini ifade edelim.

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

İlk ifadede HA yerine kütle denkliğinden gelen değerini koyalım.

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

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

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

Benzer şekilde hareketle HA için bağıntı türetilir.

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

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

$$K_a = [H_3O^+].\frac{A- AHA}{AA - A}$$

Spektrofotometrik titrasyonlarda en basit yaklaşım 3 çözelti ile gerçekleştirilir.

Öncelikle bileşiğin çözeltisi asidik yapılarak A^- oluşması önlenir. Ölçülen absorbans iyonlaşmamış türle ilgilidir (AHA).

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

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.

$$\log \frac{A - AHA}{AA - A} = pH - pK_a$$

log (A-AHA) / (AA-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 pKa değerleri su ortamına organik çözücü ilavesinde artar. pKa değerlerinin büyümesi bir diğer deyimle asitlerin daha zayıf davranması su-organik çözücü karışımlarında dielektrik sabitindeki azalmanın bir sonucudur. Bazlarda ise protonasyon sabitlerinin organik çözücü derişiminden fazla etkilenmediği bilinmektedir. Elde edilen sonuçların güvenilirliği için 50-150 pH değerinde spektrum taraması yapılır. Sonuçların değerlendirilmesi, bu amaç için hazırlanmış bilgisayar programı ile gerçekleştirilir. Potansiyometriden daha düşük derişimde analit yeterlidir.

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

2.2.3. Florimetrik pKa tayini

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. Atom veya molekülün elektronları, orbitallere spinleri ters olarak yerleşmiş ise bu hale singlet hal, orbitallerin birinde tek bir elektron varsa duplet hal, iki ayrı orbitalde spinleri birbirine paralel birer elektron varsa triplet hal ortaya çıkar.

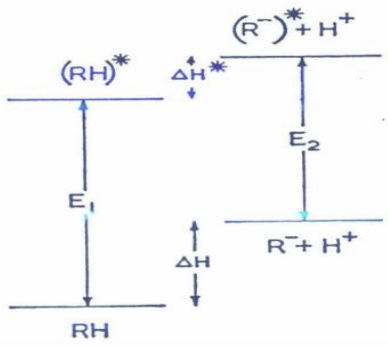
Bir molekül, absorpsiyonda 0-0 geçişlerinden hemen sonra daha az enerjiyle biraz dinlenir. Buna karşılık en aşağı enerjiyle uyarılmış hale geçer. 0-0 geçişiyle floresans emisyonundan sonra, hemen aynı relaksasyon oluşur.

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.

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

Absorpsiyon ve emisyon bantları hiç titreşimsel bir yapı göstermediklerinde, 0-0 geçişlerinin konumunu bulmak mümkün değildir. E_s için en iyi ölçüm, yukarıdaki eşitliğin $h\nu_{abs}$ 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 4: 2.4. Asidik ve bazik hallerin enerji seviyeleri

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

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

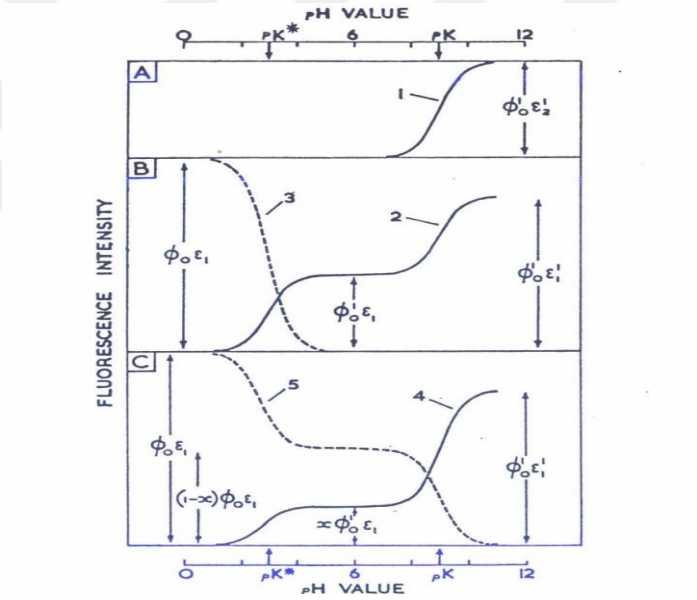
$$\Delta G = \Delta H - T\,\Delta S = - RT\ln K$$

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

burada; Planck sabitini yerine koyar, mikrona çevirirsek;

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

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



Şekil 5: 2.5. Asidik ve bazik formda floresans şiddetinin eğrileri

Şekil 6: 2.5'te verilen eğrilerin şekli;

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

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

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

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 verimidir.

2.2.4. Sıvı Kromatografik Yöntemler

Yöntem, özellikle sıvı kromatografik ayırmada yararlanılan organik çözücü – su karışımlarına uygulanabilmektedir. Çalışılan bileşiklerin alıkonma davranışları ile mobil faz pH' sı arasındaki ilişkilerden yararlanılarak iyonlaşma sabitleri tayin edilir. Kapasite faktörünün pH ile değişimi, sigmoidal davranış gösterir. Bu sigmoidalin orta noktasındaki pH değeri, o bileşiğin çalışılan ortamdaki iyonlaşma sabitini verir (Poole, 1997; Poole, 2004; Hardcastle ve Jano, 1998). Ayrıca asidik veya bazik bileşiklerin pKa sabitlerinin tayininde ortamın iyonik şiddetini de dikkate alarak hesaplama yapabilen non-lineer regresyon programları da geliştirilmiştir.

Bu yöntem ile çalışmanın bazı avantajları vardır;

- Bileşiğin saf olması gerekmez.
- ppm ve ppb düzeyinde analit ile çalışma imkanı sağlar.
- Çalışılan ortam su-organik çözücü ikili karışımıdır.
- Bu ortamlardaki pH standardizasyonunun bilinmesi gereklidir.

2.2.5. Elektroforetik Yöntemler

Bu yöntem özellikle büyük molekül kütleli bileşiklerin ayrılmasında uygulanabilmektedir. Kapiler elektrofez (CE) yönteminde çok düşük örnek hacimleri ve derişimleri ile çalışabilme olanağı vardır. Asidik veya bazik türlerin iyonlaşma sabitlerinin tayininde farklı pH'lardaki mobiliteler kullanılır. Sıvı kromatografi yönteminden farklı olarak suda pKa tayini yapabilmemiz mümkündür. Ayrıca CE ile

elde edilen pKa değerlerinin CE-DAD (DAD Diode Array Dedektör) ile karşılaştırma olanağı sağlar (Geiser vd., 2005; Poole vd., 2004).

Bu yöntem ile çalışmanın bazı avantajları vardır;

- Geniş bir pH aralığında çalışılabilir (pH 2-11).
- Yeterli doğruluk ve kesinlikte sonuçlar elde edilir.
- Bileşiklerin saf olması gerekmez.
- Sudaki çözünürlükleri düşük olan bileşiklerin tayini için uygundur.
- µM düzeyinde analit ile çalışma imkanı sağlar.
- Uygun kalibrasyon yöntemleri ile su-organik çözücü karışımlarında çalışma imkanı getirir.

2.3. Spektroflorimetri

2.3.1. Moleküler lüminesans spektroskopisi

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



Temel hal: Bir atom veya molekülün en düşük enerjili halidir. Işının belli dalga boyları madde tarafından absorblanırsa (soğurulur, emilir) absorbsiyon denir.

Bu enerji maddeyi (yani onu oluşturan atom veya molekülleri) uyarılmış (eksite) hale geçirir. Bir kimyasal türün ısı, elektrik veya ışın enerjisi ile temel halden üst enerji seviyesine geçmesidir.

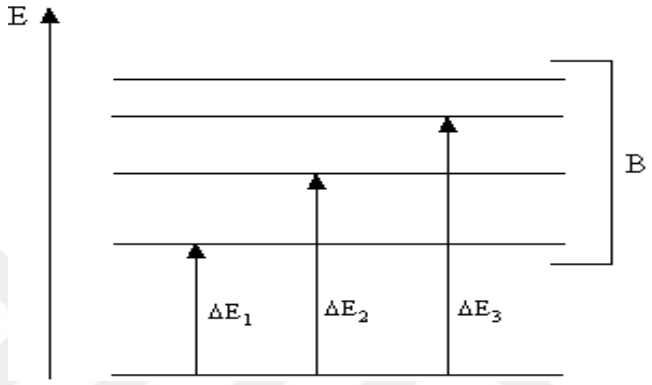
$$X + h\nu \longrightarrow X^*$$

Tanecik eski haline dönerken bu enerji geri verilir.

$$X^* \longrightarrow X + \text{ısı}$$

Uyarılmış madde temel hale dönerken ışın yaymasına emisyon,

$$X^* \longrightarrow X + h\nu$$



Şekil 7: 2.6. Bir atomun uyarılmış halleri

Floresans veya fosforesansın enerjisi (hν), uyarma için kullanılan ultraviyole ışınınkinden genellikle çok daha düşüktür. Dalga boyu enerjiyle ters orantılı olduğundan, floresans veya fosforesans, ultraviyolede (>300nm), görünür bölgede (380-750 nm) veya yakın infraredde bile (<750nm) daha uzun dalga boylarında yer alır.

Atom veya molekül temel enerji düzeyine dönerken fazla enerjisinin tümünü veya bir kısmını ışık şeklinde atabilir ve böylece sistemden bir ışık yayılması (ışık emisyonu) gözlenir. Bu ışık yayılması olayına genel olarak **lüminesans** denir.

- Uyarılma enerjisi bir kimyasal tepkimeden sağlanıyorsa, bunun sonucu gözlenen lüminesans olayına **kemilüminesans** adı verilir.
- Uyarılma enerjisi elektrot tepkimesinden sağlanıyorsa, bunun sonucu gözlenen lüminesans olayına **elektrolüminesans** veya **elektrokemilüminesans** adı verilir.
- Biyolojik sistemlerde gözlenen lüminesansa **biyolüminesans** denir.
- Uyarılma olayı atom veya molekülün fotonları absorplaması sonucu gerçekleşiyorsa gözlenen ışık emisyonuna **fotolüminesans** denir.Bazı maddeler absorpladığı ışın enerjisini kısa süreli olmak üzere, daha uzun dalga boylu ışınlar halinde yayar. Bu

olayın çok kısa süreli olmasına **floresans,** daha uzun süreli olanına **fosforesans** adı verilir.

Floresans, absorpsiyon metotlarına göre daha duyarlıdır. Aromatik yapılar floresans ışıması yaparlar. Anorganik maddelerde floresans özelliği taşıyan kompleks oluşturarak tayin edilebilirler. (UV-Görünür bölgesi ışını kullanılır ve değerlik elektronları ile ilgilidir)

Moleküler floresans, moleküler fosforesans ve kemilüminesans maddenin bir birine yakın üç ayrı fiziksel özelliğidir. Bu özelliklere lüminesans da denir. Anılan özelliklerin her biri üzerine bir spektroskopi geliştirilmiştir. Ancak, bir birlerine çok yakın olmaları nedeniyle bunlar bir bölümde toplanmıştır.

Maddenin çözeltisi üzerine ışın enerjisi gönderilerek madde uyarılır. Uyarılan maddenin aldığı enerjiyi geri vererek ilk haline dönmesi esnasında davranışları incelenir. Bu inceleme sonucunda bu yöntemlerin her birinde, analit molekülleri, emisyon (floresans, fosforesans ve kemilüminesans) spektrumları kalitatif veya kantitatif bilgiler sağlayacak şekilde uyarılır.

FIoresans ve fosforesans, uyarılmanın fotonların absorpsiyonu ile olması bakımından benzerdirler. Bunun bir sonucu olarak, bu iki olay, sıklıkla daha genel bir terim olan fotolüminesans ile ifade edilir. Floresans, floresanstan sorumlu elektronik enerji aktarımının elektronun spininde bir değişiklik oluşturmaması ile fosforesanstan ayrılır. Bunun bir sonucu olarak, floresans hemen yok olan ($<10^{-5}$s) bir lüminesans olup, kısa ömürlüdür. Buna karşılık fosforesans emisyonları ile ilişkili elektron spinindeki bir değişme, bir süre kadar, ışınlamanın bitmesinden sonra kolayca tespit edilebilir. Genellikle birkaç saniye veya daha uzun, ışımanın sürmesine sebep olur. Birçok durumda, floresans veya fosforesans olarak fotolüminesans emisyonu, onu uyarmak için kullanılan ışımanınkinden daha uzun dalga boyundadır.

Lüminesansın üçüncü tipi olan kemilüminesans, bir kimyasal reaksiyon sonucu oluşan uyarıImış bir türün emisyon spektrumuna dayanır. Bazı durumlarda, uyarıImış tür, analit ve uygun bir reaktif (ozon veya hidrojen peroksit gibi kuvvetli bir yükseltgen) arasındaki bir reaksiyonun ürünüdür. Bu durumda sonuç, analitin kendisinden çok, analitin veya reaktifin yükseltgenme ürününün karakteristik bir spektrumudur. Diğer durumlarda; analit, kemilüminesans reaksiyonunda doğrudan yer almaz. Bunun yerine, analitin, bir kemilüminesans reaksiyonuna olan yavaşlatıcı veya katalitik etkisi analitik

parametre olarak iş görür. Fotolüminesans veya kemilüminesansın şiddetinin ölçümü, eser miktarlardaki önemli bazı inorganik veya organik türün kantitatif tayinini mümkün kılar. Günümüzde, florimetrik yöntemlerin sayısı, fosforesans ve kemilüminesans yöntemlerinin uygulamalarının sayısından önemli ölçüde daha fazladır.

2.3.1.1. Floresans

Uyarılmış bir singlet sistemden temel haldeki singlet bir sisteme geçiş sırasında yayılan ışığa **floresans (hν$_2$)** denir.

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

$$1S^*_{II} \longrightarrow 1S_0 + h\nu_2 \quad \text{(floresans)}$$

Floresans ve fosforesans olayında; maddenin bir kromofor grubunda bulunan bir elektron, molekül üzerine gönderilen kısa dalga boylu ışını 10^{-14} saniye gibi çok kısa bir zamanda absorplar ve bir üst (bazen iki veya üç üst) enerji seviyesine çıkar. Buradan çeşitli mekanizmalarla temel hale döner. Madde floresans ışınları yaydığı zaman, uyarılan elektronun spini değişmez. Elektronun spinini değiştirmeden bir üst veya iki üst seviyelerine çıkması durumundaki haline **uyarılmış singlet hali** denir. Uyarılmış singlet halinde bulunan bir molekül, temel halinde olduğu gibi hâlâ diamagnetiktir. Diamagnetik maddelere **elektronları çiftleşmiş maddeler** de denir.

Madde fosforesans ışınları yaydığı zaman elektronunun spini değişir. Başka bir deyişle, uyarılmış elektronunun spini değişen molekül, fosforesans ışınları yayar. Molekülün bu haline **triplet** denir. Triplet haldeki bir molekülde iki ortaklanmamış elektron bulunur. Bir molekül bir elektronunu kaybetmişse, böyle bir moleküle **radikal** denir. Radikal moleküller paramagnetik özellik gösterirler. Böyle moleküllere de **dubletler** denir. Dublet moleküler magnetik alan içinde iki türlü yönlenme gösterir. Bu nedenle de dubletlerin enerjice farklı iki hali vardır.

Bir molekül uyarıldığı zaman doğrudan doğruya triplet hale geçemez. Uyarılmış hali, hala singlettir. Madde bu singlet halinden triplet haline geçebilir. Bu daha sonra görülecek olan sistemler arası bir geçişle gerçekleşir.

Singlet halin ömrü 10^{-7}-10^{-9} saniyede olduğu halde, triplet halin ömrü 10^{-4} saniyeden dakikalara ve hatta saatlere kadar değişir ($ZnSiO_3$). Bir molekülün

absorptivitesi ne kadar büyükse (10^4-10^5 gibi) ömrü o kadar kısadır. Bu gibi hallerde fosforesansın meydana gelme ihtimali çok azdır.

Bir molekül absorplama 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.

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.

2.3.1.2 Fosforesans

Uyarılmış bir triplet sistemden temel haldeki singlet bir sisteme geçiş sırasında yayılan ışığa ise **fosforesans (hv_3)** adı verilir.

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

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

$^3T^* \rightarrow {}^1S_0 + hv_3$ (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 fırtlatmada işlev gören enerji, ışık enerjisi olarak geri verilir. Bu olay fosforesans olur.

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

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

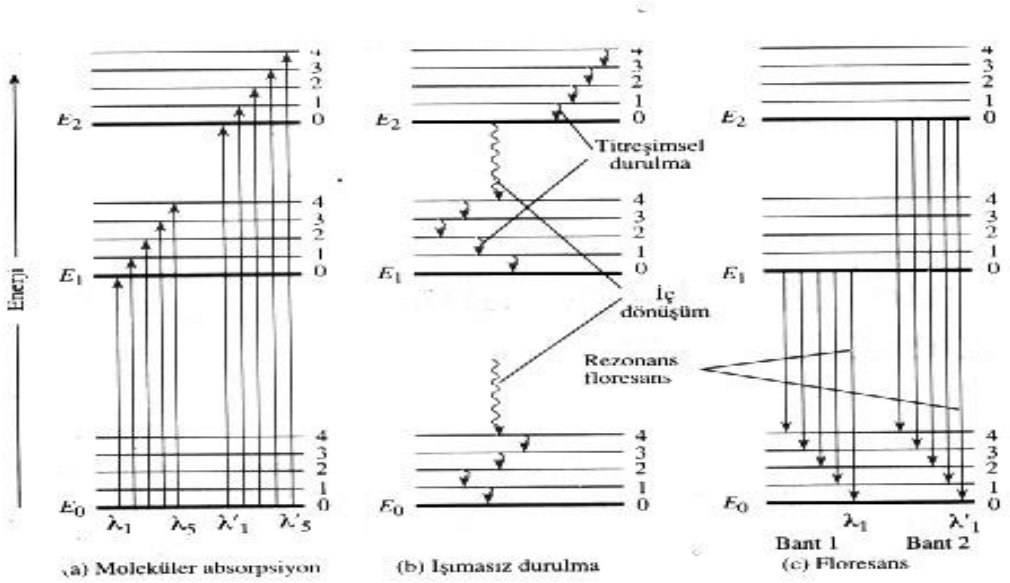
Molekül birinci uyarılmış durumdan temel hale daha önce söylendiği gibi ışıma oluşturmadan veya floresans yayarak dönebilir. Molekül birinci uyarılmış triplet durumunda ise ışığın emisyonu ile temel hale dönüş zordur. Sonuç olarak; oldukça yavaş bir emisyonla temel hale dönülür. Uyarılmadan 10^{-4} ile bir kaç saniyelik bir süreye kadar oluşan bu ışımalı dönüşte fosforesans meydana gelir.

Floresans ışın yayan maddelerin ışın yayma ömrü, fosforesans ışın yayan maddelerin ömründen daha kısadır. Şöyleki, floresans maddelerin ışın yayma ömrü genel olarak 10^{-5}-10^{-8} saniye olduğu halde, fosforesans maddelerinki, genel olarak 10^{-4} saniyeden çok daha fazla, dakikalar, hatta saatler sürebilir. Buna karşılık floresans kimyasal analizlerde, fosforesansa göre daha çok yaygın olarak kullanılır. Örneğin, kaydedilmiş en uzun olaya, Willemite $ZnSi0_3$ ın ömrü 340 saattir. Fosforesansından dolayı özel bir örnektir. Böylece, çoğunlukla organik molekülleri kapsayan birçok fosforesant madde, ultraviyole kaynağı uzaklaştırıldığı anda gözle sezilmezken, floresans ışıması devam eden inorganik minerallerin sayısı oldukça fazladır. Maddenin floresans ışınlarını yayması genelde, madde üzerine ultraviyole ışınları gönderilmesiyle gerçekleşir. Bu nedenle, floresans ışınlarının dalga boyları yaklaşık 380-720 nm arasında değişir. Bunlar da gözle görülebilir. Ancak gözle görünen ışınlarla, uyarılan maddelerden bazılarının yaydığı ışınlar yakın infrared bölgesine kayar ve gözle görülmez. Hem floresans, hem de fosforesans metodu çok hassastır. Milyardalarla ifade edilecek kadar düşük konsantrasyonlara uygulanabilir. Ayrıca bu spektroskopilerle konsantrasyon çalışma aralıkları, absorpsiyon spektroskopisindeki konsantrasyon çalışma aralıklarından genelde daha geniştir. Bu metotların bir başka üstün yanları da daha spesifik olmalarıdır (bir maddenin tayini yapılırken, bir başka maddenin bu tayini karıştırma veya bozma ihtimalinin az olmasıdır). Buna karşılık bu metotların uygulanma alanları oldukça sınırlıdır. Zira floresans özelliği gösteren maddelerin sayıları az, fosforesans özelliği gösterenlerinkiyse, daha da azdır. Öte yandan floresans ışınları, fosforesans ışınlarından genellikle daha şiddetlidir.

Floresans, maddenin katı, sıvı ve gaz hallerinde görülen bir olay olmasına karşılık fosforesans, maddenin genelde katı halinde görülen bir olaydır. Katıların fosforesansı oda sıcaklığında kolaylıkla gözlenirken, çözeltilerin fosforesansını oda sıcaklığında gözlemek çoğunlukla imkansızdır. Çünkü uyarılmış türlerle çarpışmalarda

absorplanan enerjiyi içeren oksijen molekülleri, fosforesansı söndürmektedir. Bundan sakınmak için çözeltiler sıvı azotta (77°K) soğutulur ve donmaya bırakılır. Böyle çözeltiler "rijit (bükülmez, katı) çözeltiler'' olarak ifade edilirler. Böyle çözeltileri hazırlamak için çoğunlukla kullanılan iki organik çözücü etanol ve etil eter-izopentan-etanol karışımı olan EPA'dır (Gündüz, 1995).

2.3.1.3. Moleküler floresansın özellikleri



Şekil 8: 2.7. Floresans emisyonunun şematik diyagramı (Jablonski diyagramı). Aşağıdaki süreçler sonunda oluşan bazı enerji değişimlerini gösteren enerji düzeyi şeması: a)moleküler absorpsiyon, b) ışımasız durulma, c) moleküler türlerin floresansı.

Şekil 2.7.'de hipotetik bir moleküler türün basitleştirilmiş enerji şeması görülmektedir. E_0, E_1 ve E_2 olmak üzere gösterilmiş olan üç elektronik enerji düzeyinden E_0 temel hal, E_1 ve E_2 ise uyarılmış elektronik hallerdir.

Yukarıdaki türün, λ_1 ile λ_5 arasındaki dalga boylarını içeren bir kaynak ile ışınlanması (Şekil 2.7.-a), ilk uyarılmış enerji hali E_1'e ait beş titreşim düzeyinin bir an için kısmen dolmasına yol açar. Benzer şekilde, bu moleküller daha yüksek enerjide ve λ_1 ile λ_5 arasındaki dalga boylarını içeren bir kaynak ile ışınlanırsa, daha yüksek enerjideki E_2 elektronik halin beş titreşim düzeyi de kısa bir süre için kısmen dolar.

Uyarılmış türlerin ömürleri kısadır. Çünkü uyarılmış atom veya moleküllerin kazanılmış aşırı enerjilerini vererek temel hale doğru durulmaları (relaksasyon) için birkaç yol vardır. Bu mekanizmaların en önemli ikisi ışımasız durulma ve floresans

durulması Şekil 2.7.b ve 2.7.c'de gösterilmektedir. Şekil 2.7.b'de ışımasız durulmanın iki türü gösterilmektedir.

Titreşimsel etkisizleşme veya durulma; uyarılmış moleküller ile çözücü molekülleri arasındaki çarpışmalarla gerçekleşir ve şekilde kısa dalgalı oklarla gösterilmiştir. Bu çarpışmalar sırasında aşırı titreşim enerjisi, şekilde belirtilen aşamalarla çözücü moleküllerine aktarılır. Çözücü moleküllerin kazandığı titreşim enerjisi, ortamın sıcaklığındaki hafif artış şeklinde kendini gösterir. Titreşimsel durulma, etkili bir süreç olup uyarılmış düzeyin ortalama ömrü ancak 10^{-15} s kadardır.

Başka bir olasılık da, uyarılmış bir elektronik düzeyin en alt titreşim düzeyi ile daha düşük enerjideki başka bir elektronik düzeyin üst titreşim düzeyi arasında oluşabilecek ışımasız durulmadır. İç dönüşüm olarak da anılan bu tür durulma şekil 2.7.b'de iki uzun ve dalgalı ok ile gösterilmiştir. İç dönüşüm bir durulma türü olup, en düşük titreşimsel enerji düzeyindeki bir molekülün aşırı enerjisinin aktarılarak o molekülün daha alttaki bir elektronik düzeye dönmesini içerir. İç dönüşüm, titreşimsel durulmaya göre çok daha az etkili olup bu nedenle bu süreçteki bir elektronik uyarılmış düzeyin ömrü 10^{-6} ile 10^{-9} arasındadır. Bu tür durulma için mekanizmalar tam olarak anlaşılmış değildir. Bununla beraber bu sürecin net etkisi ortam sıcaklığındaki hafif bir artışla kendini gösterir.

Şekil 2.7-c ise başka bir durulma süreci olan floresansı göstermektedir. Elektronik düzeylerden her birisi, dört uyarılmış titreşim düzeyi içerecek şekilde gösterilmiştir. Şekilden de görüldüğü gibi elektronik olarak uyarılmış moleküller temel elektronik düzeye ait titreşimsel düzeylerden herhangi birinde durulur. Böylece moleküller floresans gösterirken ışıma bantları oluşur. Moleküler absorpsiyon bantlarındakine benzer şekilde, moleküler floresans bantları da birbirine çok yakın olan ve genellikle dalga boyu ekseninde zorlukla ayrılabilen çok sayıda çizgiden oluşmaktadır.

Şekil 2.7.c'de bant 1 ve bant 2'de en yüksek enerji veya en kısa dalga boylu floresansı gösteren λ_1, λ'_1 geçişleri, aynı şeklin (a) bölümündeki λ_1 ve λ'_1 absorpsiyon geçişleri ile aynı enerjidedir. Bu çizgiler rezonans çizgileri olarak anılır, çünkü floresans ve absorpsiyon dalga boyları aynıdır.

Floresans, atom veya moleküllerin elektromagnetik ışın demetinin absorpsiyonu ile uyarılması sonucu oluşan, analitik açıdan önemli bir emisyon türüdür. Uyarılmış

türler daha sonra kazanılmış enerjilerini fotonlar şeklinde salarak temel durumlarına dönerler.

2.3.1.4. Rezonans floresansı

Floresans ve fosforesans maddelerde ışın enerjisinin alınıp verilmesi (madde ışın etkileşmesi) kısaca,

$M + hv \rightarrow M^*$

$M^* \rightarrow M + hv_1$

şeklinde gösterilir. Madde önce ışın enerjisini (hv) absorplar ve uyarılmış hale (M*) gelir. Bu halde çok kısa bir süre kaldıktan (yaşadıktan) sonra ışın enerjisi (hv_1) yayar ve eski haline veya temel haline (M) döner. Genelde $hv > hv_1$‘ dir. Ancak hv ‘nün hv_1' e eşit olduğu haller de vardır. Floresans olayında yayılan ışığın frekansı ile sistemi uyaran ışığın frekansı birbirine eşit ise buna **rezonans floresansı** denir.

Rezonans floresansı olayı:

1.Genellikle gaz halindeki atomlardan elde edilir. Bilindiği gibi bunlarda titreşim seviyeleri bulunmaz. (sadece elektronik seviyeler bulunur) Bu nedenle: element buharları absorpladıkları ışınların dalga boyunda floresans ışınları yayarlar.

2. Atomlarda ve moleküller arası çarpışmanın olmadığı bazı katı maddelerde,

3. Çözeltide oluşan uyarılmış moleküller ise daha uzun dalga boyunda floresans yaymanın yanısıra aynı frekansta ışında yayabilirler. Sodyum buharının rezonans floresansı (sarı ışın) buna örnek verilebilir. Buhar halindeki sodyum atomlarının 3s elektronları, 589,6 ve 589 nm lik dalga boylarındaki ışınların absorpsiyonu ile 3p enerji seviyesine uyarılabilir. 10^{-5}- 10^{-8} s sonra, elektronlar temel duruma geri döner ve her yöne doğru, aynı iki dalga boyunda ışın yayar.

2.3.1.5. Stokes kayması

Moleküler floresans bantlarındaki geçişler, uyarılmalarına neden olan absorplanmış ışıma bandındaki geçişlere göre daima uzun dalga boyu veya daha az enerji içermektedirler. Daha uzun dalga boylarına doğru olan bu değişme bazen **stokes kayması** olarak adlandırılır.

Stokes kayması olayını daha iyi anlamak için, Şekil 2.7.a'da görüldüğü gibi, bu ışımanın absorpsiyonuyla bir elektron ikinci uyarılmış hal olan E_2'nin 4 sayılı titreşim düzeyine yükseltilir. E_2 düzeyinin sıfır sayılı titreşim düzeyine titreşimsel durulmalar 10^{-15} s ve daha kısa bir sürede oluşur. Şekil 2.7-b. Bu noktada sonraki durulmalar ya Şekil 2.7-b'deki ışımasız yolla veya Şekil 2.7-c'deki gibi ışımalı şekilde olabilir. Işımalı yol izlenirse, temel halin çeşitli titreşim düzeylerinden herhangi birinde son bulan durulma, gösterilen bantlardan birisini (bant 2) oluşturur. Bu çizgilerin hepsi, uyarma çizgisi λ_5'e göre daha uzun dalga boyuna ve daha düşük enerjiye sahiptir.

Şimdi E_2 uyarılmış halinde olup da iç dönüşüm ile E_1 elektronik haline dönen molekülleri ele alalım. Daha öncekine benzer şekilde temel hale doğru durulma ışımasız veya ışımalı yolla olabilir. Işımalı yolla durulma durumunda bant 1 türü floresans sinyalleri oluşur. Bu durumda Stokes kayması ultraviyole bölgeden görünür bölgeye doğrudur. Yine görülebileceği gibi, bant 1 türü floresans sinyalleri, yalnız yukarıda tanımlanan mekanizma ile değil, fakat aynı zamanda λ_1-λ_5 görünür bölge dalga boylarından birisinin absorpsiyonu ile de oluşabilir,

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

2.3.1.6. Oda sıcaklığında S_1 halinin deaktivasyonu

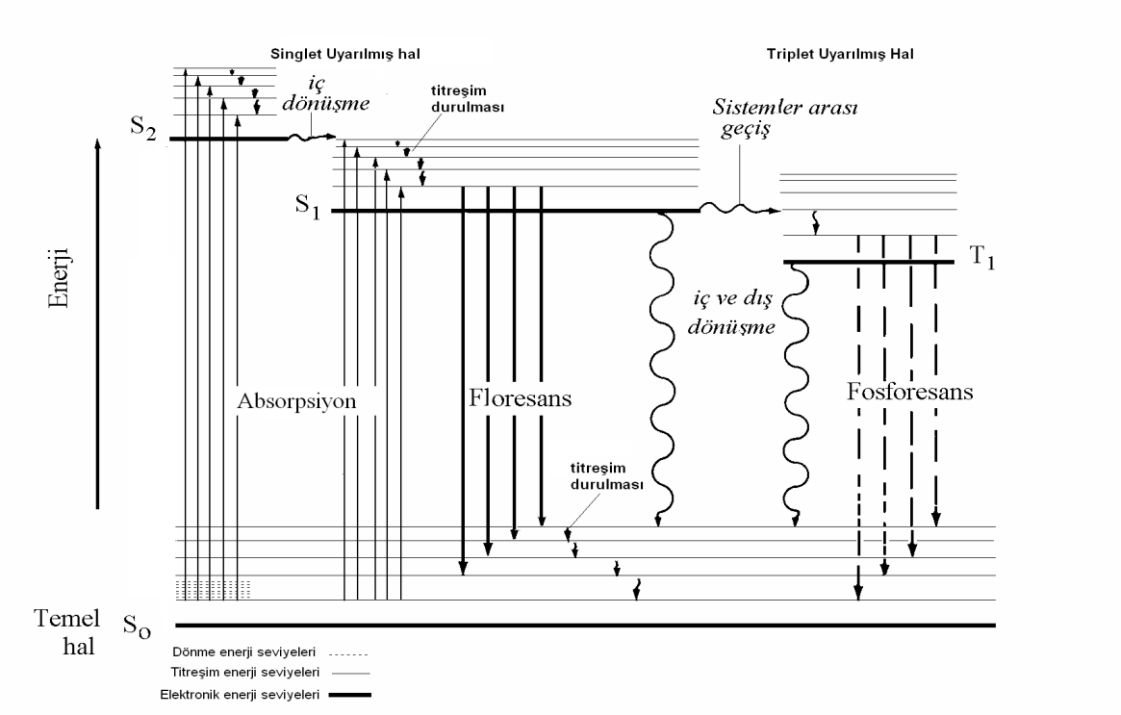
Oda sıcaklığında S_1 hali deaktivasyonu verebilen yani, fazla elektronik enerjisini kaybetmek için S_1 düzeyini bırakıp S_0 düzeyine geri dönen dört önemli proses vardır.

1. Floresans emisyonu (yayma): $1S_1^* \longrightarrow 1S_0 + h\nu$

2. İç dönüşüm: $1S_c^* \longrightarrow 1S_0 + ısı$

3. Sistemler arası geçiş: $1S_1^* \longrightarrow 3T^*$

4. Çarpışmalı söndürme: $1S_1^* + Q \longrightarrow 1S_0 + ısı$



Şekil 9: 2.8. Bir fotolüminesans molekülünün kısmi bir enerji seviyesi diyagramıdır

Bir molekülden floresans ve fosforesans ışınların yayılma mekanizmaları.

S_0) Temel hal ve üzerindeki titreşim seviyeleri,

S_1) Birinci uyarılmış hal ve üzerindeki titreşim seviyeleri,

S_2) İkinci uyarılmış hal ve üzerindeki titreşim halleri,

A) İç geçiş,

B) Sistemler arası geçiş,

C) İç ve dış geçiş,

D) Titreşim relaksasyonu.

Alttaki koyu yatay çizgi, normal olarak singlet haldeki molekülün temel hal enerjisini göstermekte olup, S_0 ile gösterilmiştir. Oda sıcaklığında, bu hal, bir çözeltideki moleküllerin hemen hemen tamamının enerjisini gösterir. En üstteki koyu çizgiler, üç uyarılmış elektronik halin temel titreşim halleri için enerji seviyelerini göstermektedir. Soldaki iki çizgi, birinci (S_1) ve ikinci (S_2) elektronik singlet hallerini gösterir. Sağdaki tek çizgi (T_1) birinci elektronik triplet halinin enerjisini gösterir. Normal olarak, birinci uyarılmış triplet halin enerjisi, karşı gelen singlet halin enerjisinden daha düşüktür. Böyle titreşim seviyeleri olmayan maddelerin (genellikle metal buharı) bir başka özellikleri de, bunlarda $S_1 \rightarrow S_0$ geçişine ilâve olarak $S_2 \rightarrow S_0$, $S_3 \rightarrow S_0$ gibi geçişlerinin de olmasıdır. Bu son derecede önemli bir olaydır. Böyle ilâve geçişlere moleküler floresans ve fosforesans spektroskopisinde rastlanmaz. Bir

maddenin absorpladığı ışm enerjisinin hiç değilse bir kısmını yeniden ışın enerjisi halinde vermesi olayına **ışın yayma, ışıma veya emisyon**denir.

Daha ince yatay çizgilerle gösterilen çok sayıdaki titreşim enerji seviyesi, dört elektronik halin her biri ile ilişkilidir. Bu molekülün uyarılması, biri uzun dalga boyunda ($S_o \rightarrow S_1$) ve ikincisi de daha kısa dalga boyu) ($S_o \rightarrow S_2$) civarında merkezlenmiş iki ışın bandın absorpsiyonu ile meydana gelebilir. Uyarılma işleminin, molekülün çok sayıda uyarılmış titreşim halinden herhangi birine dönüşü ile sonuçlandığına dikkat ediniz. Triplet hale doğrudan uyarılma da gösterilmemiştir. Çünkü bu işlem, multiplisitede bir değişmeyi gerektirir ve önceden de bahsedildiği gibi bu geçişin olma olasılığı düşüktür bu tip düşük olasılıkla bir geçişe **yasaklanmış** denir.

Uyarılmış elektronik; halin enerji kaybetmesi, fosforesans yoluyla da olabilir. Triplet bir halde sistemler arası geçişten, sonra, iç veya dış dönüşüm veya fosforesans ile biraz daha sönüm olabilir. Uyarılma (eksitasyon) ortadan kalkınca floresans olayı 10^{-10}-10^{-6}s sürer, fosforesans ise 10^{-6}-10^{2}s sürer (Skoog, 2000).

a. İç dönüşüm (Işımasız durulma)

İç dönüşüm terimi, bir molekülün, ışın yaymadan daha düşük bir elektronik enerji seviyesine geçmesi ile ilgili molekül içi bir olaydır. Fakat bağıl olarak çok az bileşiğin floresans göstermesi bunların genellikle çok etkili olduklarının açık göstergesidir.

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

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

Bir molekül, hangi elektronik hale uyarılırsa uyarılsın (S_1, S_2, S_3 gibi) en düşük enerjili halin (S_1) elektronik enerji seviyesinden floresans yayarak (λ_3 ışınları) temel hale geçmesiyle iç geçiş oluşur. Daha önce de söylendiği gibi kinin sülfat molekülü ister 250 nm'lik bir ışınla, isterse 350 nm'lik bir ışınla uyarılsın, yaydığı floresan ışının dalga boyu daima 450 nm dir. Bir iç geçişin olabilmesi için, bir molekülde bulunan S_3 uyarılma halinin titreşim enerji seviyeleriyle, S_2 uyarılma halinin titreşim enerji

seviyelerinin, keza S_2 uyarılma halinin titreşim enerji seviyeleriyle, S_1 uyarılma halinin titreşim enerji seviyelerinin, hiç değilse bir kaç enerji seviyesinde çakışması gerekir. Bu şartları yerine getiren bir maddenin iki molekülü çarpıştığı zaman, S_3 halinin alt titreşim enerji seviyelerinin birinde bulunan bir molekül, enerjini S_2 halinin üst titreşim enerji seviyelerinde bulunan bir moleküle aktarır. S_2 halin, üst titreşim enerji seviyelerinde olan bu molekül titreşim yoluyla enerji yaparak, S_1 halinin üst titreşim enerji seviyelerinden birine geçer. Buradan da titreşim enerjisi yayarak en düşük enerjili S_1 halinin elektronik geçiş seviyesine, oradan da floresan ışın yayarak temel hale gelir.

S_3 haline uyarıldığı halde bir molekülün S_1 halinden floresan ışın yaymasının nedeni, elektronik geçişlerin titreşim geçişlerine göre çok daha uzun sürede, elektronik geçişlerin 10^{-7}-10^{-9} s, titreşim geçişlerininse 10^{-13}-10^{-14} s'de gerçekleşmeleridir. Ancak, yukarıda verilen uyarılma şartlarını yerine getiren moleküllerin sayısı oldukça sınırlı olduğundan, floresan ışın yayan moleküllerin sayısı da sınırlıdır. Bunlardan başka, bir molekülün floresan ışın yayması için, temel halinin (S_0) üst titreşim, enerji seviyesinin, S_1 halinin elektronik enerji seviyesinden çok düşük olması gerekir. Aksi halde molekül titreşim yoluyla enerji yayar ve ışın yaymaksızın temel hale gelir. Alifatik moleküllerde temel halin üst titreşim seviyeleri, S_1 halinin elektronik seviyesine çok yakın olduğundan bunlarda floresans ışıması nadiren görülür.

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

b. Dissosyasyon

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

c. Dış dönüşüm

Bir molekülün üzerinde bulunan uyarılma enerjisini ortamda bulunan safsızlık moleküllerine aktararak temel hale dönmesine, dış geçiş denir. Molekülün uyarılma enerjisini diğer moleküllere aktarması, onlarla çarpışması suretiyle gerçekleşir. Buna göre çarpışma azaltılırsa, dış geçişin azalması ve floresansın (fosforesansın) artması

gerekir. Böyle olduğu denel olarak gösterilebilir. Şöyleki, çözelti soğutulduğu (çarpışma azaltıldığı) zaman bir maddenin fosforesansı azalır ve floresansı artar. Bu da çarpışmanın azalması demektir. Çünkü bunlar bir birine rakip olan iki olaydır. Birinin azalması, ötekinin artması anlamına gelir. Aynı olay floresans madde, daha viskoz çözücülerde çözüldüğü zaman da görülür ve maddenin floresansı artar. En düşük enerjili singlet veya tripletin uyarılmış halden ışın yaymaksızın temel hale geçişleri belki de iç ve dış geçişlerin bir sonucudur, Şekil 2.8 (uzun dalgalı oklar).

Uyarılmış bir elektronik halin sönümlenmesi, uyarılmış molekül ve çözücü veya diğer çözünenler arasındaki etkileşimi ve enerji aktarılmasını içerebilir. Bu olaylara topluca dış dönüşüm veya çarpışma ile sönüm denir. Dış dönüşüm için delil, çözücünün floresans şiddeti üzerindeki, kuvvetli etkisini içerir; ayrıca tanecilikler arasındaki çarpışma sayısını azaltan koşullar (düşük sıcaklık ve yüksek viskozite) genellikle floresansı arttırır.

Dış ve iç dönüşümler, fosforesans ile o kadar başarılı bir şekilde rekabet ederler ki, normal olarak bu tür emisyon, sadece düşük sıcaklıklarda; çok viskoz ortamlarda veya katı yüzeyle absorplanmış moleküllerde gözlenir.

d. Sistemler arası çapraz geçiş

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

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

Sistemler arası, geçiş, uyarılmış bir elektronun spininin ters döndüğü bir olaydır ve molekülün multiplisitesinde bir değişme olur. Sistemler arası çapraz geçişlerde, uyarılmış molekülde bulunan bir elektronun spini değişir ve molekül singlet halden triplet hale geçer. Bu da kısaca şöyle açıklanabilir. Bir molekülün birinci uyarılma halinin elektronik seviyesi, kendisinin uyarılmış fosforesans halinin titreşim seviyelerinden biriyle çakışırsa (aynı enerji seviyesindeyse) uyarılmış molekülün elektronu, spin değiştirerek çapraz olarak bu titreşim seviyesine geçer. Titreşim yoluyla fosforesans halinin elektronik seviyesine gelir ve oradan ışın yayar. İç dönüşümde

olduğu gibi, eğer iki halin titreşim seviyeleri, örtüşürse bu geçişin olasılığı artar. Şekil 2.8' de gösterilen singlet, triplet geçişi buna bir örnektir. Burada, en düşük singlet titreşim seviyesi, daha yüksek triplet titreşim seviyelerinin biri ile örtüşmektedir ve böylece spin halinde bir değişme daha muhtemeldir.

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

e. Titreşim relaksasyonu

Titreşim relaksasyonu (titreşim yoluyla enerji atma) floresans olayına rekabet eden, onu ortadan kaldırmaya çalışan olaylardan birisidir. Molekül üzerine düşen ışının enerjisine göre titreşim seviyelerinden birine yükselir. Ancak uyarılmış moleküldeki titreşim enerjisi hemen atılır. Atılma uyarılmış molekülün çözücü molekülleriyle çarpışması sonucu çözücü moleküllerine geçmesi suretiyle olur. Bu şekilde bir enerji atılması 10^{-14} saniye gibi çok kısa bir zamanda gerçekleşir ve molekül uyarılmış halin en altında bulunan elektronik geçiş seviyesine gelir, Şekil 2.8. Geldiği elektronik seviye örneğin S_2 ise gene titreşim yoluyla enerji atar ve S_1 elektronik seviyesine gelir. S_2 elektronik seviyesinden S_1 elektronik seviyesine geliş gene 10^{-14} saniye gibi çok kısa zamanda olur. Ancak, Sı den temel hale geçme zamanı titreşim zamanına göre çok uzun, 10^{-7}–10^{-9} saniyedir. Molekül bu sürenin sonunda floresan ışın yayarak temel halin titreşim seviyelerinden birine iner. Bu iniş rastgele kuralına göre gerçekleşir. Buradan da temel halin en alt seviyesine geçer. Bu geçiş de gene titreşim yoluyla gerçekleşir. Böyle olduğu molekülün spektrumunda bir birine çok yakın emisyon piklerinin görülmesinden anlaşılır. Çözeltide, ısı haline dönüşen titreşim enerjisi absorplanan enerjinin oldukça büyük bir yüzdesi olduğundan, floresans (fosforesans) ışınlarının dalga boyları uzun olur. Buna uzun dalga boylarına kayma veya Stokes kaymasından kaynaklanır.

f. Çarpışmalı söndürme

Absorpsiyon yapan madde çözelti halindeyse, uyarılmış madde çarpışmalar sonucu enerjisini titreşim enerjisi halinde çözücünün moleküllerine aktarabilir. Böylece çözücü moleküllerin kinetik enerjileri artar ve ortam az da olsa ısınır.

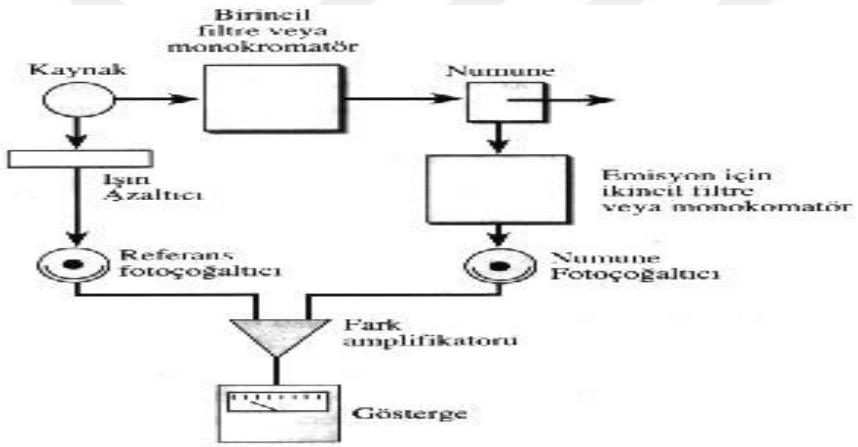
Işık absorpsiyonu için 10^{-15} s gibi çok kısa bir süre gerekir ve uyarılmış singlet halde bulunan bir molekülün ömrü 10^{-10}–10^{-6} s, uyarılmış triplet halde bulunan bir molekülün ömrü ise 10^{-6}–10^{2} s'dir. İç dönüşüm ve sistemlerarası geçiş olaylarının süreleri ise sırasıyla yaklaşık 10^{-12}-10^{-8} s'dir. Floresans olayı sistemi uyaran ışıma ortadan kalkınca 10^{-10}–10^{-6} s kadar daha sürerken, fosforesans 10^{-6}–10^{2} s kadar daha devam eder. Temel hale dönme süresi maddenin molar absorplama katsayısının artmasıyla azalır.

g. Titreşimsel durulma

Şekil 2.8' de görüldüğü gibi, elektronik uyarılma sırasında bir molekül birçok titreşim seviyesinden herhangi birine uyarılabilir. Bununla beraber, çözeltide, aşırı titreşim enerjisi, uyarılmış türlerin molekülleri ile çözücü molekülleri arasındaki çarpışmalar sonucu hemen kaybedilir. Sonuç, bir enerji aktarımı ve çözücü sıcaklığındaki çok az bir artıştır. Titreşim enerji seviyeleri bakımından uyarılmış bir molekülün ortalama ömrü 10^{-12} s veya daha az olup, bu süre elektronik olarak uyarılmış bir halin ortalama ömründen önemli derecede daha kısa olduğundan, durulma işlemi çok etkilidir. Sonuç olarak, çözeltiden floresans olduğu zaman, bu floresans daima uyarılmış bir elektronik halin en düşük titreşim seviyesinden bir geçiş ile ilgilidir. Bununla beraber, elektron, temel halin titreşim seviyelerinden herhangi birine dönebileceği için, birbirine yakın birçok pik oluşur. Daha sonra, daha fazla titreşimsel durulma ile elektron, hızla temel elektronik halin en düşük titreşim seviyesine dönecektir.

2.3.2. Lüminesans Spektrofotometreleri

Fotolüminesans ölçümlerinde kullanılan alet Şekil 2.9'de şematik olarak görülmektedir (Skoog, 2000). Ultraviyole (UV) ve görünür bölgede ışın yayan bir ışık kaynağından gelen ışın bir monokromatörden (uyarma monokromatörü) geçtikten sonra örneğe gönderilir. Örnekten kaynaklanan lüminesans genellikle uyaran ışığa göre 90° lik bir açıdan toplanarak dedektöre ulaşır. Böylece numuneyi uyaran ışının dedektöre ulaşması önlenir. Lüminesans spektrumunun elde edilmesi için ikinci bir monokromatörün (emisyon monokromatörü) örnek ile dedektör arasına yerleştirilmesi gerekir. Daha basit aletlerle monokromatörler yerine uygun filtreler kullanılır. Filtreli aletlere, kullanıldığı amaca göre *florimetre veya fosforimetre*, monokromatörlü aletlere ise *spektroflorimetre veya spektrofosforimetre* adı verilir.

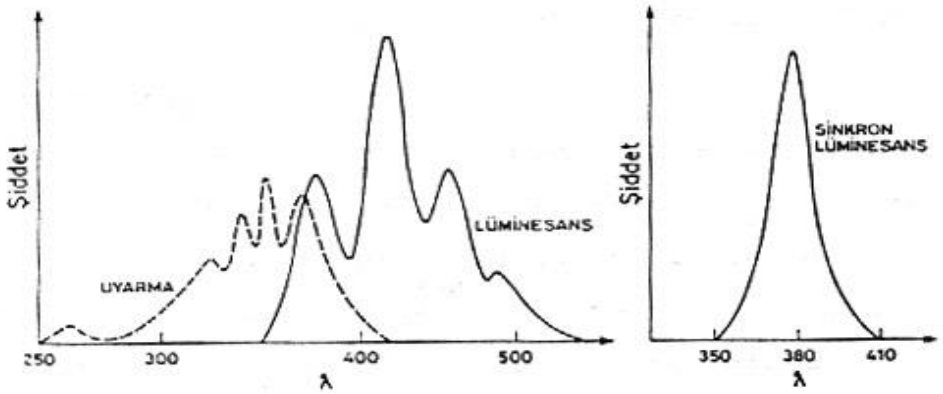


Şekil 10: 2.9. Fotolüminesans ölçümleri için kullanılan cihaz

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 (77K) yapıldığından örnek kabı azot içeren bir Dewar kabına yerleştirilir. Kullanılan Dewar kabının uyaran ve yayılan ışını geçiren pencereleri olması gerekir. Fotolüminesans ölçümlerinde kullanılan dedektör, fotoçoğaltıcı tür dedektördür.

Lüminesansın ölçüldüğü dalgaboyu sabit tutulup, uyarma monokromatöründeki dalgaboyu ayarı değiştirildiğinde, bu lüminesansa yol açan uyarıcı 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 molekülün düzeltilmemiş absorpsiyon spektrumu gibidir.

Uyarma dalga boyu 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, Şekil 2.10. Bu yöntem özellikle birden fazla floresent madde içeren karışımların nicel analizinde kullanılır. Özellikle fosforesans ölçümlerinde birden fazla bileşenin bir arada nicel analizini gerçekleştirebilecek bir başka yöntem de ışık kaynağı belli bir süre kapatıp fosforesans şiddetini zamanla azalmasını ölçmektir.



Şekil 11: 2.10. Antrasenin uyarma, lüminesans ve senkron lüminesans spektrumları

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 (Gündüz,1995).

2.3.2.1. Işık kaynakları

Absorpsiyonun olduğu dalgaboyunda ölçüm yapılabilecek şiddette ışıma yapar. Sürekli ışın kaynakları ve Çizgi (hat spektrumlu) ışın kaynaklarıdır.

Ölçülecek floresans ışınının şiddeti, floresan maddeyi uyarmak için kullanılan ışının P_0 şiddetiyle orantılı olduğundan, ışın kaynağının güçlü olması gerekir. Bu amaçla fotometre ve spektrofotometrelerde kullanılan hidrojen, döteryum ve tungsten ışın kaynaklarından daha güçlü olan düşük basınçlı cıva ark lâmbaları ve yüksek basınçlı ksenon ark lâmbaları kullanılır. Filtreli florometreler için en yaygın kullanılan kaynak, erimiş silika pencereli, düşük basınçlı Civa buhar lambasıdır. Bu kaynak, 254, 302, 313, 546, 578, 691 ve 773 dalga boylarında şiddetli ışınlar yayar. Bu ışınlar kesikli olduklarından, bir absorpsiyon filtresinden veya bir interferans filtresinden geçirilerek ayrı ayrı dalga boyunda ışın demetleri haline getirilir. Işın demetlerinden hiç değilse birisi, üzerinde floresans çalışmaları yapılacak maddeyi (molekülü) uyarmaya uygun ve yeterli olabilir. Bu nedenle böyle bir lâmba, filtre kullanılarak çok geniş bir madde topluluğu için yararlı hale getirilebilir. Fotometrelerde genelde düşük basınçlı cıva ark lâmbası ve filtre bulunur. Böyle cihazlar hassasiyet ve kesinlik bakımından spektroflorometrelerden daha düşüktür. Cıva lâmbası, uygun bir fosforesan madde kaplanarak 320-400 nm lik ışınlar yüksek basınçlı ksenon ark lâmbası elde etmede kullanılabilir. Yüksek basınçlı ksenon lâmbası yaklaşık 300 nm den 1300 nm'ye kadar sürekli ve şiddetli bir ışın bandı verir. Bu ışın bandını floresans ışını elde etmede kullanabilmek için banttaki ışınları dalga boylarına kadar ayırmak gerekir. Böyle bir ayırma ancak greyting monokromatorlarıyla yapılabilir. Bu nedenle, yüksek basınçlı ksenon ark lâmbalarının kullanıldığı cihazlara spektroflorometreler denir. Böyle cihazlar daha kullanışlı ve pahalıdır. Ksenon ark lâmbalarının gücü 75-450 W arasında değişebilir. Bunun için lâmba 15-30 V ve 5-20 A lik bir doğru akım kaynağıyla beslenir (Gündüz, 2002).

2.3.2.2. Filtreler ve Monokromatörler

Dalga boyu ayırıcı sistemlerdir. Dalgaboyu ayırıcıları, çalışılan dalgaboyunu diğer dalga boylarından ayırarak sadece onun dedektöre ulaşmasını sağlar

Hem uyarma demetinin hem de oluşan floresans ışınının dalga boyunun seçilmesi için, florometrelerde girişim ve absorpsiyon filtrelerinin her ikisi de kullanılmıştır. Spektroflorometrelerin çoğu, en az bir ve bazen iki optik ağlı monokromatör ile donatılmıştır.

2.3.2.3. Dedektörler

Işığı elektrik sinyaline çeviren parçalardır. Tipik lüminesans sinyali düşük şiddetlidir; ölçülebilmeleri için yükseltilmeleri gerekir. Duyarlı floresans cihazlarda fotoçogaltıcı tüpler en yaygın kullanılan dedektörlerdir. Bunlar, genellikle, artırılmış sinyal/gürültü oranları elde etmek için foton sayım modunda çalıştırılırlar. Sinyal/gürültü oranlarını artırmak için bazen dedektörlerin soğutulması da gerekir. Bunlar, ışın enerjisini anında elektrik enerjisine dönüştüren sistemlerdir.

2.3.2.4. Hücreler ve Hücre bölmeleri

Floresans veya fosforesans ölçülmesinde camdan veya silikadan yapılmış hücreler (numune kapları) kullanılır. Hücreler silindir veya diktörtgen prizması şeklinde olabilir. Ultraviyole alanında, floresans ışınlarına çok az rastlandığından, cam hücreler tercih edilir. Hücre bölmeleri etrafa yayılan floresans ışınlarını (kaçak ışınlar) absorplayacak şekilde yapılmıştır.

Fosforesans ölçümünde florometrelere uyarma ile fosferansın aralıklı olarak ölçülmesini sağlayacak düzenek eklenir. Fosforimetre ile florometre arasındaki fark budur.

2.3.3. Floresansı Etkileyen Faktörler

1- Molekül yapısının etkisi,

a) Çift bağ konjügasyonunun geniş bir şekilde delokalize olmasına,

b) Molekülün rijitliğine, düzlemsel olmasına ve

c) Bağlı bulunan sübstitüentlere etkisi,

2- Sıcaklık etkisi,

3-Çözücü etkisi,

4- pH etkisi,

5- Konsantrasyonun etkisi,

6- Viskozite etkisi,

7. Çözünmüş oksijen ve paramagnetiklerin etkisi,

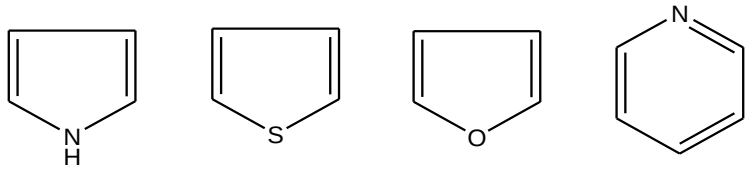
8. Gelen ışının dalga boyunun ve şiddetinin etkisi,

9. Floresans Üzerine Grupların Etkisi,

2.3.3.1. Molekül yapısının etkisi

Moleküllerde düzlemsellik, dönmenin engellenmiş olması, konjugasyon ve halka sayısının artması genellikle floresans verimini arttırır.

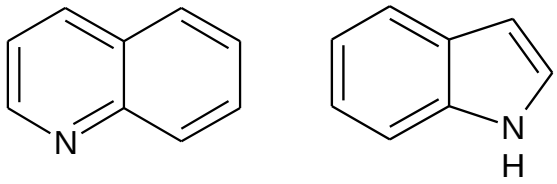
En şiddetli floresans ışınlarını yapısında düşük enerjili $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişine imkân veren aromatik halka ihtiva eden bileşikler verir. Ayrıca yapısında çok sayıda konjüge çifte bağ ihtiva eden alifatik ve alisiklik aromatik halkalar da floresans özellik gösterirler. Ancak, bunların sayısı aromatik bileşiklerin sayısına göre çok azdır. 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.



Pirol Tiyofen Furan Piridin

Bir çok sübstitüe olmamış aromatik bileşik floresans özellik gösterir. Bunların kuvantum verimleri halka sayısıyla ve bu halkaların kondanse olma dereceleriyle orantılı olarak artar. Ancak, aromatik olmalarına rağmen, floresans özelliği göstermeyen bileşikler de vardır. Bunlara pridin, furan, pirol gibi maddeler örnek verilebilir. Bunun nedeni, böyle bileşiklerde en düşük enerjili geçişin $n \rightarrow \pi^*$ olmasıdır. Bu tip bir geçiş sonucu uyarılan maddeler kolaylıkla triplet hale geçerler ve sadece

fosforesans özelliği gösterirler. Buna karşılık bunlara bir benzen halkası kondense olursa, molar absorptiviteleri artar.Daha önce de söylendiği gibi molar absorptivitesi artan bir maddenin uyarılmış halinin ortalama ömrü çok kısalır. Ömrü böyle kısa olan maddeler de şiddetli floresans ışını yayarlar. Buna göre yukarıda verilen heterosiklik aromatik halkalardan meydana gelen **kinolin, indol** gibi maddeler oldukça şiddetli floresans özelliği gösterirler.



Kinolin İndol

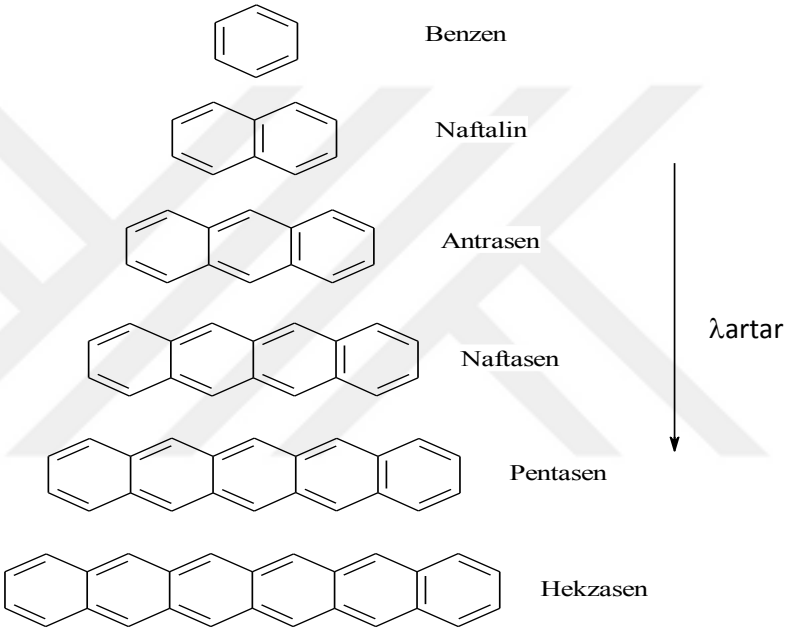
Azot içeren basit heterosiklik halkalarda n→π* düşük enerjili elektronik geçişleri olduğundan, bunlarda haller arası geçiş daha kolay olur ve uyarılmış singlet hal kolayca uyarılmış triplet hale dönüşür. Triplet halden temel hale dönüş ise fosforesans yayma yoluyla olur ve fosforesansın olduğu yerde 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.

a. Konjügasyon etkisi

Konjügasyona hem aromatik hem de alifatik bileşiklerde rastlanır. Bu iki bileşik türü karşılaştırıldığı zaman, aromatik konjügasyonda π elektronları delokalize durumda, alifatik konjügasyonda ise lokalize durumda olduğu görülür. Yani π elektronları aromatik bileşiklerde düşük bir enerjiyle uyarılabilirken alifatik bileşiklerde molekül yapısını bozmadan uyarılabilecek kadar gevşek bağlı değildirler. Ancak alifatik karbonil bileşikleri floresans kuantum verimini çok düşük olacak şekilde bir floresans yapabilirler. Çünkü karbonil oksijeni üzerindeki bağ yapmamış elektron çifti π* orbitaline düşük bir enerji ile uyarılabilir. Yukarıda belirtildiği gibi aromatik bileşiklerde konjuge durumdaki çift bağların π elektronları delokalize durumdadır.

Halka sayısı arttıkça delokalizasyon da artar. Bunun sonucu olarak da halka sayısı arttıkça floresans şiddeti artar.

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



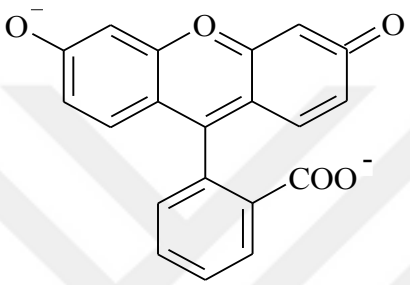
b. Molekülün rijitliğinin ve düzlemselliğinin etkisi

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

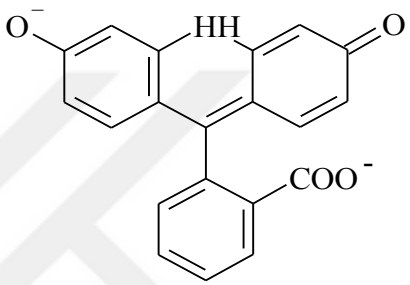
Rijid olmayan moleküllerde iç dönüşme daha kolay olduğundan, ışınlamasız enerji kaybı olasılığı çok daha fazladır. Bu hal, bilindiği gibi floresans şiddetini azaltır. Bundan başka rijid olmayan bir molekülün bir tarafı, öteki tarafına göre daha zayıf enerjiyle uyarılmış olabilir. Bu da floresans emisyonunu azaltan bir etkendir. Emisyon yapabilen moleküllerde çözünmüş oksijen ile molekülün yaydığı ışığı absorplayabilecek

bir başka madde, lüminesans verimini önemli ölçüde azaltır. Özellikle fosforesans çalışmalarında çözünmüş oksijenin ortamdan uzaklaştırılması gerekir. Çözünmüş oksijen genellikle floresans ışımasının şiddetini azaltır. Moleküler oksijen paramagnetik olduğundan, singlet halin triplet hale dönüşmesini kolaylaştırıp floresansı azaltır, diğer paramagnetik maddeler de benzer şekilde davranırlar.

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



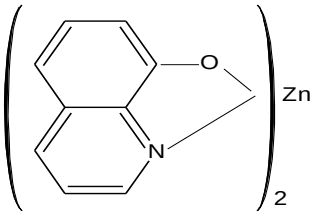
Fluoressin



Fenolftalein

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

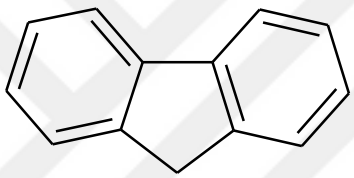
Şelat kompleksi veren bir ligand bir katyonla kompleks verdiği zaman rijiditesi artar ve dolayısıyla floresans emisyonu artar. Örneğin, çinko katyonuyla 8-hidroksikinolinin verdiği kompleks şiddetli floresanstır.



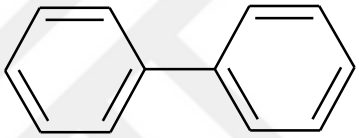
En şiddetli ve en faydalı floresans, düşük enerjili $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerine sahip aromatik fonksiyonel gruplan içeren bileşiklerde görülür. Alifatik ve alisiklik karbonil grupların veya fazla sayıda konjüge çift bağlı yapılar içeren bileşikler de floresans

gösterebilir, ancak bunların sayısı aromatik sistemlerin sayısı ile karşılaştırıldığında daha azdır.

Yapısal rijitlik (yapısal esnemezlik) floresansı artıran bir faktördür. 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. Bu, florenle bifenilin kuvantum verimleri karşılaştırılarak gösterilebilir. Şöyleki, aynı şartlarda florenin kuvantum verimi yaklaşık %100 iken, bifenilinki 0,2 dir. Florenin floresansı, bifenilden 5 defa daha şiddetlidir. Florenle, bifenil arasındaki başlıca fark florendeki fazladan bir metilen grubudur. Bu grubun kendisinin floresans özelliği hiç yoktur. Görevi sadece iki fenil grubunun birbirine göre durumlarını tespit etmek ve molekülü daha rijit hale getirmektedir.



Floren



Bifenil

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. Buna, daha başka örnekler de verilebilir. Ayrıca, böyle floresans özelliği gösteren maddeler bir katı yüzeyinde adsorbe edilirlerse, floresans özellikleri bir miktar daha artar. Bu da katı yüzeyin de maddenin rijitliğini artırdığı anlamına gelir. Yapısal rijitliğe bir başka örnek de kelatlaştırma özelliği olan biligantlardır. Örneğin, 8-hidroksi kinolinin floresans özelliği, çinko iyonuyla kompleks verdiği zaman şiddetle artar. Çünkü, kompleks içinde 8-hidroksi kinolin daha rijit bir hale gelir.

Bir molekülde rijitliğin olmaması, muhtemelen iç geçişleri kolaylaştırmakta ve dolayısıyla floresansı azaltmaktadır. Madde floresans ışıması yapmadan temel hale geçmektedir. 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.

c. Moleküldeki sübstitüentlerin etkisi

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

Çizelge 1: 2.1. Benzenin floresans özelliğine sübstitüentlerin etkisi (etanol içinde).

Madde	Floresans Dalga Boyu(nm)	Bağıl floresans şiddeti	Formülü
Benzen	270-310	10	C_6H_6
Toluen	270-320	17	$C_6H_5CH_3$
Propilbenzen	270-320	17	$C_6H_5\ C_3H_7$
Florobenzen	270-320	10	C_6H_5F
Klorobenzen	275-345	7	C_6H_5C1
Bromobenzen	290-380	5	C_6H_5Br
İyodobenzen	----------	0	C_6H_5I
Fenol	285-365	18	C_6H_5OH
Fenolat	310-400	10	$C_6H_5O^-$
Anisol	285-345	20	$C_6H_5NH_2$
Anilin	310-405	20	$C_6H_5NH_2^-$
Anilinyum iyonu	----------	0	$C_6H_5NH_3^+$
Benzoik asit	310-390	3	C_6H_5COOH
Benzonitril	280-360	20	C_6H_5CN

Molekülün bünyesinde veya molekülün çözündüğü çözücüde bulunan ağır bir atom (I veya Br gibi) molekülün floresans verimini azaltır, triplet oluşumu verimini arttırır ve bu nedenle genellikle fosforesans verimi artar. $-NO_2$ gibi π elektronunu delokalize eden (gevşeten) sübstitüentler, floresansı ya azaltırlar ya da tamamen yok ederler. Örneğin, benzen UV bölgede floresans yapar. Bu moleküle ($-NH_2$) grubu sübstitüe edilirse floresansı artar ve yüksek dalga boyuna kayar. ($-NO_2$) ile sübstitüe edilirse floresans özelliği tamamen kaybolur. Bunun nedeni, anilinde (C_6H_5-NH_2**:**) bağ yapmamış elektron çifti bulunması, nitrobenzende (C_6H_5-NO_2) bu halin görülmemesidir.

Bağ yapmamış elektron çiftleri düşük enerjili ışık fotonlarıyla molekül yapısını bozmadan bir üst enerji seviyesine uyarılabilirler. 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 (Çizelge 2.1).

Lüminesent bir bileşikteki, bileşiğin (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 2,3'de verilmiştir.

Çizelge 2: 2.3. Emisyon dalga boyu ve floresans şiddetine 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

Sübstitüentler arasında halojenlerin farklı bir yeri vardır. Şöyleki: halojen sübstitüsyonda, halojenin atom numarasının artmasıyla maddenin floresans şiddeti azalır. Örneğin, benzenin floresans şiddeti 10 kabul edilirse, florobenzenin de 10 dur. Buna karşılık klorobenzenin 7, bromobenzenin 5 ve iyodobenzenin sıfırdır. Buna daha önce de söylendiği gibi **ağır atom etkisi** denir. Ağır atom etkisinde kalan bir madde kolayca triplet hale geçer ve floresansı azalır veya sıfır olur. İyodun floresans üzerine etkisi kısmen de olsa **predissosyasyonla** açıklanabilir. Başka bir deyişle iyodobenzende kolayca kopacak bir bağ bulunur. Benzen halkasına bir karboksilik grubu sübstitüe olursa, halkanın floresans emisyonu azalır. Çünkü böyle bir sistemde daha düşük enerjili $n\rightarrow\pi^*$ geçişi vardır. Bu geçişin floresans özelliğiyse $\pi\rightarrow\pi^*$ geçişininkine göre çok daha zayıftır. Kısaca 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.

2.3.3.2. Sıcaklık

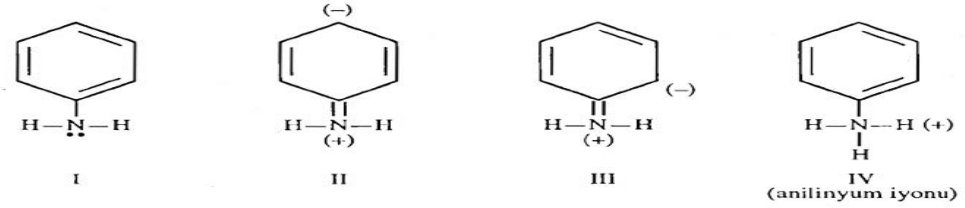
Sıcaklığın yükselmesi çarpışmayı artırdığı ve iç dönüşümü kolaylaştırdığı için floresans ışıması azalır.

2.3.3.3. Çözücü etkisi

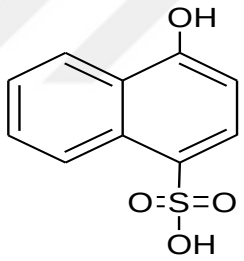
Kullanılan çözücüler floresans şiddetinin veya floresansın görüldüğü dalga boyunun değişmesine neden olabilir. Çözücünün genellikle uyarılmış durumundaki moleküller ile H bağı oluşturması temel hale ışımasız dönüş işleminin hızını arttırdığından floresansın şiddetinde azaltma olur. Çözücünün polarlığının 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. Çözücünün viskozitesinin düşmesi de çarpışmayı kolaylaştırdığından floresans ışımasını azaltır. 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.

2.3.3.4. 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, floresans verimini etkileyen bir faktör olabilir.



Asidik veya bazik bir sübstitüent ihtiva eden aromatik bir maddenin floresansı ortamın pH'na bağlıdır. Böyle maddelerin iyonlaşmış ve iyonlaşmamış (molekül) hallerinin hem floresans şiddetleri, hem de yaydıkları floresan ışınların dalga boyları birbirinden farklıdır. Bunlara anilin ve fenolün molekül ve iyon halleri örnek verilebilir. Anilin, nötral ve bazik ortamda ultraviyole ve görünür alan floresansı yayar. Viyole floresans maddenin molekül halinden (I), görünür alandaki floresans ise, maddenin rezonans hallerinden (II ve III) ileri gelir. Bu II ve III halleri uyarmak, daha uzun dalga boylu ışınlarla gerçekleşir. Buna karşılık anilinyum iyonu floresans vermez veya çok az verir. Anilinyumun rezonansı, benzenin rezonansı kadardır. Benzen ise bilindiği gibi çok zayıf floresans verir. Bu nedenle kantitatif amaçlar için kullanılamaz. Bu olay, asit ve baz indikatörlerinin pH ile değişmesine benzer, bundan yararlanarak renkli çözeltilerin titre edilmeleri teklif edilmiştir. Örneğin, l-naftol-4-sülfonik asidin fenolik halinin (sadece sülfonik asit grubundaki protonun verilmiş hali) floresansı, ultraviyole bölgesinde olduğundan gözle görülemez. Buna karşılık fenolat halinin (fenol protonu da verilmiş) floresansı gözle görülebilir. Bu değişme çok küçük bir pH aralığında gerçekleşir. Bu özelliğinden yararlanılarak madde ayarlı bir bazla titre edilebilir.



1-Naftol-4-sulfonik asit.

Bazla maddenin sülfonik asit grubunun titrasyonu sona erip de fenol grubu titre edilmeye başlanınca, floresans görülür ve bu anda titrasyona son verilir. İşin en ilginç yönü, bu değişmenin fenol protonundan beklenenden daha aşağı bir pH da gerçekleşmesidir. Bunun nedeni uyarılmış halin asitlik sabitinin, temel halin asitlik sabitinden daha büyük olmasıdır. Bu titrasyonun dönüm noktasıdır. Ancak, bu şekilde bulunan dönüm noktasının pH'sı, maddenin asitlik sabitinden hesaplanandan farklıdır. Bunun nedeni maddenin uyarılmış halinin asitlik sabitinin temel halinin asitlik sabitinden farklı olmasıdır. Maddelerin uyarılmış hallerinin asit ve baz sabitleriyle uyarılmamış hallerinin asit ve baz sabitleri arasında büyüklük bakımından 4-5 mertebesinde (10^4-10^5 katı) farklılıklar görülür. Bu nedenle floresanstan analitik

amaçlarla yararlanmak gerekiyorsa, çok iyi pH ayarlaması yapmak gerekir. Uyarmayla asit ve baz sabitinin değişmesi çok rastlanan bir olaydır (Gündüz, 2002).

2.3.3.5. 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.

2.3.3.6. 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.

2.3.3.7. Çözünmüş oksijen ve paramagnetikler

Çözünmüş oksijen genellikle floresans ışımasının şiddetini azaltır. Bunun nedeni, maddenin fotokimyasal indüksiyonla oksitlenmesidir. Ancak, genellikle paramanyetik oksijen mokelülünün etkisiyle bağlanma yoluyla kuinçing olayı meydana gelir. Bu sistemler arası geçişi ve dış geçişi etkiler ve triplet hal ortaya çıkar. Moleküler oksijen paramagnetik olduğundan, singlet halin triplet hale dönüşmesini kolaylaştırıp floresansını azaltır. Bu nedenle analizden önce çözeltiden çözünmüş havanın uzaklaştırılması uygundur.

Oksijenden başka Fe^{+3}, Co^{+2}, Ni^{+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.

2.3.3.8. 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.

Floresans ışıması meydana getiren dalga boylarının alt sınırı 250 nm kadardır. bu nedenle σ*→σ geçişine tekabül eden floresanslara pek rastlanmaz. Anılan dalga boyuna kadar olan ışınlar ancak π→π* ve π→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.

3. KAYNAK ARAŞTIRMASI

J.L. Beltrán ve arkadaşları 2003 yılında yayınladıkları "Asetonitril-su ve su ortamlarında polifenolik asitlerin spektrofotometrik, potansiyometrik ve kromatografik pKa değerleri" adlı çalışmada asetonitril-su ve su ortamlarında polifenolik asitlerin spektrofotometrik, potansiyometrik ve kromatografik olarak pKa değerleri ölçülmüştür. Su ve asetonitril-su karışımlarında dokuz polifenolik asit maddelerinin pKa değerleri spektrofotometrik, potansiyometrik ve sıvı kromatografisi (LC) ölçümleri kullanılarak tespit edilmiştir. Ayrıca, daha önce elde edilen kromatografik piklerin maksimum absorbans spektrumlarına dayalı yeni bir yöntem uygulanmıştır. Bu yöntem LC-UV (diyot algılama (DAD)) cihazlarından elde edilen tüm sonuçlara uygulanabilir ve LC'nin ve spektrofotometrik yöntemlerin saf örnekleri ile çalışma imkanı gibi tüm avantajlarını barındırır. Sonuç olarak, dokuz polifenolik asidin pKa değerlerinin belirlenmesi için farklı yöntemlerin avantajları, sulu ve asetonitril-su ortamında önerilen yöntemlerin uygulanabilirliğini doğrulamak için tarif edilmiştir.

S.A. Al-Tamrah'ın, 1998 yılında yayınlanan "Tenoksikamın spektrofotometrik akış enjeksiyon yöntemiyle tayini" adlı çalışmasında tenoksikam belirlenmesi için yeni bir spektrofotometrik akış enjeksiyon yöntemi kurulmuştur. Bu yöntem, tenoksikamın demir(III)nitratla reaksiyonuna dayanmaktadır. Elde edilen demir (II) potasyum hekzasiyanoferrat (III) ile 724 nm'de ölçülebilen Prusya mavisi şekillenerek reaksiyona girer. Azar azar akma çizgilerine ve hücre duvarına yapışan mavi kompleks alkali oksalat çözeltisi kullanılarak uzaklaştırılmıştır. Tenoksikamın tespit sınırı 0.4 µg ml^{-1} ve doğrusallık aralığı 0,5-100 µg ml^{-1}. Bu yöntem farmasötik preparatlarda tenoksikam tayininde başarıyla uygulanmıştır. 5 µg ml^{-1}' lık ilacın beş tayini için %1.04 bağıl standart sapma ile korelasyon katsayısı 0.99943 (n=8) dür.

Magda H. Barary ve arkadaşlarının 2003 yılında yayınlanan "Piroksikam ve tenoksikamda potansiyel bir safsızlık olarak 2-aminopridinin farmakopideki sınırlar içinde spektroflorimetrik tayini" adlı çalışmaya göre; İngiliz Farmakopisi, 2-aminopiridini (2-AP) piroksikamda (PX) ve tenoksikamda (TX) potansiyel bir safsızlık olarak tanımlamaktadır. 2-aminopiridinin (2-AP) piroksikamdaki (PX) ve tenoksikamdaki (TX) seçici spektroflorimetrik tayini, farmakopideki düzey içinde ya da yakınında, %0.2, doğal floresans ölçümlerine dayalı ya sulu 0.1 N sülfürik asitte ya da dioksanda geliştirilmiştir. Bu nedenle bu yaklaşım tenoksikamın ve piroksikamın toplu

ilaçlardaki ve farmasötik preperatlardaki saflığını onaylamak için sürdürülmüştür. Bu çalışma aynı zamanda, bahsedilen çözücülerdeki seçici floresans ölçümlerine dayalı olarak**,** piroksikam/2-aminopiridin ve tenoksikam/2-aminopridin sistemlerinin eşzamanlı tayinlerini kapsayacak şekilde genişletilmiştir.

Horria A. Mohamed ve arkadaşlarının 2001 yılında "Bazı metal iyonlarıyla tenoksikamın kompleksleşmesi üzerindeki potansiyometrik ve spektroflorimetrik çalışmalar" adlı makalesi yayınlanmıştır. Bu çalışmada, Fe(III), Bi(III), Sb(III), Cr(III), Cd(II) ve Al(III) gibi altı metal iyonuyla tenoksikamın etkileşimi potansiyometrik ve florimetrik metotlar kullanılarak incelenmiştir. Potansiyometrik metotdaki ligandın iyonlaşma sabiti ve komplekslerin oluşan denge sabitleri 25±0.1 °C'de, tabloya geçirilmiştir. $NaNO_3$'ın % 50 (v/v) sulu asetonitril çözeltisindeki iyon şiddeti**,** 0.05 mol dm^{-3} olarak bulunmuştur.1:1,1:2 ve 1:3 kompleksleri metalin liganda oranı ile oluşmaktadır. Metal iyonları varlığında ve yokluğunda tenoksikamın floresansına çalışılmıştır. İlaç florimetrik olarak 0.5 M HNO_3'de 450 nm' nin emisyon dalga boyunda (350 nm' de uyarma) tayin edilebilmektedir. Doğrusal aralık, Al(III) yokluğunda 0.040–0.2 µg/ml, Al(III) varlığında ise 0.016–0.1 µg/ml dir. Tenoksikam fitil enjeksiyon ve tablette önerilen bir yöntem ile tespit edilmiştir. Geri kazanma yüzdesi % 98.16'dan %102,22' ye ulaşmıştır. Ayrıca bu çalışmada tenoksikamın geri kazanımı üzerinde 2-aminopridinin etkisi de incelenmiştir.

Abo El-Maali ve arkadaşları, tenoksikam ve piroksikamın Cu(II), Pb(II) ve Cd(II) iyonları ile şelat yapma eğilimini diferensiyel puls polarografisi ve siklik voltametri yöntemleri kullanarak araştırmışlar, oluşan kompleks bileşiklerin dayanıklılık sabitlerini karşılaştırmışlardır. Taşıyıcı elektrolitin etkisi pH ve diğer parametrelerin de dikkate alındığı bu çalışmada pH 7.4, 4.5 ve 2.1 de tamponlanmış ortamda metal iyonlarının sabit derişimlerine ilaçların ilave edilmesi ile reaksiyonlar yapılmıştır. Kompleks bileşiklerin oluşumu pik potansiyellerindeki kaymalar ve akım şiddetindeki azalmalar ile anlaşılmıştır. Tersinirlikler siklik voltametri ile araştırılmıştır. Cu(II) iyonunun tenoksikam ve piroksikam ile güçlü bir kompleks oluşturma yeteneği olduğu ortaya çıkmıştır. Pb(II) sadece nötral çözeltilerde kompleks oluşturabilirken, Cd(II) herhangi bir reaksiyon göstermemektedir. Cu(II) ile tenoksikam arasındaki kompleksin maksimum 4 koordinasyon sayısına sahip olduğu bildirilmektedir. Kompleksin dayanıklılığı ve stokiyometrisinin, ligandın protonlanmış ve protonlanmamış bölgelerinden dolayı pH'a bağımlı olduğu bulunmuştur. Ortamda fosfat

iyonlarının varlığı, reaksiyonları engelleyebilmektedir. Sonuçta tenoksikamın piroksikamdan daha güçlü bir kompleks oluşturabilme yeteneğine sahip olduğu öne sürülmektedir.

Dixon ve arkadaşları, piroksikam ve tenoksikamın plazmadaki tayinleri için bir yöntem geliştirmişlerdir. Plazmadaki ilaçların eksraksiyonu için, hidroklorik asitli ortamda diklorometan kullanılmıştır. Çözücünün uçurulmasından sonra kolona uygulama yapılmıştır. Hareketli faz olarak asetonitril : su : 0.1 M fosfat tamponu (pH 5.0) (30:30:40) mL dak^{-1} akış hızında alıkonma zamanının 2.3 dakika dolayında olduğu belirtilmektedir. Kalibrasyon derişim aralığının tek doz tenokskam için 0.5-0.6 µg ml^{-1} arasında, tayin sınırının 0.1 µg ml^{-1} düzeyinde ve standart sapmanın %7.9 dolayında olduğu bilinmektedir.

Heizmann ve arkadaşları tenoksikam ve 5-hidroksitenoksikamın insan plazmasında tayini için yüksek basınçlı sıvı kromatografik yöntem önermektedirler. İç standart olarak kullanılan piroksikam ile karıştırılan plazma örnekleri pH3-4 arasında diklorometan ile ekstrakte edildikten sonra, diklorometan uçurulmuş ve kuru kalıntı hareketli faz içine alınarak C-18 ters faz kolona enjekte edilmiştir. Hareketli faz olarak metanol :0.1 M fosfat tamponu (pH5.6) (50:50) kullanılmıştır. Ölçümler 371 nm de UV detektör yardımı ile alınmıştır. 0.8 mL dak^{-1} akış hızı, 60-90 bar basınç ve oda sıcaklığında alıkonma zamanlarının tenoksikam için 7.1, metabolit için 5.5 ve internal standart için 8.7 dakika olduğu bildirilmektedir. 0.5 mL plazma örneği kullanılarak 20 ng ml^{-1} düzeyindeki tayin sınırına erişebildiği öne sürülmektedir. Ayrıca 0.02-0.5 µg ml^{-1} derişim aralığında doğrusallık bulunduğu, bağıl standart sapmanın % 2.5 dolayında olduğu belirtilmektedir. Bu çalışma kapsamında plazma örneklerindeki tenoksikamın dayanıklılığı da incelenmiştir. Laboratuvar ışığı ve sıcaklığında renksiz cam kaplardaki örneklerde 3 saat içerisindeki % 45' lik bir tenoksikam kaybı gözlendiği, ancak karanlık ortamda tutulan örneklerde ise aynı süre içerisinde bir kaybın olmadığı ileri sürülmektedir. Tenoksikamın sulu çözeltilerinin de doğrudan güneş ışığı altında 1 saat içerisinde % 75, doğrudan güneş ışığı olmaksızın 1 saatte % 40' lık bir kayba uğradığı, karanlıkta saklanan çözeltilerde ise 20 saat boyunca herhangi bir kaybın olmadığı vurgulanmaktadır. 24 saat sonra plazmadaki tenoksikam kaybının % 70' i bulduğu, renkli cam kaplarda ise 96 saat sonra yaklaşık % 15' lik bir kayıp olduğu, -18ºC'de ve karanlıkta saklama koşulu ile 3 ay boyunca bir kaybın gözlenmediği öne sürülmektedir. Araştırmacılar, farmakokinetik çalışmalar için daha düşük tayin sınırı istendiğinden

plazmadaki 20 ng ml^{-1} düzeyindeki tenoksikamın ölçülebilmesi için sundukları yöntemin uygun olduğunu savunmaktadırlar.

Lapicque ve arkadaşları çeşitli non-steroidal antienflamatuar ilaçların yüksek basınçlı sıvı kromatografisi kullanarak simultane tayinlerini gerçekleştirmişlerdir. 17 ilaç plazmadan ekstrakte edildikten sonra ters-faz oktadesil silika kolonlara enjekte edilmişlerdir. İç standart olarak (benzoil-4-fenil)-2-bütirik asit kullanılmıştır. Hareketli faz olarak asetonitril : % 0.3 lük asetik asit : tetrahidrofuran karışımı seçilmiştir. Ölçümler 254 ve 370 nm de UV dedektörü ile yapılmıştır. Hareketli faz bileşenlerinin çeşitli oranlarına, pH'a ve kolon sıcaklığına göre alıkonma zamanlarındaki değişiklikler incelenmiştir. Tenoksikam için bu parametrelerin değişmesi ile alınkonma zamanı genellikle sabit kalmaktadır. Asetonitril : %0.3 lük asetik asit : tetrahidrofuran (36 :63.1 :0.9 v/v) sisteminde 40 $^{\circ}$C'de 1 mL dak^{-1} akış hızında , pH 3 dolayında ve her iki dalga boyundaki ölçümlerde tenoksikam için alıkonma zamanının 3.4 dakika olduğu bulunmuştur. Ayrıca dietil eter ile 1 kez ekstrakte edilmekle tenoksikamın %71'inin alınabildiği, çalışma derişiminin 0.1- 80 μg ml^{-1} aralığında, tayin sınırının 0.02 μg ml^{-1} düzeyinde ve standart sapmanın 0.12 olduğu da öne sürülmektedir.

Troconiz ve arkadaşları plazma, kan ve tampon çözeltilerindeki piroksikam ve tenoksikam tayinleri için bir yüksek basınçlı sıvı kromatografik yöntem sunmaktadırlar. Bu çalışmada, ilaçların birinin tayininde diğerinin iç standart olarak kullanıldığı bildirilmektedir. Nucleosil C-18 kolon ve asetonitril : su:asetik asit (58:38:4) sisteminin hareketli faz olarak kullanıldığı bu araştırmada akış hızının 1 mL dak^{-1}, çalışma basıncının 1.5 psi olarak seçildiği, ölçümlerin ise 365 nm de UV dedektörü kullanılarak gerçekleştirildiği bildirilmektedir. Sadece proteinleri çöktürüp santrifüj ederek, herhangi bir ektraksiyon ve uçurma (evaporasyon) işlemine başvurmadan tayinlerin yapılabileceği ileri sürülmüştür. Tenoksikam için 1-25 μg mL^{-1} derişim aralığında doğrusallık bulunduğu ve belirtilen çalışma koşullarında alıkonma zamanının 1.5 dakika olduğu, bu yöntemle 0.2 μg mL^{-1} derişim düzeyine kadar tayinlerin yapılabileceği savunulmaktadır.

Abo El-Maali ve Hassan, piroksikam ve tenoksikamın elektrooksidasyonuna dayanarak karbon pasta elektrot ile bu bileşiklerin tayin edilebilmelerine yönelik bir yöntem önermektedirler. Her iki ilacın tayini için de adsorptif ön-deriştirme tekniği kullanılarak voltametrik analizler gerçekleştirilmiştir. Karbon pasta elektrdoun seçiciliği

ve etkinliğinin modifiye edilerek arttırılabileceği öne sürülmektedir. Bu amaçla, karbon pastası içerisinde laurik asit, stearik asit gibi yağ asitleri karıştırılarak elektrotların hazırlandığı belirtilmektedir. Uygun bir süre ve potansiyelde elektrotların yüzeyine ön-deriştirme tekniği uygulanmış ve süre sonunda voltamogramlar kaydedilmiştir. Piroksikam ve tenoksikamın siklik voltametrik davranışlarının birbirine benzediği gösterilmiştir. Yöntem idrarda düşük derişimlerde bulunabilecek piroksikam ve tenoksikam için de uygulanmıştır. Yüksek adsorpsiyon ve seçicilik özelliğinden dolayı, idrar gibi karmaşık ortamlarda bile kullanabilmek amacı ile laurik asit ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot kullanılmıştır. Ürik asitin varlığı çalışmaları etkilememiş, oysa askorbik asitin varlığı girişimlere neden olmuştur. Bu sorunun da ortam değiştirme tekniği kullanılarak çözülebileceği belirtilmektedir. $1x10^{-7}$ M tenoksikam derişiminin tayin edilebileceği, yöntemin biyolojik sıvılardaki tayinler için uygun bir yöntem olduğu öne sürülmüştür.

Kráčmar ve Kráčmarová ilaçların UV spektrofotometrik yöntemle kontrolleri konusunda, aralarında tenoksikamın da bulunduğu 15 ilacın UV spektrumlarını kaydetmişlerdir. Tenoksikam için iki çözücü sisteminde spektrumlar alınmıştır. Kloroform içerisinde, 1-30 μg mL^{-1} derişim aralığında, 275 ve 345 nm' lerde maksimum absorbans verdiğini, %90 metanollü 0.01 M NaOH içerisinde ise 1-45 μg mL^{-1} derişim aralığı için, maksimum absorbansların 265, 289 ve 372 nm' lerde olduğunu belirtmektedirler.

Literatürde yer alan çalışmalar incelendiğinde, oksikamların çeşitli çözücü ortamlarında spektrofotometrik ve spektroflorimetrik yöntemlerle yapılmış iyonlaşma sabitlerinin tayinine hemen hemen hiç rastlanmamıştır. Bu nedenle bu konuda yapılan bu çalışma ile literatüre de katkıda bulunulacağı düşünülmektedir.

4. METERYAL VE YÖNTEM

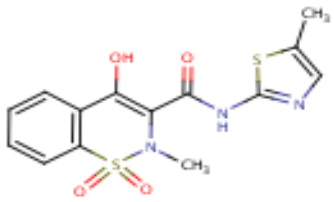
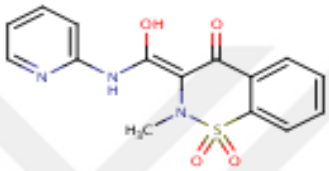
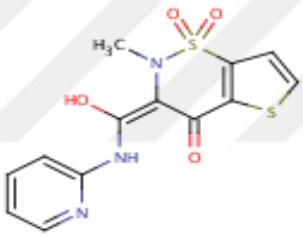
Bu tez çalışması kapsamında öncelikle NSAEİ'lerin organik çözücü-su ortamlarında florimetrik parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Florimetrik parametrelerin belirlenmesi için, öncelikle saf asetonitril, metanol, DMF, THF ve su içerisinde, daha sonra %10 - %50 organik çözücü su karışımlarında ilaç etken maddelerinin uygun derişimlerdeki çözeltileri hazırlanarak, uyarma dalga boyları 10' ar nm aralıklarla değiştirilip emisyon spektrumları alınmış ve her bir ilaç etken maddesinin, her bir organik çözücü-su ortamında maksimum floresans şiddetine sahip oldukları uyarma ve emisyon dalga boyları belirlenmiştir. Aynı zamanda, bu ilaç etken maddelerinin florimetrik parametreleri (uyarma ve emisyon dalga boyu, floresans şiddeti) üzerine pH' nın etkisi de incelenmiştir. Ayrıca, NSAEİ'lerin kimyasal yapısındaki asidik ve bazik gruplardan dolayı, sahip oldukları asidik ve bazik özelliklerinin, pKa değerlerinin belirlenmesi de amaçlanmıştır. Bu amaçla, NSAEİ'lerin su ve farklı bileşimdeki % DMF-su, % THF-su, % asetonitril-su ve % metanol-su ortamlarında uygun derişimde ve farklı pH' larda hazırlanan çözeltilerinin, pH ile floresans şiddeti (optimum uyarma ve emisyon dalga boyundaki) arasındaki bağıntıya göre pH-floresans şiddeti grafikleri çizilerek, pKa değerleri belirlenmiştir. Bu maddelerin pKa değerleri aynı zamanda spektrofotometrik yöntemle de tayin edilip, iki yöntem ile elde edilen sonuçlar birbirleriyle ve teorik olarak bileşiklerin pKa değerlerini hesaplayan SPARC programıyla elde edilen pKa değerleriyle karşılaştırılmıştır.

4.1. Kimyasal Maddeler

4.1.1. Non-Steroidal Antienflamatuarlar (Oksikamlar)

Bu çalışmada kullanılan NSAEİ'lerin (oksikamların) CAS numaraları, bileşiğin formülü, molekül ağırlıkları ve açık formülleri ile Çizelge 4.1. 'de verilmiştir.

Çizelge 3: 4.1. Deneylerde kullanılan NSAI'ların bazı kimyasal özellikleri

Maddenin Adı	Açık formülü	Kapalı formülü	Molekül ağırlığı	CAS numarası
Meloksikam		$C_{14}H_{13}N_3O_4S_2$	351.401	71125-38-7
Piroksikam		$C_{15}H_{13}N_3O_4S$	331.346	36322-90-4
Tenoksikam		$C_{13}H_{11}N_3O_4S_2$	337.374	59804-37-4

4.1.2. Kullanılan çözücüler

Çözeltilerin hazırlanmasında kullanılan asetonitril (ACN), metanol, DMF ve THF Merck firmasından temin edildi. Tüm deneysel çalışma boyunca çözeltilerin hazırlanmasında ultra saflıkta su kullanılanıldı.

Çizelge 4: 4.2. Kullanılan çözücülerin özellikleri ve solvatokromik parametreleri

Çözücü	D	μ	η	α	β	π*	DN	AN	$E_T^{(30)}$	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

D = Çözücünün dielektrik sabiti (20-25°C)
μ = Çözücünün dipol momenti (debye biriminde)
η = Çözücünün viskozitesi (centipoise biriminde)
DN = Gutman'ın donör sayısı
AN =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

4.1.3. Non-Steroidal Antienflamatuar (Oksikam) çözeltilerinin hazırlanması

Non-Steroidal Antienflamatuarların (Oksikamların) asetonitril (ACN), THF, DMF ve metanolde 10^{-4}M derişimde stok çözeltileri hazırlandı. Floresans özelliklerinin incelenmesinde, pH çalışmalarında bu çözeltiler kullanıldı. Çalışma çözeltileri, stok çözeltilerden uygun miktarlarda alınıp 10^{-5} M' a seyreltilerek hazırlanmıştır. Yüzde çözücü ortamı çalışmalarında, uygun hacimlerde organik çözücü ve su kullanarak çözeltiler hazırlanmıştır.

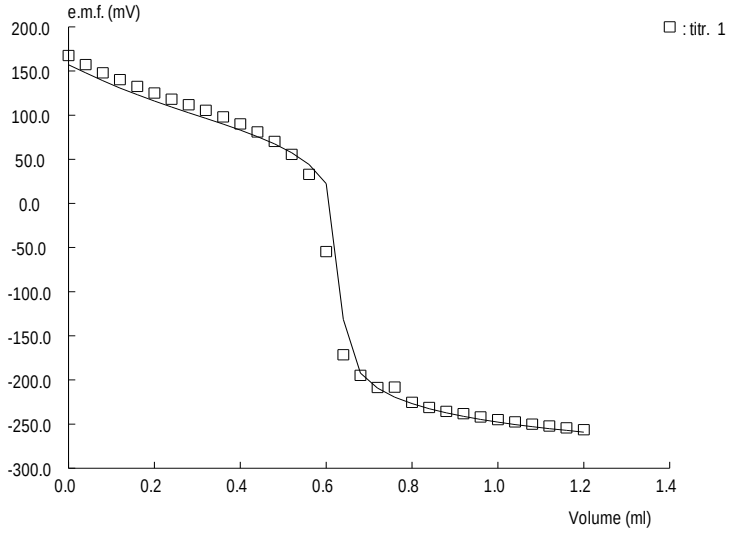
4.1.4. Titrant çözeltisinin hazırlanması

0.1 M'lık titrant çözeltisi 50 mL'lik balon jojede 0.1 M KCl içerecek şekilde, her bir % çözücü ortamında, 1.0 M'lık Titrisol KOH çözeltisinden hazırlanmıştır. 0.1 M KCl çözeltisi, pH çalışmasında titrant çözeltilerinin (0.1 M KOH ve HCl çözeltileri) ve ortamın iyonik şiddetini sabit tutmak amacıyla kullanılmıştır.

Titrasyonlar, her seferinde 25ºC' de sıcaklığın sabit tutulduğu titrasyon hücresine, 40 mikrolitre titrant ilave edilip potansiyeller E(mv) kaydedilerek yapılmıştır. Bu işleme titrant hacmi 1.2 mL oluncaya kadar devam edilmiştir (dönüm noktası 0.6 mL'dir).

4.1.4.1. Titrant baz çözeltisinin ayarlanması

Titrant baz çözeltisinin ayarlanması için potasyum asit fitalat (KHP) kullanıldı. KHP kullanılmadan önce etüvde 120 ºC de 2 saat kurutma yapıldı. Daha sonra 3×10^{-3} M KHP hazırlamak amacıyla 0.01225 g KHP tartıldı. KHP az miktarda ultra saf suyla çözüldü ve pH ölçümlerinin yapılması için 25ºC' de sıcaklığın sabit tutulduğu titrasyon hücresine aktarıldı. Ortamın iyonik şiddetini dengede tutmak için 2mL 1M KCl çözeltisi, %10 asetonitril-su ortamı için 2mL, % 20 asetonitril-su ortamı için 4ml, % 30 asetonitril-su ortamı için 6mL, % 40 asetonitril-su ortamı için 8 mL asetonitril titrasyon hücresine ilave edildi. Titrasyon hücresindeki çözeltinin hacmi saf suyla 20 mL'ye tamamlandı. Ortamın sıcaklığı 25ºC de sabit tutmak amacıyla su ceketli reaksiyon hücresi sirkülasyonlu su banyosuna bağlandı.

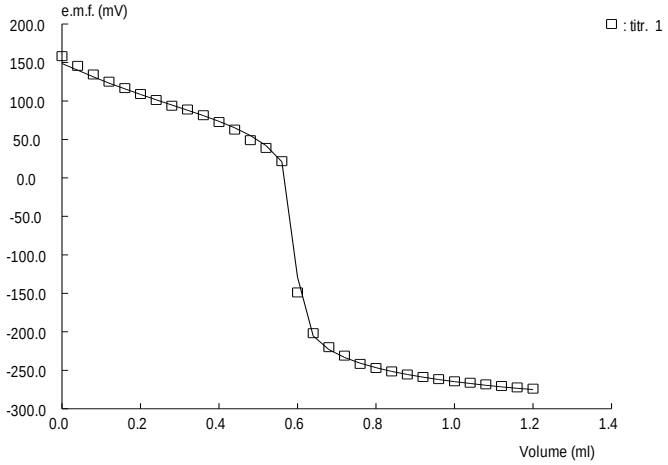


Şekil 12: 4.1. 0.1 M KOH çözeltisinin %10 asetonitril-su ortamında potasyum asit ftalat ile ayarlanmasına ait PKPOT programında çizilen titrasyon grafiği

4.1.4.2. Titrant asit çözeltisinin ayarlanması

KHP ile ayarlanan 0,1 M'lık KOH kullanılarak, 1.oM'lık Titrisol HCl çözeltisi ayarlanmıştır. Ortamın iyonik şiddetini dengede tutmak amacıyla 2mL KCl ilave edildi. % 10 asetonitril-su ortamı için 2mL, % 20 asetonitril-su ortamı için 4ml, % 30 asetonitril-su ortamı için 6mL, % 40 asetonitril-su ortamı için 8 mL asetonitril tüpe ilave edildi. Toplam hacmin 20mL olması için 16mL saf su ilave edildi. Hazırlanan 0.1

M’ lık HCl çözeltisinden 40’ar µL’lik ilaveler yapılarak titrasyon gerçekleştirilmiş ve asit çözeltisi ayarlanmıştır.



Şekil 13: 4.2. 0.1 M HCl çözeltisinin %10 asetonitril-su ortamında ayarlı 0.1 M ayarlı KOH çözeltisiyle ayarlanmasına ait PKPOT programında çizilen titrasyon grafiği

4.3. Kullanılan Cihazlar

Bu çalışmada floresans ölçümleri için laboratuarımızda bulunan Perkin Elmer LS/55 spektroflorimetre kullanıldı. Uyarma monokromotorunun slit aralığı 10 nm emisyon monokromotorunun slit aralığı ise 10 nm olarak ayarlandı ve tüm ölçümler bu aralıkta yapıldı. Spektrofotometrik ölçümler için ise AGİLENT 8453 marka UV-görünür bölge spektrofotometre kullanıldı.

Deney çözeltilerinin pH’ larını ayarlamak amacıyla Mettler Toledo marka pH metre ve Mettler Toledo marka cam elektrot kullanıldı. pH metrenin kalibrasyonu Merck firmasından temin edilen pH 4, 7 ve 10 tamponlarıyla yapıldı. Elektrot deneyler yapılmadan 24 saat önce kullanılacak çözücülerde şartlanması için bekletildi.

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

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

4.4. Deneysel Yöntem

Oksikamların 10 mL'lik balon jojede asetonitril ortamında 10^{-3} M ve 10^{-4} M derişimlerinde hazırlanan stok çözeltilerden 2 mL alınarak reaksiyon hücresine aktarıldı. Reaksiyon hücresi Şekil 4.3'de görülmektedir. Hücereye 2 mL 1M KCl çözeltisi, %10 asetonitril ortamı için ACN ilave edilmedi, % 20 asetonitril ortamı için 2 ml ACN, % 30 asetonitril ortamı için 4 mL ACN, % 40 asetonitril ortamı için 6 ml ACN ilave edildi. Daha sonra oksikamların uygun derişimlerde ve ortamda hazırlanan çözeltileri, asidik iyonlaşma sabitlerini belirlemek amacıyla öncelikle ayarlı 0.1 M KOH çözeltisiyle, bazik iyonlaşma sabitlerini belirlemek için de ikinci bir titrasyonda ayarlı 0.1 M HCl çözeltisiyle, 40ar μL'lik kısımlar eklenerek titre edildi. Herbir titrant ilavesinden sonra reaksiyon hücresinden alınan 1 mL'lik çözeltinin (ölçümden sonra çözelti tekrar reaksiyon kabına aktarılmıştır), daha önce her bir % asetonitril-su ortamı için spektroflorimetride 200-800 nm arasında uyarma dalgaboyu 10 nm aralıklarla değiştirilerek çoklu spektrumları alınmasıyla belirlenen, çözücü ortamının en düşük, maddenin en yüksek floresans şiddeti verdiği en uygun uyarma (λ_{ekz}) ve emisyon dalga boylarında (λ_{em}), emisyon ve belirlenen en uygun absorpsiyon dalga boyunda da absorpsiyon spektrumları alındı. Elde edilen spektrumlardan, belirlenen dalga boylarında floresans şiddetleri ölçüldü, eş zamanlı olarak da UV spektrofotometrede absorbans değerleri kaydedildi. Floresans şiddeti verileri pH'ya karşılık grafiğe geçirilerek pK_a ve pK_b değerleri belirlendi. Spektrofotometrik çalışmayla da absorbans verilerinden STAR programı kullanılarak iyonlaşma sabitleri hesaplandı.



Şekil 14: 4.3. Oksikamların titrasyonunda kullanılan deney düzeneği.

5. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

5.1. Oksikamların Spektroflorimetrik Özelliklerinin Belirlenmesi

Çalışmada kullanılan Oksikamların stok çözeltileri, asetonitril, metanol, DMF, THF ve su ortamlarında, derişimleri 10^{-3}mol.l^{-1} olacak şekilde hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiler, bozunmayı azaltmak amacıyla buzdolabında +5-10˚C' de ve karanlıkta saklanmıştır. Çalışma çözeltileri, %10-%50 asetonitril, metanol, DMF ve THF içeren sulu ortamlarda 10^{-4} mol.l^{-1} olacak şekilde seyreltilerek günlük olarak hazırlanmıştır**.** Floresans özelliklerinin incelenmesinde ve pH çalışmalarında, belirli yüzdede organik çözücü içeren sulu ortam çözeltileri ve ortamın iyonik şiddetini dengede tutmak için 0.1 M KCl çözeltisi kullanıldı. Titrasyonlarda kullanılan 0.1 M'lık KOH ve HCl çözeltileri her bir yüzdede organik çözücü içeren sulu çözelti ortamlarında hazırlandı. 25 ml'lik balon jojelerde meloksikam, piroksikam, tenoksikam ve naproksenin su, MeOH, ACN, DMF, THF çözücüleri ile 10^{-4} M derişiminde çözeltileri hazırlandı ve maddelerin bu ortamlarda çözünüp çözünmediği kontrol edildi (Çizelge 5.1).

Maddelerin bu ortamlarda çözünüp çözünmediği kontrol edildikten sonra, aynı çözücüler ile %10, %20, %30, %40, %50 organik çözücü içeren sulu çözeltileri hazırlandı. Daha sonra bu çözeltilerin floresans özelliklerini incelemek amacıyla sırasıyla her bir yüzde çözücü ortamı için spektroflorimetride 200-800 nm arasında 10 nm aralıklarla çoklu spektrumları alındı. Daha sonra kullanılan yüzde çözücü ortamlarının da aynı aralıkta çoklu spektrumları alınıp çözücü ortamının en düşük maddenin en yüksek floresans şiddeti verdiği en uygun uyarma (λ_{ekz}) ve emisyon dalga boyları (λ_{em}) belirlendi. Hazırlanan çözeltilerin önce spektroflorimetride, belirlenen dalga boylarında floresans şiddetleri ölçüldü, daha sonra eş zamanlı olarak UV spektrofotometrede absorbans değerleri kaydedildi.

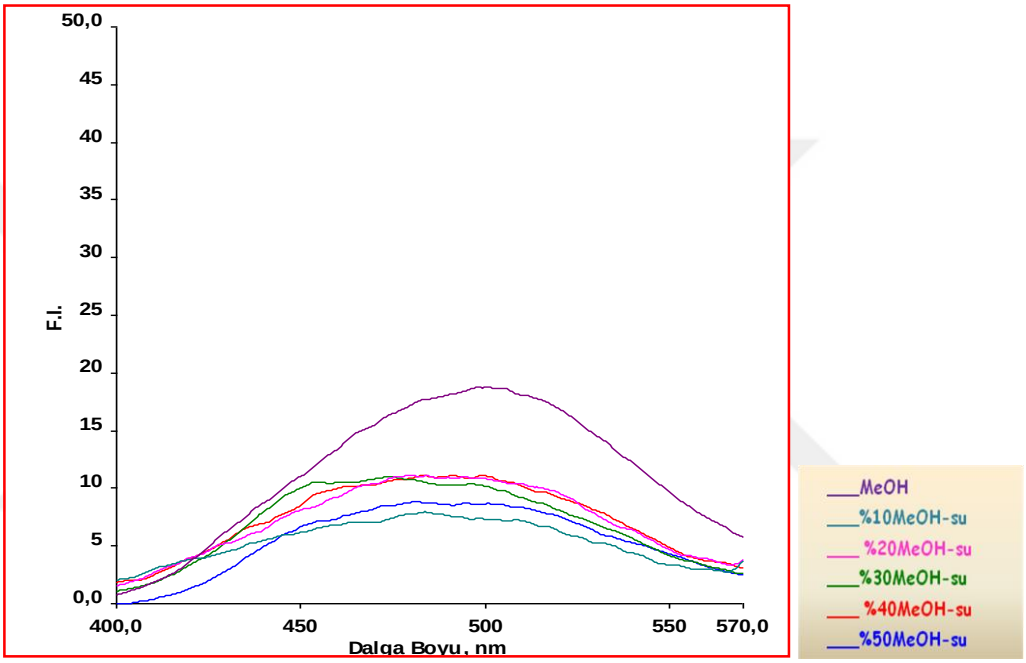
Çizelge 5: 5.1. Oksikamların, asetonitril, metanol, DMF, THF ve su ortamlarında çözünme durumu.

Madde	Çözücü	Çözünme Durumu
Meloksikam	Su	-
	MeOH	+
	ACN	+
	DMF	+
	THF	+
Piroksikam	Su	+
	MeOH	+
	ACN	+
	DMF	+
	THF	+
Tenoksikam	Su	-
	MeOH	Isı ile çözünme
	ACN	+
	DMF	+
	THF	+
	Su	+
	MeOH	+
	ACN	+
	DMF	+
	THF	+

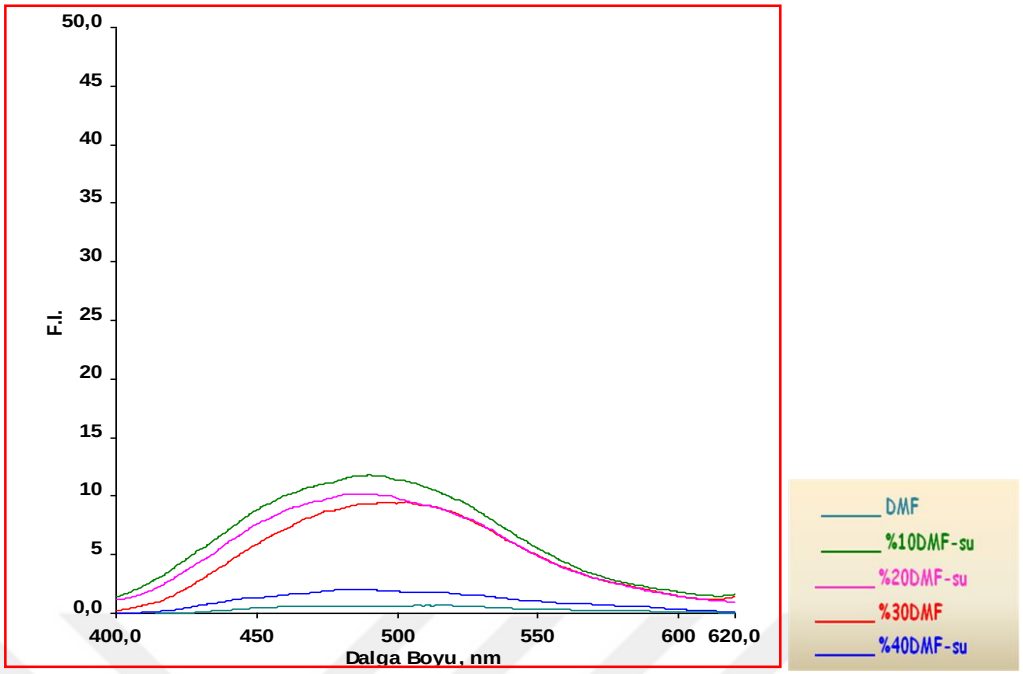
Oksikamların organik çözücü-su ortamlarında florimetrik parametrelerinin belirlenmesi için, öncelikle saf asetonitril, metanol, DMF, THF ve su içerisinde, daha sonra %10-50 organik çözücü su karışımlarında uygun derişimlerdeki çözeltileri hazırlanarak, uyarma dalga boyları 10’ ar nm aralıklarla değiştirilip emisyon spektrumları alınmış ve her bir oksikam bileşiğinin, her bir organik çözücü-su ortamında maksimum floresans şiddetine sahip oldukları uyarma ve emisyon dalga boyları belirlenmiştir.

5.1.1. Meloksikamın emisyon spektrumları

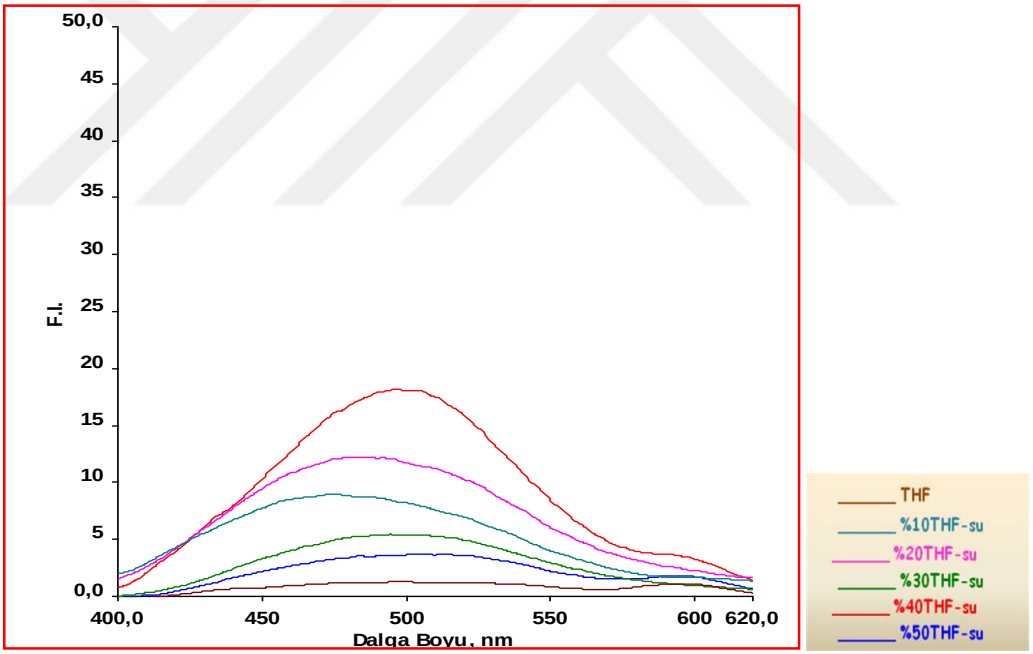
Meloksikamın %10-%50 metanol, DMF ve THF içeren su ortamlarında hazırlanan 10^{-4} M' lık çözeltilerinin, çoklu spektrum taramalarıyla belirlenen en uygun uyarma dalga boyunda emisyon spektrumları alınmış ve aynı dalga boyunda alınan çözücüye ait emisyon spektrumu ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 15: 5.1. Meloksikamın %10-%50 MeOH-Su ortamlarındaki emisyon spektrumları (λ_{ekz}= 362 nm)



Şekil 16: 5.2. Meloksikamın %10-%50 DMF-Su ortamlarındaki emisyon spektrumları (λ_{ekz}= 367 nm)



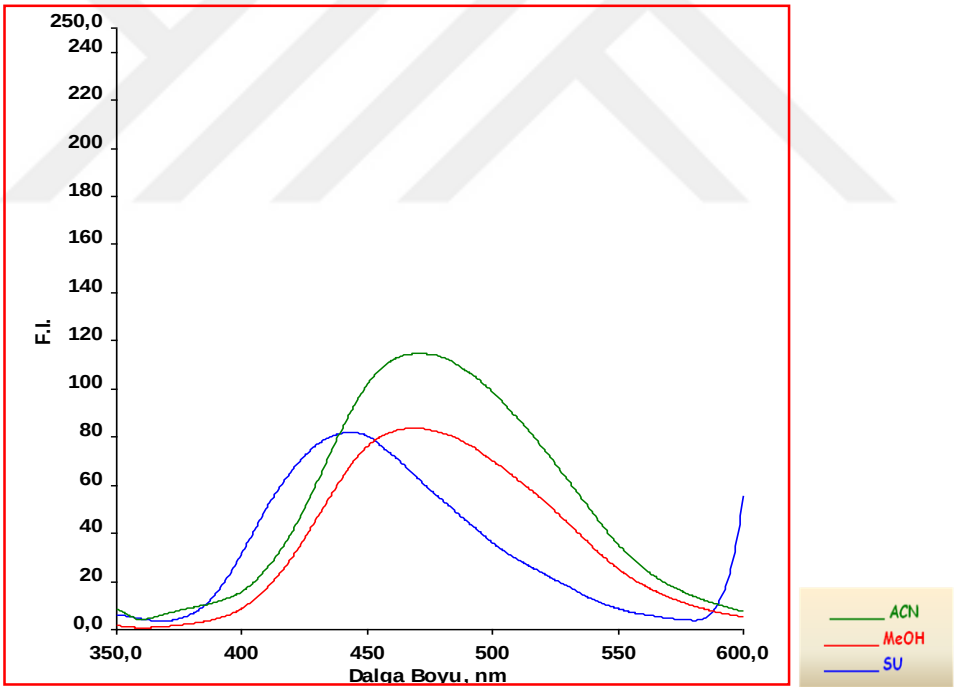
Şekil 17: 5.3. Meloksikamın %10-%50 THF-Su ortamlarındaki emisyon spektrumları (λ_{ekz}= 398 nm)

Meloksikam %10-%30 DMF ve %10-40 THF içeren sulu çözücü ortamlarında, diğer ortamlara göre daha yüksek floresans şiddetine sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.2 ve 5.3). Saf DMF ve THF'ın floresans şiddetleri ise oldukça düşüktür. Su karışımlı organik çözücülerde su yüzdesi arttıkça çözücü ortamının polaritesi de artarak

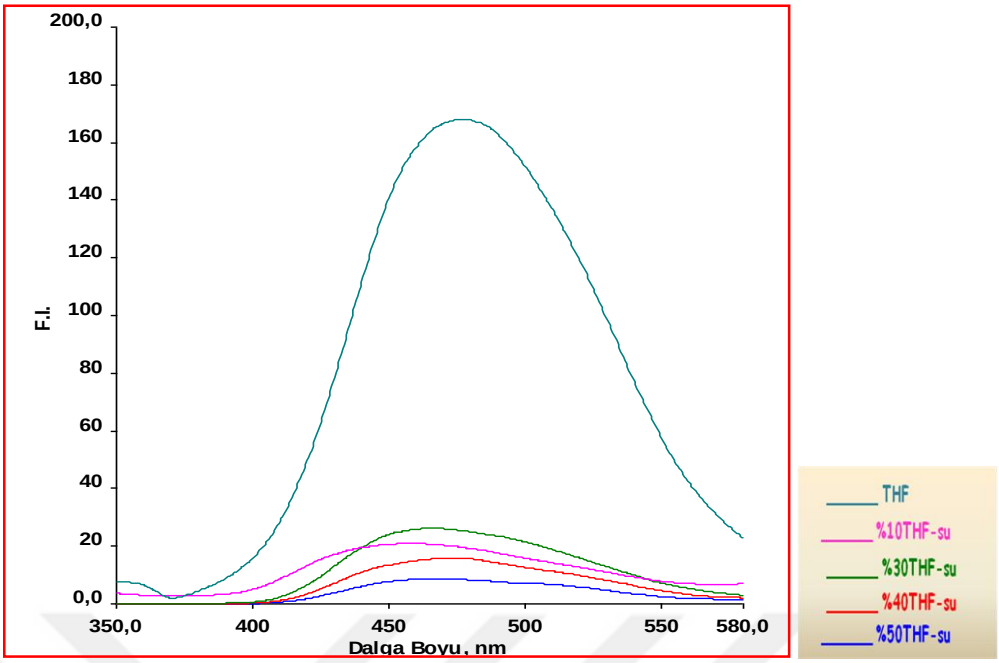
maddenin polaritesine yakın olması sebebiyle oldukça iyi çözündüğü ve bu ortamların maddenin floresans şiddetini arttırdığı şeklinde yorumlanabilir. Meloksikamın %10-%50 metanol içeren sulu çözücü ortamlarındaki emisyon spektrumlarının, saf metanoldeki emisyon spektrumunun altında kaldığı gözlenmiştir (Şekil 5.1). İyonlaşma sabitlerinin düşük yüzdede organik çözücü içeren sulu çözücü ortamlarında tayin edilmesi daha uygun olduğundan, metanol-su ortamlarında spektroflorimetrik çalışma yapmak mümkün değildir.

5.1.2. Piroksikamın emisyon spektrumları

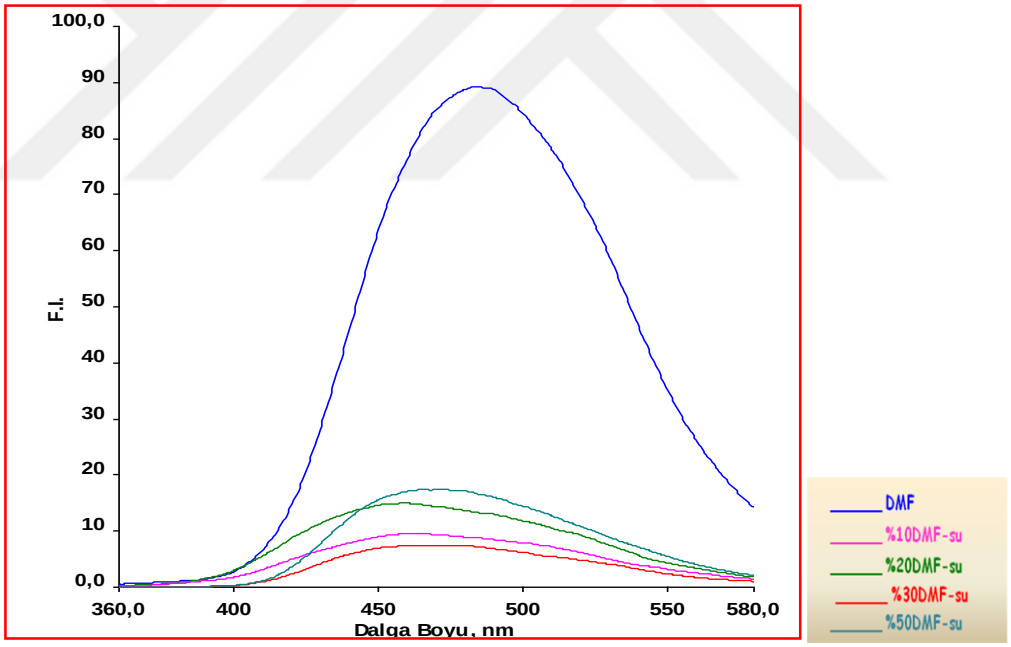
Piroksikamın asetonitril, metanol, su, %10-%50 DMF ve THF içeren su ortamlarında hazırlanan 10^{-4} M' lık çözeltilerinin, çoklu spektrum taramalarıyla belirlenen en uygun uyarma dalga boyunda emisyon spektrumları alınmış ve aynı dalga boyunda alınan çözücüye ait emisyon spektrumu ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 18: 5.4. Piroksikamın asetonitril, metanol, su ortamlarındaki emisyon spektrumları (λ_{ekz}= 329 nm)



Şekil 19 5.5. Piroksikamın %10-%50 THF-Su ortamlarındaki emisyon spektrumları (λ_{ekz}= 342 nm)



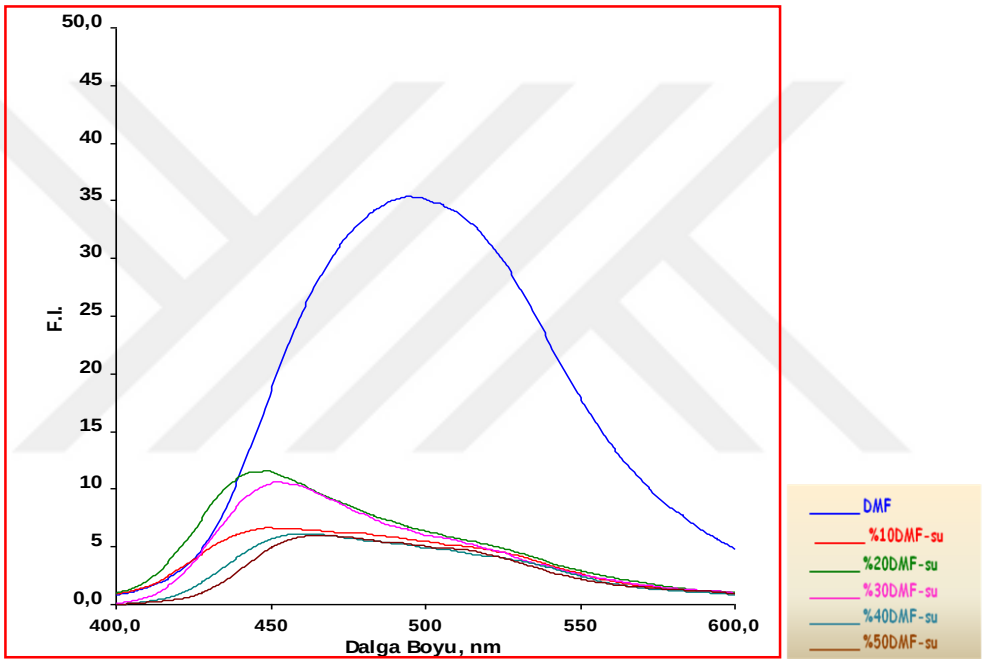
Şekil 20: 5.6. Piroksikamın %10-%50 DMF-Su ortamlarındaki emisyon spektrumları (λ_{ekz}= 337 nm)

Piroksikamın emisyon spektrumları incelendiğinde, saf çözücü ortamlarında, özellikle de THF ve asetonitrilde oldukça yüksek, organik çözücü içeren sulu çözücü ortamlarında ise çok düşük floresans şiddetine sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.4-5.6). İyonlaşma sabitlerinin düşük yüzdede organik çözücü içeren sulu çözücü

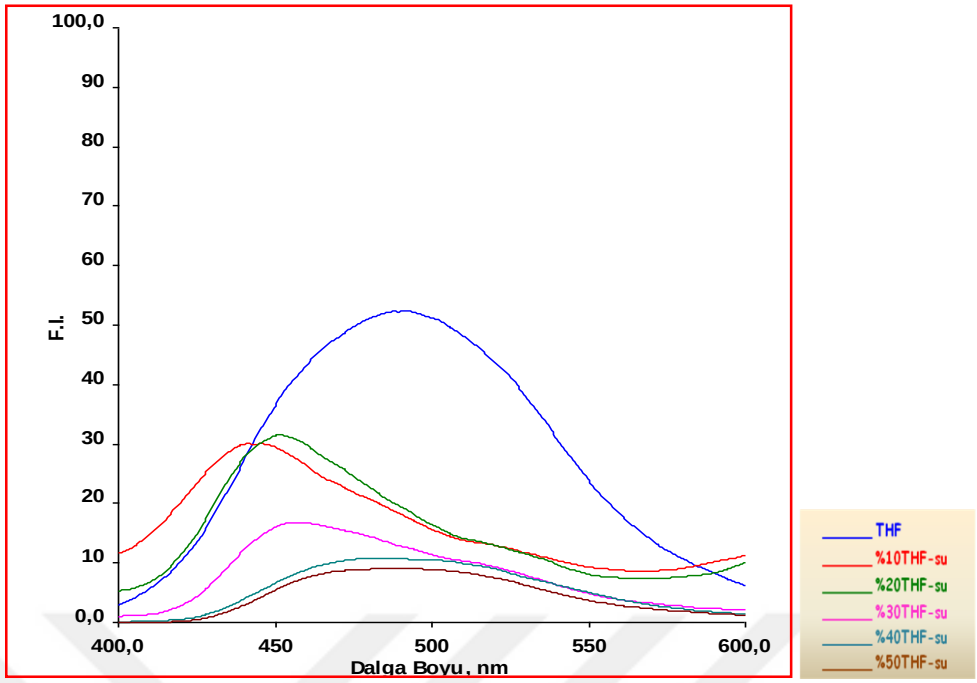
ortamlarında tayin edilmesi daha uygun olduğundan, su karışımlı organik çözücü ortamlarında spektroflorimetrik çalışma yapmak mümkün değildir.

5.1.3. Tenoksikamın emisyon spektrumları

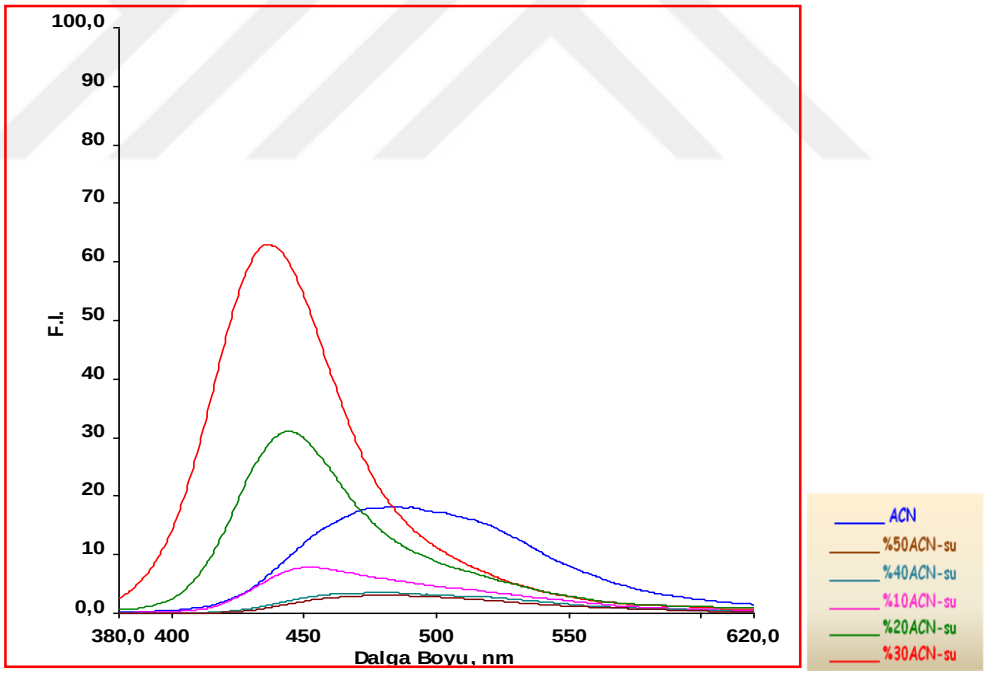
Tenoksikamın %10-%50 asetonitril, DMF ve THF içeren su ortamlarında hazırlanan 10^{-4} M' lık çözeltilerinin, çoklu spektrum taramalarıyla belirlenen en uygun uyarma dalga boyunda emisyon spektrumları alınmış ve aynı dalga boyunda alınan çözücüye ait emisyon spektrumu ile karşılaştırılmıştır.



Şekil 21: 5.7. Tenoksikamın %10-%50 DMF-Su ortamlarındaki emisyon spektrumları (λ_{ekz}= 382 nm)



Şekil 22: 5.8. Tenoksikamın %10-%50 THF-Su ortamlarındaki emisyon spektrumları (λ_{ekz}= 370 nm)



Şekil 23: 5.9. Tenoksikamın %10-%50 Asetonitril-Su ortamlarındaki emisyon spektrumları (λ_{ekz}= 336 nm)

Tenoksikamın emisyon spektrumları incelendiğinde, saf çözücü ortamlarında, özellikle de DMF ve THF' de oldukça yüksek, %10-%30 DMF, THF ve asetonitril içeren sulu çözücü ortamlarında, diğer ortamlara göre daha yüksek floresans şiddetine sahip olduğu gözlenmiştir (Şekil 5.7- 5.9). Saf DMF ve THF'ın floresans şiddetleri ise

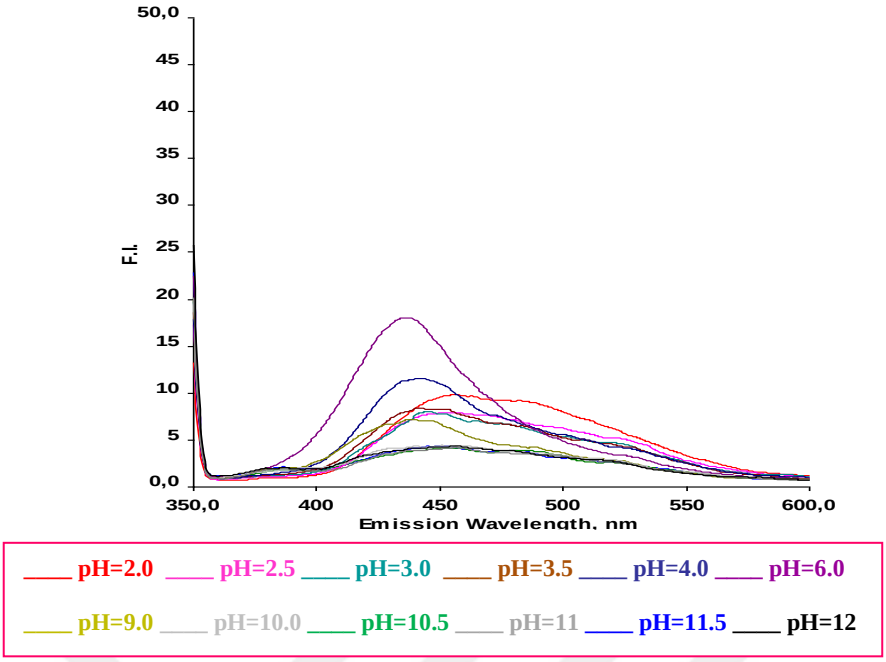
oldukça düşüktür. Su karışımlı organik çözücülerde su yüzdesi arttıkça çözücü ortamının polaritesi de artarak maddenin polaritesine yakın olması sebebiyle emisyon dalga boylarının daha düşük dalga boylarına kaydığı (maviye kayma) görülmüştür. İyonlaşma sabitlerinin düşük yüzdede organik çözücü içeren sulu çözücü ortamlarında tayin edilmesi daha uygun olduğundan, tenoksikamın iyonlaşma sabitlerinin tayini için %20 ve 30 DMF, %10 ve 20 THF ve %10-30 asetonitril içeren sulu çözelti ortamlarının uygun olduğuna karar verilmiştir.

5.2. Oksikamların İyonlaşma Sabitlerinin Tayini

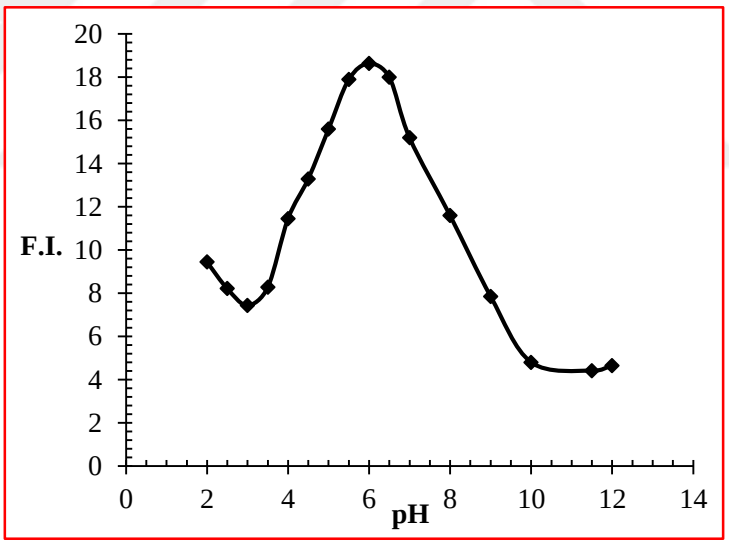
Oksikamların su karışımlı organik çözücüler içinde iyonlaşma sabitlerinin tayin edilmesi amacıyla yapılan florimetrik parametrelerin belirlenmesi aşamasında, meloksikam ve piroksikamın, floresans şiddetlerinin çok düşük olması sebebiyle, hiçbir su karışımlı organik çözücü ortamında iyonlaşma sabitlerinin tayin edilemeyeceği görülmüştür. Bu nedenle sadece tenoksikamın, DMF, THF ve asetonitrilin belirlenen yüzdelerdeki sulu çözücü ortamlarında iyonlaşma sabitleri belirlenmeye çalışılmıştır. Ancak tenoksikamın %20 ve 30 DMF, %10 ve 20 THF ve %20 ve 30 asetonitril içeren sulu çözücü ortamlarında, spektroflorimetrik yöntemle iyonlaşma sabitleri tam olarak tayin edilememiştir.

5.2.1. Spektroflorimetrik yöntemle tenoksikamın iyonlaşma sabitlerinin tayini

Tenoksikamın %10 asetonitril içeren sulu çözücü ortamında hazırlanan 10^{-4} M'lık çözeltileri, 25˚C sabit sıcaklıkta, iyonik şiddeti sabit tutmak için ilave edilen 0,1 M KCl yanında, ayarlı 0,1 M'lık KOH çözeltisiyle titre edilmiştir. pH 2-12 değerleri arasında, her bir pH değerinde çözeltilerin belirlenen uyarma dalga boyunda emisyon spektrumları alınmış (Şekil 5.10) ve pH-floresans şiddeti titrasyon grafikleri çizilmiştir (Şekil 5.11). Bu sigmoidal grafiklerden yarı nötralizasyon noktasına karşılık gelen pH değerlerinden iyonlaşma sabitleri belirlenmiştir.



Şekil 24: 5.10. Tenoksikamın %10 asetonitril-%90 su karışımında pH=2-12 arasındaki emisyon spektrumları (λex= 336 nm).



Şekil 25: 5.11. Tenoksikamın %10 asetonitril-%90 su karışımında pH=2-12 arasındaki pH-Floresans şiddeti (F.I.) grafiği (λex= 336 nm, λem= 435 nm).

Oksikamların su karışımlı organik çözücü ortamlarında spektrofotometrik yöntemle de iyonlaşma sabitleri tayin edilmeye çalışılmış, ancak çok uygun sonuçlar alınamamıştır. Bu nedenle spektrofotometrik yöntem kullanılarak iyonlaşma sabitlerinin hesaplandığı STAR programı da kullanılamamıştır. Spektroflorimetrik yöntem ile belirlenen iyonlaşma sabitleri, SPARC ile hesaplanan teorik iyonlaşma sabitleriyle karşılaştırılmıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Su ve metanol protik-nötral çözücülerdir, aynı zamanda bunların bağıl asitlik/bazlık özellikleri de oldukça kuvvetlidir. Ancak asetonitril aprotik, protofobik bir çözücüdür ve oldukça zayıf bağıl asitlik/bazlık özelliğe sahiptir. Dimetilformamit (DMF) çok azda olsa asidik disosyasyon özelliği gösterir. Bu nedenle de dipolar aprotik çözücüler içinde yer alır. Çözücülerin dipol momenti ve viskozitesi, florimetrik tayinlerde floresans şiddetini etkileyen çok önemli bir parametredir. Fakat organik çözücü-su ikili karışımlarında, suyun en yüksek polariteye sahip olmasından dolayı bu durum çok farklıdır.

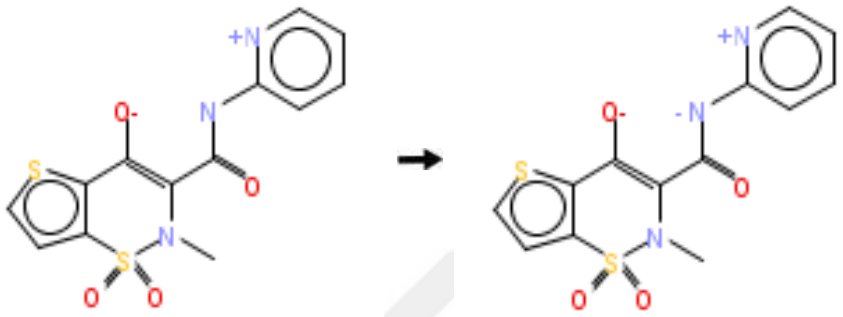
Emisyon spektrumları incelendiğinde, meloksikamın gerek saf çözücü gerekse su karışımlı çözücü ortamlarında oldukça düşük floresans şiddetine sahip olduğu, piroksikamın saf çözücülerde daha yüksek floresans şiddetine sahip olduğu, tenoksikamın ise hem asetonitril hem de THF saf çözücü ve su karışımlı organik çözücü ortamlarında diğer iki maddeye göre daha yüksek floresans şiddetine sahip olduğu görülmüştür.

Bu tez çalışmasında yapılan çalışmada, oksikamların asetonitril-su karışımı çözücü ortamında pKa değerlerinin, spektroflorimetrik yöntem kullanarak tayini yapılmıştır. Veriler ile SPARC programından hesaplanan sonuçlar karşılaştırılmıştır. Teorik olarak iyonlaşma davranışlarını incelemek üzere SPARC (Sparc Performs Automated Reasoning in Chemistry) adlı on-line hesap programı kullanılmıştır. Bu hesap programı sübstitüe grupların etkisini de inceleyerek olası iyonlaşma formlarını ve bunların bağıl derişimlerini vermektedir.

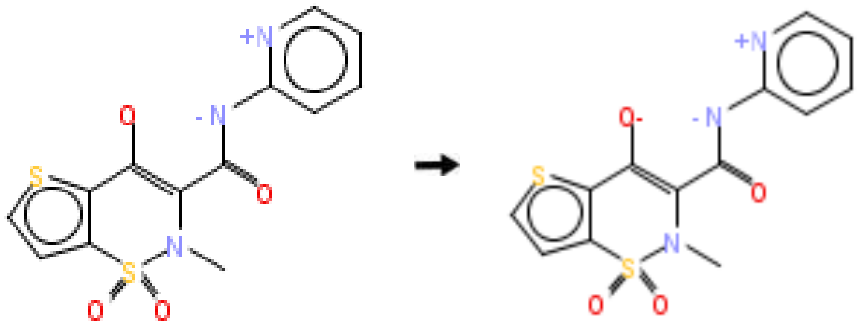
Bunun için ilk olarak oksikamların çözündüğü ve tayin yöntemlerinde kullanılabilecek en uygun çözücü karışım yüzdeleri belirlendi. Daha sonra uyarma ve emisyon dalga boyları, çözücü ortamı ve molar absorbtivite katsayısı gibi değerler optimize edilerek, en uygun deney koşulları saptandı. İkinci aşamada, %10 asetonitril içeren sulu çözücü ortamında hazırlanan 10^{-4} M'lık çözeltileri, 25˚C sabit sıcaklıkta, iyonik şiddeti sabit tutmak için ilave edilen 0,1 M KCl yanında, ayarlı 0,1 M'lık KOH çözeltisiyle titre edilmiştir. Her bir pH değerindeki çözeltinin optimum koşullardaki floresans şiddetleri ölçülmesiyle çizilen pH-floresans şiddeti grafiğinden yararlanılarak iyonlaşma sabitleri (pKa) tayin edilmiştir. Spektroflorimetrik yöntemle tenoksikamın %10 asetonitril içeren sulu çözücü ortamında elde edilen pKa değerlerinin, teorik olarak

bileşiklerin pKa değerlerini hesaplayan SPARC programıyla elde edilen pKa değerlerine çok daha yakın olduğu görülmüştür (Çizelge 6.1).

Tenoksikamın SPARC programıyla hesaplanan teorik mikro pKa değerleri ve iyonlaşma reaksiyonları:



pKa is 4.12



pKa is 8.37

Çizelge 6: 6.1. Tenoksikamın %10 asetonitril içeren su karışımlı ortamda teorik ve deneysel iyonlaşma sabitleri (n=3).

Bileşik	pKa Sayısı	SPARC Teorik pKa	Deneysel pKa
Tenoksikam	1	4.12	4.20±0.22
	2	8.37	8.00±0.14

Spektroflorimetrik yöntemle tayin edilen pKa değerleri; reaksiyon oranını, biyolojik aktiviteyi, biyolojik transferi ve çevresel durumu belirlemek ve anlamak için önemli bir anahtar parametredir. Ayrıca çözücü bileşiminin bir fonksiyonu olarak pKa değerlerinin bilinmesi, iyonlaşabilen bileşiklerin ayrılması için özellikle ters faz HPLC ve kapiler elektroforez uygulamalarında da faydalıdır ve ilaç bileşiklerinin fizikokimyasal davranışları hakkında önemli bilgiler sağlayacaktır.

7. KAYNAKLAR

Al-Tamrah, S.A., 1998, "Flow injection spectrophotometric determination of tenoxicam", Analytica Chimica Acta 375, 277-283.

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

Barary, M.H., Abdel-Hay, M.H., Sabry, S.M., Belal, T.S., 2004, "Spectrofluorimetric determination of 2-aminopyridine as a potential impurity in piroxicam and tenoxicam within the pharmacopoeial limit", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 34, 221–226.

Beltrán, J.L., Sanli, N., Fonrodona, G., Barrón, D., Özkan, G., Barbosa, J., 2003, "Spectrophotometric, potentiometric and chromatographic p*K*a values of polyphenolic acids in water and acetonitrile–water media", Analytica Chimica Acta 484, 253–264.

Branchu, S., Rogueda, P.G., Plumb, A.P., Cook, W.G., 2007, "A decision-support tool for the formulation of orally active, poorly soluble compounds", Eur.J.Pharm.Sci., 32, 128-139.

Burke, A., Smyth, E., Fıtzgerald, G.A., 2006, "Analgesic-antipyretic agents; pharmacotherapy of gout. The Pharmacological basis of Therapeutics",(Ed: L.L.Brunton), 11th ed., Chapter 26, 671-715.

Clarke's Isolation and identification of drugs, 1986, 2nd ed., Pharmaceutical Press.

Dixon, J.S., Lowe, J.R., Galloway, D.B., 1984, "Rapid methot for the determination of either piroxicam or tenoxicam in plasma using high-performance liquid chromatography", J. Chromatography, 310, 455-459.

El-Maali, N.A., Vire, J.C., Patriarche, G.J., Ghandour, M.A., 1989, "Copper (II), lead (II) and cadmium(II) complexes with the anti-inflammatory piroxicam and tenoxicam", Anal. Lett., 22(15), 3025-3039.

El-Maali, N.A., Hassan, R.M., 1990, "Electrooxidation And Determination Of The Anti-İnflammatory Drugs Piroxicam And Tenoxicam At The Carbon-Paste Electrode", Bioelectrochem. Bioenerg., 24,155-163.

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

Gençbay, M., 2004, "Siklooksijenaz-2-İnhibitörleri Koroner Olay Riskini Artırıyorlar mı?", Türk Kardiyol Dern Ars, 32, 371-375.

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

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

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

Heizman, P., Körner, J., Zinapold, K., 1986, "Determination of tenoxicam in human plasma by high-performance liquid chromatography", J. Chromatography, 374, 95-102.

Herzfeldt, C.D., Kümmel,R., 1983, "Dissociation constants, solubilities and dissolution rates of some selected nonsteroidal antiinflammatories", Drug.Dev.Ind.Pharm., 9(5), 767-793.

Karatas, A., Yuksel, N., Baykara, T., 2005 "Improved solubility and dissolution rate of piroxicam using gelucire 44/14 and labrasol", Il Farmaco (France), 60(9), 777-782.

Kráčmar, J., Kráčmarová, J., 1989, "UV spektrophotometrie in der Arzneimittelkontrolle", Pharmazie, 44, 199-203.

Lapicque, F., Netter, P., Bannwarth, B.,Trechot, P., Gillet, P., Lambert, H., Royer, R. J., 1989, "Identification and simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs using high-performance liquid chromatography", J. Chromatography, 496, 301-320.

Li, P., Zhao, L., 2007, "Developing early formulations: Practice and perspective" Int.J.Pharm., 341, 1-19.

Mohamed, H.A., Wadood, H.M.A., Farghaly, O.A., 2002, "Potentiometric and spectrofluorimetric studies on complexation of tenoxicam with some metal ions", Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 28, 819–826.

Page, C.P., Curtıs, M.J., Walker, M.A., Hoffman, B.B., 2006, Integrated Pharmacology. Third Ed. 253-271.

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

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

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

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

Sweetman, S.C., 2007, Martindale The Complete Drug Reference, 34th Ed., USA, Pharmaceutical Press.

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

The Merck Index, 1989, 13th ed. Merck&Co, Inc.

Trıssel, L.A., 1996, Trissel's stability of compounded formulations, American Pharmaceutical Association.

Toroconiz, J. I. F., Lopez-Bustamante, L. G., Fos, D., 1993, "High-performance liquid chromatographic analysis of piroxicam and tenoxicam in plasma,blood and buffer solution", Arzneim. Forsch. Drug Res., 43,679-681.

Valızadeh, H., Zakerı-Mılanı, P., Barzegar-Jalalı, M., 2007, "Preparation and characterization of solid dispersions of piroxicam with hydrophilic carriers", Drug Dev Ind Pharm (United States), 33(1), 45-56.

Zahedı, P., Lee, P.I., 2007, " Solid molecular dispersions of poorly water-soluble drugs in poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels", Eur J Pharm Biopharm (Netherlands), Mar, 65(3), 320-328.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı:	Sema Melike Erden (Güzel)
Uyruğu:	T.C.
Doğum Yeri ve Tarihi:	KONYA- 27/06/1986
Telefon:	05388450598
Faks:	
e-mail:	m.semaerden@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise:	Konya Lisesi, Meram, Konya	2003
Üniversite:	Brno University of Technology Faculty of Chemistry Brno / Çek Cumhuriyeti Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	2009-2010 (Güz dönemi) 2010 2003
Yüksek Lisans:	University of Barcelona Analytical Chemistry Department Barcelona/Spain Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, Konya	2012 2016

UZMANLIK ALANI

İlaç Etken Maddelerinin İyonlaşma Sabitlerinin Spektrofotometrik ve Florimetrik Yöntem ile Tayini

BİLİMSEL ÇALIŞMALAR

1- S.B.Gündüz, S.M.Erden, Eda Ediz, Şükran Küçükkartallar, S.A.Özkan, 3rd PAK-TURK Conference on Chemical Sciences konferansı dahilinde "Book of Abstracts. 3rd PAK-TURK Conference on Chemical Sciences" bildiri kitapçığındaki " Determination of The Ionization Constant of Tenoxicam in Organic Solvent-Water Media by The Spectroflorimetric Method", PP-45, 92 pp., Bursa, Turkey, 13-15 September 2012

2- B.Gündüz, E. Ediz, S. M. Erden, S.A.Özkan, 6. Ulusal Analitik Kimya Kongresi dahilinde "Kongre Bildiri Özetleri Kitapçığı. 6. Ulusal Analitik Kimya Kongresi" bildiri kitapçığındaki "Bazı Nonsteroid Antienflamatuar İlaç Etken Maddelerinin (Oksikamların) Organik Çözücü ve Su-Organik Çözücü Ortamlarında Floresans Özelliklerinin İncelenmesi", P-249, 291 pp., Hatay, Türkiye, 03-07 Eylül 2012