



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI OKSİKAM TÜRÜ İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN METAL BAĞLAMA ÖZELLİKLERİNİN SPEKTROFLORİMETRİK YÖNTEMLE İNCELENMESİ

HATİCE KAÇAR ÇETİN

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kimya Anabilim Dalı

Ağustos-2019
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BAZI OKSİKAM TÜRÜ İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN METAL BAĞLAMA ÖZELLİKLERİNİN SPEKTROFLORİMETRİK YÖNTEMLE İNCELENMESİ

HATİCE KAÇAR ÇETİN

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
KİMYA Anabilim Dalı

Danışman: Prof.Dr. S. Beniz GÜNDÜZ

2019, 73 Sayfa

Jüri
Prof.Dr. S. Beniz GÜNDÜZ
Doç. Dr. Ecir YILMAZ
Dr. Öğr. Üyesi Fatih DURMAZ

Oksikam türü steroid olmayan antienflamatuar ilaçlar (NSAEİ'ler) (meloksikam, piroksikam ve tenoksikam), yan etkilerinin daha az olması sebebiyle ve siklodekstrin ile kombine edilerek, fizyolojik ortamda daha hızlı, daha kolay çözülerek etkin bir şekilde kana kontrollü salınımı ve karışması sağlandığı için çok tercih edilen ağrı kesicilerdir. Ağrı kesiciler pek çok hastalıkta sıklıkla kullanılmaktadır. Aynı zamanda, gıdalardan vitamin ve minerallerin yeteri kadar alınamamasından dolayı vitamin-mineral kombinasyonu ilaçların alınması da oldukça yaygındır. Bu nedenle oksikam türü NSAEİ'lerle birlikte alınan vitamin-mineral kombinasyonu ilaçların içeriğinde makro miktarda bulunan demir ve eser (iz) oranda bulunan çinko, bakır, kobalt ve mangan gibi metallerin oksikamlarla kompleks oluşturma ve her iki ilacın da etkinliklerinin azalmasına sebep olma olasılığının incelenmesi büyük önem taşımaktadır. Oksikam türü NSAEİ'ler, piroksikam (PRX), tenoksikam (TNX), meloksikam (MLX) ve naproksen (NPRX) bileşiklerinin metal bağlama özellikleri spektroflorimetrik metot kullanarak incelenmiştir. Bu oksikam türü NSAEİ'lerden belirlenen uygun deney koşullarında yapılan florimetrik çalışmayla, yalnızca Zn(II) iyonunun, MLX ile etkileşimi ve en uygun deney koşulları tayin edilebilmiştir. MLX-Zn(II) kompleksinin uyarma ve emisyon dalga boyları, pH 3.0 ve asetonitril ortamında sırasıyla λ_{ex}= 406 nm ve λ_{em}= 474 nm olarak belirlenmiştir. Kompleks oluşumu için çözeltiler 15 dakika bekletildikten sonra alınan emisyon spektrumlarından floresans şiddeti değerleri ölçülmüştür. Belirlenen deney şartlarında, kalibrasyon grafiği ($[Zn^{2+}]$-F grafiği) çizilmiştir ve en uygun koşullar altında MLX-Zn (II) kompleksi için doğrusal çalışma aralığı, 0.1-1.0 μM olark belirlenmiştir. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) sırasıyla 0.012 ve 0.037 μM olarak hesaplanmıştır. MLX'ın Zn(II) iyonlarıyla oluşturduğu komplekse dayalı florimetrik yöntem, çinko içeren bir ilaca (Redoxon) uygulanmış, ancak uygun ve başarılı sonuçlar elde edilememiştir.

Anahtar Kelimeler: NSAEİ'ler, oksikamlar, piroksikam, tenoksikam, meloksikam, naproksen, florimetri, çinko

ABSTRACT

MS. THESIS

INVESTIGATION OF THE METAL BONDING PROPERTIES OF SOME OXICAM TYPE OF DRUG ACTIVE SUBSTANCES BY SPECTROFLFRIMETRIC METHOD

HATİCE KAÇAR ÇETİN

SELÇUK UNIVERSITY
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
IN CHEMİSTRY

Advisor: Prof.Dr. S. Beniz GÜNDÜZ

2019, 73 Pages

Jury
Prof.Dr. S. Beniz GÜNDÜZ
Assoc. Prof. Dr. Ecir YILMAZ
Assist. Prof. Dr. Fatih DURMAZ

Oxicam-type non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (meloxicam, piroxicam and tenoxicam) which are combined with cyclodextrin because of their less side effects and combined with cyclodextrin to dissolve faster and more easily in the physiological environment to ensure controlled release and mixing into the blood are preferred painkillers. Painkillers are frequently used in many diseases. It is also common to take vitamin-mineral combination medicines because vitamins and minerals cannot be adequately removed from food. For this reason, it is very important to investigate the possibility of complexation of oxicam-type NSAIDs together with vitamin-mineral combination drugs which are present in macro amounts of iron and trace amounts of zinc, copper, cobalt and manganese and to decrease the effectiveness of both drugs. Metal binding properties of oxicam-type NSAIDs, piroxicam (PRX), tenoxicam (TNX), meloxicam (MLX) and naproxen (NPRX) compounds were investigated using spectrofluorimetric method. With the fluorimetric study carried out under the appropriate experimental conditions determined from these oxicam type NSAIDs, only the interaction of Zn (II) ion with MLX and the most suitable experimental conditions could be determined. The excitation and emission wavelengths of the MLX-Zn (II) complex were determined as λ_{ex}= 406 nm and λ_{em}= 474 nm in pH 3.0 and acetonitrile media, respectively. Fluorescence intensity values were measured from emission spectra taken after the solutions were left for 15 minutes for complex formation. Under the specified experimental conditions, the calibration graph ($[Zn^{2+}]$ - F graph) was plotted and under optimal conditions the linear operating range for the MLX-Zn (II) complex was determined to be 0.1-1.0 μM. Observability limit (LOD) and lower detection limit (LOQ) were calculated as 0.012 and 0.037 μM, respectively. The fluorimetric method based on the complex of MLX with Zn (II) ions was applied to a zinc-containing drug (Redoxon), but the appropriate and successful results could not be obtained.

Keywords: NSAIDs, oxicams, piroxicam, tenoxicam, meloxicam, naproxen, fluorimetry, zinc

ÖNSÖZ

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi öğretim üyelerinden Prof. Dr. S. Beniz GÜNDÜZ danışmanlığında, Hatice KAÇAR ÇETİN tarafından hazırlanmış bir Yüksek Lisans Bitirme Tezidir.

Öncelikle Yüksek lisans eğitimimiz boyunca hoşgörülü tavrıyla bizi her zaman destekleyen, bilgi ve birikimleriyle bizi aydınlatan, bu tez çalışmamızda da yardımlarını esirgemeyen, bize sunduğu laboratuar imkânlarıyla gelişmemize ve tecrübe kazanmamıza yardımcı olan, değerli danışman hocamız Sayın Prof. Dr. S.Beniz GÜNDÜZ'e teşekkür ve saygılarımı sunarım. Kimya Yüksek Lisans eğitimimiz süresince engin bilgilerle bizi geliştiren tüm Selçuk Üniversitesi Kimya Bölümü Öğretim Üyelerine teşekkürü borç bilirim.

Bugünlere kadar gelmemizde emekleri sonsuz olan, hayatımızın her aşamasında sevgi ve desteklerini bizden esirgemeyen sevgili aileme ve eşime sonsuz teşekkürlerimi sunarım…

HATİCE KAÇAR ÇETİN
KONYA-2019

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

ŞEKİLLER LİSTESİ ..... **x**

ÇİZELGELER LİSTESİ ..... **xi**

1. GİRİŞ **1**

2.TEORİK KISIM **2**

2.1. Nonsteroid (Steroid Olmayan) Antienflamatuvar İlaçlar (NSAEİ'ler) 2
2.1.1. Oksikam türevleri 2
2.1.1.1. Piroksikamın fiziksel ve kimyasal özellikleri 2
2.1.1.2. Tenoksikamın fiziksel ve kimyasal özellikleri 3
2.1.1.3. Meloksikamın fiziksel ve kimyasal özellikleri 4
2.1.1.4. Naproksenin fiziksel ve kimyasal özellikleri 5
2.2.1. Moleküler lüminesans spektroskopisi 6
2.2.3. Kuantum verimi 14
2.2.5. Floresans ve fosforesansı etkileyen dış değişkenler 15
2.2.6. Emisyon ve uyarma spektrumları 21
2.2.7. Fotolüminesans ölçüm cihazları 22
2.2.8. Florimetre ve spektroflorimetrelerin başlıca bölümleri 23
2.2.9. Fotolüminesans yöntemlerin uygulamaları 27
2.2.10. İnorganik türlerin florometrik tayinleri 28
2.2.11. Organik türlerin florometrik tayinleri 29
2.2.12. Fotolüminesansın sıvı kromatografisinde kullanılması 29

3. KAYNAK ARAŞTIRMASI **30**

4. MATERYAL VE YÖNTEM **36**

4.1. Kimyasal Maddeler 36
4.1.1. Non-steroidal antienflamatuarlar (Oksikamlar) 36
4.1.2. Kullanılan çözücüler 37
4.1.3. Amonyum asetat çözeltisi 37
4.1.4. Hidroklorik asit ve sodyum hidroksit çözeltisi 37
4.1.5. Stok çinko çözeltisi 38
4.1.6. Stok bakır çözeltisi 38

4.1.7. Stok demir çözeltisi 38
4.2. Kullanılan Cihazlar 38
4.2.1. Spektroflorimetre 38
4.2.2. Analitik terazi ve pH metre 38
4.2.3. Su Banyosu, saf su cihazı ve karıştırıcı 39
4.3. Deneysel Yöntem 39
4.4. Deney Koşullarının Belirlenmesi 40
4.4.1. Uyarma ve emisyon dalga boylarının belirlenmesi 40
4.4.2. En uygun MLX ve NPRX derişimlerinin belirlenmesi 40
4.4.3. En uygun pH değerinin belirlenmesi 40
4.4.4. En uygun ortam sıcaklığının belirlenmesi 41
4.4.5. Kalibrasyon grafiği ve analitik parametrelerin belirlenmesi 41

5. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 42

5.1. Uyarma ve Emisyon Dalga Boylarının Belirlenmesi 42
5.2. En Uygun MLX ve NPRX Ligand Derişimlerinin Belirlenmesi 51
5.3. En Uygun pH Değerinin Belirlenmesi 51
5.4. En Uygun Sıcaklığın Belirlenmesi 56
5.5. Kompleksin Floresans Şiddetine Zn(II) Derişiminin Etkisinin Belirlenmesi 56
5.6. MLX-Zn(II) Kompleksi İçin Belirlenen En Uygun Koşullar 57
5.7. Yöntem Validasyonu 58
5.7.1. Doğrusallık 58
5.7.2. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ) 58
5.7.3. Doğruluk ve kesinlik 59
5.8. MLX'in Çinko İçerikli Tabletlerle Kompleks Oluşturması 59

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 61

6.1 Sonuçlar 61
6.2 Öneriler 61

KAYNAKLAR 62

ÖZGEÇMİŞ 64

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

A:	Absorbans
g:	Gram
L:	Litre
M:	Molarite
mM:	Milimolar
µM:	Mikromolar
mg:	Miligram
nm:	Nanometre
s:	Saniye
Zn:	Çinko
Fe:	Demir
µg:	Mikrogram
ε:	Molar absortive katsayısı(L / mol.cm)
λ:	Dalgaboyu
ϕ:	Fotolüminesans Kuantum Verimi
P:	Soğurulup gecen fotonun siddeti
P0:	Gelen fotonun siddeti
F:	Floresans şiddeti

Kısaltmalar

ACN:	Asetonitril
PRX:	Piroksikam
MLX:	Meloksikam
TNX:	Tenoksikam
NPRX:	Naproksen
DMF:	Dimetilformamid
EtOH:	Etanol
JNC:	Joint National Committee
LOD:	Gözlenebilme Sınırı
LOQ:	Alt Tayin Sınırı
MeOH:	Metanol
SEM:	Taramalı Elektron Mikroskobu
UV:	Ultraviyole

ŞEKİLLER LİSTESİ

Şekil 2.6. Bir fotolüminesans sistem için kısmi enerji seviyesi diyagramı 10
Şekil 2.7. Fotolüminesans mekanizmalarının Jablonski enerji diyagramı. 11
Şekil 2.8. Anilinyumun rezonans formları 18
Şekil 2.9. Fenantren için spektrumlar: *E*, uyarma; *F*, floresans; P, fosforesans 21
Şekil 2.10. Uranil nitrat [UO_2 $(NO_3)_2$] çözeltisinin emisyon spektrumu 21
Şekil 2.11. Fotolüminesans ölçüm cihazlarının başlıca bölümleri 23
Şekil 2.12. Basit bir filtreli florimetre 25
Şekil 2.13. İki optik ağlı monokomatorun kullanıldığı spektroflorimetre 26
Şekil 2.14. Uyarma ve fosforesansın ard arda gözlenmesi için bir düzeneğin şematik gösterimi 27
Şekil 2.15. Yaygın kullanılan en başarılı dört reaktifin yapısı 29
Şekil 5.1. Piroksikamın ACN'de pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumları (λex=366 nm, λem=466 nm, [PRX]=10^{-3} M) 42
Şekil 5.2. Piroksikamın DMF'de pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumları (λex=380 nm, λem=472 nm, [PRX]= 10^{-3} M) 43
Şekil 5.3. Meloksikamın ACN'de pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumu (λex=406 nm, λem=503 nm, [MLX]=10^{-3} M) 45
Şekil 5.4. Tenoksikamın DMF'de pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumu (λex=332 nm, λem=448 nm, [TNX]=10^{-3} M) 46
Şekil 5.5. Naproksenin EtOH'da pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumu (λex=283 nm, λem=355 nm, [NPRX]=10^{-6} M) 47
Şekil 5.6. Naproksenin MeOH'da pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumu (λex=272 nm, λem=356 nm, [NPRX]=10^{-6} M) 48
Şekil 5.7. Naproksenin suda pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumu (λex=273 nm, λem=357 nm, [NPRX]=10^{-6} M) 49
Şekil 5.8. Piroksikamın DMF'deki pH-F.I. grafiği, (λex=380 nm, λem=472 nm, [PRX]=10^{-3} M) 52
Şekil 5.9. Meloksikamın ACN'deki pH-F.I. grafiği, (λex=400 nm, λem=503 nm, [MLX]=10^{-3} M) 52
Şekil 5.10. Tenoksikamın DMF'deki pH-F.I. grafiği, (λex=332 nm, λem=448 nm, [TNX]=10^{-3} M) 53
Şekil 5.11. Naproksenin farklı çözücülerdeki pH-F.I. grafikleri, (EtOH'de λex=283 nm, λem=355 nm, MeOH'de λex=272 nm, λem=356 nm ve suda λex=273 nm, λem=357 nm, [NPRX]=10^{-6} M) 53
Şekil 5.12. MLX-Zn(II) kompleksinin ACN ortamında pH=2-9 aralığındaki pH-F.I. grafiği, [MLX]= 10^{-4} M, [Zn^{2+}]= 10^{-4} M, λex=406 nm, λem=474 nm 54
Şekil 5.13. NPRX-Fe(II) kompleksinin su ortamında pH=2-9 aralığındaki emisyon spektrumları, [NPRX]= 10^{-6} M, [Fe^{2+}]= 10^{-6} M, λex=278 nm, λem=307 nm (1), λem=358 nm (2) 55
Şekil 5.14. NPRX-Fe(II) kompleksinin su ortamında pH=2-9 aralığındaki pH-F.I. grafiği, [NPRX]= 10^{-6} M, [Fe^{2+}]= 10^{-6} M, λex=278 nm, λem=307 nm (1), λem=358 nm (2) 55
Şekil 5.15. MLX-Zn(II) kompleksinin kalibrasyon grafiği (Deney koşulları: [MLX] = 10^{-4} M, [Zn^{2+}] = 0.1-1.0 μM, pH=3.0, ACN ortamı, λ_{uy} = 406 nm, λ_{em} = 474 nm) 57

ÇİZELGELER LİSTESİ

Çizelge 2. 1. Benzenin floresans özelliğine sübstitüentlerin etkisi (etanol içinde) 16
Çizelge 2. 2. İnorganik türler için seçilmiş florimetrik yöntemler 28
Çizelge 4. 1. Oksikamların çeşitli çözücülerde çözünme özellikleri 37
Çizelge 5. 1. Piroksikamın ACN'de pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumlarına ait floresans şiddet değerleri (λex=366 nm, λem=466 nm, [PRX]=10^{-3} M) 43
Çizelge 5. 2. Piroksikamın DMF'de pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumlarına ait floresans şiddet değerleri (λex=380 nm, λem=472 nm, [PRX]=10^{-3} M) 44
Çizelge 5. 3. Meloksikamın ACN'de pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumlarına ait floresans şiddet değerleri (λex=406 nm, λem=503 nm, [MLX]=10^{-3} M) 45
Çizelge 5. 4. Tenoksikamın DMF'de pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumlarına ait floresans şiddet değerleri (λex=332 nm, λem=448 nm, [TNX]=10^{-3} M) 46
Çizelge 5. 5. Naproksenin EtOH'da pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumlarına ait floresans şiddet değerleri (λex=283 nm, λem=355 nm, [NPRX]=10^{-6} M) 48
Çizelge 5. 6. Naproksenin MeOH'da pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumlarına ait floresans şiddet değerleri (λex=272 nm, λem=356 nm, [NPRX]=10^{-6} M) 49
Çizelge 5. 7. Naproksenin suda pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumlarına ait floresans şiddet değerleri (λex=273 nm, λem=357 nm, [NPRX]=10^{-6} M) 50
Çizelge 5. 8. MLX-Zn(II) kompleksi için belirlenen en uygun koşullar 57
Çizelge 5.9. MLX ile Zn(II) etkileşiminin incelendiği florimetrik yöntemin istatistik parametreleri 58
Çizelge 5. 10. Florimetrik yöntemle MLX ve Zn(II) iyonu arasındaki etkileşimin tayini için geri kazanım çalışması. 59

1. GİRİŞ

Oksikamlar en uzun süreli NSAEİ'lerdendir. Günde bir kez verilmeleri yeterli olur. Gastrointestinal yan tesir riskleri diğer NSAEİ'lerden yüksektir. Oksikamlar steroid olmayan anti-enflamatuar ilaçlardır (NSAEİ'ler), anti-enflamatuar, analjezik ve antipiretik faaliyetleri ile yapısal olarak yakından ilgili maddelerden oluşan bir gruptur. Zayıf asidik yapıları vardır ve yüksek oranda plazma proteinlerine bağlanırlar. Piroksikam, en yaygın olarak kullanılan oksikamdır.

Mineraller doğada yaygın olarak görülen inorganik maddelerdir. Vücudun büyümesi ve gelişmesi, yaşamın sürdürülmesi ve sağlığın korunması için minerallere ihtiyaç vardır. Mineraller vücudumuzda yapıyı oluşturan ve birçok işlevi düzenleyen elzem besin öğeleri grubudur. Vücudunuzun % 4 gibi çok küçük bir kısmını oluşturmalarına rağmen vücut yapısının oluşmasında yardımcıdırlar. Kemik, diş, kas, kan ve diğer dokularda da mineraller bulunur. Mineraller inorganik maddelerdir ve ısı veya besin işlemede kullanılan diğer elle yapılan işlemler sırasında kayba uğramazlar. Günlük gereksinimin 250 mg'ın üzerinde olduğu mineraller makro minerallerdir. Sodyum, potasyum ve klor elektrolitleri ile kalsiyum, magnezyum ve fosfor bu gruptadırlar. Krom, bakır, flor, iyot, demir, manganez, molibden, selenyum ve çinko gereksinimi günlük 20 mg'ın altındadır, bunlara eser elementler denir. Bunlardan günlük alım düzeyleri belirlenenler sadece demir, çinko, iyot ve selenyumdur. (Samur, 2008)

Oksikam türü NSAEİ'ler (meloksikam, piroksikam ve tenoksikam), yan etkilerinin daha az olması sebebiyle ve siklodekstrin ile kombine edilerek, fizyolojik ortamda daha hızlı, daha kolay çözülerek etkin bir şekilde kana kontrollü salınımı ve karışması sağlandığı için çok tercih edilen ağrı kesicilerdir. Ağrı kesiciler pek çok hastalıkta sıklıkla kullanılmaktadır. Aynı zamanda, bağışıklık sisteminin gelişmesi ya da desteklenmesi amacıyla, beslenmeyle yeteri kadar alınamayan vitamin ve mineraller vitamin-mineral içerikli ilaçlarla yaygın olarak karşılanmaktadır. Bundan dolayı antienflamatuar ilaçlarla aynı anda alınan mineral içerikli ilaçların içeriğindeki demir, çinko, bakır, kobalt ve mangan gibi metallerin oksikamlarla etkileşime girerek iki ilacın da biyoyararlılıklarının azalmasına sebep olma olasılığının incelenmesi büyük öneme sahiptir.

Bu tez çalışmasında, metabolik reaksiyonlarda önemli görevleri olan ve vücutta en çok bulunan makro element demir ve mangan, eser miktarlardaki mikro elementler çinko, bakır ve kobalt gibi temel minerallerle Oksikam türü NSAEİ'lerin etkileşime girerek kompleks oluşturma özelliklerinin spektroflorimetrik yöntem ile incelenmesi amaçlanmaktadır.

2.TEORİK KISIM

2.1. Nonsteroid (Steroid Olmayan) Antienflamatuvar İlaçlar (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 isimle non-steroidal (steroid olmayan) antienflamatuvar ilaçlar veya antienflamatuvar analjezikler denmektedir. Çoğu NSAEİ'ler zayıf asidiktir. 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 (örneğin 20-60 saat). Oksikam türevleri kimyasal yapısından dolayı NSAEİ sınıfındandır. Oksikam türevleri; piroksikam, lornoksikam, meloksikam, tenoksikam, naproksendir.

2.1.1. Oksikam türevleri

2.1.1.1. Piroksikamın fiziksel ve kimyasal özellikleri

Piroksikam (Şekil 2.1) beyaz-açık sarı renkli, kokusuz ve ışığa duyarlı kristal yapıda bir tozdur. Suda çözünürlüğü çok zayıftır, etanol ve alkali sulu çözeltilerinde hafif çözünür. Piroksikamın erime derecesi 198-200°C dir. Çözünürlüğü pH'ya bağlı olarak önemli ölçüde değişir. Herzfeldt ve Kümmel adlı araştırmacılar, piroksikam çözünürlüğü üzerine pH'nın etkisini gözlemlemişlerdir. Bu çalışmaya göre piroksikamın pKa değerini 5,3 olarak rapor etmişlerdir.(Herzfeldt ve Kümmel, 1983) Bernhard ve Zimmerma ise piroksikamın enolat-enol sistemi nedeni ile iki farklı pKa değerinin olması gerektiğini söylemişler ve bu değerleri de pK_1 1.86 ve pK_2 5.46 olarak vermişlerdir.(Bernhard ve Zimmermann, 1984)

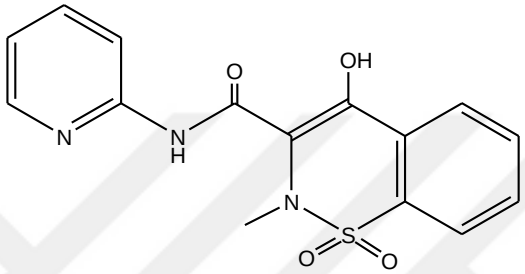
CAS Numarası: 36322-90-4

Kimyasal Adı: 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).

Kapalı Formülü: $C_{15}H_{13}N_3O_4S$

Molekül Ağırlığı: 331.346

Açık Formülü:



Şekil 2.1. Piroksikamın açık formülü.

2.1.1.2. Tenoksikamın fiziksel ve kimyasal özellikleri

İnce, sarı renkli toz halinde, kendine has özel kokulu, hafif acı lezzettedir. Erime noktası 209-213°C dir ve bu sıcaklıkta bozunmaktadır.(Binder ve ark., 1987) Hidrofilik asit karakterde olup sudaki dissosiasyon sabitleri; UV spektrofotometrik yöntem ile pKa_1=l.07, pKa_2=5.34 olarak verilmektedir.(Bernhard ve Zimmermann, 1984) 1:1 oranında su-etanol karışımında ise potansiyometrik yöntemle ölçülen dissosiasyon sabitinin pKaı=4.95± 0.02 olduğu, titrasyon sürecinde çökme görüldüğünden pKaı için herhangi bir ölçüm yapılamadığı da bildirilmektedir.(Tsai ve ark., 1993) Santrifüjlü partisyon kromatografisi ile yapılan çalışmalarda pH 7.4 de, oktanol-su sistemi için dağılma katsayısı log D_{okt}=0.32, heptan-tampon sistemi için ise log D_{hep}=2.88 olarak bulunmuştur.(Tsai ve ark., 1993) Tenoksikamın (Şekil 2.2) çözünürlüğü incelendiğinde; suda, metanol de, etanol de, asidik çözeltilerde ve etil asetatta çok az çözünürlüğe sahip olduğu, buna karşılık N,Ndimetilformamid, dimetilsülfoksid ve kuvvetli bazlarda daha kolay çözünebildiği gözlenmiştir. Çözünürlüğünün pH 5.3 de 13 mg/100 mL su, pH 7.5 da ise 279 mg/100 mL su olduğu bildirilmektedir.(Heintz ve ark., 1984) Diğer non-steroidal antienflamatuar ilaçlara göre daha zayıf lipofilik özelliklere sahiptir.(Fenner,

1987) Antienflamatuar etkiye sahip diğer non-steroidal ilaçlar gibi tenoksikam da bu grubun genel farmakolojik özelliklerini taşımaktadır. Bu etkinin genellikle siklooksijenazın ve bunu takiben de prostaglandin oluşumunun inhibisyonu ile gerçekleştiği bilinmektedir.(Bradshaw ve ark., 1984) Tenoksikamın lökosit fonksiyonlarını inhibe etme yeteneği fagositoz ve histamin salınımını da içermekte ve buna ek olarak aktif oksijen radikallerinin oluşmasının engellenmesi veya kaldırılması ile antienflamatuar etkinin arttığı da ileri sürmektedir.(Gonzales ve Todd, 1987)

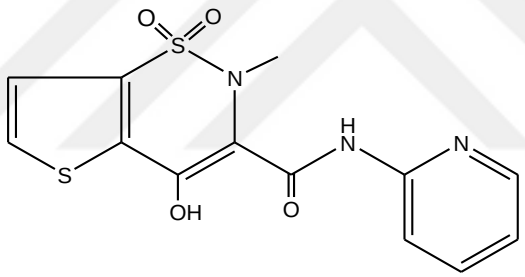
CAS Numarası: 59804-37-4

Kimyasal Adı: 4-hidroksi-2-metil-N-2-piridil-2 H-tieno(2,3-e)-1,2-tiazin-3-karbok-samid-1,1 dioksit

Kapalı Formülü: $C_{13}H_{11}N_3O_4S_2$

Molekül Ağırlığı: 337.374

Açık Formülü:



Şekil 2.2. Tenoksikamın kimyasal formülü.

2.1.1.3. Meloksikamın fiziksel ve kimyasal özellikleri

Meloksikam (Şekil 2.3), romatizmal hastalıklarda ve osteoartritte ağrı ve iltihabı tedavi etmek için yaygın olarak kullanılan, steroid olmayan bir anti-enflamatuar ilaçtır. En sık kullanım şekli ağızdan alınarak olur. USP, BP, EP, Meloksikamın mümkün olduğunca kısa bir süre içinde ve düşük bir dozda uygulanmasını önermektedir.

Karın ağrısı, baş dönmesi, şişme, baş ağrısı ve döküntü gibi Meloxicam hammaddesi USP BP EP'nin uzun süreli kullanımı için ortak yan etkiler olabilir. Bu arada, gebeliğin üçüncü üç ayında tavsiye edilmez. Meloksikam hammaddesi USP BP EP, oksikam kimyasal ailesine aittir ve piroksikam ile yakından ilgilidir. Meloksikam hammaddesi USP BP EP, yetişkinlerde osteoartrit veya romatoid artritin neden olduğu

ağrı veya iltihabı tedavi etmek için kullanılır. Meloksikam ayrıca romatoid tedavisinde en az 2 yaşında olan çocuklarda uygulanır. Ancak talimatları yakından takip etmeli. Meloksikam hammaddesi USP BP EP, bir hormon ilacı olmayan ve güçlü bir anti-enflamatuar, analjezik ve antipiretik etkiye sahip olan ve seçici olarak siklooksijenaz-2 (COX-2) aktivitesini inhibe edebilen, steroid olmayan bir antipiretik ve analjezik anti-enflamatuar ilaç prostaglandinlerin sentezini bloke eden, enflamatuar alandaki prostaglandin biyosentezi, gastrik mukozanın veya böbreğin prostaglandin biyosentezinden daha güçlüdür ve diğer NSAİD'lerden daha güvenlidir. Meloksikam hammaddesi USP BP EP, osteoartrit, ağrılı osteoartrit, romatoid artrit ve ankilozan spondilit semptomlarını hafifletmek için kullanılır. (FENGCHEN GROUP CO., 2009)

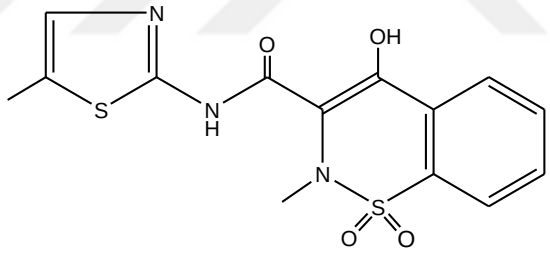
CAS Numarası: 71125-38-7

Kimyasal Adı: 4-hidroksi-2-metil-*N*-(5-metil-2-tiazolyl)-2-*H*-1,2-benzotiazin-3-karboksamit-1,1-dioksit

Kapalı Formülü: $C_{14}H_{13}N_3O_4S_2$

Molekül Ağırlığı: 351.401

Açık Formülü:



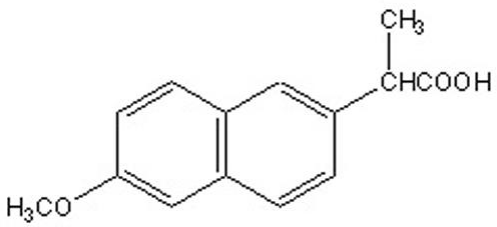
Şekil 2.3. Meloksikamın kimyasal formülü

2.1.1.4. Naproksenin fiziksel ve kimyasal özellikleri

Naproksen (Şekil 2.4) beyaz, beyaza yakın renkte, hemen hemen kokusuz, kristalize bir tozdur. Pratik olarak suda çözünmez. Alkol (1'e 40 oranında), kloroform (1'e 15 oranında) ve etanolde (1'e 25 oranında) çözünür. pH 6 'dan daha yüksek değerlerde suda çözünebilir.(Mikami ve ark., 2000; Bonina ve ark., 2001; Monser ve Darghouth, 2003; Zaghloul ve ark., 2003; Ayano ve ark., 2006; El Maghraby, 2008)

Fenilpropiyonik asit türevleri içinde en uzun etkili olanıdır. Bu gruptaki diğer ilaçlar gibi antipiretik, antienflamatuar ve analjezik etki gösterir. Naproksen antienflamatuvar aktivitesini prostaglandin sentezini inhibe ederek gösterir. Prostaglandin sentezinden sorumlu siklooksijenaz enzimini inhibe eder. Lökositlerin inflamasyon alanına migrasyonunu belirgin şekilde baskıladığı gösterilmiştir. Diğer yandan prostaglandinler ağrı reseptörlerinin duyarlılığını arttırırlar (analjezik etki). Antipiretik etkisinin, hipotalamustaki santral aktivitesine bağlı periferik dilatasyon ile ilişkili olduğu kabul edilmektedir. Bu mekanizma üzerinden derideki kan akımının artmasına ve vücudun ısı kaybetmesine neden olur.(Rautio ve ark., 2000; Monser ve Darghouth, 2003; Sharma ve Bhatia, 2004)

CAS Numarası: 22204-53-1
Kapalı formülü: $C_{14}H_{14}O_3$
Kimyasal adları: 2-(6-metoksi-2-naftil)propiyonik asit, 6-metoksi-2-metil-2-naftalin-asetik asit, 2-naphalenasetik asit
Molekül ağırlığı: 230.26 g/mol
Erime noktası: 154-158 °C



Şekil 2.4. Naproksenin yapısal formülü

2.2. Spektroflorimetri

2.2.1. Moleküler lüminesans spektroskopisi

Atom veya molekül temel enerji düzeyine dönerken fazla enerjisinin tümünü veya bir kısmını ışın şeklinde atabilir ve böylece sistemden bir ışın yayılması (ışın emisyonu) gözlenir. Bu ışın 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 ışın enerjisi ile yapılmış ve temel hale dönerken ışın yayılırsa **floresans (fosforesans)** denir. Uyarılma olayı atom veya molekülün fotonları absorplaması sonucu gerçekleşiyorsa gözlenen ışın emisyonuna **fotolüminesans** denir.

Lüminesans spektrumları normal olarak ultraviyole ve görünür bölgededir ve daima karşılık geldikleri soğurma spektrumlarına göre daha uzun dalga boylarına kaymışlardır. Maddenin kimyasal yapısına, fiziksel durumuna ve sıcaklığına bağlı olarak farklı lüminesans olayları gözlenebilir.

1- Floresans (hızlı ve kısa ömürlü)

2- Fosforesans (yavaş ve uzun ömürlü)

Bu farklı lüminesans olayları birbirinden, emisyon dalga boyları veya absorpsiyon ve emisyon arasında geçen zaman ile ayırt edilir. Normal floresans, bir madde için, herhangi bir fiziksel durumda ve hem oda sıcaklığı hem de düşük sıcaklıklarda gözlenebilen bir durumdur. Floresansın ömrü genellikle çok kısadır, yaklaşık 10^{-10}–10^{-8} saniye arasında bir ömre sahiptir. Fosforesans ışıması ise, 10^{-6}–10^{2} s kadar daha devam eder.(Gündüz, 1995)

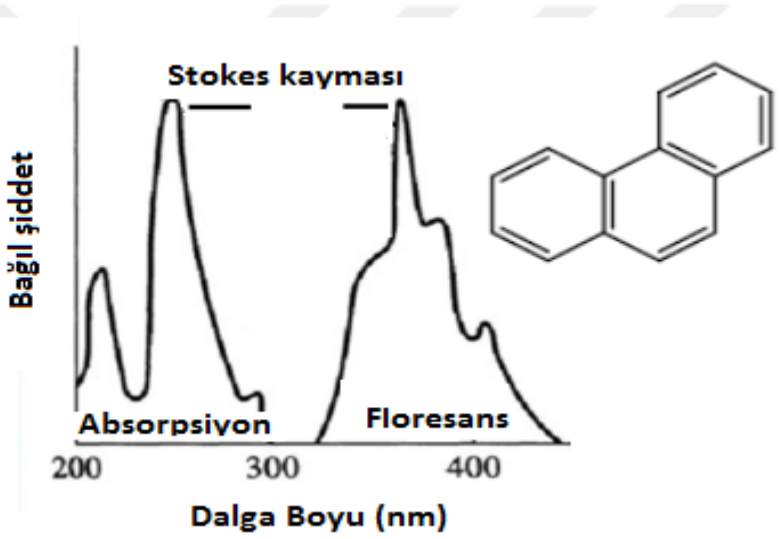
2.2.2. Floresans ve fosforesans

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. Madde fosforesans ışınları yaydığı zaman elektronunun spini değişir. 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.(Gündüz, 1995)

Bir molekülün absorpladığı ışının aynı dalga boyunda yeniden yayılması olayına ***rezonans ışıması*** veya ***rezonans floresansı*** denir.

Bazı moleküler türler rezonans floresansı gösterebilir. Bununla beraber çoğunlukla, moleküler floresans veya fosforesans bantları rezonans çizgisinden daha uzun dalga boylarında merkezlenmiş olarak bulunur. Bu uzun dalga boylarına veya düşük enerjilere kayma ***stokes kayması*** olarak ifade edilir (Şekil 2.5). (Skoog ve ark., 1998)



Şekil 2.5. Fenantren'in absorpsiyon ve floresans spektrumu

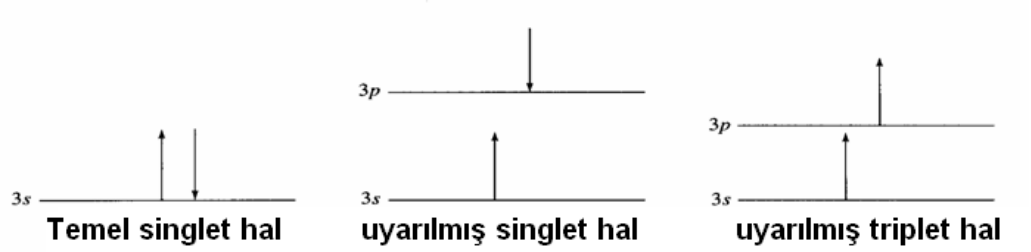
2.2.2.1. Elektron spini

Pauli prensibi, bir atomdaki iki elektron için dört kuantum sayısının hepsinin birden aynı olamayacağını belirtir. Bu sınırlama, bir orbital de iki elektrondan daha fazla elektron bulunmamasını ve ayrıca iki elektronun da zıt spinli olmasını gerektirir. Bu şartlar altında, spinler eşleşmiştir. Spin eşleşmesi sebebiyle, moleküllerin çoğu net manyetik alan göstermez ve bu yüzden ***diamanyetik*** olarak adlandırılır. Yani bunlar, durgun manyetik alan tarafından ne çekilir ne de itilirler. Buna karşılık,

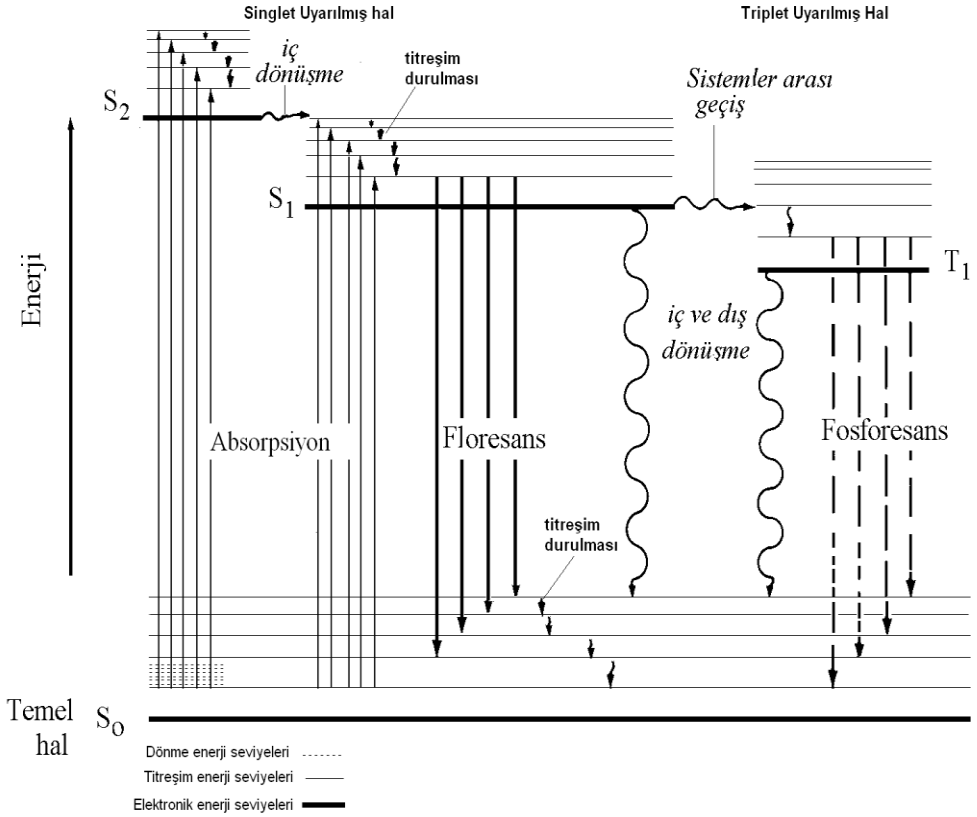
eşleşmemiş elektronlar içeren serbest radikallerin bir manyetik momenti vardır ve bunun sonucu olarak bir manyetik alan tarafından çekilir. Bu yüzden serbest radikaller ***paramanyetik*** olarak adlandırılır.

2.2.2.2. Singlet/ triplet uyarılmış haller

Bütün elektron spinlerinin eşleşmiş olduğu bir moleküler *elektronik* hal; bir ***singlet*** hal olarak adlandırılır ve molekül bir manyetik alana maruz bırakıldığında elektronik enerji seviyelerinde hiçbir yarılma meydana gelmez. Diğer taraftan, bir serbest radikal için temel hal bir ***dublet*** halidir. Çünkü tek elektronun bir manyetik alan içinde, sisteme çok az farklı enerjilerde katkı yapan iki yönlenmeye sahip olduğu kabul edilebilir. Bir molekülün bir çift elektronundan biri daha yüksek bir enerji seviyesine uyarılırsa ya bir singlet ya da bir ***triplet*** hal meydana gelir.



Uyarılmış triplet hali, uyarılmış singlet halden daha düşük enerjiye sahiptir. Singlet/triplet geçişi, karşılık gelen singlet/singlet geçişine göre daha az gerçekleşir. Uyarılmış triplet halinin ortalama ömrü 10^{-4} s'den birkaç saniyeye kadar sürebilir. Bir uyarılmış singlet halinin ortalama ömrü ise 10^{-7} ile 10^{-8} s kadardır. Temel haldeki bir molekülün ışınla, uyarılmış triplet hale geçme olasılığı oldukça düşüktür. Uyarılmış triplet hale geçebilen bazı moleküller fosforesans ışıması yaparlar.



Şekil 2.6. Bir fotolüminesans sistem için kısmi enerji seviyesi diyagramı

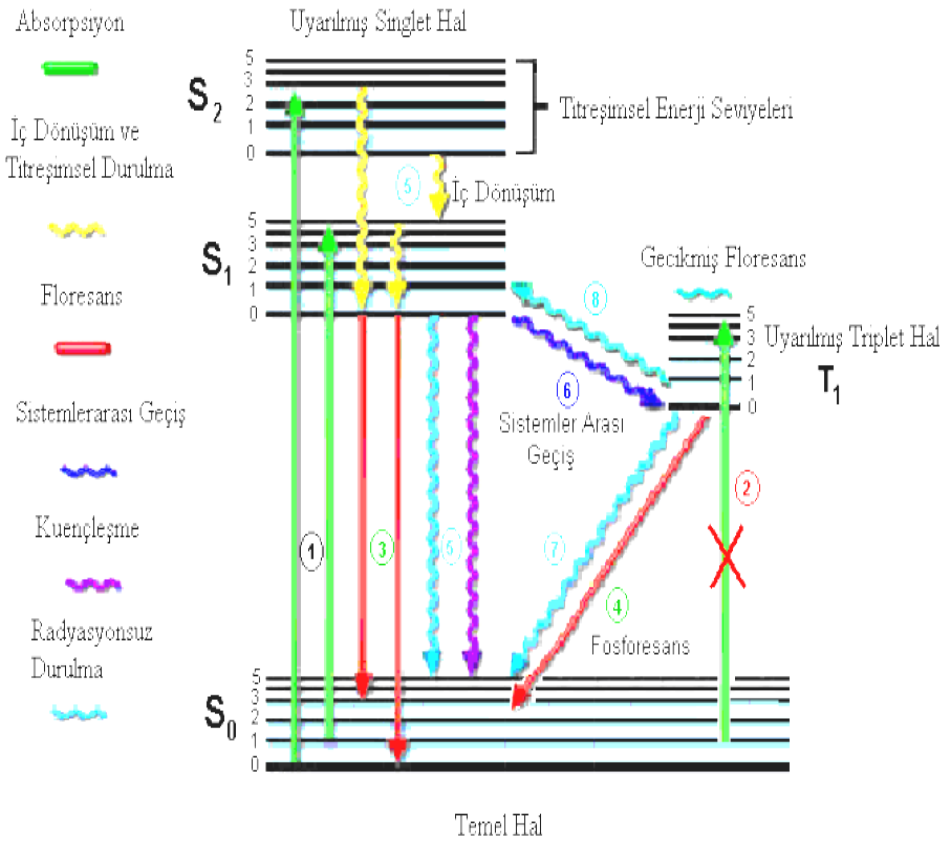
Şekil 2.6 tipik bir fotolüminesans molekülünün kısmi bir enerji seviyesi diyagramıdır. En alttaki koyu yatay çizgi normal olarak singlet haldeki molekülün temel hal enerjisini göstermekte olup, S_0 ile gösterilmiştir. Oda sıcaklığında bu hal bir çözeltideki moleküllerin hemen hemen tamamının enerjisini gösterir. En üstteki koyu çizgiler üç uyarılmış elektronik halin temel titreşim halleri için enerji seviyelerini göstermektedir. Soldaki iki çizgi, (S_1) ve ikinci (S_2) elektronik singlet halini 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.(Skoog ve ark., 1998)

Daha ince yatay çizgilerle gösterilen çok sayıdaki titreşim enerji seviyesi dört elektronik halin her biri ile ilişkilidir. Şekilde görüldüğü gibi bu molekülün uyarılması, biri yaklaşık λ_1 dalga boyunda ve ikincisi de daha kısa dalga boyu λ_2 civarında merkezilenmiş iki ışın bandın absorpsiyonu ile meydana gelebilir. Uyarılma işleminin molekülün çok sayıda uyarılmış titreşim halinden birinine 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.)

2.2.2.3. Absorpsiyon ve emisyon hızları

Bir ışın fotonunun absorpsiyon hızı (10^{-14}-10^{-15} s), floresans emisyon hızına göre çok daha büyük bir hızla oluşur. Uyarılmış halin ömrü, uyarılma işlemine karşılık gelen absorpsiyonun molar absorptivitesi ile ters orantılıdır. Bu nedenle, 10^3 -10^5 aralığındaki molar absorptiviteler için uyarılmış hallerin ömrü 10^{-7}- 10^{-9} s'dir. Tripletten singlete geçişin ortalama hızı, buna karşılık gelen singlet-singlet geçişininkinden daha azdır. Bu nedenle, fosforesans emisyonu 10^{-4}-10^2 s veya daha fazla bir süre gerektirir.(Skoog ve ark., 1998)



Şekil 2.7. Fotolüminesans mekanizmalarının Jablonski enerji diyagramı.

2.2.2.4. Titreşimsel durulma

Elektronik uyarılma sırasında bir molekül birçok titreşim seviyesinden herhangi birine uyarılabilir (Şekil 2.7). 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 ömrü10^{-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.(Skoog ve ark., 1998)

2.2.2.5. İç geçiş (ışımasız durulma)

Bir molekül, hangi elektronik hale uyarılırsa uyarılsın (S_1, S_2, S_3 gibi) en düşük enerjili halin (S_1) elektronik enerji seviyesinden floresans ışını yayarak temel hale geçmesi olayına *iç geçiş* denir. Kinin sülfat molekülü ister 250 nm'lik bir ışınla, isterse 350 nm'lik bir ışınla uyarılsın, yaydığı floresans ışığının 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 birkaç 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, enerjisini S_2 halinin üst titreşim enerji seviyelerinde bulunan bir moleküle aktarır. S_2 halin üst titreşim enerji seviyelerinde olan bu molekül titreşim yoluyla enerji yayarak, 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 S1 halinden floresan ışın yaymasının nedeni, elektronik geçişlerin titreşim geçişlerine göre çok daha uzun sürede, elektronik geçişlerin 10^{-7}–10^{-9} saniyede, titreşim geçişlerinin ise 10^{-13}–10^{-14} saniyede 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 için dalga boyları bir birinden çok farklı florensan ışınlar elde edilmiş olurdu. Bu da görülen bir durum değildir.

Dissosyasyon: predissosyasyon olayından farklıdır. Bu olay da 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 etkisinin olduğu zannedilmektedir.(Gündüz, 2002)

2.2.2.6. Dış geçiş

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 deneysel olarak gösterilebilir. Şöyle ki, çözelti soğutulduğu (çarpışma azaltıldığı) zaman bir maddenin fosforesansı azalır ve floresansı artar. Bu da çarpışmanın azalması demektir. Çünkü bunlar birbirine 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.(Gündüz, 2002)

2.2.2.7. Sistemler arası çapraz geçiş

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. Bu söylenenler, gözetlenen olayları açıklamak için düşünülen yollardır. Ya değilse bu yolları söylendiği şekilde izlemek mümkün değildir. 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).(Gündüz, 2002)

2.2.3. Kuantum verimi

Floresans veya fosforesans için kuantum verimi veya kuantum verimi oranı basit olarak lüminesans yapan moleküllerin sayısının toplam uyarılmış molekül sayısına oranıdır. Floressein gibi oldukça floresans bir molekül için bazı şartlar altındaki kuantum verimi bire yaklaşır. Önemli derecede floresans yapmayan kimyasal türler sıfıra yakın verimlere sahiptir.

$$\Phi = \frac{k_f}{k_f + k_s + k_{dd} + k_{id} + k_{öa} + k_a}$$

kf =floresans bağıl hız sabiti

ks= sistemler arası geçiş bağıl hız sabiti

kdd= dış dönüşüm bağıl hız sabiti

kid= iç dönüşüm bağıl hız sabiti

köa= ön ayrışma bağıl hız sabiti

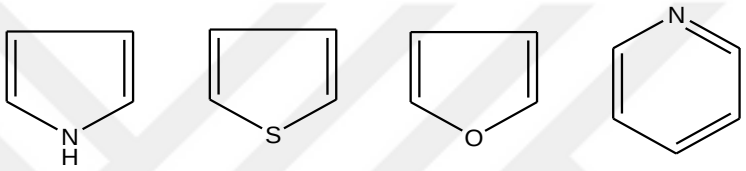
ka = ayrışma bağıl hız sabiti

2.2.5. Floresans ve fosforesansı etkileyen dış değişkenler

2.2.5.1. Floresans ve yapı

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. Sübstitüe olmamış bir çok aromatik hidrokarbon çözeltide floresans yapar. Kuvantum verimi genellikle halka sayısı ve kondensasyon derecesi ile artar.

Piridin, furan ,tiyofen ve pirol gibi heterosiklik maddeler floresans göstermezler.



Pirol Tiyofen Furan Piridin

Azotlu heterosiklikler de en düşük enerjili elektronik geçişin hızlıca triplet hale dönüşen ve floresansı önleyen n→ π* sistemi ile ilgili olduğu kabul edilir. Bunula beraber, bir heterosiklik çekirdek oluşturmak üzere benzen halkalarının birleşmesi absorpsiyon pikinin molar absorptivitesinde bir artışa sebep olur. Böyle yapılarda uyarılmış bir halin ömrü daha kısadır; bu yüzden kinolin, izokinolin ve indol gibi bileşikler için floresans gözlenir.



kinolin izokinolin indol

Benzen halkasındaki sübstitüsyon absorpsiyon maksimumunun dalga boyunda kaymaya ve karşı gelen floresans piklerinde değişmelere sebep olur (Çizelge 2.1). Sübstitüsyon genellikle floresans verimini etkiler, bu etkilerin bazıları çizelgede benzen türevleri için verilmiştir.

Halojen sübstitüsyonunun etkisi dikkate değerdir; halojenin atom numarası arttıkça floresansın azalmasının, triplet hale sistemler arası geçiş olasılığını arttıran ağır atom etkisinden dolayı olduğu düşünülür. İyodobenzen ve nitro türevlerinde de önayrışmanın önemli bir rol oynadığı düşünülür, bu bileşikler; bu bileşikler iç dönüşümden sonra uyarma enerjisini absorplayabilen kolayca kopan bağlara sahiptir.

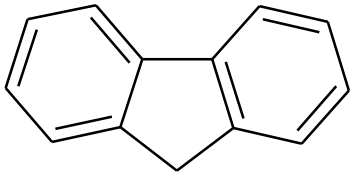
Bir aromatik halkaya bir karboksilik asit veya karbonil grubunun sübstitüsyonu genellikle floresansı durdurur. Bu bileşiklerde, $n \rightarrow \pi^*$ geçişinin enerjisi, $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişinkinden daha azdır, $n \rightarrow \pi^*$ sistemin floresans verimini normal olarak düşürür. (Gündüz, 2002)

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

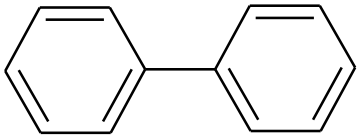
Madde	Floresans Dalga Boyu(nm)	Bağıl floresans şiddeti	Formülü
Benzen	270-310	10	C_6H_6
Toluen	270-320	17	$C_6H_5CH_3$
Propilbenzen	270-320	17	$C_6H_5\ C_3H_7$
Florobenzen	270-320	10	C_6H_5F
Klorobenzen	275-345	7	C_6H_5C1
Bromobenzen	290-380	5	C_6H_5Br
İyodobenzen	----------	0	C_6H_5I
Fenol	285-365	18	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

2.2.5.2. Yapısal rijitliğin etkisi

Floresans rijit yapılara sahip moleküllerde özellikle daha fazla olduğu ampirik olarak bulunmuştur. Örneğin; floren ve bifenil için kuvantum verimleri benzer ölçme koşullarında sırasıyla yaklaşık 1.0 ve 0,2'dir. Davranıştaki bu farklılık başlıca florendeki metilen frubunun köprü yapmasıyla oluşan rijit artışının bir sonucu olarak ortaya çıkar.



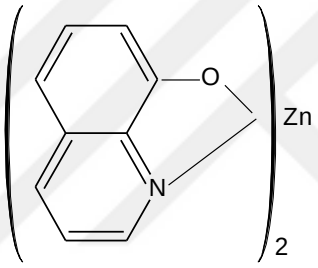
Floren



Bifenil

Rijitliğin,bir metal iyonu ile kompleks oluşturdukları zaman şelat oluşturucu bazı organik maddelerin floresansındaki artışından sorumulu olduğu düşünülmektedir.

Örneğin 8-hidroksikinolin floresans şiddeti çinko komplesinden çok daha azdır.



2.2.5.3. Floresans üzerine grupların etkisi

Elektron donörü olan -NH_2,-OH gibi gruplar floresansı arttırdığı halde, elektron akseptörü olan -NO_2, -X (halojenürler), -COOH, -CHO, -N=N- gibi gruplar floresansı azaltır ve bazen ortadan kaldırır.

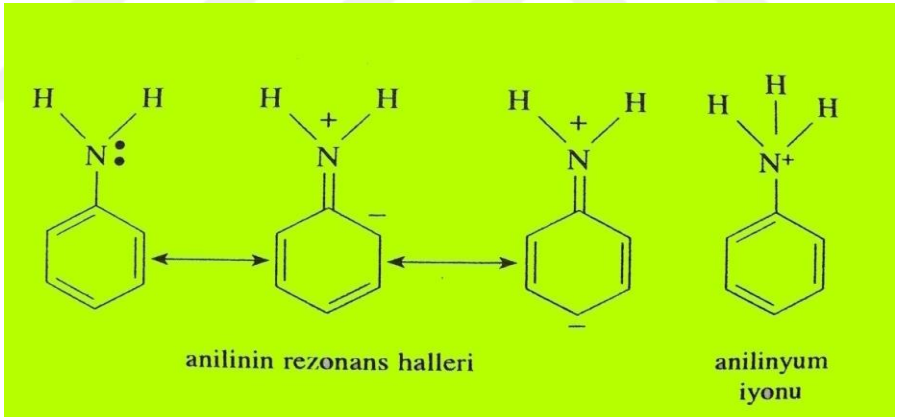
2.2.5.4. Sıcaklık ve çözücü etkisi

Birçok molekülde floresansın kuantum verimi sıcaklık arttıkça azalır. Yüksek sıcaklıklarda çarpışma frekansının artması dış dönüşüm ile sönme olasılığını arttırır. Çünkü viskositesindeki azalma da benzer şekilde dış dönüşümü artırır ve aynı sonuca götürür.

Bir molekülün floresansı ağır atomları veya yapılarında bu atomların olduğu diğer çözünenleri içeren çözücüler varlığında azalır; karbontetrabromür ve etiliyodür buna örnektir. Bu etki, ağır atomların floresans yapan bileşiklerde sübstitüent olarak bulunduğu durumdakine benzer; orbital spin etkileşimleri triplet oluşum hızında bir artışa ve dolayısıyla floresansta bir azalışa sebep olur.

2.2.5.5. Floresansa pH'ın etkisi

Asidik veya bazik sübstitüentleri içeren bir aromatik bileşiğin floresansı genellikle pH'ya bağlıdır. Bileşiğin iyonlaşmamış ve iyonlaşmış halleri için dalga boyu ve emisyon şiddetinin her ikisi de farklıdır. Fenol ve anilin için bu etkiyi gösteren veriler Çizelge 2.1'de verilmiştir. Bu tip bileşiklerin emisyonundaki değişmeler moleküllerin asidik ve bazik formları ilgili rezonans türlerinin farklılığından kaynaklanır. Örneğin, anilinyumun bir tane iken anilinin bir çok rezonans hali vardır (Şekil 2.8).



Şekil 2.8. Anilinyumun rezonans formları

İlave rezonans formları daha kararlı birinci uyarılmış hale yol açar;bunun sonucunda ultraviyole bölgede floresans olur. Floresansa dayanan analitik işlemlerde genellikle sıkı bir pH kontrolü gerekir.

2.2.5.6. Çözünmüş oksijenin etkisi

Bir çözeltide, çözünmüş oksijenin varlığı, genellikle floresans şiddetini azaltır. Bu etki, floresans yapan türlerin fotokimyasal olarak yükseltgenmesinin bir sonucu

olabilir. Yaygın olarak moleküler oksijenin paramanyetik özellikleri sonucu olarak sönüm meydana gelir ve sistemler arası geçiş ve uyarılmış moleküllerin triplet hale geçişi artar. Diğer paramanyetik türler de floresansı azaltma eğilimindedir.(Gündüz, 2002)

2.2.5.7. Konsantrasyonun floresans üzerine etkisi

Floresans ışın F ile gösterilir. F'nin şiddeti, uyarıcı ışının şiddetiyle orantılıdır.

$$F = K'(P_0-P)$$

şeklinde ifade etmek mümkündür. Burada P_0 çözelti (numune) üzerine gönderilen ışının şiddeti (gücü), P de numuneden absorplanmadan geçen ışının şiddetidir. K' ise kuantum veriminin de (ϕ) içinde bulunduğu bir sabittir.

Floresans ışının (F) şiddetiyle konsantrasyonu arasındaki bağıntıyı göstermek için Lambert-Beer kanunundan yararlanılır. Bu amaçla,

$$P/P_0 = 10^{-\varepsilon bC}$$

bağıntısı yazılır. Burada ε floresans maddenin molar absorptivitesidir. Başka bir deyişle numunenin uyarıcı ışını absorplama kabiliyetidir. εbc değerine topluca absorbans denir ve A ile gösterilir. Buna göre log P_0/P= εbc=A olur. Eşitlik

$$F = K' P_0 (1-10^{-\varepsilon bc})$$

olarak da yazılabilir. Lambert-Beer kanununun geçerli olduğu düşük konsantrasyonlarda (floresans ölçmeleri zaten çok düşük konsantrasyonlarda yapılır) eşitlikteki parantez içi,

$$1-10^{-\varepsilon bc} = 2{,}3\ \varepsilon bc$$

alınabilir. Buna göre F floresans ışınının şiddeti,

$$F = K' P_0 (2{,}3\ \varepsilon bc)$$

olur. Burada P_0 sabit yapıldığında (c den başka ötekiler sabit),

$$F = Kc$$

bağıntısı elde edilir. Bu da, bir maddenin yaydığı floresans ışını şiddetinin konsantrasyonla (düşük konsantrasyonlarda) orantılı olduğunu gösterir. Bu orantı yüksek konsantrasyonlarda bozulur ve F-c bağıntısı içe bükülmüş (x eksenine doğru) bir eğri şeklini alır. Buna doğrusallıktan negatif sapma denir. Doğrusallıktan negatif sapma, sadece yüksek konsantrasyonlarda

$$1\text{-}10^{-\varepsilon bc} = 2{,}3\ \varepsilon bc$$

eşitliğinin bozulmasından değil, buna ek olarak maddenin,

a)Kendi kendini söndürmesi (self quinching)

b)kendi ışınını absorplaması,

yoluyla da olur. Kendi kendini söndürme olayında, iki uyarılmış molekül veya tanecik çarpışır ve bu çarpışmadan yeni kompleks bir molekül meydana gelir.

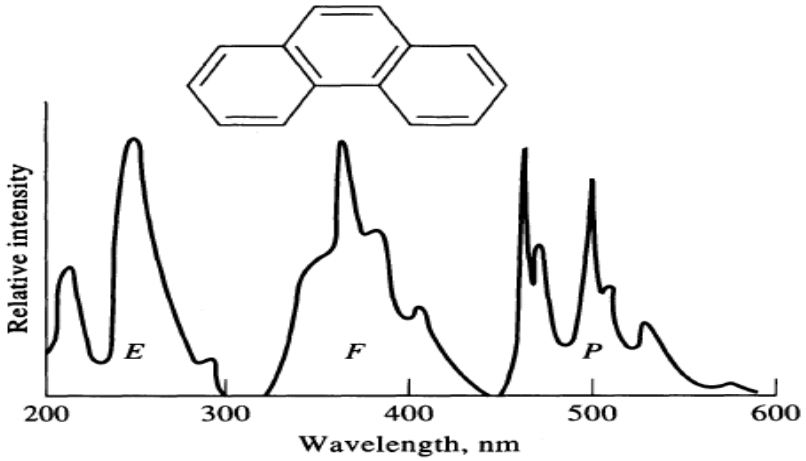
$$M^* + M^* \rightarrow (MM)^{**} \rightarrow 2M + \text{ısı}$$

Böyle uyarılmış kompleks moleküllerin enerjisi, ışın şeklinde değil, ısı şeklinde çözelti ortamına verilir. Bu da belki de daha önce görülen dış geçiş şeklinde olur.

Kendi ışınını absorplama olayındaysa uyarılmış bir molekülden yayılan floresan ışın uyarılmamış aynı tür bir molekül tarafından absorplanır. Böyle bir absorplamanın olabilmesi için, yayılan floresan ışının dalga boyunun, numunenin absorpladığı uyarıcı ışınlardan birinin dalga boyuna uyması gerekir. Bilindiği gibi bir molekülün birkaç dalga boyunda absorpsiyon piki vardır. Bir ışının bir molekül tarafından absorplanabilmesi için, o ışın enerjisinin, moleküldeki bağların birinde bulunan bir elektronun bir üst seviyeye çıkarılma enerjisine eşit olması gerekir.

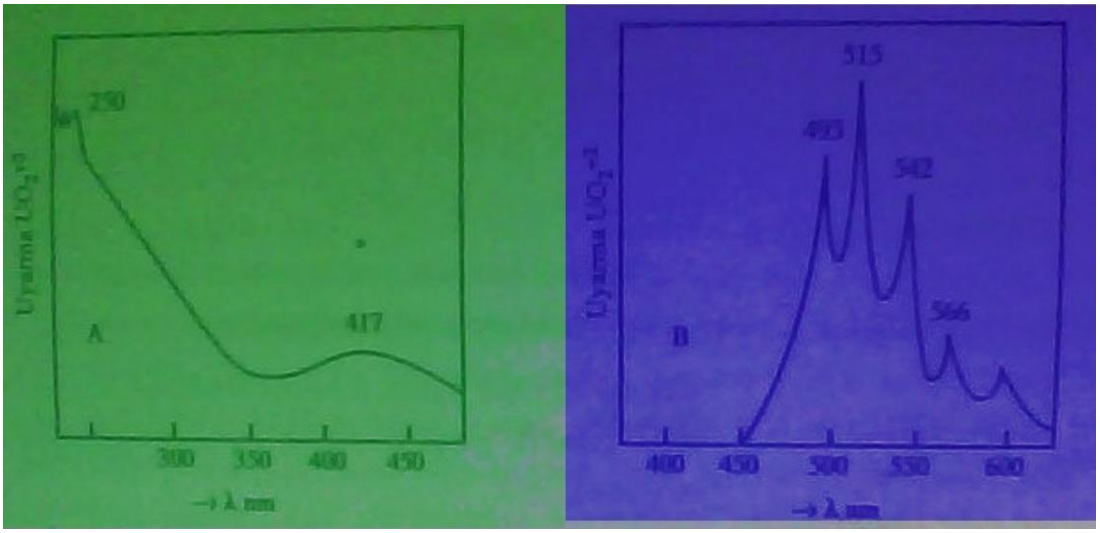
Bu son iki olayın etkisi altında floresans konsantrasyon bağıntısı bazen maksimumlu bir eğri şeklini bile alır.(Gündüz, 2002)

2.2.6. Emisyon ve uyarma spektrumları



Şekil 2.9. Fenantren için spektrumlar: *E*, uyarma; *F*, floresans; P, fosforesans

Bir uyarma spektrumu, uyarma dalga boyu değiştirilirken, sabit dalga boyunda lüminesansın ölçülmesiyle elde edilir. (aynı şartlarda elde edilen absorpsiyon spektrumu ile aynıdır). Floresans ve fosforesans spektrumları dalga boyunun bir fonksiyonu olarak emisyon şiddeti kaydedilirken sabit dalga boyunda uyarılmayı kapsar (Şekil.2.9). Fotolüminesans genellikle uyarma dalga boyundan daha uzun dalga boylarında olur. Ayrıca fosforesans bantları floresans bantlarından daha uzun dalga boylarında olur. Çünkü triplet uyarılmış enerji seviyesi genelde singlet uyarılmış enerji seviyesinden daha düşük enerjilidir.

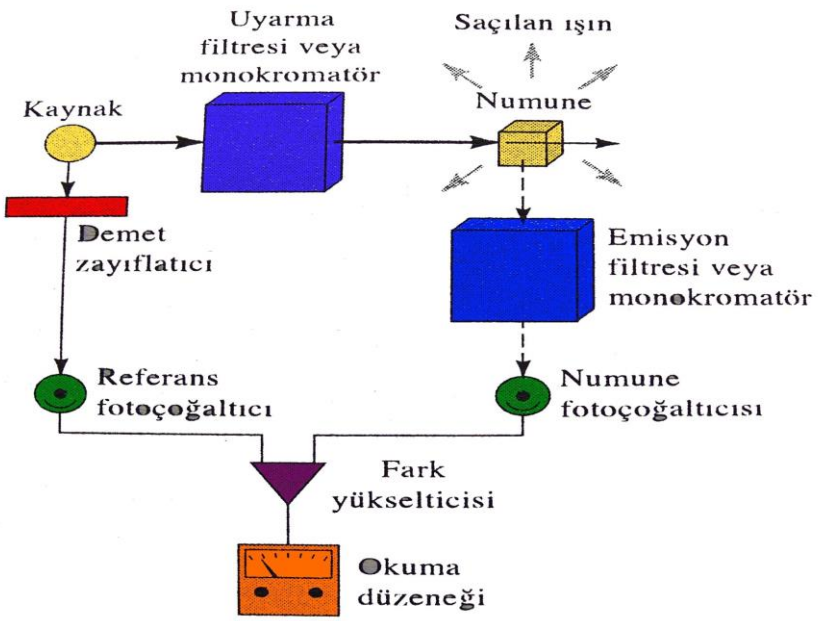


Şekil 2.10. Uranil nitrat [UO_2 $(NO_3)_2$] çözeltisinin emisyon spektrumu

Uranil nitrat [UO_2 $(NO_3)_2$] çözeltisinin spektrumu da örnek olarak verilebilir (Şekil 2.10). Bunun için tuzun 1.10^{-4} M'lık bir çözeltisi hazırlanır ve absorpsiyon spektrumu alınır. Bu spektrumdan maddenin en çok absorpsiyon yaptığı dalga boyu (250 nm) tespit edilir. Bundan sonra bu 250 nm'lik ışınla (monokromatik) uranil nitrat çözeltisi devamlı olarak ışınlanır. Yayılan ışınlar bir florimetrede kaydedilir. Böylece maddenin emisyon spektrumu elde edilir. Şekilde görüldüğü gibi uranil nitrat 450 nm'den sonra emisyon yapmaya başlar ve emisyon yaklaşık 700 nm'ye kadar devam eder. Madde en şiddetli emisyonu 515 nm de(yeşil ışın) yapar. Teorik olarak bir maddenin uyarılma spektrumunun bittiği yerde floresans spektrumu onun bittiği yerde de fosforesans spektrumu başlar.

2.2.7. Fotolüminesans ölçüm cihazları

Fotoluminesans ölçülmesi için kullanılan cihazların çeşitli bileşenleri, ultraviyole görünür bölge fotometreleri veya spektrofotometrelerinde bulunanlarla benzerdir. Şekil 2.11'de florimetreler ve spektroflorimetrelerdeki bu bileşenlerin tipik bir dizilişi görülmektedir. Hemen hemen bütün floresans cihazlarında güç kaynağındaki dalgalanmaları dengelemek (etkisini gidermek) için çift-ışınlı optik sistem kullanılır. Numuneden gelen ışın, önce floresans uyaracak ışınları geçiren fakat floresans emisyonunun dalga boyundaki ışınları dışarıda tutan veya sınırlayan bir uyarılma filtresinden veya bir monokromatörden geçer. Floresans numuneden bütün yönlere doğru olur, fakat en uygun şekilde floresans uyarma ışınına dik açıdan gözlenir, diğer açılarda çözeltiden ve hücre duvarlarından oluşan saçılma, şiddet ölçümünde büyük hatalara sebep olabilir. Yayılan ışın, ölçme için floresansı ayıran ikinci bir filtreden veya monokromatörden geçtikten sonra bir dedektöre ulaşır. Referans ışın demeti ise, ışığın gücünü yaklaşık olarak floresans ışınlarınkine azaltan bir azaltıcıdan geçer (güç azaltılması ekseriya 100 kat veya daha fazladır). Referans ve numune fotoçoğaltıcı tüplerden gelen sinyaller, sonra çıktıyı bir metreye veya kaydedici ile gösteren bir fark yükselticisine gönderilir.



Şekil 2.11. Fotolüminesans ölçüm cihazlarının başlıca bölümleri

2.2.8. Florimetre ve spektroflorimetrelerin başlıca bölümleri

2.2.8.1. Işın kaynakları

Lambalar: 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 lambaları* ve yüksek basınçlı *ksenon ark lambaları* kullanılır. Düşük basınçlı cıva lambaları, 254, 366, 405, 436, 546, 577, 691 ve 773 nm 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 lamba, filtre kullanılarak çok geniş bir madde topluluğu için yararlı hale getirilebilir. Fotometrelerde genelde düşük basınçlı cıva ark lambası ve filtre bulunur. Böyle cihazlar hassasiyet ve kesinlik bakımından spektroflorimetrelerden daha düşüktür. Cıva lambası, uygun bir fosforesan madde kaplanarak 320-400 nm'lik ışınlar veren yüksek basınçlı ksenon lambası elde etmede kullanılabilir.

Yüksek basınçlı ksenon lambası yaklaşık 300-1300 nm aralığında sürekli ve şiddetli bir ışın bandı verir. Bu ışın bandını floresans ışını elde etmede kullanabilmek için banttaki ışınları dalga boylarına ayırmak gerekir. Böyle bir ayırma ancak greyting monokromatörlarıyla yapılabilir. Bu nedenle, yüksek basınçlı ksenon ark lambalarının kullanıldığı cihazlara spektroflorimetreler denir. Ksenon ark lambalarının gücü 15-30 V ve 5-20 A'lik bir doğru akım kaynağıyla beslenir. (Gündüz, 2002)

Lazerler: Uyarma kaynağı olarak pulslu azot gazı lazeri veya Nd:YAG lazeri ile pompalanan ayarlanabilir boya lazerleri kullanılabilir.

2.2.8.2. Filtre ve Monokromatörlar

Hem uyarma demetinin hem de oluşan floresans ışının dalga boyunun seçilmesi için, florimetrelerde girişim ve absorpsiyon filtrelerinin her ikisi de kullanılır. Spektroflorimetrelerin çoğu en az bir bazen iki optik ağlı monokromatör ile donatılmıştır.

2.2.8.3. Dedektörler

Tipik lüminesans sinyali düşük şiddetlidir, ölçülebilmeleri için yükseltilmeleri gerekir. Duyarlı floresans cihazlarda fotoçoğaltıcı tüpler en yaygın kullanılan transduserlerdir. Spektroflorimetreler için diyot-serili ve yük aktarma dedektörleri önerilmektedir. Bunlar hem uyarma hem de emisyon spektrumlarının hızlı kaydına izin verir, özellikle kromatografik ve elektroforezde dedektör olarak kullanımları faydalıdır.

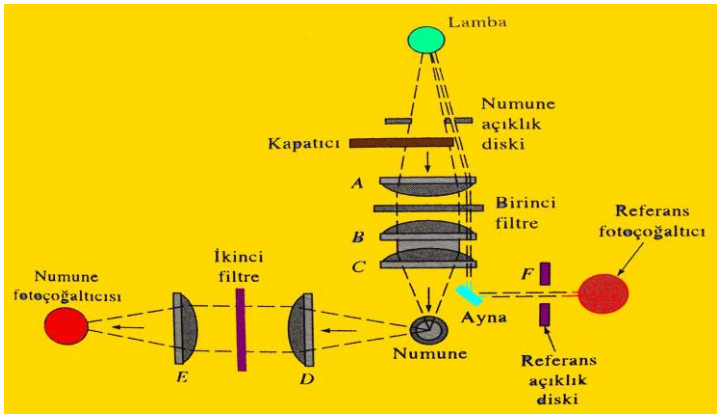
2.2.8.4. Numune küvetleri (hücreleri) ve hücre bölmeleri

Floresans (fosforesans) ölçümleri için cam veya slikadan (kuvars) yapılmış hem silindirik hem de dikdörtgen prizması şeklindeki numune küvetleri kullanılır. UV bölgede silika (kuvars), görünür bölgede ise cam numune küvetleri tercih edilir. Hücre bölmeleri etrafa yayılan floresans ışınlarını (kaçak ışınlar) absorplayacak şekilde yapılmıştır. Cilt yağları genellikle floresans yaptığı için hücreler üzerindeki parmak izinin önlenmesi çok önemlidir.

2.2.8.5. Fotolüminesans ölçüm cihazlarının tasarımları

Filtreli florimetreler kantitatif floresans analizlerinin gerçekleştirilmesi için nispeten basit ve ucuz bir yoldur. Uyarma ve yayılan ışınların dalga boylarını sınırlamak için ya absorpsiyon ya da girişim filtreleri kullanılır. Genellikle florimetreler küçük, dayanıklı ve kullanımı kolaydır.

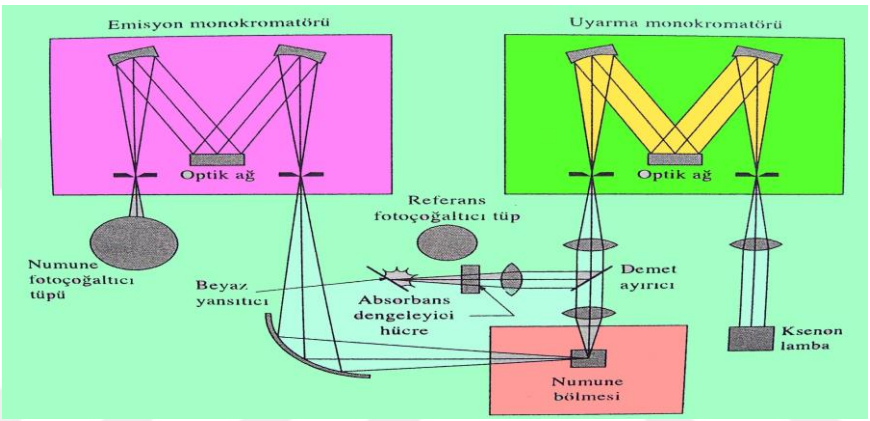
Şekil 2.12'de floresans uyarımı için bir civa lambası ve transduser olarak bir çift çoğaltıcı tüpün kullanıldığı tipik bir filtreli florimetre şematik olarak gösterilmiştir. Kaynak ışını, kaynak yakınında bir düzenekle bir referans ışın ve numune ışınına ayrılır. Şiddeti hemen hemen floresans şiddeti ile aynı olsun diye, referans demeti aralık diski ile zayıflatılır. Her iki demet birincil filtreden geçer. Referans ışın daha sonra referans fotoçoğaltıcı tüpe yansıtılır. Numune ışını bir mercek çifti ile numuneye odaklanır ve floresans emisyonuna sebep olur. Yayılan ışın ikinci bir filtreden geçer ve sonra ikinci fotoçoğaltıcı tüpe odaklanır. İki transduserin elektrik çıktıları analit değişken olarak kullanılan numune şiddetinin referans şiddetine oranını hesaplama için analog bölücüye beslenir.



Şekil 2.12. Basit bir filtreli florimetre

Bir çok cihaz yapımcısı hem uyarma hem de emisyon spektrumlarını verebilen spektrofotometreleri piyasaya sunmuşlardır. Bunlardan iki optik ağlı monokromatörün kullanıldığı bir cihazın tasarımı Şekil 2.13'de gösterilmiştir. Birinci monokromatördan

gelen ışın, bir referans çoğaltıcıdan ve numuneden geçen kısım olmak üzere ikiye ayrılır. İkinci monokromatör ile dispersiyondan sonra oluşan floresans ışın, ikinci bir fotoçoğaltıcı ile tespit edilir. Şekilde gösterilene benzer bir cihaz, kantitatif analiz için çok tatminkar spektrum oluşturur. Bununla beraber elde edilen emisyon spektrumları diğer cihazlardan elde edilen spektrumlara tam olarak benzemez. Çünkü çıktı sadece floresans şiddetine değil aynı zamanda lambanın transduserin ve monokromatörun özelliklerine bağlıdır. Bu cihazların tüm özellikleri dalga boyu ile değişir ve cihazdan cihaza farklıdır. Cihaz etkilerinden bağımsız, gerçek floresans spektrumundan düzeltilmiş spektrum elde etmek için çok sayıda yöntem geliştirilmiştir.

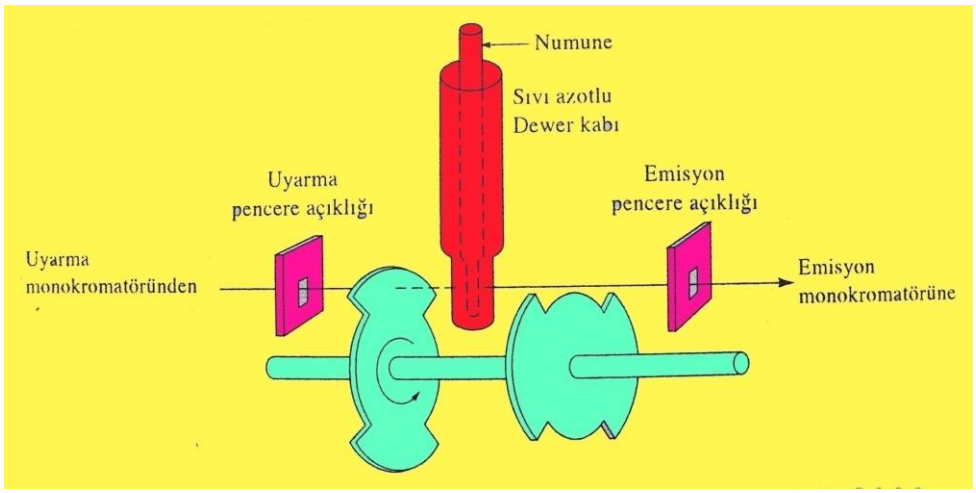


Şekil 2.13. İki optik ağlı monokomatorun kullanıldığı spektroflorimetre

Fosforesans çalışmaları için kullanılan cihazlar, tasarım bakımından ilave iki bileşen gerektirmesi dışında florometreler ve spektroflorimetrelere benzerler. Farklı olarak;

1- Sırayla numuneyi ışınla uyaracak ve uygun bir geciktirmeden sonra fosforesans şiddetini ölçecek bir düzenektir.
2- Aynı numuneden kaynaklanabilecek olan uzun ömürlü fosforesans emisyonu ile kısa ömürlü fosforesans emisyonu arasında fark oluşturmak için zaman gecikmesi gereklidir.

Hem mekanik hem de elektronik cihazlar kullanılır ve birçok ticari cihazın fosforesans ölçümleri için aksesuarları bulunmaktadır.



Şekil 2.14. Uyarma ve fosforesansın ard arda gözlenmesi için bir düzeneğin şematik gösterimi

Fosforesans ölçümleri, çarpışmayla sönüm çıktının azalmasını önlemek için sıvı azot sıcaklığında gerçekleştirilir. Bu nedenle Şekil 2.14'de görüldüğü gibi kuvars pencereli bir Dewar kabı fosforimetrenin bir parçasıdır. Uygulanan sıcaklıkta analit, camda veya katı çözücüde çözünen olarak bulunur. Bu amaç için uygun bir çözücü dietil eter, pentan ve etanolün bir karışımıdır.

2.2.9. Fotolüminesans yöntemlerin uygulamaları

Floresans ve fosforesans yöntemleri absorbansa dayalı spektrofotometrik ölçümlerden daha düşük derişim aralıklarına uygulanabilir. Floresan kompleks oluşturularak metal iyonlarının emisyonu ölçülebilir. Florimetrik analizin, organik ve biyokimyasal türlere çok sayıda uygulaması vardır. Florimetrinin en önemli uygulamaları, gıda ürünleri, ilaç, klinik numuneler ve doğal ürünlerin analizidir. Fosforesans ve floresans yöntemleri birbirlerini tamamlama eğilimindedirler. Fosforimetri, nükleik asitler, amino asitler; pirin ve pirimidin, enzimler, petrol hidrokarbonları ve pestisitler gibi maddeleri de kapsayan çok çeşitli organik ve biyokimyasal türlerin tayini için kullanılmıştır.(Gündüz, 1995)

Fosforimetri, florimetri kadar yaygın kullanım alanı bulmamıştır. (Çünkü düşük sıcaklıklara ihtiyaç duyulur ve fosforesans ölçmeleri daha zayıf kesinliğe sahiptir.)

Fosforesans işlemleri potansiyel olarak daha yüksek seçiciliğe sahiptir. (Davranıştaki bu farkın sebebi, etkili fosforesansın uyarılmış triplet haldeki molekül

sayısını artırmak için hızlı sistemler arası geçişe ihtiyaç duyması, dolayısıyla uyarılmış singlet derişimini ve böylece de fosforesans şiddetini azaltmasıdır.)

2.2.10. İnorganik türlerin florometrik tayinleri

İnorganik florometrik yöntemler iki tiptir:

1- Doğrudan yöntemler, floresans yapan bir şelat oluşumunu ve onun emisyonunun ölçümünü içerir.

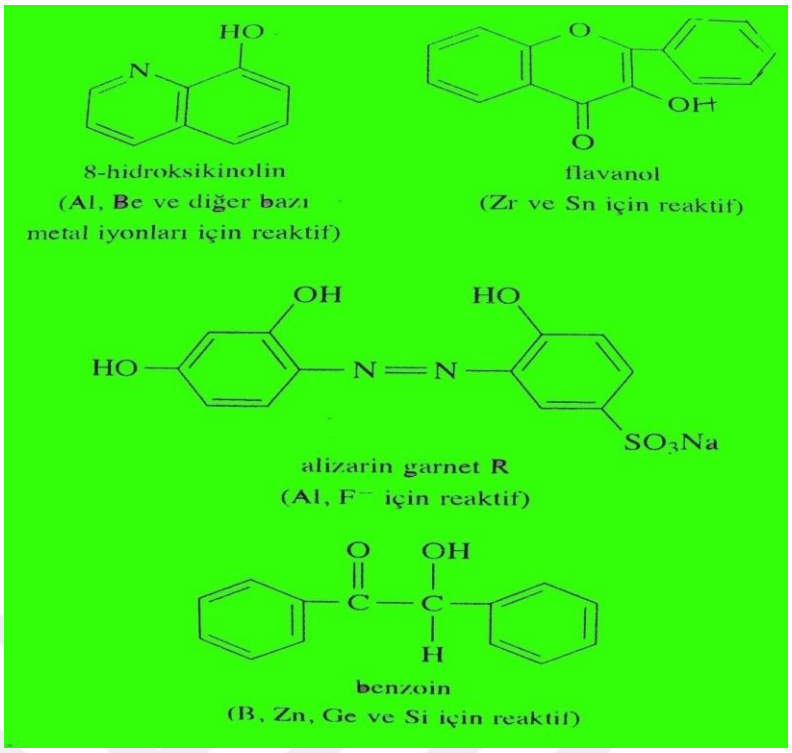
2- Dolaylı yöntemler, tayin edilecek maddenin söndürme etkisiyle floresanstaki azalmaya dayanır.

İkinci teknik anyon analizleri için yaygın olarak kullanılır.

Katyon analizleri için en başarılı florimetrik reaktifler, metal iyonu ile şelat oluşturmayı sağlayan iki veya daha fazla elektron verici fonksiyonel gruba sahip aromatik yapılardır (Çizelge 2.2). Yaygın dört reaktifin yapısı Şekil 2.15'de verilmiştir.

Çizelge 2. 2. İnorganik türler için seçilmiş florimetrik yöntemler

İyon	Reaktif	Dalga boyu, nm		Duyarlılık	Girişim
		Absorpsiyon	Floresans	µg/mL	
Al^{3+}	Alizarin garnet R	470	500	0,007	Be, Co, Cr, Cu, F^-, NO_3^-, Ni, PO_4^{3-}, Th, Zr
F^-	Alizarin garnet R'nin Al kompleksi (söndürücü)	470	500	0,001	Be, Co, Cr, Cu, Fe, Ni, PO_4^{3-}, Th, Zr
$B_4O_7^{2-}$	Benzoin	370	450	0,04	Be, Sb
Cd^{2+}	2-(*o*-Hidroksifenil)-benzoksazol	365	Mavi	2	NH_3
Li^+	8-Hidroksikinolin	370	580	0,2	Mg
Sn^{4+}	Flavanol	400	470	0,1	F^-, PO_4^{3-}, Zr
Zn^{2+}	Benzoin	—	Yeşil	10	B, Be, Sb, Renkli iyonlar



Şekil 2.15. Yaygın kullanılan en başarılı dört reaktifin yapısı

2.2.11. Organik türlerin florometrik tayinleri

Florimetrik analizin organik ve biyokimyasal türlere çok sayıda uygulaması vardır. Örneğin, Weissler ve White, çok çeşitli organik bileşikler, enzimler ve koenzimler, tıbbi maddeler, bitkisel ürünler, steroider ve vitaminleri içeren 200''ün üzerindeki maddenin tayini için yöntemler verilmiştir. Florometrenin en önemli uygulamaları, gıda ürünleri, ilaç, klinik numuneler ve doğal ürünlerin analizleri ile ilgilidir.

2.2.12. Fotolüminesansın sıvı kromatografisinde kullanılması

Fotolüminesans ölçmeleri, kromatografik veya kapiler elekroforez kolonlardan çıkan bir numunenin bileşenlerinin tespiti ve tayini için önemli bir yöntem sağlar. Bunların çoğunda floresans, uyarıcı ışına 90 derece yerleştirilmiş bir fotoelektrik dedektör yardımıyla gözlenmektedir.

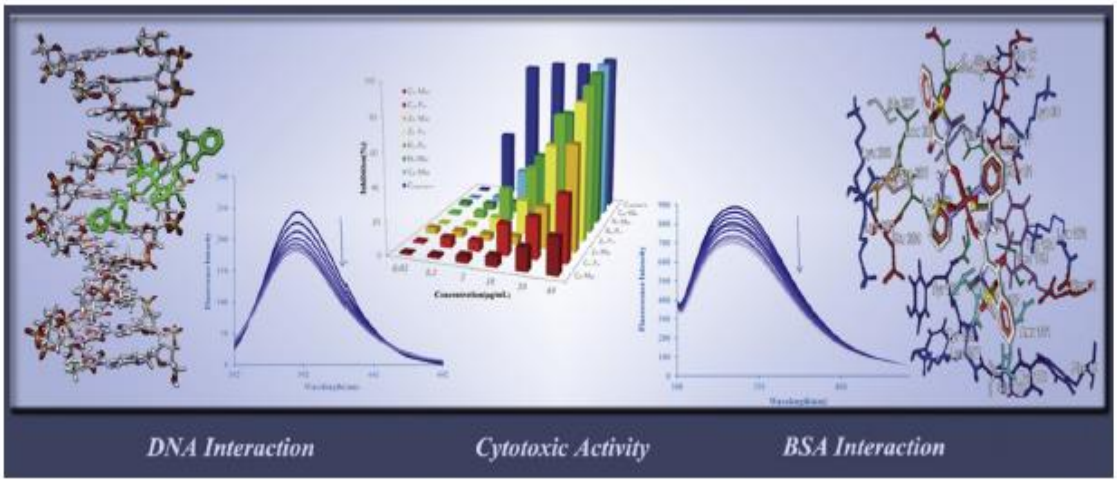
3. KAYNAK ARAŞTIRMASI

Gehad G. Mohamed ve arkadaşlarının 2004 yılında yapmış oldukları "üçlü piroksikam komplekslerin Fe (II), Fe (III), Co (II), Ni (II), Cu (II) ve çinko (II)'nin glisin ve dl-fenilalanin spektroskopik karakterizayonunun incelemesi ve sentezlenmesi" başlıklı çalışmada üçlü piroksikam kompleksleri (Pir-4-hidroksi-2-metil-N-(2-piridil)-2H-1,2-benzothiazine-3-karboksamid 1,1-dioksit) Fe (II), Fe (III), Co (II), Ni (II), Cu (II) ve çinko (II)'nin element analizi ile hazırlanmış ve glisin (Giy) ya da dl-fenilalanin (PhA) gibi çeşitli amino asitler (AA) ile molar iletkenlik IR, UV-Vis, manyetik momenti, dağınık yansıtıcılık ve X-ışını toz kırınımını karakterize edilmiştir. Pir UV-Vis spektrumu ve farklı interligand geçiş metal şelasyon etkisi ayrıntılı bir şekilde ele alınmıştır. IR ve UV-Vis spektrumu Pir piridin-N ve amit parçası karbonil grubu üzerinden metal iyonlarına koordine nötr taraflı diş şeklinde ligand olarak davrandıkları teyit edilmiştir. Giy, bir uninegatively tek dişli ligand olarak hareket molekülü ve karboksilik grubu vasıtasıyla metal iyonlarına koordine PhA bir uninegatively iki dişli ligand olarak görev yapıp buna ek olarak karboksilik asit ve amino grupları ile metal iyonlarını koordine etmiştir. Cu (II) ve çinko (II)'nun PHA ile üçlü şelatları kare düzlemsel bir geometrik yapıya sahip iken bütün şelatları oktahedral geometrik yapılara sahiptir. Molara ait iletkenlik verileri, bu şelatları en olmayan elektrolitler olduklarını göstermektedir ve Fe (III), -Pir-Gly, Co (II), Ni (II), Cu (II), Zn (II), -Pir-PhA elektrolitler: şelat 1:1 idi. X-ışını toz difraksiyon şelatların kristalini tahmin etmenin yanı sıra geometrik yapılarını açıklamak için kullanılan yeni bir araç olarak kullanılmıştır.(Mohamed ve El-Gamel, 2004)

Sujata Roy ve arkadaşlarının 2006 yılında yapmış oldukları "DNA omurgası ile oksikam NSAİD'lerin komplekslerinin, Cu (II) ile doğrudan bağlanması" başlıklı çalışmada non-steroidal anti-enflamatuar ilaç grubuna (NSAID) ait olan ilaçlar, sadece anti-enflamatuar ve analjezik maddeler olarak kullanılmış, ancak, aynı zamanda, çeşitli kanser hücre hatlarında kemo önleyici ve kemo bastırma etkisine sahip değildir. Bunlar protein seviyesinde ve/veya transkripsiyon seviyesinde hem de inhibe ederek antikanser etkilerinde uygulanmıştır. Bu NSAİD'lerin Cu (II) kompleksleri diğer ilaçlardan daha iyi anti-kanser etkileri gösterilmiştir. Yukarıdaki özellikler göz önüne alındığında, bu ilaçların Cu (II) kompleksleri, DNA seviyesinde doğrudan etkiler ortaya çıkarmak için ilgi çekmektedir. Bu çalışmada, Cu (II) ve anti-kanser özellikleri sergileyen, her ikisi de

oksikam grubu yani piroksikam ve meloksikam, ait iki NSAİD arasında kompleks oluşturmayı karakterize etmek için UV-Vis spektroskopisi kullanılmıştır. İlk defa, bu çalışma Cu (II) kompleksleri, doğrudan DNA –NSAİD omurga ile bağlanabildiğini göstermektedir ve bağlanma sabitleri ve stokiyometri veya bağlanma yeri boyutları tespit edilmiştir. Van't Hoff araziler gelen termodinamik parametreler ctDNA bu Cu (II) NSAID komplekslerinin etkileşimi bir entropik tahrik olgu olduğunu gösterdi. Piroksikam ve Cu (II) meloksikam kompleksleri dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi her ikisine de Cu (II) benzer olan DNA omurgası bozulmaları ctDNA sonucu bu Cu (II) NSAİD'lerde bağlanma gösterilmiştir. Rekabetçi CD olarak floresans ölçümleri ile takip edilen etidiyum bromür (EtBr) gibi standart bir interkalatörünün bağlanma Cu (II) kompleksleri NSAİD DNA'da interkalasyon olabileceğini göstermektedir.(Roy ve ark., 2006)

Zahra Jannesari ve arkadaşlarının 2015 yılında yapmış oldukları "Tek-çekirdekli olan Piroksikam, çinko (II) kompleksi: Kristal yapısı, DNA ve BSA bağlanma çalışmaları; in vitro hücre sitotoksisite ve oksikam komplekslerinin moleküler modellemesi" başlıklı çalışmada yeni bir mononükleer Zn (II) kompleksi, trans-$[Zn(Pir)_2(DMSO)_2]$, Pir 4-hidroksi-2-metil-N-2-piridil-2H-1,2-benzotiyazin-3-karboksamid-1,1-dioksit (piroksikam) sentezlenmiş ve karakterize edilmiştir. Kompleksin kristal yapısı, tek bir kristal X ışını kırınımı yöntemi ile elde edilmiştir. DNA ve BSA ile kompleks etkileşimi incelenmiştir. Karmaşık iki bağlayıcı modları ile FS-DNA, yani, elektrostatik ve (majör ve minör) bağlayıcı yiv ile etkileşime girer. Mikroortam ve BSA ikincil yapı kompleksi mevcudiyetinde değiştirilmiştir. Oksikam türlerinde yedi komplekslerinin kansere karşı etkileri, insan K562 hücre hatları üzerinde belirlenmiştir ve sonuçlar uygun sitotoksisite göstermiştir. BSA ve DNA ile oksikam komplekslerinin etkileşimleri moleküler yerleştirme ve moleküler dinamik simülasyon yöntemleri ile modellenmiştir.(Jannesari ve ark., 2015)



A.Bury ve arkadaşlarının 1987 yılında yapmış oldukları "Anti-enflamatuar ilaçlar metal kompleksleri. Bölüm 4. Tenoxicam kompleksleri manganez (II), demir (III), kobalt (II), nikel (II) ve bakır (II)" başlıklı çalışmada hazırlanan ilaç, spektroskopik ve manyetik özellikleri, anti-enflamatuar ilaç tenoksikam kompleksleri manganez (II), demir (III), kobalt (II), nikel (II) ve bakır için bildirilmektedir. Bütün kompleksleri enolat oksijen atomunu ve amid grubunun karbonil oksijen atomunu içeren koordinasyon ile şelat monoanyonik bağ olarak tenoksikam eylemleri üzerinde çalışılmıştır. Kompleksler iki değerlikli metal iyonları, merkezi ve demir (III) kompleksi üç şelat tenoksikam ligandların durumunda iki şelat tenoksikam ligandlar içeren bir oktahedral stereokimyaya sahip görünmektedir. Manganez (II) ve bakır (II) komplekslerinin sergi nitroblue tetrazolium tahlilinde süperoksit dismutaz aktivitesi belirtilmiştir.(Bury ve ark., 1987)

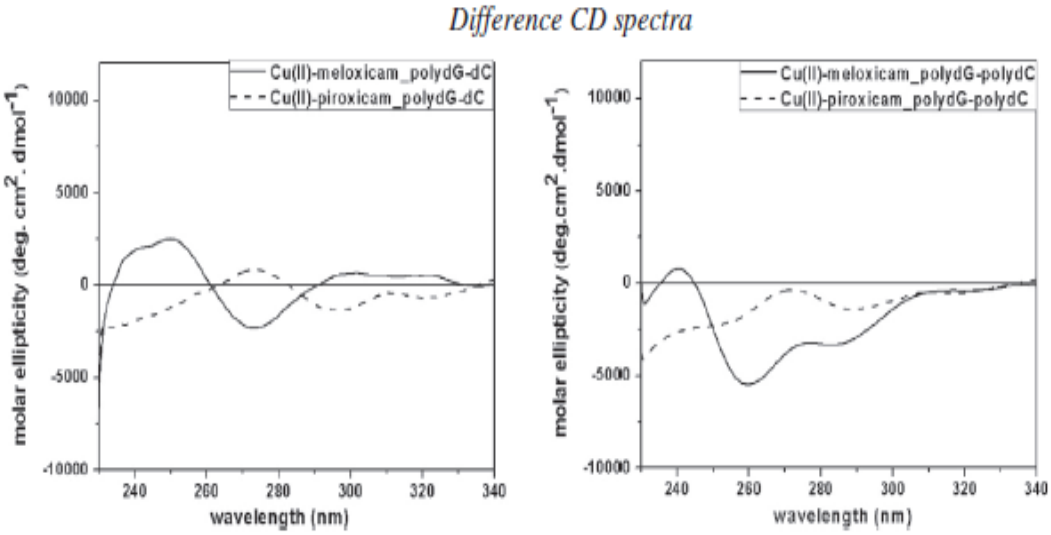
Gabriella Tamasi ve arkadaşlarının 2008 yılında yapmış oldukları "Anti-enflamatuar ve anti-kanser ilaçları gibi piroksikam ve bakır (II) komplekslerinin oksikam için taşıyıcı olarak, akıllı hidrojeller salınım çalışmaları. X-ışını yeni bakır (II) yapıları piroksikam ve izoksikam karmaşık molekülleri" başlıklı çalışmada piroxicam H_2PIR önceden hazırlanmış ve bu laboratuvardan ve Ulusal Sağlık Enstitüsü, Ulusal Kanser Enstitüsü, Gelişim Tedavi Programı, NIH-NCI-DTP, ABD'de [R. Çini, G.Tamasi, S. Defazio, M.B. Hursthouse, J. Inorg. Biochem. 101 (2007) 1140-1152 ve burada belirtilen referanslar), [Cu(HMEL)$_2$(DMF)] (H_2MEL, 4-hidroksi-2-metil-N-(5-metil-1,3-tiazol-2-]-2H-1,2-benzothiazine-3-karboksamid 1,1dioxide DMF, N,N-dimetilformamid), [Cu(HISO)$_2$] (H_2ISO, 4-hidroksi-2-metil-N-(5-metilisoksazol-3-il)-

2H-1,2-benzothiazine-3-karboksamid 1,1-dioksit), test edilmiş ve [$Cu(HTEN)_2(H_2O)_2$] (H_2TEN, 4-hidroksi-2-metil-N-piridin-2-il-2H-tieno [2,3-e] [1,2] tiazin-3-karboksamit 1,1-dioksit), CMH_2 hidrojel N,NO-etilen-bis-akrilamid ile çapraz bağlı yüklendi (ko-1: 10-poli(N-metaakriloil-L-histidin-ko-N-izopropil) (EBA)% 2) ve birden çok medya Cu-HPIR türlerinin serbest bırakılması kinetiği çalışılmıştır. Şişme ve DMSO geleni yükledikten sonra CMH_2 hidrojelden DMSO içinde $Cu(HPIR)_2$ sürüm bir difüzyon kontrollü bir süreç izlenmiştir. Daha sonra su içine ıslatılması, THF çözeltisinden şişme ve yükleme sonrası kurutulmuş CMH_2 hidrojelden Cu(HPIR)/$Cu(HPIR)_2$ salınması/DMSO 95:5 h/h (pH 5.6) bir dinlenme kontrol edilmiş ve difüzyon kontrollü bir mekanizma izlenmiştir. $Cu(HPIR)_2$ miktarı 0.03 lg Cu/mg jel/ml Metal tabanlı ilaçlar için rapor IC_{50} değerleri ile karşılaştırılmış, 48 saat içinde 0.8 İM karboplatin gibi (diammino (1,1-cyclobutandicarboxylato) ulaşılmış bazı insan tümör hücre hatlarına karşı platinyum (II)) ortamda yayınlanmıştır. Teslimat ortamında $Cu(HPIR)_2$ stokiyometriye, bağlı olarak 2 veya 362 nm'de absorbans değerlerini hem de izleme tarafından gerçekleştirilen çalışmalar, salma (metale-bağlanmış HPIR duyarlı a) ve AAS ile Cu içeriği, Cu(HPIR) ile mükemmel bir uyum olduğunu göstermiştir. Karşılık gelen çalışmalar, diğer Cu(oksikam-H), farklı dağıtım ortamı içinde 2 türleri için yapılmıştır.(Tamasi ve ark., 2008)

Tahereh Hosseinzadeh Sanatkar ve arkadaşlarının 2013 yılında yapmış oldukları "Co (II) ve çinkonun (II) meloksikam kompleksleri: Sentez, kristal yapıları, ışıkla yarılma veya in vitro DNA-bağlanması" başlıklı çalışmada iki nötral tek çekirdekli kompleksler Co (II) ve Zn (II)'nin non-steroidal anti-enflamatuar ilaç ile birlikte meloksikamın (H_2mel, 4-hidroksi-2-metil-N-(5-metil-2-tiazolil)-2H-1, 2-benzothiazine-3-carboxammide-1,1-dioksit), [$Co(Hmel)_2(EtOH)_2$] (1) ve [$Zn(Hmel)_2(EtOH)_2$] (2), sentezlenmiş ve element analizi ile karakterize, IR ve UV-Vis spektroskopisi ve katı-hal yapıları tek kristal kırınımı ile incelenmiştir. Kompleksleri, metal atomu çevresinde çarpık sekiz yüzeyli geometriye sahiptir. Meloksikam ligandların adaptasyonunun deneysel verilerinde meloksikam (amit oksijenle ve tiazolil halkasına ait nitrojen atomuna) deprotone iki dişli ligand komplekslerinde ve amit, N-H fonksiyonuna ve enolat O atomunun stabilize arasında güçlü bir molekül içi hidrojen bağı olarak görev yaptığını göstermiştir. Floresans spektroskopisi ve siklik voltametri balık sperm DNAsı (FS-DNA) ile komplekslerinin birleşimini araştırmak için kullanılmıştır. Buna ek olarak, ışıkla yarılma çalışmaları da plazmid DNA kompleksleri bağlanmasını araştırmak için kullanılmıştır. DNA ile kompleks bir etkileşim elektrostatik bağlanma

moduna atfedilen UV-Vis spektrumu mavi bir kayma ve hiperkromizmler ile izlenmiştir. Ethidium bromide (EB) ile rekabet çalışması kompleksleri, DNA'ya bağlı EB de EB güçlü rekabette DNA'ya bağlananı belirten yerini göstermiştir. Deney sonuçları kompleksleri pUC57 plasmid DNA'nın yarabildiğini göstermiştir.(Sanatkar ve ark., 2013)

Sreeja Chakraborty ve arkadaşlarının 2014 yılında yapmış oldukları "Alternatif GC ve GC homopolimerik dizilerine oksikam NSAID'lerin Cu (II) komplekslerine bağlanmasının spektroskopik araştırmaları" başlıklı çalışmada, non-steroidal anti-enflamatuvar (NSAID) grubuna ait ilaçlar tek anti-enflamatuar, analjezik ve anti-piretik maddeler olarak kullanılmış ancak aynı zamanda anti-kanser etkilerini göstermemiştir. Bakır gibi biyolojik olarak aktif bir metal ile kompleks, olan tam mekanizması henüz tam olarak anlaşılamamıştır çıplak ilaçlara kıyasla, anti-kanser etkilerinin bir donanımını göstermiştir. İlk kez, Cu (II), doğrudan DNA-NSAIDs omurgasına bağlanan grup ile gösterilmiştir. DNA omurgasına bağlamak için NSAID yani meloksikam ve piroksikamın bakır komplekslerinin yeteneği onların gelişmiş antikanser etkileri arkasında olası bir moleküler mekanizma olabilir. DNA Cu (II)-NSAIDs baz dizisi belirli bir etkileşim açıklık getirecek genom sekansı içinde muhtemel bağlanma siteleri hakkında bilgi sağlamıştır. Bu çalışmada, bu komplekslerin yapısı ve GC zengin dizilerinin hidrasyon desen farklılıklarına nasıl tepki sunmuşlardır. Bunun için, Cu (II) bağlanma çalışmaları piroksikam kompleksleri [Cu (II) - $(Px)_2(L)_2$] ve meloksikam [Cu (II) - $(Mx)_2(L)$] alternatif GC (polydG- dC) ve homopolimerik GC (polydG-polydC) sekansları UV-Vis absorpsiyonu, floresan ve dairesel dikroizm (CD) spektroskopisi dahil spektroskopik teknikler bir kombinasyonu kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Cu (II) -NSAIDs polydG-dC ve polydG-polydC güçlü bir bağlanma eğilimi göstermiştir. Cu (II) -NSAIDs polydG-dC ve polydG-polydC hem güçlü bir bağlanma eğilimi göstermiştir. PolydG-polydC (K_b=11,5.10^3 M^{-1}) zayıf bir bağlayıcıya polydG-dC (K_b=5,02.10^3 M^{-1}) güçlü bir bağlayıcıdan Cu (II) -meloxicam rolü tersine dönmesi sırasında, Cu (II)-piroksikam polydG-polydC (K_b=8,18.10^3 M^{-1}) zayıf birine polydG-polydC (K_b=2,18.10^3 M^{-1}) güçlü bir bağlayıcıdan değişiklikler akım, omurga yapıları/hidrasyon değişikliklere bu komplekslerin hassasiyet noktası olmuştur. (Chakraborty ve ark., 2014)



Literatür taraması sonucunda, Oksikam bileşikleriyle antibiyotiklerle özellikle metabolik öneme sahip bazı metaller arasında oluşturulan komplekslerin spektroflorimetrik yöntemle incelenmesi konusunda oldukça az çalışmaya rastlanmıştır

4. MATERYAL VE YÖNTEM

Oksikam türevi olan ilaç etken maddelerinin (Piroksikam, Meloksikam, Tenoksikam, Naproksen) ultra saf su, metil alkol, etil alkol, DMF, asetonitril ile hazırlanan çözeltilerin florimetrik parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Bu parametrelerin belirlenebilmesi için Piroksikam, Meloksikami Tenoksikam ve Naproksen'in her bir çözücüde uygun derişimlerdeki çözeltileri hazırlanarak, uyarma dalga boyları 10'ar nm aralıklarla değiştirilip emisyon spektrumları alınmış ve oksikam türü ilaç etken maddelerinin her bir çözücüde maksimum floresans şiddetine sahip oldukları uyarma ve emisyon dalga boyları belirlenmiştir. Vücuttaki pek çok metabolik reaksiyonda önemli rol oynayan, çinko (Zn) ile Oksikam türü ilaç etken maddelerinin, aynı çözücü ortamlarında kompleks oluşturacağı en uygun koşullar tayin edilmiştir. Bu nedenle çözücü ortamı, pH ve Oksikam türü ilaç etken maddelerinin konsantrasyonu incelenmiştir. Belirlenen uygun koşullarda, kalibrasyon eğrileri çizilip geliştirilecek yöntemin doğrusal tayin aralığı ve alt tayin sınırları belirlenmiştir.

4.1. Kimyasal Maddeler

4.1.1. Non-steroidal antienflamatuarlar (Oksikamlar)

Oksikam türlerinden olan piroksikam (PRX), meloksikam (MLX), tenoksikam (TNX), naproksenin (NPRX) ultra saf su, etanol (EtOH), metanol (MeOH), DMF ve asetonitrilde (ACN) çözünme özellikleri (Çizelge 4.1) belirlendikten sonra, 10^{-3} M stok çözeltileri hazırlanıp floresans özelliklerinin incelenmesinde ve pH çalışmalarında kullanıldı. Stok çözeltilerden uygun derişimler de seyreltilerek çalışma çözeltileri hazırlanmıştır.

Çizelge 4. 1. Oksikamların çeşitli çözücülerde çözünme özellikleri

Oksikamlar	Su	MeOH	EtOH	DMF	ACN
PRX	Çözünmedi	Çözünmedi	Çözünmedi	Çözündü	Çözündü
MLX	Çözünmedi	Spektrum floresans şiddeti çok düşük	Çözünmedi	Spektrum floresans şiddeti çok düşük	Çözündü
TNX	Çözünmedi	Spektrum floresans şiddeti çok düşük	Çözünmedi	Çözündü	Spektrum floresans şiddeti çok düşük
NPRX	Çözündü	Çözündü	Çözündü	Spektrum floresans şiddeti çok düşük	Çözünmedi

4.1.2. Kullanılan çözücüler

Deneysel çalışmalar boyunca Oksikam türü ilaç etken maddeleri olan PRX, MLX, TNX ve NPRX için, ultra saf su, MeOH, EtOH, DMF, ACN ortamlarında çalışma yapılmıştır. Bütün çözücüler, ultra saflıkta veya spektral saflıkta Merck firmasından temin edilmiştir.

4.1.3. Amonyum asetat çözeltisi

Deneysel süreç boyunca oluşturulan çözelti ortamlarının pH'larını kontrol altında tutabilmek için, Merck firması tarafından temin edilen amonyum asetatın (CH_3COONH_4) % 20'lik çözeltisi ultra saf suda hazırlanmış ve tampon çözelti olarak kullanılmıştır.

4.1.4. Hidroklorik asit ve sodyum hidroksit çözeltisi

Deney ortamındaki çözeltilerin pH'ını ayarlayabilmek için 1M'lık HCI (hidroklorik asit) ve 1M'lık NaOH (sodyum hidroksit) çözeltileri hazırlanmıştır. Hidroklorik asit ve sodyum hidroksit Merck firmasından temin edilmiştir. % 37'lik saf

hidroklorik asit ve sodyum hidroksit gerekli miktarda alınarak ultra saf su ile çözeltiler hazırlanmıştır.

4.1.5. Stok çinko çözeltisi

Merck firmasından temin edilen 1000 ppm'lik standart çinko çözeltisinden gerekli miktarda alınıp ultra saf su ile çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çinko çözeltisi 10^{-3} M derişimine sahiptir.

4.1.6. Stok bakır çözeltisi

Merck firmasından temin edilen 1000 ppm'lik standart bakır çözeltisinden, gerekli miktarda alınıp saf su kullanılarak 10^{-3} M stok çözeltisi hazırlanmıştır. Her gün, stok çözeltiden saf su ile seyreltilerek çalışma çözeltileri hazırlandı.

4.1.7. Stok demir çözeltisi

Stok 10^{-3} M'lık demir (II) çözeltisi, Merck firmasından temin edilen demir (II) sülfat hepta hidrat ($FeSO_4.7H_2O$) kullanılarak ultra saf su ile hazırlanmıştır.

4.2. Kullanılan Cihazlar

4.2.1. Spektroflorimetre

Yapılan çalışmalarda floresans ölçümleri PERKIN ELMER LS/55 marka spektroflorimetre ile yapılmıştır. Uyarma ve emisyon monokromatörünün slit aralıkları 10'ar nm, emisyon dalga boyu aralığı ise 200-800 nm olarak ayarlanmış ve tüm ölçümler bu aralıkta yapılmıştır. Optik uzunluğu 1 cm olan kuvars bir küvet kullanılmıştır.

4.2.2. Analitik terazi ve pH metre

Çözeltiler hazırlanırken kullanılan maddelerin tartımı, ACCULAB ATILON marka hassas terazi ile yapılmıştır. Deney çözeltilerinin pH'larını ayarlamak amacıyla

METTLER TOLEDO marka pH-metre ve aynı marka kombine cam-pH elektrodu kullanılmıştır. pH-metrenin kalibrasyonu, Merck firmasından temin edilen pH 2, pH 4, pH 7 ve pH 10 tampon çözeltileri kullanılarak yapılmıştır.

4.2.3. Su Banyosu, saf su cihazı ve karıştırıcı

Çözeltiler de kullanılan ultra saf su, Pure Lab Option-Q ELGA DV25 marka cihazdan elde edilmiştir. WiseCircu marka sirkülasyonlu su banyosu kullanılarak çalışma esnasında çözeltilerin sıcaklığı 35.5°C'de sabit tutulmuştur. Çözeltileri karıştırmak için ULTRASONIC LC/30H marka su banyosu ve manyetik karıştırıcı kullanılmıştır.

4.3. Deneysel Yöntem

Oksikam türevleri olarak en çok tercih edilen Meloksikam ve Naproksen ile metabolik öneme sahip çinko (Zn^{2+}) ve demir (Fe^{2+}) iyonlarının kompleks oluşumuna dayanan spektroflorimetrik tayinde kullanılan deneysel işlem şu şekildedir:

25 mL'lik sıcaklık kontrollü bir reaksiyon hücresinde, Zn (II) derişimi 10^{-4}M olacak şekilde Zn (II) stok çözeltisinden uygun hacimlerde ilave edildi. Bunun üzerine, 2.0 mL 10^{-3} M MLX'ın tayin için belirlenen en uygun floresans şiddetinin elde edildiği çözücüdeki (ACN) stok çözeltisinden ve 1.0 mL % 20'lik CH_3COONH_4 çözeltisi ilave edildi. İstenilen pH değerine (pH=3.0 ve pH=5.0) ulaşmak için 1M HCl ve 1M NaOH çözeltileri kullanıldı.

Çözeltilerin hacmi uygun çözücüyle (MLX-ACN, NPRX-Saf su) sıcaklık kontrollü bir reaksiyon hücre içerisinde 20 mL'ye tamamlandı. Çözelti kompleks oluşumu için en uygun süre (25 dakika) ve sıcaklıkta bekletildi. Aynı deneysel işlem NPRX-Fe kompleksi için de uygulandı. Hazırlanan bu çözeltilerin uyarma ve emisyon spektrum ölçümleri yapıldı ve floresans şiddetleri ölçüldü. Belirlenen en uygun uyarma ve emisyon dalga boylarında, kalibrasyon (F-[Zn^{2+}] ve Stern-Volmer kalibrasyon grafikleri (F0/F-[Zn^{2+}]) çizildi. Geri kazanım, alt tayin sınırı (LOQ) ve gözlenebilme sınırı (LOD) değerleri hesaplanmıştır.

4.4. Deney Koşullarının Belirlenmesi

Oksikam türevlerinden olan MLX ve NPRX'in ilk aşamada çinko ve demir ile oluşturacağı kompleks yapının uygun koşulları belirlenmelidir. Uygun deney koşullarının belirlenmesi için, ligand ve kompleksin en iyi çözündüğü çözücü ortamı, en uygun uyarma ve emisyon dalga boyları, pH, ligand derişimi, kompleks oluşum süresi araştırılmıştır. Belirlenen en uygun koşullarda kalibrasyon ve Stern-Volmer kalibrasyon eğrileri çizilmiş ve geliştirilen yöntemin tayin aralığı ve alt tayin sınırı belirlenmiştir.

4.4.1. Uyarma ve emisyon dalga boylarının belirlenmesi

MLX ve NPRX'in hangi çözücü ortamında en uygun uyarma ve emisyon dalga boyunu verdiğini incelemek için, oksikam türü ilaç etken maddelerinin saf su, EtOH, MeOH, ACN, DMF'deki uygun derişimlerde çözeltileri hazırlanıp, uyarma dalga boyu 200 nm'den başlayarak 10 nm aralıklarla değiştirilerek, her bir uyarma dalga boyunda çoklu emisyon spektrum taraması yapılmıştır. Bu çoklu emisyon spektrumlarından maksimum floresans şiddetine sahip, en uygun çözücü ortamı, en uygun uyarma ve emisyon dalga boyları belirlenmiştir.

4.4.2. En uygun MLX ve NPRX derişimlerinin belirlenmesi

Oksikam türü olan ve çalışmada ligand olarak kullanılan MLX ve NPRX'in derişimi en uygun kompleks oluşumunu sağlamak amacıyla MLX 10^{-5}-10^{-3} M ve NPRX 10^{-6}-10^{-3} derişim aralıklarında değiştirilerek emisyon spektrumları alınmış ve en uygun floresans şiddetinin elde edildiği derişim, çalışmada ligand derişimi olarak belirlenmiştir.

4.4.3. En uygun pH değerinin belirlenmesi

MLX ve NPRX'in ve metal komplekslerinin farklı pH değerlerinde florimetrik davranışları incelenmiş ve en uygun pH değerini tespit etmek amacıyla, belirlenen uygun çözücü ortamlarında, pH değeri 2-9 arasında 0.5 artış ile değiştirilerek belirlenen

dalga boylarında emisyon spektrumları alınmış ve floresans şiddetleri kaydedilmiştir. Her bir ilaç etken maddesi için ölçülen floresans şiddeti değerleri pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir. Bu grafiklerden kompleks oluşumu için en uygun pH değeri belirlenmiştir.

4.4.4. En uygun ortam sıcaklığının belirlenmesi

Oksikam türü ilaç etken maddeleri MLX ve NPRX için kompleks oluşum sıcaklığının belirlemesinde vücut sıcaklığının dikkate alınması gerektiği göz önünde bulundurulup, kompleks oluşumu için en uygun sıcaklık aralığını belirlemek için, deneyler sabit sıcaklıkta çalışma imkanı sağlayan özel bir reaksiyon hücresinde 35-37^{o}C sıcaklık aralığında çalışılmıştır. Sıcaklık ceketi bulunduran bu hücre, sirkülasyonlu su banyosundan sürekli belli sıcaklıktaki su devir daimi ile sıcaklığı sabit tutmaktadır. Bu reaksiyon hücresinde her bir sıcaklık değerinde belirlenen dalga boylarında emisyon spektrumları alınarak floresans şiddetleri ölçülmüş, MLX ve NPRX'in kompleks oluşumu için en uygun verilerin elde edildiği sıcaklık değeri belirlenmiştir.

4.4.5. Kalibrasyon grafiği ve analitik parametrelerin belirlenmesi

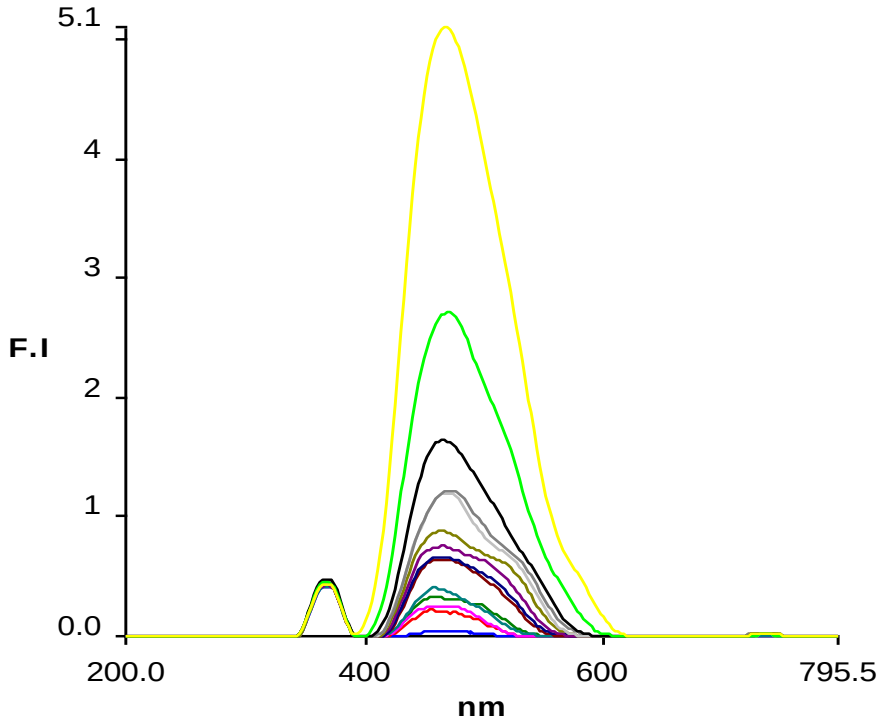
Zn(II)-MLX ve Fe(II)-NPRX komplekslerinin belirlenen uygun çalışma koşullarında ve uygun derişim aralıklarında hazırlanan çözeltilerinin, seçilen dalga boylarında floresans şiddetleri ölçülerek, doğrusal çalışma aralığını belirlemek amacıyla Zn(II) ve Fe(II) derişimlerine karşı ölçülen floresans şiddetleri grafiği çizilmiştir.

5. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

5.1. Uyarma ve Emisyon Dalga Boylarının Belirlenmesi

Çalışmada öncelikle, Piroksikam, Meloksikam, Tenoksikam ve Napsoksenin ultra saf, etanol, metanol, DMF ve asetonitrilde 10^{-3} M derişimlerde 25'er ml'lik balon jojelerde stok çözeltileri hazırlanarak, 200 nm'den başlayarak 10 nm aralıklarla dalga boylarının değiştirilmesiyle her bir uyarma dalga boyundaki çoklu emisyon spektrumu alınmıştır. Diğer bir aşamada ise, PRX, MLX, TNX ve NPRX'in derişimleri 10^{-3}'er M olacak şekilde çözeltileri hazırlanmış ve her bir çözücü de 2-9 arasındaki pH değerlerinde belirlenen dalga boylarında emisyon spektrumları alınmıştır.

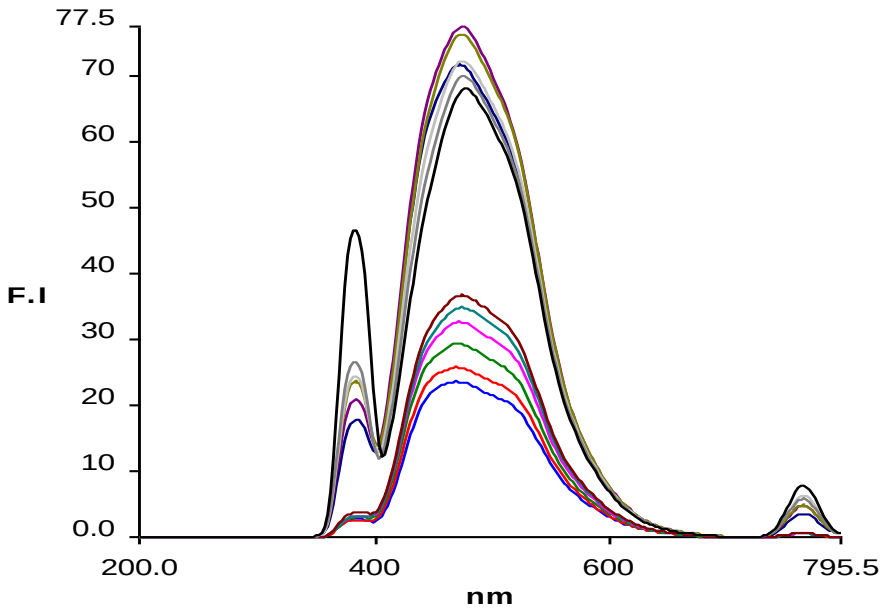
Bu spektrumlar ve veri tabloları PRX için Şekil 5.1-Şekil 5.2 ve Çizelge 5.1-Çizelge 5.2'de, MLX için ise Şekil 5.3 ve Çizelge 5.3'de, TNX için Şekil 5.4 ve Çizelge 5.4'de, NPRX için Şekil 5.5-Şekil 5.6 ve Çizelge 5.5- Çizelge 5.6'da verilmiştir.



Şekil 5.1. Piroksikamın ACN'de pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumları (λex=366 nm, λem=466 nm, [PRX]=10^{-3} M)

Çizelge 5. 1. Piroksikamın ACN'de pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumlarına ait floresans şiddet değerleri (λex=366 nm, λem=466 nm, [PRX]=10^{-3} M)

ACN	Floresans Şiddeti (F.I.)	
pH	**λex=366 nm**	**λem=466 nm**
2	U Y A R M A	5,11
2.5		2,74
3		1,65
4		1,23
4.5		1,21
5		0,87
5.5		0,75
6		0,66
6.5		0,64
7		0,38
7.5		0,24
8		0,31
8.5		0,20
9		0,05

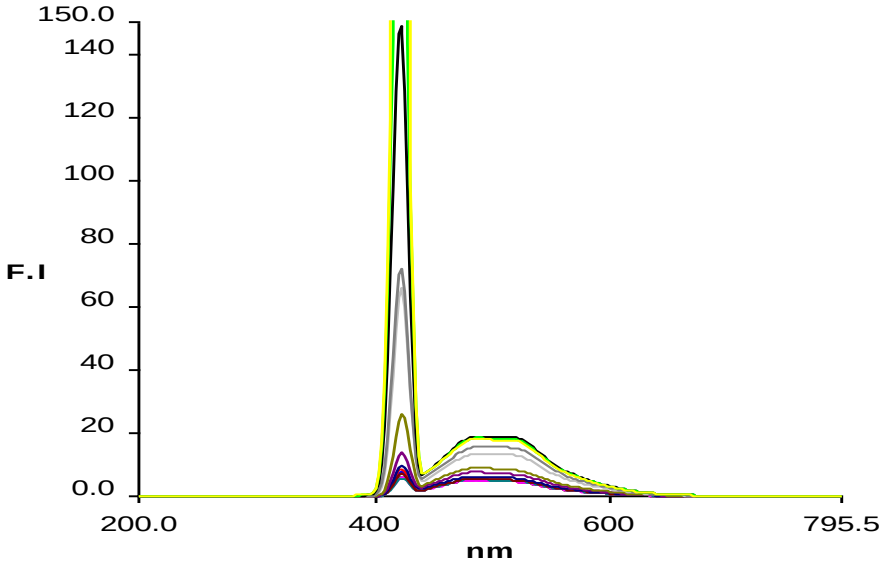


Şekil 5.2. Piroksikamın DMF'de pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumları (λex=380 nm, λem=472 nm, [PRX]= 10^{-3} M)

Çizelge 5. 2. Piroksikamın DMF'de pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumlarına ait floresans şiddet değerleri (λex=380 nm, λem=472 nm, [PRX]=10^{-3} M)

DMF	**Floresans Şiddeti (F.I.)**	
pH	**λex=380 nm**	**λem=472 nm**
2		69,23
2.5	U	71,30
3		73,75
3,5	Y	78,32
4		78,84
4.5	A	72,23
6,5		37,18
7	R	35,56
7,5		32,98
8	M	29,74
8,5		25,76
9	A	24,05

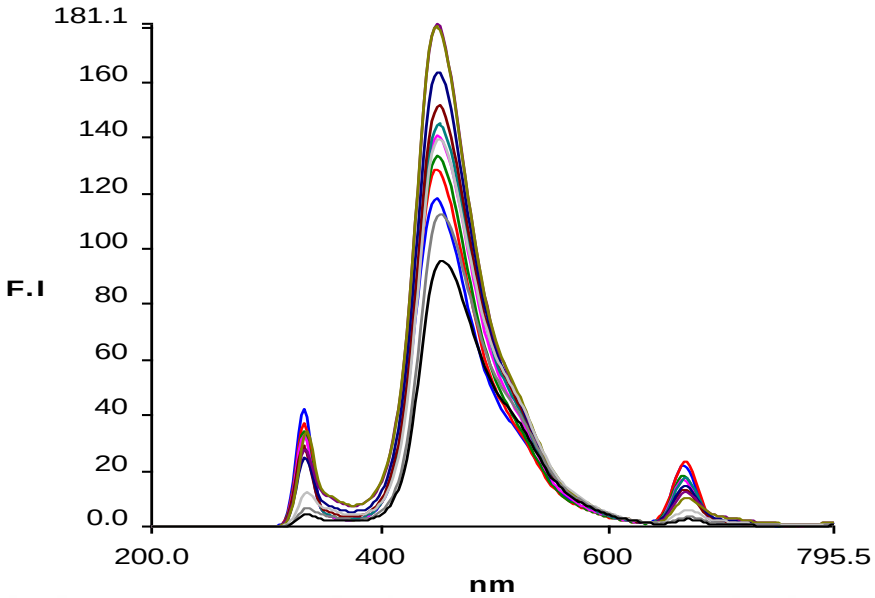
PRX sadece ACN ve DMF'de çözündüğü için bu çözücülerde spektrumları alınmıştır. ACN ortamında floresans şiddetinin çok düşük olmasına rağmen artan pH değerlerinde kararlı ve uygun değişimler göstermiştir. ACN ortamında PRX için en uygun dalga boyları λex=366 nm, λem=466 nm olarak belirlenmiştir. Ancak bu ortamda çalışma yapmanın çok uygun olmayacağı düşünülmüştür. DMF ortamında ise, artan pH değerlerine karşı biraz daha yüksek floresans şiddetleri ölçülmüş ve daha düzgün spektrumlar elde edilmiştir. DMF ortamında PRX için en uygun dalga boyları da λex=380 nm, λem=472 nm olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.3. Meloksikamın ACN'de pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumu (λex=406 nm, λem=503 nm, [MLX]=10^{-3} M)

Çizelge 5. 3. Meloksikamın ACN'de pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumlarına ait floresans şiddet değerleri (λex=406 nm, λem=503 nm, [MLX]=10^{-3} M)

ACN	**Floresans Şiddeti (F.I.)**	
pH	**λex=406 nm**	**λem=503 nm**
2		17,82
2.5		18,13
3	U	18,74
4		15,48
4.5	Y	13,19
5		8,63
5,5	A	7,25
6		5,93
6,5	R	5,22
7		5,04
7,5	M	4,71
8		4,82
8,5	A	4,90
9		5,01

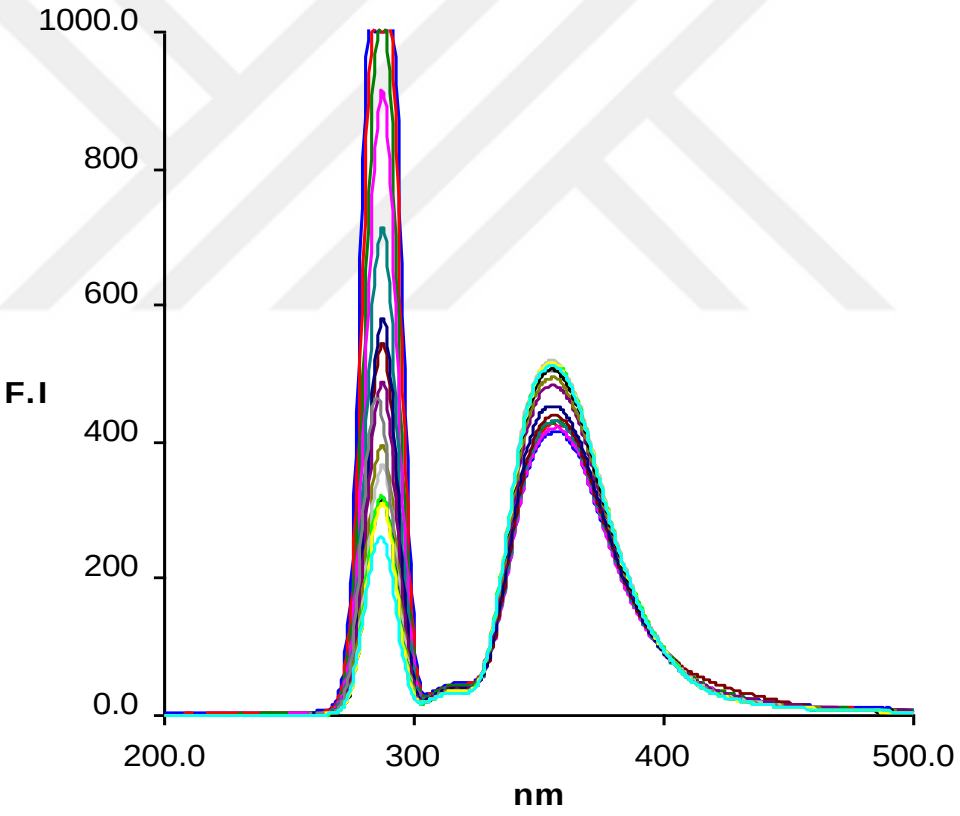


Şekil 5.4. Tenoksikamın DMF'de pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumu (λex=332 nm, λem=448 nm, [TNX]=10^{-3} M)

Çizelge 5. 4. Tenoksikamın DMF'de pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumlarına ait floresans şiddet değerleri (λex=332 nm, λem=448 nm, [TNX]=10^{-3} M)

DMF	**Floresans Şiddeti (F.I.)**		
pH	**λex=332 nm**	**λem=448 nm**	**λex=664**
2		91,16	
3	U	107,61	U
4		134,88	
5	Y	174,04	Y
5,5		174,52	
6	A	158,38	A
6,5		146,34	
7	R	139,80	R
7,5		136,08	
8	M	129,00	M
8,5		124,33	
9	A	113,96	A

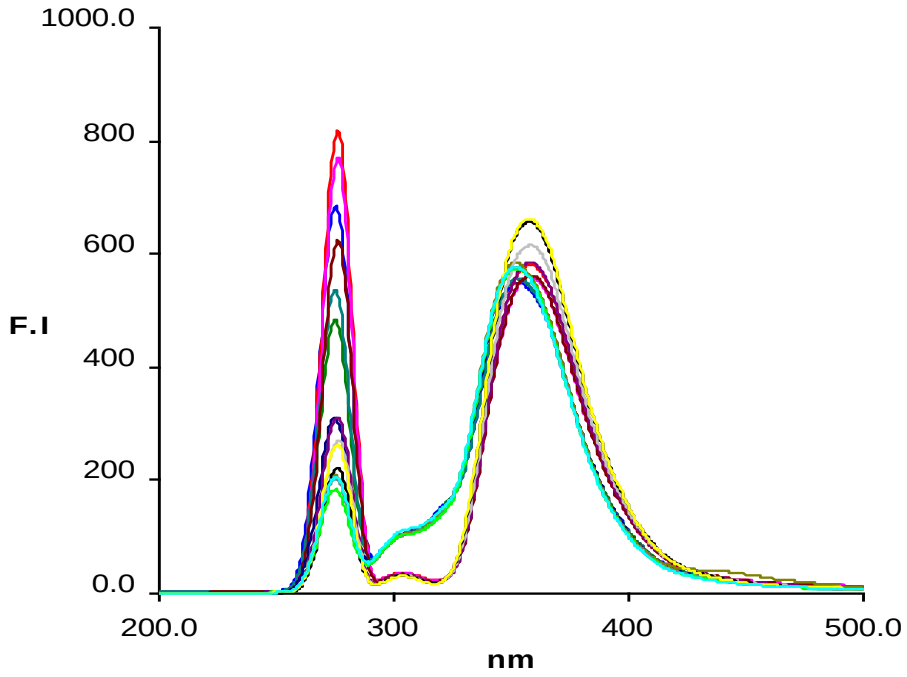
MLX sadece ACN'de, TNX ise sadece DMF de çözündüğü için bu çözücülerde spektrumları alınmıştır. MLX'ın 10^{-3} M derişimde, artan pH değerlerine karşı floresans şiddetlerinin düşük ancak kararlı ve düzgün artışlar gösterdiği gözlenmiştir. ACN ortamında MLX için en uygun dalga boyları da λex=406 nm, λem=503 nm olarak belirlenmiştir. TNX'ın 10^{-3} M derişimde ise, artan pH değerlerine karşı floresans şiddetlerinin daha yüksek ve düzgün artışlar gösterdiği gözlenmiştir. DMF ortamında TNX için en uygun dalga boyları da λex=322 nm, λem=448 nm olarak belirlenmiştir.



Şekil 5.5. Naproksenin EtOH'da pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumu (λex=283 nm, λem=355 nm, [NPRX]=10^{-6} M)

Çizelge 5. 5. Naproksenin EtOH'da pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumlarına ait floresans şiddet değerleri (λex=283 nm, λem=355 nm, [NPRX]=10^{-6} M)

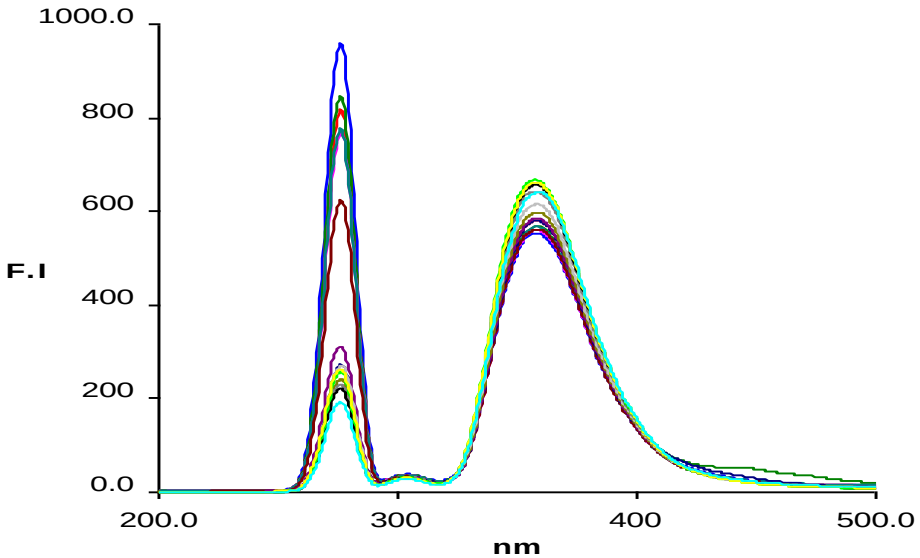
EtOH	**Floresans Şiddeti (F.I.)**	
pH	**λex=283 nm**	**λem=355 nm**
2		510,90
2.5		514,68
3		511,91
3.5		505,27
4	U	503,49
4.5		518,49
5	Y	493,26
5,5		481,68
6	A	451,92
6,5		437,68
7	R	429,32
7,5		418,89
8	M	428,34
8,5		424,49
9	A	413,39



Şekil 5.6. Naproksenin MeOH'da pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumu (λex=272 nm, λem=356 nm, [NPRX]=10^{-6} M)

Çizelge 5. 6. Naproksenin MeOH'da pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumlarına ait floresans şiddet değerleri (λex=272 nm, λem=356 nm, [NPRX]=10^{-6} M)

MetOH	Floresans Şiddeti (F.I.)	
pH	**λex=272 nm**	**λem=356 nm**
2	U Y A R M A	566,56
2.5		664,73
3		565,18
3.5		657,10
4		565,02
4.5		614,25
5		569,06
5,5		585,02
6		567,82
6,5		558,31
7		551,13
7,5		562,11
8		549,61
8,5		581,91
9		543,24



Şekil 5.7. Naproksenin suda pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumu (λex=273 nm, λem=357 nm, [NPRX]=10^{-6} M)

Çizelge 5. 7. Naproksenin suda pH 2-9 değerleri arasındaki emisyon spektrumlarına ait floresans şiddet değerleri (λex=273 nm, λem=357 nm, [NPRX]=10^{-6} M)

MetOH	**Floresans Şiddeti (F.I.)**	
pH	**λex=273 nm**	**λem=357 nm**
2	U Y A R M A	639,78
2.5		664,54
3		668,47
3.5		658,26
4		643,38
4.5		617,61
5		598,63
5,5		587,68
6		580,94
6,5		559,98
7		567,75
7,5		562,95
8		568,03
8,5		582,01
9		554,40

NPRX, EtOH, MeOH ve suda çözündüğü için bu çözücülerde spektrumları alınmıştır. NPRX kimyasal yapısında yüksek konjügasyona sahip naftalen halkası içermesinden dolayı çok yüksek floresans şiddetine sahiptir ve çalışılan tüm çözücülerde bu özelliği göstermiştir. Bu nedenle spektrumları görüntüleyebilmek için 10^{-6} M derişime kadar düşülmüştür. Çalışılan antienflamatuar ilaçlar içerisinde en yüksek floresans şiddetine sahip olan madde NPRX'dir. NPRX her üç çözücü ortamında da oldukça yüksek floresans şiddetine sahip spektrumlar vermiştir. Ayrıca artan pH değerlerinde kararlı ve uygun değişimler göstermiştir. NPRX için, en uygun dalga boyları EtOH ortamında λex=283 nm, λem=355 nm, MeOH ortamında λex=272 nm, λem=356 nm ve su ortamında λex=273 nm, λem=357 nm olarak belirlenmiştir.

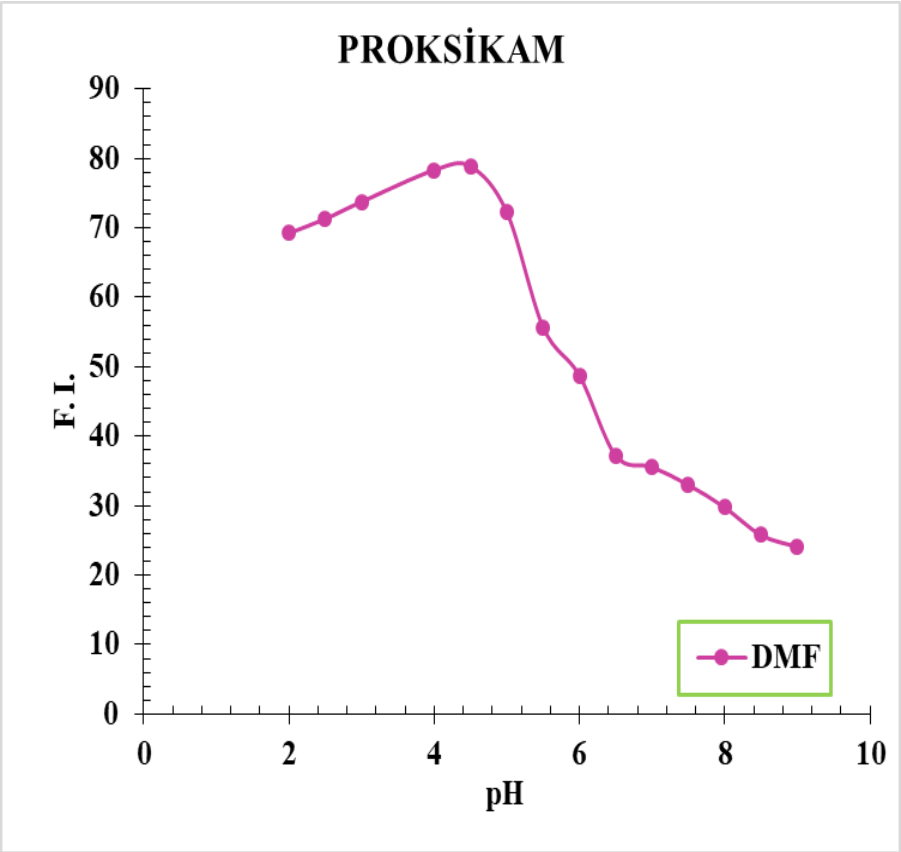
Aynı işlem, belirlenen en uygun deney şartlarında MLX'in Zn(II) ve NPRX'in Fe (II) komplekleri için de tekrarlanmıştır.

5.2. En Uygun MLX ve NPRX Ligand Derişimlerinin Belirlenmesi

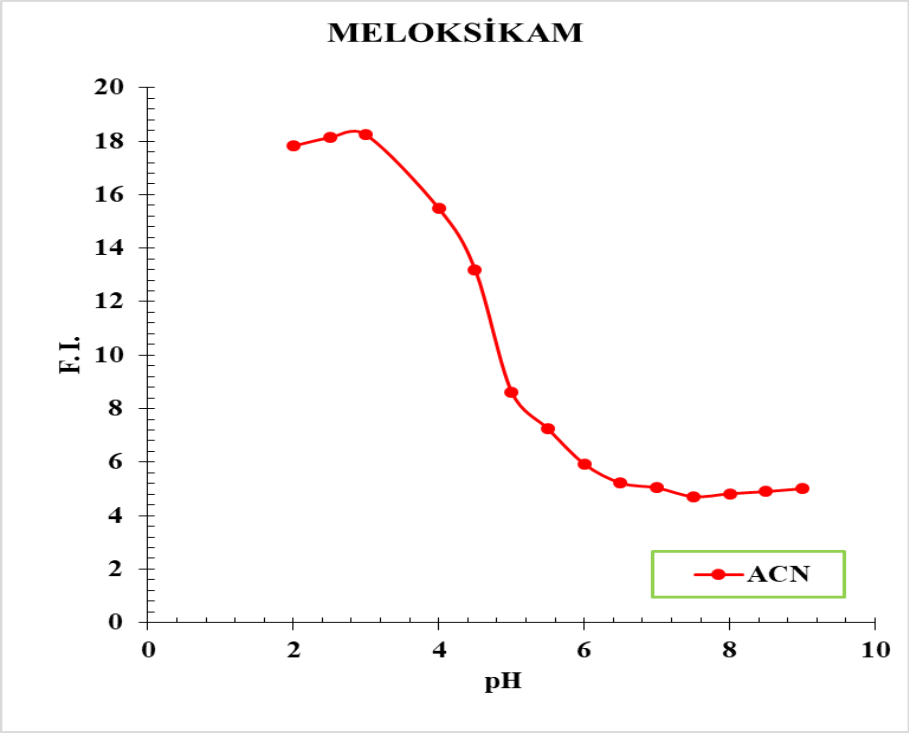
Çalışmada ligand olarak kullanılan MLX ve NPRX'in derişimi, en uygun kompleks oluşumunu sağlamak amacıyla 10^{-3}-10^{-6} M derişim aralığında değiştirilerek emisyon spektrumları alınmıştır. MLX için 10^{-3} ve 10^{-5} M derişimde çalışıldığında floresans şiddetinin çok düşük olduğu gözlenmiştir. NPRX için ise 10^{-3}-10^{-5} M arasındaki derişimlerde floresans şiddeti çok yüksek olduğu için, florimetrenin görüntüleme limitinin üzerine çıkması sebebiyle bu derişimlerde tayin yapılamamıştır. Bu nedenle MLX-Zn(II) ve NPRX-Fe(II) kompleksleri için en uygun floresans şiddetinin elde edildiği derişim MLX için 10^{-4} M ve NPRX için 10^{-6} M olarak seçilmiştir.

5.3. En Uygun pH Değerinin Belirlenmesi

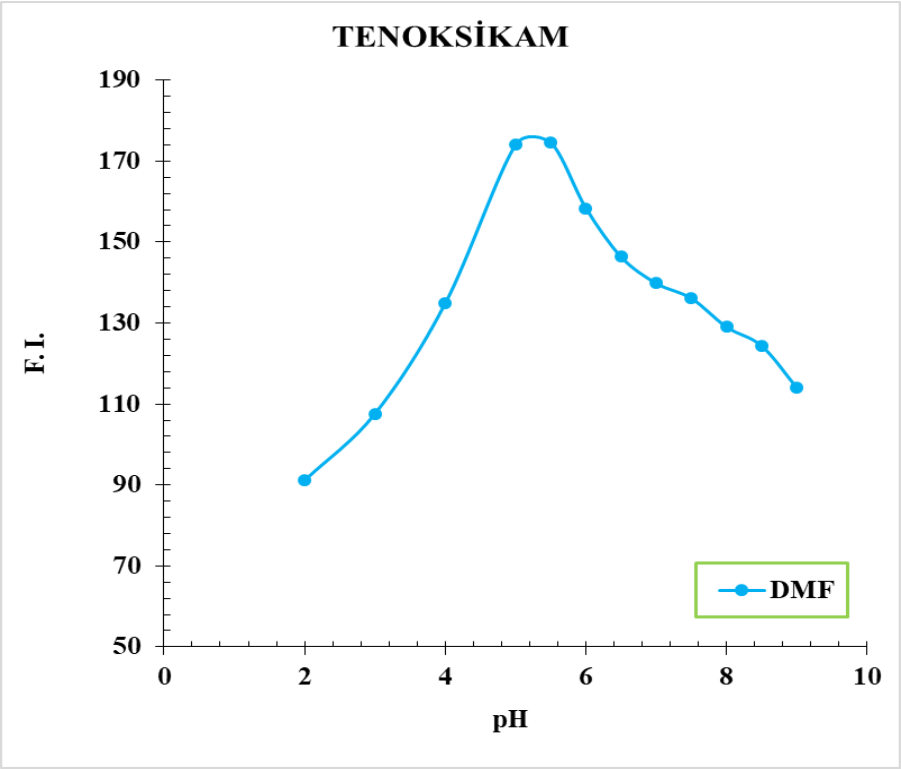
pH Değerinin metal komplekslerinin oluşumunda en önemli parametrelerden biri olmasından dolayı, PRX (Şekil 5.7), MLX (Şekil 5.8), TNX (Şekil 5.9), NPRX (Şekil 5.10) ve metal komplekslerinin (Şekil 5.11 ve Şekil5.12) en uygun çözücü ortamlarında en uygun pH değerini belirlemek amacıyla farklı pH değerlerinde (pH değeri 2-9 arasında 0.5 birim artışlarla) değiştirilerek florimetrik davranışları incelenmiştir. Bu amaçla, 2 ml ligant alınarak üzerine 1ml % 20'lik amonyum asetat, 2 ml Zn (II) çözeltisi ve 10 ml çözücü ilave edilerek bir çalışma çözeltisi hazırlanmış, pH değeri uygun değere ayarlandıktan sonra çözücü ile çözelti hacmi 20 ml'ye tamamlanmıştır. Çözelti kompleks oluşumu için uygun süre bekledikten sonra, belirlenen dalga boylarında emisyon spektrumları alınmış ve floresans şiddetleri kaydedilmiştir. Herbir ilaç etken maddesi için ölçülen floresans şiddeti değerleri pH'ya karşı grafiğe geçirilmiştir.



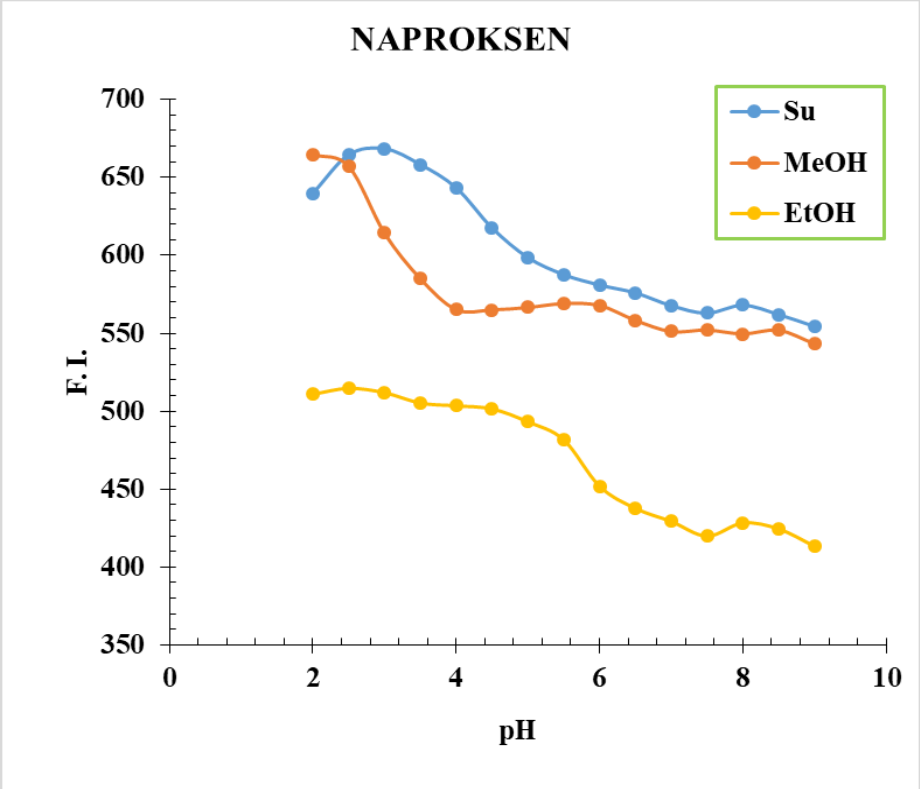
Şekil 5.8. Piroksikamın DMF'deki pH-F.I. grafiği, (λex=380 nm, λem=472 nm, [PRX]=10^{-3} M)



Şekil 5.9. Meloksikamın ACN'deki pH-F.I. grafiği, (λex=400 nm, λem=503 nm, [MLX]=10^{-3} M)



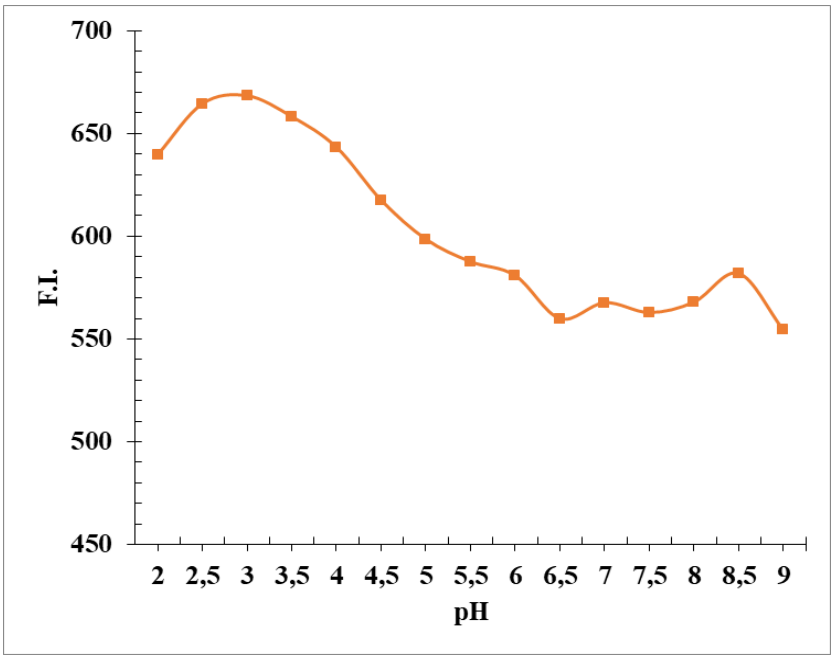
Şekil 5.10. Tenoksikamın DMF'deki pH-F.I. grafiği, (λex=332 nm, λem=448 nm, [TNX]=10^{-3} M)



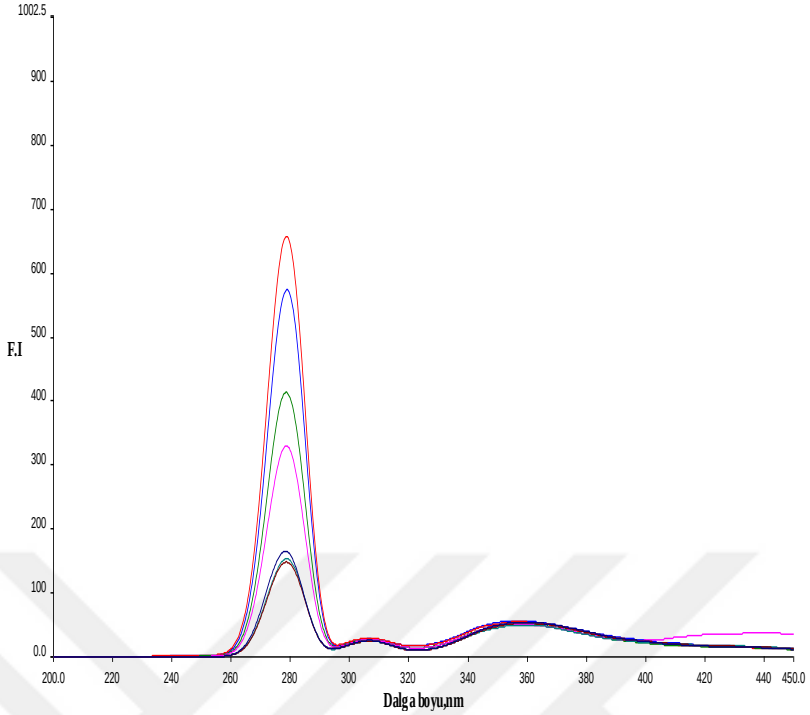
Şekil 5.11. Naproksenin farklı çözücülerdeki pH-F.I. grafikleri, (EtOH'de λex=283 nm, λem=355 nm, MeOH'de λex=272 nm, λem=356 nm ve suda λex=273 nm, λem=357 nm, [NPRX]=10^{-6} M)

Bu grafikler pH-F.I. grafikleri incelendiğinde, PRX, MLX ve NPRX'in katyonik formlarının, çalışılan bütün çözücülerde anyonik formlarınınkinden (TNX'ın DMF'deki durumu dışında) daha yüksek floresans şiddetine sahip olduğu gözlemlenmiştir. TNX'ın floresans şiddeti ise pH 2.0-5.5 arasında (katyonik form) artarken, Ph 5.5-9.0 arasında azalmıştır.

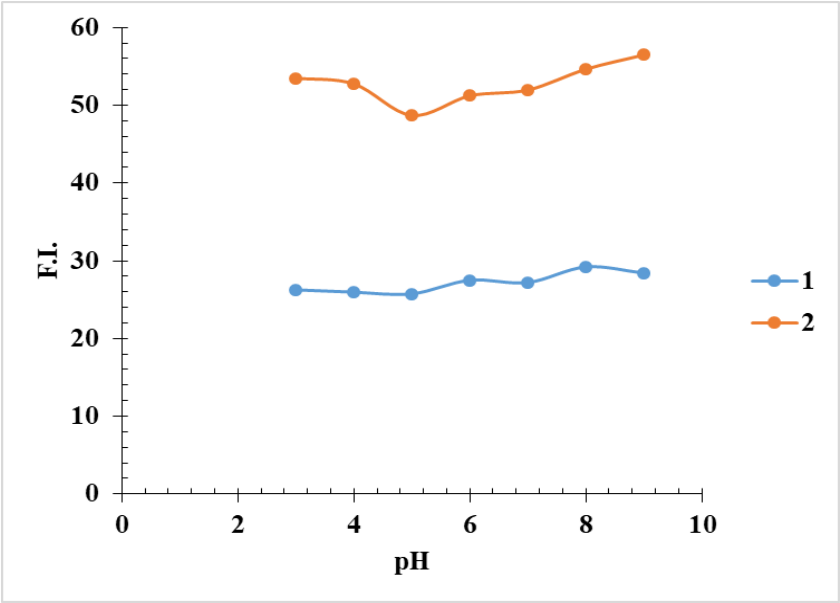
Oksikamların pH-F.I. grafiklerinden, en düşük floresans şiddetine ACN ortamında MLX'ın sahip olduğu ve en yüksek floresans şiddetine ise, EtOH, MeOH ve su ortamlarında 10^{-6} M derişimlerinde bile NPRX'in sahip olduğu gözlenmiştir. Oksikamların çalışılan çözücü ortamlarında metal iyonlarıyla etkileşimlerini incelemek amacıyla, düşük floresans şiddetine sahip olan MLX'ın floresans şiddetini arttıracak şekilde kompleks oluşturan Zn (II) iyonları ve yüksek floresans şiddetine sahip olan NPRX'in floresans şiddetini azaltacak şekilde kompleks oluşturan Fe (II) iyonları seçilmiştir. Kompleks oluşumunda en uygun pH değerinin, MLX-Zn(II kompleksi için pH=3 (Şekil 5.10), NPRX-Fe(II) kompleksi için ise pH=5 (Şekil 5.11 ve Şekil5.12) olduğu tespit edilmiştir.



Şekil 5.12. MLX-Zn(II) kompleksinin ACN ortamında pH=2-9 aralığındaki pH-F.I. grafiği, [MLX]= 10^{-4} M, [Zn^{2+}]= 10^{-4} M, λex=406 nm, λem=474 nm



Şekil 5.13. NPRX-Fe(II) kompleksinin su ortamında pH=2-9 aralığındaki emisyon spektrumları, [NPRX]= 10^{-6} M, [Fe^{2+}]= 10^{-6} M, λex=278 nm, λem=307 nm (1), λem=358 nm (2)



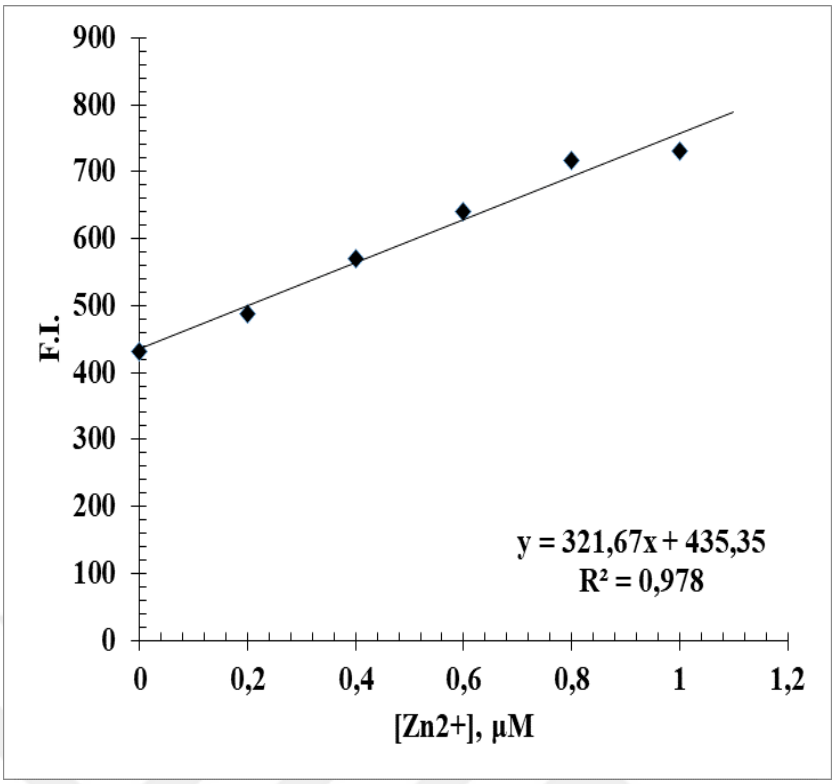
Şekil 5.14. NPRX-Fe(II) kompleksinin su ortamında pH=2-9 aralığındaki pH-F.I. grafiği, [NPRX]= 10^{-6} M, [Fe^{2+}]= 10^{-6} M, λex=278 nm, λem=307 nm (1), λem=358 nm (2)

5.4. En Uygun Sıcaklığın Belirlenmesi

Oksikamlarla metal komplekslerinin oluşumunda ortam sıcaklığı da önemli bir parametredir. MLX-Zn (II) ve NPRX-Fe(II) kompleksleri için ortamın sıcaklığı, daha uygun floresans şiddeti değerlerine sahip olduğu için fizyolojik sıcaklığa yakın olan 35.5^{o}C olarak tercih edilmiştir

5.5. Kompleksin Floresans Şiddetine Zn(II) Derişiminin Etkisinin Belirlenmesi

NPRX-Fe(II) kompleksi için yapılan pH çalışmasında, çalışılan ortamlarda ve derişimlerde emisyon spektrumlarında kararsız floresans şiddeti değerleri kaydedilmiştir. Bu nedenle kompleksin floresans şiddetine metal derişiminin etkisini belirleme çalışmalarına MLX-Zn (II) kompleksiyle devam edilmiştir. Belirlenen en uygun deney koşullarında, 35.5°C ve pH 3.0'de ACN ortamında, belirlenen uyarma ve emisyon dalga boylarında, MLX'ın farklı derişimlerdeki Zn(II) ile etkileşimlerini incelemek amacıyla, 0.1-1.0 μM derişim aralığında kalibrasyon grafiği çizilmiştir. Belirlenen en uygun koşullarda hazırlanan çözeltilerin 406 nm, uyarma dalga boyu ve 474 nm emisyon dalga boyunda (MLX'ın emisyon dalga boyu, Zn(II) ile kompleks oluşturunca 503 nm'den daha düşük dalga boyuna kaymıştır) floresans şiddetleri ölçülmüş, Zn(II) derişimine karşı grafiğe geçirilerek kalibrasyon grafiği çizilmiştir, Şekil 5.13. MLX'ın da kompleks için belirlenen uyarma ve emisyon dalga boylarında az da olsa floresans şiddetine sahip olmasından ve bu floresans şiddetinin sıfırlanmasının mümkün olmamasından dolayı kalibrasyon grafikleri sıfırdan geçmemektedir.



Şekil 5.15. MLX-Zn(II) kompleksinin kalibrasyon grafiği (Deney koşulları: [MLX] = 10^{-4} M, [Zn^{2+}] = 0.1-1.0 µM, pH=3.0, ACN ortamı, λ_{uy} = 406 nm, λ_{em} = 474 nm)

5.6. MLX-Zn(II) Kompleksi İçin Belirlenen En Uygun Koşullar

Bu tez çalışmasında yapılan deneyler sonucunda, MLX'in Zn(II) ile kompleks oluşturduğu en uygun koşullar belirlenmiş ve Çizelge 5.8' de verilmiştir.

Çizelge 5. 8. MLX-Zn(II) kompleksi için belirlenen en uygun koşullar

Uyarma dalga boyu	406 nm
Emisyon dalga boyu	474 nm
En uygun MLX konsantrasyonu	1×10^{-4} M
En uygun pH	3.0
En uygun çözücü ortamı	ACN
Kompleks oluşum sıcaklığı	35.5°C

5.7. Yöntem Validasyonu

5.7.1. Doğrusallık

MLX-Zn(II) kompleksinin kalibrasyon grafiği, Çizelge 5.8'de verilen aralıkta Zn(II) derişimi ile floresans şiddeti arasında doğrusal bir bağıntının olduğunu göstermiştir. MLX-Zn(II) kompleksine ait verilerin doğrusal regresyon denklemi aşağıdaki eşitlikle verilmiştir:

$$F = 321.67\ [Zn^{2+}] + 435.35,\ R^2 = 0.9780$$

En uygun şartlar altında MLX-Zn(II) kompleksi için doğrusallık, 0.1-1.0 μM olarak belirlenmiştir.

5.7.2. Gözlenebilme sınırı (LOD) ve alt tayin sınırı (LOQ)

MLX-Zn(II) kompleksi için geliştirilen yöntemin gözlenebilme sınırı (LOD) 0.012 μM ve alt tayin sınırı (LOQ) 0.037 μM olarak bulunmuştur. Sonuçlar Çizelge 5.9'da verilmiştir.

Çizelge 5.9. MLX ile Zn(II) etkileşiminin incelendiği florimetrik yöntemin istatistik parametreleri

Parametreler	MLX-Zn(II) Kompleksi
Doğrusal aralık (μM)	0.1-1.0
LOD (μM)	0.012
LOQ (μM)	0.037
Eğim (b)	321.67
Kayma (a)	435.35
Korelasyon katsayısı (R^2)	0.9780

5.7.3. Doğruluk ve kesinlik

MLX-Zn(II) kompleksi için geliştirilen yöntem için önemli validasyon parametrelerinden olan doğruluk ve kesinliği, numunelerin üç tekrarlı (n=3) analiziyle tayin edilmiştir. Bağıl ortalama hata (%BSS) olarak ifade edilen yöntemin doğruluğu, MLX-Zn(II) kompleksi için %2.38-12.50 aralığında bulunmuştur. Bu istatistik parametreler Çizelge 5.10'da verilmiştir.

Çizelge 5. 10. Florimetrik yöntemle MLX ve Zn(II) iyonu arasındaki etkileşimin tayini için geri kazanım çalışması.

MLX-Zn(II) Kompleksi için			
Eklenen Zn(II) iyonu (µM)	Bulunan Fe(III) iyonu (µM) ± SD [a]	Geri Kazanım (%)	BSS (%)
0.20	0.16±0.02	82	12.50
0.40	0.42±0.01	104	2.38
0.60	0.64±0.02	107	3.12
0.80	0.87±0.03	109	3.45
1.00	0.92±0.06	92	6.52

[a] Üç tayinin ortalaması ve standart sapması.

5.8. MLX'in Çinko İçerikli Tabletlerle Kompleks Oluşturması

MLX'ın Zn(II) çözeltisiyle etkileşimi bir florimetrik yöntem geliştirilerek deneysel olarak incelenmiş ve MLX'ın çinko ihtiva eden ilaçlarla reaksiyona girerek aynı kompleksi oluşturup oluşturamayacağı tayin edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla, Zn(II) numune çözeltisini hazırlamak için öncelikle 250 mL suda, 2 adet Zn(II) içeren bir ilaç olan Redoxon suda eriyen tablet çözülerek çözeltisi oluşturulmuştur. 50 mL'lik beher içerisine hazırlanan bu çözeltiden uygun miktarda alınmış ve çözeltinin asidik yapılması amacıyla HCI ile pH 2'ye ayarlanmıştır. Sıcaklığı 35.5ºC'de sabit tutulan reaksiyon hücresine 2ml 10^{-3} M MLX, 1ml %20'lik NH_4CH_3COO çözeltisi, 5ml Redoxon numune çözeltisi ilave edilmiş ve 1M HCI ile pH 3 olacak şekilde

ayarlanmıştır. Daha sonra ACN ile hacim 20 mL'ye tamamlanmış ve çözelti kompleks oluşumu için 15 dk beklenmiştir. Bu numune çözeltisinin floresans şiddeti değerleri belirlenen en uygun dalga boylarında kaydedilmiş ve çalışma kalibrasyon grafiğinden Redoxon içeriğindeki Zn(II) derişim değeri belirlenmeye çalışılmış, ancak kararsız sonuçlar elde edilmiştir. Ayrıca Redoxon içeriğindeki Zn (II) derişim değerini belirleyebilmek için, geliştirilen florimetrik yöntemle standart ekleme yöntemi de denenmiş, ancak başarılı olunamamıştır.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

6.1 Sonuçlar

Bu tez çalışmasında, pekçok metabolik reaksiyonda önemli rol oynayan ve vücutta az miktarlarda bulunan mikro element çinko mineraliyle, Oksikam türü ilaç etken maddelerinin çeşitli çözücü ortamlarında kompleks oluşturabilme özellikleri spektroflorimetrik yöntem ile incelenmiştir. MLX ile Zn(II) iyonları özellikle ACN ortamında belirlenen en uygun deney koşullarında etkileşime girerek kompleks oluşturduğu halde, diğer oksikam türü ilaç etken maddeleriyle iyi ve uygun sonuçlar alınamamıştır. Ayrıca MLX'ın Zn(II) iyonlarıyla oluşturduğu komplekse dayalı florimetrik yöntem, çinko içeren bir ilaca (Redoxon) uygulanmış, ancak uygun ve başarılı bir sonuç alınamamıştır. Bu durumda, hem fizyolojik bir çözücü ortamı olan suda ne MLX-Zn(II) kompleksinin ne de yalın halde çok düşük derişimlerde oldukça yüksek floresans şiddetine sahip olmasına rağmen NPRX ile metal iyonları arasında bir kompleks oluşturulamamış olması, hem de Redoxon içeriğindeki çinko miktarının geliştirilen florimetrik yöntemle tayin edilememiş olması sebebiyle her iki ilacın birlikte alınmasının bir zararının olmadığı sonucuna varılmıştır.

6.2 Öneriler

İlaç etken maddelerinin eser miktarlardaki metallerin tayinleri için kullanılabilecek iyi ligandlar olduğu ve bu tez çalışmasının bu alanda yapılacak çalışmalara güzel bir örnek olacağı söylenebilir. Ayrıca bu çalışmayla, çinko içerikli ilaçların Oksikam türü antienflamatuar ilaçlarla etkileşime girmedikleri için aynı anda alınmasının bir sakıncasının olmadığı gösterilmiştir.

KAYNAKLAR

Ayano, E., Nambu, K., Sakamoto, C., Kanazawa, H., Kikuchi, A. ve Okano, T., 2006, Aqueous chromatography system using pH-and temperature-responsive stationary phase with ion-exchange groups, *Journal of Chromatography A*, 1119 (1-2), 58-65.

Bernhard, E. ve Zimmermann, F., 1984, Contribution to the understanding of oxicam ionization constants, *Arzneimittel-Forschung*, 34 (6), 647-648.

Binder, D., Hromatka, O., Geissler, F., Schmied, K., Noe, C. R., Burri, K., Pfister, R., Strub, K. ve Zeller, P., 1987, Analogs and derivatives of tenoxicam. 1. Synthesis and antiinflammatory activities of analogs with different residues on the ring nitrogen and the amide nitrogen, *Journal of medicinal chemistry*, 30 (4), 678-682.

Bonina, F. P., Puglia, C., Barbuzzi, T., de Caprariis, P., Palagiano, F., Rimoli, M. G. ve Saija, A., 2001, In vitro and in vivo evaluation of polyoxyethylene esters as dermal prodrugs of ketoprofen, naproxen and diclofenac, *European journal of pharmaceutical sciences*, 14 (2), 123-134.

Bradshaw, D., Cashin, C., Kennedy, A. ve Roberts, N., 1984, Pharmacological and biochemical activities of Tenoxicam (Ro 12-0068), a new non-steroidal anti-inflammatory drug, *Agents and Actions*, 15 (5-6), 569-577.

Bury, A., Underhill, A., Kemp, D., O'shea, N., Smith, J. ve Gomm, P., 1987, Metal complexes of anti-inflammatory drugs. Part IV. Tenoxicam complexes of manganese (II), iron (III), cobalt (II), nickel (II) and copper (II), *Inorganica chimica acta*, 138 (1), 85-89.

Chakraborty, S., Bose, M. ve Sarkar, M., 2014, Spectroscopic studies of the binding of Cu(II) complexes of oxicam NSAIDs to alternating G-C and homopolymeric G-C sequences, *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 122, 690-697.

El Maghraby, G. M., 2008, Transdermal delivery of hydrocortisone from eucalyptus oil microemulsion: effects of cosurfactants, *International journal of pharmaceutics*, 355 (1-2), 285-292.

FENGCHEN GROUP CO., L., 2009, Meloksikam hammadde USP BP EP, http://tr.fengchengroup.org/pharmaceutical-api/functional-api/meloxicam-raw-material-usp-bp-ep.html:

Fenner, H., 1987, Comparative biochemical pharmacology of the oxicams, *Scandinavian Journal of Rheumatology*, 16 (sup65), 97-101.

Gonzales, J. ve Todd, P., 1987, Tenoxicam. A preliminary review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties and therapeutic efficacy, *Drugs*, 34, 289-310.

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

Gündüz, T., 2002, İnstrümental analiz, Gazi Büro Kitabevi, p.

Heintz, R., Guentert, T., Enrico, J., Dubach, U., Brandt, R. ve Jeunet, F., 1984, Pharmacokinetics of tenoxicam in healthy human volunteers, *European journal of rheumatology and inflammation*, 7 (2), 33-44.

Herzfeldt, C. ve Kümmel, R., 1983, Dissociation constants, solubilities and dissolution rates of some selected nonsteroidal antiinflammatories, *Drug development and industrial pharmacy*, 9 (5), 767-793.

Jannesari, Z., Hadadzadeh, H., Amirghofran, Z., Simpson, J., Khayamian, T. ve Maleki, B., 2015, A mononuclear zinc(II) complex with piroxicam: Crystal structure, DNA- and BSA-binding studies; in vitro cell cytotoxicity and molecular modeling of oxicam complexes, *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136, 1119-1133.

Mikami, E., Goto, T., Ohno, T., Matsumoto, H. ve Nishida, M., 2000, Simultaneous analysis of naproxen, nabumetone and its major metabolite 6-methoxy-2-naphthylacetic acid in pharmaceuticals and human urine by high-performance liquid chromatography, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 23 (5), 917-925.

Mohamed, G. G. ve El-Gamel, N. E. A., 2004, Synthesis, investigation and spectroscopic characterization of piroxicam ternary complexes of Fe(II), Fe(III), Co(II), Ni(II), Cu(II) and Zn(II) with glycine and DL-phenylalanine, *Spectrochimica Acta Part a-Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 60 (13), 3141-3154.

Monser, L. ve Darghouth, F., 2003, Simultaneous determination of naproxen and related compounds by HPLC using porous graphitic carbon column, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 32 (4-5), 1087-1092.

Rautio, J., Nevalainen, T., Taipale, H., Vepsäläinen, J., Gynther, J., Laine, K. ve Järvinen, T., 2000, Piperazinylalkyl prodrugs of naproxen improve in vitro skin permeation, *European journal of pharmaceutical sciences*, 11 (2), 157-163.

Roy, S., Banerjee, R. ve Sarkar, M., 2006, Direct binding of Cu(II)-complexes of oxicam NSAIDs with DNA backbone, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 100 (8), 1320-1331.

Samur, G., Şubat-2008 ANKARA.

Sanatkar, T. H., Hadadzadeh, H., Simpson, J. ve Jannesari, Z., 2013, The meloxicam complexes of Co(II) and Zn(II): Synthesis, crystal structures, photocleavage and in vitro DNA-binding, *Journal of Molecular Structure*, 1049, 336-344.

Sharma, P. K. ve Bhatia, S. R., 2004, Effect of anti-inflammatories on Pluronic® F127: micellar assembly, gelation and partitioning, *International journal of pharmaceutics*, 278 (2), 361-377.

Skoog, D. A., Holler, F. J. ve Nieman, T., 1998, Principles of instrumental analysis. 5th, *Thomson Learning, USA, p849*.

Tamasi, G., Serinelli, F., Consumi, M., Magnani, A., Casolaro, M. ve Cini, R., 2008, Release studies from smart hydrogels as carriers for piroxicam and copper(II)-oxicam complexes as anti-inflammatory and anti-cancer drugs. X-ray structures of new copper(II)-piroxicam and -isoxicam complex molecules, *Journal of Inorganic Biochemistry*, 102 (10), 1862-1873.

Tsai, R. S., Carrupt, P. A., Tayar, N. E., Giroud, Y., Andrade, P., Testa, B., Brée, F. ve Tillement, J. P., 1993, Physicochemical and structural properties of non- steroidal anti- inflammatory oxicams, *Helvetica chimica acta*, 76 (2), 842-854.

Zaghloul, A.-A., Hussain, A., Khan, M. A. ve Ahsan, F., 2003, Development of a HPLC method for the determination of cyclosporin-A in rat blood and plasma using naproxen as an internal standard, *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 31 (6), 1101-1107.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı : HATİCE KAÇAR ÇETİN
Uyruğu : TÜRKİYE
Doğum Yeri ve Tarihi : BOZKIR 16.12.1991
Telefon : 05075759616
Faks : --
e-mail : h.kacar1612@gmail.com

EĞİTİM

Derece		Adı, İlçe, İl	Bitirme Yılı
Lise	:	**Cumhuriyet Lisesi, Selçuklu, KONYA**	**2010**
Üniversite	:	**Selçuk Üniversitesi, Selçuklu, KONYA**	**2014**
Yüksek Lisans	:		
Doktora	:		

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	Kurum	Görevi
(08.2016-08.2017)	Özel Periyot Öğretim Kursu	Müdür
(07.2017-Halen)	Selçuklu Sınav Anadolu Lisesi	Kimya Öğretmeni

YABANCI DİLLER

İngilizce

UZMANLIK ALANI

Oksikam türü antienflamatuar ilaçların bazı metaller ile oluşturduğu komplekslerin spektroflorimetrik tayini

BİLDİRİLER

S. B. Gündüz, H. Kaçar, "The solvent and pH effect on the fluorescence properties of the anti-inflammatory agents", 4th International Türk-Pak Conference Chemical Sciences (ITPCCS 2017) Kongresi, 26-28 Ekim 2017, PP094, Konya, Türkiye.