



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI ANTİENFLAMATUAR İLAÇ ETKEN
MADDELERİNİN SPEKTROSKOPİK
YÖNTEMLERLE İYONLAŞMA
SABİTLERİNİN TAYİNİ**

Sema Melike ERDEN (GÜZEL)

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalını

2016
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

TEZ KABUL VE ONAYI

Sema Melike ERDEN (GÜZEL) tarafından hazırlanan “Bazı Antienflamatuar İlaç Etken Maddelerinin Spektroskopik Yöntemlerle İyonlaşma Sabitlerinin Tayini” adlı tez çalışması 05/05/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından oy birliği / ~~oy çokluğu~~ ile Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı’nda YÜKSEK LİSANS/DOKTORA TEZİ olarak kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri**İmza****Başkan**

Doç. Dr. Sabri ALPAYDIN

**Danışman**

Doç. Dr. S. Beniz GÜNDÜZ

**Üye**

Doç. Dr. Semahat KÜÇÜKKOLBAŞI

**Üye**

Unvanı Adı SOYADI

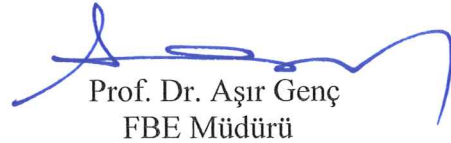
.....

Üye

Unvanı Adı SOYADI

.....

Yukarıdaki sonucu onaylarım.



Prof. Dr. Aşır Genç
FBE Müdürü

Bu tez çalışması BAP tarafından 12201035 nolu proje ile desteklenmiştir.

TEZ BİLDİRİMİ

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

DECLARATION PAGE

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

İmza

SEMA MELİKE ERDEN(GÜZEL)

Tarih:

ÖZET**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

BAZI ANTİENFLAMATUAR İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN SPEKTROSKOPIK
YÖNTEMLERLE İYONLAŞMA SABİTLERİNİN TAYİNİ

Sema Melike ERDEN (GÜZEL)

**Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya anabilim Dalı**

Danışman: Doç.Dr. S. Beniz GÜNDÜZ

Yıl, ... Sayfa (Örnek: 2016, 92 Sayfa)

Jüri

**Danışmanın Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI**

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

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

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

ABSTRACT**MS THESIS**

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

Sema Melike ERDEN (GÜZEL)

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

Advisor: Doç.Dr. S. Beniz GÜNDÜZ

2016, 92 Pages

Jury

**Advisor Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI
Diğer Üyenin Unvanı Adı SOYADI**

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

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

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

ÖNSÖZ

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

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

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

Tez çalışmamın benden sonraki arkadaşlarıma yardımcı olmasını ümit ediyorum.

Sema Melik ERDEN
Konya, 2016

İÇİNDEKİLER

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

2.3.1.1. Floresans	22
2.3.1.2 Fosforesans	23
2.3.1.3. Moleküler floresansın özellikleri	25
2.3.1.4. Rezonans floresansı	27
2.3.1.5. Stokes kayması	27
2.3.1.6. Oda sıcaklığında S ₁ halinin deaktivasyonu.....	28
a. İç dönüşüm (Işımasız durulma).....	30
b. Dissosiyasyon	31
c. Dış dönüşüm	31
d. Sistemler arası çapraz geçiş	32
e. Titreşim relaksasyonu	33
f. Çarpışmalı söndürme.....	34
g. Titreşimsel durulma	34
2.3.2. Lüminesans Spektrofotometreleri	35
2.3.2.1. Işık kaynakları.....	37
2.3.2.2. Filtreler ve Monokromatörler	38
2.3.2.3. Dedektörler	38
2.3.2.4. Hücreler ve Hücre bölmeleri.....	38
2.3.3. Floresansı Etkileyen Faktörler.....	38
2.3.3.1. Molekül yapısının etkisi.....	39
a. Konjügasyon etkisi.....	40
b. Molekülün rijitliğinin ve düzlemselliğinin etkisi.....	41
c. Moleküldeki süstitüentlerin etkisi	44
2.3.3.2. Sıcaklık	46
2.3.3.3. Çözücü etkisi.....	46
2.3.3.4. pH etkisi	46
2.3.3.5. Konsantrasyonun etkisi.....	48
2.3.3.6. Viskozite etkisi	48
2.3.3.7. Çözülmüş oksijen ve paramagnetikler	48
2.3.3.8. Gelen ışının dalga boyunun ve şiddetinin etkisi	48
3. KAYNAK ARAŞTIRMASI	50
4. METERYAL VE YÖNTEM.....	55
4.1. Kimyasal Maddeler	55

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

ŞEKİLLER LİSTESİ

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

ÇİZELGELER LİSTESİ

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



SİMGELER VE KISALTMALAR

Kısaltmalar

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

Simgeler

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

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



1.GİRİŞ

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

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

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

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

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

2.TEORİK KISIM

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

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

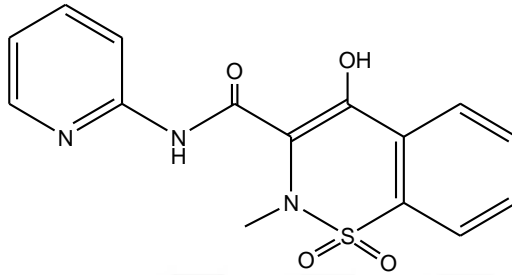
2.1.1. Oksikam türevleri

2.1.1.1. Piroksikamın fiziksel ve kimyasal özellikleri

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

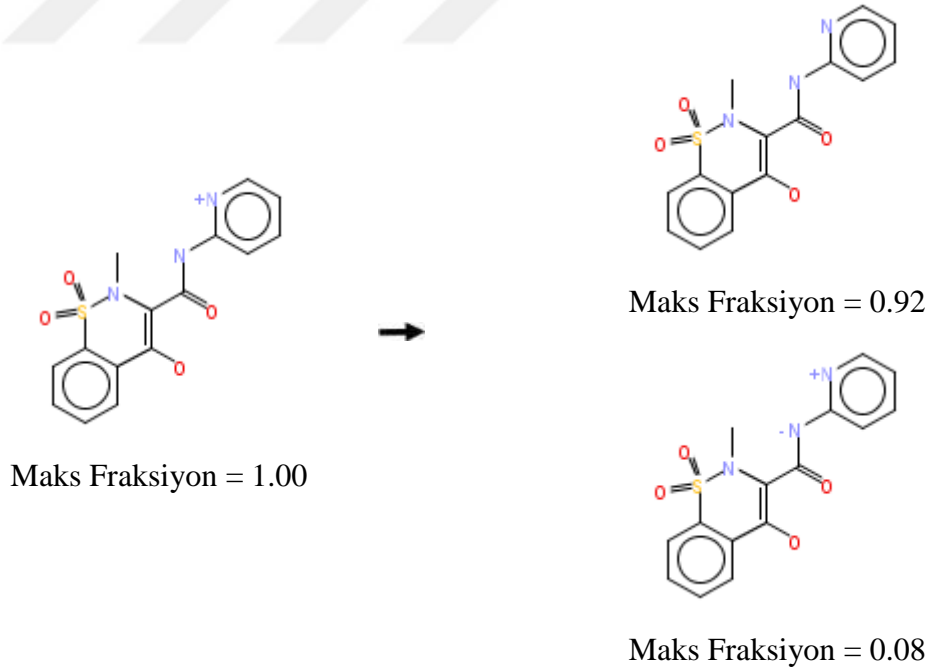
2.1.1.2. Piroksikamın Kimyasal Yapısı ve SPARC Programı İle Hesaplanan Maksimum pKa Değerleri

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



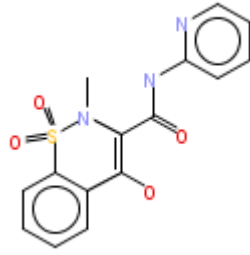
Şekil 1: 2.1. Piroksikamın açık formülü.

1. İyonlaşma reaksiyonları:

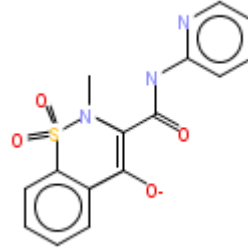


Makro pK_a= 2.20

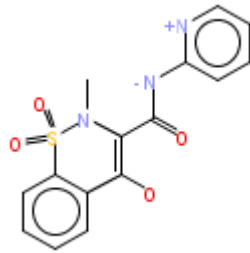
2. İyonlaşma reaksiyonları:



Maks Fraksiyon = 0.92



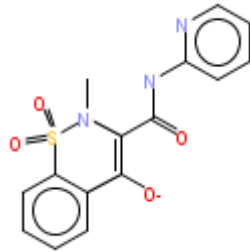
Maks Fraksiyon = 0.98



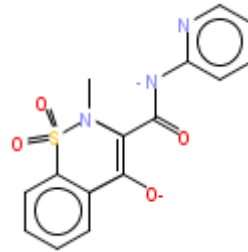
Maks Fraksiyon = 0.08

Makro pK_a = 7.72

3. İyonlaşma reaksiyonları:



Maks Fraksiyon = 0.98



Maks Fraksiyon = 0.98

Makro pK_a = 12.25

2.1.1.3. Piroksikam için miktar tayini ve tanıma yöntemleri

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

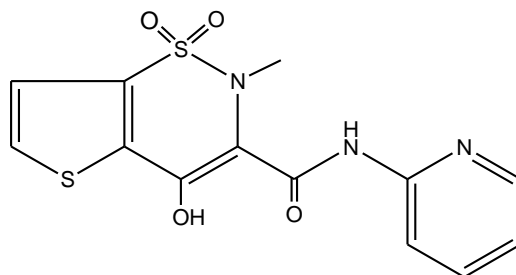
Etken maddenin saflığı ve tanınması için IR (Infra-red) spektrofotometrisi, kütle spektrofotometrisi, ince tabaka kromatografisi (TLC), yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC), renk testleri (Koppanyi-Zwicker test ve Liebermann test) yöntemleri kullanılabilir (Clarke's Isolation and identification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

2.1.1.4. Tenoksikamın Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

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

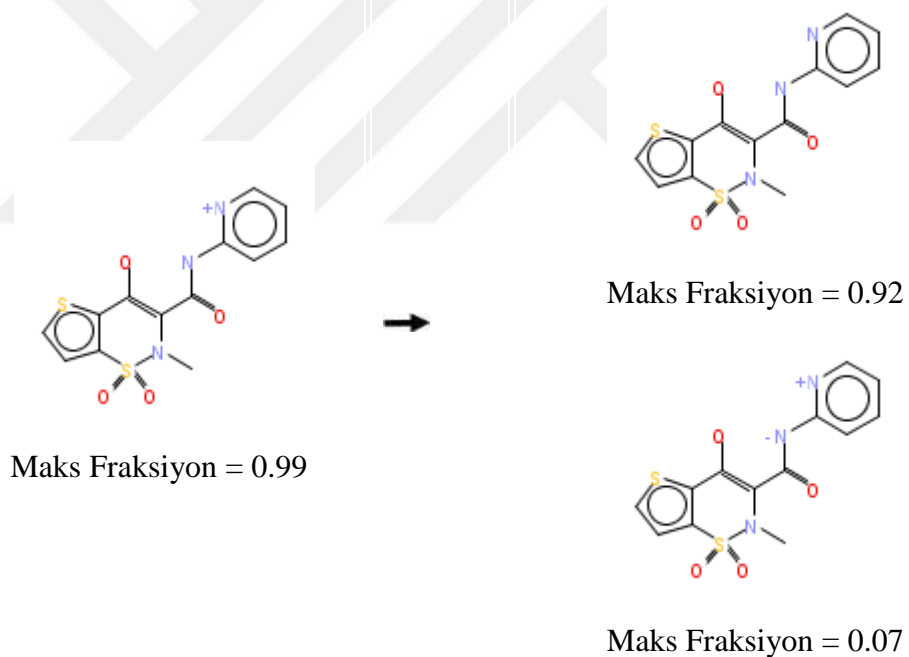
2.1.1.5. Tenoksikamın Kimyasal Yapısı ve SPARC Programı İle Hesaplanan Maksimum pKa Değerleri

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



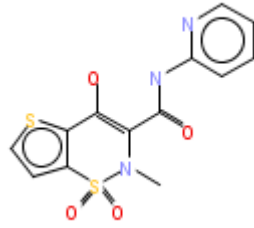
Şekil 2: 2.2. Tenoksikamın kimyasal formülü.

1. İyonlaşma reaksiyonları:

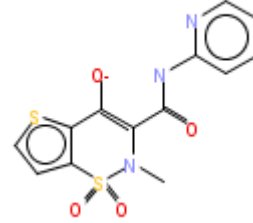


Makro $pK_a = 1.92$

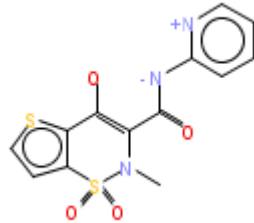
2. İyonlaşma reaksiyonları:



Maks Fraksiyon = 0.92



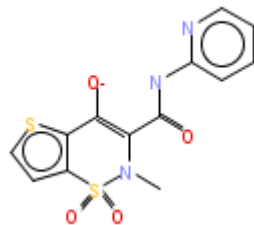
Maks Fraksiyon = 0.99



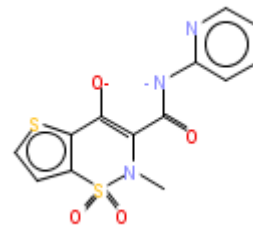
Maks Fraksiyon = 0.07

Makro pK_a = 6.62

3. İyonlaşma reaksiyonları:



Maks Fraksiyon = 0.99



Maks Fraksiyon = 0.99

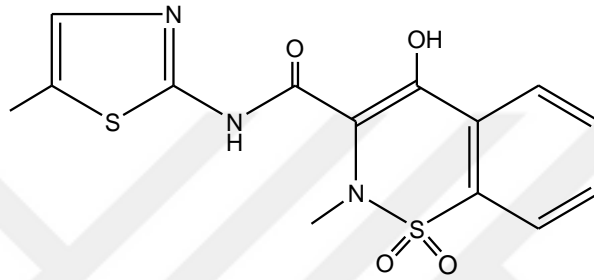
Makro pK_a = 12.01

2.1.1.6. Meloksikam

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

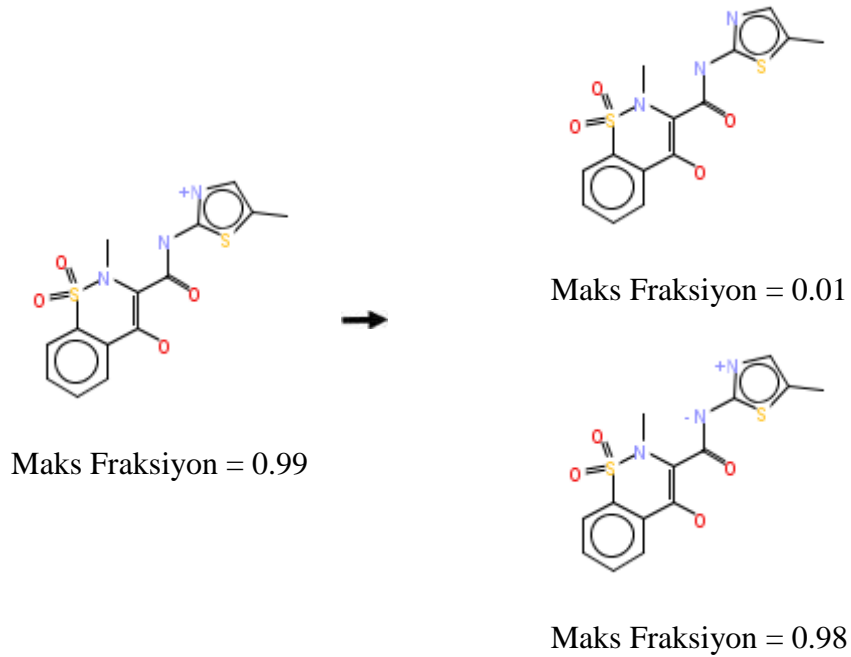
inhibe etmediği için hipertansiyona ve ödeme neden olmaz. Kardiyovasküler risk açısından oldukça güvenli bir alternatiftir. Meloksikam'ın, bazı klasik NSAE ilaçlar tarafından indüklenen trombosit agregasyonu inhibisyonu sonucu oluşan kanama zamanının uzaması üzerine etkisi yoktur.

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



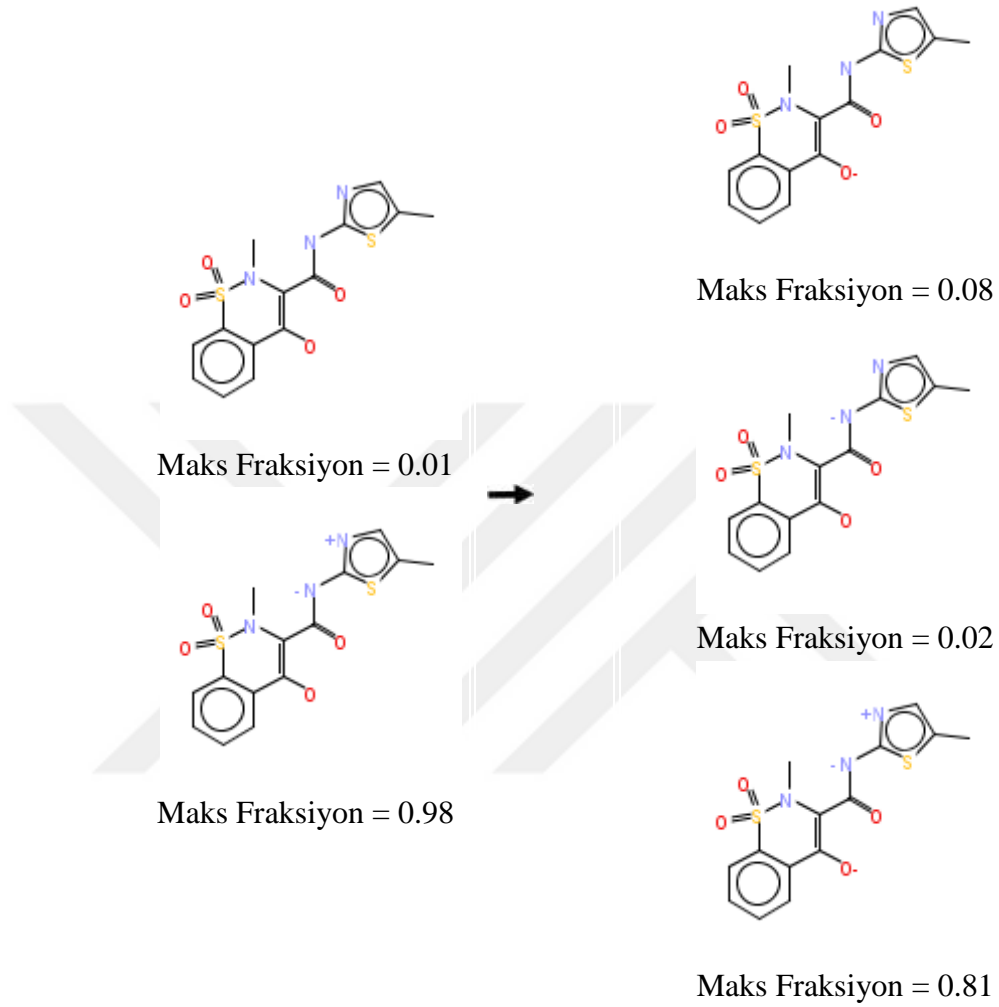
Şekil 3: 2.3. Meloksikamın kimyasal formülü

1. İyonlaşma reaksiyonları:



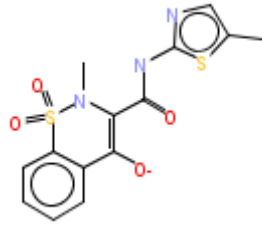
Makro pK_a = 1.91

2. İyonlaşma reaksiyonları:

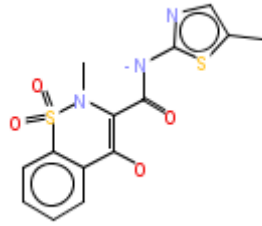


Makro $pK_a = 8.42$

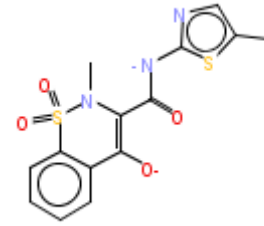
3. İyonlaşma reaksiyonları:



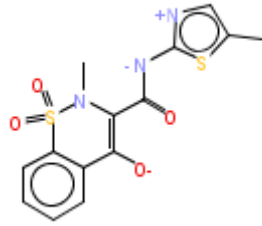
Maks Fraksiyon = 0.08



Maks Fraksiyon = 0.02



Maks Fraksiyon = 1.00



Maks Fraksiyon = 0.81

Makro pK_a = 10.97

2.2. İyonlaşma Sabiti Tayin Yöntemleri

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

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

İyonlaşma sabitlerinin tayininde;

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

2.2.1. Potansiyometrik yöntemle pKa tayini

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

Bu yöntemler,

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

b) Bu teknikte yeterli doğruluk ve kesinlikte tayin mümkündür.

c) Çalışılan bileşiklerin mutlaka saf olmaları gereklidir

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

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

f) Elektrot sistemi çalışılan ortama uygun şekilde kalibre edilmelidir.

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

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

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

2.2.2. Spektrofotometrik yöntemle pKa tayini

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

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

Moleküler absorpsiyonun uygulama alanlarından birisi, denge sabitlerinin tayinidir. Bir zayıf asitte iyonlaşan ve iyonlaşmayan türlerin kendilerine özel dalga boylarında absorpsiyon yaptığını biliyoruz. Her 2 türün de her bir dalga boyundaki

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

Bu durumda :

$$A = \epsilon_{HA} \cdot l \cdot [HA] + \epsilon_A \cdot l \cdot [A^-]$$

bağıntısı geçerlidir. Kütle denkliğini ifade edelim.

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

İlk ifadede HA yerine kütle denkliğinden gelen değerini koyalım.

$$A = \epsilon_{HA} \cdot l \cdot (C - [A^-]) + \epsilon_A \cdot l \cdot [A^-] = \epsilon_{HA} \cdot l \cdot C - \epsilon_{HA} \cdot l \cdot [A^-] + \epsilon_A \cdot l \cdot [A^-]$$

$$A = A_{HA} + l \cdot [A^-] (\epsilon_A - \epsilon_{HA})$$

$$[A^-] = \frac{A - A_{HA}}{l \cdot (\epsilon_A - \epsilon_{HA})}$$

Benzer şekilde hareketle HA için bağıntı türetilir.

$$[HA] = \frac{A - A}{l \cdot (\epsilon_A - \epsilon_{HA})}$$

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

$$K_a = \frac{[H_3O^+] \cdot [A^-]}{[HA]}$$

Spektrofotometrik titrasyonlarda en basit yaklaşım 3 çözelti ile gerçekleştirilir.

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

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

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

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

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

$\log (A - AHA) / (AA - A)$ y ekseninde ve pH, x ekseninde kullanılarak hazırlanan doğrusal grafiğin x eksenini kestiği değer, $-pK_a$ dır.

Günümüzde ise bu teorik yaklaşım bilgisayar programları ile desteklenerek kullanılmaktadır. Asitlerin pK_a değerleri su ortamına organik çözücü ilavesinde artar. pK_a değerlerinin büyümesi bir diğer deyimle asitlerin daha zayıf davranması su-organik çözücü karışımlarında dielektrik sabitindeki azalmanın bir sonucudur. Bazlarda ise protonasyon sabitlerinin organik çözücü derişiminden fazla etkilenmediği bilinmektedir. Elde edilen sonuçların güvenilirliği için 50-150 pH değerinde spektrum taraması yapılır. Sonuçların değerlendirilmesi, bu amaç için hazırlanmış bilgisayar programı ile gerçekleştirilir. Potansiyometriden daha düşük derişimde analit yeterlidir.

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

2.2.3. Florimetrik pK_a tayini

Maddenin floresans özelliği üzerine kurulmuş olan tayin metoduna florimetri veya floresans spektroskopisi denir. Floresans özelliği; maddenin gaz, sıvı ve katı

hallerinde görülebilir. En basit floresans, seyreltik atom buharları tarafından meydana getirilir. Atom veya molekülün elektronları, orbitallere spinleri ters olarak yerleşmiş ise bu hale singlet hal, orbitallerin birinde tek bir elektron varsa duplet hal, iki ayrı orbitalde spinleri birbirine paralel birer elektron varsa triplet hal ortaya çıkar.

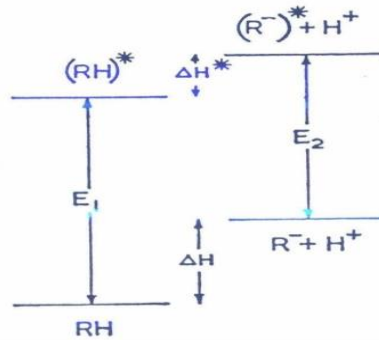
Bir molekül, absorpsiyonda 0-0 geçişlerinden hemen sonra daha az enerjiyle biraz dinlenir. Buna karşılık en aşağı enerjiyle uyarılmış hale geçer. 0-0 geçişiyle floresans emisyonundan sonra, hemen aynı relaksasyon oluşur.

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

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

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

Absorpsiyon ve emisyon bantları hiç titreşimsel bir yapı göstermediklerinde, 0-0 geçişlerinin konumunu bulmak mümkün değildir. E_s için en iyi ölçüm, yukarıdaki eşitliğin $h\nu_{\text{abs}}$ ve $h\nu_{\text{em}}$ maksimum spektrumlarından elde edildi. E_s 'nin kullanılan bu değerlerini gösteren şekildeki enerji diyagramından temel hal ile uyarılmış hal arası enerji geçişlerini bulabiliriz.



Şekil 4: 2.4. Asidik ve bazik hallerin enerji seviyeleri

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

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

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

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

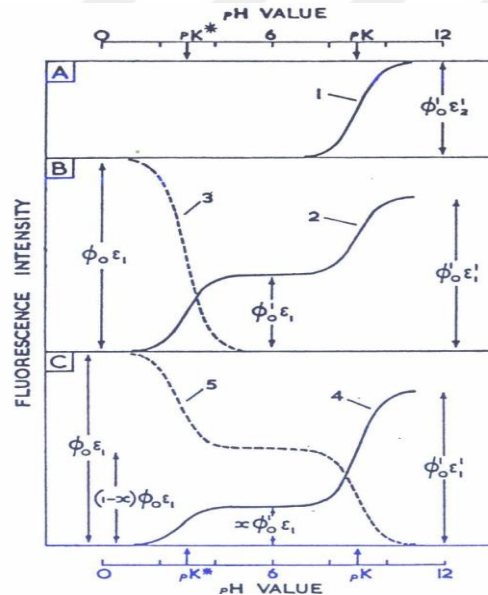
burada; Planck sabitini yerine koyar, mikrona çevirirsek;

$$6,25 \times 10^3$$

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

$$pK^* = pK - 21,4 (\Delta\nu)$$

elde edilir.



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

Şekil 6: 2.5'te verilen eğrilerin şekli;

- pK ve pK* değerlerine,
- Asitik (ϵ_1) ve bazik (ϵ_2) formun kısa dalga boyu ekzitasyonundaki sönüm katsayıları ile bazik formun uzun dalga boyu ekzitasyonundaki sönüm katsayısına (ϵ_2'),
- Uyarılan türün ömrüyle karşılaştırılarak elde edilen uyarılmış haldeki dengenin elde edilme oranına,
- Asidik ve bazik formun floresans verimlerine Φ_0 ve Φ_0' bağlıdır.

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

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

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

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

Burada; ω : enstrümental sabit, c : konsantrasyon, I_o : uyaran ışın şiddeti, Φ_o : floresans verimidir.

2.2.4. Sıvı Kromatografik Yöntemler

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

Bu yöntem ile çalışmanın bazı avantajları vardır;

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

2.2.5. Elektroforetik Yöntemler

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

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

Bu yöntem ile çalışmanın bazı avantajları vardır;

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

2.3. Spektroflorimetri

2.3.1. Moleküler lüminesans spektroskopisi

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

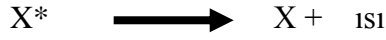


Temel hal: Bir atom veya molekülün en düşük enerjili halidir. Işının belli dalga boyları madde tarafından absorblanırsa (soğurulur, emilir) absorpsiyon denir.

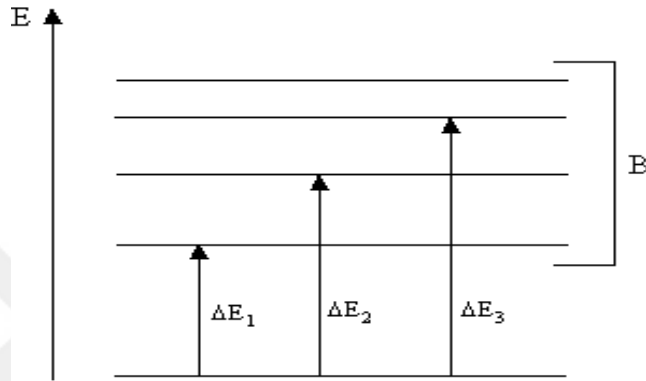
Bu enerji maddeyi (yani onu oluşturan atom veya molekülleri) uyarılmış (eksite) hale geçirir. Bir kimyasal türün ısı, elektrik veya ışın enerjisi ile temel halden üst enerji seviyesine geçmesidir.



Tanecik eski haline dönerken bu enerji geri verilir.



Uyarılmış madde temel hale dönerken ışın yaymasına emisyon,



Şekil 7: 2.6. Bir atomun uyarılmış halleri

Floresans veya fosforesansın enerjisi (hv), uyarma için kullanılan ultraviyole ışımından genellikle çok daha düşüktür. Dalga boyu enerjile ters orantılı olduğundan, floresans veya fosforesans, ultraviyolede ($>300\text{nm}$), görünür bölgede ($380\text{-}750\text{ nm}$) veya yakın infraredde bile ($<750\text{nm}$) daha uzun dalga boylarında yer alır.

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

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

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

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

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

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

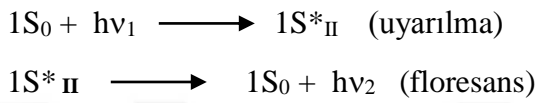
Floresans ve fosforesans, uyarılmanın fotonların absorpsiyonu ile olması bakımından benzerdirler. Bunun bir sonucu olarak, bu iki olay, sıklıkla daha genel bir terim olan fotolüminesans ile ifade edilir. Floresans, floresanstan sorumlu elektronik enerji aktarımının elektronun spininde bir değişiklik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

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

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

2.3.1.1. Floresans

Uyarılmış bir singlet sistemden temel haldeki singlet bir sisteme geçiş sırasında yayılan ışığa **floresans** ($h\nu_2$) denir.



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

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

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

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

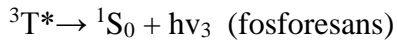
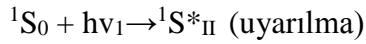
absorptivitesi ne kadar büyükse (10^4 - 10^5 gibi) ömrü o kadar kısadır. Bu gibi hallerde fosforesansın meydana gelme ihtimali çok azdır.

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

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

2.3.1.2 Fosforesans

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



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

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

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

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

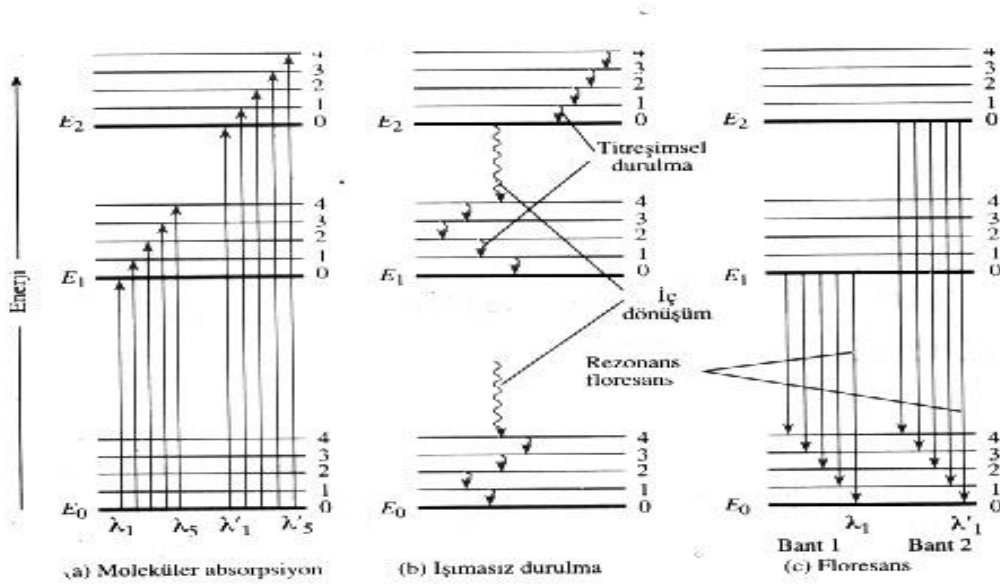
Molekül birinci uyarılmış durumdan temel hale daha önce söylendiği gibi ışımaya oluşturmada veya floresans yayarak dönebilir. Molekül birinci uyarılmış triplet durumunda ise ışığın emisyonu ile temel hale dönüş zordur. Sonuç olarak; oldukça yavaş bir emisyonla temel hale dönülür. Uyarılmadan 10^{-4}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

Floresans ışın yayan maddelerin ışın yayma ömrü, fosforesans ışın yayan maddelerin ömründen daha kısadır. Şöyleki, floresans maddelerin ışın yayma ömrü genel olarak 10^{-5} - 10^{-8} saniye olduğu halde, fosforesans maddelerinki, genel olarak 10^{-4} saniyeden çok daha fazla, dakikalar, hatta saatler sürebilir. Buna karşılık floresans kimyasal analizlerde, fosforesansa göre daha çok yaygın olarak kullanılır. Örneğin, kaydedilmiş en uzun olaya, Willemite $ZnSiO_3$ in ömrü 340 saattir. Fosforesansından dolayı özel bir örnektir. Böylece, çoğunlukla organik molekülleri kapsayan birçok fosforesant madde, ultraviyole kaynağı uzaklaştırıldığı anda gözle sezilmezken, floresans ışınması devam eden inorganik minerallerin sayısı oldukça fazladır. Maddenin floresans ışınlarını yayması genelde, madde üzerine ultraviyole ışınları gönderilmesiyle gerçekleşir. Bu nedenle, floresans ışınlarının dalga boyları yaklaşık 380-720 nm arasında değişir. Bunlar da gözle görülebilir. Ancak gözle görünen ışınlarla, uyarılan maddelerden bazılarının yaydığı ışınlar yakın infrared bölgesine kayar ve gözle görülmez. Hem floresans, hem de fosforesans metodu çok hassastır. Milyardalarla ifade edilecek kadar düşük konsantrasyonlara uygulanabilir. Ayrıca bu spektroskopilerle konsantrasyon çalışma aralıkları, absorpsiyon spektroskopisindeki konsantrasyon çalışma aralıklarından genelde daha geniştir. Bu metotların bir başka üstün yanı da daha spesifik olmalarıdır (bir maddenin tayini yapılırken, bir başka maddenin bu tayini karıştırma veya bozma ihtimalinin az olmasıdır). Buna karşılık bu metotların uygulanma alanları oldukça sınırlıdır. Zira floresans özelliği gösteren maddelerin sayıları az, fosforesans özelliği gösterenlerinkiyse, daha da azdır. Öte yandan floresans ışınları, fosforesans ışınlarından genellikle daha şiddetlidir.

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

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

2.3.1.3. Moleküler floresansın özellikleri



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

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

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

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

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

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

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

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

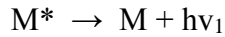
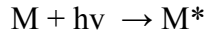
Şekil 2.7.c'de bant 1 ve bant 2'de en yüksek enerji veya en kısa dalga boylu floresansı gösteren λ_1 , λ'_1 geçişleri, aynı şeklin (a) bölümündeki λ_1 ve λ'_1 absorpsiyon geçişleri ile aynı enerjidedir. Bu çizgiler rezonans çizgileri olarak anılır, çünkü floresans ve absorpsiyon dalga boyları aynıdır.

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

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

2.3.1.4. Rezonans floresansı

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



şeklinde gösterilir. Madde önce ışın enerjisini ($h\nu$) absorplar ve uyarılmış hale (M^*) gelir. Bu halde çok kısa bir süre kaldıktan (yaşadıktan) sonra ışın enerjisi ($h\nu_1$) yayar ve eski haline veya temel haline (M) döner. Genelde $h\nu > h\nu_1$ dir. Ancak $h\nu$ 'nün $h\nu_1$ ' e eşit olduğu haller de vardır. Floresans olayında yayılan ışığın frekansı ile sistemi uyaran ışığın frekansı birbirine eşit ise buna **rezonans floresansı** denir.

Rezonans floresansı olayı:

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

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

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

2.3.1.5. Stokes kayması

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

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

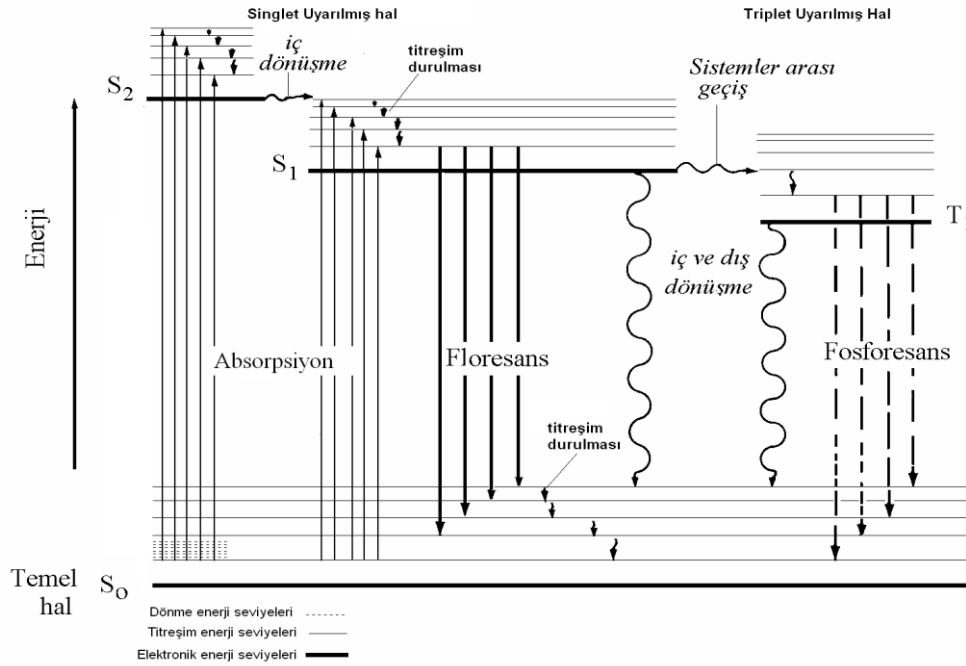
Şimdi E_2 uyarılmış halinde olup da iç dönüşüm ile E_1 elektronik haline dönen molekülleri ele alalım. Daha öncekine benzer şekilde temel hale doğru durulma ışımsız veya ışıklı yolla olabilir. Işıklı yolla durulma durumunda bant 1 türü floresans sinyalleri oluşur. Bu durumda Stokes kayması ultraviyole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

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

2.3.1.6. Oda sıcaklığında S_1 halinin deaktivasyonu

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

1. Floresans emisyonu (yayma): $1S_1^* \longrightarrow 1S_0 + h\nu$
2. İç dönüşüm: $1S_c^* \longrightarrow 1S_0 + 1S_1$
3. Sistemler arası geçiş: $1S_1^* \longrightarrow 3T^*$
4. Çarpışmalı söndürme: $1S_1^* + Q \longrightarrow 1S_0 + 1S_1$



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

Bir molekülden floresans ve fosforesans ışınların yayılma mekanizmaları.

- S₀) Temel hal ve üzerindeki titreşim seviyeleri,
- S₁) Birinci uyarılmış hal ve üzerindeki titreşim seviyeleri,
- S₂) İkinci uyarılmış hal ve üzerindeki titreşim halleri,
- A) İç geçiş,
- B) Sistemler arası geçiş,
- C) İç ve dış geçiş,
- D) Titreşim relaksasyonu.

Altta ki koyu yatay çizgi, normal olarak singlet haldeki molekülün temel hal enerjisini göstermekte olup, S₀ ile gösterilmiştir. Oda sıcaklığında, bu hal, bir çözültideki moleküllerin hemen hemen tamamının enerjisini gösterir. En üstteki koyu çizgiler, üç uyarılmış elektronik halin temel titreşim halleri için enerji seviyelerini göstermektedir. Soldaki iki çizgi, birinci (S₁) ve ikinci (S₂) elektronik singlet hallerini gösterir. Sağdaki tek çizgi (T₁) birinci elektronik triplet halinin enerjisini gösterir. Normal olarak, birinci uyarılmış triplet halin enerjisi, karşı gelen singlet halin enerjisinden daha düşüktür. Böyle titreşim seviyeleri olmayan maddelerin (genellikle metal buharı) bir başka özellikleri de, bunlarda S₁ → S₀ geçişine ilâve olarak S₂ → S₀, S₃ → S₀ gibi geçişlerinin de olmasıdır. Bu son derecede önemli bir olaydır. Böyle ilâve geçişlere moleküler floresans ve fosforesans spektroskopisinde rastlanmaz. Bir

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

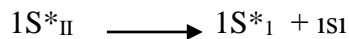
Daha ince yatay çizgilerle gösterilen çok sayıdaki titreşim enerji seviyesi, dört elektronik halin her biri ile ilişkilidir. Bu molekülün uyarılması, biri uzun dalga boyunda ($S_0 \rightarrow S_1$) ve ikincisi de daha kısa dalga boyu ($S_0 \rightarrow S_2$) civarında merkezlenmiş iki ışın bandın absorpsiyonu ile meydana gelebilir. Uyarılma işleminin, molekülün çok sayıda uyarılmış titreşim halinden herhangi birine dönüşü ile sonuçlandığına dikkat ediniz. Triplet hale doğrudan uyarılma da gösterilmemiştir. Çünkü bu işlem, multiplisitede bir değişmeyi gerektirir ve önceden de bahsedildiği gibi bu geçişin olma olasılığı düşüktür bu tip düşük olasılıkla bir geçişe **yasaklanmış** denir.

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

a. İç dönüşüm (Işımasız durulma)

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

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



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

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

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

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

b. Dissosyasyon

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

c. Dış dönüşüm

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

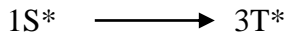
gerekir. Böyle olduğu denel olarak gösterilebilir. Şöyleki, çözelti soğutulduğu (çarpışma azaltıldığı) zaman bir maddenin fosforesansı azalır ve floresansı artar. Bu da çarpışmanın azalması demektir. Çünkü bunlar bir birine rakip olan iki olaydır. Birinin azalması, ötekinin artması anlamına gelir. Aynı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

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

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

d. Sistemler arası çapraz geçiş

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



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

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

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

e. Titreşim relaksasyonu

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

f. Çarpışmalı söndürme

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

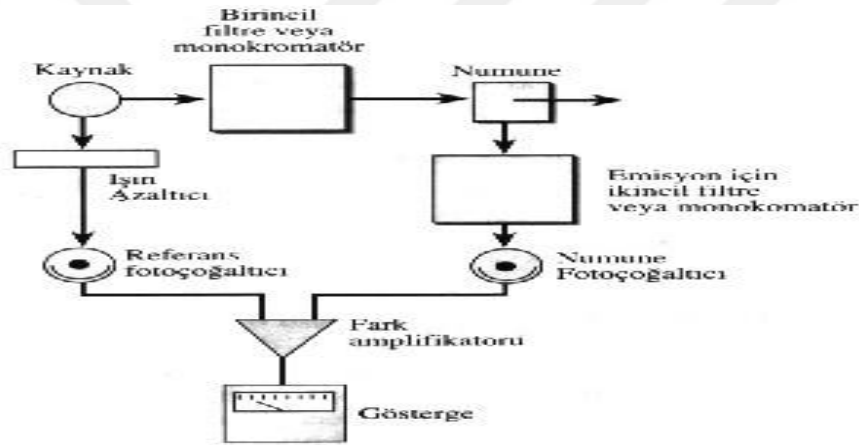
Işık absorpsiyonu için 10^{-15} s gibi çok kısa bir süre gerekir ve uyarılmış singlet halde bulunan bir molekülün ömrü 10^{-10} – 10^{-6} s, uyarılmış triplet halde bulunan bir molekülün ömrü ise 10^{-6} – 10^2 s'dir. İç dönüşüm ve sistemlerarası geçiş olaylarının süreleri ise sırasıyla yaklaşık 10^{-12}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

g. Titreşimsel durulma

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

2.3.2. Lüminesans Spektrofotometreleri

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

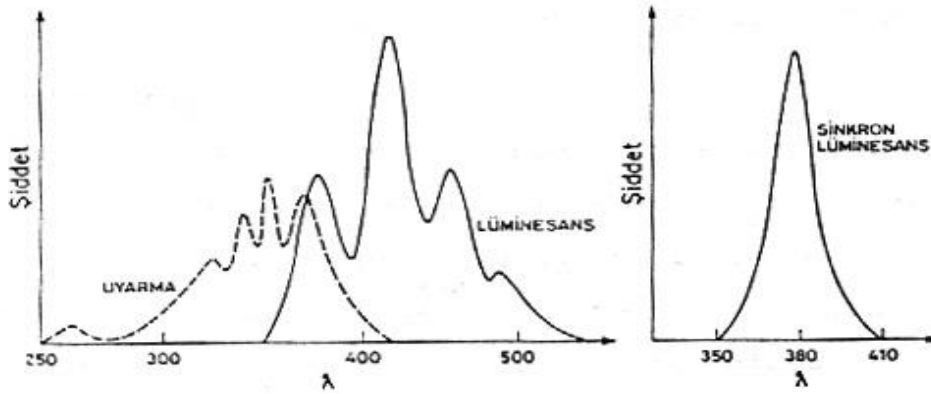


Şekil 10: 2.9. Fotolüminesans ölçümleri için kullanılan cihaz

Lüminesans ölçümü yapan aletlerin tek kanallısı olduğu gibi, çift kanallı türleri de vardır. Cıva ark lambası hat şeklinde ışık yaydığından çok filtreli aletlerde kullanılır. Ölçümlerin UV bölgesi yerine görünür bölgede yapıldığı durumlarda, tungsten lambası veya çeşitli lazerler de ışık kaynağı olarak kullanılabilir. Fotolüminesans ölçümlerinde kullanılan örnek kapları absorpsiyon ölçümleri için kullanılanların aynısıdır. 320 nm'den daha kısa dalgaboylu emisyon ölçümlerinde pireks kaplar yerine kuartz veya silika kaplar kullanılmalıdır. Fosforesans ölçümleri genellikle sıvı azot sıcaklığında (77K) yapıldığından örnek kabı azot içeren bir Dewar kabına yerleştirilir. Kullanılan Dewar kabının uyarıcı ve yayılan ışını geçiren pencereleri olması gerekir. Fotolüminesans ölçümlerinde kullanılan dedektör, fotoçöğaltıcı tür dedektördür.

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

Uyarma dalga boyu sabit tutulup, emisyon monokromatöründeki dalga boyu ayarı değiştirilirse, örnek için lüminesans spektrumu elde edilir. Lüminesans spektrumu, uyarma spektrumundan daha uzun dalga boyu bölgesindedir. Hem uyarma hem de emisyon monokromatöründeki dalga boyu ayarları aralarında belli bir dalga boyu farkı, $\Delta\lambda$, uygulanarak ve aynı hızda birlikte değiştirilerek lüminesans ölçümü yapılabilir. Bu tür spektrum elde etme yöntemine *senkron spektrofiorimetri yöntemi* denir, Şekil 2.10. Bu yöntem özellikle birden fazla floresent madde içeren karışımların nicel analizinde kullanılır. Özellikle fosforesans ölçümlerinde birden fazla bileşenin bir arada nicel analizini gerçekleştirebilecek bir başka yöntem de ışık kaynağı belli bir süre kapatıp fosforesans şiddetini zamanla azalmasını ölçmektir.



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

Işık kaynağının önüne bir ışık bölücü konarak veya ışığı örneğe pulslar halinde gönderip lüminesansı pulstan belli bir süre sonra ölçerek fosforesansın zamanla değişimi incelenebilir. İkili bir fosforesant karışımında bileşenlerden birinin fosforesansı daha çabuk sönyorsa, fosforesans kısa sürelerde her iki bileşenden, uzun sürelerde ise sadece bir bileşenden kaynaklanır.

Fotolüminesans ölçümlerinden önce, uyarma ve emisyon spektrumu ve lüminesans kuantum verimi bilinen bir madde ile (örneğin kinin sülfat çözeltisi) ölçüm

yapılarak, aletin kalibre edilmesi gerekir. Görünür bölge ve mor ötesinde lüminesans gösterdiği bilinen yaklaşık 3000 organik bileşik için kabaca tayin alt sınırı 1 ppm olarak verilmektedir (Gündüz,1995).

2.3.2.1. Işık kaynakları

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

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

2.3.2.2. Filtreler ve Monokromatörler

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

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

2.3.2.3. Dedektörler

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

2.3.2.4. Hücreler ve Hücre bölmeleri

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

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

2.3.3. Floresansı Etkileyen Faktörler

1- Molekül yapısının etkisi,

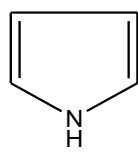
- a) Çift bağ konjügasyonunun geniş bir şekilde delokalize olmasına,
- b) Molekülün rijitliğine, düzlemsel olmasına ve
- c) Bağlı bulunan sübstitüentlere etkisi,

- 2- Sıcaklık etkisi,
- 3-Çözücü etkisi,
- 4- pH etkisi,
- 5- Konsantrasyonun etkisi,
- 6- Viskozite etkisi,
7. Çözünmüş oksijen ve paramagnetiklerin etkisi,
8. Gelen ışının dalga boyunun ve şiddetinin etkisi,
9. Floresans Üzerine Grupların Etkisi,

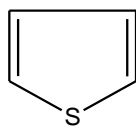
2.3.3.1. Molekül yapısının etkisi

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

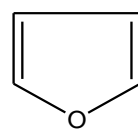
En şiddetli floresans ışınlarını yapılarında düşük enerjili $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişine imkân veren aromatik halka ihtiva eden bileşikler verir. Ayrıca yapılarında çok sayıda konjüge çifte bağ ihtiva eden alifatik ve alisiklik aromatik halkalar da floresans özellik gösterirler. Ancak, bunların sayısı aromatik bileşiklerin sayısına göre çok azdır. Bunlardan başka karbonil grubu içeren alifatik ve alisiklik bileşiklerle çok sayıda çifte bağ içeren konjüge sistemler de floresans özelliği gösterirler. Bu özellikleri aromatik halkaların kondesasyonu ile daha da artar. Piridin, tiyofen, pirol, furan gibi heterosiklik halkalar floresans özelliği göstermezler.



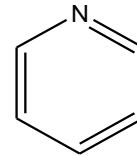
Pirol



Tiyofen



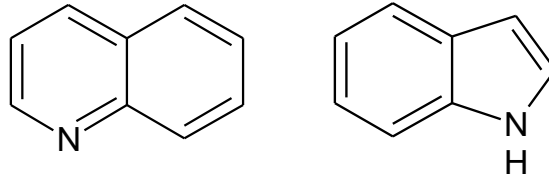
Furan



Piridin

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

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



Kinolin

İndol

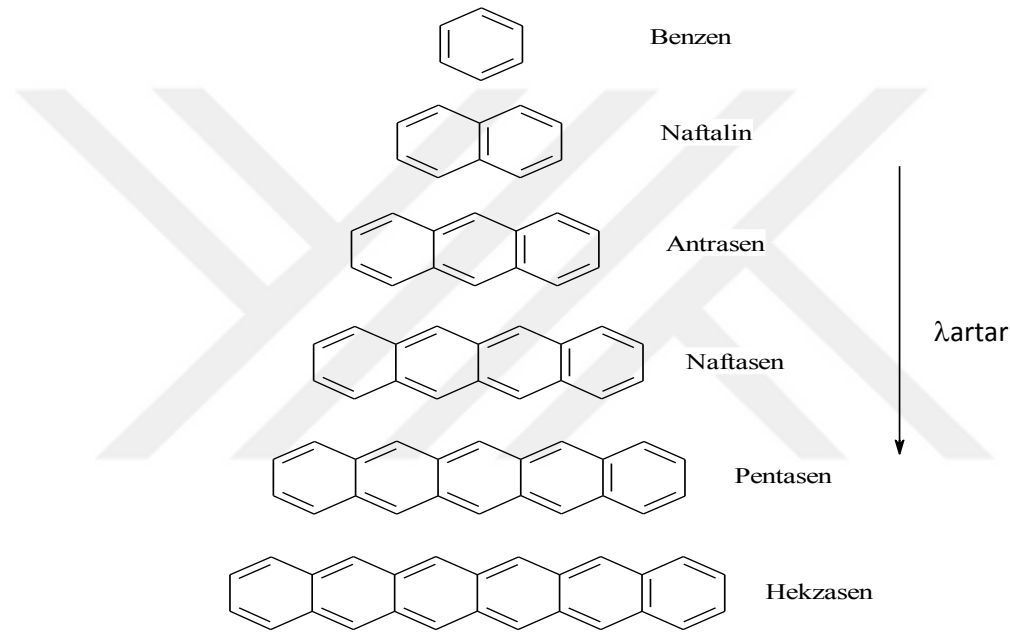
Azot içeren basit heterosiklik halkalarda $n \rightarrow \pi^*$ düşük enerjili elektronik geçişleri olduğundan, bunlarda haller arası geçiş daha kolay olur ve uyarılmış singlet hal kolayca uyarılmış triplet hale dönüşür. Triplet halden temel hale dönüş ise fosforesans yayma yoluyla olur ve fosforesansın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

a. Konjügasyon etkisi

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

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

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



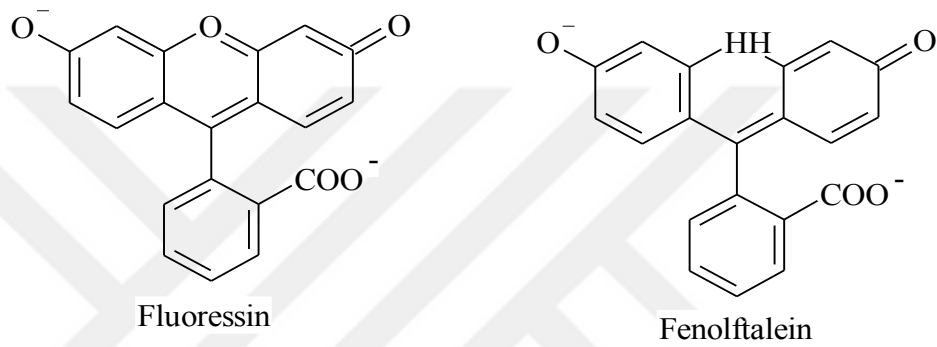
b. Molekülün rijitliğinin ve düzlemselliğinin etkisi

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

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

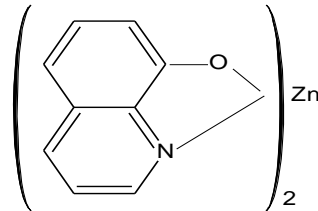
bir başka madde, lüminesans verimini önemli ölçüde azaltır. Özellikle fosforesans çalışmalarında çözünmüş oksijenin ortamdaki uzaklaştırılması gerekir. Çözünmüş oksijen genellikle floresans ışığının şiddetini azaltır. Moleküler oksijen paramagnetik olduğundan, singlet halin triplet hale dönüşmesini kolaylaştırıp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

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



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

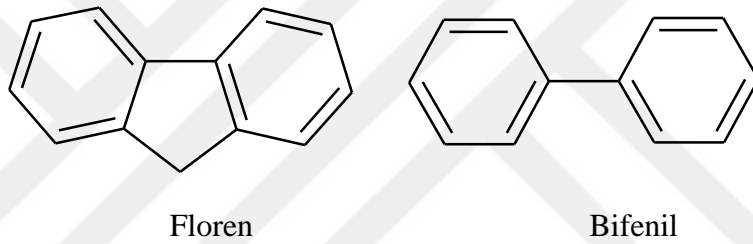
Şelat kompleksi veren bir ligand bir kationla kompleks verdiği zaman rijiditesi artar ve dolayısıyla floresans emisyonu artar. Örneğin, çinko kationuyla 8-hidroksikinolinin verdiği kompleks şiddetli floresanstır.



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

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

Yapısal rijitlik (yapısal esnemezlik) floresansı artıran bir faktördür. Bir molekülün yapısının rijid olması onun floresans özelliğini artırır. Floresans özelliği gösteren bir boya bir yüzeyde absorbe edilince emisyon şiddeti daha da artar. Bunun nedeni, boyanın tutulduğu yüzeyde rijiditesinin artmasıdır. Bu, florenle bifenilin kuvantum verimleri karşılaştırılarak gösterilebilir. Şöyleki, aynı şartlarda florenin kuvantum verimi yaklaşık %100 iken, bifenilinki 0,2 dir. Florenin floresansı, bifenilden 5 defa daha şiddetlidir. Florenle, bifenil arasındaki başlıca fark florendeki fazladan bir metilen grubudur. Bu grubun kendisinin floresans özelliği hiç yoktur. Görevi sadece iki fenil grubunun birbirine göre durumlarını tespit etmek ve molekülü daha rijit hale getirmektir.



Rijit olmayan moleküllerde iç dönüşme daha kolay olduğundan ışın yaymaksızın enerji kaybı olma ihtimali çok daha fazladır. Bu hal, bilindiği gibi floresans şiddetini azaltır. Bundan başka, rijit olmayan bir molekülün bir tarafı diğer tarafına göre daha zayıf bir enerjiyle uyarılmış olabilir. Bu da floresans verimini azaltabilir. Buna, daha başka örnekler de verilebilir. Ayrıca, böyle floresans özelliği gösteren maddeler bir katı yüzeyinde adsorbe edilirlerse, floresans özellikleri bir miktar daha artar. Bu da katı yüzeyin de maddenin rijitliğini artırdığı anlamına gelir. Yapısal rijitliğe bir başka örnek de kelatlaştırma özelliği olan biligantlardır. Örneğin, 8-hidroksi kinolinin floresans özelliği, çinko iyonu ile kompleks verdiği zaman şiddetle artar. Çünkü, kompleks içinde 8-hidroksi kinolin daha rijit bir hale gelir.

Bir molekülde rijitliğin olmaması, muhtemelen iç geçişleri kolaylaştırmakta ve dolayısıyla floresansı azaltmaktadır. Madde floresans ışınması yapmadan temel hale geçmektedir. Örneğin; Fluoresein çözelti içinde kuvvetli floresans göstermesine karşılık moleküler katılık göstermeyen fenolftaleinin böyle bir özelliği yoktur. Floressein

molekölü rijit bir yapıya sahip olduğu halde fenolftalein molekülü rijit değildir. Bu nedenle fenolftalein uyarıldığı zaman temel hale dönmek için iç dönüşümü tercih edilir.

c. Moleküldeki süstitüentlerin etkisi

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

Çizelge 1: 2.1. Benzenin floresans özelliğine süstitüentlerin 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	$C_6H_5C_3H_7$
Florobenzen	270-320	10	C_6H_5F
Klorobenzen	275-345	7	C_6H_5Cl
Bromobenzen	290-380	5	C_6H_5Br
İyodobenzen	-----	0	C_6H_5I
Fenol	285-365	18	C_6H_5OH
Fenolat	310-400	10	$C_6H_5O^-$
Anisol	285-345	20	$C_6H_5NH_2$
Anilin	310-405	20	$C_6H_5NH_2^-$
Anilinyum iyonu	-----	0	$C_6H_5NH_3^+$
Benzoik asit	310-390	3	C_6H_5COOH
Benzonitril	280-360	20	C_6H_5CN

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

Bağ yapmamış elektron çiftleri düşük enerjili ışık fotonlarıyla molekül yapısını bozmadan bir üst enerji seviyesine uyarılabilirler. Floresans verimine süstitüentlerin etkisini benzen halkası ve benzen halkasına bazı süstitüentler üzerinde incelenecek olursa, benzen halkasının süstitüsyona uğradığı hem absorpsiyon, hem de floresans bandında bir değişimin olduğu ve floresans şiddetinin de çoğu kez değiştiği görülür (Çizelge 2.1).

Lüminesent bir bileşikteki, bileşiğin (π) elektronlarını delokalize edebilen süstitüentler genellikle, uyarılmış singlet hal ve temel hal arasında oluşan muhtemel bir ışık geçişini arttırır. Bu sonuç floresansı da arttırır. Genellikle orto-para pozisyonundaki süstitüentler halkaya elektron verirler ve muhtemelen oluşacak floresansı arttırırlar. Meta- pozisyonundaki süstitüentler halkadan elektron çekerler ve muhtemel floresansı azaltırlar. Aromatik bileşiklerin floresansına bilinen bazı süstitüentlerin etkileri Çizelge 2,3’de verilmiştir.

Çizelge 2: 2.3. Emisyon dalga boyu ve floresans şiddetine süstitüent etkilerinin listesi.

Süstitüent	Dalga Boyuna Etkisi	Işın şiddetine etkisi
Alkil	Etkilemez	Önemsiz ölçüde artar
COOH,CHO,COOR,CRO	Artar	Azalıır
OH,OMe,OEt	Artar	Artar
CN	Etkilemez	Artar
NH ₂ ,NHR,NR ₂	Artar	Artar
NO ₂ ,NO	Büyük ölçüde artar	Büyük ölçüde artar veya tam söndürme (quenching)
SH	Artar	Azalıır
SO ₃ H	Etkilemez	Etkilemez
F,Cl,Br,I	Artar	Azalıır

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

bulunan bir ağır atom (I veya Br gibi) molekülün floresans verimini azaltır, triplet oluşumu verimini artırır ve bu nedenle genellikle fosforesans verimi artar.

2.3.3.2. Sıcaklık

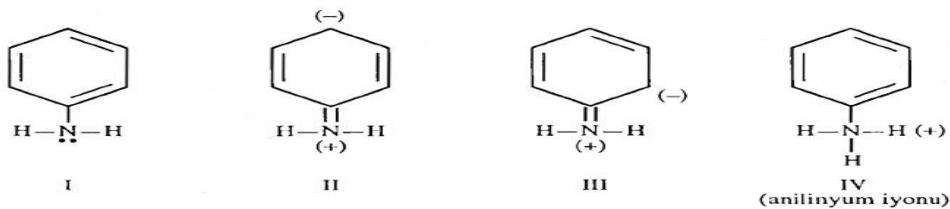
Sıcaklığın yükselmesi çarpışmayı artırdığı ve iç dönüşümü kolaylaştırdığı için floresans ışınması azalır.

2.3.3.3. Çözücü etkisi

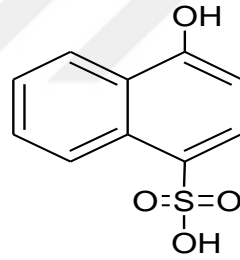
Kullanılan çözücüler floresans şiddetinin veya floresansın görüldüğü dalga boyunun değişmesine neden olabilir. Çözücünün genellikle uyarılmış durumundaki moleküller ile H bağı oluşturması temel hale ışınmasız dönüş işleminin hızını arttırdığından floresansın şiddetinde azaltma olur. Çözücünün polarlığının artması da floresansı etkiler. Çünkü, polar çözücüler $n \rightarrow \pi^*$ geçişlerinde enerji farkını genellikle artırarak floresans ışınmasını azaltır. Bazı hallerde $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişinin enerjisi $n \rightarrow \pi^*$ geçişininkinin altına bile düşer. Çözücünün viskozitesinin düşmesi de çarpışmayı kolaylaştırdığından floresans ışınmasını azaltır. İçinde ağır atomlar içeren çözücüler, örneğin, karbontetraklorür ve etilyodür, floresans ışınmasının şiddetini azaltır. Ağır atomlar floresant madde üzerinde olduğu zaman da aynı özelliği gösterirler. Atom numarası arttıkça spin ve toplam orbital momentleri arasındaki etkileşimler büyür ve uyarılmış triplet hale dönüşmesi olasılığı artar. Triplet hal fosforesansı artırır, floresansı azaltır.

2.3.3.4. pH etkisi

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



Asidik veya bazik bir süstitüent ihtiva eden aromatik bir maddenin floresansı ortamın pH'na bağlıdır. Böyle maddelerin iyonlaşmış ve iyonlaşmamış (molekül) hallerinin hem floresans şiddetleri, hem de yaydıkları floresan ışınların dalga boyları birbirinden farklıdır. Bunlara anilin ve fenolün molekül ve iyon halleri örnek verilebilir. Anilin, nötral ve bazik ortamda ultraviyole ve görünür alan floresansı yayar. Viyole floresans maddenin molekül halinden (I), görünür alandaki floresans ise, maddenin rezonans hallerinden (II ve III) ileri gelir. Bu II ve III halleri uyarmak, daha uzun dalga boylu ışınlarla gerçekleşir. Buna karşılık anilinyum iyonu floresans vermez veya çok az verir. Anilinyumun rezonansı, benzenin rezonansı kadardır. Benzen ise bildiği gibi çok zayıf floresans verir. Bu nedenle kantitatif amaçlar için kullanılamaz. Bu olay, asit ve baz indikatörlerinin pH ile değişmesine benzer, bundan yararlanarak renkli çözeltilerin titre edilmeleri teklif edilmiştir. Örneğin, 1-naftol-4-sülfonik asidin fenolik halinin (sadece sülfonik asit grubundaki protonun verilmiş hali) floresansı, ultraviyole bölgesinde olduğundan gözle görülemez. Buna karşılık fenolat halinin (fenol protonu da verilmiş) floresansı gözle görülebilir. Bu değişme çok küçük bir pH aralığında gerçekleşir. Bu özelliğinden yararlanılarak madde ayarlı bir bazla titre edilebilir.



1-Naftol-4-sulfonik asit.

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

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

2.3.3.5. Konsantrasyonun etkisi

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

2.3.3.6. Viskozite etkisi

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

2.3.3.7. Çözünmüş oksijen ve paramagnetikler

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

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

2.3.3.8. Gelen ışının dalga boyunun ve şiddetinin etkisi

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

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

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



3. KAYNAK ARAŞTIRMASI

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

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

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

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

Horria A. Mohamed ve arkadaşlarının 2001 yılında “Bazı metal iyonlarıyla tenoksikamın kompleksleşmesi üzerindeki potansiyometrik ve spektrofotometrik çalışmalar” adlı makalesi yayınlanmıştır. Bu çalışmada, Fe(III), Bi(III), Sb(III), Cr(III), Cd(II) ve Al(III) gibi altı metal iyonu ile tenoksikamın etkileşimi potansiyometrik ve florimetrik metotlar kullanılarak incelenmiştir. Potansiyometrik metotdaki ligandın iyonlaşma sabiti ve komplekslerin oluşan denge sabitleri 25 ± 0.1 °C’de, tabloya geçirilmiştir. NaNO_3 ’ün % 50 (v/v) sulu asetonitril çözeltisindeki iyon şiddeti, 0.05 mol dm^{-3} olarak bulunmuştur. 1:1, 1:2 ve 1:3 kompleksleri metalin liganda oranı ile oluşmaktadır. Metal iyonları varlığında ve yokluğunda tenoksikamın floresansına çalışılmıştır. İlaç florimetrik olarak 0.5 M HNO_3 ’de 450 nm’ nin emisyon dalga boyunda (350 nm’ de uyarma) tayin edilebilmektedir. Doğrusal aralık, Al(III) yokluğunda 0.040–0.2 µg/ml, Al(III) varlığında ise 0.016–0.1 µg/ml dir. Tenoksikam fitil enjeksiyon ve tablette önerilen bir yöntem ile tespit edilmiştir. Geri kazanma yüzdesi % 98.16’ dan % 102.22’ ye ulaşmıştır. Ayrıca bu çalışmada tenoksikamın geri kazanımı üzerinde 2-aminopridinin etkisi de incelenmiştir.

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

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

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

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

plazmadaki 20 ng ml⁻¹ düzeyindeki tenoksikamın ölçülebilmesi için sundukları yöntemin uygun olduğunu savunmaktadırlar.

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

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

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

ve etkinliğinin modifiye edilerek arttırılabileceği öne sürülmektedir. Bu amaçla, karbon pastası içerisinde laurik asit, stearik asit gibi yağ asitleri karıştırılarak elektrotların hazırlandığı belirtilmektedir. Uygun bir süre ve potansiyelde elektrotların yüzeyine önderiştirme tekniği uygulanmış ve süre sonunda voltamogramlar kaydedilmiştir. Piroksikam ve tenoksikamın siklik voltametik davranışlarının birbirine benzediği gösterilmiştir. Yöntem idrarda düşük derişimlerde bulunabilecek pirosikam ve tenoksikam için de uygulanmıştır. Yüksek adsorpsiyon ve seçicilik özelliğinden dolayı, idrar gibi karmaşık ortamlarda bile kullanabilmek amacı ile laurik asit ile modifiye edilmiş karbon pasta elektrot kullanılmıştır. Ürik asitin varlığı çalışmaları etkilememiş, oysa askorbik asitin varlığı girişimlere neden olmuştur. Bu sorunun da ortam değiştirme tekniği kullanılarak çözülebileceği belirtilmektedir. 1×10^{-7} M tenoksikam derişiminin tayin edilebileceği, yöntemin biyolojik sıvılardaki tayinler için uygun bir yöntem olduğu öne sürülmüştür.

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

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

4. METERYAL VE YÖNTEM

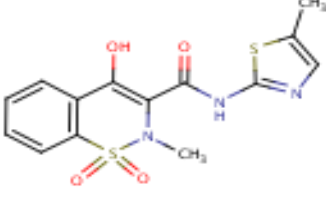
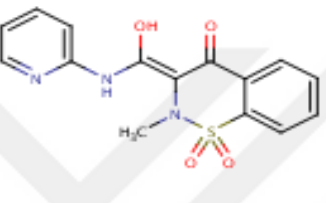
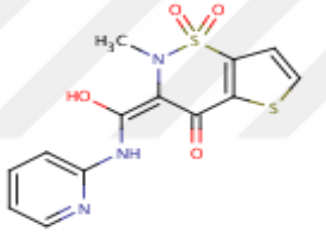
Bu tez çalışması kapsamında öncelikle NSAİİ'lerin organik çözücü-su ortamlarında florimetrik parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Florimetrik parametrelerin belirlenmesi için, öncelikle saf asetonitril, metanol, DMF, THF ve su içerisinde, daha sonra %10 - %50 organik çözücü su karışımlarında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

4.1. Kimyasal Maddeler

4.1.1. Non-Steroidal Antienflamatuarlar (Oksikamlar)

Bu çalışmada kullanılan NSAİİ'lerin (oksikamların) CAS numaraları, bileşimin formülü, moleköl ağırlıkları ve açık formülleri ile Çizelge 4.1. 'de verilmiştir.

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

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

4.1.2. Kullanılan çözücüler

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

Çizelge 4: 4.2. Kullanılan çözücülerin özellikleri ve solvatokromik parametreleri

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

D = Çözücünün dielektrik sabiti (20-25°C)

μ = Çözücünün dipol momenti (debye biriminde)

η = Çözücünün viskozitesi (centipoise biriminde)

DN = Gutman'ın donör sayısı

AN =Gutman-Mayer akseptör sayısı

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

β = Kamlet-Taft Lewis-bazlık parametresi

π^* =Kamlet-Taft polarlık /polarizlenebilirlik parametresi

4.1.3. Non-Steroidall Antienflamatuar (Oksikam) çözeltilerinin hazırlanması

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

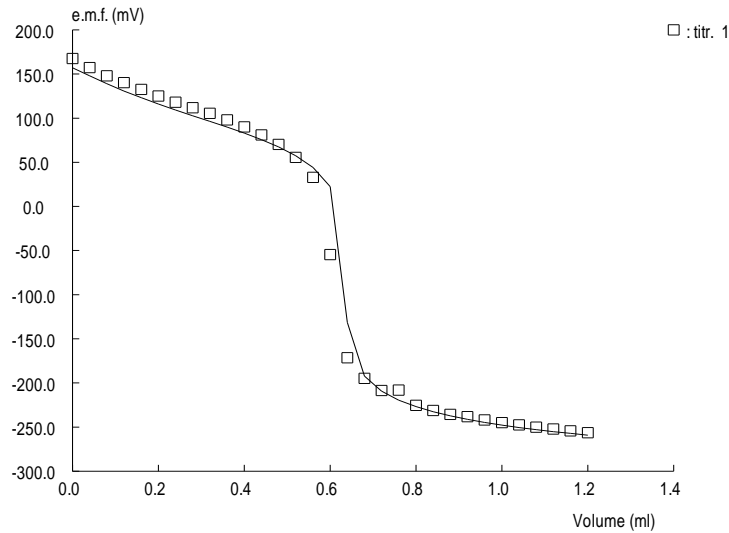
4.1.4. Titrant çözeltilisinin hazırlanması

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

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

4.1.4.1. Titrant baz çözeltisinin ayarlanması

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

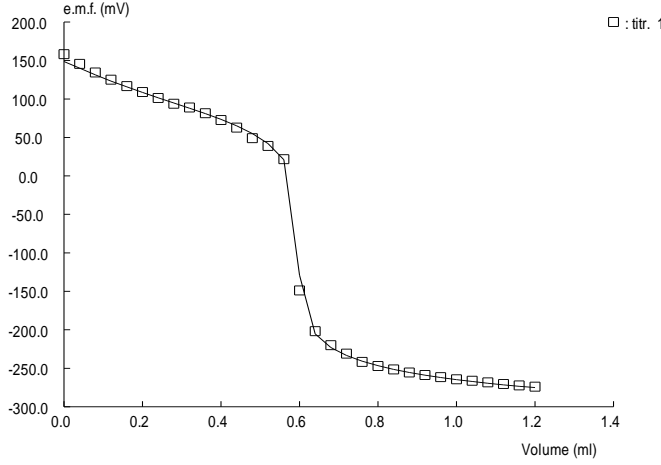


Şekil 12: 4.1. 0.1 M KOH çözeltisinin %10 asetonitril-su ortamında potasyum asit ftalat ile ayarlanmasına ait PKPOT programında çizilen titrasyon grafiği

4.1.4.2. Titrant asit çözeltisinin ayarlanması

KHP ile ayarlanan 0,1 M’lık KOH kullanılarak, 1.0M’lık Titrisol HCl çözeltisi ayarlanmıştır. Ortamın iyonik şiddetini dengede tutmak amacıyla 2mL KCl ilave edildi. % 10 asetonitril-su ortamı için 2mL, % 20 asetonitril-su ortamı için 4ml, % 30 asetonitril-su ortamı için 6mL, % 40 asetonitril-su ortamı için 8 mL asetonitril tüpe ilave edildi. Toplam hacmin 20mL olması için 16mL saf su ilave edildi. Hazırlanan 0.1

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



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

4.3. Kullanılan Cihazlar

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

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

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

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

4.4. Deneysel Yöntem

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



Şekil 14: 4.3. Oksikamların titrasyonunda kullanılan deney düzeneği.

5. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

5.1. Oksikamların Spektroflorimetrik Özelliklerinin Belirlenmesi

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

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

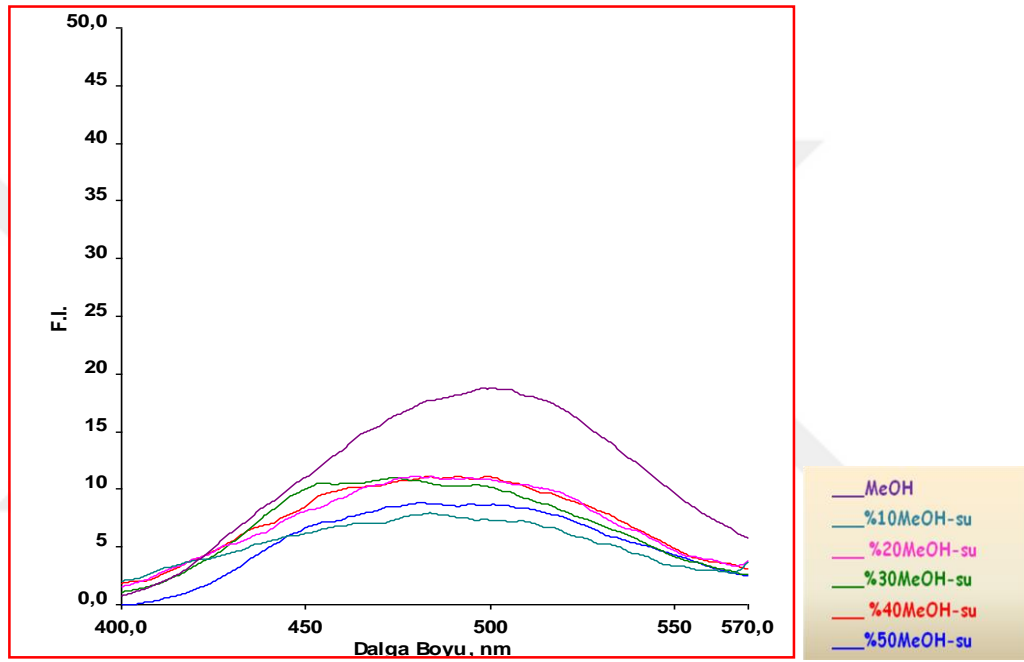
Çizelge 5: 5.1. Oksikamların, asetonitril, metanol, DMF, THF ve su ortamlarında çözünme durumu.

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

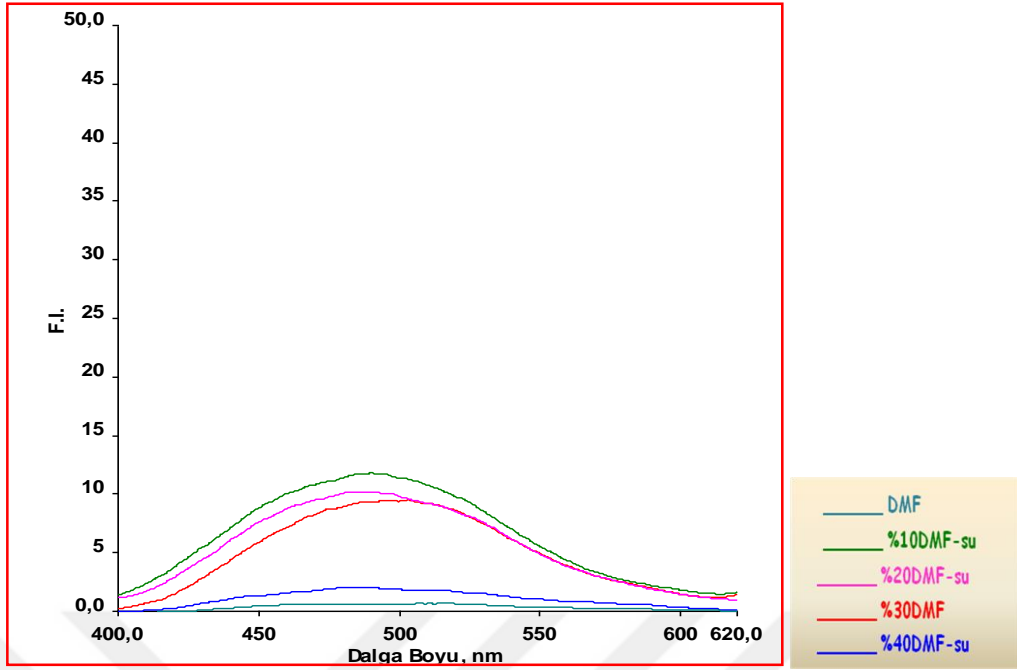
Oksikamların organik çözücü-su ortamlarında florimetrik parametrelerinin belirlenmesi için, öncelikle saf asetonitril, metanol, DMF, THF ve su içerisinde, daha sonra %10-50 organik çözücü su karışımlarında uygun derişimlerdeki çözeltileri hazırlanarak, uyarma dalga boyları 10' ar nm aralıklarla değiştirilip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

5.1.1. Meloksikamın emisyon spektrumları

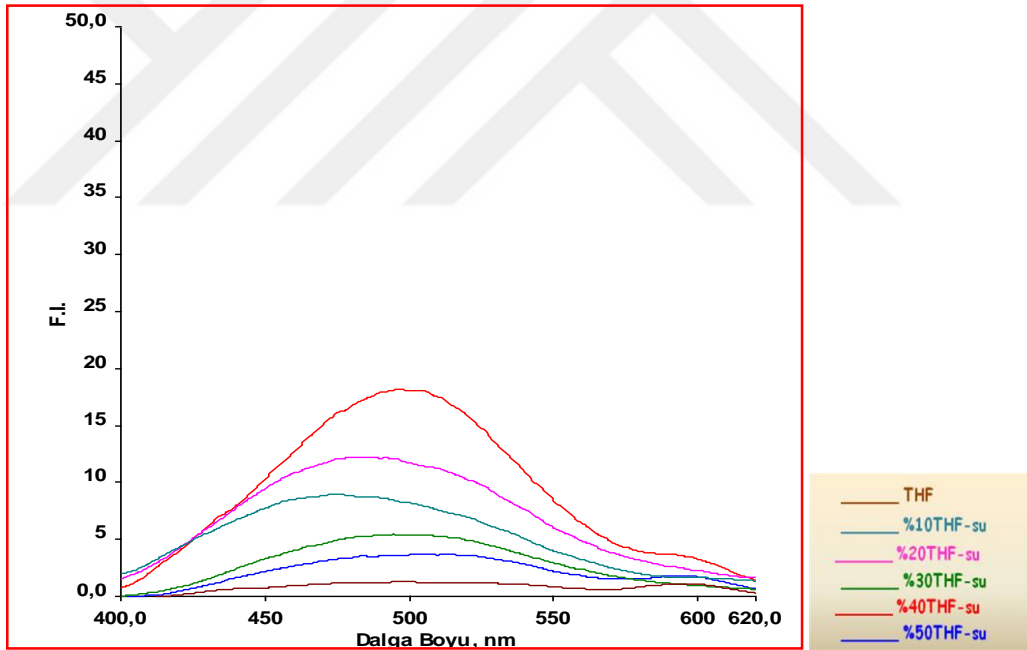
Meloksikamın %10-%50 metanol, DMF ve THF içeren su ortamlarında hazırlanan 10^{-4} M'lık çözeltilerinin, çoklu spektrum taramalarıyla belirlenen en uygun uyarma dalga boyunda emisyon spektrumları alınmış ve aynı dalga boyunda alınan çözücüye ait emisyon spektrumu ile karşılaştırılmıştır.



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



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



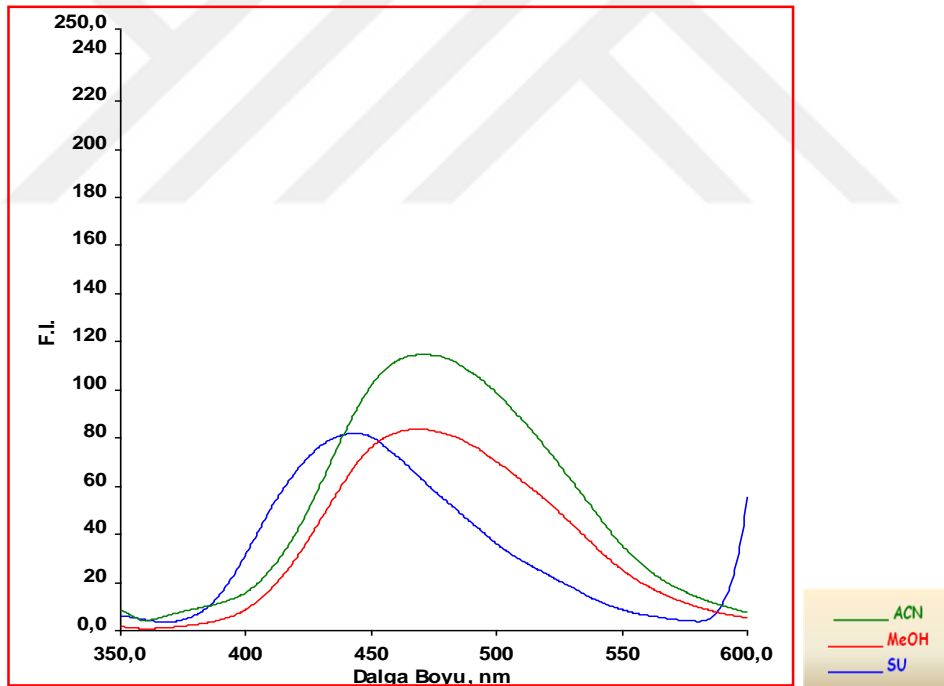
Şekil 17: 5.3. Meloksikamın %10-%50 THF-Su ortamlarındaki emisyon spektrumları ($\lambda_{ekz}=398\text{ nm}$)

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

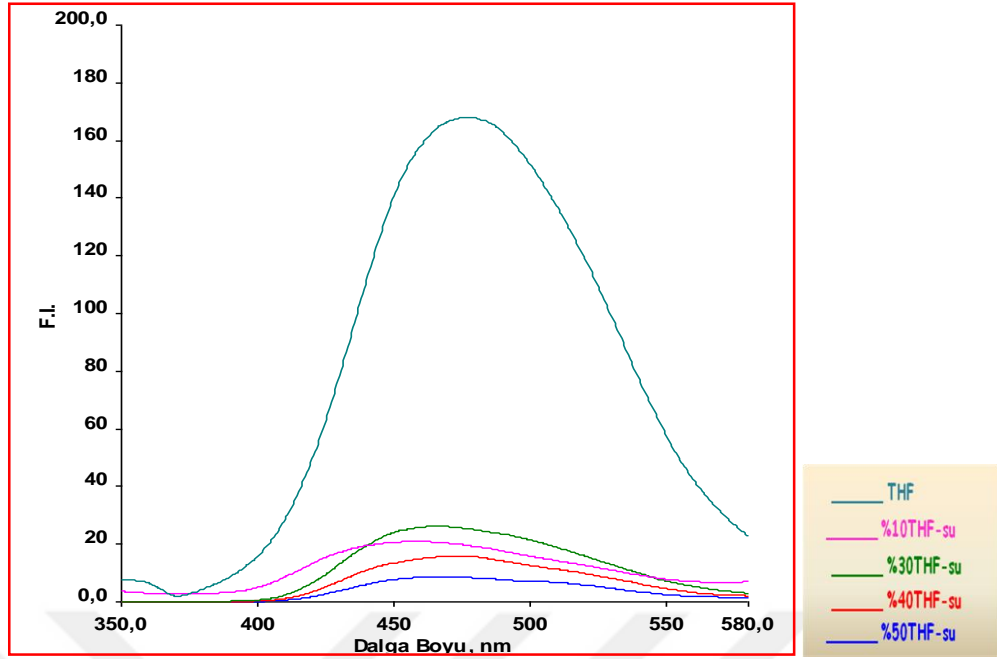
maddenin polaritesine yakın olması sebebiyle oldukça iyi çözüldüğü ve bu ortamların maddenin floresans şiddetini arttırdığı şeklinde yorumlanabilir. Meloksikamın %10-%50 metanol içeren sulu çözücü ortamlarındaki emisyon spektrumlarının, saf metanoldeki emisyon spektrumunun altında kaldığı gözlenmiştir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

5.1.2. Piroksikamın emisyon spektrumları

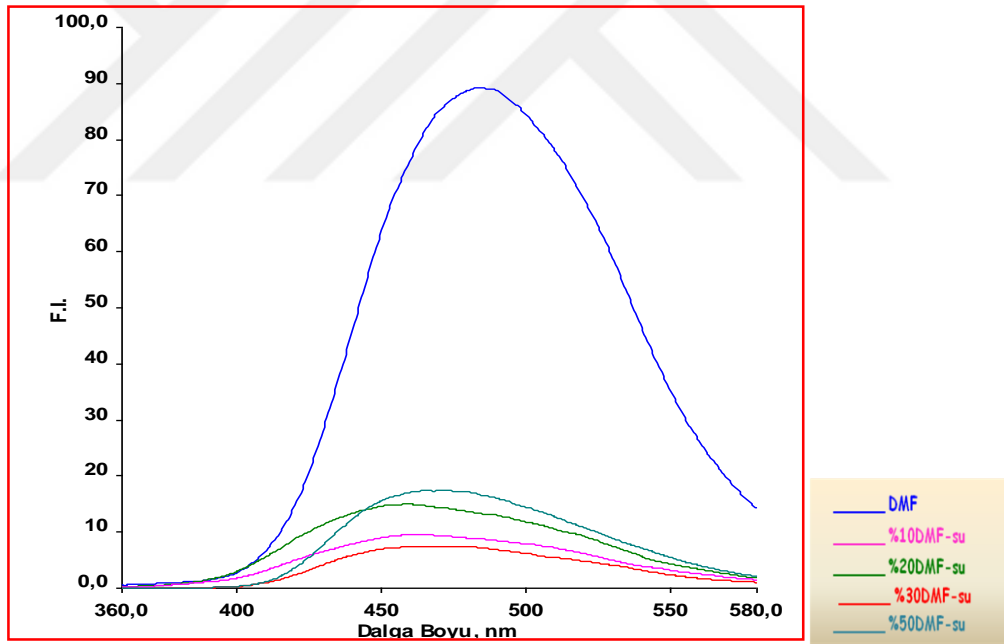
Piroksikamın asetonitril, metanol, su, %10-%50 DMF ve THF içeren su ortamlarında hazırlanan 10^{-4} M'lık çözeltilerinin, çoklu spektrum taramalarıyla belirlenen en uygun uyarma dalga boyunda emisyon spektrumları alınmış ve aynı dalga boyunda alınan çözücüye ait emisyon spektrumu ile karşılaştırılmıştır.



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



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



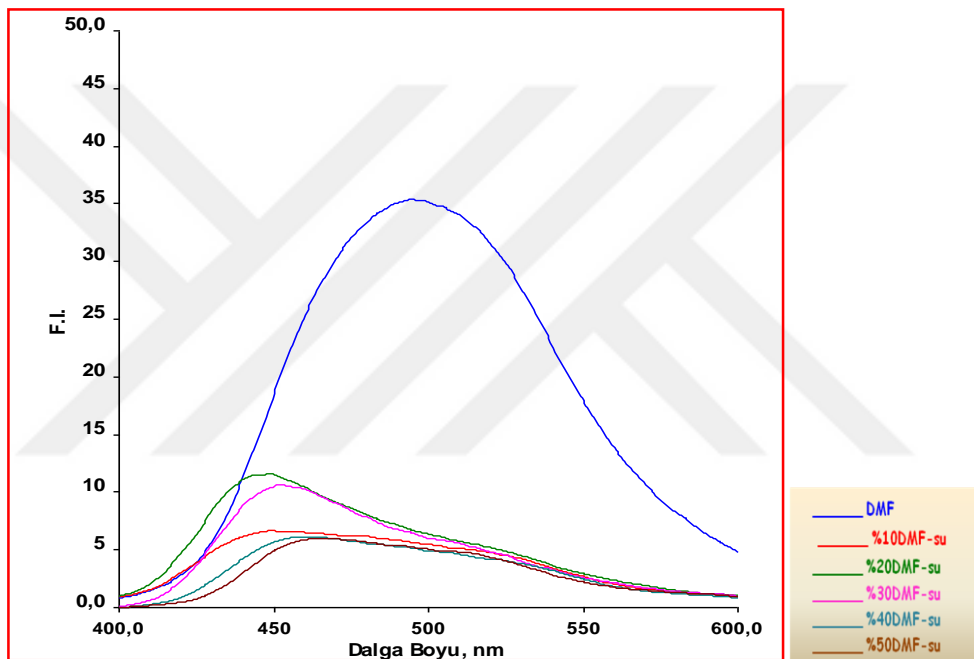
Şekil 20: 5.6. Piroksikamın %10-%50 DMF-Su ortamlarındaki emisyon spektrumları ($\lambda_{\text{ekz}}= 337 \text{ nm}$)

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

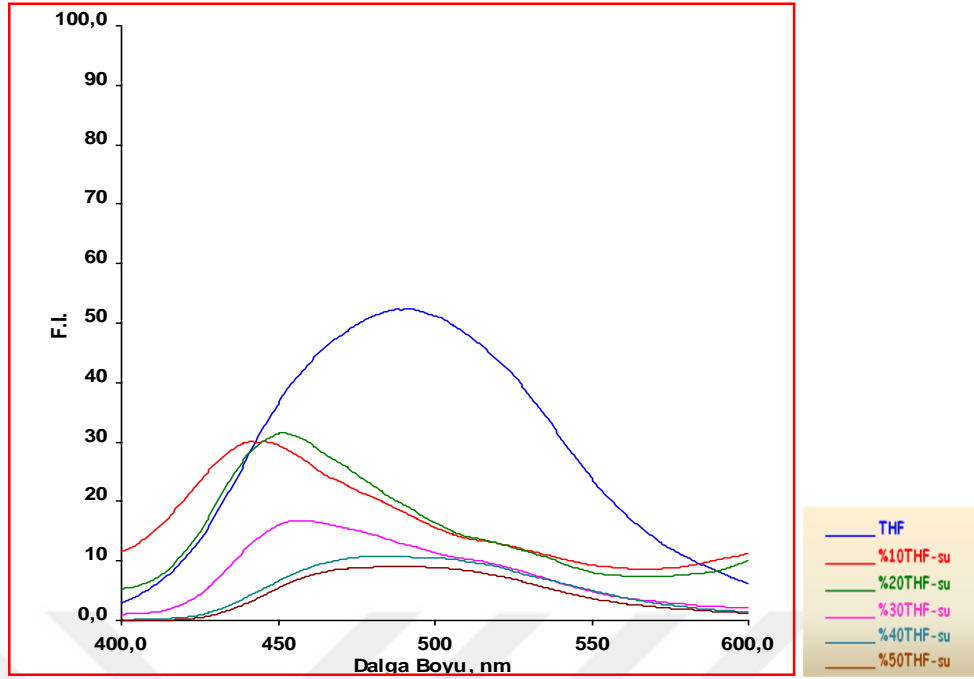
ortamlarında tayin edilmesi daha uygun olduğundan, su karışımli organik çözücü ortamlarında spektrofotometrik çalışma yapmak mümkün değildir.

5.1.3. Tenoksikamın emisyon spektrumları

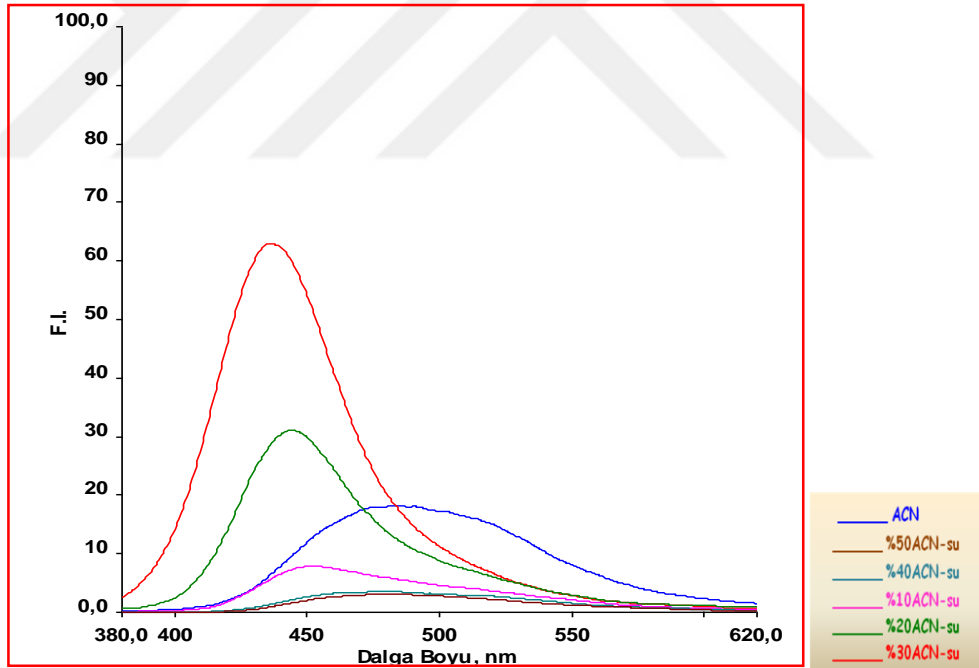
Tenoksikamın %10-%50 asetonitril, DMF ve THF içeren su ortamlarında hazırlanan 10^{-4} M'lık çözeltilerinin, çoklu spektrum taramalarıyla belirlenen en uygun uyarma dalga boyunda emisyon spektrumları alınmış ve aynı dalga boyunda alınan çözücüye ait emisyon spektrumu ile karşılaştırılmıştır.



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



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



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

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

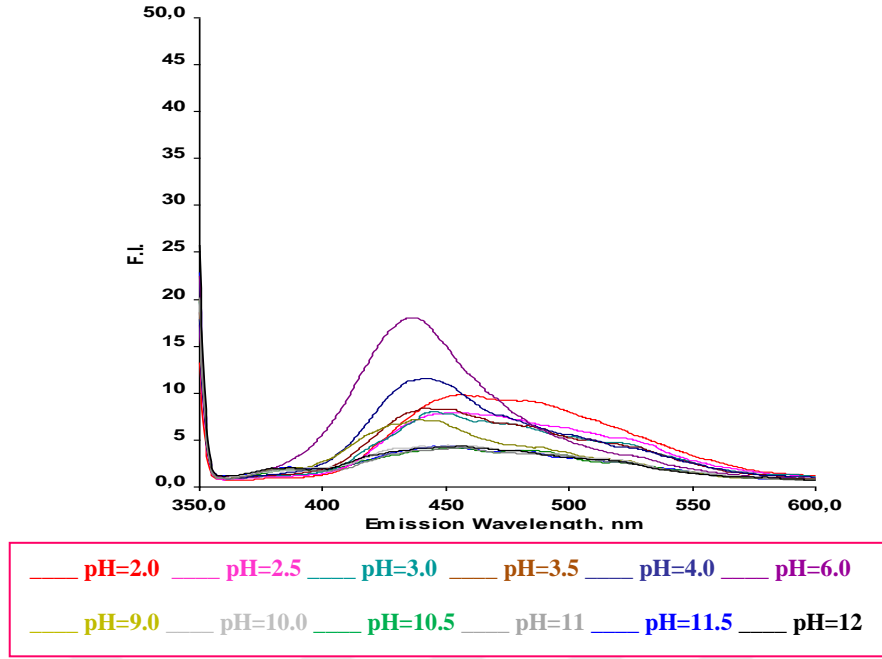
oldukça düşüktür. Su karışımı organik çözücülerde su yüzdesi arttıkça çözücü ortamının polaritesi de artarak maddenin polaritesine yakın olması sebebiyle emisyon dalga boylarının daha düşük dalga boylarına kaydığı (maviye kayma) görülmüştür. İyonlaşma sabitlerinin düşük yüzdede organik çözücü içeren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

5.2. Oksikamların İyonlaşma Sabitlerinin Tayini

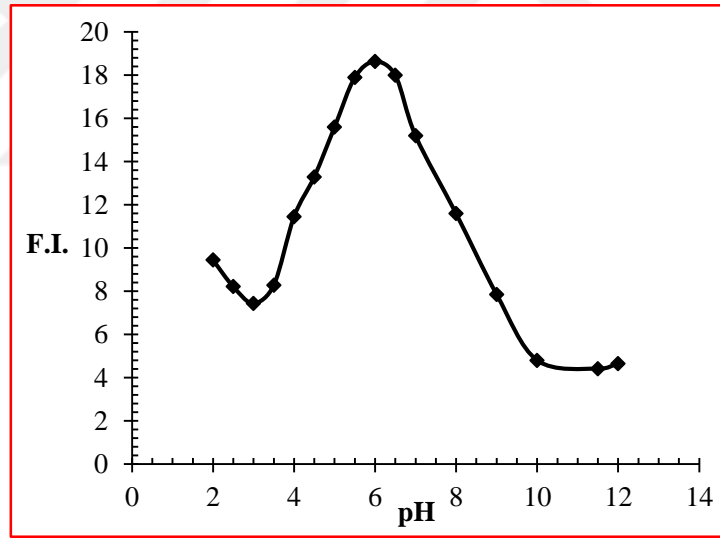
Oksikamların su karışımı organik çözücüler içinde iyonlaşma sabitlerinin tayin edilmesi amacıyla yapılan florimetrik parametrelerin belirlenmesi aşamasında, meloksikam ve piroksikamın, floresans şiddetlerinin çok düşük olması sebebiyle, hiçbir su karışımı organik çözücü ortamında iyonlaşma sabitlerinin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

5.2.1. Spektroflorimetrik yöntemle tenoksikamın iyonlaşma sabitlerinin tayini

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



Şekil 24: 5.10. Tenoksikamın %10 asetonitril-%90 su karışımında pH=2-12 arasındaki emisyon spektrumları ($\lambda_{ex}=336$ nm).



Şekil 25: 5.11. Tenoksikamın %10 asetonitril-%90 su karışımında pH=2-12 arasındaki pH-Floresans şiddeti (F.I.) grafiği ($\lambda_{ex}=336$ nm, $\lambda_{em}=435$ nm).

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

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

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

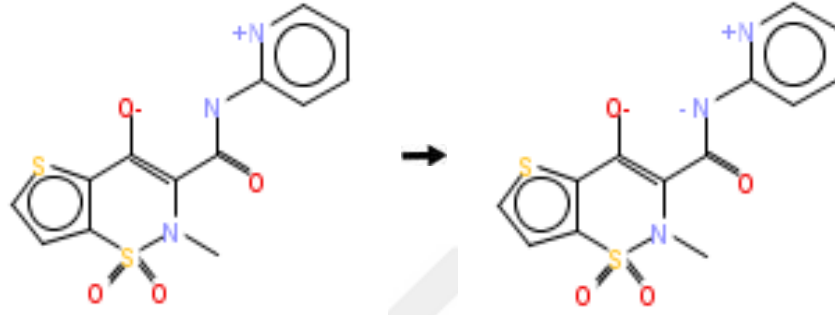
Emisyon spektrumları incelendiğinde, meloksikamın gerek saf çözücü gerekse su karışımı çözücü ortamlarında oldukça düşük floresans şiddetine sahip olduğu, piroksikamın saf çözücülerde daha yüksek floresans şiddetine sahip olduğu, tenoksikamın ise hem asetonitril hem de THF saf çözücü ve su karışımı organik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

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

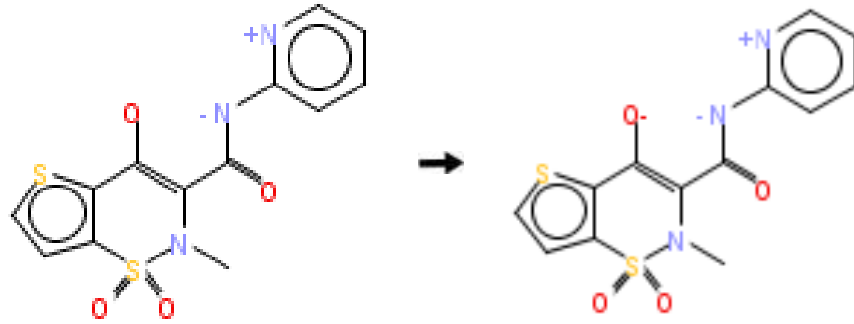
Bunun için ilk olarak oksikamların çözüdüğü ve tayin yöntemlerinde kullanılacak en uygun çözücü karışım yüzdeleri belirlendi. Daha sonra uyarma ve emisyon dalga boyları, çözücü ortamı ve molar absorbtivite katsayısı gibi değerler optimize edilerek, en uygun deney koşulları saptandı. İkinci aşamada, %10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

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

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



pKa is 4.12



pKa is 8.37

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

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

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

7. KAYNAKLAR

- Al-Tamrah, S.A., 1998, "Flow injection spectrophotometric determination of tenoxicam", *Analytica Chimica Acta* 375, 277-283.
- Avdeef, A., Box, K.J., Comer, J.E.A., Gilges, M., Hadley, M., Hibbert, C., Patterson, W., Tam, K.Y., 1999, "pH Metric log P 11. pKa determination of water soluble drugs in organic solvent- water mixtures", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 20, 631 - 641.
- Barary, M.H., Abdel-Hay, M.H., Sabry, S.M., Belal, T.S., 2004, "Spectrofluorimetric determination of 2-aminopyridine as a potential impurity in piroxicam and tenoxicam within the pharmacopoeial limit", *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34, 221-226.
- Beltrán, J.L., Sanli, N., Fonrodona, G., Barrón, D., Özkan, G., Barbosa, J., 2003, "Spectrophotometric, potentiometric and chromatographic pKa values of polyphenolic acids in water and acetonitrile-water media", *Analytica Chimica Acta* 484, 253-264.
- Branchu, S., Rogueda, P.G., Plumb, A.P., Cook, W.G., 2007, "A decision-support tool for the formulation of orally active, poorly soluble compounds", *Eur.J.Pharm.Sci.*, 32, 128-139.
- Burke, A., Smyth, E., Fitzgerald, G.A., 2006, "Analgesic-antipyretic agents; pharmacotherapy of gout. *The Pharmacological basis of Therapeutics*", (Ed: L.L.Brunton), 11th ed., Chapter 26, 671-715.
- Clarke's Isolation and identification of drugs, 1986, 2nd ed., Pharmaceutical Press.
- Dixon, J.S., Lowe, J.R., Galloway, D.B., 1984, "Rapid method for the determination of either piroxicam or tenoxicam in plasma using high-performance liquid chromatography", *J. Chromatography*, 310, 455-459.
- El-Maali, N.A., Vire, J.C., Patriarche, G.J., Ghandour, M.A., 1989, "Copper (II), lead (II) and cadmium(II) complexes with the anti-inflammatory piroxicam and tenoxicam", *Anal. Lett.*, 22(15), 3025-3039.
- El-Maali, N.A., Hassan, R.M., 1990, "Electrooxidation And Determination Of The Anti-Inflammatory Drugs Piroxicam And Tenoxicam At The Carbon-Paste Electrode", *Bioelectrochem. Bioenerg.*, 24, 155-163.
- Geiser, L., Henchoz, Y., Galland, A., Corrupt, P., A., Veutley, J., L., 2005, "Determination of pKa values by capillary zone electrophoresis with a dynamic coating procedure", *Journal of Separation Science*, 28, 2374-2380.
- Gençbay, M., 2004, "Siklooksijenaz-2-İnhibitorleri Koroner Olay Riskini Artırıyorlar mı?", *Türk Kardiyol Dern Ars*, 32, 371-375.

- Gündüz, B., 1995, Fotolüminesans ve analitik uygulama alanları, Doktora Semineri, Ankara Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Gündüz, T., 2002, İnrümentel Analiz, Dokuzuncu baskı, Bölüm 12, Gazi Büro Kitabevi, Ankara.
- Hardcastle J., Jano I., 1998, “Determination of dissociation constants of polyprotic acids from chromatographic data”, *Journal of Chromatography B*, 71, 739-756.
- Heizman, P., Körner, J., Zinapold, K., 1986, “Determination of tenoxicam in human plasma by high-performance liquid chromatography”, *J. Chromatography*, 374, 95-102.
- Herzfeldt, C.D., Kümmel,R., 1983, “Dissociation constants, solubilities and dissolution rates of some selected nonsteroidal antiinflammatories”, *Drug.Dev.Ind.Pharm.*, 9(5), 767-793.
- Karatas, A., Yuksel, N., Baykara, T., 2005 “Improved solubility and dissolution rate of piroxicam using gelucire 44/14 and labrasol”, *Il Farmaco (France)*, 60(9), 777-782.
- Kráčmar, J., Kráčmarová, J., 1989, “UV spektrofotometrie in der Arzneimittelkontrolle”, *Pharmazie*, 44, 199-203.
- Lapicque, F., Netter, P., Bannwarth, B.,Trechot, P., Gillet, P., Lambert, H., Royer, R. J., 1989, “Identification and simultaneous determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs using high-performance liquid chromatography”, *J. Chromatography*, 496, 301-320.
- Li, P., Zhao, L., 2007, “Developing early formulations: Practice and perspective” *Int.J.Pharm.*, 341, 1-19.
- Mohamed, H.A., Wadood, H.M.A., Farghaly, O.A., 2002, “Potentiometric and spectrofluorimetric studies on complexation of tenoxicam with some metal ions”, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28, 819–826.
- Page, C.P., Curtis, M.J., Walker, M.A., Hoffman, B.B., 2006, *Integrated Pharmacology*. Third Ed. 253-271.
- Poole, C. P., Poole, S. W., 1997, *Chromatography Today*. Fifth impression. Elsevier Science, B.V., Amsterdam.
- Poole, S. K., Patel, S., Dehring, K., Workman, H., Poole, C., F., 2004, “Determination of acid dissociation constants by capillary electrophoresis”, *Journal of Chromatography A* , 1037, 445-454.
- SPARC: <http://ibmlc2.chem.uga.edu/sparc>.
- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman, T.A., Çeviri: Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H.,2000, *Enstrümentel Analiz İlkeleri*, Bilim Yayıncılık, Ankara, 355-377.

- Sweetman, S.C., 2007, Martindale The Complete Drug Reference, 34th Ed., USA, Pharmaceutical Press.
- Takacs-Novak, K., Box, K., J., Avdeef, A., 1997, "Potentiometric pKa determination of water-insoluble compounds: validation study in methanol/water mixtures", *International Journal of Pharmaceutics*, 151, 235-248.
- The Merck Index, 1989, 13th ed. Merck&Co, Inc.
- Trissel, L.A., 1996, *Trissel's stability of compounded formulations*, American Pharmaceutical Association.
- Toroconiz, J. I. F., Lopez-Bustamante, L. G., Fos, D., 1993, "High-performance liquid chromatographic analysis of piroxicam and tenoxicam in plasma, blood and buffer solution", *Arzneim. Forsch. Drug Res.*, 43, 679-681.
- Valizadeh, H., Zakeri-Milani, P., Barzegar-Jalali, M., 2007, "Preparation and characterization of solid dispersions of piroxicam with hydrophilic carriers", *Drug Dev Ind Pharm (United States)*, 33(1), 45-56.
- Zahedi, P., Lee, P.I., 2007, "Solid molecular dispersions of poorly water-soluble drugs in poly(2-hydroxyethyl methacrylate) hydrogels", *Eur J Pharm Biopharm (Netherlands)*, Mar, 65(3), 320-328.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

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

EĞİTİM

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

UZMANLIK ALANI

İlaç Etken Maddelerinin İyonlaşma Sabitlerinin Spektrofotometrik ve Florimetrik Yöntem ile Tayini

BİLİMSEL ÇALIŞMALAR

- 1- S.B.Gündüz, S.M.Erden, Eda Ediz, Şükran Küçükkartallar, S.A.Özkan, 3rd PAK-TURK Conference on Chemical Sciences konferansı dahilinde "Book of Abstracts. 3rd PAK-TURK Conference on Chemical Sciences" bildiri kitapçığındaki " Determination of The Ionization Constant of Tenoxicam in Organic Solvent-Water Media by The Spectrofluorimetric Method", PP-45, 92 pp., Bursa, Turkey, 13-15 September 2012
- 2- B.Gündüz, E. Ediz, S. M. Erden, S.A.Özkan, 6. Ulusal Analitik Kimya Kongresi dahilinde "Kongre Bildiri Özetleri Kitapçığı. 6. Ulusal Analitik Kimya Kongresi" bildiri kitapçığındaki "Bazı Nonsteroid Antienflamatuar İlaç Etken Maddelerinin (Oksikamların) Organik Çözücü ve Su-Organik Çözücü Ortamlarında Floresans Özelliklerinin İncelenmesi", P-249, 291 pp., Hatay, Türkiye, 03-07 Eylül 2012