

Aromatik Bileşikler: Absorbsiyon bantları molekülün yapısına bağlı olarak değişir. Benzen 184, 204 nm'de şiddetli E bantları ve 256 nm'de B bandı olmak üzere üç absorpsiyon bandına sahiptir.

Benzen halkasında alkil süstitüsüyonu hiperkonjugasyon sonucu batokromik kaymaya neden olur. Benzen halkasında alkil grubu varken p-konumuna ikinci bir alkil grubunun getirilmesi, büyük bir batokromik kaymaya neden olur. Eğer benzen halkasına bağlı bir heteroatom varsa, bu atomun ortaklanmamış elektron çifti, halkanın π elektronları mezomerisine katılır ve benzenin E (Aromatik yapıların karakteristikleri olan bantlar) ve B bantları daha uzun dalga boyuna kayar. Fenolün fenolat haline geçişi E ve B bantlarında batokromik kaymaya neden olurken anilinin anilinyuma dönüşmesi ise hipsokromik bir kayma yapar. Bunun nedeni olarak, anilinyum katyonunda azotun ortaklanmamış elektronları asit protonu tarafından tutulmuş olup, halkanın π elektron mezomerisine katılamaması gösterilebilir. Doymamış bir grubun benzen halkasına bağlanması ile B bandında (Aromatik veya heteroaromatik moleküllere ait bantlar) kuvvetli bir batokromik kayma gerçekleşir.

Heteroaromatik Bileşikler: Beş üyeli heteroaromatik bileşiklerin ultraviyole spektrumları siklopentadieninkiyle karşılaştırıldığında, siklopentadien spektrumu ile 200 nm deki kuvvetli dien absorpsiyonu ile 238 nm deki orta şiddetli absorpsiyonun furan, pirol ve tiyofende sırasıyla, furandan tiyofene doğru gidildikçe daha büyük dalga boylarına kaydıkları görülür. Altı üyeli heteroaromatik bileşiklerden piridinin ultraviyole spektrumu, 257 ve 270 nm'lerde olmak üzere başlıca iki absorpsiyon maksimumu gösterir. 5 ve 6 üyeli heteroaromatik bileşiklerin aksine doymuş türevleri 200 nm den daha uzun dalga boylarında absorpsiyon yapmazlar.

2.2.9 UV ve Görünür Alan Spektroskopisinin Uygulamaları

Kalitatif analizde: Bilinmeyen madde saflaştırıldıktan sonra UV spektrumu alınır. Bu spektrum aynı madde için daha önce alınmış spektrumlarla karşılaştırılır. Spektrumlardan hangisine uyarsa bilinmeyen madde spektrumuna uyan maddedir.

Saflık kontrolünde: Maddenin ne olduğu biliniyor, saf olup olmadığı araştırılıyorsa, spektrum alındıktan sonra spektrumda beklenmedik piklerin çıkması maddenin saf olmadığını ortaya koyar. Spektroskopide kullanılan çözücüler de spektrumdaki piklerde belli bir miktar kayma ve yanılmaya neden olabilirler. Bunun için spektroskopide kullanılacak çözücülerin, spektrumu alınacak maddeyi çözmesinin dışında, maddenin absorpsiyon yaptığı alanda absorpsiyon yapmaması ve polar olmaması gerekir. Ayrıca giriş ve çıkış aralıklarının da spektruma etkisi vardır. Bunun için spektrumun mümkün olduğunca dar aralıkla alınması gerekir yoksa spektrumun karakteristik özelliği bozulur.

Kantitatif Analizde: Kantitatif olarak analizi yapılacak madde biliniyorsa sırasıyla şu işlemler yapılabilir:

- Madde saflaştırılır.
- Tayinin yapılacağı dalga boyu seçilir.
- Tayin sıcaklığı ayarlanır.
- Tayin için uygun çözücü ve pH seçimi yapılır.
- Absorbansa karşı konsantrasyon grafiği çizilir.

Spektrofotometrik Titrasyonda: Her çeşit titrasyon spektrofotometrik olarak yapılabilir. Absorblanan ışının dalga boyu değeri;

- Hem titre edilen X maddesi, hem de titre eden Y maddesi absorpsiyon yapmıyor ve meydana gelen XY maddesi absorpsiyon yapıyor ise eğri dönüm noktasına kadar düzenli olarak artar, ondan sonra sabit kalır.

- Titre edilen X maddesi, çalışılan özel dalga boyunda absorpsiyon yapıyor, titre eden Y maddesi ve ortamda meydana gelen XY maddesi absorpsiyon yapmıyor ise eğri dönüm noktasına kadar düşer, sonra sabit kalır.

- Titre edilen X maddesi ve titre eden Y maddesi absorpsiyon yapıyor, meydana gelen XY maddesi absorpsiyon yapmıyor ise eğri dönüm noktasına kadar düşer, dönüm noktasından sonra tekrar süratle yükselir.

Molekül Ağırlığı Tayininde: Çok özel durumlarda bir maddenin molekül ağırlığı spektrofotometrik olarak tayin edilebilir. Bunun için

özellikle maddenin absorblama şiddetine sahip belli bir fonksiyonel grup içermesi gerekir.

Asit ve Bazlık Sabitelerinin Tayininde: Tautomerik sistemlerde ve diğer dengelerde, bileşiğin iki şekli değişik dalga boylarında absorbsiyon yapar ve her birinin kantitatif analizi, denge konsantrasyonlarını ve denge sabitini verir. Mesela keto ve enol şekillerinde bulunabilen asetoasetat esterleri için enol şekli konjuge olduğundan, daha yüksek şiddette absorbsiyon yapar.

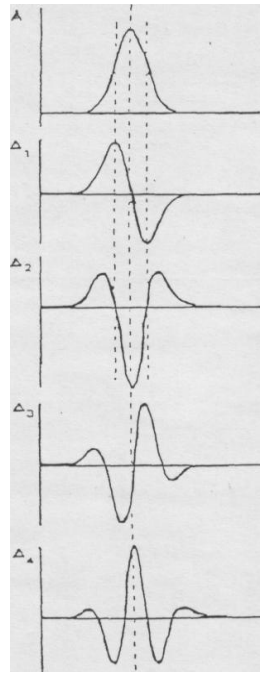
Moleküllerin Stereokimyasının Araştırılmasında: Bifenillerde engellenmiş dönme UV ile araştırılabilir. Moleküldeki halkaların aynı düzlemde oluşunu ortaya çıkaran π - π^* geçişi belli bir λ_{max} değerindedir. Molekülde orto konumunda büyük gruplar varsa aynı düzlemde oluş engellenir ve λ_{max} değeri farklıdır.

Geometrik İzomerlerin Konfigürasyonunun Bulunmasında: Geometrik izomerlerde cis şekli daha çok sterik engellenmiş, trans şekli elektron sisteminin aynı düzlemde oluş özelliğini daha kolay kazanmıştır. Dolayısıyla trans şekli daha yüksek dalga boyunda absorbsiyon yapar ve molar absorbtivitesi de daha büyüktür.

2.2.10 Türev Spektroskopisi

UV Spektroskopisinin son yıllarda çok yararlanılan bir uygulaması (özellikle kantitatif amaçla) türev uygulaması ile yürütülen biçimdir. UV-Visible (Görünür) bölgede absorbsiyonu olan bir madde üzerine gönderilen ışınların dalga boylarına karşı, absorbans değerleri grafiğe geçirilerek türev spektrumu elde edilmektedir. Türev spektroskopisinin sözünü ettiğimiz özelliği kısaca; $A=f(x)$ eşitliği ile ifade edilebilir. Burada **A** absorbansı, **x** ise dalga boyunu ifade eder. Absorbans bir anlamda dalga boyunun fonksiyonu şeklindedir. Bu fonksiyonun her bir noktasındaki türev; $[dA/d\lambda]$ şeklinde hesaplanır. Eğer bu türev değerleri dalga boyuna karşı grafiğe geçirilecek olursa, türev spektrumu oluşur ve bu da **1**'den **n**'e kadar değişik derecelerde olabilir. Türev spektrofotometresi ile yürütülen yöntemler türev

spektrumlarının kullanılması esasına dayanmaktadır. Türev eğrilerinin hazırlanmasında ise matematiksel işlemlerden yararlanılmaktadır. Türev çalışmaları spektrumun eğimini bildirmekte ve çok net bir şekilde spektrumdaki omuz, dirsek oluşumları, tepe ve bükülme noktalarını ortaya koymaktadır. Bu şekilde kesin sonuç alınabilmektedir. Aynı zamanda spektrum doğrusundaki bir deformasyonun gözlenmesi ile, numunede bir yada birkaç yabancı maddenin bulunduğunu saptamak son derece kolay olmaktadır. Absorbsiyon bantlarının daha anlaşılır olması için, diferansiyon uygulamak, spektrumdaki bantları inceltmekte ve onları tam olarak ayırtmaya olanak sağlamaktadır. Bu şekilde kompleks bir karışımı oluşturan maddeleri ya da onlara ait bantları ayrı ayrı hale getirmek mümkün olmaktadır. Sonuç olarak, türev spektroskopisi uygulaması ile karışım numunelerinin spektrumunda birbirlerinin içine girerek birbirlerini etkilemesi önlenmekte ve bu tür maddelerin de spektroskopik analizlerini yapmak mümkün olmaktadır. Şekil 2.2.3'de 1 ile 4. dereceden türev spektrumuna ait bant örnekleri verilmektedir.



- A : Özgün spektrum
- Δ_1 : 1. Türev Spektrumu
- Δ_2 : 2. Türev Spektrumu
- Δ_3 : 3. Türev Spektrumu
- Δ_4 : 4. Türev Spektrumu

Şekil 2.2.3. 1. ve 4. Dereceden türev spektrumları

2.2.11 Türev Spektrofotometresinin Kullanım Alanları

- Kalitatif analizlerde karışım maddelerinin tanınmasında ve saflık kontrollerinde kolay ve kesin sonuçlar vermektedir.
- Kantitatif analizlerde iki bileşiğin karışımında içiçe girmiş bantların ayrılmasına yardımcı olmakta, böylece iki bileşiğin birlikte tayinine olanak vermektedir.
- Süspansiyon gibi bulanık ortamlarda çalışırken, hiçbir ayırma işlemine gerek kalmadan rahatlıkla analiz yapılabilmektedir.
- Doğal ya da reaktif ilavesiyle renklendirilmiş bir ortamda alınan spektrumda, bir madde son derece zayıf görünüm verse de türev spektroskopisi ile rahatlıkla tayin edilebilmektedir.
- Dar bir alana sıkışmış birden çok maddenin tayinine olanak vermektedir.

Kullanımının çok kolay olmasına karşılık, türev spektrofotometresinin maliyeti son derece pahalıdır. Ayrıca türev spektrumlarında çok sayıda uydu pikler görülür. Bu pikler bir karışım ile çalışırken bizi başka bileşenlerin varlığına götürerek yanıltabilir. Türev derecesi arttıkça bu cins piklerin sayısı da artacağı için, bu durum sonuçta, yeterince deneyimi olmayan kişilerin spektrumları yorumlamasını güçleştirmektedir.

2.2.12 İlaç Etken Maddelerinin Görünür Bölgede Miktar Tayini Uygulamaları

Görünür bölgede absorpsiyonu olan herhangi bir ilaç etken maddesinin (renkli ya da renklendirilmiş madde çözeltisi) miktar tayini, maddenin belli konsantrasyondaki çözeltisinden, seçilen uygun bir dalga boyunda (400-800 nm arasında) ışık geçirilerek yapılabilir. Bu tayinlerde Lambert-Beer kanunu geçerlidir.

Seçilen dalga boyunda maddenin gösterdiği absorbans ölçüldükten sonra aşağıda gösterilen yollardan biri izlenerek madde miktarı hesaplanır:

- Miktar tayini yapılacak madde, aynı koşullarda (dalga boyu, slit açıklığı, tabaka kalınlığı ve çözücü) referans standart ile karşılaştırılır. Her ikisinden hazırlanan çözeltilerin absorpsanları boşa karşı ölçülür ve aşağıdaki formülden yararlanılarak madde miktarına geçilir:

$$\frac{C_x}{C_s} = \frac{A_x}{A_s} \quad C_x = \frac{A_x}{A_s} \times C_s$$

C_x : Miktarı bilinmeyen maddenin konsantrasyonu

C_s : Standart maddenin konsantrasyonu

A_x : Miktarı bilinmeyen maddenin absorpsansı

A_s : Standart maddenin absorpsansı

- Referans standardın değişik konsantrasyonlu çözeltileri hazırlanır ve bunların, seçilen dalga boyunda absorpsanları okunur. Konsantrasyon absis, absorpsans ordinat olmak üzere ölçü eğrisi (kalibrasyon eğrisi) çizilir. Sonra bilinmeyen örnekten hazırlanan çözeltinin absorpsansı ölçülür ve ordinatta işaretlenir. Bu noktadan kalibrasyon eğrisine bir dik çıkılır, dikin eğriyi kestiği noktadan absise dik inilerek madde miktarı bulunur; yüzde saflık miktarı hesaplanır.

Görünür bölgede miktar tayini yönteminin uygulanması: Bu bölümde örnek olarak parasetamol miktar tayini bütün ayrıntıları ile verilecek, laboratuvaradaki hesaplamalar bu örneği esas alarak yapılacaktır.

PARASETAMOL TABLETİ

300 mg Parasetamol içerdiği bildirilen tabletlerin 20 tanesi toz edilerek iyice karıştırılır. 100 mg dolayında aktif maddeye eşdeğer miktarda tablet tozu tartılır. 50 ml %10'luk HCl ile hidroliz edildikten sonra distile suyla 100 ml'ye seyreltilen çözeltiden 3 ml'lik bir kısım 100 ml'lik bir balon jöjeye aktarılır. Üzerine 2 ml %10'luk HCl ve 3ml DAB çözeltisi (p-dimetilaminobenzaldehidin %95'lik etanoldeki %3'lük çözeltisi) ilave edilir. Karışım, iyice çalkalandıktan sonra, 20 dakika oda ısısında bekletilir ve distile suyla 100 ml'ye tamamlanıp 444 nm'de boş çözeltiliye karşı absorpsansı

ölçülür. Absorbans 0.51 olduğuna göre önce tabletlerdeki, sonra bir tabletteki aktif madde miktarı bulunur.

Standart eğrinin çizilmesi: Referans standart maddeden 100 mg dolayında tam tartılmış bir kısım, yukarıda gösterildiği gibi hidroliz edilip 100 ml'ye seyreltilir. Bu çözülden 0.5 ml, 1 ml, 2 ml, 3 ml ve 4 ml'lik kısımlar 100 ml'lik balon jöjelere alınıp 2'şer ml %10'luk HCl ve 3'er ml DAB çözeltisi ilave edilir, 20 dakika bekletildikten sonra distile su ile 100 ml'ye seyreltilir ve boş çözültiye karşı 444 nm'deki absorbansları okunur. Absorbanslar ordinat, konsantrasyonlar absis olmak üzere milimetrik bir kağıda standart eğri çizilir. Konsantrasyonlar 1 ml'de mcg (μg , mikrogram) ya da mg olarak hesaplanır ve seyreltmeler için de hesaplar yapılarak her birinin 1 ml'sindeki madde miktarı bulunur:

$$\begin{array}{r} 100 \text{ ml} \qquad 100 \text{ mg} \\ 1 \text{ ml} \qquad \qquad x \\ \hline x = 1 \text{ mg / ml (ana çözelti)} \end{array}$$

1. seyreltme: Ana çözülden 0.5 ml alınıp reaktif ilavesinden sonra su ile 100 ml'ye tamamlanır:

100 ml'de 0.5 mg, 1 ml'de 0.005 mg = 5 mcg vardır.

2. seyreltme: Ana çözülden 1 ml alınıp reaktif ilavesinden sonra su ile 100 ml'ye tamamlanır:

100 ml'de 1 mg, 1 ml'de 0.010 mg = 10 mcg vardır.

3. seyreltme: Ana çözülden 2 ml alınıp reaktif ilavesinden sonra su ile 100 ml'ye tamamlanır:

100 ml'de 2 mg, 1 ml'de 0.02 mg = 20 mcg vardır.

4. seyreltme: Ana çözülden 3 ml alınıp reaktif ilavesinden sonra su ile 100 ml'ye tamamlanır ve $x = 30 \mu\text{g}$ bulunur (5., 6., vb. seyreltmeler).

Hesaplanan konsantrasyonlar ve bunlara karşılık gelen 444 nm'deki absorpsanları kullanılarak aşağıdaki standart eğri çizilir:

C (µg/ml)	A
5.....	0.075
10.....	0.16
20.....	0.38
30.....	0.56
40.....	0.77

