



T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ

FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

BAZI FLOROKİNOLON ANTİBİYOTİKLERİNİN FLORESANS ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ VE FLORİMETRİK YÖNTEM İLE İYONLAŞMA SABİTLERİNİN TAYİNİ

ŞÜKRAN KÜÇÜKKARTALLAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Analitik Kimya Anabilim Dalı

Temmuz-2011
KONYA
Her Hakkı Saklıdır

ÖZET

YÜKSEK LİSANS

BAZI FLOROKİNOLON ANTİBİYOTİKLERİNİN FLORESANS ÖZELLİKLERİNİN İNCELENMESİ VE FLORİMETRİK YÖNTEM İLE İYONLAŞMA SABİTLERİNİN TAYİNİ

ŞÜKRAN KÜÇÜKKARTALLAR

Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü
Analitik Kimya Anabilim Dalı
Anabilim Dalı

Danışman: Yrd. Doç. Dr. S. Beniz GÜNDÜZ
2011, 164

Jüri
Prof. Dr. Hüseyin KARA
Prof. Dr. Erol PEHLİVAN
Yrd. Doç. Dr. S. Beniz GÜNDÜZ

Florokinolonların 1980'lerin sonlarından itibaren kullanılmaya başlanması ile ciddi enfeksiyonların oral yolla tedavisi mümkün olmuştur. Siprofloksasin, levofloksasin, enoksasin, ofloksasin ve pefloksasin, gibi antibakteriyel ilaçlar (florokinolonlar) genital ve üriner sistem enfeksiyonlar, prostat yangısı, mide bağırsak yangısı, cinsel yolla bulaşan hastalıklar, solunum sistemi hastalıkları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, tümör önleyici etkinlikleri, idrar yolu enfeksiyonları, alt solunum yolu enfeksiyonları tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Anti-bakteriyal ilaçlar olarak florokinolonların iyonlaşma sabitlerinin birkaç uygun yöntem ile tam olarak tayini etki mekanizmalarının anlaşılmasında ve biyoyararlanabilirlikleri açısından oldukça önemlidir.

Bu nedenle bu çalışmada öncelikle florokinolonların organik çözücü-su ortamlarında florimetrik parametreleri belirlenmiştir. Florimetrik parametrelerin (uyarma ve emisyon dalga boyu, floresans şiddeti) belirlenmesi için, öncelikle asetonitril, metanol, DMF, DMSO ve saf su içerisinde, daha sonra %10-%90 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. Florokinolonlar, molekül yapılarında karboksil (-COOH) ve amin (-NH) grupları gibi, asidik ve bazik fonksiyonlu gruplara sahip olduklarından, optimum koşullarda %10-40 asetonitril-su ortamlarında, bu ilaç etken maddelerinin iyonlaşma sabitleri spektroflorimetrik ve spektrofotometrik yöntemlerle hem pH-floresans şiddeti grafiklerinden hem de pKa değerlerini deney koşullarında hesaplayan bir bilgisayar programı olan STAR programıyla iyonlaşma sabitleri tayin edilmiştir. Deneysel yöntemlerle elde edilen pKa değerleri, SPARC programından (online teorik pKa hesaplama programı) hesaplanan teorik pKa değerleriyle karşılaştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: Enoksasin, Florokinolon antibiyotikleri, Levofloksasin, Ofloksasin, Pefloksasin, pKa, Siprofloksasin, Spektroflorimetri, Spektrofotometri

ABSTRACT

MS THESIS

INVESTIGATION OF THE FLUORESCENCE PROPERTIES OF SOME FLUOROQUINOLONE ANTIBIOTICS AND DETERMINATION OF THEIR IONIZATION CONSTANTS BY USING FLUORIMETRIC METHODS

Şükran KÜÇÜKKARTALLAR

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

Advisor: Asist. Prof. Dr. S.Beniz GÜNDÜZ
2011, 164

Jüri
Prof. Dr. Hüseyin KARA
Prof. Dr. Erol PEHLİVAN
Asist. Prof. Dr. S. Beniz GÜNDÜZ

The treatment of severe infections became treatable orally after the usage of fluoroquinolons in the late 1980s. Antibacterial drugs (fluoroquinolons) such as Siprofloksasin, levofloksasin, enoxacin, ofloksasin and pefloksasin are used in the treatment of genital and urinary infections, prostate infection, gastrointestinal infection, veneral disease, upper and lower respiratory tract infections, skin and soft tissue infections. In addition they also have tumour inhibiting activities. Full determination of ionization constants of fluoroquinolons by several suitable methods is very important in understanding their action mechanisms and bioavailability.

For this reason in this study, the fluorimetric parameters of fluoroquinolons 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, DMSO and in pure water, and then in 10-90 % 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 fluoroquinolons contain acidic and basic functional groups such as carboxyl (-COOH) and amine (-NH) groups, under optimum conditions, 10-40% acetonitrile-water medium, the effective drug materials' ionization constants were determined by spectrofluorimetric and spectrofluorimetric methods both from the pH-fluorecence intensity graphics and from the STAR programme which calculates the pKa values during experimental conditions. The pKa values obtained experimentally were compared to theoretic pKa values obtained from SPARC programme (online theoretic pKa calculation programme).

Keywords: Ciprofloxacin, Enoxacin, Floroquinolon antibiotics, Levoflokacin, Ofloxacin, Pefloxacin, pKa, Spectrofluorimetry, Spectrofotometry,

ÖNSÖZ

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü öğretim üyelerinden Yrd. Doç. Dr. S. Beniz GÜNDÜZ danışmanlığında tamamlanarak Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü' ne Yüksek Lisans Tezi olarak sunulmuştur.
Bu çalışma aynı zamanda S.Ü Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü tarafından FBE 10201028 no' lu proje olarak desteklenmiştir.

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

Tez çalışmalarım boyunca bana laboratuar imkanı sağlayan, hoşgörüyle desteklerini hiç esirgemeyen Kimya Bölüm Başkanı Sayın Prof. Dr. İbrahim KARATAŞ'a, Analitik Kimya Ana Bilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Hüseyin KARA'ya ve Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü' nde görev yapan bütün değerli hocalarıma çok teşekkür ederim.

Laboratuar çalışmalarım boyunca beni yalnız bırakmayan çalışma arkadaşlarım Eda EDİZ'e ve Kübra ETÇİ' ye teşekkür etmeyi borç bilirim.

Deneysel çalışmalarda ve yaşamım boyunca bana sonuna kadar destek olan, bugünlere kadar gelmemi sağlayan, sevgi ve desteklerini esirgemeyen (her zaman, her konuda, sıkıntılı günlerimde hep yanımda olan, istemedende olsa üzdüğüm canımdan çok sevdiğim anneme) aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

ŞÜKRAN KÜÇÜKKARTALLAR
KONYA-2011

İÇİNDEKİLER

ÖZET ..... **iv**

ABSTRACT ..... **v**

ÖNSÖZ ..... **vi**

İÇİNDEKİLER ..... **vii**

SİMGELER VE KISALTMALAR ..... **ix**

1.GİRİŞ **1**

1.1. Spektroflorimetri 2
1.1.1. Moleküler lüminesans spektroskopisi 2
1.1.2. Elektron spini: 3
1.1.3. Oda sıcaklığında S_1 halinin deaktivasyonu 5
1.1.4. Floresans 6
1.1.5. Fosforesans 8
1.1.6. Rezonans floresansı 9
1.1.7. Stokes kayması 10
1.1.8. Absorpsiyon ve emisyon hızları 11
1.1.9. Spektroflorimetreler 12
1.1.10. Floresansı Etkileyen Faktörler 16
1.1.10.1. Molekül yapısının etkisi 16
1.1.10.2. Sıcaklık 22
1.1.10.3. Çözücü etkisi 22
1.1.10.4. pH etkisi 23
1.1.10.5. Konsantrasyonun etkisi 24
1.1.10.6. Viskozite etkisi 24
1.1.10.7. Çözünmüş oksijen ve paramagnetikler 25
1.1.10.8. Gelen ışının dalga boyunun ve şiddetinin etkisi 25
1.1.11. Fotolüminesans teorisi 25
1.1.12. Florimetrinin bazı uygulama alanları 29
1.2. Spektrofotometri 30
1.2.1. UV-Visible spektroskopisi ve Lambert-Beer Yasası: 31
1.3. İyonlaşma Sabitlerini Tayini 34
1.3.1. Potansiyometrik yöntemle pKa tayini 34
1.3.2. Spektrofotometrik yöntemle pKa tayini 35
1.3.3. Florimetrik pKa tayini 38
1.4. Antibiyotikler 40
1.4.1. Kinolonlar 42
1.4.1.1. Kinolonların elde edilişleri 44
1.4.2. Etki mekanizmaları 46
1.4.3. Farmakokinetik özellikleri 47
1.4.4. Florokinolonlara karşı direnç mekanizmaları 47
1.4.5. Kinolonların yan etkileri: 48
1.4.6. Florokinolonlar ve SPARC Programı ile Hesaplanan İyonlaşma Sabitleri. 48
1.4.6.1. Siprofloksasin 50
1.4.6.2. Levofloksasin 51
1.4.6.3. Enoksasin 53

1.4.6.4. Pefloksasin 54
1.4.6.5. Ofloksasin 56

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI 58

3. MATERYAL VE YÖNTEM 79

3.1. Kullanılan Cihazlar 80
3.1.1. Spektroflorimetre 80
3.1.2. Spektrofotometre 80
3.1.3. pH / İyon Metre 80
3.1.4. Kullanılan diğer cihazlar 80
3.2. Kimyasal Maddeler 80
3.2.1. Florokinolonlar 80
3.2.2. Çözücüler 81
3.2.3. Çözeltiler 81
3.3. Yöntem: 81
3.3.1. Bazın (KOH) ayarlanması: 81
3.3.2. Titrant çözeltisinin hazırlanması: 81
3.3.3. Deneysel İşlem 82

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA 84

4.1. Floresans Şiddetine Çözücü Etkisi 84
4.1.1.Florokinolon ilaç etken maddelerin spektroflorimetrideki emisyon spektrumları 84
4.2. Floresans Şiddetine Çözücü Yüzdesinin Etkisinin İncelenmesi 95
4.2.1. Florokinolonların farklı çözücü yüzdelerinde alınan emisyon spektrumları 95
4.2.2. Florokinolonların % Çözücü-Floresans Şiddeti Grafikleri 107
4.3. Florokinolonların İyonlaşma Sabitlerinin Tayini 110
4.3.1. Florimetrik yöntemle iyonlaşma sabitlerinin tayini 110
4.3.2. Spektrofotometrik yöntemle iyonlaşma sabitlerinin tayini 122

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER 148

5.1. Sonuçlar 148
5.2. Öneriler 150

KAYNAKLAR 151

ÖZGEÇMİŞ 155

SİMGELER VE KISALTMALAR

Siprofloksasin (ciprofloxacin)
Enoksasin (enoxacin)
Levofloksasin (levofloxacin)
Ofloksasin (ofloxacin)
Pefloksasin (pefloxacin)
Nor: NOR : norfloksasin
FQ: florokinolon
SPE: katı faz ekstraksiyonu
LC: sıvı kromatografik yöntemi
MLS: makrolid
TCS: tetrasiklin
Sas: sulfonamid antibiyotikler
TMP: trimetoprim
HPLC: yüksek performanslı sıvı kromatografisi
MS: çiftleşmiş kütle spektrometresi
MS / MS: ardışık kütle spektrometresi
UV: ultraviyole
FD: floresans dedektör

1.GİRİŞ

Siprofloksasin, levofloksasin, enoksasin, ofloksasin ve pefloksasin, gibi antibakteriyel ilaçlar (florokinolonlar) genital ve üriner sistem enfeksiyonlar, prostat yangısı, mide bağırsak yangısı, cinsel yolla bulaşan hastalıklar, solunum sistemi hastalıkları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, tümör önleyici etkinlikleri, idrar yolu enfeksiyonları, alt solunum yolu enfeksiyonları, genore ve gonokoksik olmayan üretrit tedavisinde yaygın olarak kullanılır. Suda çözünen lipofilikliği yüksek ilaçlardır. Oral biyo yararlanımları yüksektir. Tüm florokinolonlara bakterisidal etkili olup ortak etki mekanizması olarak hepsi de bakterilerdeki DNA jiraz enzimini (type II topoizomeraz) hedef alırlar. +2 ve +3 değerlikli (besinler ve antasidler gibi ilaçlar içindeki) metallerle şelat yaparlar. Tüm kinolonlar di- ve trivalent katyonlar ile şelat kompleksleri oluşturular. Kinolonların bu özellikleriyle ilgili önemli bir nokta da; invitro sistemde magnezyum konsantrasyonunda yapılan çok küçük değişiklikler, çok büyük etkilerin ortaya çıkmasına sebep olur.

Etkisi, güvenirliği ve geniş antibakteriyal spektrumu ile florokinolonlar bir çok enfeksiyon hastalığının tedavisinde cazip bir seçenek haline gelmiştir. Ancak bu antimikrobiyallerin yaygın kullanımı nedeniyle bakteriyel direnç gelişiminin hızlanması söz konusu olmaktadır. Anti-bakteriyal ilaçlar olarak florokinolonların iyonlaşma sabitlerinin birkaç uygun yöntem ile tam olarak tayini, etki mekanizmalarının anlaşılmasında ve biyoyararlanabilirlikleri açısından oldukça önemlidir. Bu nedenle bu çalışmada öncelikle, bu bileşiklerin çeşitli çözücü ortamlarında floresans özelliklerinin incelenmesi amaçlanmaktadır.

Florimetri yöntemi, derişimleri 10^{-9}-10^{-6} M olan maddeleri çok büyük bir kesinlik, doğruluk ve seçicilikle tayin etmesi özelliğinden dolayı, ultraviyole spektroskopisi ve atomik absorbsiyon spektroskopisi gibi diğer bazı enstrümental yöntemlere göre bazı üstün özelliklere sahip olduğu görülmektedir. Çevresiyle floresans molekülün çözünme dinamiği, birçok fotokimyasal parametre üzerinde önemli bir etkiye sahiptir. Floresans emisyonunda gözlenen Stokes kayması, genellikle çözücü ve floresans moleküller arasındaki etkileşimden otaya çıkmaktadır.

Floresans spektroskopisi, gelişmiş floresans cihazına dayalı teknikler sayesinde doğru, hassas, hızlı, güvenilir sonuçlara ve yorumlara ulaşılmasını sağlayan optik bir yöntemdir. Tepkime oluşumlarına, etkileşimlerine çok duyarlı ve etkindir.

1.1. Spektroflorimetri

1.1.1. 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.

$$\text{Temel Hal} + \text{UV} \xrightarrow[\text{(uyarma)}]{\text{absorbsiyon}} \text{Uyarılmış Hal} \xrightarrow[\text{(Yayılma)}]{\text{emisyon}} \text{Temel Hal} + \text{Lüminesans} \qquad (1.1)$$

Temel hal: Bir atom veya molekülün en düşük enerjili halidir. Işının belli dalga boyları madde tarafından absorblanırsa (soğurulur, emilir) absorbsiyon denir. Bu enerji maddeyi (yani onu oluşturan atom veya molekülleri) uyarılmış (eksite) hale geçirir.

Bir kimyasal türün ısı, elektrik veya ışın enerjisi ile temel halden üst enerji seviyesine geçmesidir.

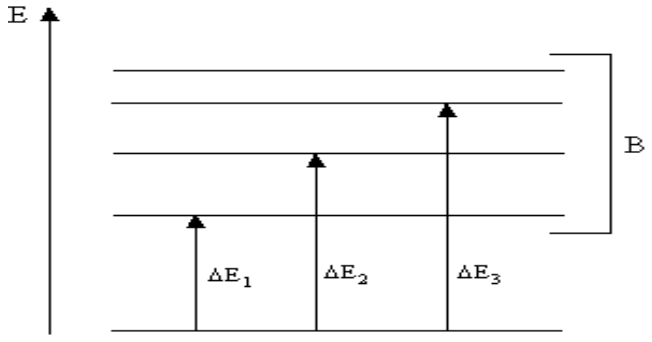
$$X + h\nu \longrightarrow X^* \qquad (1.2)$$

Tanecik eski haline dönerken bu enerji geri verilir.

$$X^* \longrightarrow X + \text{ısı} \qquad (1.3)$$

Uyarılmış madde temel hale dönerken ışın yaymasına emisyon,

$$X^* \longrightarrow X + h\nu \qquad (1.4)$$



Şekil 1.1. Bir atomun uyarılmış halleri

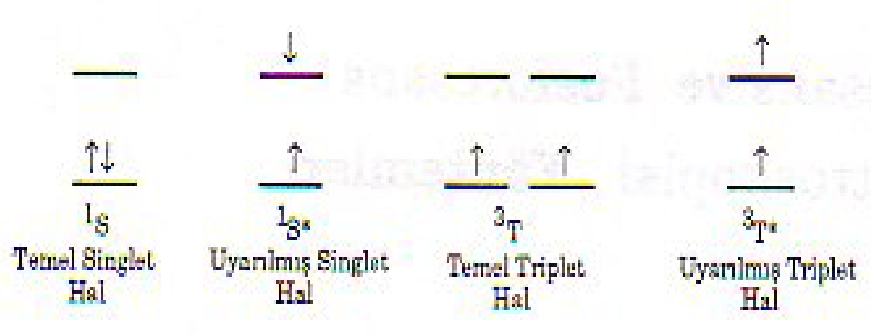
Atom veya molekül temel enerji düzeyine dönerken fazla enerjisinin tümünü veya bir kısmını ışık şeklinde atabilir ve böylece sistemden bir ışık yayılması (ışık emisyonu) gözlenir. Bu ışık yayılması olayına genel olarak **lüminesans** denir.

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

1.1.2. Elektron spini:

Bütün elektron spinlerinin, eşleşmiş olduğu bir moleküler elektronik hal; bir **singlet hal** olarak adlandırılır. Bir atom veya molekülde elektronların en düşük enerjili orbitallere yerleşimi ile atom veya molekülün temel enerji düzeyi veya temel hali oluşur. Elektronların üst enerji düzeylerine yerleşmesi ile atom veya molekülün **uyarılmış hali** oluşur. Uyarılmış bir atom veya molekül kararsızdır, fazla enerjisini atarak temel hale dönmek ister. Molekül bir manyetik alana maruz bırakıldığında elektronik enerji seviyelerinde hiçbir yarılma meydana gelmez. Diğer taraftan, bir serbest radikal için temel hal bir **dublet** halidir. Çünkü, tek elektronun bir manyetik alan içinde, sisteme çok az farklı enerjilerde katkı yapan iki yönlenmeye sahip olduğu kabul edilebilir.



Şekil 1.2. Bir molekülün enerji seviyesi

Bir molekülün bir çift elektronundan biri daha yüksek bir enerji seviyesine uyarılırsa ya bir **singlet** ya da bir **triplet** hal meydana gelir. Uyarılmış singlet halde, uyarılmış elektronun spini temel haldeki elektron ile eşleşmiş durumda, triplet halde, iki elektronun spinleri eşleşmemiş durumda ve böylece paralel durumdadırlar.

Seçim Kuralları: S ➔➔ S T ➔➔ T S ➔/➔ T

Pauli dışarlama prensibi, bir atomdaki iki elektron için dört kuantum sayısının hepsinin birden aynı olamayacağını belirtir. Bu sınırlama, bir orbitalde iki elektrondan daha fazla elektron bulunmamasını ve ayrıca iki elektronun da zıt spinli olmasını gerektirir. Bu şartlar altında, spinler eşleşmiştir. Spin eşleşmesi sebebiyle, moleküllerin çoğu net manyetik alan göstermez ve bu yüzden **diamanyetik** olarak adlandırılır. Yani bunlar, durgun manyetik alan tarafından ne çekilir, ne de itilirler. Buna karşılık, eşleşmemiş elektronlar içeren serbest radikallerin bir manyetik momenti vardır ve bunun sonucu olarak bir manyetik alan tarafından çekilir. Bu yüzden serbest radikaller **paramanyetik** olarak adlandırılır. Uyarılmış triplet haldeki bir molekülün özellikleri, uyarılmış singlet halindekinden önemli derecede farklıdır. Örneğin, bir molekül triplet halde paramanyetik iken, singlet halde diamanyetiktir. Bununla beraber, daha da önemlisi, elektronun halindeki bir değişmeyi de kapsayan, singlet triplet geçişinin, karşı gelen singlet singlet geçişine göre önemli derecede daha az mümkün olması gerçeğidir. Bunun sonucu olarak uyarılmış triplet halinin ortalama ömrü 10^{-4}s den birkaç saniyeye kadar uzayabilir. Bir uyarılmış singlet halin ortalama ömrü ise 10^{-5}-10^{-8}s kadardır.

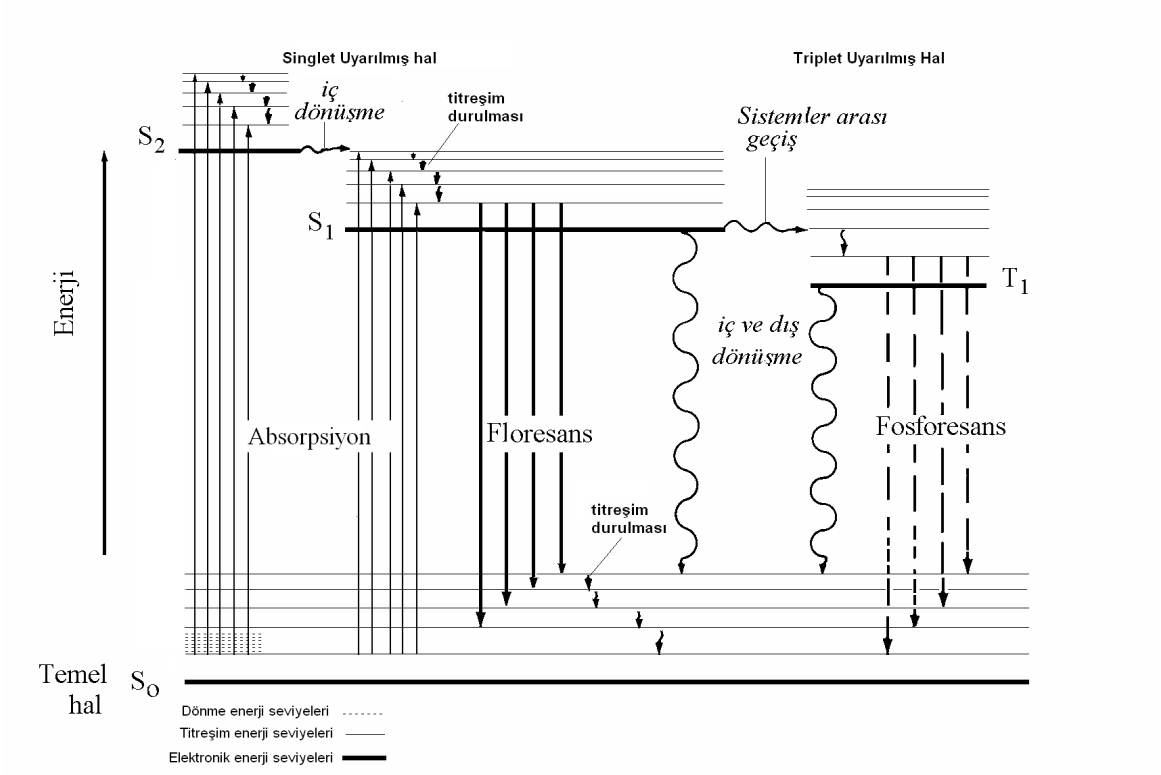
Bir triplet → singlet geçişi, singlet→singlet dönüşümüne göre çok daha az mümkündür. Bu nedenle, uyarılmış triplet halin ortalama ömrü, emisyona göre 10^{-4} s'den daha fazla süreye kadar olabilir. Böyle bir geçişten kaynaklanan emisyon, ışınlanma kesildikten sonra biraz daha sürebilir. Ayrıca, temel haldeki bir molekülün

ışınla, bir uyarılmış triplet hale uyarılması, düşük olasılığa sahiptir ve bu işlem sonucu oluşan absorpsiyon pikIerinin şiddeti, benzer şekilde singlet-singlet geçişine karşı gelenlerinkinden bir kaç kat ondalık mertebesi daha düşüktür. Bazı moleküllerin, bir uyarılmış singlet halinden, bir uyarılmış triplet hale geçebilmesiyle fosforesans oluşur. (ALTINIŞIK, 2004)

1.1.3. 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): $1S_1^* \longrightarrow 1S_0 + h\nu$ (1.13)
2. İç dönüşüm: $1S_c^* \longrightarrow 1S_0 + \text{ısı}$ (1.14)
3. Sistemler arası geçiş: $1S_1^* \longrightarrow 3T^*$ (1.15)
4. Çarpışmalı söndürme: $1S_1^* + Q \longrightarrow 1S_0 + \text{ısı}$ (1.16)



Şekil 1.3. Floresans emisyonunun şematik diyagramı (Jablonski diyagramı)

Bir molekülden floresans ve fosforesans ışınların yayılma mekanizmaları:

S_0) Temel hal ve üzerindeki titreşim seviyeleri,

S_1) Birinci uyarılmış hal ve üzerindeki titreşim seviyeleri,

S_2) İkinci uyarılmış hal ve üzerindeki titreşim halleri,

A) İç geçiş,

B) Sistemler arası geçiş,

C) İç ve dış geçiş,

D) Titreşim relaksasyonu.

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

1.1.4. Floresans

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

$1S_0 + h\nu_1 \longrightarrow 1S^*_{II}$ (uyarılma) (1.6)

$1S^*_{II} \longrightarrow 1S_0 + h\nu_2$ (floresans) (1.7)

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

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

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

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

1.1.5. Fosforesans

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

$$^1S_0 + hv_1 \rightarrow {}^1S^*_{II} \text{ (uyarılma)} \qquad (1.8)$$

$$^1S^*_I \rightarrow {}^3T^* \text{ (sistemlerarası geçiş)} \qquad (1.9)$$

$$^3T^* \rightarrow {}^1S_0 + hv_3 \text{ (fosforesans)} \qquad (1.10)$$

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

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

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

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

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

Floresans ışın yayan maddelerin ışın yayma ömrü, fosforesans ışın yayan maddelerin ömründen daha kısadır. Şöyleki, floresans maddelerin ışın yayma ömrü genel olarak 10^{-5}-10^{-8} saniye olduğu halde, fosforesans maddelerinki, genel olarak 10^{-4}

saniyeden çok daha fazla, dakikalar, hatta saatler sürebilir. Buna karşılık floresans kimyasal analizlerde, fosforesansa göre daha çok yaygın olarak kullanılır.

Hatta bazen saatlerle ifade edilecek kadar uzundur. Örneğin, kaydedilmiş en uzun olaya, Willemite $ZnSi0_3$ ın ömrü 340 saattir. Fosforesansından dolayı özel bir örnektir Böylece, çoğunlukla organik molekülleri kapsayan birçok fosforesant madde, ultraviyole kaynağı uzaklaştırıldığı anda gözle sezilmezken, floresans ışıması devam eden inorganik minerallerin sayısı oldukça fazladır. Maddenin floresans ışınlarını yayması genelde, madde üzerine ultraviyole ışınları gönderilmesiyle gerçekleşir. Bu nedenle, floresans ışınlarının dalga boyları yaklaşık 380-720 nm arasında değişir. Bunlar da gözle görülebilir. Ancak gözle görünen ışınlarla, uyarılan maddelerden bazılarının yaydığı ışınlar yakın infrared bölgesine kayar ve gözle görülmez. Hem floresans, hem de fosforesans metodu çok hassastır. Milyardalarla ifade edilecek kadar düşük konsantrasyonlara uygulanabilir. Ayrıca bu spektroskopilerle konsantrasyon çalışma aralıkları, absorpsiyon spektroskopisindeki konsantrasyon çalışma aralıklarından genelde daha geniştir. Bu metotların bir başka üstün yanları da daha spesifik olmalarıdır. (bir maddenin tayini yapılırken, bir başka maddenin bu tayini karıştırma veya bozma ihtimalinin az olmasıdır) Buna karşılık bu metotların uygulanma alanları oldukça sınırlıdır. Zira floresans özelliği gösteren maddelerin sayıları az, fosforesans özelliği gösterenlerinkiyse, daha da azdır. Öte yandan floresans ışınları, fosforesans ışınlarından genellikle daha şiddetlidir.

Floresans, maddenin katı, sıvı ve gaz hallerinde görülen bir olay olmasına karşılık fosforesans, maddenin genelde katı halinde görülen bir olaydır. Katıların fosforesansı oda sıcaklığında kolaylıkla gözlenirken, çözeltilerin fosforesansını oda sıcaklığında gözlemek çoğunlukla imkansızdır. Çünkü uyarılmış türlerle çarpışmalarda absorplanan enerjiyi içeren oksijen molekülleri, fosforesansı söndürmektedir. Bundan sakınmak için çözeltiler sıvı azotta (77 °K) soğutulur ve donmaya bırakılır. Böyle çözeltiler "rijit (bükülmez, katı) çözeltiler'' olarak ifade edilirler. Böyle çözeltileri hazırlamak için çoğunlukla kullanılan iki organik çözücü etanol ve etil eter-izopentan-etanol karışımı olan EPA'dır.

1.1.6. Rezonans floresansı

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

$$M + h\nu \rightarrow M^* \qquad (1.11)$$

$$M^* \rightarrow M + h\nu_1 \qquad (1.12)$$

şeklinde gösterilir. Madde önce ışın enerjisini (hv) 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 hv > $h\nu_1$‘ dir. Ancak hv ‘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.

1.1.7. Stokes kayması

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

Stokes kayması olayını daha iyi anlamak için, Şekil 1.7.a’da görüldüğü gibi, bu ışımanın absorpsiyonuyla bir elektron ikinci uyarılmış hal olan E_2’nin 4 sayılı titreşim düzeyine yükseltilir. E_2 düzeyinin sıfır sayılı titreşim düzeyine titreşimsel durulmalar 10^{-15} s ve daha kısa bir sürede oluşur. Şekil 1.7-b. Bu noktada sonraki durulmalar ya Şekil 1.7-b’deki ışımasız yolla veya Şekil 1.7.’deki gibi ışımalı şekilde olabilir. Işımalı yol izlenirse, temel halin çeşitli titreşim düzeylerinden herhangi birinde son bulan durulma, gösterilen bantlardan birisini (bant 2) oluşturur. Bu çizgilerin hepsi, uyarma çizgisi λ_5’e göre daha uzun dalga boyuna veya daha düşük enerjiye sahiptir.

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

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

1.1.8. Absorpsiyon ve emisyon hızları

Çeşitli dalga boylarında ışın içeren bir demet, şeffaf bir ortamdan geçirilirse, içinden bazı dalga boylarının kaybolduğu görülür. Böylece ışın absorplanır. Absorpsiyonla ışın enerjisi maddenin iyon, atom veya moleküllerine aktarılır. Böyle ışın enerjisini absorplamış olan atom, iyon veya moleküller uyarılmış hale geçerler. Uyarılmış bir atom veya molekül 10^{-8} sn kadar yaşayabilir. Sonra absorpladığı ışın enerjisini geri vererek tekrar eski haline veya temel haline döner. Madde tarafından absorplanan ışın enerjisinin geri verilmesi, genellikle ısı şeklinde olur ve madde çok az ısınır. Maddenin titreşim enerjisi artar. Atomların ve iyonların sınırlı sayıda uyarılmış halleri vardır. Bu nedenle sınırlı sayıda ışın enerjisini veya sınırlı sayıda ışın dalgalarını absorplarlar. Atomik absorpsiyon ve Moleküler absorpsiyon olmak üzere 2 tür vardır. Bir maddenin temel haliyle uyarılmış halleri arasındaki enerji farkları başka bir maddeninkinden farklı olduğundan, her maddenin kendine özgü bir absorpsiyon spektrumu vardır.

Bir ışın fotonunun absorplanma hızı çok büyüktür. Bu işlem 10^{-14}-10^{-15} saniyede tamamlanır. Diğer taraftan, floresans emisyonu önemli derecede daha yavaş hızda oluşur. Burada, uyarılmış halin ömrü, uyarılma işlemine karşılık gelen absorpsiyon pikinin molar absorptivitesi ile ters orantılıdır. Bu nedenle, 10^3-10^5 aralığındaki molar absorptiviteler için uyarılmış hallerin ömrü 10^{-7}-10^{-9} s'dir. Geçiş olasılığının daha küçük olduğu zayıf absorplayıcı sistemler için ömür, 10^{-6}-10^{-5} s kadar uzun olabilir. Önceden

de belirttiğimiz gibi, tripletten singlete geçişin ortalama hızı, buna karşılık gelen singlet-singlet geçişininkinden daha azdır. Bu nedenle, Fosforesans emisyonu 10^{-4}-10 s veya daha fazla bir süre gerektirir.

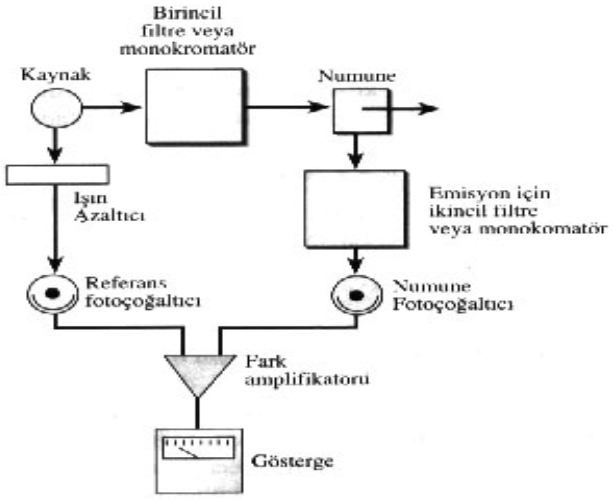
Uyarılmış bir molekül temel haline birkaç mekanik basamağın bir birleşimi yoluyla dönebilir. Şekilde düz düşey okların gösterdiği gibi, bu basamakların ikisi, bir ışın fotonunun yayımını içeren floresans ve fosforesanstır. Dalgalı oklarla gösterilen diğer sönüm basamakları ışımasız olaylardır. Temel hale geçişte en tercih edilen yol, uyarılmış halin ömrünü en az yapan yoldur. Bu yüzden, ışımasız geçişlere göre floresans ile sönüm hızlı ise, bir emisyon gözlenir. Diğer taraftan, eğer bir ışımasız yol daha büyük hız sabitine sahipse, floresans ya yoktur ya da çok düşük şiddettedir

1.1.9. Spektroflorimetreler

Fotolüminesans ölçülmesi için kullanılan cihazların çeşitli bileşenleri, ultraviyole görünür bölge fotometreleri veya spektrofotometrelerinde bulunanlarla benzerdir. Şekilde florimetreler ve spektroflorometrelerdeki bu bileşenlerin tipik bir dizilişi görülmektedir. Hemen hemen bütün floresans cihazlarında güç kaynağındaki dalgalanmaları dengelemek (etkisini gidermek) için çift-ışınlı optik sistem kullanılır. Numuneden gelen ışın, önce floresans uyaracak ışınları geçiren, fakat floresans emisyonunun dalga boyundaki ışınları dışarıda tutan veya sınırlayan bir uyarılma filtresinden veya bir monokromatörden geçer.



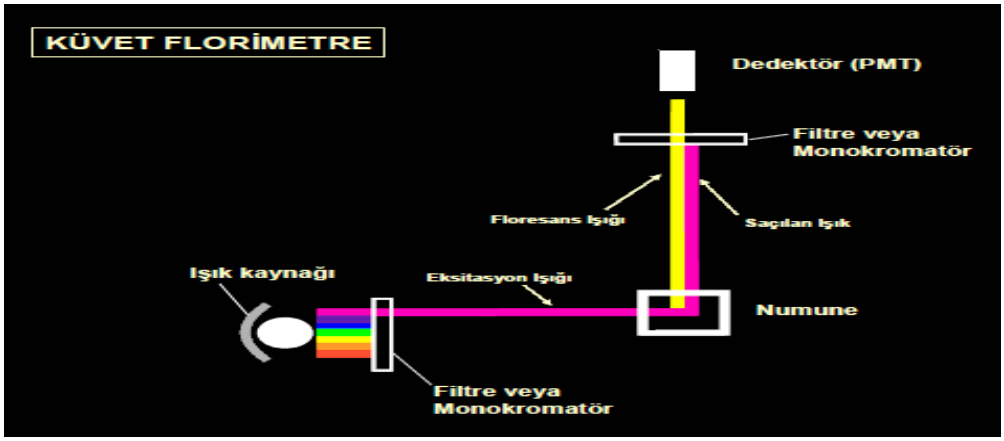
Şekil 1.4. Fotolüminesans ölçümleri için kullanılan cihaz.



Şekil 1.5. Bir Xe ışık kaynağı kullanan 90 ile florimetre şematik ° geometri

Floresans numuneden bütün yönlere doğru olur, fakat en uygun şekilde floresans uyarma ışınına dik açıdan gözlenir. Diğer açılarda çözeltiden ve hücre duvarlarından oluşan saçılma, şiddet ölçümünde büyük hatalara sebep olabilir. Yayılan ışın, ölçme için floresansı ayıran ikinci bir filtreden veya monokromatörden geçtikten sonra bir dedektöre ulaşır. Referans ışın demeti ise, ışığın gücünü yaklaşık olarak floresans ışınlarınkine azaltan bir azaltıcıdan geçer (güç azaltılması 100 kat veya daha fazladır). Referans ve numune fotoçoğaltıcı tüplerden gelen sinyaller, sonra çıktıyı bir metreye veya kaydedici ile gösteren bir fark yükselticisine gönderilir.

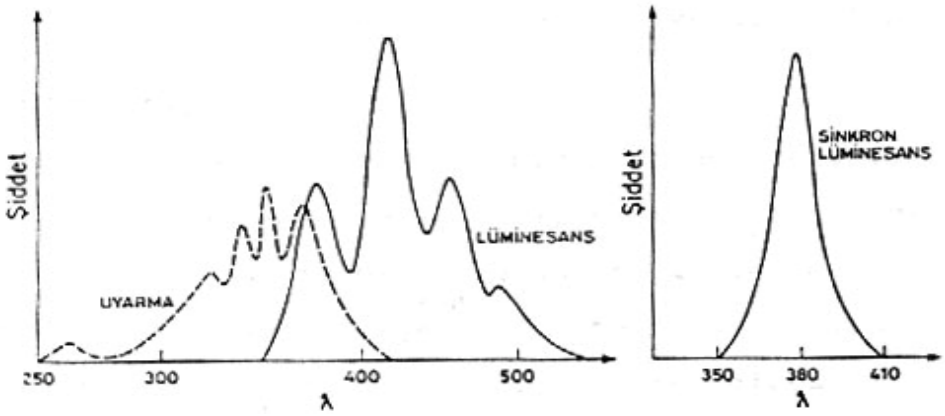
Ultraviyole (UV) ve görünür bölgede ışık yayan bir ışık kaynağından gelen ışık bir monokromatörden (uyarma monokromatörü) geçtikten sonra örneğe gönderilir. Örnekten kaynaklanan lüminesans genellikle uyaran ışığa göre 90° lik bir açıdan toplanarak dedektöre ulaşır. Böylece örneği uyaran ışığın dedektöre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



Şekil 1.6. Floresans spektroskopisi

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

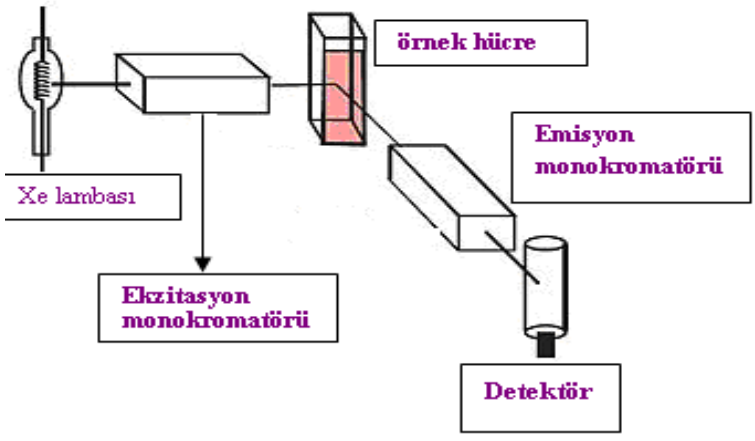
Uyarma dalga boyu sabit tutulup, emisyon monokromatöründeki dalgaboyu ayarı değiştirilirse, örnek için lüminesans spektrumu elde edilir. Lüminesans spektrumu, uyarma spektrumundan daha uzun dalgaboyu bölgesindedir. Hem uyarma hem de emisyon monokromatöründeki dalgaboyu ayarları aralarında belli bir dalgaboyu farkı, $\Delta\lambda$, uygulanarak ve aynı hızda birlikte değiştirilerek lüminesans ölçümü yapılabilir. Bu tür spektrum elde etme yöntemine **senkron spektroflorimetri yöntemi** denir. 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 1.7. Antrasenin uyarma, lüminesans ve senkron lüminesans spektrumları

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

Fotolüminesans ölçümlerinden önce, uyarma ve emisyon spektrumu ve lüminesans kuantum verimi bilinen bir madde ile (örneğin kinin sülfat çözeltisi) ölçüm yapılarak, aletin kalibre edilmesi gerekir. Görünür bölge ve mor ötesinde lüminesans gösterdiği bilinen yaklaşık 3000 organik bileşik için kabaca tayin alt sınırı 1 ppm olarak verilmektedir.



Şekil 1.8. Spektroflorimetre

1.1.10. 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,

3-Çözücü etkisi,

4- pH etkisi,

5- Konsantrasyonun etkisi,

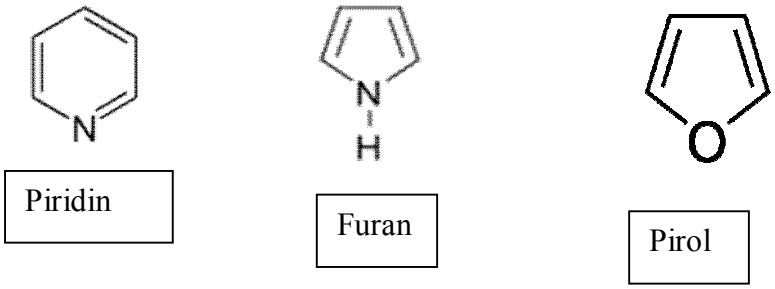
6- Viskozite etkisi,

7. Çözünmüş oksijen ve paramagnetikler,

8. Gelen ışının dalga boyunun ve şiddetinin etkisi,

9. Floresans Üzerine Grupların Etkisi (Gündüz, 1995),

1.1.10.1. Molekül yapısının etkisi

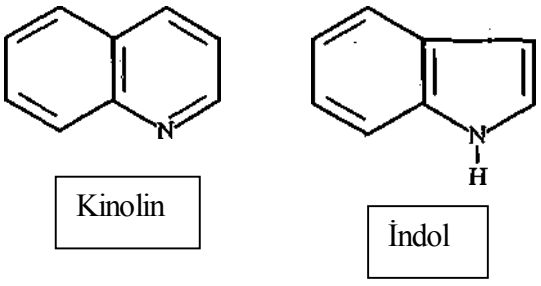


Şekil 1.9. Piridin, pirol ve furan gibi heterosiklik halkalar

Moleküllerde düzlemsellik, dönmenin engellenmiş olması ,konjugasyon ve halka sayısının artması genellikle floresans verimini arttırır. En şiddetli floresans ışınlarını yapısında düşük enerjili $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişine imkân veren aromatik halka ihtiva eden bileşikler verir. Ayrıca yapısında çok sayıda konjüge çifte bağ ihtiva eden alifatik ve alisiklik aromatik halkalar da floresans özellik gösterirler. Ancak, bunların sayısı aromatik bileşiklerin sayısına göre çok azdır. Bunlardan başka karbonil grubu içeren alifatik ve alisiklik bileşiklerle çok sayıda çifte bağ içeren konjuge sistemler de

floresans özelliği gösterirler. Bu özellikleri aromatik halkaların kondesasyonuyla daha da artar.

Bir çok sübstitüe olmamış aromatik bileşik floresans özellik gösterir. Bunların kuvantum verimleri halka sayısıyla ve bu halkaların kondanse olma dereceleriyle orantılı olarak artar. Ancak, aromatik olmalarına rağmen, floresans özelliği göstermeyen bileşikler de vardır. Bunlara pridin, furan, pirol gibi maddeler örnek verilebilir. Bunun nedeni, böyle bileşiklerde en düşük enerjili geçişin $n \rightarrow \pi^*$ olmasıdır. Bu tip bir geçiş sonucu uyarılan maddeler kolaylıkla triplet hale geçerler ve sadece fosforesans özelliği gösterirler. Buna karşılık bunlara bir benzen halkası kondense olursa, molar absorptiviteleri artar. Molar absorptivitesi artan bir maddenin uyarılmış halinin ortalama ömrü çok kısalır. Ömrü böyle kısa olan maddeler de şiddetli floresans ışını yayarlar. Buna göre yukarıda verilen heterosiklik aromatik halkalardan meydana gelen kinolin, indol gibi maddeler oldukça şiddetli floresans özelliği gösterirler.



Şekil 1.10. kinolin ve indol gibi heterosiklik halkalar

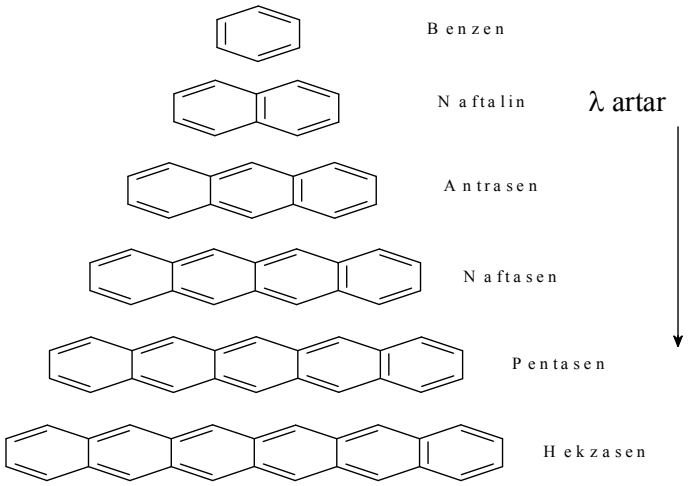
Azot içeren basit heterosiklik halkalarda $n \rightarrow \pi^*$ düşük enerjili elektronik geçişleri olduğundan ,bunlarda haller arası geçiş daha kolay olur ve uyarılmış singlet hal kolayca uyarılmış triplet hale dönüşür. Triplet halden temel hale dönüş ise fosforesans yayma yoluyla olur ve fosforesansın olduğu yerde de floresans azalır veya yok olur. Buna karşılık azotlu bir aromatik halka olan piridin , aromatik bir halkaya kondense olursa, kinolinde görüldüğü gibi floresans özelliği görülür. İndol, izokinolin gibi azot içeren kondense bileşikler de floresans özelliği gösterirler (Gündüz, 1995).

1.1.10.1.a. Konjügasyon etkisi

En şiddetli ve en faydalı floresans, düşük enerjili $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişlerine sahip aromatik fonksiyonel gruplar 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. Konjügasyona hem aromatik hem de alifatik bileşiklerde rastlanır. Bu iki bileşik türü karşılaştırıldığı zaman; aromatik konjügasyonda π elektronları delokalize durumda, alifatik konjügasyonda ise lokalize durumda olduğu görülür. Yani π elektronları aromatik bileşiklerde düşük bir enerjiyle uyarılabilirken alifatik bileşiklerde molekül yapısını bozmadan uyarılabilecek kadar gevşek bağlı değildirler. Ancak alifatik karbonil bileşikleri floresans kuantum verimini çok düşük olacak şekilde bir floresans yapabilirler. Çünkü karbonil oksijeni üzerindeki bağ yapmamış elektron çifti π* orbitaline düşük bir enerji ile uyarılabilir. Yukarıda belirtildiği gibi aromatik bileşiklerde konjuge durumdaki çift bağların π elektronları delokalize durumdadır. Halka sayısı arttıkça delokalizasyon da artar. Bunun sonucu olarak da halka sayısı arttıkça floresans şiddeti artar.

Benzende floresans yüksek enerjili fotonlarla gerçekleştirilirken pentasende düşük enerjili fotonlarla olmaktadır. Benzendeki floresans daha yüksek enerjili olan UV bölgede olurken, pentasendeki floresans görünür bölgede olur (Gündüz, 1995).



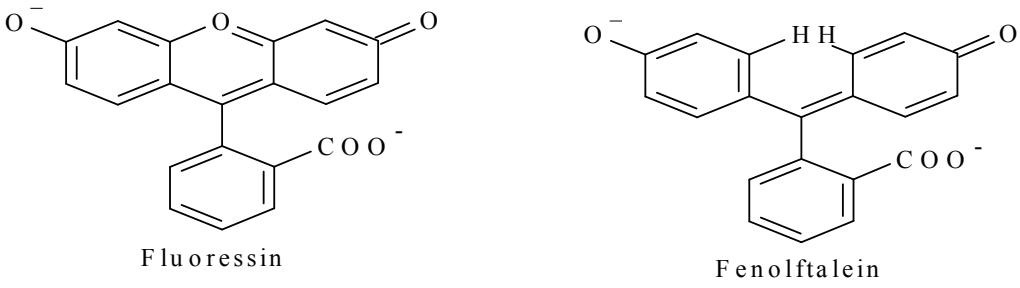
Şekil 1.11. Halka sayısı çok olan aromatik bileşikler

1.1.10.1.b. Molekülün rijitliğinin ve düzlemselliğinin etkisi

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

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

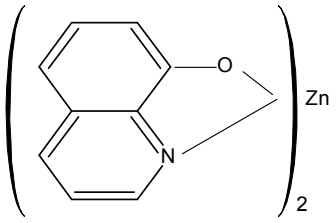
Örnek olarak, yapıları birbirine çok benzeyen floressein ve fenolftalein moleküllerini ele alalım. Floresseinin alkol-su karışımındaki çözeltisi çok kuvvetli floresans olduğu halde, fenolftaleinin çözeltisi floresans özellik göstermez (Gündüz, 1995).



Şekil 1.12. Floressein fenolftalein gibi heterosiklik halkalar

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

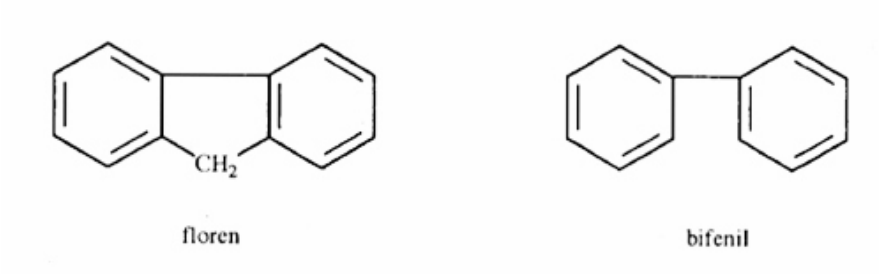
Şelat kompleksi veren bir ligand bir katyonla kompleks verdiği zaman rijiditesi artar ve dolayısıyla floresans emisyonu artar. Örneğin, çinko katyonuyla 8-hidroksikinolinin verdiği kompleks şiddetli floresanstır.



Şekil 1.13. Çinko katyonu 8-hidroksikinolinin verdiği kompleks

Yapısal rijitlik (yapısal esnemezlik) floresansı artıran bir faktördür. Bir molekülün yapısının rijid olması onun floresans özelliğini arttırır. Floresans özelliği gösteren bir boya bir yüzeyde absorbe edilince emisyon şiddeti daha da artar. Bunun

nedeni, boyanın tutulduğu yüzeyde rijiditesinin artmasıdır. Bu, florenle bifenilin kuvantum verimleri karşılaştırılarak gösterilebilir. Şöyleki, aynı şartlarda florenin kuvantum verimi yaklaşık %100 iken, bifenilinki 0,2 dir. Florenin floresansı, bifenilden 5 defa daha şiddetlidir. Florenle, bifenil arasındaki başlıca fark florendeki fazladan bir metilen grubudur. Bu grubun kendisinin floresans özelliği hiç yoktur. Görevi sadece iki fenil grubunun birbirine göre durumlarını tespit etmek ve molekülü daha rijit hale getirmektedir (Gündüz, 1995).



Şekil 1.14. Floren ve Bifenil

1.1.10.1.c. Moleküldeki sübstitüentlerin etkisi

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

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

sübstitüentlerin etkisini benzen halkası ve benzen halkasına bazı sübstitüentler üzerinde incelenecek olursa, benzen halkasının sübstitüsyona uğradığı hem absorpsiyon ,hem de floresans bandında bir değişmenin olduğu ve floresans şiddetinin de değiştiği görülür (Gündüz, 1995).

Çizelge 1.1. Benzenin floresans özelliğine sübstitüsyonların etkisi(etanol içinde)

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

Lüminesent bir bileşikteki, bileşiğin (π) elektronlarını delokalize edebilen sübstitüentler genellikle, uyarılmış singlet hal ve temel hal arasında oluşan muhtemel bir ışık geçişini arttırır. Bu sonuç floresansı da arttırır. Genellikle orto-para pozisyonundaki sübstitüentler halkaya elektron verirler ve muhtemelen oluşacak floresansı arttırırlar. Meta- pozisyonundaki sübstitüentler halkadan elektron çekerler ve muhtemel floresansı azaltırlar. Aromatik bileşiklerin floresansına bilinen bazı sübstitüentlerin etkileri aşağıdaki çizelgede verilmiştir (Gündüz, 1995).

Çizelge 1.2. Emisyon dalga boyu ve floresans şiddetine sübstitüentin etkilerinin listesi

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

Sübstitüentler arasında halojenlerin farklı bir yeri vardır. Şöyleki: halojen sübstitüsyonda, halojenin atom numarasının artmasıyla maddenin floresans şiddeti azalır. Örneğin, benzenin floresans şiddeti 10 kabul edilirse, florobenzenin de 10 dur. Buna karşılık klorobenzenin 7, bromobenzenin 5 ve iyodobenzenin sıfırdır. Buna daha önce de söylendiği gibi **ağır atom etkisi** denir. Ağır atom etkisinde kalan bir madde kolayca triplet hale geçer ve floresansı azalır veya sıfır olur. İyodun floresans üzerine etkisi kısmen de olsa predissosyasyonla açıklanabilir. Başka bir deyişle iyodobenzende kolayca kopacak bir bağ bulunur. Benzen halkasına bir karboksilik grubu sübstitüe olursa, halkanın floresans emisyonu azalır. Çünkü, böyle bir sistemde daha düşük enerjili n - π* geçişi vardır. Bu geçişin floresans özelliğiyse π - π* geçişininkine göre çok daha zayıftır. Kısaca molekülün bünyesinde veya molekülün çözündüğü çözücüde bulunan bir ağır atom (I veya Br gibi) molekülün floresans verimini azaltır, triplet oluşumu verimini arttırır ve bu nedenle genellikle fosforesans verimi artar (Gündüz, 1995).

1.1.10.2. Sıcaklık

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

1.1.10.3. Çözücü etkisi

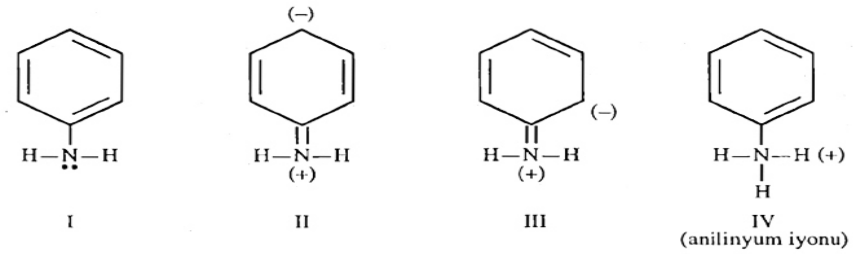
Kullanılan çözücüler floresans şiddetinin veya floresansın görüldüğü dalga boyunun değişmesine neden olabilir.Çözücünün genellikle uyarılmış durumundaki moleküller ile H bağı oluşturması temel hale ışımasız dönüş işleminin hızını arttırdığından floresansın şiddetinde azaltma olur. Çözücünün polarlığının artmasıda floresansı etkiler. Çünkü, polar çözücüler n→π* geçişlerinde enerji farkını genellikle artırarak floresans ışımasını azaltır. Bazı hallerde π→π* geçişinin enerjisi n→π* geçişininkinin altına bile düşer. İçinde ağır atomlar içeren çözücüler, örneğin, karbontetraklorür ve etiliyodür, floresans ışımasının şiddetini azaltır. Ağır atomlar floresant madde üzerinde olduğu zaman da aynı özelliği gösterirler. Atom numarası arttıkça spin ve toplam orbital momentleri arasındaki etkileşmeler büyür ve uyarılmış

triplet hale dönüşmesi olasılığı artar. Triplet hal fosforesansı artırıp, floresansı azaltır (Gündüz, 1995).

1.1.10.4. pH etkisi

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

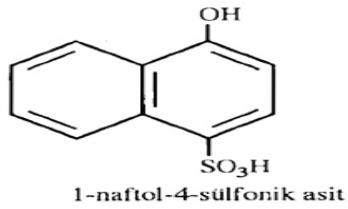
Asidik veya bazik bir sübstitüent ihtiva eden aromatik bir maddenin floresansı ortamın pH'na bağlıdır. Böyle maddelerin iyonlaşmış ve iyonlaşmamış (molekül) hallerinin hem floresans şiddetleri, hem de yaydıkları floresan ışınların dalga boyları birbirinden farklıdır. Bunlara anilin ve fenolün molekül ve iyon halleri örnek verilebilir (Gündüz, 1995).



Şeki1 1.15. Anilin aromatik bileşiğinin molekül ve iyonlaşmış hali

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 hallerim uyarmak, daha uzun dalga boylu ışınlarla gerçekleşir. Buna karşılık anilinyum iyonu floresans vermez veya çok az verir. Anilinyumun rezonansı, benzenin rezonansı kadardır. Benzense bilindiği gibi çok zayıf floresans verir. Bu da kantitatif amaçlar için kullanılamaz. Bu olay ,asit ve baz indikatörlerinin pH ile değişmesine benzer. bundan yararlanarak renkli çözeltilerin titre edilmeleri teklif edilmiştir. Örneğin, l-naftol-4-sülfonik asidin fenolik halinin (sadece sülfonik asit grubundaki protonun verilmiş hali) floresansı, ultraviyole bölgesinde olduğundan gözle görülemez. Buna karşılık fenolat halinin (fenol protonu da verilmiş) floresansı gözle görülebilir. Bu değişme çok küçük bir pH aralığında

gerçekleşir. Bu özelliğinden yararlanılarak madde ayarlı bir bazla titre edilebilir (Gündüz, 1995).



1-naftol-4-sülfonik asit

Şeki1 1.16. l-naftol-4-sülfonik asit

Bazla maddenin sülfonik asit grubunun titrasyonu sona erip de fenol grubu titre edilmeye başlanınca, floresans görülür ve bu anda titrasyona son verilir. İşin en ilginç yönü, bu değişmenin fenol protonundan beklenenden daha aşağı bir pH da gerçekleşmesidir. Bunun nedeni uyarılmış halin asitin sabitinin,temel halin asit 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 hız 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, 1995).

1.1.10.5. Konsantrasyonun etkisi

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

1.1.10.6. 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.

1.1.10.7. Çözünmüş oksijen ve paramagnetikler

Çözünmüş oksijen genellikle floresans ışımasının şiddetini azaltır. Bunun nedeni, maddenin fotokimyasal indüksiyonla oksitlenmesidir. Ancak, genellikle paramanyetik oksijen mokelünün etkisiyle bağlanma yoluyla söndürme (quenching) olayı meydana gelir. Bu sistemler arası geçişi ve dış geçişi etkiler ve triplet hal ortaya çıkar. Moleküler oksijen paramagnetik olduğundan, singlet halin triplet hale dönüşmesini kolaylaştırıp floresansını azaltır. Bu nedenle analizden önce çözeltiden çözünmüş oksijenin 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 (Gündüz, 1995).

1.1.10.8. Gelen ışının dalga boyunun ve şiddetinin etkisi

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

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

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

1.1.11. Fotolüminesans teorisi

Fotolüminesans boyunca yayılan radyasyonun miktarı, absorblanan radyasyonun (ışığın) miktarına bağlıdır. Mümkün olan uyarılmış bir molekül radyasyonsuz bir enerji

kaybıyla temel enerji düzeyine geri döndüğü için, yayılan radyasyonun fotonlarının sayısı genellikle absorblanan radyasyonunun fotonlarının sayısından daha az olur. Kuantum ürünü, kuantum verimini veya lüminesans verimini Φ, absorblanan fotonların sayısının yayılan fotonların sayısına oranı olarak verilebilir. Kuantum verimini, floresansın normal formları boyunca biri geçmemelidir. Belirlenen deney şartlarında belli bir maddenin kuantum verimi sabittir. Yayılan radyasyonun ışık şiddeti F, kuantum veriminin ve absorblanan radyasyonun şiddeti cinsinden şöyle yazılabilir (Gündüz, 1995).

$$F = \Phi(I_0 - I) \qquad (1.13)$$

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

$$I_a = I_0 - I \qquad (1.14)$$

Geçen ışığın (radyasyonun) şiddeti Beer yasasından hesaplanabilir.

$$A = \varepsilon lC = -\log \frac{I}{I_o} \qquad (1.15)$$

ε : Maddenin molar absorblanma katsayısı

C : Çözeltideki çözünen maddenin molar konsantrasyonu

l: optik ışık yolu

Geçen ışık şiddetine göre Beer yasasının çözümü verilirse:

$$I = I_o 10^{-\varepsilon lC} = I_o e^{-2,303\ \varepsilon lC} \qquad (1.16)$$

Eşitlik 1' de I yerine yukarıdaki eşitlikteki değeri yazılırsa

$$F = \phi\left[I_o - Ie^{-2,303\,\varepsilon lC}\right] \qquad (1.17)$$

Yukarıdaki eşitlikteki üstel ifadeler sonsuz seriler şeklinde yazılırsa;

$$ex = 1 + X + \frac{X^2}{2!} + \frac{X^3}{3!} + \ldots\ldots + \frac{X^n}{n!} \qquad (1.18)$$

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

$$F = \phi I_o \left[1 - 1 + 2{,}303 \varepsilon lC - \frac{2{,}303 \varepsilon lC}{2} + \frac{2{,}303 \varepsilon lC}{6} - ..... \right] \quad (1.19)$$

$$F = \phi I_o \left[2{,}303 \varepsilon lC - \frac{2{,}303 \varepsilon lC}{2} + \frac{2{,}303 \varepsilon lC}{6} - ..... \right] \quad (1.20)$$

Seyreltik çözeltiler için absorbans (εlC) küçüktür. (εlC), 0,05 e eşitse Eşitlik 1.33'deki serilerin ikinci terimi, birinci terimin % 2,5'u kadardır ve bunu takip eden terimler daha küçük veya eşittir. Analitin konsantrasyonu sabit alınmak suretiyle absorbans 0,05'den küçük tutulursa birinci terim hariç serilerdeki terimlerin tümü, ihmal edilir ve Eşitlik (1.8) şu şekilde basitleştirilir.

$$F = \phi I_o \, 2{,}303 \, \varepsilon lC \quad (1.21)$$

Eşitlik (1.9)' dan görüldüğü gibi seyreltik çözeltiler için (10^{-8}–10^{-5}M) yayılan fotolümine-sansın şiddeti kuantum verimi, gelen veya absorblanan ışığın şiddeti ve analitin konsantrasyonuyla orantılıdır. Çoğu laboratuar cihazlarında yalnızca dedektöre gelen toplam lüminesansın sabit bir kesri, f, ölçülür ve bu denkleme, dedektörün cevabı için de bir değerin "R" ilave edilmesi gerekir. Bu iki faktörün ilavesi ile Eşitlik (1.9) şöyle verilir:

$$F = 2{,}303 \, fR \, \phi I_o \varepsilon lC \quad (1.22)$$

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

$$F = K . I_0 . C \quad (1.23)$$

eşitlik (1.11)'da I_0 da sabit yapılırsa, C'den başka hepsi sabit olacağından tümü K sabitiyle gösterilebilir. Sonuç olarak, floresans ışın şiddetiyle konsantrasyon arasında:

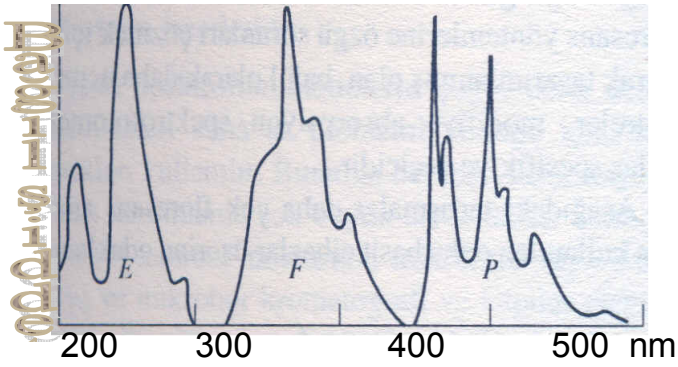
$$F = K'C \quad (1.24)$$

bağıntısı kurulur. K' sabiti konsantrasyonu düşük ve belli bir takım çözeltilerin F floresansı ölçmek suratiyle hesaplanır. Absorbansı küçük ($A<0.05$) çözeltilerde floresans şiddeti konsantrasyonla doğru orantılıdır ve doğrunun eğimi K' yı verir. Ama konsantrasyon arttıkça doğru sağa doğru bir bükülme olur. Yani floresans konsantrasyonla orantılı olarak artmaz. Bunun nedeni: Self-söndürme ve Self absorpsiyondur (Gündüz, 1995).

Self-söndürme, floresant moleküllerin birbirlerine çarparak enerjilerini birbirlerinin enerjice daha düşük olan taraflarına aktarmaları ve böylece radyasyonsuz bir enerji kaybı olmasıdır. Bu floresant taneciklerle çözücü molekülleri arasında meydana gelen dış dönüşmeye benzer. Bu olay konsantrasyonun artmasıyla artar. Kendi kendini söndürme olayında, iki uyarılmış molekül veya tanecik çarpışır ve bu çarpışmadan yeni kompleks bir molekül meydana gelir. Yüksek derişimlerde kendi kendine sönüm ve kendi kendine absorpsiyon nedeniyle negatif sapma gösterir.

Bir uyarma spektrumu, uyarma dalgaboyu değiştirilirken, sabit dalgaboyunda lüminesansın ölçülmesiyle elde edilir. (aynı şartlarda elde edilen absorpsiyon spektrumu ile aynıdır). Floresans ve fosforesans spektrumları dalgaboyunun bir fonksiyonu olarak emisyon şiddeti kaydedilirken sabit dalgaboyunda uyarılmayı kapsar.

Fotolüminesans genellikle uyarma dalgaboyundan daha uzun dalgaboylarında olur. Ayrıca fosforesans bantları floresans bantlarından daha uzun dalgaboylarında olur. Çünkü triplet uyarılmış enerji seviyesi genelde singlet uyarılmış enerji seviyesinden daha düşük enerjilidir.



E, uyarma;
F, floresans;
P, fosforesans

Şekil 1.17. Fenantren için spektrumlar

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

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

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

Kendi ışınını absorplama olayındaysa uyarılmış bir molekülden yayılan floresan ışın uyarılmamış aynı tür bir molekül tarafından absorplanır. Böyle bir absorplamanın olabilmesi için, yayılan floresan ışının dalga boyunun, numunenin absorpladığı uyarıcı

ışınlardan birinin dalga boyuna uyması gerekir. Bilindiği gibi bir molekülün bir kaç dalga boyunda absorpsiyon piki vardır. Bir ışının bir molekül tarafından absorplanabilmesi için, o ışın enerjisinin, moleküldeki bağların birinde bulunan bir elektronun bir üst seviyeye çıkarılma enerjisine eşit olması gerekir (Gündüz, 1995).

Bu son iki olayın etkisi altında floresans konsantrasyon bağıntısı bazen maksimumlu bir eğri şeklini bile alır. Floresans konsantrasyon arttıkça artar, ancak belli bir noktada konsantrasyon çok fazla arttırıldığında artık konsantrasyonla orantılı olarak artmaz ve hemen hemen sabit kalır. Bir molekülün floresans etki gösterebilmesi için önce üzerine gönderilen ışımayı soğurması gerekmektedir.

Absorbans yaklaşık 0,05'den çok daha büyük olduğunda Eşitlik (1.12) deki parantez içerisinde olan ilk terim dışındaki terimler bir anlam taşır ve lüminesans şiddeti ile konsantrasyon arasında doğrusal (lineer) olmayan bir bağıntı söz

konusudur. Absorbans çok büyük olduğu zaman Eşitlik (1.12) basit bir şekilde

$$F = \phi \mathrm{I}_o \qquad (1.25)$$

ile verilir. Ve lüminesans şiddeti böyle konsantrasyondan bağımsız olmaktadır. Eşitlik (1.13)' ün esası, gelen ışın şiddetinin hücrenin her yerinde aynı olduğunu kabul eder.

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

Sonuç olarak seyreltik çözeltilerde nicel analiz, kalibrasyon eğrisi oluşturularak veya standart ekleme yöntemine göre gerçekleştirilir. Çözeltide bulunan bir madde, lüminesant bir maddenin yaydığı ışığı söndürüyor yani azaltıyorsa, lüminesansı önleyen bu maddenin de nicel analizi yapılabilir. Lüminesanstaki azalma, genellikle, bu önleyici maddenin miktarı ile doğru orantılıdır. Burada da, lüminesans şiddetinin azalmasının lüminesansı önleyici madde derişimine karşı ölçülmesi ile bir kalibrasyon eğirisi çıkarılabilir veya standart ekleme yönteminden yararlanılabilir (Gündüz, 1995).

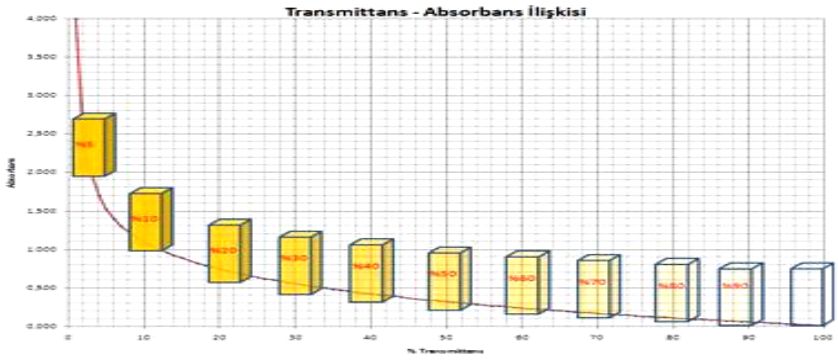
1.1.12. Florimetrinin bazı uygulama alanları

Floresans spektroskopisi, optik bir yöntem olarak gittikçe artan önem kazanmaktadır. Yöntemin duyarlı ve seçimli olması, uygulama alanını genişletmiştir. Aynı zamanda florimetri, numunelerde çok düşük derişimlerdeki türlerin tayinine olanak sağladığı, biyokimyada, besin endüstrisinde, nadir toprak elementlerinin

analizinde, son yıllarda büyük önem kazanan çevre kimyasında, hava ve çevre kirliliğine yol açan bazı zehirli gazların, atık organik bileşiklerin ve eser metal atıklarının tayininde, farmakolojide, klinik numunelerin analizinde, tarım kimyasında ve pek çok organik ve inorganik bileşiğin analizinde oldukça tercih edilen bir enstrümental metottur.

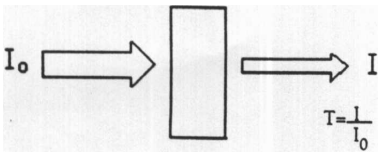
1.2. Spektrofotometri

Spektrofotometrik ölçümlerde deney tüpünde kimyasal reaksiyon sonucu oluşturulan renkli solüsyon spektrofotometreye bir küvet içinde yerleştirilir ve solüsyonun maksimum absorbe ettiği dalga boyundaki ışık küvet üzerine düşürülür. Bu ışığın bir kısmı solüsyon tarafından absorbe edilir, bir kısmı ise küvetten geçer. Solüsyon tarafından absorbe edilen ışık miktarına absorbans (A), geçirilen ışık miktarına ise transmisyon (T) adı verilir. Solüsyon tarafından absorbe edilmeyerek geçirilen ışık miktarı detektör tarafından saptanır ve ışık kaynağından çıkan ışık miktarı ile karşılaştırılarak ne kadarının solüsyon tarafından absorbe edildiği saptanır.



Şekil 1.17. Absorbans - Transmittans ilişkisi

Ölçüm öncesi, içinde ölçülmek istenen analitin bulunmadığı bir örneğin (kör) herhangi bir renk oluşturmayacağı ve üzerine düşürülen ışığın tamamını geçireceği kabul edilerek spektrofotometrenin ‘‘ sıfır ’’ ayarı yapılır. Daha sonra içinde ölçülmek istenen analitten bilinen konsantrasyonda bulunan örneğin (standart) absorbe ettiği ışık miktarı okunur. Bilinmeyen konsantrasyonda analit içeren numunenin absorbe ettiği ışık miktarı standardın absorbe ettiği ışık miktarı ile kıyaslanır ve aşağıdaki formüller kullanılarak örneğin konsantrasyonu hesaplanır.



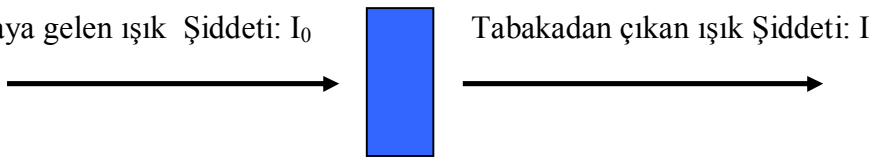
Geçirgenlik T = P/P_0 gelen ışın şiddetinin numuneden geçen ışın şiddetine oranıdır.

A= - log T veya A= log (1/T) (1.26)

Absorbans gelen ışının şiddetindeki azalmayı ifade eder.

1.2.1. UV-Visible spektroskopisi ve Lambert-Beer Yasası:

Moleküler biyolojide UV ve görünür ışınlar kullanılarak:molekülün yapısı hakkında bilgi edinilebilir. (özellikle UV alandaki absorpsiyon önemlidir.) Konsantrasyon (derişim) belirlenebilir, kimyasal reaksiyonun gidişi izlenebilir, enzim aktivitesi ölçülebilir.



Homojen bir absorplayıcı ortam

Lambert yasası:

Homojen bir absorplayıcı ortamdan geçen ışının şiddeti tabaka kalınlığının artması ile üssel olarak azalır:

$I = I_0 . e^{-kd}$ (1.27)

I = geçen ışının şiddeti

I_0= gelen ışının şiddeti

k = absorpsiyon katsayısı

d = tabakanın kalınlığı

Beer Kanunu:

Absorpsiyon yapan bir türün konsantrasyonu ile absorbans değeri arasındaki ilişkiyi gösterir. Işının şiddeti içerisinden geçtiği maddenin konsantrasyonuna bağlıdır.

$I = I_0 . e^{-kc}$ (1.28)

I = geçen ışının şiddeti

I_0= gelen ışının şiddeti

k = absorpsiyon katsayısı

c = konsantrasyon

Bu iki yasanın (1.16 ve 1.17 denklemlerinin) birleştirilmesiyle :

$I = I_0 .e^{-kcd}$ (1.29)

I = geçen ışının şiddeti

I_0= gelen ışının şiddeti

k = absorpsiyon katsayısı

c = konsantrasyon

d = ışık yolu (sıvının içinde bulunduğu küvetin genişliği)

$I / I_0 = e^{-kcd} = \ln I / I_0 = -k.c.d$

$\ln I_0 / I = k.c.d$

$\log I_0 / I = (k.c.d) / 2{,}303$ $k/2.303 = \varepsilon$ (epsilon) (1.30)

$\log I_0 / I = \varepsilon cd = A$ (Absorbans) veya E (Ekstinksiyon)

ε: Absorpsiyon (veya Ekstinksiyon) katsayısı

Konsantrasyonun (c) birimi g/l olursa, εS, spesifik absorpsiyon katsayısı;

Konsantrasyonun (c) birimi mol/l olursa, εM, molar absorpsiyon katsayısı adını alır.

1.2.2. Spektrofotometreler



Şekil 1.18. Spektrofotometre

Spektrofotometre, renkli bir solüsyonun üzerine düşürülen ışığın ne kadarının solüsyon tarafından absorbe edildiğini ölçen bir cihazdır. Anorganik, Organik ve biyokimyasal maddelerin kalitatif ve kantitatif tayininde kullanılabilir. Absorpsiyon yapmayan türler bile absorplayıcı türevleri oluşturularak tayin edilebilir. (UV-GB bölgesi ışını kullanılır ve değerlik elektronları ile ilgilidir.)

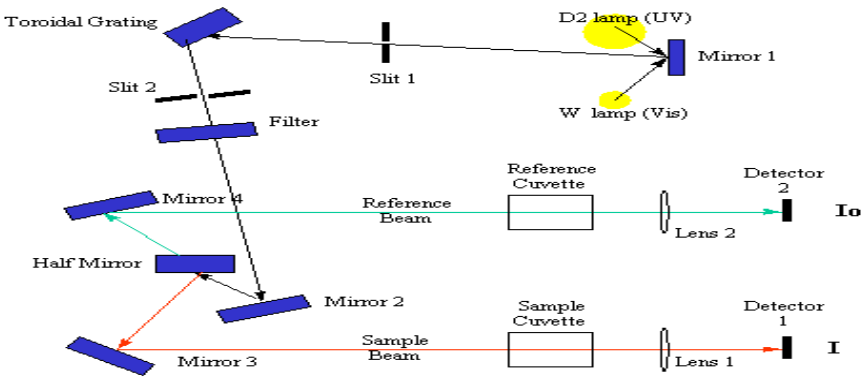
Tayin sınırı 10^{-5} M a kadar (bazen 10^{-6} M) düşebilir. Bağıl hatası azdır. Ölçümler kolay ve rahattır.

Kolorimetrik biyokimyasal analizlerde, konsantrasyonu ölçülmek istenen analit bir kimyasal madde ile reaksiyona sokularak renkli bir solüsyon oluşturması sağlanır. Renkli solüsyonlar renkleri ile bağlantılı olarak belli dalga boyundaki ışığı absorbe ederler ve absorbe edilen ışığın miktarı solüsyonun renginin koyuluğu ile doğru orantılıdır.

Lamba tarafından yayılan ışın demeti monokromatör (prizma) yardımıyla tek bir dalga boyundaki ışına (monokromatik ışına) dönüştürülür.Bu ışın örneğin içinde bulunduğu odaya girer. Ölçümü yapılacak örnek, küvet içine konulur. Görünür alanda çalışılıyorsa **cam (optik) küvet**; UV'de çalışılıyorsa **kuvartz (silika) küvet** kullanılır.

Örnekten geçen ışığın şiddeti detektör tarafından algılanır ve kaydedici ya da yazıcıya elektrik sinyali şeklinde gönderilir.

Double-beam (Çift ışınlı spektrofotometrelerde ışın hem örnekten hem de kör örnekten (referans)) geçirilir.



Şekil 1.19. Çift ışınlı spektrofotometre

1.3. İyonlaşma Sabitlerini Tayini

İyonlaşma sabiti, bir molekülün iyonlaşma davranışını belirlememizi sağlayan temel parametredir ve bileşiklerin en önemli fizikokimyasal özelliğidir. Bu parametrenin bilinmesi herhangi bir bileşikle çalışmalara başlamadan önce izlenecek deneysel yolu tayin etmek için gerekmektedir. Su-organik çözücü karışımları veya susuz organik çözücüler, suda çözünmeyen bileşiklerin asitlik ve bazlık sabitlerinin tayinlerinde tercihli olarak kullanılmaktadır. Bu ortamların sıvı pKa tayini için su ortamı öncelikli ortamdır; ancak su-organik çözücü karışımları veya susuz organik çözücüler, suda çözünmeyen bileşiklerin asitlik ve bazlık sabitlerinin tayinlerinde tercihli olarak kullanılmaktadır (Barrón vd., 2000).

İyonlaşma sabitlerinin sudaki tayinleri, bileşiğin sudaki çözünürlüğünün az olması durumunda su-organik çözücü ikili karışımlarının kullanılmasını zorunlu kılar. Günümüzde su-organik çözücü karışımlarının, sıvı kromatografik ve kapiler elektroforetik ayırmalarda kullanılması ve bileşiklerin ayırmadaki davranışlarında iyonlaşma sabitlerinin etkin olmasından dolayı bu ortamlardaki iyonlaşma sabitlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca bu ortamlarda suyun kendi hidrojen bağlı sistemini oluşturabildiği koşulda pH aynen sudaki gibi belirlenebilmektedir. Bu nedenle suda çözünmesi yeterli olmayan ve su ortamında iyonlaşma sabitleri tayin edilemeyen bileşiklerin bu sabitlerinin tayinlerinde sıklıkla su-organik çözücü ikili karışımları kullanılır. İyonlaşma sabitlerinin tayininde kullanılan alternatif yöntemler;

1. Potansiyometrik yöntemler,
2. Spektroskopik yöntemler,
3. Sıvı kromatografik yöntemler,
4. Elektroforetik yöntemlerdir.

1.3.1. Potansiyometrik yöntemle pKa tayini

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

Bu yöntemler,

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

b) Bu teknikle yeterli doğruluk ve kesinlikte tayin mümkündür.

c) Çalışılan bileşiklerin mutlaka saf olmaları gereklidir.

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

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

f) Elektrot sistemi çalışılan ortama uygun şekilde kalibre edilmelidir.

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

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

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

1.3.2. Spektrofotometrik yöntemle pKa tayini

Bilindiği gibi iyonlaşma sabitlerinin tayininde ilk yöntem potansiyometridir. Bu yöntem 3 mM derişimi gerektirir. Bu derişimin sağlanamadığı durumlarda

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

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

Moleküler absorpsiyonun uygulama alanlarından birisi, denge sabitlerinin tayinidir. Bir zayıf asitte iyonlaşan ve iyonlaşmayan türlerin kendilerine özel dalga boylarında absorbsiyon yaptığını biliyoruz. Her 2 türün de her bir dalga boyundaki absorbansa katkı verdikleri bilinmektedirİyonlaşma sabitleri spektrometrik ölçümler ile de tayin edilebilir. Bunun için belli bir dalga boyu aralığında kaydedilen absorbans verilerinden yararlanılır.

Bu durumda :

$$A = \varepsilon HA.l.[HA] + \varepsilon A.l.[A^-] \qquad (1.31)$$

bağıntısı geçerlidir. Kütle denkliğini ifade edelim.

$$C = [HA] + [A^-] \qquad (1.32)$$

İlk ifadede HA yerine kütle denkliğinden gelen değerini koyalım.

$$A = \varepsilon HA.l.(C - [A^-]) + \varepsilon A.l.[A^-] = \varepsilon HA.l.C - \varepsilon HA.l.[A^-] + \varepsilon A.l.[A^-]$$

$$A = AHA + l.[A^-](\varepsilon A - \varepsilon HA)$$

$$[A^-] = \frac{A - AHA}{l.(\varepsilon A - \varepsilon HA)} \qquad (1.33)$$

Benzer şekilde hareketle HA için bağıntı türetilir.

$$[HA] = \frac{AA - A}{l.(\varepsilon A - \varepsilon HA)} \qquad (1.34)$$

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

$$Ka = [H_3O^+].\ \frac{A^- \ AHA}{AA - A} \qquad (1.35)$$

Spektrofotometrik titrasyonlarda en basit yaklaşım 3 çözelti ile gerçekleştirilir.

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

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

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

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

$$\log \frac{A^- \ AHA}{AA - A} = pH - pKa \qquad (1.36)$$

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

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

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

1.3.3. Florimetrik pKa tayini

Maddenin floresans özelliği üzerine kurulmuş olan tayin metoduna florimetri veya floresans spektroskopisi denir. Floresans özelliği; maddenin gaz, sıvı ve katı hallerinde görülebilir. En basit floresans, seyreltik atom buharları tarafından meydana getirilir. Atom veya molekülün elektronları, orbitallere spinleri ters olarak yerleşmiş ise bu hale singlet hal, orbitallerin birinde tek bir elektron varsa duplet hal, iki ayrı orbitalde spinleri birbirine paralel birer elektron varsa triplet hal ortaya çıkar.

Bir molekül, absorpsiyonda 0-0 geçişlerinden hemen sonra daha az enerjiyle biraz dinlenir. Buna karşılık en aşağı enerjiyle uyarılmış hale geçer. 0-0 geçişiyle floresans emisyonundan sonra, hemen aynı relaksasyon oluşur.Bu relaksasyonların sonucunda temel durumda kararlı konfigürasyon ve ilk uyarılan durum arasında enerji farklılıkları oluşur. İlk uyarılma halinde enerji absorpsiyon için hν'den daha az, fakat emisyon için hν'den daha fazladır.

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

$$Es=1/2(h\nu_{abs}+h\nu_{em}) \qquad (1.37)$$

Absorpsiyon ve emisyon bantları hiç titreşimsel bir yapı göstermediklerinde, 0-0 geçişlerinin konumunu bulmak mümkün değildir. Es için en iyi ölçüm, yukarıdaki eşitliğin hνabs ve hνem maksimum spektrumlarından elde edildi. Es' nin kullanılan bu değerlerini gösteren şekildeki enerji diyagramından temel hal ile uyarılmış hal arası enerji geçişlerini bulabiliriz.

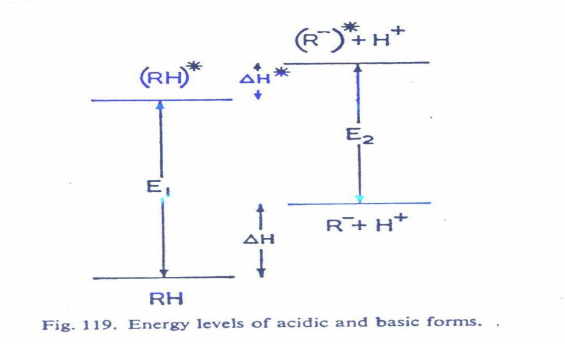


Fig. 119. Energy levels of acidic and basic forms.

Şekil 1.20. Asidik ve bazik formların enerji seviyeleri

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

Bu durumda ; $E_1-E_2 = \Delta H- \Delta H^*$ elde edilir. (1.38)

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

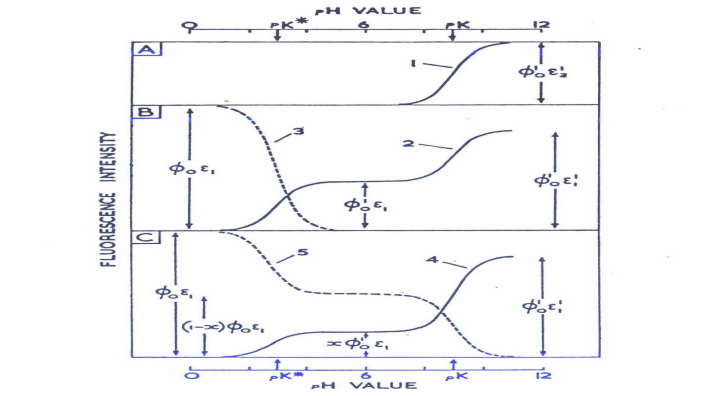
$\Delta G= \Delta H - T \Delta S = - RTInK$

$$\log(K^* / K) = \frac{E1 - E2}{2.3RT} = \frac{Nh(\Delta \nu)}{2.3RT} \qquad (1.39)$$

Burada ; Planck sabitini yerine koyar , mikrona çevirirsek;

$$pK^* = pK - \frac{6.25 \times 10^3}{T}(\Delta\tilde{\nu})$$

$$pK^* = pK - 21.4(\Delta\tilde{\nu})$$



Şekil 1.21. Asidik ve bazik formda floresans şiddetinin eğrileri

R- bazik formunun (düz çizgiyle gösterilmiş eğriler) en düşük singlet uyarılmış düzeye sahip olduğu farzedilir ve RH asidik formunun (kesik çizgiyle gösterilmiş eğriler) absorpsiyon yapmadığı (ışığı tamamen geçirdiği), λ_2 dalga boyunda absorpsiyon yaptığı görülür.

ε_2', R- anyonunun λ_2 'deki sönüm katsayısıdır.

ε_1' ve ε_1 daha kısa dalga boyu λ_1 ' de R- ve RH'ın sönüm katsayılarıdır.

Φo' ve 'ın dalga boyundan bağımsız olduğu farzedilir.

Grafikteki eğriler; ε_1' =1.6 ε_2'=2 ε_1 ve Φo=2.5 Φo' olan bir sistem için çizilmiştir.

Blok A, λ_2 'deki uyarmayla ilgilidir. Blok B ve C ise λ_1 ' deki uyarmayla ilgilidir. B' de floresans dikkate değer ölçüde oluşmadan önce bütün pH değerlerinde denge kurulur. C'de floresans oluşmadan önce, pH 6'da ayrışan asitin oranı X'in 0.5 olduğu farz edilir.

Bu eğrilerin şekli aşağıdaki faktörlere bağlıdır.:

a) pK ve pK* değerlerine,

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

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

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

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

$$\Phi_o = k_f / (k_f+k_g+k_n) = k_f \tau \qquad (1.40)$$

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

$$F = \omega I_o \varepsilon \Phi_o c \qquad (1.41)$$

ω: enstrümental sabit c: konsantrasyon I_o; uyaran ışın şiddeti Φ_o:floresans verimi

1.4. Antibiyotikler

Antibiyotikler, bakteri, mantar ve aktinomisetler gibi canlı mikroorganizmalar tarafından meydana getirilen veya sentezle hazırlanan, düsük yogunlukta bile bakterilerin gelismesini etkileyen ya da onları öldüren maddelerdir. Bütün bakterilerde yavas gelisme, hızlı gelisme ve dinlenme dönemlerinden olusan üç çogalma devresi vardır. Antibiyotikler bakterilerin hızlı ve yavas gelimse dönemlerinde etki gösterirler.

Bu etkilesim ya bakterilerin öldürülmesi (bakterisid etki) ya da bakterilerin gelisimi ve üremesinin durdurulması (bakteriostatik etki) seklinde olur. Örnegin penisilinler, aminoglikozidler, sefaloporinler, vankomisin, florokinolonlar ve basitrasin, bakterisid etkiye ; tetrasiklinler, makrolidler ve sülfonamidler ise bakteriostatik etkiye sahiptirler. Antibiyotikler (Çizelge 1.3);

1. Hücre duvarı sentezini engelleyerek
2. Sitoplazmik zarın geçirgenligini degistirerek
3. Nükleik asit sentezini önleyerek
4. Ara metabolizmayı bozarak
5. Protein sentezini engelleyerek bakteri hücresi üzerinde etkilerini gösterirler (Sardohan, 2006; Akkan vd., 2003; Dökmeci vd., 1992; Kayaalp, 1991).

Ara metabolizmanın bozulmasına neden olan ilaçlar, bakteriler için gerekli bazı maddelerin (folik asit gibi) sentezini engellerler. Bu grup ilaçlara örnek olarak sülfonamidler, kinolonlar, sülfonlar, trimetoprim ve p-salisalik asit gösterilebilir.

Florokinolonlar, kemik gelisimini olumsuz etkiledigi için genç hayvanlarda kullanılmamalıdır. Penisilinler, florokinolonlar, nalidisik asit ve sikloserinin çırpınmalara, aminoglikozidlerin işitme ve denge kaybına, izoniazid ve etambütolun ise çevre sinirlerin iltihabı ile görme bozukluklarına yol açabilecegi göz önünde bulundurulmalıdır. Kloramfenikol, tetrasiklinler, sülfonamidler, sefalosporinler, ampisilin, florokinolonlar ve izoniazid hayvanlarda bulantı, kusma ve ishale neden 4 olabilir, vitamin K ve B sentezini engelleyebilirler (Sardohan, 2006; Akkan vd., 2003; Şanlı vd., 1994; Kayaalp, 1991).

Antibakteriyel etkinlik saglamak amacıyla kullanılan antibiyotikler, vücuda verilme yolları, vücutta meydana gelen atık maddeler, fizyolojik durum ve canlıda bulunan doğal engellerden etkilenebilir. İstenen antibakteriyel etkinin saglanması için antibiyotiklerin seçiminde bu önemli kosullara dikkat edilmesi yerinde olur. Penisilinler ise irin varlıgından etkilenmezler. Oral kullanılan tetrasiklinler midebarsak içeriginin kalsiyumdan zengin olması durumunda gerekli antibakteriyel etkilerini gösteremezler. İki degerli mineraller ise florokinolonların etkisini önemli ölçüde azaltırlar.

Çizelge 1.3. Antibiyotiklerin farmakokinetik özelliklerine göre sınıflandırılmaları

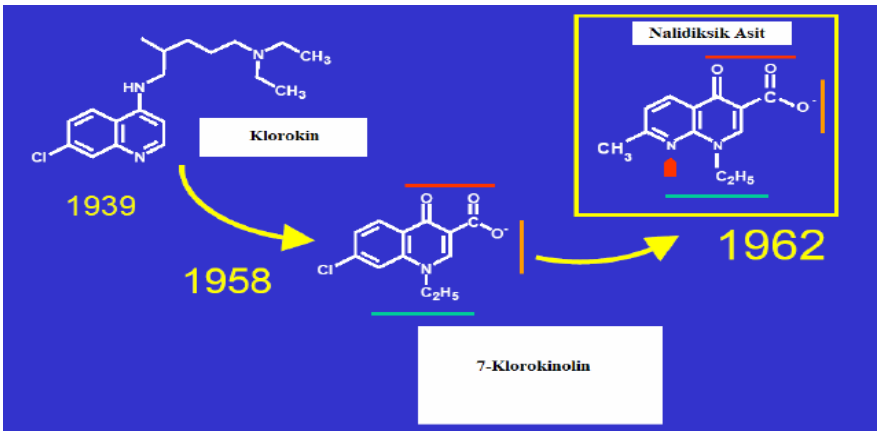
1.Akciğer dokusuna girifli iyi olan antibiyotikler:	**2.Kemik dokusuna girifli iyi olan antibiyotikler**	**3.intraselüler penetrasyonu iyi olan antibiyotikler:**	**4.Barsaklardan emilmeyen Ve mide sıvısında parçalanmayan antibiyotikler:**
Penisilin, Ampisilin Tetrasiklin Eritromisin, Spiramisin Florokinolonlar	Metisilin Sefazolin Klindamisin, Linkomisin	Tetrasiklinler Makrolitler Etambutol Kloramfenikol Rifamisin Florokinolonlar Klindamisin Trimetoprim	Aminoglikozidler: Kanamisin, Neomisin, Paromomisin Kolistin, Polimiksin Vankomisin

5.Kan-beyin engelini aşabilen (Menenjit tedavisinde kullanılabilen antibiyotikler:		
1. Kolay Aşabilenler:	**Yüksek Dozda Aşabilenler:**	**TüberkülozMenenjitte Kullanılanlar**
Kloramfenikol Ko-trimoksazol 3.Kuşak Sefalosporinler Florokinolonlar	Penisilinler, Ampisilin Gentamisin	Rifampisin isoniazid Streptomisin

6.Safradan aktif şekilde atılanlar:	7.idrarla aktif şekilde atılanlar:
Ampisilin, Makrolitler, Linkomisin, Tetrasiklin, Tiamfenikol	Ampisilinler, Sefalosporinler Aminoglikozidler, Kolistin, Polimiksin B, Ko-trimoksazol, Kinolonlar

1.4.1. Kinolonlar

Kinolonlar yaygın şekilde kullanılan anti bakteriyel ilaçlardır. Bu ilaçların geliştirilmesi 1960'lı yılların başlarında, yapısında flor ihtiva etmeyen ilk üyesi olan nalidiksik asit ile başlamıştır. 1980'lerde yapılarında 6-flor grubu bulunduran ve antibakteriyel etki spektrumları Gram negatif bakterileri de kapsayacak şekilde genişletilmiş türevleri (norfloksasin, oflaksasin, siprofloksasin gibi) geliştirilmiştir. Daha sonraki dönemde Gram pozitif bakterilere karşı etkisi arttırılan florokinolonlar (moksifloksasin, gatifloksasin) terapötik amaçla kullanılmaya başlanmıştır. Son zamanlarda ise yüksek aktiviteye sahip, 6 numaralı C atomlarında flor grubu taşımayan ancak yan zincirde flor ihtiva eden türevleri geliştirilmiştir. Bu şekliyle hazırlanan ilaçlar nalidiksik asit gibi klasik ilaçlardan belirgin farklılıklar gösterirler ve genel bir terim olarak da florokinolon yerine kinolonlar olarak adlandırılabilirler (Kayaalp,2005).



Şekil 1.22. Klorokinin saflastırılmasıyla nalidiksik asitin elde edilmesi

Kinolonlar ağızdan ve parenteral yollarla uygulanırlar. Ağızdan verildikten sonra sindirim kanalından %30-100'e kadar değişen oranlarda emilirler, bu oran norfloksasin için 30-40, siprofloksasin için 50-70 ve diğerleri için 50-70'dir (Kayaalp ve ark. 2000). Kinolonlar ağız yoluyla uygulamayı takiben sindirim kanalından iyi emilirler ve yüksek bir biyoyararlanıma sahiptirler. Damar içi uygulamayla

karşılaştırıldığında ağız yoluyla uygulamada da aynı serum düzeylerine ulaşmak mümkündür; bu durum ağız yoluyla uygulamayı geçerli kılmakta ve aynı zamanda tedavi maliyetinin de daha düşük seviyede kalmasına yol açmaktadır.

Gıdalar florokinolonların çoğunun emilimini etkilemez. Bununla birlikte; alüminyum, magnezyum, kalsiyum, demir ve bakır gibi bazı katyonlarla kinolonlar şelat oluştururlar. Bu etkileşmeler emilme ve biyoyararlanımı önemli ölçüde azaltır, aynı şekilde serum ilaç yoğunluklarını düşürür ve hedef dokulara geçişi zayıflatır.

Kinolonların böbrek ve diğer organlar yoluyla atılmaları da değişkenlik gösterir. Sadece ofloksasin ve levofloksasin özellikle böbreklerden atırlır. Böbrek ve diğer organlar (mide bağırsak ve karaciğer yoluyla); nalidiksik asid, sinoksasin, norfloksasin, siprofloksasin, enoksasin, lomeflosasin, gatifloksasin, moksifloksasin ve sparfloksasinin atılımında rol oynarlar. Özellikle böbrekler yoluyla atılanlarda doz ayarlaması yapılırken kreatin klirensinin de hesaplanması önemlidir. Çoğu durumda doz aralıkların geniş tutulması tavsiye edilmektedir.

Florokinolonlar ciddi infeksiyonların sağaltımında sık kullanılan önemli antibiyotik gruplarından birini oluşturmaktadır. Ancak özellikle yoğun ve akılcı olmayan kullanım sonucunda önemli direnç sorunu da ortaya çıkmakta ve mikroorganizmalar sadece florokinolonlara değil farklı antibiyotiklere de hızlı bir biçimde duyarlılıklarını yitirmektedirler.

Çizelge 1.4. Kinolonların (DNA-Giraz İnhibitörlerinin) sınıflandırılması

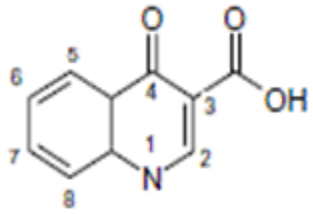
<table>
<tr><th>1.Kuşak kinolonlar</th><th>2. Kuşak kinolonlar:</th><th>3. Kuşak kinolonlar:</th></tr>
<tr><td rowspan="2">Nalidiksik Asid,
Oksolinik Asid,
Sinoksasin.</td><td rowspan="2">Pipedimik Asid, (florsuz, atipik)
Flumekin</td><td>Florokinolonlar: (Quinolones)
DNA- Jiraz inhibitörleri</td></tr>
<tr><td>Siprofloksasin,
Norfloksasin,
Ofloksasin,
Levofloksasin,
Moksifloksasin,
Oksolinik Asit,
Enoksasin,
Pefloksasin,
Nalidiksik Asit.</td></tr>
</table>

Yeni kinolonların binlerce türevi elde edilmis ve halen üretilmekte iken bunlardan ancak bazıları insan infeksiyonlarında kullanılır durumdadır. En çok uygulananların basında norfloksasin, enoksasin, ofloksasin, siprofloksasin, pefloksasin

gelmekte; bunları fleroksasin, lomefloksasin, temafloksasin, amifloksasin, sparfloksasin izlemektedir. (www.infeksiyon.org)

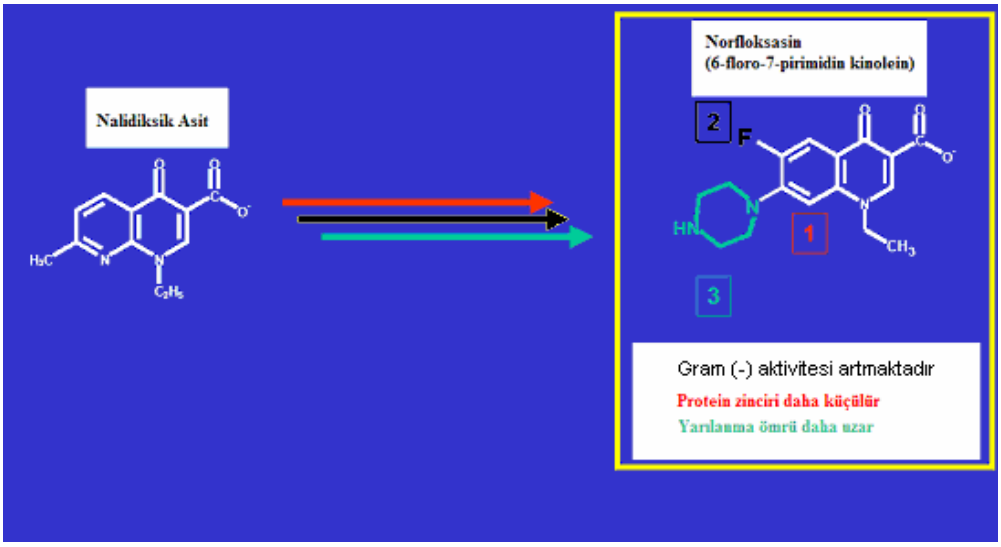
1.4.1.1. Kinolonların Kimyasal Yapısı

Kinolonlar mantarlardan elde edilmeyip, tamamen sentetik olarak üretilen saf kimyasal maddelerdir. Antibakteriyel etkili kemoterapötiklerdir. Kinolonların temel yapısı iki halkadan oluşmaktadır. Birinci pozisyonda (N), üçüncü pozisyonda (COOH) ve dördüncü karbon atomuna çift bagla baglı (O) içeren temel yapı antibakteriyel etki için sarttır. Şekil 1.23'de kinolonların temel yapısı gösterilmektedir. Son 15-20 yılda bu temel yapıdan üretilen çok sayıda kinolon klinik kullanıma girmis, çok daha fazlasının da klinik öncesi çalısmaları devam etmektedir. Kinolonlar arasındaki antibakteriyel etkinlik ve farmakokinetik farklılıklar, kimyasal yapılarındaki farklılıktan kaynaklanmaktadır (www.infeksiyon.org).

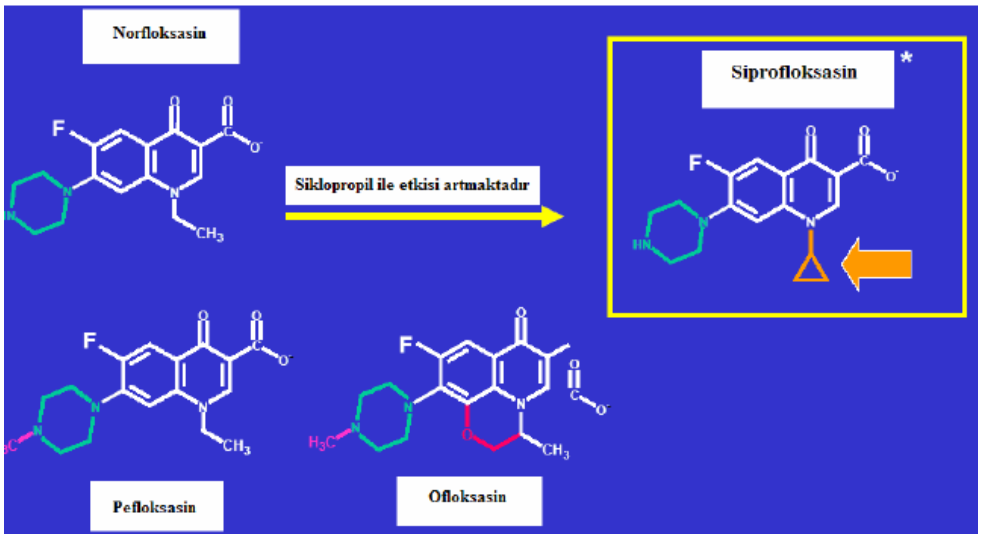


Şekil 1.23. Kinolonların temel molekül yapısı

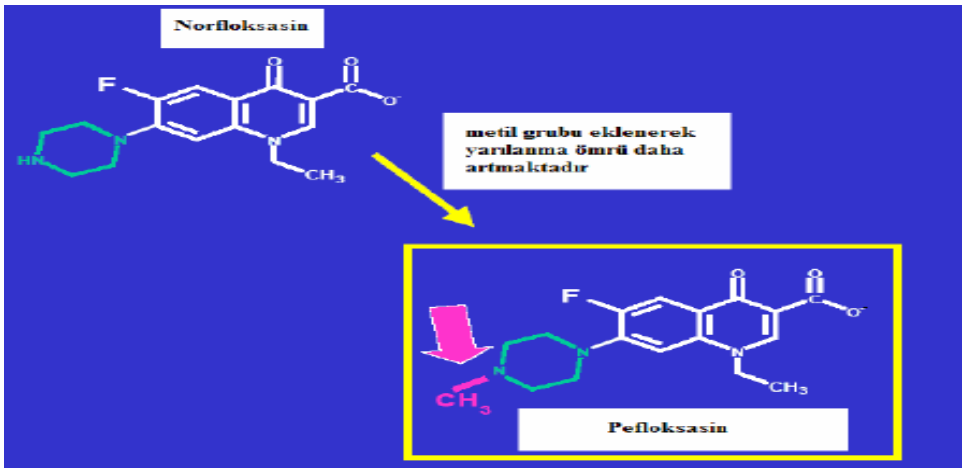
1.4.1.1. Kinolonların elde edilişleri



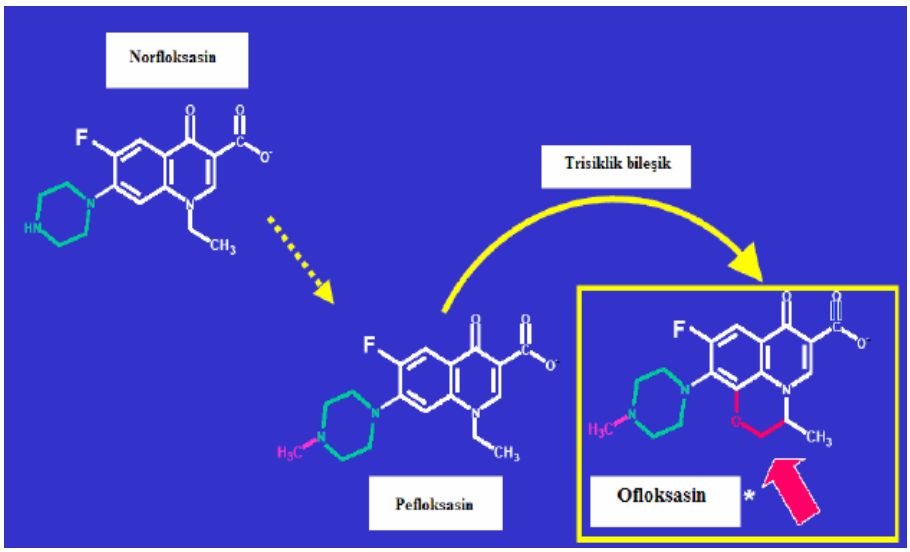
Şekil 1.24. Norfloksasinin elde edilişi



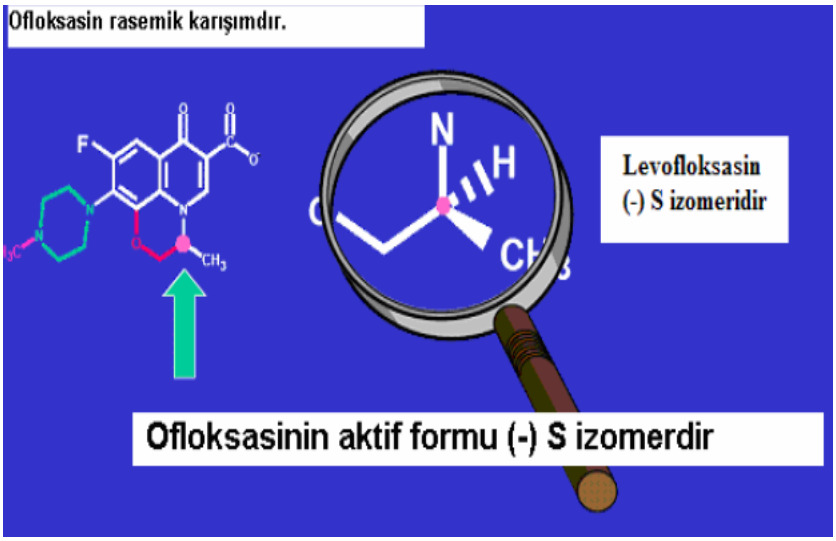
Şekil 1.25. Siprofloksasinin elde edilişi



Şekil 1.26. Pefloksasinin elde edilişi



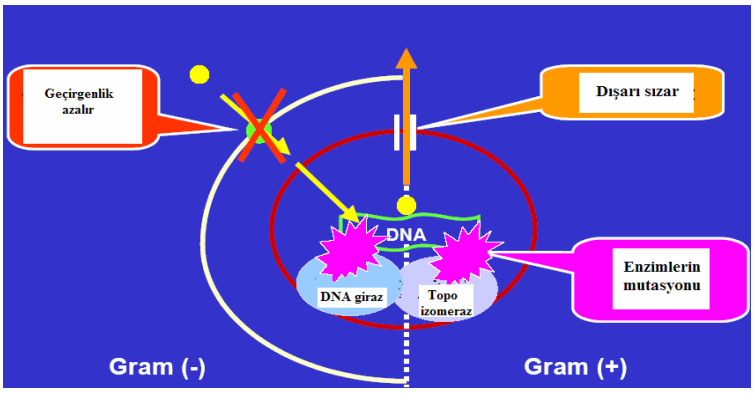
Şekil 1.27. Ofloksasinin elde edilişi



Şekil 1.28. Levofloksasinin yapısı (www.sbimc.org)

1.4.2. Etki mekanizmaları

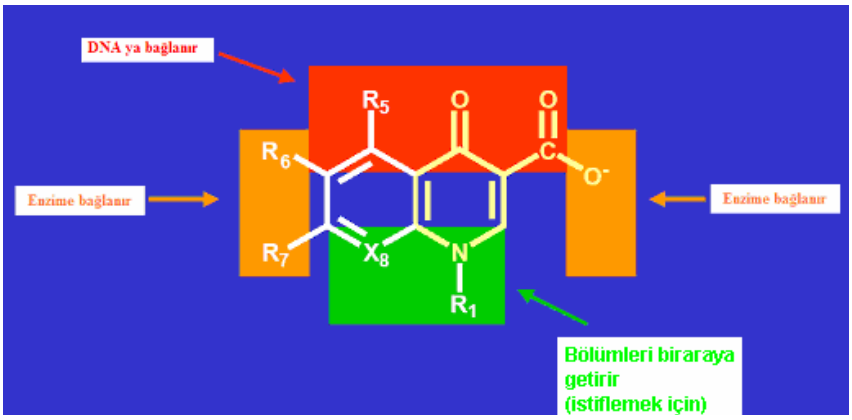
Tüm florokinolonlara bakterisidal etkili olup ortak etki mekanizması olarak hepsi de bakterilerdeki DNA jiraz enzimini (type II topoizomeraz) hedef alırlar. 6-florokinolonlar sentetik nitelikli antibakteriyel ilaçlar olup, nalidiksik asit veya oksolinik asitten türetilmiş (ya da bunlarla ilişkili) maddelerdir. Florokinolonlar direk olarak DNA sentezini inhibe ettikleri için antimikrobiyal ajanlar içerisinde klinik kullanımı açısından önemlidirler. İnhibisyon ilacın DNA'nın oluşturduğu kompleks yapılar ile arasındaki etkileşme sonucu ve hedef enzimler olan DNA jirazin ve topoizomeraz IV enzimeleri arasındaki etkileşmeler sonucu ortaya çıkar.



Şekil 1.29. Florokinolonların DNA'ya etkisi

Nalidiksik asid türevi olan Florokinolonlar, DNA'yı negatif süpersarmal hale getiren DNA- giraz (topoizomeraz II) enzimini, alfa- alt birimine bağlanarak inhibe ederler. Böylece bakteriler bölünemezler ve uzayıp ölürler. Novobiosin, DNA-girazın

beta- alt birimini etkiler. Siprofloksasin ve Ofloksasin ayrıca, bakteri sitoplazma membranını zedeleyerek, diğerlerine göre daha güçlü antibakteriyel etki yaparlar. Geniş spektrumlu ve bakterisid etkilidirler.



Şekil 1.30. Florokinolonların farmokimyası

1.4.3. Farmakokinetik özellikleri

- Suda çözünen lipofilikliği yüksek ilaçlardır. Oral biyoyararlanımları yüksektir,
- +2 ve +3 değerlikli metallerle şelat yaparlar,
- Böbreklerden glomerüler filtrasyon ve tübüler sekresyonla atılırlar.

1.4.4. Florokinolonlara karşı direnç mekanizmaları

Florokinolonların kullanımında ikinci yüzyılının ortalarına yaklaşırken, bazı bakteri türlerinde ortaya çıktığı tespit edilmiştir. Çalışılan tüm türlerde florokinolonlara direncin bir ya da iki mekanizma ile oluştuğu tespit edilmiştir; bunlar, ilacın hedefi niteliğindeki yapıların değişmesi ve ilacın hedef noktaya ulaşması mekanizmasındaki değişikliklerdir.

Florokinolonlara karşı bakteriyel direnci sağlayan özel bir enzim veya mekanizma söz konusu değildir; bununla birlikte bazı mantarlar kinolonları metabolik olarak yıkılmayabilirler.

Florokinolonların sinir sistemine yönelik etkilerinin patogenezisi tam olarak bilinmemektedir. Kinolonların gaba için antagonistik etkileri in vitro olarak 7 numaralı karbon atomundaki heterosiklik yapının sürdürülmesiyle mümkündür. Serbest

piperazinil grup taşıyan kinolonların bu türevleri, metil piperazin halka taşıyanlardan daha güçlü etkinlik gösterirler. Tüm kinolonlar di- ve trivalent katyonlar ile şelat kompleksleri oluşturular. Kinolonların bu özellikleriyle ilgili önemli bir nokta da; invitro sistemde magnezyum konsantrasyonunda yapılan çok küçük değişiklikler, çok büyük etkilerin ortaya çıkmasına sebep olur.

1.4.5. Kinolonların yan etkileri:

Penisilinlerin en önemli yan etkileri döküntülere hatta anaflaksi ile ölüme bile yol açan duyarlılık reaksiyonlarıdır. Atopik alerji (Astım, agzema, saman nezlesi) hikayesi olanlarda anaflaktoid reaksiyon riski normale göre artmıştır. Bir penisilin türüne alerjik olanlar diğer bir türede alerjik olabilirler çünkü temel yapıları aynıdır. Bu nedenle penisilin alerjisi olanlar sefalosporin ve diğer beta laktam antibiyotikleri almamalıdırlar. Genellikle penisilin alımından 72 saat sonra görülen alerjik reaksiyonlar penisline bağlı değildir. Nadir görülen fakat ciddi toksik etkilerden biride beyin irritasyonuna bağlı olan ensefalopatidir. Bu aşırı doz alımı sonucunda veya normal dozlarda böbrek yetmezliğine sekonder gelişebilir. Penisilinler ölümcül ensefalopatiye yol açabileceğinden intratekal olarak verilmemelidir. Diğer bir problemde penisilinler yüksek dozda veya normal dozda verildiğinde böbrek yetmezlikli kişilerde, içerdiği sodyum ve potasyuma bağlı olarak elektorlit birikimine neden olabilir. Ağızdan penisilin kullanılmasına bağlı olarak diyare olabilir, bu en çok geniş spektrumlu penislinlerde görülür, kolitede neden olabilir.

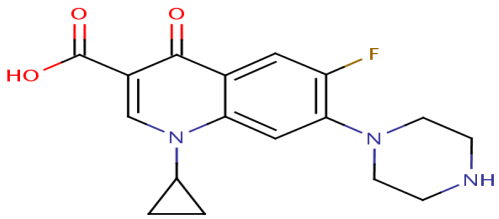
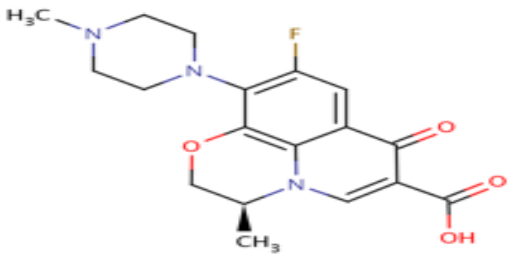
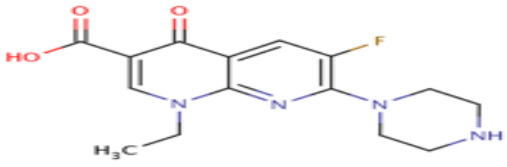
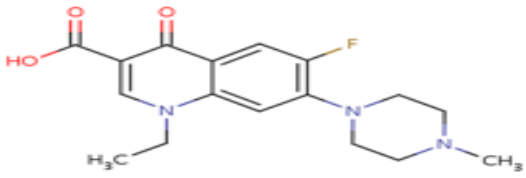
En sık görülen yan etkiler; gastrointestinal sistem (%3-5), santral sinir sistemi(%1- 4,4) ve deriye ait (%0,5-1,4) yan etkilerdir. Gastrointestinal yan etkiler arasında bulantı- kusma (%1-2,2), karın agrısı (%0,9-1,2) ve diyare (%0,5-1,2) sık görülür. Bas ağrısı, bas dönmesi, uyku bozuklukları, anksiyete, ajitasyon, konvülziyon ve uyum bozuklukları seyrek görülen santral sinir sistemine ait yan etkilerdir.

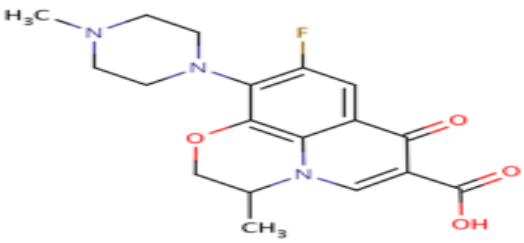
1.4.6. Florokinolonlar ve SPARC Programı ile Hesaplanan İyonlaşma Sabitleri

Florokinolonlar teorik olarak iyonlaşma davranışlarını incelemek üzere kantitatif yapı aktivite ilişkilerini esas alan SPARC (Sparc Performs Automated Reasoning in Chemistry) adlı on-line hesap programı kullanılmıştır. Bu hesap programı substitue grupların etkisini de inceleyerek olası iyonlaşma formlarını ve bunların bağıl

derişimlerini vermektedir. Bu nedenle florokinolonların iyonlaşma davranışları SPARC ile incelenmiş ve bu veriler elde edilen deneysel sonuçların yorumlanmasında yol gösterici olmuştur. Ancak elde edilen veriler su ortamı içindir.

Çizelge 1.5. Deneysel çalışmalarımda kullandığım florokinolonların özellikleri ve molekül fomülleri

Florokinolonlar	**Kimyasal yapısı**	**Özellikleri**
Siprofloksasin:(Ciprofloxacin): **Kimyasal adı:** 1-cyclopropyl-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-ylquinoline-3-carboxylic acid 1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-yl-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid	 **Kapalı formülü:** $C_{17}H_{18}FN_3O_3$	**CAS numarası:** 85721-33-1 **Molekül Ağırlığı :** 331.3415 gr/ mol **Erime noktası :** 255 - 257 °C
Levofloksasin : (Levofloxacin): **Kimyasal adı:** (-)-(S)-9-fluoro-2,3-dihydro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-7Hpyrido[1,2,3-de]-1,4 benzoxazine-6-carboxylic acid hemihydrate	 **Kapalı formülü:** $C_{18}H_{20}FN_3O_4$	**CAS numarası:** 100986-85-4 **Molekül Ağırlığı :** 361.3675 g/mol
Enoksasin : (Enoxacin) : **Kimyasal adı:** 1-ethyl-6-fluoro-4-oxo-7-piperazin-1-yl-1,8-naphthyridine-3-carboxylic acid	 **Kapalı formülü:** $C_{15}H_{17}FN_4O_3$	**CASnumarası:** 74011-58-8 **Molekül Ağırlığı:** 320.3189 g/mol **Erime noktası:** 220-224 °C
Pefloksasin : (Pefloxacin): **Kimyasal adı:** 1-ethyl-6-fluoro-7-(4-methylpiperazin-1-yl)-4-oxoquinoline-3-carboxylic acid	 **Kapalı formülü:** $C_{17}H_{20}FN_3O_3$	**CAS numarası:** 70458-92-3 **Molekül Ağırlığı :** 333.3574 gr/mol **Erime noktası :** 271 °C

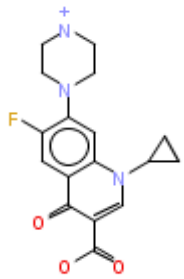
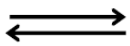
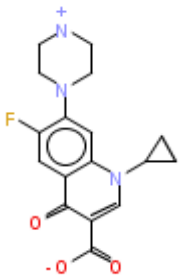
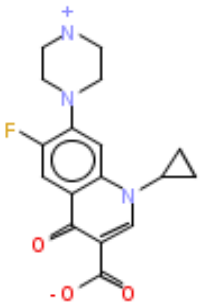
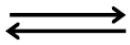
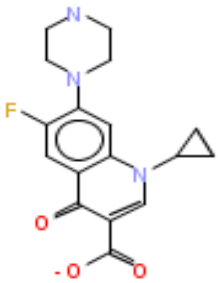
Ofloksasin: (Ofloxacin): **Kimyasal adı:** (+/-)-9-fluoro-2,3-dihydro-3-methyl-10-(4-methyl-1-piperazinyl)-7-oxo-7H-pyrido[1, 2, 3-de]-1, 4-benzoxazine-6-carboxylic acid	 **Kapalı formülü:** $C_{18}H_{20}FN_3O_4$	**CAS numarası:** 82419-36-1 **Molekül Ağırlığı :** 361.3675 g/mol

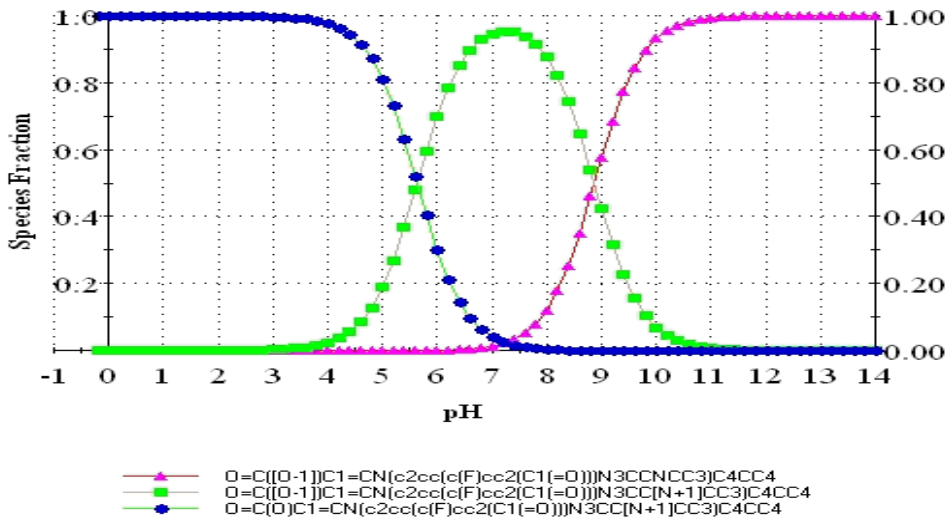
1.4.6.1. Siprofloksasin

Sentetik bir kemoterapötik antibiyotik ve florokinolon ilaç sınıfındadır. Bu nesil bir ikinci florokinolon antibakteriyeldir. Bakterilerin DNA ve protein sentezini kopyalayıp, DNA neden enzimleri ile müdahale ederek bakterileri öldürür. Hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterilere karşı etkilidir. KC ve safrada en yüksek oranda bulunandır. En kısa etkili kinolondur.

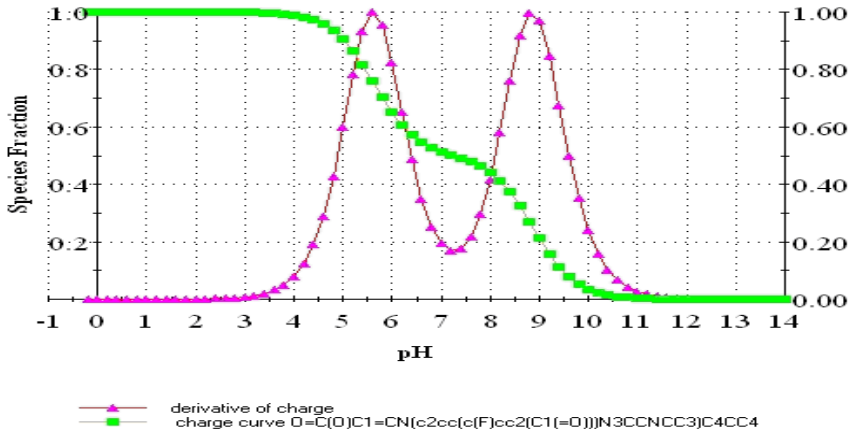
1.4.6.1.1. Siprofloksasinin iyonlaşma sabitleri

Siprofloksasin iyonlaşma dengeleri ve bu dengelerden hesaplanan pKa değerleri;

 **Max Fraction = 1.00**		 **Max Fraction = 0.95**
Macro Pka = 5.64		
 **Max Fraction = 0.95**		 **Max Fraction = 1.00**
Macro Pka = 8.87		



Şekil 1.31. Siprofloksasin için α- pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi



Şekil 1.32. Siprofloksasin için α- pH ilişkisi ve 2. türev eğrisi

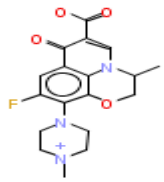
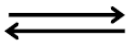
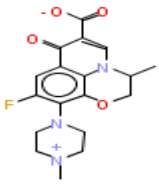
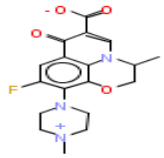
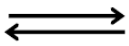
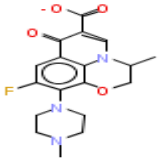
1.4.6.2. Levofloksasin

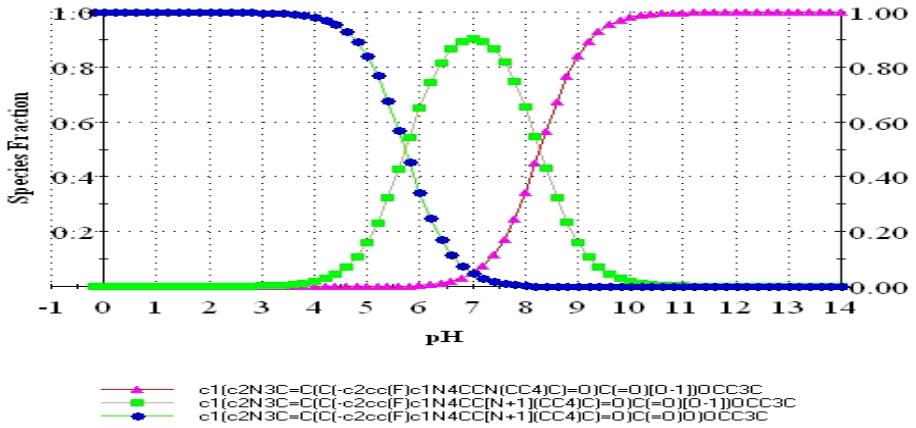
Levofloksasin bir antibiyotiktir ve florokinolon grubu ilaçlardan biridir. Levofloksasin vücuttaki bakteriler ile savaşır.

Solunum yolu enfeksiyonları (sinüzit, bronşit, toplum kökenli zatürre, hastane kaynaklı zatürre gibi), deri ve yumuşak doku enfeksiyonları (apse, çıban, kıl kökü iltihaplanması, yara enfeksiyonları gibi), idrar yolu enfeksiyonları (böbrek iltihaplanması gibi), prostat iltihaplanması gibi hastalıklara yol açabilir.

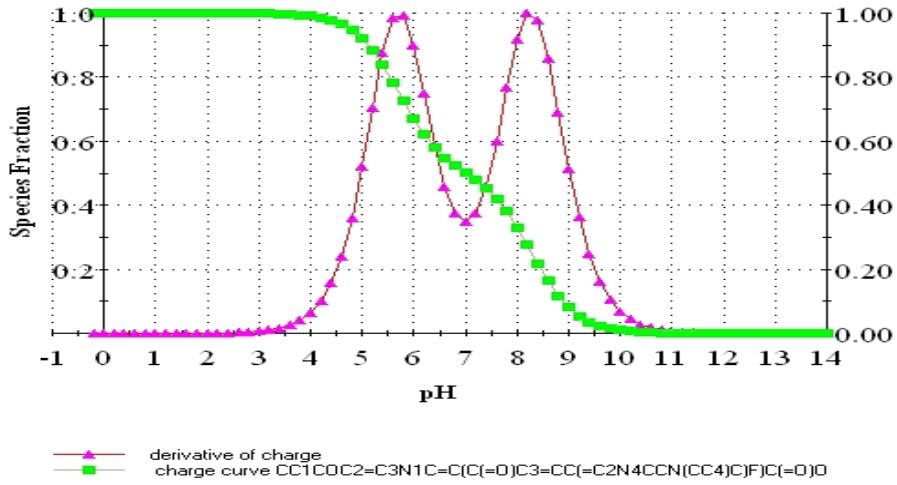
1.4.5.6.1. Levofloksasinin iyonlaşma sabitleri

Levofloksasin iyonlaşma dengeleri ve bu dengelerden hesaplanan pKa değerleri;

 **Max Fraction = 1.00**		 **Max Fraction = 0.90**
Macro Pka = 5.72		
 **Max Fraction = 0.90**		 **Max Fraction = 1.00**
Macro Pka = 8.28		



Şekil 1.33. Levofloksasin için α- pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi



Şekil 1.34. Levofloksasin için α- pH ilişkisi ve 2. türev eğrisi

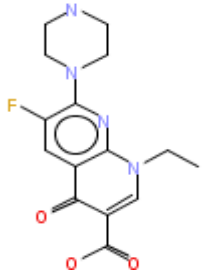
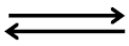
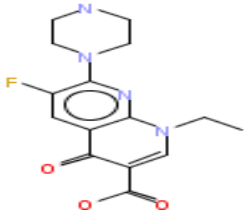
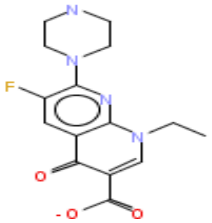
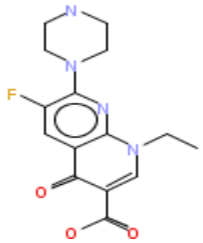
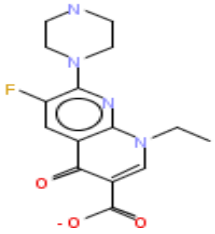
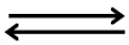
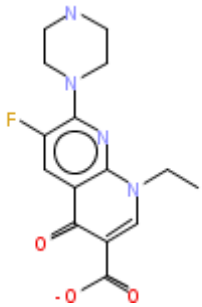
1.4.6.3. Enoksasin

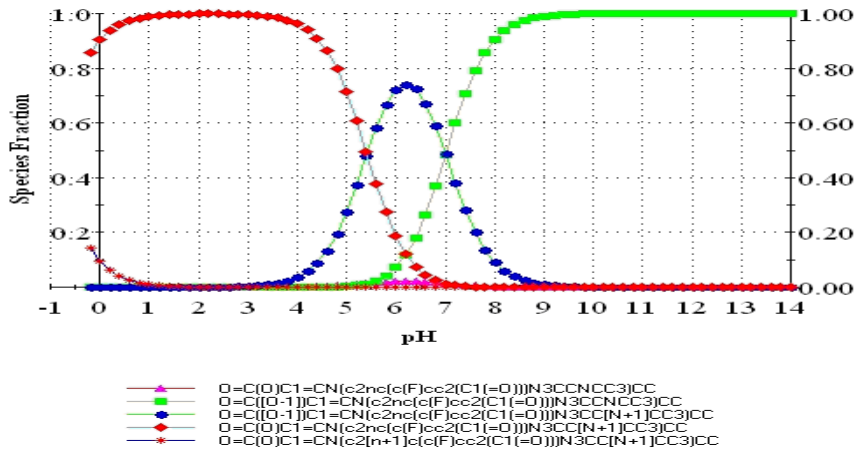
Antibakteriyel etkinlikleri bakımından siprofloksasine benzerler. Ancak invitro etkinlikler onunkinden genellikle daha düşüktür. Esas olarak idrar yolu enfeksiyonlarının ve gonorenin tedavisinde kullanılır. Yan etkileriyle de siprofloksasine benzerler.

Enoksasin vücutta yaygın olarak dağılım göstermektedir ve akciğer, böbrek ve prostat gibidokularda plazmadakinden daha yüksek konsantrasyonlar elde edilmiştir.

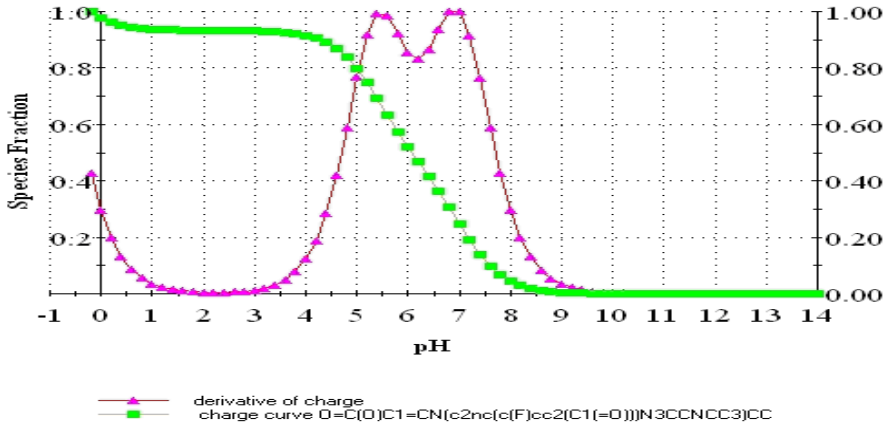
1.4.6.3.1. Enoksasinin iyonlaşma sabitleri

Enoksasin iyonlaşma dengeleri ve bu dengelerden hesaplanan pKa değerleri;

<table>
<tr><td>
Max Fraction = 1.00</td><td></td><td>
Max Fraction = 0.02

Max Fraction = 0.74</td></tr>
<tr><td colspan="3">Macro Pka = 5.40</td></tr>
<tr><td>
Max Fraction = 0.02

Max Fraction = 0.74</td><td></td><td>
Max Fraction = 1.00</td></tr>
<tr><td colspan="3">Macro Pka = 7.02</td></tr>
</table>



Şekil 1.35. Enoksasin için α- pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi



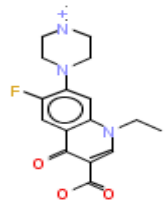
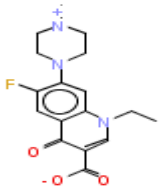
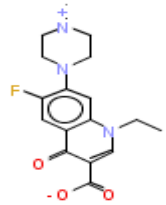
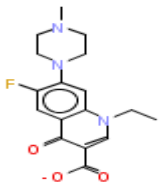
Şekil 1.36. Enoksasin için α- pH ilişkisi ve 2. türev eğrisi

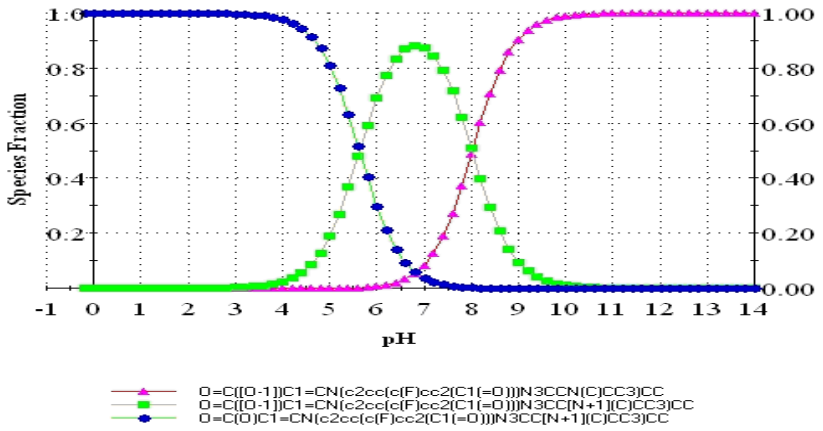
1.4.6.4. Pefloksasin

Antibakteriyel etkinlikleri bakımından siprofloksasine benzerler. Ancak invitro etkinlikler onunkinden genellikle daha düşüktür. Esas olarak idrar yolu enfeksiyonlarının ve gonorenin tedavisinde kullanılır. Yan etkileriyle de siprofloksasine benzerler. Ayrıca parlak güneş ışığından kaçınmak gerekir.

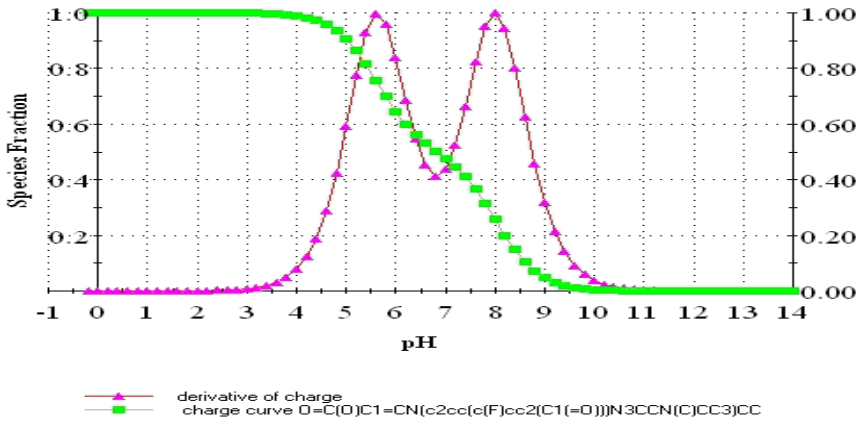
1.4.6.4.1. Pefloksasinin İyonlaşma Sabitleri

Pefloksasin iyonlaşma dengeleri ve bu dengelerden hesaplanan pKa değerleri;

 **Max Fraction = 1.00**	⇌	 **Max Fraction = 0.88**
Macro Pka = 5.64		
 **Max Fraction = 0.88**	⇌	 **Max Fraction = 1.00**
Macro pKa = 8.02		



Şekil 1.37. Pefloksasin için α- pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi



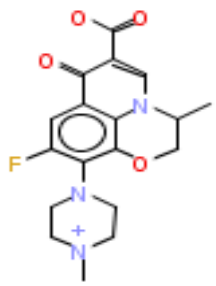
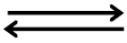
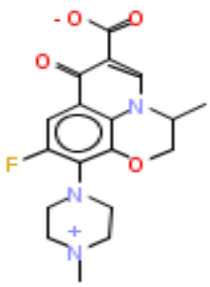
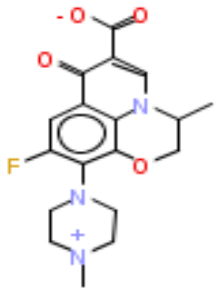
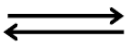
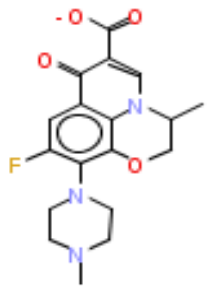
Şekil 1.38. Pefloksasin için α- pH ilişkisi ve 2. türev eğrisi

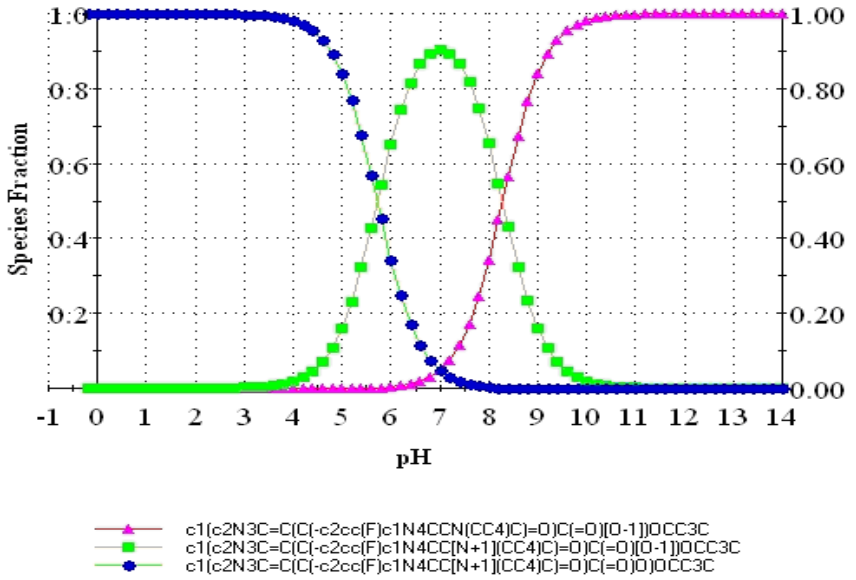
1.4.6.5. Ofloksasin

İdrar yolu enfeksiyonları, alt solunum yolu enfeksiyonları, genore ve gonokoksik olmayan üretrit ve servisitte kullanılır. Metabolize edilmez, %95 oranında değişmeden atılır. Sadece idrar yolu infeksiyonlarında kullanılır. Ofloksasin bir antibiyotiktir ve fluorokinolon grubu ilaçlardan biridir. Ofloksasin vücuttaki bakteriler ile savaşarak etki gösterir. Solunum sistemi enfeksiyonları (bronşit, zatürre gibi), kulak – burun – boğaz enfeksiyonları, üreme organları ile ilgili enfeksiyonlar, prostat, kemik ve eklem enfeksiyonları, deri ve yumuşak doku enfeksiyonları, safra yolları enfeksiyonları, karınla ilgili enfeksiyonlarda kullanılır.

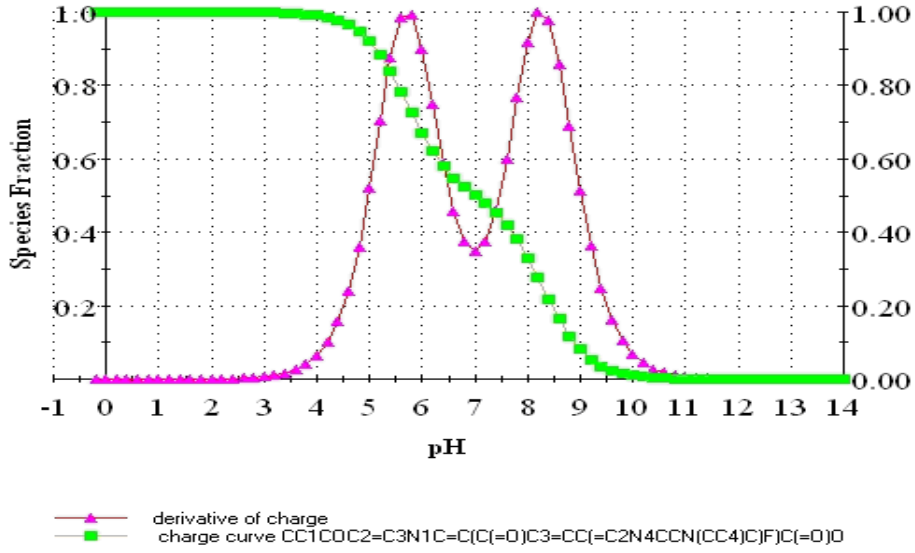
1.4.6.5. 1. Ofloksasinin İyonlaşma Sabitleri

Ofloksasin iyonlaşma dengeleri ve bu dengelerden hesaplanan pKa değerleri;

<table>
<tr><td>
Max Fraction = 1.00</td><td></td><td>
Max Fraction = 0.90</td></tr>
<tr><td colspan="3">Macro Pka = 5.72</td></tr>
<tr><td>
Max Fraction = 0.90</td><td></td><td>
Max Fraction = 1.00</td></tr>
<tr><td colspan="3">Macro Pka = 8.28</td></tr>
</table>



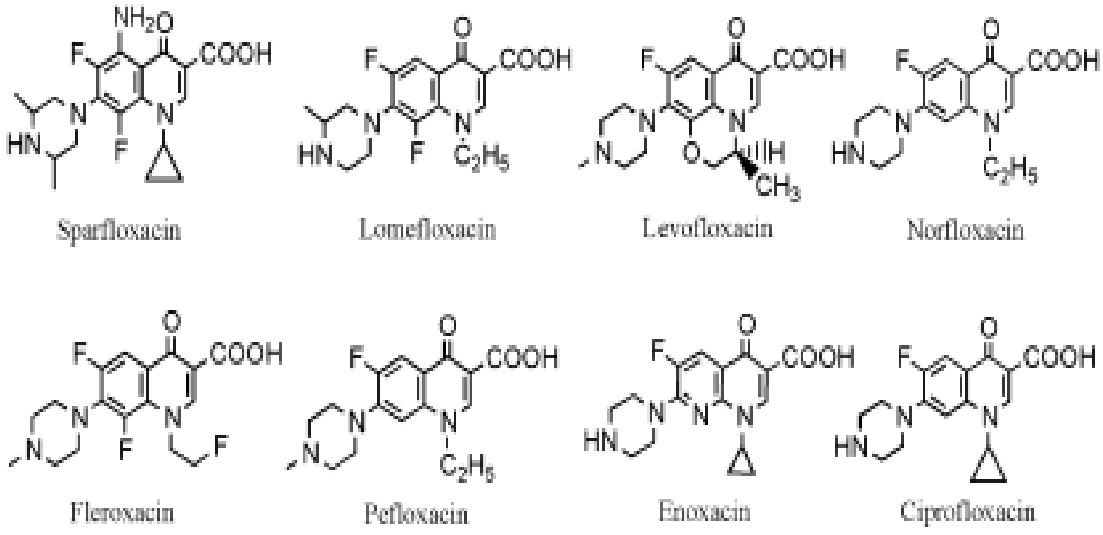
Şekil 1.39. Ofloksasin için α- pH ilişkisi ve 1. türev eğrisi



Şekil 1.40. Ofloksasin için α- pH ilişkisi ve 2. türev eğrisi

2. KAYNAK ARAŞTIRMASI

4-Kinolonlar, karboksikinolonlar veya yalnızca kinolonlar olarak adlandırılan ajanlar, yapıca nalidiksik aside benzeyen sentetik antibakteriyel bileşiklerdir (yapıca 6-floro-4-kinolonkarboksilik asit türevleridir). Bu grubun ilk üyesi olan nalidiksik asit, dar spektrumu, oldukça zayıf antibakteriyel aktivitesi ve hızlı bakteriyel rezistans gelişmesinden dolayı yaygın kullanım alanı bulamamıştır. Kinolonların yeni bir kuşağı olan florokinolonlar, geniş antimikrobiyal spektrum, hızlı ve bakterisid etki ve yavaş rezistans gelişmesi gibi önemli terepötik üstünlüklere sahiptirler. Sitoplazmaya giren florokinolonlar, burada DNA'yı negatif süpersarmal hale getiren bakteriyel DNA-jiraz (topoizomeraz II) enzimini alfa- alt birimine bağlanarak inhibe ederler. Bu nedenle de "DNA-jiraz inhitörleri" olarak da adlandırılırlar.



Şekil-2.1. Florokinolon ilaç etken maddelerinin molekül şekilleri

DNA-jirazın inhibisyonu için, bütün kinolonların moleküllerinin 3 no'lu pozisyonunda karboksil grubunun ve 4 no'lu pozisyonunda keton grubunun bulunması gereklidir. Bakteri DNA'sının negatif süpersarmal hale geçmesi için gerekli olan DNA-jiraz enziminin (aslında bu enzimin A alt-biriminin) inhibisyonu, DNA replikasyon ve transkripsiyonunu bozarak, negatif süpersarmal hale geçmesini önler. Böylece florokinolonların etkisi altında kalan bakteriler bölünemezler ve uzayarak ölürler. Ayrıca 6 no'lu pozisyona flor ilavesi, DNA-jirazın inhibisyonunu güçlendirir ve bakteri hücre geçirgenliğini arttırır (siprofloksasin ve ofloksasin gibi). Novobiosin, DNAgiraz

ın beta-alt birimini etkiler. Siprofloksasin ve ofloksasin ayrıca, bakteri sitoplazma membranını zedeleyerek, diğerlerine göre daha güçlü antibakteriyel etki yaparlar. Geniş spektrumlu ve bakterisid etkilidirler. 1,7 ve 8 no'lu pozisyonlardaki diğer değişiklikler hem mikrobiyolojik aktiviteyi hem de florokinolonların farmakolojik özelliklerini etkiler. 7 no'lu pozisyondaki piperazin grubu antipsödomonal aktiviteyi güçlendirir (Akkan, 2000). Farmakolojik açıdan bu kadar önemli olan bu ilaç grubunun, iyonlaşma sabitlerinin doğru ve hassas bir şekilde tayin edilmesi de büyük bir önem arz etmektedir.

Zhang ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları " Florokinolonlar ve insan serumu albumini arasındaki etkileşimlerin affinite kapiler elektroforez ve floresans yöntemleriyle incelenmesi" konulu çalışmalarında, Florokinolonlar ve insan serumu albumini (HSA) arasındaki etkileşimlerin affinite kapiler elektroforez (ACE) ve floresans söndürme teknikleriyle çalışmışlardır. Basit bir fosfat tamponu kullanarak çeşitli florokinolonların etkin ayırımına dayalı, florokinolonların insan serumu albumini ile bağlanma sabitleri, ACE yöntemiyle bir set elektroforez süresince eş-zamanlı olarak tayin edilmiştir. Termodinamik parametreler, farklı sıcaklıklardaki verilerden elde edilmiştir ve negatif ΔH ve ΔS değerleri göstermiştir ki hem hidrojen bağları hem de vander Waals etkileşimi, florokinolonların insan serumu albuminine bağlamnmasında başlıca rol oynadıklarını belirtmişlerdir. Bu etkileşimler, floresans söndürme tekniğiyle de çalışılmıştır. Floresans titrasyon sonuçları göstermiştir ki florokinolonlar, statik söndürme işlemi boyunca insan serumu albumininin floresansını söndürmek konusunda güçlü bir yeteneğe sahiptirler. Bağlanma alanı sayısı n, bilinen bağlanma sabiti Kb ve Stern-Volmer söndürme sabiti Ksv tayin edilmiştir. Termodinamik parametreler floresans yöntemiyle de çalışılmış ve sonuçlar ACE'ninkilerle uyumlu olarak bulunmuştur.

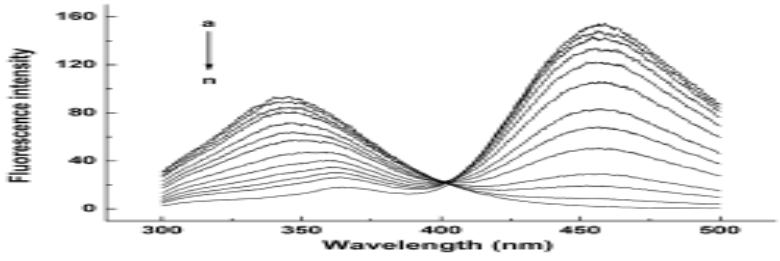


Fig. 7 – Fluorescence quenching of HSA by levofloxacin. From *a* to *n* C_{levo}/C_{HSA} were 0, 0.1, 0.3, 0.5, 0.7, 1.0, 1.5, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 and 10.0, respectively. Conditions: excitation and emission slit width, 5 nm; excitation wavelength, 280 nm; temperature, 298 K; buffer solution, 50 mM, pH 7.4 PB.

Şekil 2.2. Levofloksasinin dalga boyu-floresans şiddeti grafiği

Şekilde görüldüğü gibi, levofloksasin 280 nm'lik eksitasyon dalgaboyunda HSA'nın iç Floresansında konsantrasyona bağımlı bir söndürme göstermiş ve triptofanın HSA'daki maksimum floresansında görülebilir kaymalara neden olmuştur. Hidrofobik özelliğin HSA'da triptofanın bağlanma kapasitesinin levofloksasinle etkileşimi sonucu azaldığı ve HSA ve proteine sekonder oluşumların değiştiği izlenmektedir. Florofor türlerinin söndürme etkinliği Ster-Volmer eşitliğine tabidir:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_Q \tau_0 [Q] = 1 + K_{SV}[Q] \qquad 2.1.$$

F_0 ve F, sırasıyla söndürücü yokluğunda veya varlığında durağan Floresans şiddetlerini göstermektedir. [Q] söndürücünün konsantrasyonudur. KQ bimoleküler söndürme oran sabiti ve KSV de Stern–Volmer söndürme sabitidir. τ_0 floroforun ortamdaki ömrüdür.

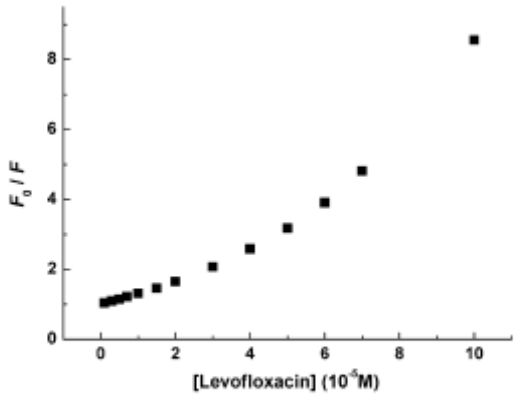


Fig. 8 – Stern–Volmer plots of fluorescence quenching of HSA–levofloxacin. Conditions as in Fig. 7.

Şekil 2.3. 10^{-5}M Levofloksasin konsantrasyon- floresans şiddeti oranı grafiği

Li Ming Du ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptıkları "Spektroflorimetrik belirleme yoluyla belirli bir kinolon arasında transferle kompleks oluşumu" konulu çalışmalarında, Bir spectrofluorimetrik yöntemi üç florokinolon antibakteriyelleri belirlenmesi için, ofloksasin (OFL), levofloksasin (LEV), lomefloksasin (LOM) gibi ve şarj transferi yoluyla pipemidik asit (PIP) kompleks oluşum 7,7,8,8-tetracyanoquinodimethane (TCNQ) ile geliştirilmiştir. TCNQ kararlı kompleksleri ve komplekslerinin floresans yoğunluğu üretmek için bu ilaçlar ile tepki 15-90 kat daha kendisini daha gelişmiş olduğu çalışmaları bulmuştur. Bu komplekslerde Uv-Vis ve IR ölçümleri tespit edildi. Farklı deneysel parametreleride floresans yoğunluğy dikkatle çalışıldı, Araştırılan ilaçlar için optimum reaksiyon koşullarında doğrusal kalibrasyon

grafikleri 0,02-2,2 μgml^{-1} konsantrasyon aralığında ve algılama sınırları 0,006 0,016 μgml^{-1} elde edildi. Önerilen işlemleri onaylanmış başarıyla belirlemek için araştırılan ilaçlar ilaç dozaj formlarında iyi bir hassasiyet ve doğruluğu karşılaştırıldı. Resmi ve sunum metotlarına göre t ve F-testlerinde gösterildi. Ayrıca onlar idrar ve plazma örneklerinin belirlemek için uygulanmıştır.

Juan Antonio Ocaña González ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları "İnsan idrar ve serumunda tabletlerdeki levofloksasinin spektroflorimetrik tayini" konulu çalışmalarında, tabletlerdeki ve alkollü insan idrar ve serumundaki levofloksasin tayini için bir spektrofluorimetrik yöntem önermişlerdir. Fluorimetrik yöntem sırasıyla λex = 292 nm ve λem = 494 nm' de asetik asit-sodyum asetat tamponu (pH 4) içeren sulu çözeltideki levofloksasinin 20-3000 $ng.ml^{-1}$'sinin tayinine olanak sağlamıştır. Floresans arttırıcı misel duyarlılığı iyileştirmiş ve pH 5'de 8 mM sodyum dodesil sülfat çözeltilerinde, alkollü insan serumunda (5 $mg.ml^{-1}$) ve idrarda (420 $mg.ml^{-1}$) levofloksasinin doğrudan ölçümünü sağlamıştır.

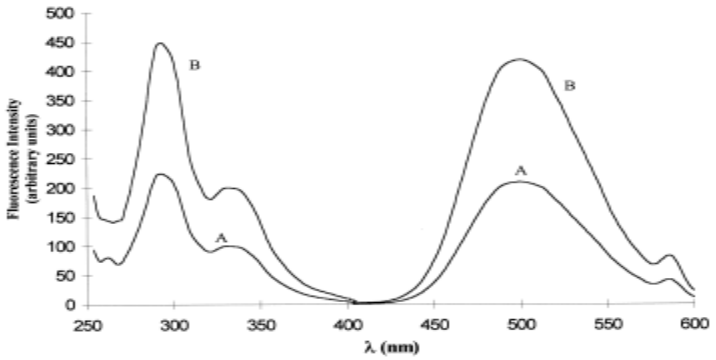


Fig. 1. Excitation spectra and emission spectra of levofloxacin (1 μg ml⁻¹) with λ_{exc} = 292 nm for an aqueous solution (A), and for an 8 mM SDS micellar solution (B).

Şekil 2.4. Levofloksasinin 292 nm dalga boyu, floresans şiddeti grafiği

Katı haldeyken, levofloksasin kokusuz, beyaz-sarı arası bir renkte, kristalize bir tozdur. Erime noktası 228.6°C'dır. Levofloksasin pratik olarak suda çözünmez ancak etanol ve kloroformda çözülür. Etanol-su karışımında da çözülür. Oktanol:su dağılma katsayısı (logKow) 0.6'dır.Bu bilgiler Hoechst Marison Roussel'den elde edilmiştir. Levofloksasin iki iyonlaşabilen grup ihtiva eder: bir karboksilik grup (pKa1: 6.05 ve 5.70) ve bir de temel piperanzil grup (pKa2: 8.22 ve 7.90). Sudaki %1'lik solusyonu 6.5–7.5 arasında bir pH gösterir. Şekil 2.5. (A), levofloksasinin sulu çözeltisinin eksitasyon ve emisyon spektrumlarını göstermektedir. Ekzitasyon spektrumunda 292

nm'de bir maksimum, ve emisyon spektrumu da 494 nm'de bir maksimum göstermektedir. Bu eksitasyon ve emisyon spektrumları Floresans şiddetini hesaplamak için kullanılmıştır. Levofloksasinin floresans şiddetinde pH etkisi Şekil 2.5'de görülmektedir. pH 3.0-5.0 arasında floresans maksimumdur. Karboksilik grubun pKa'sı, pH 5.5'dan yüksekse 6.0 olmaktadır ki bu da floresansta önemli bir azalmadır çünkü karboksilat iyon varlığı moleküldeki floresansın aktivitesini engellemektedir. Bu nedenle pH 4.0'deki asetik asit-sodyum asetat tamponu, levofloksasinin spektroflorimetrik tayini için seçilmiştir.

Eklenen tampon miktarının etkisi incelenmiş ve floresans şiddetinin 20 ml'den daha az 0.1 M asetik-asetat tamponu 25 ml'lik son hacme eklendiğinde stabil kaldığı görülmüştür. Benzer şekilde 0.1 M tampon çözeltisinin 25 ml içindeki 5 ml'lik örneği, önerilen işlem için uygun bir hakim olarak seçilmiştir. İyonik gücün etkisinin incelenmesinde levofloksasinin değişik konsantrasyonlarda KCl içeren tamponları hazırlanmıştır. Levofloksasinin floresans şiddetinde 0.1 M KCl konsantrasyonunda anlamlı azalma olmaktadır. Floresans şiddetine sıcaklığın etkisi hemen hemen lineer olup ancak negative ilişki göstermektedir. Sıcaklık azaldığında beklendiği gibi floresans artmaktadır.

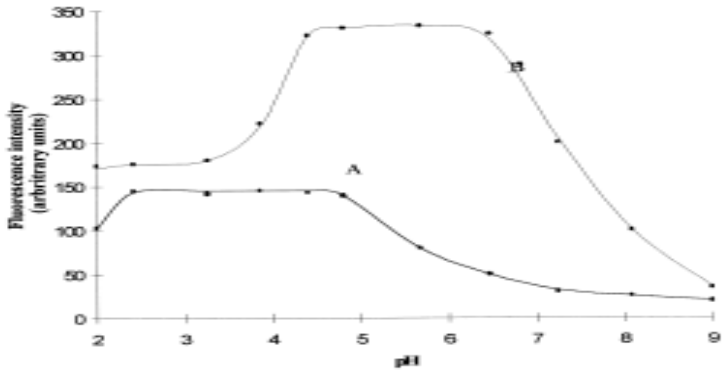


Fig. 2. pH influence on the fluorescence intensity for levofloxacin (1 μg ml^{-1}, $\lambda_{exc} = 292$ nm, $\lambda_{em} = 494$ nm) for levofloxacin: (A) aqueous solution; and (B) 8 mM SDS micellar solution.

Şekil 2.5. Levofloksasinin pH-floresans şiddeti grafiği

SDS anyonik miçeller varlığında, levofloksasin daha fazla solübilize olmaktadır. Bu durum molar absortivitesinde ve floresans kuantum verminde değişikliğe neden olmakta ve floresans şiddetinde iyileşme yapmaktadır. Misel ortamı sağlayabilmek için, SDS konsantrasyonu minimum bir değerin üzerinde olmalıdır (kritik misel konsantrasyonu). Levofloksasinin misel vasıtasıyla floresansı, levofloksasinin 1 $mg.ml^{-1}$

çözeltilerinde artan SDS konsantrasyonlarında incelenmiştir. SDS konsantrasyonu arttıkça floresans şiddeti de artmış ve SDS 6mM konsantrasyonda kararlı hale gelmiştir. Daha fazla ilave edilen SDS Floresans şiddetini değiştirmemiştir. Bu nedenle 8mM SDS konsantrasyonu, daha sonraki ölçümler için uygun konsantrasyon olarak belirlenmiştir. Şekil 2.6. (B)'de görüldüğü gibi, misel etkisiyle oluşan floresans 4.5-6.0 pH aralığında maksimum olmaktadır.

Oscar Ballesteros ve arkadaşlarının 2002 yılında yaptıkları "Insan idrarında ve serum örneklerinde antibakteriyel ofloksasinin katı faz spectrofluorimetrisiyle tayini" konulu çalışmalarında, ofloksasinin eser miktarının tayini için katı faz spektroflorimetrisine dayanan bir yöntem geliştirilmiştir. Sefadeks SP C -25 jelinde sabitlenmiş olan ofloksasinin bağıl floresans şiddeti, bir katı faz eklentisi kullanarak, 1-mm silika hücrede jel boncuklar istiflendikten sonra direkt olarak ölçülmüştür. Uyarılma ve emisyon dalga boyları sırasıyla 294 ve 494 nm' dir. Uygulamanın doğrusal derişim aralığı, %1,1'lik bağıl standart sapma ile (8.0 ng ml^{-1} seviyesi için) 0.5-16.0 $ng.ml^{-1}$ ofloksasin ve dedeksiyon limiti ise 0,14 ng ml^{-1}'dir. Yöntem, insan idrarı ve serum örneklerinde ofloksasin tayinine uygulanmıştır. Yöntem, standart ekleme yöntemi ve referans bir yöntem olarak HPLC kullanılarak doğrulanmıştır. Yöntemin geri kazanım seviyeleri bütün durumlarda %100'e ulaşmıştır.

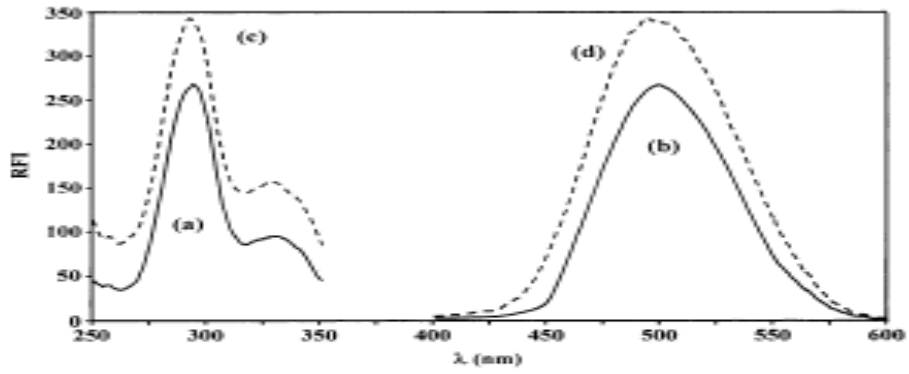


Fig. 1. Fluorescence spectra of: ofloxacin fixed on Sephadex SP C-25 (—), (a) excitation and (b) emission, [OFL] = 5.0 ng ml^{-1}, sample volume, 500 ml; ofloxacin in solution watery (· · ·), (c) excitation and (d) emission, [OFLX] = 1.0 mg l^{-1} (RFI, relative fluorescence intensity). $slit_{ex}$, 5 nm; $slit_{em}$, 5 nm; v, 480 nm min^{-1}.

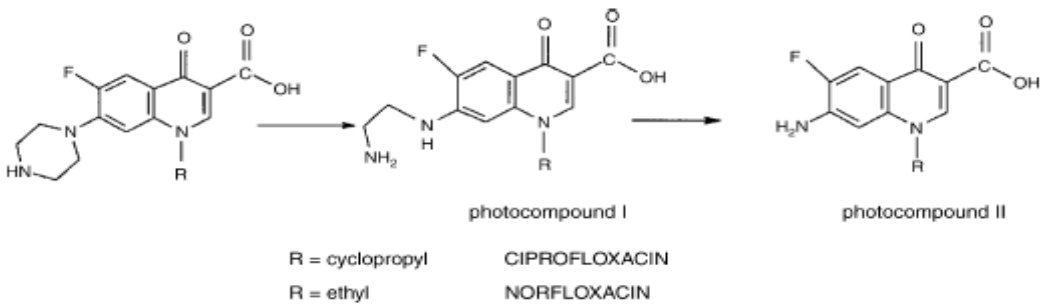
Şekil 2.6. Ofloksasinin dalga boyu-floresans şiddeti grafiği

Hing-Biu Lee ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları "Atık suda ofloksasin, norfloksasin ve siprofloksasinin seçici katı faz ekstraksiyonu, floresans dedektörlü sıvı

kromatografisiyle ve sıvı kromatografisi-ardışık kütle spektrometresiyle tayini ” konulu çalışmalarında, kentsel atık su örneklerinde ofloksasin, norfloksasin ve siprofloksasin içeren seçilmiş florokinolon (FQ) ilaçların tayini için bir katı faz ekstraksiyonu (SPE) ve sıvı kromatografik (LC) yöntemi geliştirilmiştir. FQ'ların ekstraksiyonu, zayıf katyon değiştirici SPE kartuş, Oasis WCX ile gerçekleştirilmiştir. FQ'ların metanol, asetonitril ve formik asit bir karışımı tarafından elüe edilmeden önce, kartuş temizleninceye kadar su ve metanol ile yıkanmıştır. FQ'ların ayrımı, izo kratik koşulda 0,2 ml / dk'lık akış hızında bir Zorbax SB C8 kolonu kullanılarak elde edilmiştir. Alkollü son atık su örneklerinde FQ'ların geri kazanımı, % 6 dan daha az bağıl standart sapma ile % 87 ve % 94 arasında tespit edilmiştir. Çeşitli teknikler atık su ekstraktlarında belirlenmesi için değerlendirilmiştir; bunlar floresans dedektör ve ya kütle seçici dedeksiyon ya da ardışık kütle spektroskopisi (MS/MS) kullanan elektrosprey iyonizasyon kütle spektroskopisini (ESI) kapsamaktadır. Bunlar kanalizasyon atık suyu ve atık su örneklerine uygulandığı zaman, en yüksek duyarlılık (tayin limiti 5 ng /L) ve seçicilik gösterdiği için, çoklu reaksiyon görüntüleme modunun (MRM) işletildiği LC-MS/MS tekniğinin kanalizasyon örneklerinde FQ'ların tayini için en uygunu olduğunu göstermiştir. FQs ESI LC-MS ve LC-MS/MS için sinyal baskılamasının (matriks etkisi) gözlemi tartışılmış ve bir çözüm önerilmiştir. Üç florokinolon, bu çalışmada test edilen tüm kanalizasyon örneklerinde 34 ve 251 ng /L arasındaki medyan konsantrasyonlarıyla belirlenmiştir.

A. Espinosa-Mansilla ve arkadaşlarının 2005 yılında yaptıkları "Enoxacin, siprofloksasin, norfloksasin ve ofloxacının fotoindüklenmiş fluorimetrik (PIF) dedeksiyon ve çoklu emisyon taraması ile HPLC tayini: İdrar ve seruma uygulanması" konulu çalışmalarında, enoxacin (ENO), siprofloksasin (CIPRO), norfloksasin (NOR) ve ofloksasin (OFLO) gibi florokinolonların floresans emisyonu, etanol-su ortamında birkaç dakika boyunca UV ışınlamasıyla dikkate değer ölçüde artmıştır. Bu florokinolonların tayini için uyarılma foto-ürünleri oluşturulmasıyla ayırma esasına dayanan bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Analitik dalga boyunun optimizasyonu, hızlı çoklu-emisyon taramalı floresans dedeksiyonuyla belirlenmiştir. En yüksek duyarlılık (277 nm uyarma dalga boyunda) emisyon dalga boyları enoksasin ve ofloksasin için sırasıyla 407 ve 490 nm ve NOR ve CIPRO her ikisi için de 444 nm ölçüldüğü zaman bulunmuştur. Clayton'un kriterine göre, yanlış pozitif ve yanlış negatif hata güven olasılıkları olarak 0,05 kullanarak, ENO, NOR, CIPRO ve OFLO için dedeksiyon limitleri sırasıyla 7,3, 6,0, 6,3 ve 14,5 ng / ml bulunmuştur. İdrar ve serum için sırasıyla

geri kazanım değerleri % 99-97 ve% 98-103 arasında değişen geri kazanım değerşleriyle idrar ve serum örnekleri başarılı bir şekilde analiz edilmiştir.



Scheme 1. Pathway photodegradation for CIPRO and NOR.

Şekil 2.7. Siprofloksasin ve Norfloksasin molekül şekilleri

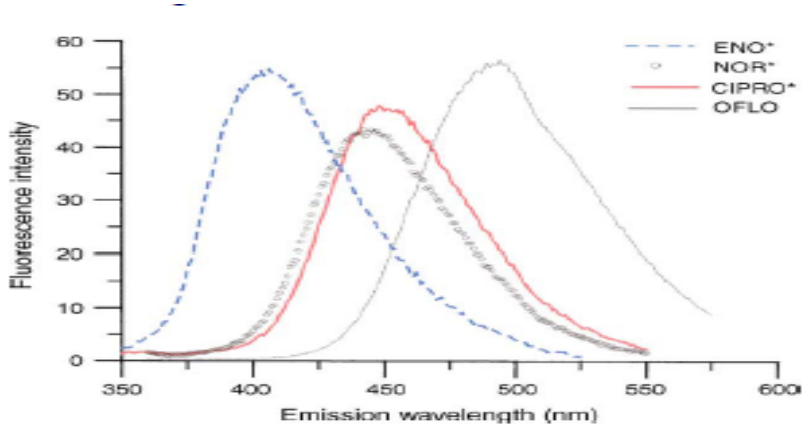


Fig. 2. Emission spectra of ENO, NOR, CIPRO and OFLO exciting at 277 nm, before the irradiation process.

Şekil 2.8. ENO, NOR, CİPRO ve OFLO emisyon dalga boyu-floresans şiddeti grafiği

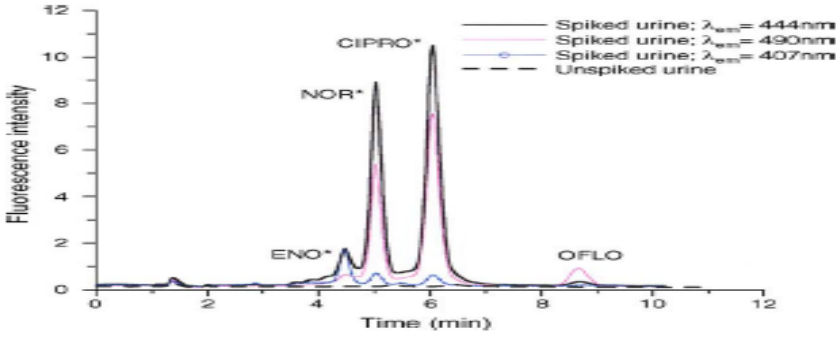


Fig. 4. Chromatogram of unspiked and spiked urine samples containing ENO, NOR, CIPRO and OFLO, at different detection emission wavelengths (λ_{ex} = 277 nm).

Şekil 2.9. ENO, NOR, CİPRO ve OFLO zaman-floresans şiddeti grafiği

İncilay Süslü ve Ayla Tamer 'in 2002 yılında yaptıkları "Yığında ve ilaç dozaj formunda bromo fenol mavi ve bromo krezol moruyla iyon çiftleri halinde enoksosinin spektrofotometrik olarak tayini " konulu çalışmalarında, enoxacinin tayini için üç basit, doğru ve duyarlı spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemler, bromo fenol mavi ve bromo krezol moru gibi sülfonftaleyn boyalar ile iyon çiftleri halinde, kloroform içine ilacın ekstraksiyonuna dayanmaktadır. Reaksiyonların optimum şartları çalışılmış ve optimize edilmiştir. Sarı ürünlerin absorbansı enoxacin-bromo fenol mavisi için 412 nm'de ve enoxacin-bromo krezol moru için 410 nm'de ölçülmüştür. Doğrusal aralıklar enoxacin-bromo fenol mavisi için 2,0-20,0 µg ml^{-1} ve enoxacin-bromo krezol moru için 0,77-17,62 µg ml^{-1} olark bulunmuştur. Dedeksiyon limitleri enoxacin-bromo fenol mavisi için ve enoxacin-bromo krezol moru için sırasıyla 0,084 µg ml^{-1} ve 0,193 µg ml^{-1} olarak bulunmuştur. İyon çifti bileşimi Job's yöntemiyle 1:1 oranında bulunmuştur. Geliştirilen yöntemler farmasötik preparatlarda bu ilacın tayini için başarıyla uygulanmıştır. Geliştirlen yöntemlerle elde edilen veriler literatürdeki spektrofotometrik yöntemle karşılaştırılmıştır. İstatistiksel olarak fark olmadığı bulunmuştur.

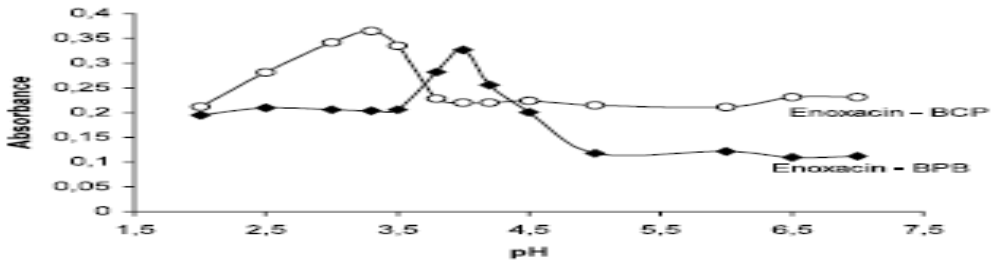


Fig. 4. Effect of pH of buffer solution on the ion-pair complexes.

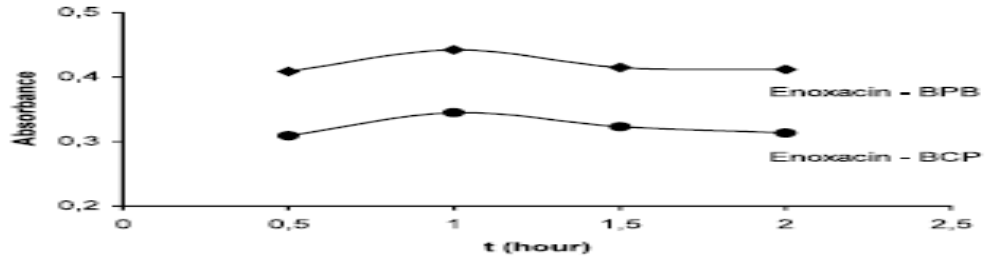


Fig. 5. Effect of shaking time on the ion-pair complexes.

Şekil 2.10. Enoksasinin bromo fenol mavi ve bromocresol moru pH-Absorbans, pH-zaman grafiği

Marcela Seifrtová ve arkadaşlarının 2009 yılında yaptıkları "Çevre sularında antibiyotiklerin tayini için analitik metodolojilere genel bir bakış " konulu çalışmalarında, su ortamında kirleticiler olarak antibiyotiklerin yaygın oluşumunun son

yıllarda önemli ölçüde arttığı, çevreye antibiyotiklerin bırakılması üzerine olan ilginin, öncelikle mikroorganizmalar arasında antimikrobiyel direncin gelişimi için potansiyele bağlı olduğu belirtilmiştir. Bu makale farklı çevre sularında kinolon (Qlar) ve florokinolon (FQlar), makrolit (MLler), tetrasiklin (TCler), sulfonamit (SAler) antibiyotikler ve trimetoprimin (TMP) tayini için analitik yöntemlere genel bir bakış sunmaktadır. Bu antibiyotiklerin analizi gibi genellikle kütle spektrometresi (MS) veya tandem (ardışık) kütle spektrometresi (MS / MS) ile ve daha az bir oranda ultraviyole (UV) veya floresans dedeksiyon (FD) ile birleştirilmiş yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ile yapılmıştır. LC analizinden önceki çok önemli bir adım, numune hazırlama ve hedef analitlerin ön deriştirilmesi ve matris etkisinin önlenmesi ve girişim yapan türlerin uzaklaştırılmasına sebep olan ekstraksiyondur.

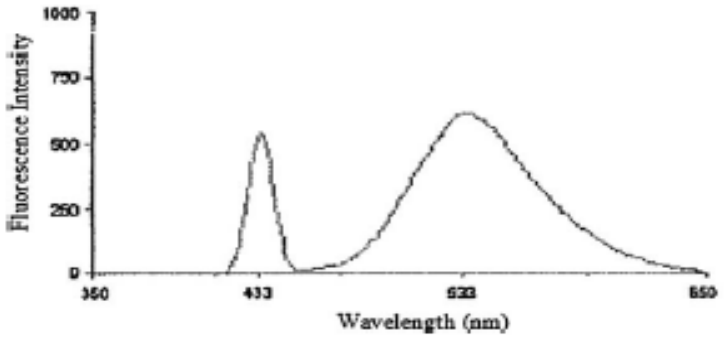


Fig. 2. Fluorescence spectrum of LOM-NBD derivative.

Şekil 2.11. Lomofloksasin dalga boyu-floresans şiddeti grafiği

Sevgi Tatar Ulu'nun 2009 yılında yaptıkları "alkollü insan plazması, idrar yüksek duyarlılıkla spectroflorimetrik tayini " konulu çalışmalarında, biyolojik sıvılar ve farmasötik preparatlar içindeki lomefloxacinin tayini için duyarlı, basit ve seçici bir spectroflorimetrik yöntem geliştirilmiştir. Yöntem pH 8.5'luk borat tamponunda, 433nm'de uyarıldıktan sonra 533nm'de ölçülen yüksekçe floresent bir türev vermek üzere, ilaç ve 4-kloro-7-nitrobenzodioksazol arasındaki reaksiyona dayanmaktadır. Kalibrasyon eğrileri sırasıyla plazma, idrar ve standart çözelti için 12,5-625, 15-1.500 ve 20-2.000 ng/ml derişim aralıklarının üzerinde doğrusaldır. Dedeksiyon limitleri plazmada 4,0 ng /ml, idrarda 5.0 ng /ml ve standart çözeltide 7,0 mL ng/ml'dir. Tayin-içi doğruluk ve kesinlik plazmada sırasıyla %0,45-2,10 ve %0,25-0,38 arasındayken, tayin-dışı doğruluk ve kesinlik sırasıyla %0,032-2,40 ve % 0,23-0,36 arasına değişmektedir. Tayin-içi doğruluk ve kesinlik alkollü örneklerde idrarda sırasıyla %1.60-4.00 ve %0.14- 0.25,arasındayken, tayin-dışı doğruluk ve kesinlik sırasıyla

%1,27-4,20 ve % 0,12-0,24arasında değişmektedir. Plazma ve idrardan lomefloksasin geri kazanım ortalaması sırasıyla %98,34 ve 98,43'tür. Yöntem farmasötiklerde ve biyolojik sıvılarda lomefloksasinin tayinine başarıyla uygulanmıştır.

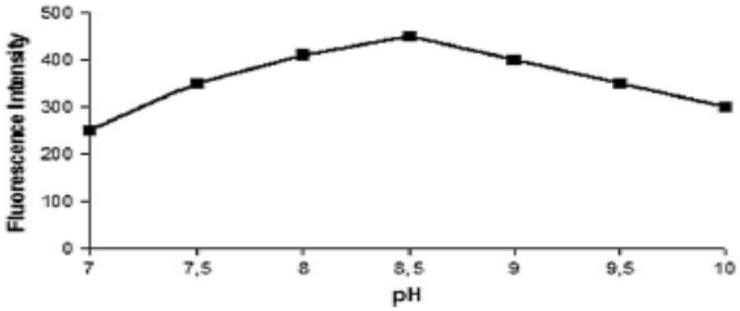


Fig. 3. Effect of pH on fluorescence intensity of lomefloxacin-NBD derivative.

Şekil 2.12. Lomefloksasinin pH-floresans şiddeti grafiği

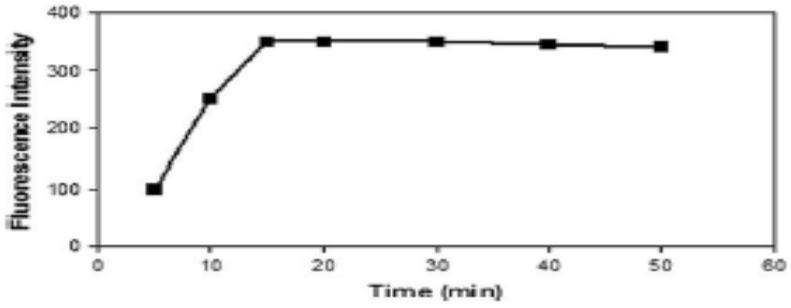
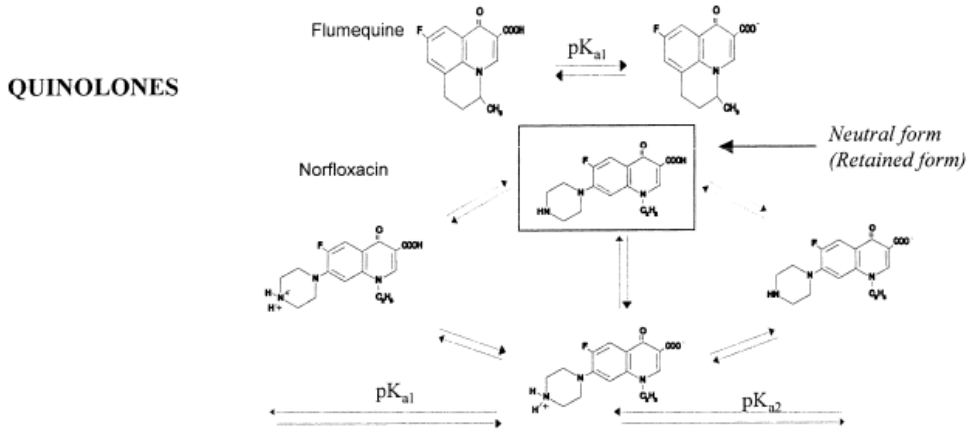


Fig. 4. Effect of time on the reaction of lomefloxacin with NBD-Cl (70 °C).

Şekil 2.13. Lomefloksasinin zaman-floresans şiddeti grafiği

M. Rizk, F. Belal ve arkadaşlarının 2000 yılında yaptıkları "ilaçlarda ve biyolojik sıvılardaki bazı 4-kinolonların spectroflorimetrik analizi " konulu çalışmalarında, ilaç dozaj formları veya biyolojik sıvılarda sparfloksasin(I), okzolonic asit (II), flumekin (III) ve enrofloksasin (IV) gibi bazı 4-kinolon antibiyotiklerinin analizi için çok hassas bir spectroflorimetrik yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntem, sparfloksasin için asetonitrilde gerçek floresansa veya $AlCl_3$ ile ilaçların etkileşimi ile elde edilen oldukça arttırılmış olan floresansa dayanmaktadır. Maksimum floresans şiddet için en uygun pH, I için 8-8,5, II ve III için 5-6 ve IV için pH 3,5'tur. Floresans şiddetini etkileyen farklı deneysel parametreler dikkatlice çalışılmış ve yönteme dahil edilmiştir.

V. Sanz-Nebot ve arkadaşlarının 2001 yılında yaptıkları "Sıvı kromatografisinde bir seri peptid ve kinolonun pKa değerlerinin değerlendirilmesi ve alıkonma davranışının tahmini" konulu çalışmalarında, biyolojik ilgiye sahip peptid ve kinolon bileşiklerinin sıvı kromatografisinde alıkonma davranışı üzerine çözünen iyonizasyonunun etkisi mobil faz olarak asetonitril-su ortamı ve polimerik bir sabit faz kullanılarak incelenmiştir. Polistiren-divinilbenzen (PS-DVB) polimerli polimerik kolonlar, kalıp geniş bir pH aralığında kararlı olduğu için, silika-bazlı ters-faz dolgular oldukça fazlı avantaj göstermiştir. pK değerleri, kinolonlar için % 30, 35, 40 ve 50 (v/v) ve peptidler için % 12,5 ve 20 (v/v)'lik asetonitril yüzdeleri ile asetonitril su karışımlarda kromatografik veriler kullanılarak hesaplanmıştır. Kinolonlar PS-DVB sabit fazında büyük bir alıkonma göstermiştir. Böylesi, az alıkonmuş peptitler için olandan hareketli fazda daha yüksek asetonitril içeriğiyle çalışmayı gerektirmektedir. pH değerleri, sudakinin yerine hareketli faz olarak kullanılan hidroorganik karışımlarda ölçülmüştür ve aktiflik katsayısının etkisi hesaba katılmıştır. Türetilen eşitlikler, doğrusal olmayan en küçük kareler yönteminde deneysel verilere uyarlanarak, asetonitril-su ortamlarındapeptitler ve kinolonların pKa değerlerinin kromatografik tayinini ve kromatografik davranışları üzerine pH'nın etkisinin tahminine de imkân sağlamaktadır. Bu çalışmada, elde edilen pKa değerleri, daha önce asetonitril-su ortamında potansiyometrik ölçümlerden elde edilenlerle karşılaştırılmıştır.



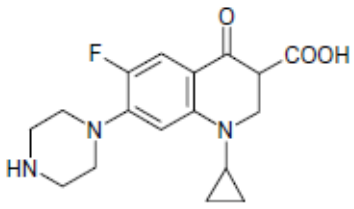
Şekil 2.14. Kinolonların (Flumequine ve Norfloksasin) reaksiyonları

Sandra Babic ve arkadaşlarının 2007 yılında yaptıkları "Ilaç aktif maddelerinin pKa değerlerinin tayini " konulu çalışmalarında, asit iyonlaşma sabitinin bir maddenin önemli bir fizikokimyasal parametresi olduğu ve bunun bilinmesinin uygulamalar ve

araştırma alanlarının geniş bir aralığında temel öneme sahip olduğu belirtilmiştir. Bu çalışma, pKa değerleri üzerine özel bir vurguyla, ilaç etken maddelerinin asit iyonlaşma sabitlerinin tayini için basılmış yöntemler ve yaklaşımların eleştirsel bir değerlendirmesini sunmaktadır.

Potansiyometrik titrasyona, UV-VIS spektrofotometri alternatiftir çünkü daha düşük çözünürlükteki bileşikleri ve düşük konsantarsyondaki örnekleri inceleyebilir. Molar absorpsiyon koefisyanları iyi olan bileşiklerdeki yüksek hassasiyeti esas avantajıdır. Ancak bileşik UV-aktif olan kromofor içermelidir ve moleküldeki asit-baz fonksiyonuna yeterince yakın olmalıdır. Diyot saçılımlı spektrometreyle yapılan titrasyon süresince spektral veriler sürekli olarak kaydedilir. Örneğin absorpsiyon spektrumu titrasyon sırasında değişerek mevcut nötral ve iyonize türlerin konsantrasyonunu yansıtır. Absorbanstaki en büyük değişiklik pKa değerine uyan pH seviyesinde görülür. Bu değişiklikler genellikle absorbansın zamana karşı ilk türevlerinden veya değişik spektrumların kaydedilmesiyle tespit edilir. pKa değerlerinin UV-VIS ile tespiti, solütün saf olduğunu farz ederek veya içindeki safsızlıkların UV-VIS aralığında absorbans yapmadığı kabul edilerek yapılır. Spektroflörimetrik metotlar, potansiyometride olduğu gibi, mükemmel hassasiyet sağlarlar ama farklı türler için değişik spektrumlar gerektirirler ve çözücülerin saf olmaları gerekir. Geleneksel olarak, tek bir analitik dalgaboyundaki spektral veriler, bir dizi tampon çözelti içindeki bir örnekten elde edilen pKa değerleridir. Bu metodu kullanmak için, her bir türün absorpsiyon spektrumları önceden belirlenmeli, proton almış ve proton vermiş türlerin molar absorptiviteleri bilinmelidir.

Çizelge 2.1. Florokinolonların kimyasal formülü ve özellikleri, pKa

Compound	Chemical structure	pK_a	Method	Ref.
Ciprofloxacin		6.42 ± 0.01; 8.29 ± 0.04	UV/pH titration (MDM-water)	
		6.28 ± 0.02; 8.56 ± 0.05	UV/pH titration (MeOH-water)	
		6.09; 8.62	Potentiometry	
		5.86 ± 0.05; 8.24 ± 0.07	CE	
		6.33 ± 0.01; 8.84 ± 0.04	CE-DAD	
		3.01 ±0.30; 6.14 ± 0.13; 8.70 ± 0.09; 10.58 ± 0.30	Potentiometry	
		5.05 ± 0.15; 6.35 ± 0.07; 8.95 ± 0.04	CE	
		5.90 ± 0.15; 8.89 ± 0.11	Potentiometry/fluorimetry	
		6.68, 8.63	Calculated (SPARC)	

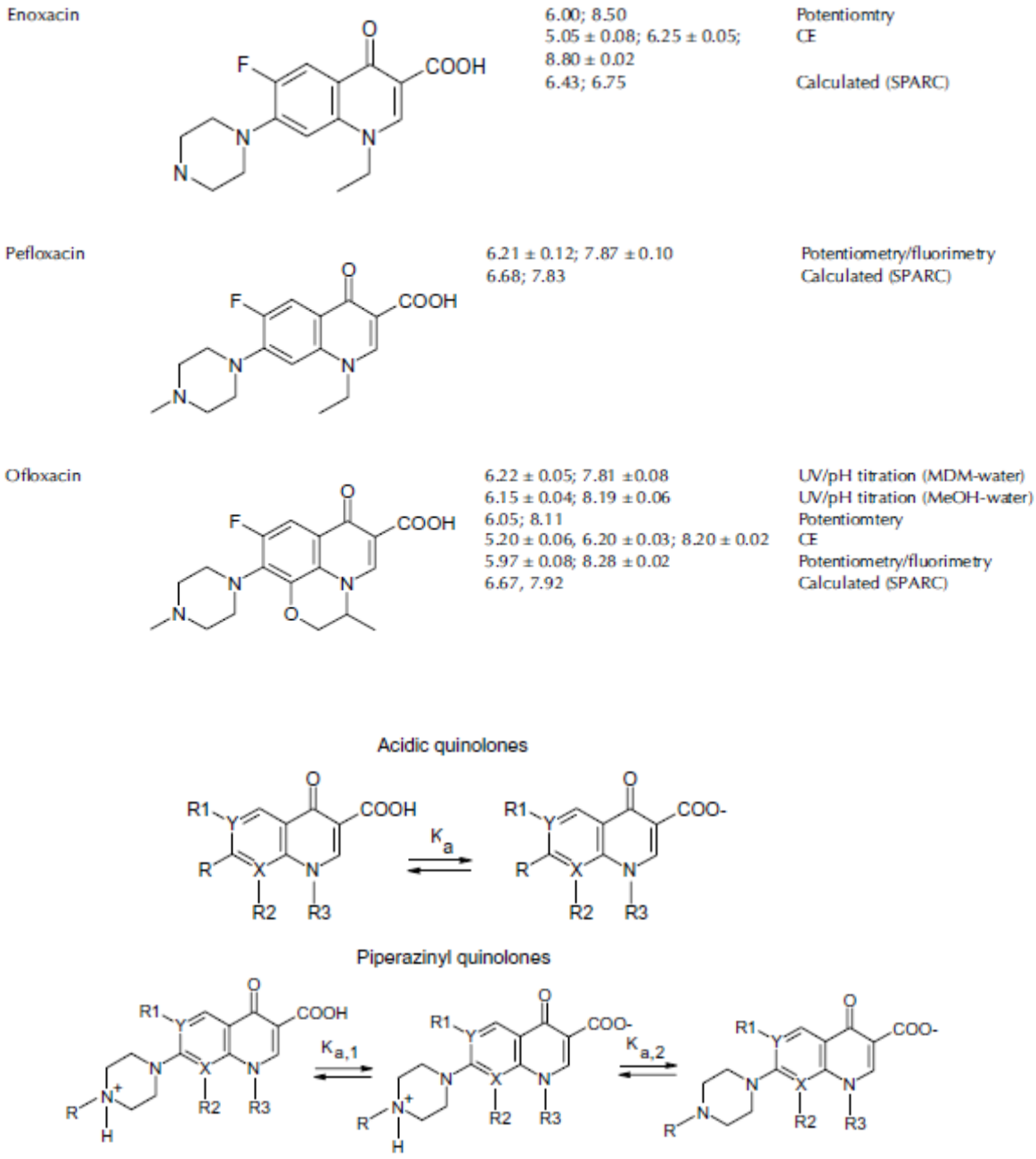


Figure 4. Acid-base equlibria for piperazinyl quinolones and acidic quinolones.

Şekil 2.16. Kinolonların (piperazinylve asidik kinolonlar) asit, baz denklemi

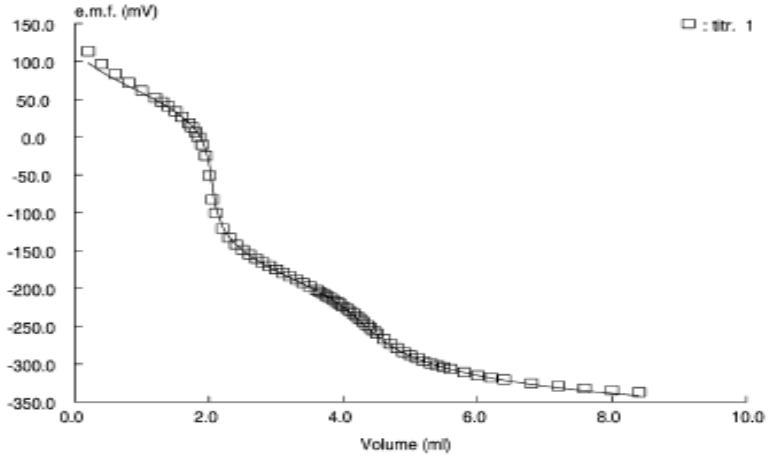
Anargiros I. Drakopoulus ve Pinelopi C. Loannou 1997 yılında yaptıkları "Sulu çözeltide asit-baz dengeleri ve kompleksleşme davranışının olarak incelenmesi " konulu çalışmalarında, ofloksasin (OF), norfloksasin (NOR), siprofloksasin (CIP) ve pefloksasin (PEF) gibi florokinolon antibiyotiklerinin asit-baz özellikleri ve kompleksleşme davranışının spektroflorimetrik bir çalışması yapılmıştır. Antibiyotiklerin İyonlaşma sabitleri potansiyometrik/ florimetrik teknik birleştirilerek

belirlenmiştir. Çalışılan bütün forokinolonlar zayıf asidik çözeltilerde (pH:4,2 ; λex = 280nm ; λem = 430 nm (Ofloksasin için 480 nm) skandiyum (Sc^{+3}) ile floresent kompleksler oluşturmuştur. Sulu çözeltilerde Ofloksasin, Norfloksasin, Siprofloksasin ve Pefloksasinin tayini için skandiyum (Sc^{+3}) komplekslerinin oluşumuna dayanan basit, hızlı ve duyarlı bir spektroflorimetrik yöntem geliştirilmiştir. Dört florokinolonun hepsi için kalibrasyon grafikleri, %3,2'lik bir ortalama bağıl hataya sahip sonuçlarla 1.0 µM'ın üzerinde doğrusaldır. 3σ dedeksiyon limitleri OF, NOR, CIP ve PEF için sırasıyla 1.1, 0.6, 0.5 ve1.0 nM olarak belirlenmiştir. Yöntem, % 93.4±1.1'lik bir ortalama geri kazanım (n=3) ile asetonitrille (serum-asetonitril, 1:2 v/v) deproteinizasyondan sonra sentetik serum örneklerinde (5.0-50.0 µM) NOR'in tayinine başarıyla uygulanmıştır. Çözeltilerin iyonik şiddetleri sodyum asetat ile 0,05 M'da tutulmuştur. pH 25ºC'deki sabit sıcaklıkta su ile seyreltilmiş HCl ve ya NaOH ilave edilmesiyle ayarlanmıştır. pH aralığı olarak 1,5-10,50 arasında çalışılmıstır. Her bir florokinolon için spektroflorometrik verilerden iyonlaşma sabitleri tayin edilmiştir. Çalışmada çalışılan kinolonların bulunan pK_a değerleri çizelgede verilmiştir (Çizelge 2.2).

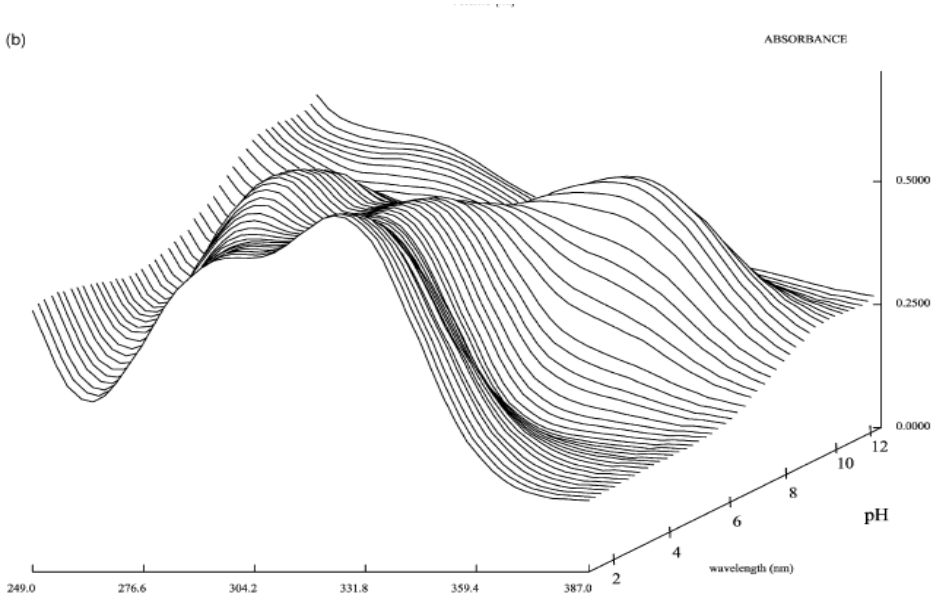
Çizelge 2.2. Florokinolonların çalısmada tayin edilen protonasyon sabitleri

Bileşiğin Adı	**pK_{a1}**	**pK_{a2}**
Ofloksasin	5,97±0,08	8,28±0,02
Siprofloksasin	5,90±0,15	8,89±0,11
Norfloksasin	6,36±0,12	8,62±0,08
Pefloksasin	6,21±0,12	7,87±0,10

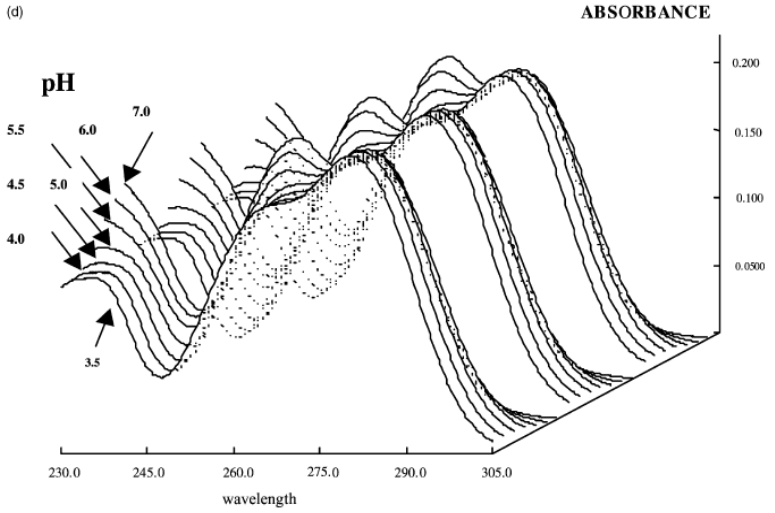
J.L. Beltrán ve ark.' nın (2003) yaptığı bir çalışmada polifenolik asitlerin pKa değerleri su ve asetonitril-su ortamlarında spektrofotometrik, potansiyometrik ve kromatografik yöntemlerle hesaplanmıştır. Ayrıca yeni geliştirilen metotla daha önce elde edilen kromotografik piklerin maksimumları absorbans piklerine uyarlanmıştır. Bu metot LC-UV (diode array dedektör–DAD)'den elde edilen örneklere uygulanabileceği gibi, LC ve spektrofotometrik metotlarda saf olmayan örneklerde kullanılması avantajlıdır. Sonuç olarak, farklı metotların avantajları, dokuz polifenolik asidin su ve asetonitril-su ortamında pKa'larının tayininde kullanılması ve uygulanabilirliği belirtilmiştir. pKa hesaplamaları PKPOT programı ile yapılmış olup literatürdeki sonuçlarla karşılaştırılmıştır.



Şekil. 2.17. Kafeik asidin % 30 MeCN ortamındaki pH-absorbans değerlerinin PKPOT grafiği.



Şekil. 2.18. Kafeik asidin % 30 MeCN ortamındaki pH-absorbans değerlerinin STAR grafiği



Şekil. 2.19. Kafeik asidin LC piklerinin maksimumunun alındığı UV spektrumu

N. Şanlı ve ark.' nın (2002) yaptığı bir çalışmada ise son zamanlarda biyolojik özelliklerinden dolayı ilgi gören polifenolik asitlerin çileklerde ayrımının optimizasyonu yapılmış, kromatografik alınkonma ve pKa değerleri hesaplanmıştır. Bu çalışmada hareketleri faz olarak kullanılan asetonitril-su karışımının pH'ı bir seri polifenolik bileşiği ayırmak için optimize edilmiştir. Lineer solvasyon enerjisi, tek çözücü polarite parametresine dayalı formüle edilmiş ve E_T^N bağıntısı eluentteki asetonitril yüzdesinin fonksiyonu olarak kromatografik davranışlarını tahmin etmek için kullanılmıştır. Ayrıca alıkonma ve su-organik fazın arasında kurulan ilişki mobil fazın pH'ını optimize etmek için kullanışmıştır. Optimize mobil fazın (% 12 asetonitril) pH'ı formik asit tamponuyla pH 4,25' e ayarlanmıştır. Ayrıca, asetonitril-su karışımındaki polifenolik asitlerin pKa değerleri kromatografik verilerle saptanmış ve optimize edilen koşulları valide etmek için bir seri polifenolik bileşik çileklerde çalışılmıştır.

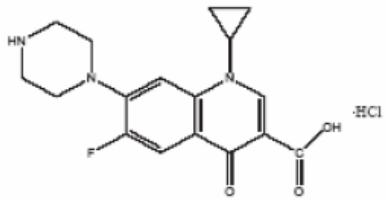
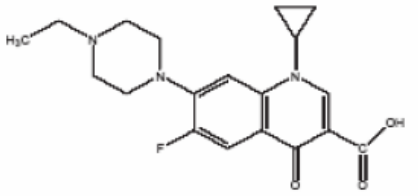
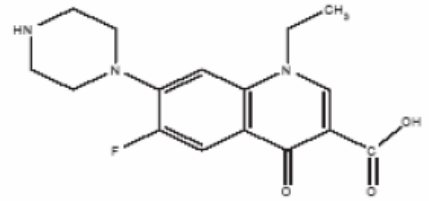
N. Şanlı ve ark.'nın (2005) yaptığı "Polifenolik Asitlerin Sıvı Kromatografisinde Alıkonmaları Modellenerek Çözücü Bileşimi ve Hareketli Fazın pH'nın Tahmini" başlıklı çalışmada, bir seri polifenolik asidin alıkonma davranışı, bu bileşikler arasındaki kromatografik rezolüsyonu (ayırımsal çözünürlük)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

Barbosa ve ark.' nın (2001) yaptığı bir çalışmada ise, zwitteriyonik yapıdaki bazı kinolonların asetonitril-su karışımlarında pKa değerlerinin tayini için farklı

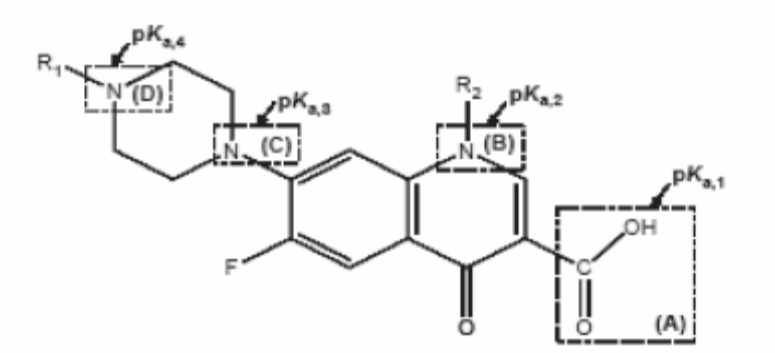
teknikler kullanılmıştır. Bu maddelerin pKa degerlerini tayin etmede çoğunlukla kapiler elektroforez, sıvı kromatografi, potansiyometri ve UV görünür spektrofotometre tekniklerinin tercih edildiği belirtilmiştir. Uygulanan her bir yöntem için pKa değerleri tayin edilmiş ve bu yöntemler arasında karşılaştırma yapılmıştır. Çalışmada, 0,1 ve 0,02 mol L¯1 KOH çözeltileri asetonitril-su karışımında hazırlanmış ve potasyum hidrojen ftalat ile titre edilerek standardize edilmiştir. Bu çalışmada pK_a değerleri tayin edilen kinolonlar ofloksasin, pipemidik asit, enoksasin, norfloksasin, fleroksasin, siprofloksasin, enrofloksasin, danofloksasin, difloksasin, sarofloksasin ve marbofloksasindir. %50(v/v) asetonitril-su karışımında potansiyometrik yöntemle ofloksasinin pK_{a2} değeri 8,76, pipemidik asitin pK_{a2} değeri 8,64, norfloksasinin pK_{a1} ve pK_{a2} değerleri sırasıyla 7,98 ve 9,05, enoksasinin pK_{a2} değeri 8,95, fleroksasinin pK_{a1} ve pK_{a2} değerleri 7,11 ve 8,39, siprofloksasin için pK_{a2} 8,95 olarak bulunmustur.

Qiang ve Adams (2004), sülfonamitlerin, makrolitlerin, tetrasiklinlerin ve fluorokinolonların iyonlaşma sabitlerini potansiyometrik titrasyon ile tayin etmişlerdir. Çalışmalarında fosforik asidi model bileşik olarak almışlar ve 2. türev eğrisi metodunun antibiyotiklerin pKa tayinlerinde uygun olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışma için kinolon grubu antibiyotiklerden norfloksasin, siproflokasin ve enrofloksasin seçilmiştir. Siprofloksasin, enrofloksasinin metabolitidir. Bu çalışmada genellikle antibiyotiklerin çözünebildiği 1 mM'lık derişime kadar inilmiştir. İyonik şiddet için 0,01-0,05 M sodyum perklorat tercih edilmiş ve titrant çözeltisi olarak 0,01 M NaOH ve 0,1 M HCl kullanılmış ve bu çözeltiler sırası ile potasyum asit ftalat ve sodyum karbonat ile standardize edilmiştir. Bu çalışmada elektrot pH'sı 4,00±0,01 olan 0,05 M potasyumbiftalat ile ve pH'sı 7,00±0,01 olan 0,05 M potasyum hidrojen fosfat-sodyum hidroksit ve pH'sı 10,00±0,02 olan 0,05 M potasyum karbonat, potasyum borat ve potasyum hidroksit standartlarını kullanarak kalibre edilmiştir. Yapılan deneysel çalışmada öncelikle fosforik asidin titrasyonu yapılmış ve sonuçlar gran, ikinci türev eğrisi ve non-lineer regresyon programlarıyla değerlendirilmiştir. Çalışmacılar ikinci türev ve non-lineer regresyonun literatürde fosforik asit için verilen 2,2 -7,2 -12,3 pK_a değerlerine daha yakın sonuçlar olduğunu belirtmişlerdir. Çalıştıkları fluorokinolonların pK_a değerlerinin tayininde pK_{a1} ve pK_{a2} de ± 0,30'a varan standart sapmalar bulmuşlardır. Bunu sıvı-sıvı temas potansiyelinden kaynaklandığını belirtmişlerdir. Bu çalışmada fluorokinolonlardan siprofloksasin, enrofloksasin ve norfloksasin için bulunan pK_a değerleri tabloda verilmiştir. Çalışmada kinolonlar için elde edilen pK_a değerleri çizelge 2.3'de verilmektedir.

Çizelge 2.3. Yapılan çalışmada bulunan pKa değerleri (Qiang ve Adams, 2004'den)

Bileşik	**Bileşiğin Yapısı**	pK_a değerleri
Siprofloksasin.HCl		3,01±0,30 6,14±0,13 8,70±0,09 10,58±0,30
Enrofloksasin		3,85±0,30 6,19±0,18 7,59±0,25 9,86±0,30
Norfloksasin		3,11±0,30 6,10±0,19 8,60±0,10 10,59±0,30

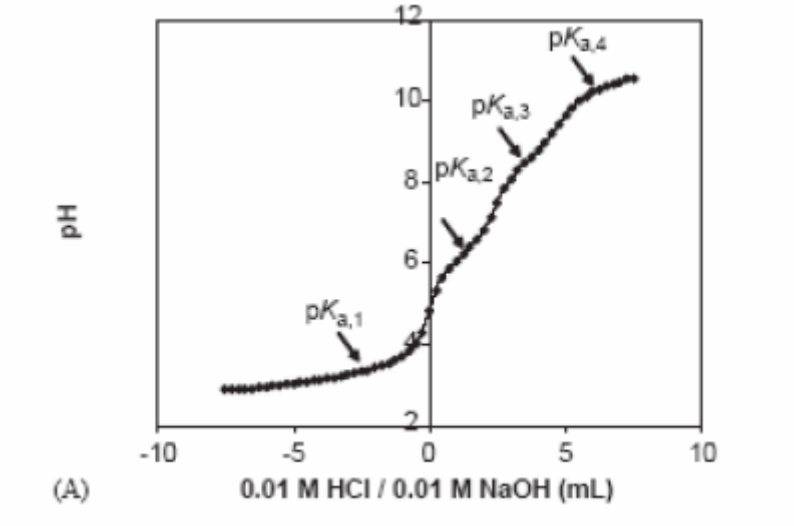
Çalışmacılar, florokinolonların bir karboksilik grubu ve üç bazik azot bölgesine dayanarak muhtemelen dört pK_a değerinin bulunacağını ifade etmişlerdir. pK_a değerlerinin hangi gruba ait olduğu şekil 2.20'de yapı üzerinde gösterilmektedir.



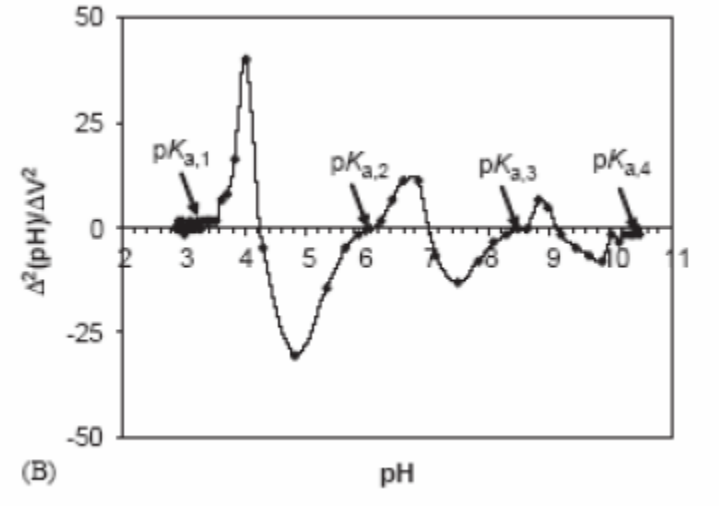
Şekil 2.20. Yapılan çalışmada florokinolonların pKa değerlerine uygun grupların gösterimi

Bu çalışmada siprofloksasin için bulunan pK_a değerlerinin yapı ile ilişkisi aşağıda verildiği gibi belirtilmiştir. Çalışmada 1-naftoik asidin pK_a değerinin 3,69 olduğu ve benzen halkasına bağlı karboksilik asit grubunun verilen pK_a değeri ile

bununla uyumlu olduğu belirtilmiştir. Çalışmacılar, siprofloksasin, enrofloksasin ve norfloksasin için pK_{a4} değerlerini 10,58, 9,86 ve 10,56 olarak bulmuşlardır. Siprofloksasin ve norfloksasinin şekil 2.20'de görülen D grubu (dimetilamin yapısı) aynı olduğundan pK_{a4} değerlerinin birbirine çok yakın değerler olduğunu ifade etmişlerdir. Bundan yararlanarak pK_{a4} değerinin dimetilamin ve pK_{a3} değerinin trimetilamin yapıları ile uyumlu olduğunu ve bu iki aminin literatür değerlerinin 10,73 ve 9,80 olduğunu belirtmişlerdir. Bu değerlerin siprofloksasin, enrofloksasin ve norfloksasin için bulunan pK_a değerleri ile uyumlu olduğunu ifade etmişlerdir. Bu çalışmada siprofloksasin için elde edilen titrasyon grafiği ve bunun ikinci türev eğrisi, şekil 2.21 ve şekil 2.22'de verilmiştir.

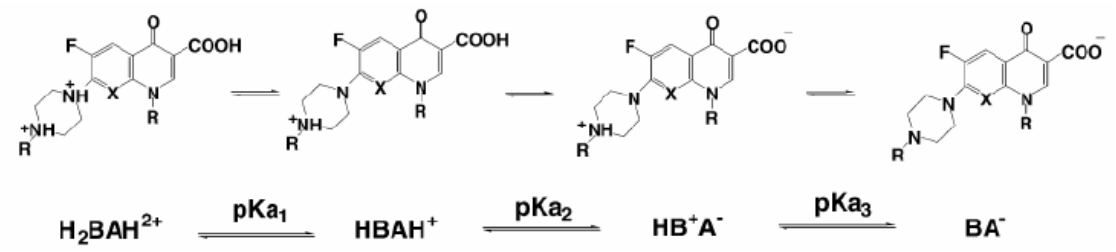


Sekil 2.21. Siprofloksasin için elde edilen titrasyon eğrisi (Qiang ve Adams,2004'den)



Sekil 2.22. Siprofloksasin için elde edilen ikinci türev egrisi

Lin ve ark. tarafından (2004), ofloksasin, enoksasin, norfloksasin, lomefloksasin, siprofloksasin ve pipemidik asit gibi piperazin gruplu 6 çesit kinolonun ve bunlarla birlikte flumekin ve nalidiksik asit gibi piperazin grubu olmayan 2 tür kinolonun elektroforetik davranışları ve pK_a değerleri tayin edilmiştir. Piperazin gruplu kinolonların üç protonasyon/deprotonasyon dengesi içerdigi görülmüştür (Şekil 2.23). Çalışmada, kinolonların 3 pK_a değeri tayin edilmiştir (Çizelge 2.3).



Sekil 2.23. Piperazin gruplu kinolonların protonasyon/deprotonasyon dengesi

Çizelge 2.3. Kinolonların çalışmada elde edilen pKa değerleri (Lin ve ark., 2004'den)

Bileşikler	pK_{a3}	pK_{a2}	pK_{a1}
Ofloksasin	8,20(±0,02)	6,20(±0,03)	5,20(±0,06)
Enoksasin	8,80(±0,02)	6,25(±0,05)	5,05(±0,08)
Norfloksasin	8,45(±0,03)	6,25(±0,04)	5,00(±0,10)
Lomefloksasin	9,00(±0,03)	6,25(±0,05)	5,00(±0,10)
Siprofloksasin	8,95(±0,04)	6,35(±0,07)	5,05(±0,15)
Pipemidik Asit	8,90(±0,04)	6,15(±0,06)	5,25(±0,12)
Flumekin	-	-	6,35(±0,01)
Nalidiksik Asit	-	-	6,00(±0,01)

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Florokinolonların organik çözücü-su ortamlarında florimetrik parametrelerinin belirlenmesi amaçlanmıştır. Florimetrik parametrelerin belirlenmesi için, öncelikle saf asetonitril, metanol, DMF ve su içerisinde, daha sonra %10 organik çözücü -%90 su karışımlarında ilaç etken maddelerinin uygun derişimlerdeki çözeltileri hazırlanarak, uyarma dalga boyları 10'ar nm aralıklarla değiştirilip emisyon spektrumları alınacak ve her bir ilaç etken maddesinin, her bir organik çözücü-su ortamında maksimum floresans şiddetine sahip oldukları uyarma ve emisyon dalga boyları belirlenecektir. Optimum koşullarda bu maddelerin kuantum verimlerinin ve organik çözücü-su ortamlarında Kamlet-Taft eşitliğinden yararlanarak solvatokromik parametrelerin hesaplanması da bu projenin kapsamı içindedir.

Bu çalısmada siprofloksasin, levofloksasin, enoksasin, pefloksasin ve ofloksasinin iyonlasma sabitleri potansiyometrik yöntemle tayin edilmistir. Ortam olarak su-asetonitril ikili karısımları kullanılmıstır. Bilesiklerin yaklasık 3 mM lık çözeltileri asetonitril-su ikili karısımlarında hazırlanmıs, iyonik siddet KCl ile ayarlanmıstır. Su-organik çözücü karısımlarında asitlerin titrasyonunda IUPAC'ın önerdigi titrant KOH'dir. Kinolonların tirasyonlarından önce titrant olarak kullanılacak KOH çözeltisinin derisimi, iyonik siddeti 0,1 M olan 10 mL 0,003 M HCl çözeltisinin KOH ile potansiyometrik yöntemle titrasyonuyla belirlenmistir. Potansiyometrik pKa tayinleri azot atmosferinde sabit sıcaklıkta çift cidarlı hücrelerde gerçeklestirilmistir. Her kosulda çalısmaya baslamadan önce elektrot, çalısılan ortamda bir süre bekletilerek sartlanmıs ve bu ortamda kalibre edildikten sonra bilesik titrasyonuna geçilmistir.

Bu ilaç etken maddelerinin florimetrik parametreleri (uyarma ve emisyon dalga boyu, floresans şiddeti) üzerine pH' nın etkisi incelenecektir. Bu amaçla, florokinolonların su % asetonitril-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 belirlenecektir. Bu maddelerin pKa değerleri aynı zamanda potansiyometrik yöntemle de tayin edilip, çalısılan tüm titrasyon kosullarını, iyonik siddet de dahil olmak üzere dikkate alan ve sistematik yaklastırmayı temel alan non-lineer regresyon STAR programı pKa hesaplanmasında kullanılmıstır. Sonuçta iki yöntem ile elde edilen sonuçlar birbirleriyle ve teorik olarak bileşiklerin pKa değerlerini hesaplayan SPARC programıyla elde edilen pKa değerleriyle karşılaştırılacaktır.

3.1. Kullanılan Cihazlar

3.1.1. Spektroflorimetre

Bu çalışmada floresans ölçümleri PERKIN ELMER LS/55 marka spektroflorimetre ile yapıldı. Uyarma ve emisyon monokromotorlarının slit aralığı ise 10 ve 5 nm olarak ayarlandı ve tüm ölçümler bu aralıkta yapıldı.

3.1.2. Spektrofotometre

pH absorpsiyon ölçümleri AGİLENT 8453 marka spektrofotometre kullanıldı. 200-800 dalga boyundaki absorbansları ölçüldü.

3.1.3. pH / İyon Metre

Deney çözeltilerinin pH'larını ayarlamak amacıyla METTLER TOLEDO marka pH-metre ve aynı marka kombine cam-pH elektrodu kullanıldı. pH-metrenin kalibrasyonu, Merck firmasından temin edilen pH 4 , pH 7 ve pH 10 tampon çözeltileri kullanılarak yapıldı. Elektrot 3 M KCl çözeltisinde bekletilerek şartlandırıldı. Kullanmadan öncede çalışacak % çözücü ortamında şartlanma yapıldı.

3.1.4. Kullanılan diğer cihazlar

Hücre sürekli HEİDOLP MR 3001 K marka hot plattte karıştırıldı. Çözeltileri hazırlamak için kullanılan Pure Lab Option-Q ELGA DV25 marka ultra saf su cihazından elde edildi. Maddeyi tartmak için ACCULAB ATILON marka hassas terazi kullanıldı. Çalışmada, pH ölçümlerinde sabit sıcaklık (25°C) olması için WiseCircu marka sirkülatör ve çözeltiyi karıştırmak için ULTRASONIC LC/30H marka su banyosu kullanıldı.

3.2. Kimyasal Maddeler

3.2.1. Florokinolonlar

Florokinolonlardan siprofloksasin ilaç etken madde standardı Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Sibel A. Özkan'dan temin edildi.

3.2.2. Çözücüler

Kullanılan kimyasal maddeler	Temin edilen yerler
Potasyum Klorür	Merck, analitik saflıkta
Potasyum Hidroksit	Merck ayarlı çözelti (Titrisol)
Hidroklorik Asit	Merck ayarlı çözelti (Titrisol)
Asetonitril	Merck ,
Metanol	Merck ,
DMF	Merck ,
DMSO	Merck ,
Ultra saf su	Pure Lab Option-Q ELGA DV25 marka ultra saf su cihazından

3.2.3. Çözeltiler

Kullanılan florokinolonların, asetonitril ve ultra saf suda en yüksek floresans gösterecek derişimde stok çözeltileri hazırlandı. 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.

3.3. Yöntem:

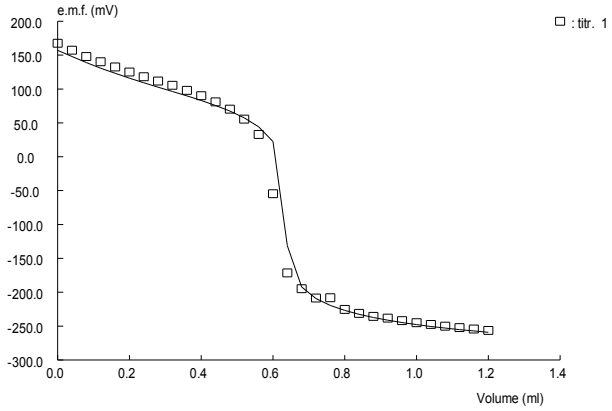
3.3.1. Bazın (KOH) ayarlanması:

Bazın (KOH) ayarlanmasında primer standart madde olarak kullanılan potasyum asit ftalat (KHP), 120° C'de 2 saat etüvde kurutuldu. 20 mL'lik reaksiyon hücresinde 3.10-3 M'lık KHP çözeltisini hazırlamak için 0,01225 gr KHP tartıldı. İlk önce az miktarda saf su (bilinen hacimde) ilave edilerek ultrasonic banyoda karıştırılarak çözülmesi sağlandı ve daha sonra 20 mL'lik hücreye aktarıldı. Reaksiyon hücresine, 2 mL KCl (ortamın iyonik şiddetini dengede tutmak için) %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 hücreye ilave edildi. Reaksiyon kabındaki çözeltinin hacmi saf suyla 20 mL'ye tamamlandı.

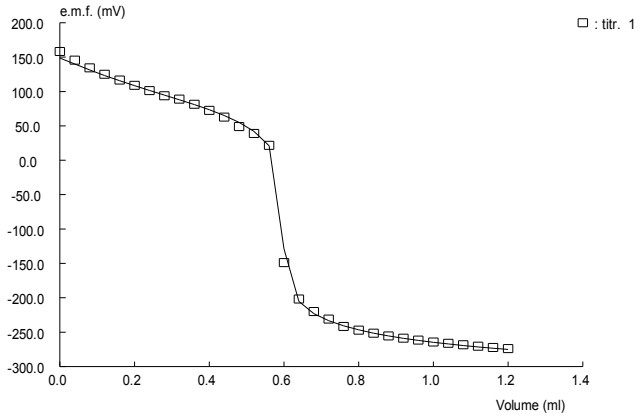
3.3.2. Titrant çözeltisinin hazırlanması:

0,1 M'lık titrant çözeltisi 50 mL'lik santrifüj tüpünde 0,1 M KCl içerecek şekilde, her bir % çözücü ortamında, 1M'lık Titrisol KOH çözeltisinden hazırlanmıştır.Titrasyonlar, her seferinde hücreye 40 mikrolitre titrant ilave edilip

potansiyeller E(mv) kaydedilerek yapılmıştır (Marquès,1999). Bu işleme titrant hacmi 1,2 mL oluncaya kadar devam edilmiştir (dönüm noktası 0,6 mL'dir) .



Şekil 3.1. 0,1 M KOH'in %10 asetonitril-su ortamında potasyum asit ftalat ile ayarlanmasına ait PKPOT programında çizilen titrasyon grafiği

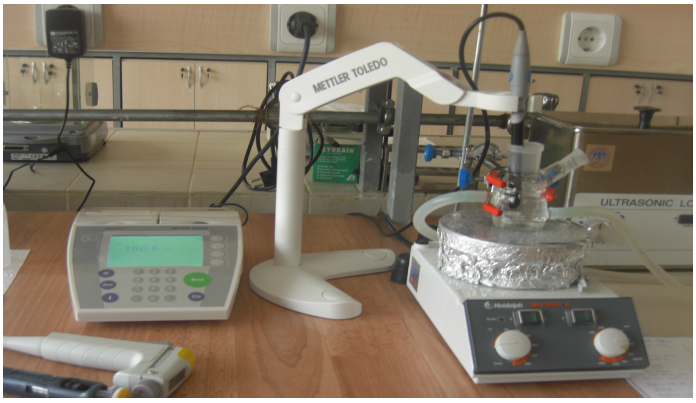


Şekil 3.2. 0,1 M KOH'in %30 asetonitril-su ortamında potasyum asit ftalat ile ayarlanmasına ait PKPOT programında çizilen titrasyon grafiği

3.3.3. Deneysel İşlem

Siprofloksasinin 10 mL'lik balon jojede asetonitril ortamında 1.10^{-3} M ve 1.10^{-4} M derişimlerinde hazırlanan stok çözeltilerden 2 mL alınarak reaksiyon hücresine aktarıldı. Hücereye 2 mL 1M KCl çözeltisi, %10 asetonitril ortamı için ACN ilave edilmez, % 20 asetonitril ortamı için 2 ml ACN, % 30 asetonitril ortamı için 4mL ACN, % 40 asetonitril ortamı için 6ml ACN ilave edildi. Bu çözeltilerin floresans özelliklerini incelemek amacıyla sırasıyla her bir % asetonitril-su ortamı için spektroflorimetride 200-800 nm arasında 10 nm aralıklarla çoklu spektrumları alındı.

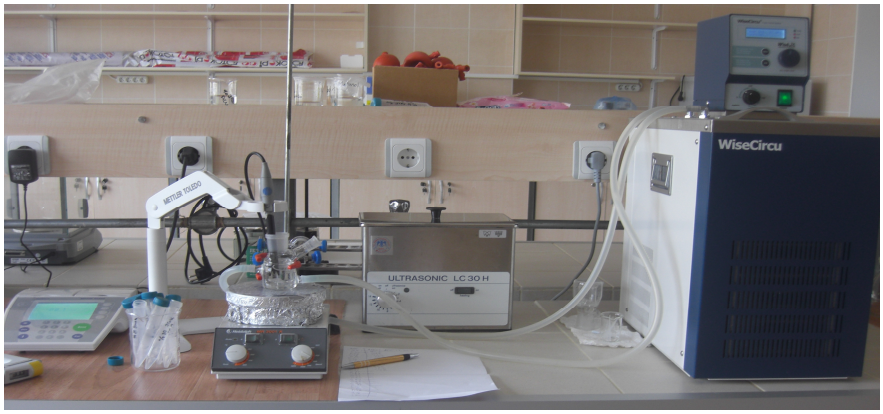
Daha sonra kullanılan % asetonitril-su ortamlarının da aynı aralıkta çoklu spektrumları alınıp çözücü ortamının en düşük maddenin en yüksek floresans şiddeti verdiği en uygun uyarma (λekz) ve emisyon dalga boyları (λem) belirlendi. Hazırlanan çözeltilerin önce spektroflorimetride, belirlenen dalga boylarında floresans şiddetleri ölçüldü, daha sonra aynı gün içinde UV spektrofotometrede absorbans değerleri kaydedildi.



Şekil 3.3. pH/iyon metre



Şekil 3.4. Deney düzeneği



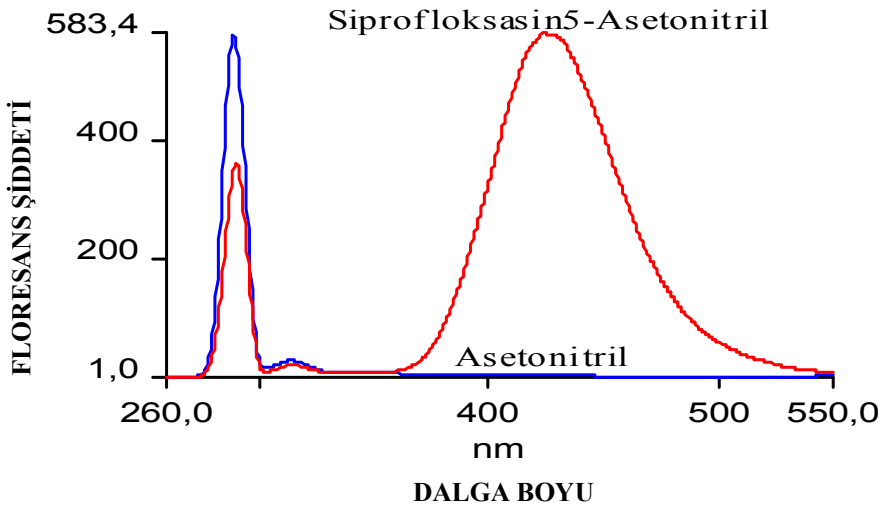
Şekil 3.5. pH metre, ultrasonic banyo ve sirkülatör

4. ARAŞTIRMA SONUÇLARI VE TARTIŞMA

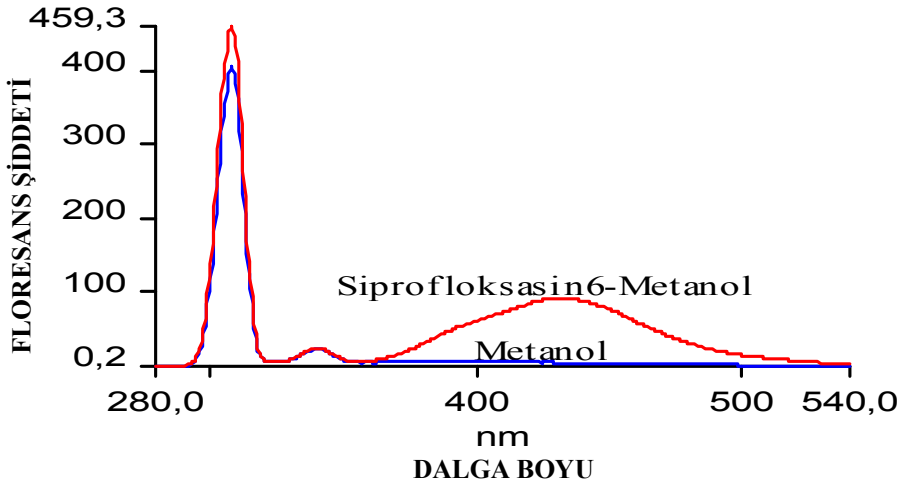
4.1. Floresans Şiddetine Çözücü Etkisi

4.1.1.Florokinolon ilaç etken maddelerin spektroflorimetrideki emisyon spektrumları

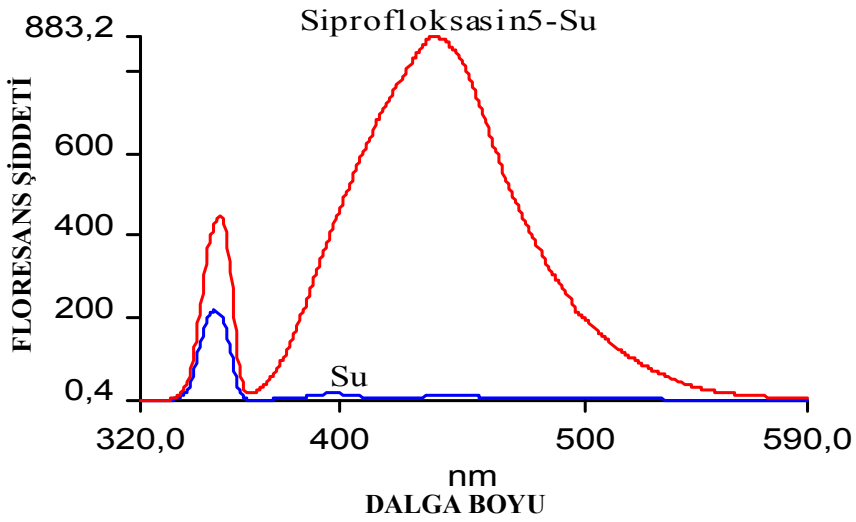
Florokinolonlar, Asetonitril, Metanol, DMF, DMSO ve SU ortamlarında 200-800 nm aralığında 10'ar nm aralıklarla değiştirilen uyarma dalga boylarında çoklu emisyon spektrum taramaları yapılmış, bu çoklu spektrum taramalarından yararlanılarak maksimum floresans şiddeti elde edilen uyarma ve emisyon dalga boyları belirlenmiştir. Aynı işlemler yine %10-%90 Asetonitril, Metanol, DMF ve DMSO içeren sulu çözeltilere uygulanarak optimum dalga boyları belirlenmiştir.



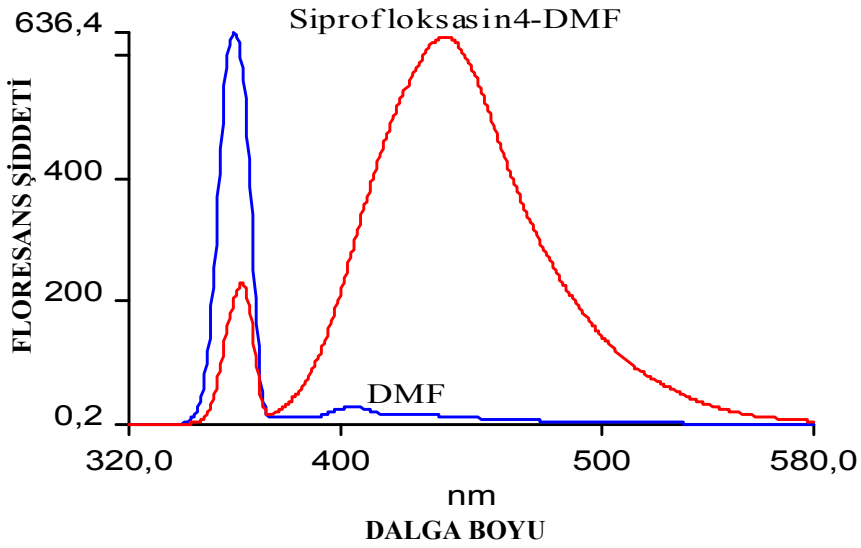
Şekil-4.1. Siprofloksasinin Asetonitrildeki emisyon spektrumu (λeks: 290.14 nm)



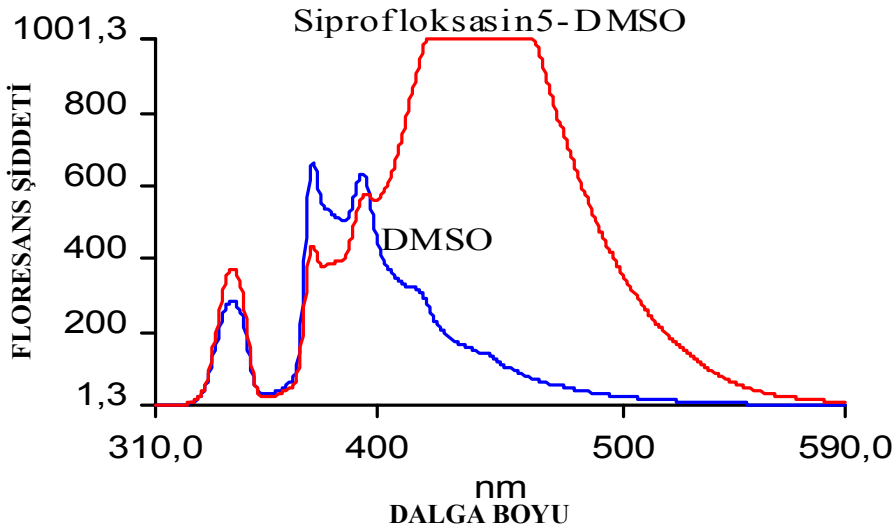
Şekil-4.2. Siprofloksasinin Metanoldaki emisyon spektrumu (λeks: 307,95 nm)



Şekil-4.3. Siprofloksasinin Sudaki emisyon spektrumu (λeks: 320.42 nm)



Şekil-4.4. Siprofloksasinin Dimetil formamitdeki emisyon spektrumu (λeks: 363,27 nm)

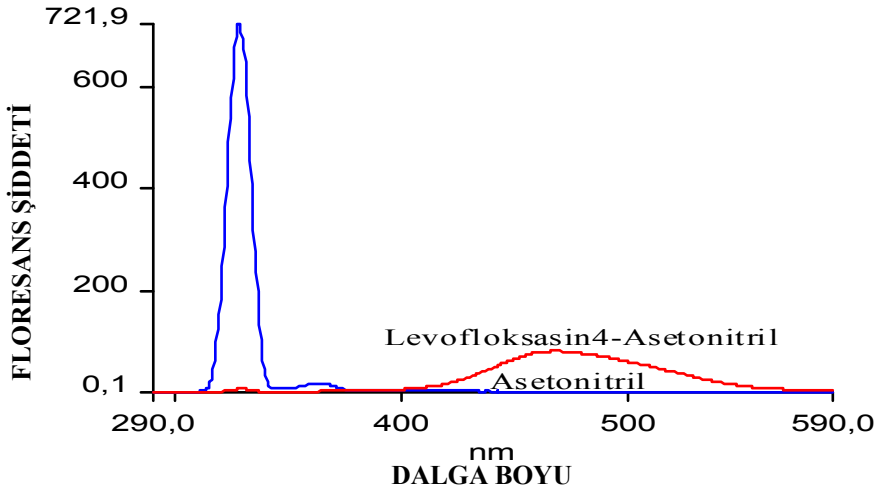


Şekil-4.5. Siprofloksasinin Dimetil sülfoksittekideki emisyon spektrumu (λeks: 350,91 nm)

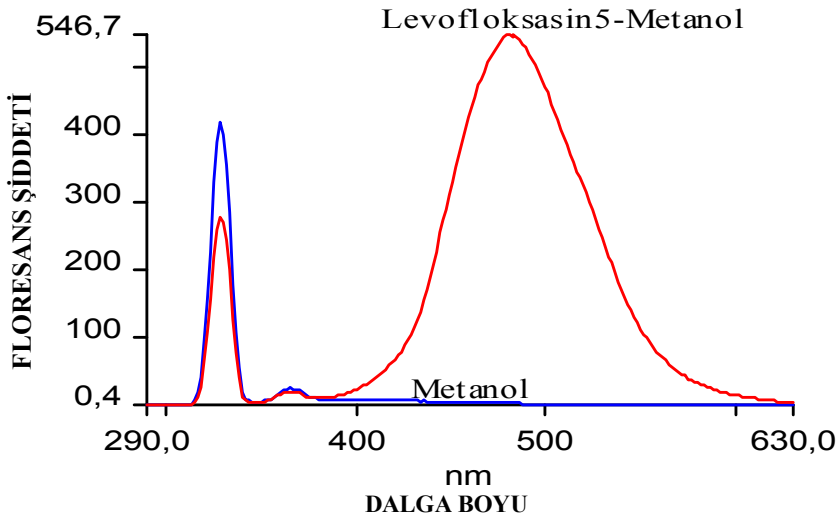
Çizelge 4.1. Siprofloksasinin çözücülerdeki floresans şiddetleri

CİPROFLOXACİN	λeks: (nm)	λems: (nm)	Floresans şiddeti:	Çözücünün Floresans şiddeti:
Siprofloksasin -10^{-5} M-ACN	290.14	425,24	582,43	3,60
Siprofloksasin -10^{-6} M-METANOL	307,95	431,74	91,96	4,90
Siprofloksasin -10^{-5} M-SU	351,83	439,38	883,05	10,16
Siprofloksasin -10^{-4} M-DMF	363,27	440,00	629,67	13,75
Siprofloksasin -10^{-5} M-DMSO	350,91	443,11	750,61	118,92

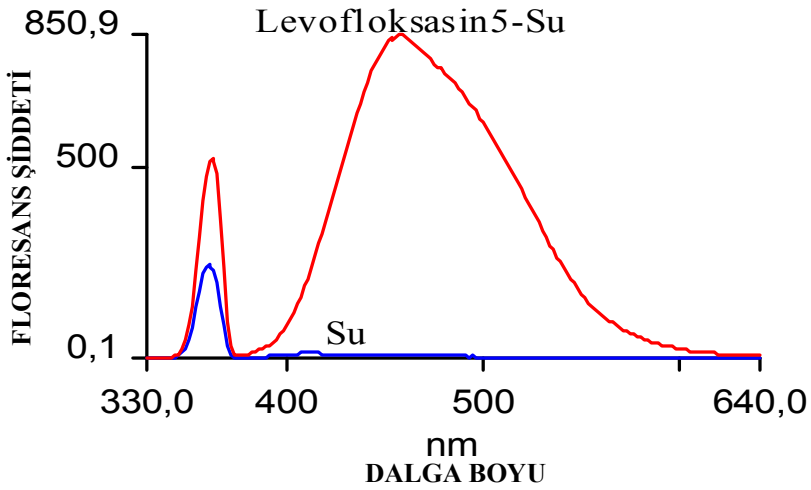
Siprofloksasinin çalışılan çözücülerde alınan emisyon spektrumları incelendiğinde; su, asetonitril, DMSO ve DMF'de yüksek floresans şiddeti verdiği, aynı zamanda maddenin floresans şiddetinin aynı uyarma ve emisyon dalga boylarında çözücününkinden oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Çözücünün polaritesi arttıkça özelilikle de DMSO ve DMF'de maddenin floresans şiddeti yüksek olmasının yanında, uyarma ve emisyon dalgaboylarında da uzun dalga boylarına kayma (kırmızıya kayma) olduğu tesbit edilmiştir. Bu durum çözücünün polar özelliğinin maddenin floresans şiddetine etki ettiğini açıkça göstermektedir.



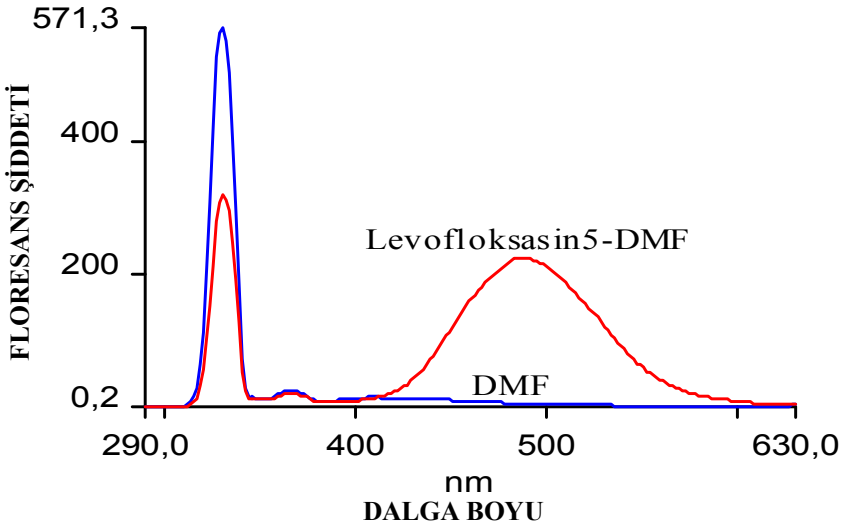
Şekil-4.6. Levofloksasinin Asetonitrildeki emisyon spektrumu (λeks**:** 328,92 nm)



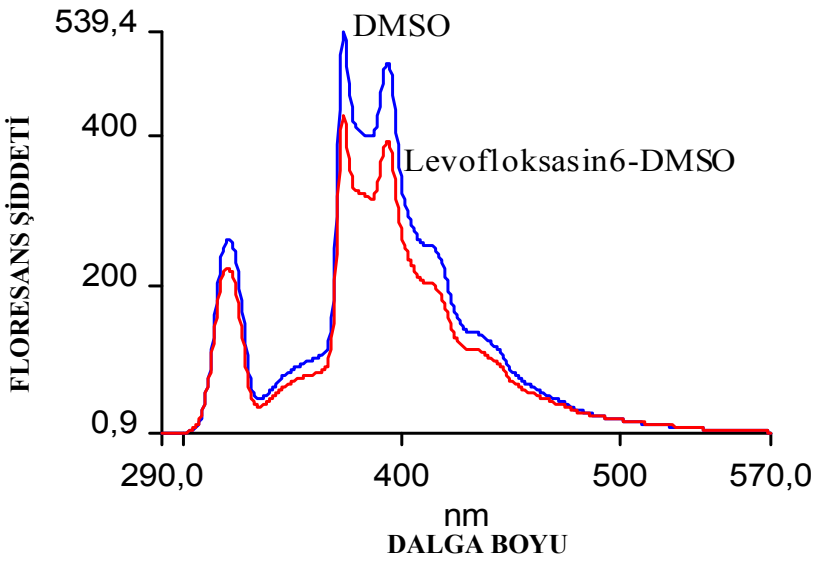
Şekil-4.7. Levofloksasinin Metanoldeki emisyon spektrumu (λeks**:** 329,35 nm)



Şekil-4.8. Levofloksasinin Sudaki emisyon spektrumu (λeks**:** 330,30 nm)



Şekil-4.9. Levofloksasinin Dimetil Formamitteki emisyon spektrumu (λeks**:** 330,72 nm)

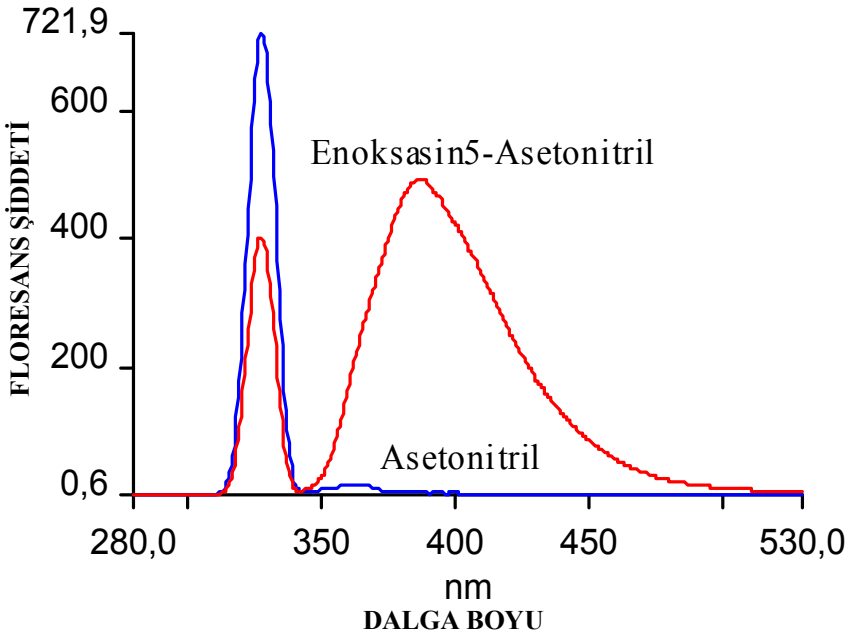


Şekil-4.10. Levofloksasinin Dimetil Sülfoksitteki emisyon spektrumu (λeks**:** 320,08 nm)

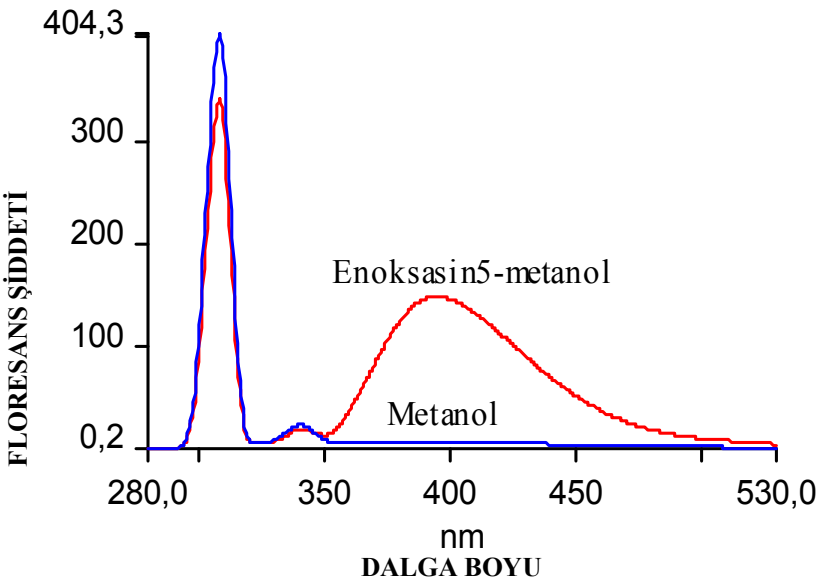
Çizelge 4.2. Levofloksasinin çözücülerdeki floresans şiddetleri

LEVOFLOXACİN	**λeks: (nm)**	**λems: (nm)**	**Floresans şiddeti:**	**Çözücünün Floresans şiddeti:**
Levofloksasin -10^{-4} M-ACN	328,92	466,91	81,40	1.59
Levofloksasin -10^{-5} M-METANOL	329,35	478,10	546,64	2,70
Levofloksasin -10^{-5} M-SU	362,43	458,49	850,89	5,54
Levofloksasin -10^{-5} M-DMF	330,72	487,05	223,76	5,24
Levofloksasin -10^{-6} M-DMSO	320,08	373,46-394,34	428,08-391,61	497,92

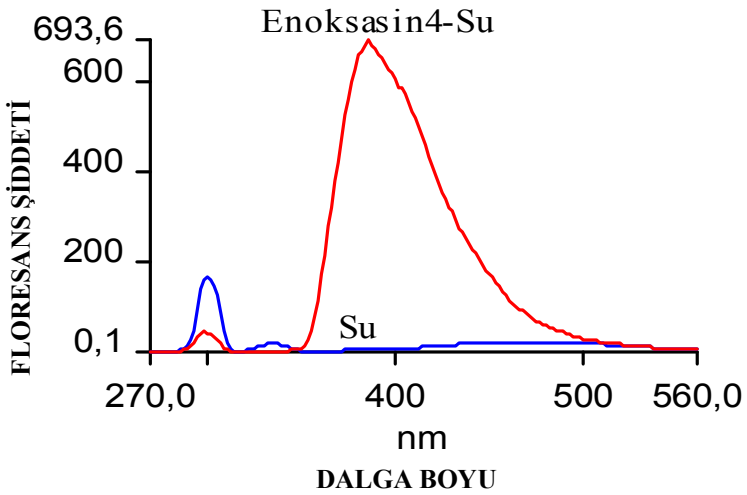
Levofloksasinin çalışılan çözücülerde alınan emisyon spektrumları incelendiğinde; su ve metanolde yüksek floresans şiddeti verdiği, aynı zamanda maddenin floresans şiddetinin aynı uyarma ve emisyon dalga boylarında çözücününkinden oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. DMSO'in maddenin floresans emisyonu verdiği dalga boylarında çok yüksek floresans şiddetine sahip olması ve maddenin DMSO'den daha düşük bir floresans şiddeti vermesi sebebiyle bu maddenin tayininde kullanılması uygun değildir.



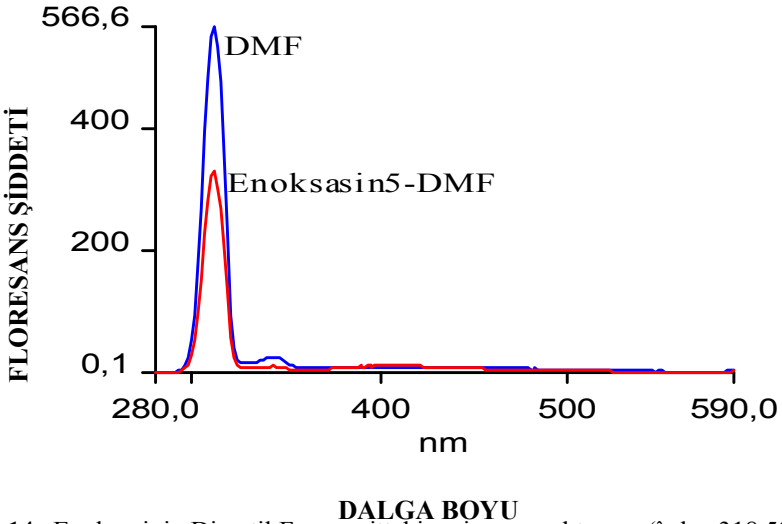
Şekil-4.11. Enoksasinin Asetonitrildeki emisyon spektrumu (λeks: 327,78 nm)



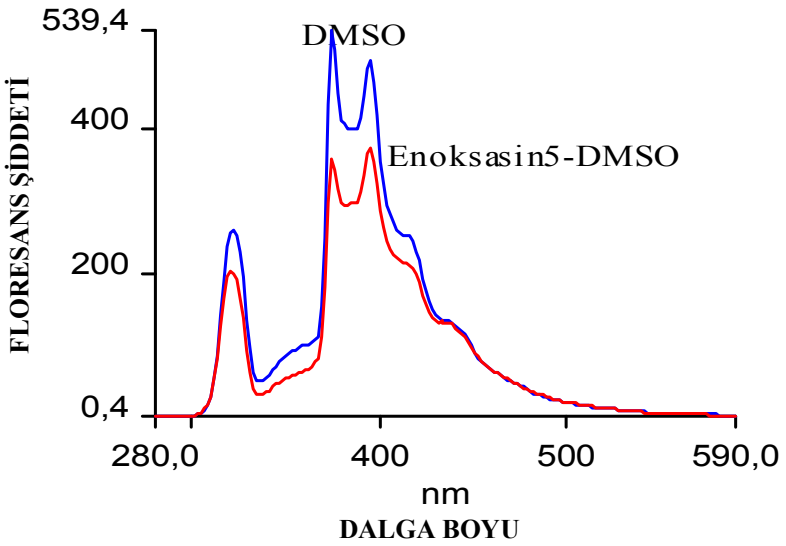
Şekil-4.12. Enoksasinin Metanoldeki emisyon spektrumu (λeks: 308.37 nm)



Şekil-4.13. Enoksasinin Sudaki emisyon spektrumu (λeks: 320,12 nm)



Şekil-4.14. Enoksasinin Dimetil Formamitteki emisyon spektrumu (λeks: 318,53 nm)

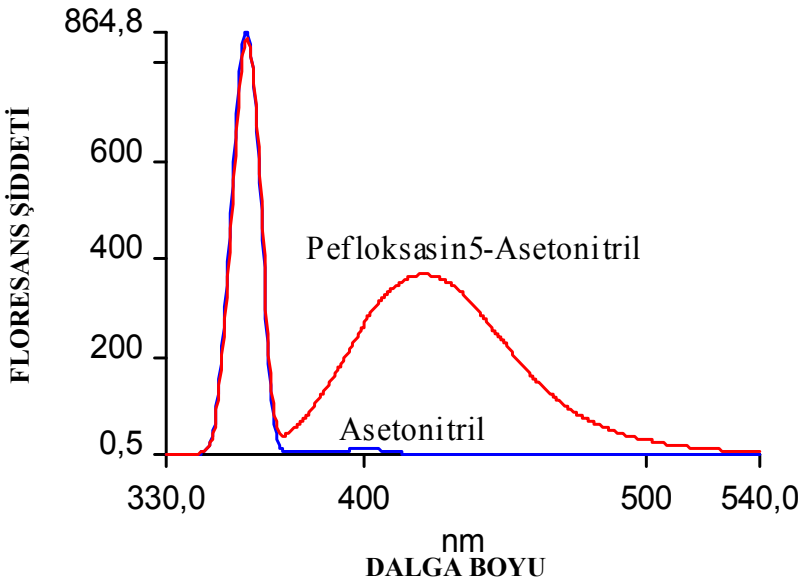


Şekil-4.15. Enoksasinin Dimetil Sülfoksitteki emisyon spektrumu (λeks: 319,9 nm)

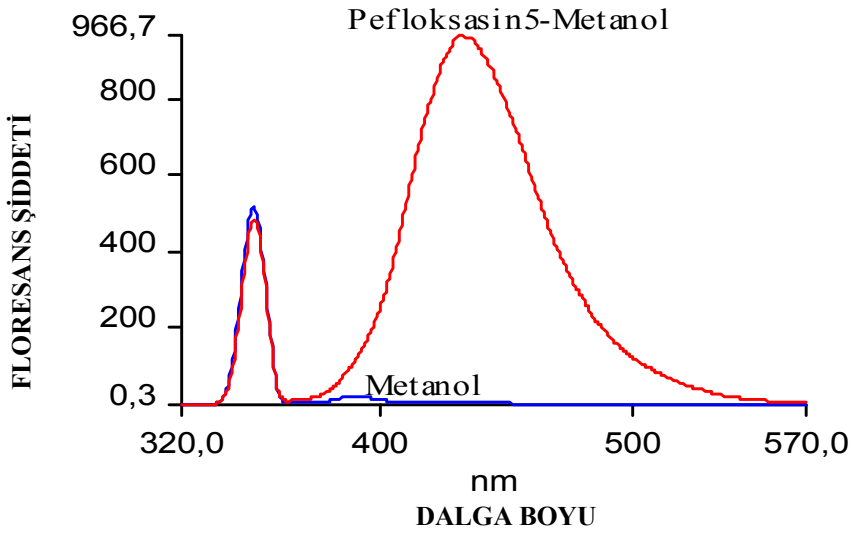
Çizelge 4.3. Enoksasinin çözücülerdeki floresans şiddetleri

ENOXACİN	**λeks: (nm)**	**λems: (nm)**	**Floresans şiddeti:**	**Çözücünün floresans şiddeti:**
Enoksasin-10^{-5} M-ACN	327,78	386.67	492.91	3,27
Enoksasin -10^{-5} M-METANOL	308.37	397.04	148.01	6.59
Enoksasin -10^{-4} M-SU	298,00	384,36	693,19	5,02
Enoksasin -10^{-5} M-DMF	318,53	411,86	13,62	11,81
Enoksasin -10^{-6} M-DMSO	319,9	373,8-393,3	360,1-374,8	538,4-375,6

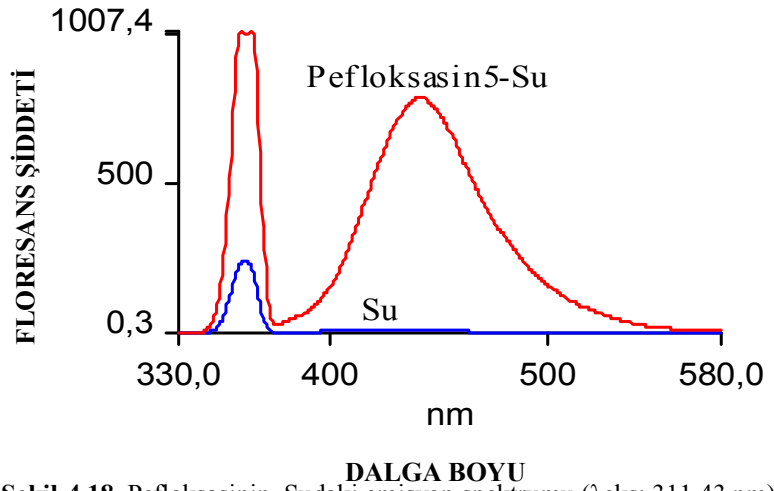
Enoksasinin çalışılan çözücülerde alınan emisyon spektrumları incelendiğinde; su, metanol ve asetonitrilde yüksek floresans şiddeti verdiği, aynı zamanda maddenin floresans şiddetinin aynı uyarma ve emisyon dalga boylarında çözücününkinden oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. DMSO'in maddenin floresans emisyonu verdiği dalga boylarında çok yüksek floresans şiddetine sahip olması ve maddenin DMSO'den daha düşük bir floresans şiddeti vermesi sebebiyle bu maddenin tayininde de kullanılması uygun değildir.



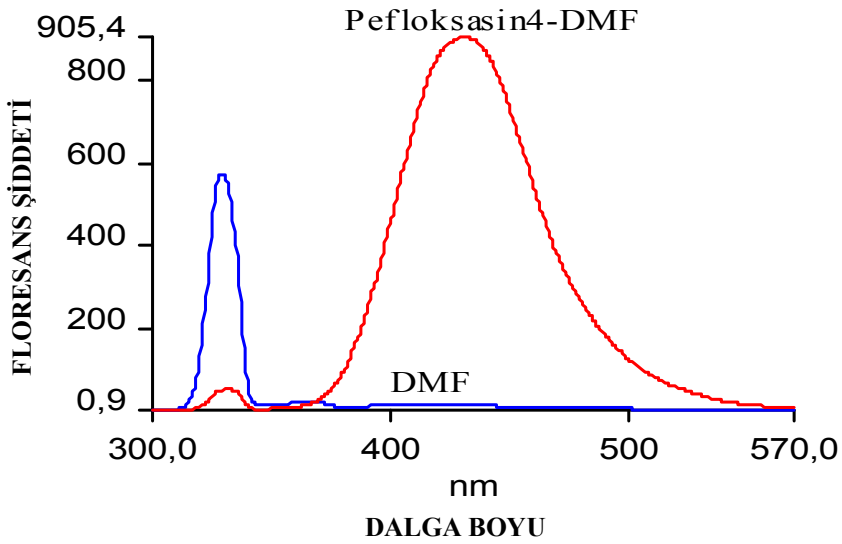
Şekil-4.16. Pefloksasinin Asetonitrildeki emisyon spektrumu (λeks:358,45 nm)



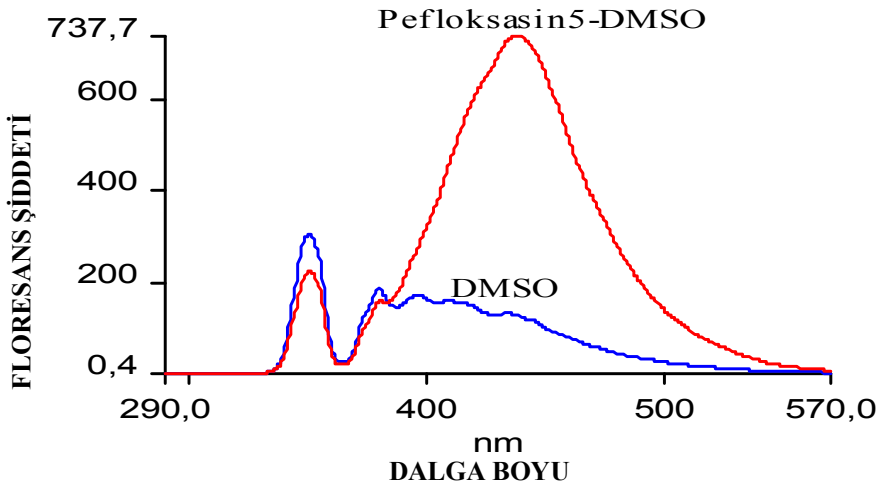
Şekil-4.17. Pefloksasinin Metanoldeki emisyon spektrumu (λeks: 348,62 nm)



Şekil-4.18. Pefloksasinin Sudaki emisyon spektrumu (λeks: 311,43 nm)



Şekil-4.19. Pefloksasinin Dimetil Formamitteki emisyon spektrumu (λeks: 329,08 nm)

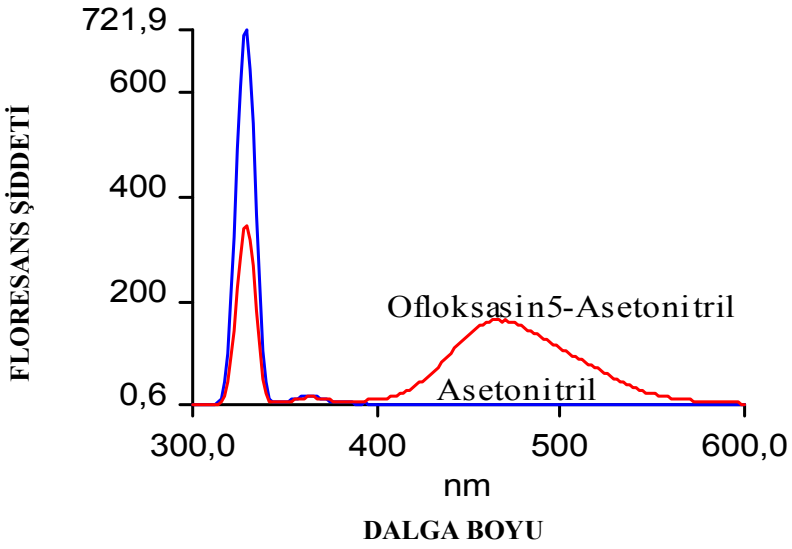


Şekil-4.20. Pefloksasinin Dimetil Sülfoksittedeki emisyon spektrumu (λeks:351,2 nm)

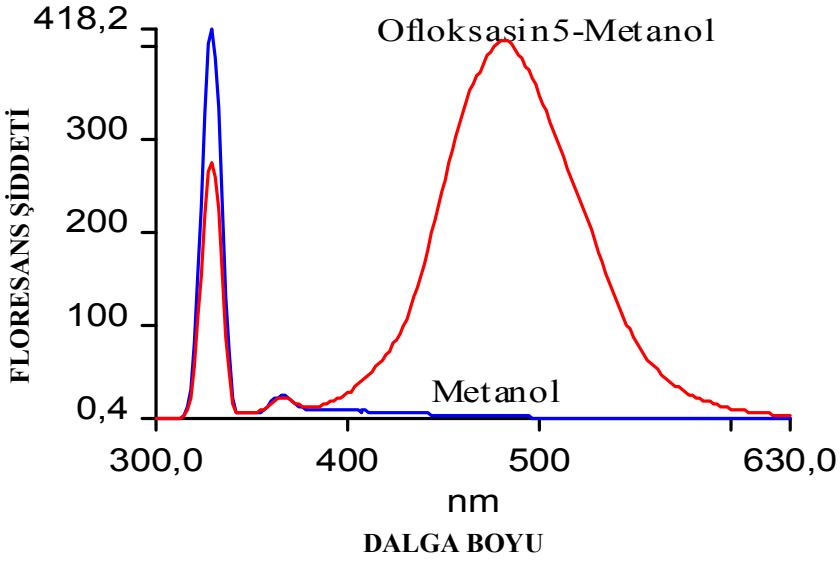
Çizelge 4.4. Pefloksasinin çözücülerdeki floresans şiddetleri

PEFLOXACİN	**λeks: (nm)**	**λems: (nm)**	**Floresans şiddeti:**	**Çözücünün floresans şiddeti:**
Pefloksasin -10^{-5} M-ACN	358.45	421.83	369.56	2.45
Pefoxacin -10^{-5} M-METANOL	348,62	431,19	966.68	5.64
Pefloksasin -10^{-5} M-SU	361,69	440,66	788,82	5,99
Pefloksasin -10^{-4} M-DMF	329,08	431,39	905,38	12,78
Pefloksasin -10^{-5} M-DMSO	351,2	439,5	737,6	124,7

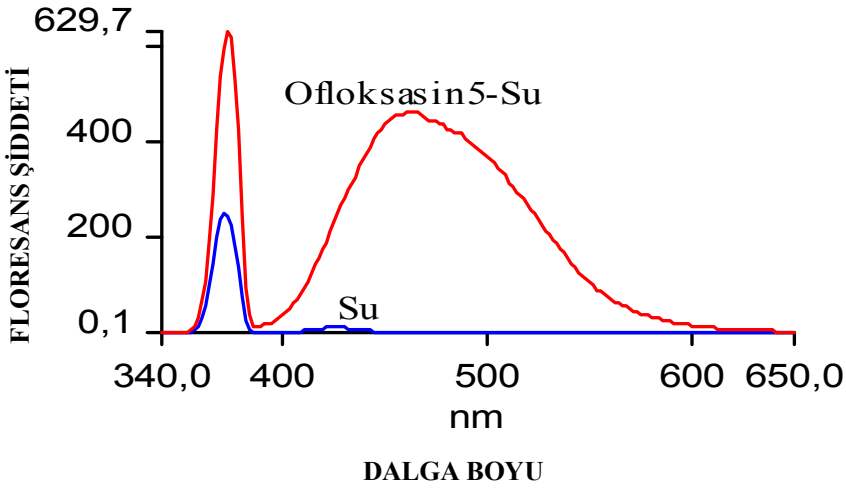
Pefloksasinin çalışılan çözücülerde alınan emisyon spektrumları incelendiğinde; bütün çözücülerde, asetonitrildeki hariç, yüksek floresans şiddeti verdiği, aynı zamanda maddenin floresans şiddetinin aynı uyarma ve emisyon dalga boylarında çözücününkinden oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. Bu durumun maddenin kimyasal yapısı, bu çözücülerdeki tam olarak çözünmesi ve çözücü ile maddenin polar özelliklerinin uyuşumundan kaynaklandığı düşünülebilir.



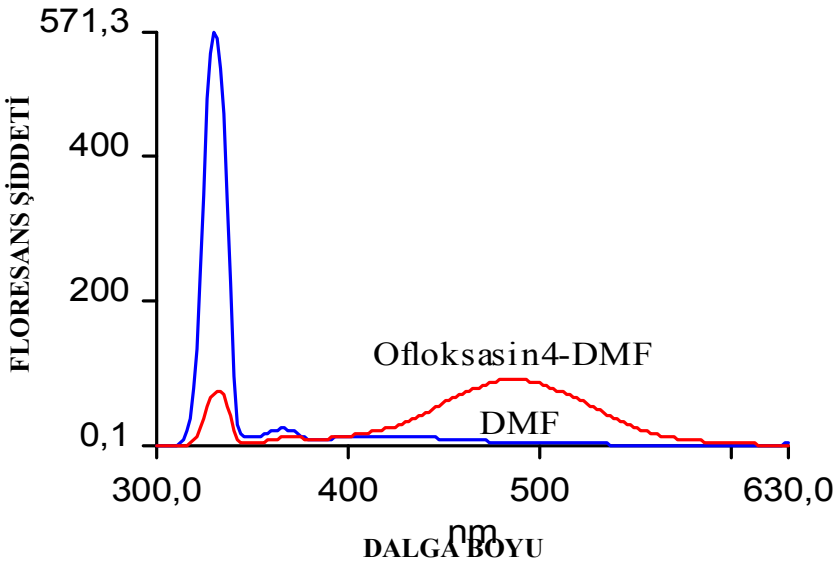
Şekil-4.21. Ofloksasinin Asetonitrildeki emisyon spektrumu (λeks: 328,44 nm)



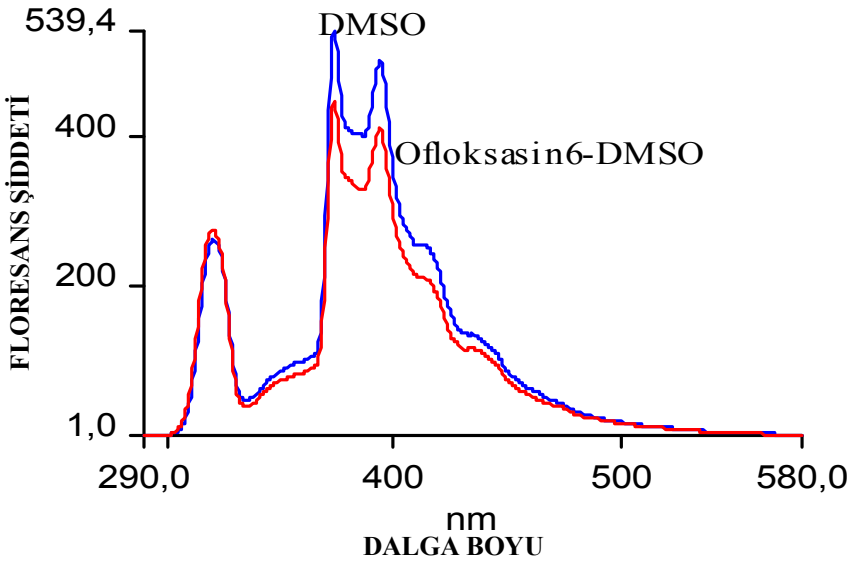
Şekil-4.22. Ofloksasinin Metanoldeki emisyon spektrumu (λeks: 327,82 nm)



Şekil-4.23. Ofloksasinin Sudaki emisyon spektrumu (λeks: 360,81 nm)



Şekil-4.24. Ofloksasinin Dimetil Formamitteki emisyon spektrumu (λeks: 331,60 nm)



Şekil-4.25. Ofloksasinin Dimetil Sülfoksitteki emisyon spektrumu (λeks: 319,5 nm)

Çizelge 4.5. Ofloksasinin çözücülerdeki floresans şiddetleri

OFLOXACİN	**λeks: (nm)**	**λems: (nm)**	**Floresans şiddeti:**	**Çözücünün floresans şiddeti:**
Ofloksasin -10^{-5} M-ACN	328,44	465,13	163.33	1.59
Ofloksasin -10^{-5} M-METANOL	327,82	479,63	406,48	2,60
Ofloksasin -10^{-5} M-SU	372,02	462,75	460,14	2,91
Ofloksasin -10^{-4} M-DMF	331,60	485,60	92,37	5,55
Ofloksasin -10^{-6} M-DMSO	319,5	373,3-393,9	442,2-408,9	535,8-498,6

Ofloksasinin çalışılan çözücülerde alınan emisyon spektrumları incelendiğinde; su, metanol ve asetonitrilde yüksek floresans şiddeti verdiği, aynı zamanda maddenin floresans şiddetinin aynı uyarma ve emisyon dalga boylarında çözücününkinden

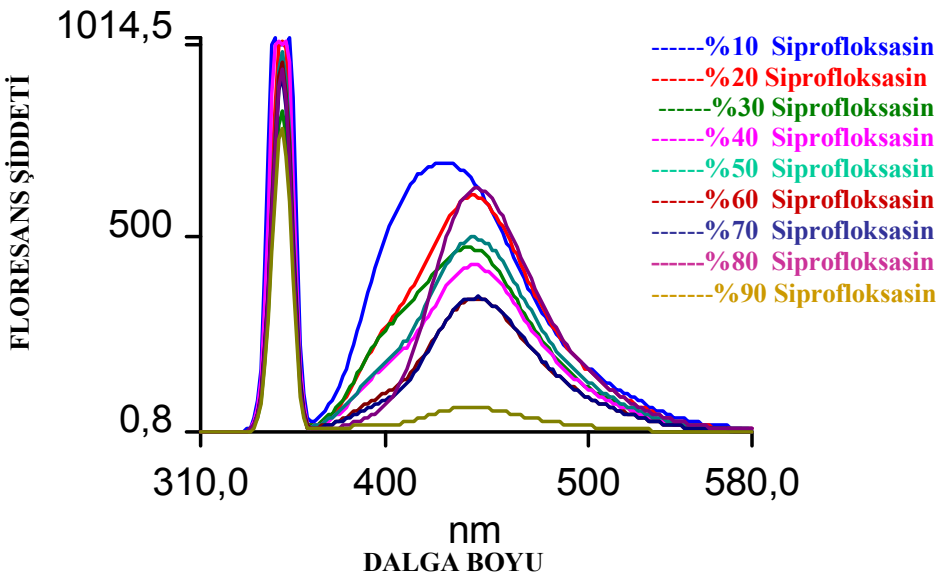
oldukça yüksek olduğu gözlenmiştir. DMSO'in maddenin floresans emisyonu verdiği dalga boylarında çok yüksek floresans şiddetine sahip olması ve maddenin DMSO'den daha düşük bir floresans şiddeti vermesi sebebiyle bu maddenin tayini için de kullanılması uygun değildir.

Emisyon grafikleri incelendiğinde, Levofloksasin, Enoksasin ve Ofloksasinin DMSO ortamındaki emisyon spektrumu çözücünün emisyon spektrumunun altında olduğu ve bu bileşiklerin seçilen dalga boylarındaki floresans şiddetinin çözücününkinden düşük olduğu gözlenmiştir. Bu nedenle DMSO'in bu maddelerin florimetrik özelliklerinin incelenmesinde kullanılmasının uygun olmadığı sonucuna varılmıştır.

4.2. Floresans Şiddetine Çözücü Yüzdesinin Etkisinin İncelenmesi

4.2.1. Florokinolonların farklı çözücü yüzdelerinde alınan emisyon spektrumları

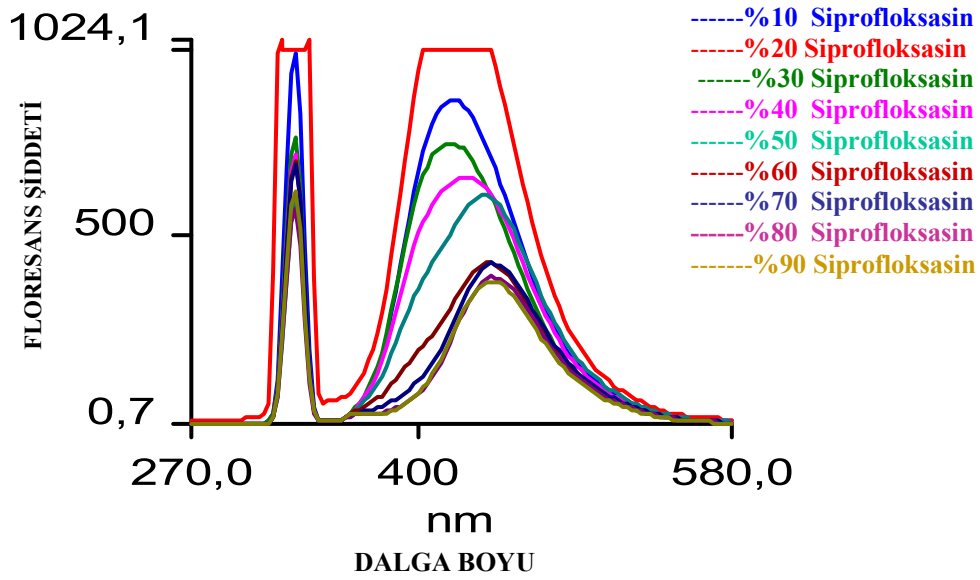
Florokinolonların floresans şiddetlerine çözücü yüzdelerinin incelenmesi amacıyla; %10-90 oranlarındaki asetonitril, metanol, DMF ve DMSO'in su ile karışım ortamlarında emisyon spektrumları alınmış ve en uygun çözücü ortamı belirlenmiştir.



Şekil-4.26. Siprofloksasin %10-90 ACN-SU karışımlarındaki emisyon spektrumları (λekz:348,79 nm)

Çizelge 4.6. 10^{-5} M Siprofloksasin ve Asetonitrilin λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

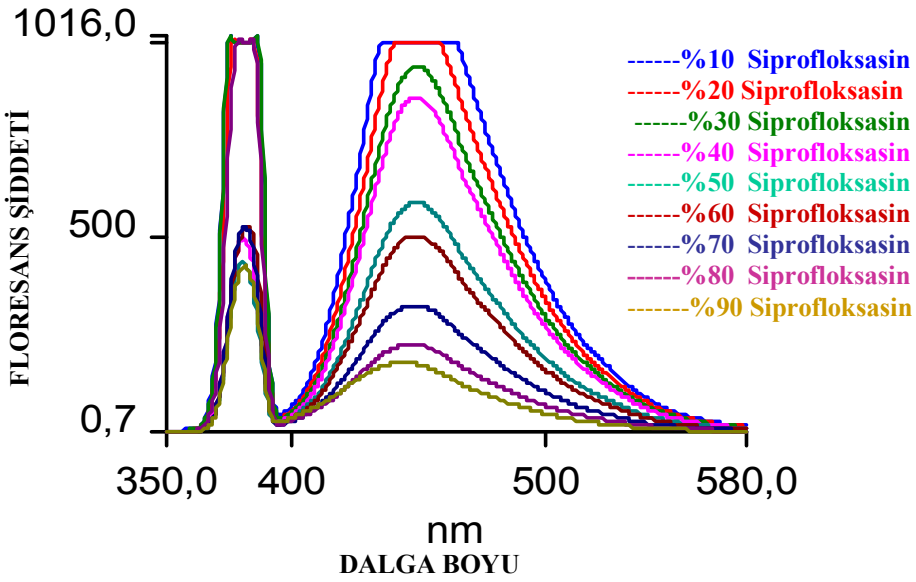
% ÇÖZÜCÜ	λekz (nm)	λems (nm)	Çözücü floresans şiddeti	Çözelti floresans şiddeti
10	348,79	428,32	17,59	694,08
20	348,79	389,68	3,89	606,97
30	348,79	440,66	4,74	475,23
40	348,79	443,75	5.63	430,29
50	348,79	442,21	4,25	500,32
60	348,79	443,75	4,32	344,69
70	348,79	445,29	3,21	346,07
80	348,79	443,75	5,52	625,74
90	348,79	442,21	2,86	63,57



Şekil-4.27. Siprofloksasin %10-90 METANOL SU karışımlarındaki emisyon spektrumu (λekz:328,78nm)

Çizelge 4.7. 10^{-6} M Siprofloksasin ve Metanolün λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

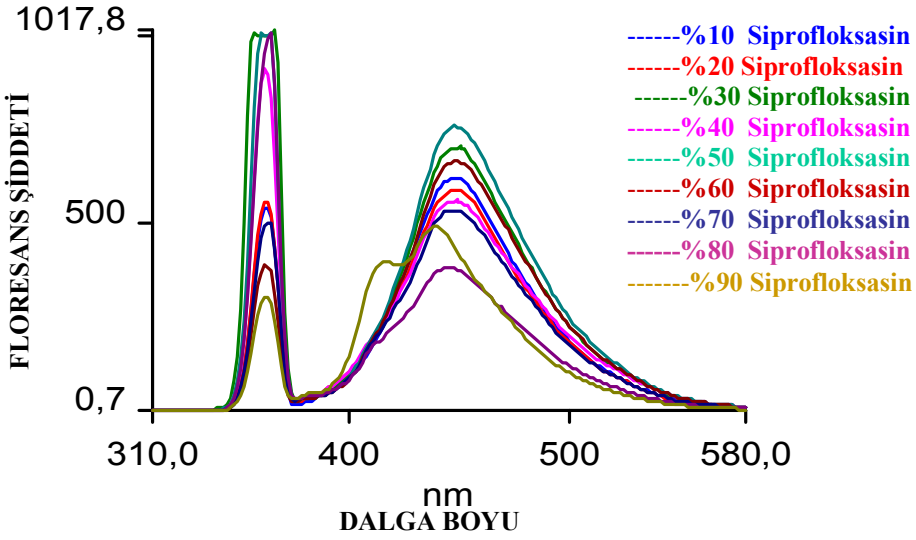
% ÇÖZÜCÜ	λekz (nm)	λems (nm)	Çözücü floresans şiddeti	Çözelti floresans şiddeti
10	328,78	419,69	8,72	866,32
20	328,78	424,24	6,08	1000
30	328,78	416,56	4,39	748,88
40	328,78	424,24	3,69	655,99
50	328,78	436,36	4,25	610,93
60	328,78	443,75	2,78	344,69
70	328,78	439,70	28,21	426,78
80	328,78	440,23	30,87	391,74
90	328,78	440,23	3,81	381,30



Şekil-4.28. Siprofloksasin %10-90 DMF -SU karışımlarındaki emisyon spektrumları (λekz: 381,25 nm)

Çizelge 4.8. 10^{-4}M Siprofloksasin ve Dimetil Formamitin λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

% ÇÖZÜCÜ	λekz (nm)	λems (nm)	Çözücü floresans şiddeti	Çözelti floresans şiddeti
10	381,25	450,00	9,70	1000
20	381,25	450,00	4,49	1000
30	381,25	450,00	12,16	937,80
40	381,25	448,75	7,77	854,62
50	381,25	447,50	4,15	589,61
60	381,25	450,00	2,42	502,79
70	381,25	447,50	4,53	325,21
80	381,25	447,50	5,88	224,94
90	381,25	446,82	5,18	176,17

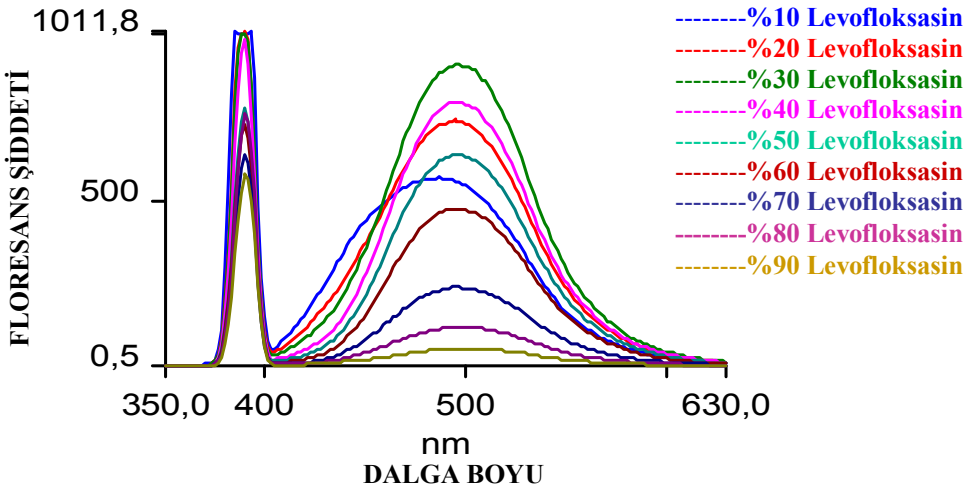


Şekil-4.29. Siprofloksasin %10-90 DMSO -SU karışımlarındaki emisyon spektrumları (λekz: 360,56 nm)

Çizelge 4.9. 10^{-5} M Siprofloksasin ve Dimetil Sülfoksitin λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

% ÇÖZÜCÜ	λekz (nm)	λems (nm)	Çözücü floresans şiddeti	Çözelti floresans şiddeti
10	360,56	448,22	35,03	622,35
20	360,56	445,60	20,59	589,46
30	360,56	448,22	26,22	886,74
40	360,56	445,60	36,28	558,04
50	360,56	446,91	56,95	760,23
60	360,56	448,22	67,10	668,81
70	360,56	445,60	83,00	536,03
80	360,56	445,60	95,72	379,90
90	360,56	437,75	121,11	494,73

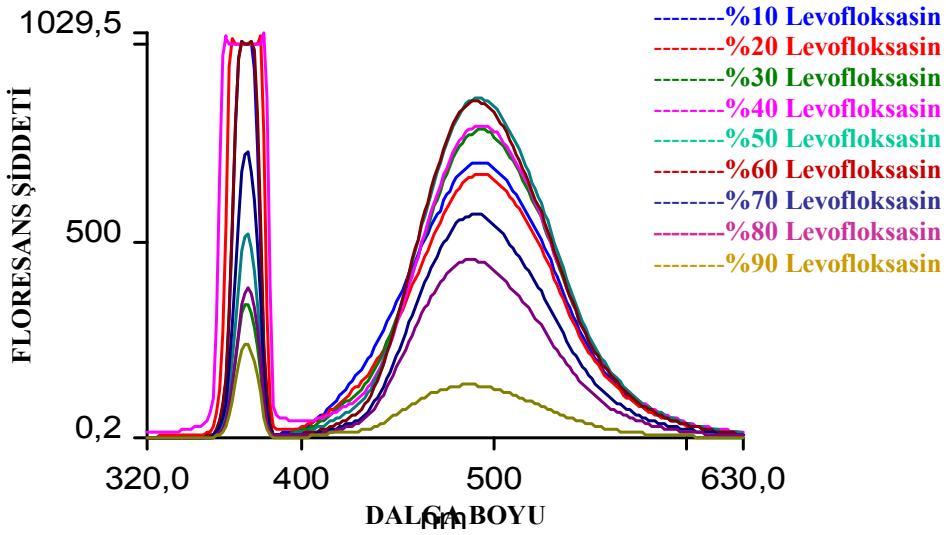
Siprofloksasinin %10-%90 su karışımlı organik çözücülerdeki (asetonitril, metanol, DMF ve DMSO) emisyon spektrumları incelendiğinde; %10ACN, %20 metanol, %10 DMF ve %50 DMSO ortamlarında en yüksek floresans şiddeti verdiği ve organik çözücü yüzdesi arttıkça floresans şiddeti düştüğü gözlenmiştir. Bu durumun siprofloksasinin suda çözünme özelliğinin organik çözücüdekinden daha fazla olmasından kaynaklandığı düşünülebilir.



Şekil-4.30. Levofloksasin %10-90 ACN -SU karışımlarındaki emisyon spektrumları (λekz: 387,70 nm)

Çizelge 4.10. 10^{-4} M Levofloksasin ve Asetonitrilin λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

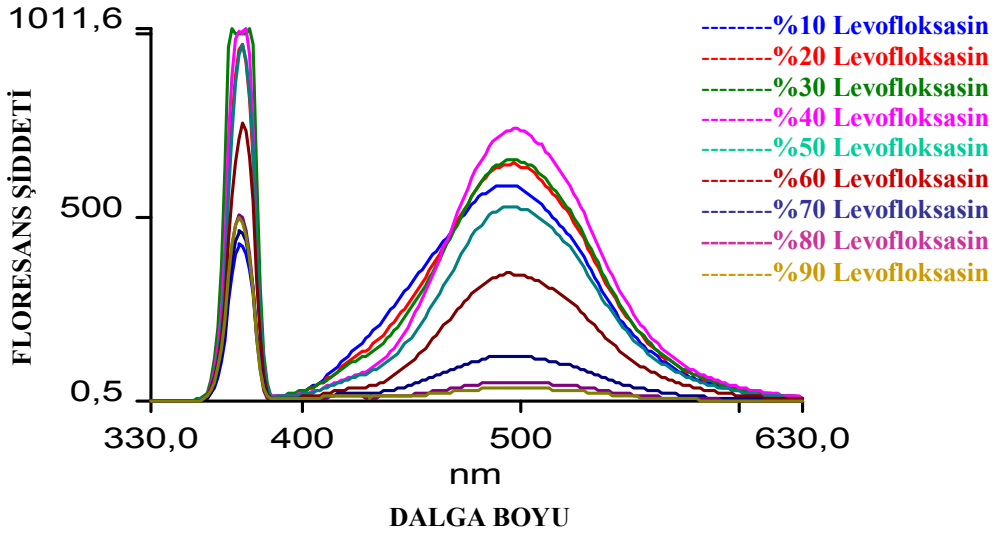
% ÇÖZÜCÜ	λekz (nm)	λems (nm)	Çözücü floresans şiddeti	Çözelti floresans şiddeti
10	387,70	485,59	0,92	568,55
20	387,70	493,19	1,00	742,27
30	387,70	494,71	0,92	910,96
40	387,70	494,71	1,43	796,72
50	387,70	497,75	0,97	636,61
60	387,70	496,23	1,04	476,69
70	387,70	493,19	0,91	237,33
80	387,70	499,26	1,07	116,50
90	387,70	499,26	0,71	53,12



Şekil-4.31. Levofloksasin %10-90 METANOL-SU karışımlarındaki emisyon spektrumları (λekz:368,94 nm)

Çizelge 4.11. 10^{-5} M Levofloksasin ve Metanolün λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

% ÇÖZÜCÜ	λekz (nm)	λems (nm)	Çözücü floresans şiddeti	Çözelti floresans şiddeti
10	368,94	494,03	1,57	698,82
20	368,94	492,94	2,37	671,43
30	368,94	492,94	1,09	782,96
40	368,94	491,85	0,92	794,79
50	368,94	490,77	1,04	866,08
60	368,94	489,68	0,85	856,25
70	368,94	489,68	8,07	567,26
80	368,94	485,33	9,68	452,82
90	368,94	487,50	1,29	135,16

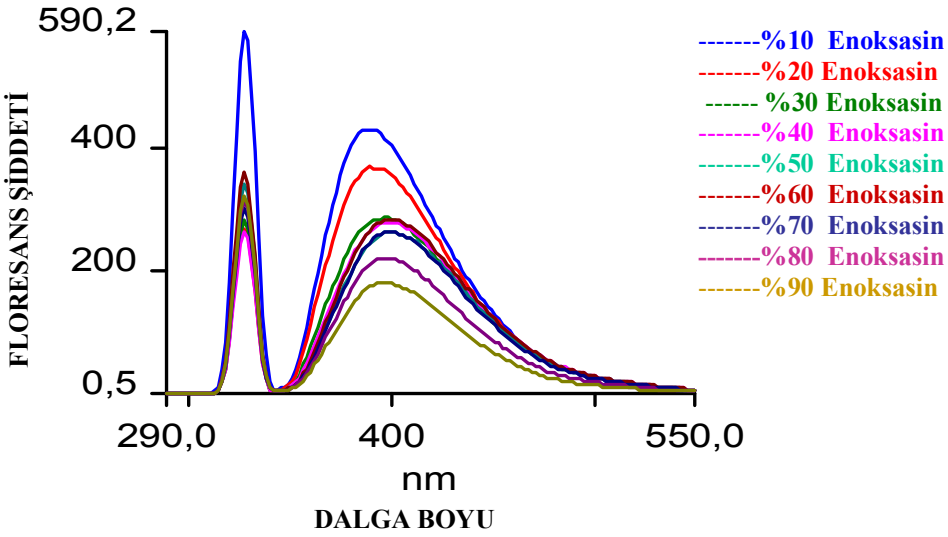


Şekil-4.32. Levofloksasin %10-90 DMF-SU karışımlarındaki emisyon spektrumları (λekz: 370,70 nm)

Çizelge 4.12. 10^{-5}M Levofloksasin ve Dimetil Formamitin λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

% ÇÖZÜCÜ	λekz (nm)	λems (nm)	Çözücü floresans şiddeti	Çözelti floresans şiddeti
10	370,70	493,07	7,68	585,86
20	370,70	497,69	3,11	643,51
30	370,70	496,15	7,70	654,78
40	370,70	496,66	4,84	738,32
50	370,70	494,32	1,89	528,58
60	370,70	494,32	1,15	346,01
70	370,70	491,30	3,34	124,54
80	370,70	497,33	6,77	52,84
90	370,70	498,84	2,71	36,83

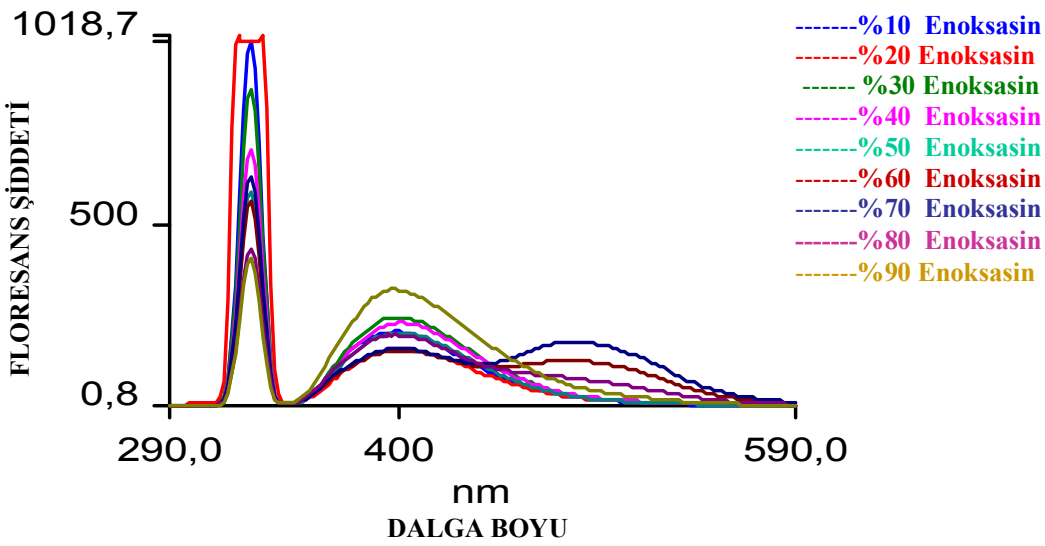
Levofloksasinin %10-%90 su karışımlı organik çözücülerdeki (asetonitril, metanol, DMF ve DMSO) emisyon spektrumları incelendiğinde; %30ACN, %50 ve %60 metanol ve %40 DMF ortamlarında en yüksek floresans şiddeti verdiği ve bu değerlerin üzerinde, organik çözücü yüzdesi arttıkça floresans şiddetinin düştüğü gözlenmiştir. Bu durumun levofloksasinin ortalama %50 organik çözücü ortamlarında çözünme özelliğinin daha fazla olmasından kaynaklandığı düşünülebilir.



Şekil-4.33. Enoksasin %10-90 ACN-SU karışımlarındaki emisyon spektrumları (λekz: 327.78 nm)

Çizelge 4.13. 10^{-5} M Enoksasin ve Asetonitrilin λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

% ÇÖZÜCÜ	λekz (nm)	λems (nm)	Çözücü floresans şiddeti	Çözelti floresans şiddeti
10	327.78	386,57	15,42	429,00
20	327.78	389,68	3,63	368,67
30	327.78	397,46	3,76	287,35
40	327.78	402,12	4,75	280,21
50	327.78	400,55	3,60	263,27
60	327.78	397,47	3,74	284,18
70	327.78	400,55	3,83	264,49
80	327.78	397,47	6,16	221,06
90	327.78	394,38	4,51	181,38

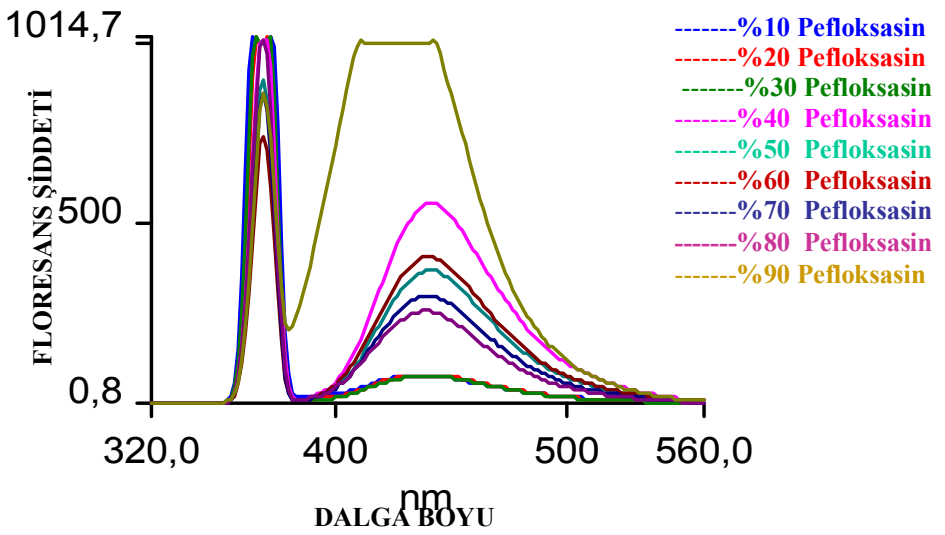


Şekil-4.34. Enoksasin %10-90 METANOL-SU karışımlarındaki emisyon spektrumları (λekz: 327,50 nm)

Çizelge 4.14. 10^{-5} M Enoksasin ve Metanolün λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

% ÇÖZÜCÜ	λekz (nm)	λems (nm)	Çözücü floresans şiddeti	Çözelti floresans şiddeti
10	327,50	398,00	204,36	10,23
20	327,50	401,00	157,59	6,60
30	327,50	402,50	243,75	4,63
40	327,50	399,50	229,03	3,96
50	327,50	401,00	202,62	3,86
60	327,50	399,50-482,00	284,18-125,26	3,59-1,37
70	327,50	398,46-484,61	158,21-174,77	11,37-54,18
80	327,50	396,92	195,49	11,97
90	327,50	396,92	320,09	3,52

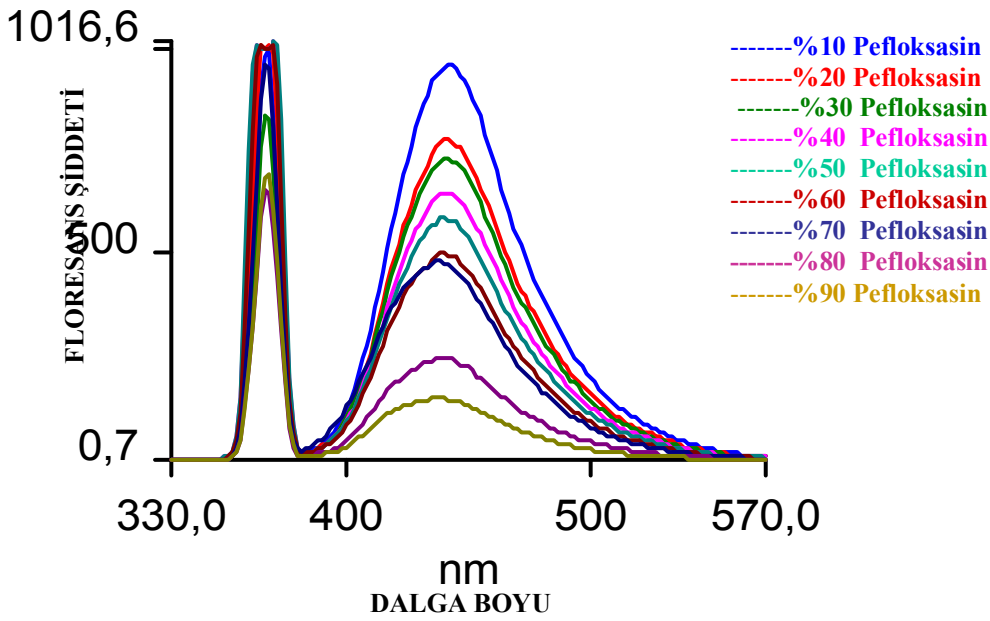
Enoksasinin %10-%90 su karışımlı organik çözücülerdeki (asetonitril, metanol, DMF ve DMSO) emisyon spektrumları incelendiğinde; %10ACN ve %90 metanol, ortamlarında en yüksek floresans şiddeti verdiği ve asetonitril ortamında organik çözücü yüzdesi arttıkça floresans şiddeti düşerken, metanol ortamında %30a kadar artmış daha sonra azalıp %90da birden bir artış gösterdiği gözlenmiştir. Bu durumda enoksasinin floresans özelliklerinin tayini için %90 ortamında çalışılmasının daha uygun olacağı sonucuna varılmıştır.



Şekil-4.35. Pefloksasin %10-90 ACN-SU karışımlarındaki emisyon spektrumları (λekz: 367,68 nm)

Çizelge 4.15. 10^{-5} M Pefloksasin ve Asetonitrilin λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

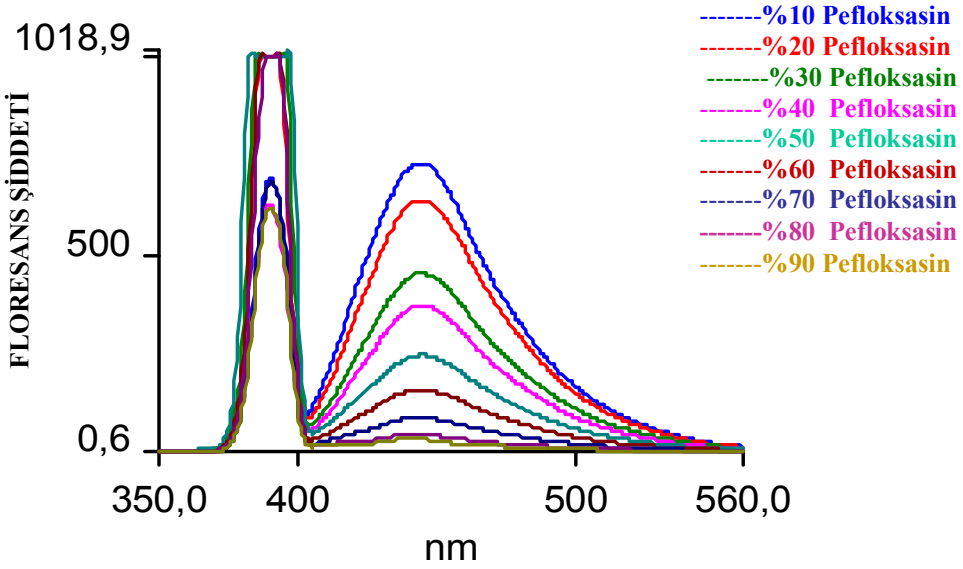
% ÇÖZÜCÜ	λekz (nm)	λems (nm)	Çözücü floresans şiddeti	Çözelti floresans şiddeti
10	367,68	439,21	5,34	75,63
20	367,68	438,04	2,69	78,87
30	367,68	441,56	2,52	75,30
40	367,68	440,39	3,10	553,17
50	367,68	440,39	2,33	367,05
60	367,68	439,21	2,48	405,44
70	367,68	438,04	2,57	299,11
80	367,68	437,96	3,07	255,84
90	367,68	426,98	3,83	1000



Şekil-4.36. Pefloksasin %10-90 METANOL-SU karışımlarındaki emisyon spektrumları (λekz: 367,36 nm)

Çizelge 4.16. 10^{-5} M Pefloksasin ve Metanolün λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

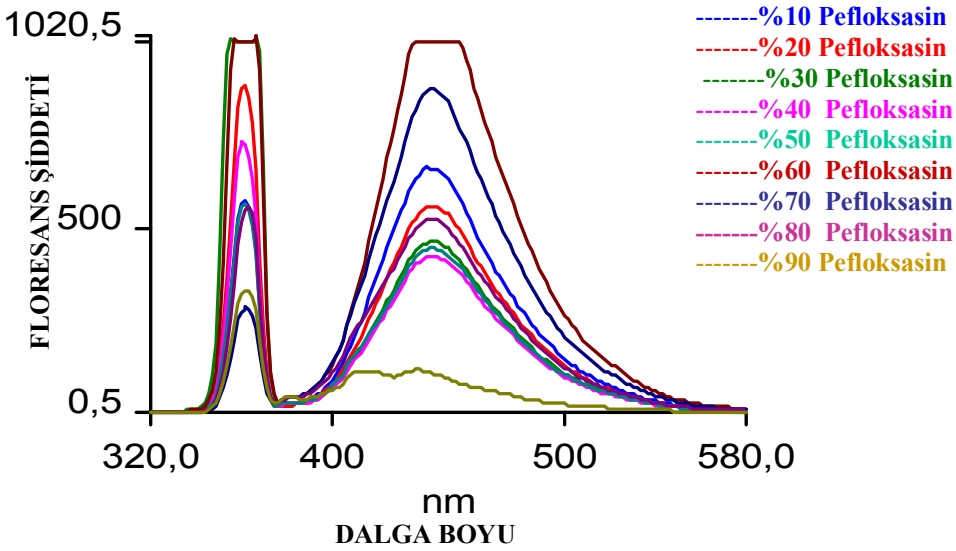
% ÇÖZÜCÜ	λekz (nm)	λems (nm)	Çözücü floresans şiddeti	Çözelti floresans şiddeti
10	367,36	442,10	3,58	959,15
20	367,36	438,94	4,55	778,44
30	367,36	440,00	2,46	734,86
40	367,36	440,00	2,03	647,82
50	367,36	438,94	2,23	586,63
60	367,36	438,94	2,10	248,09
70	367,36	437,89	4,80	482,75
80	367,36	438,94	4,97	248,09
90	367,36	436,84	2,13	150,30



Şekil-4.37. Pefloksasin %10-90 DMF-SU karışımlarındaki emisyon spektrumları (λekz: 390,39 nm)

Çizelge 4.17. 10^{-4} M Pefloksasin ve Dimetil Formamitin λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

% ÇÖZÜCÜ	λekz (nm)	λems (nm)	Çözücü floresans şiddeti	Çözelti floresans şiddeti
10	390,39	443,88	11,69	731,69
20	390,39	442,79	8,74	637,85
30	390,39	443,88	15,20	452,00
40	390,39	443,75	10,62	372,08
50	390,39	444,86	9,46	245,69
60	390,39	444,86	8,70	158,27
70	390,39	441,51	9,68	86,87
80	390,39	442,63	11,06	45,60
90	390,39	442,63	12,10	33,13

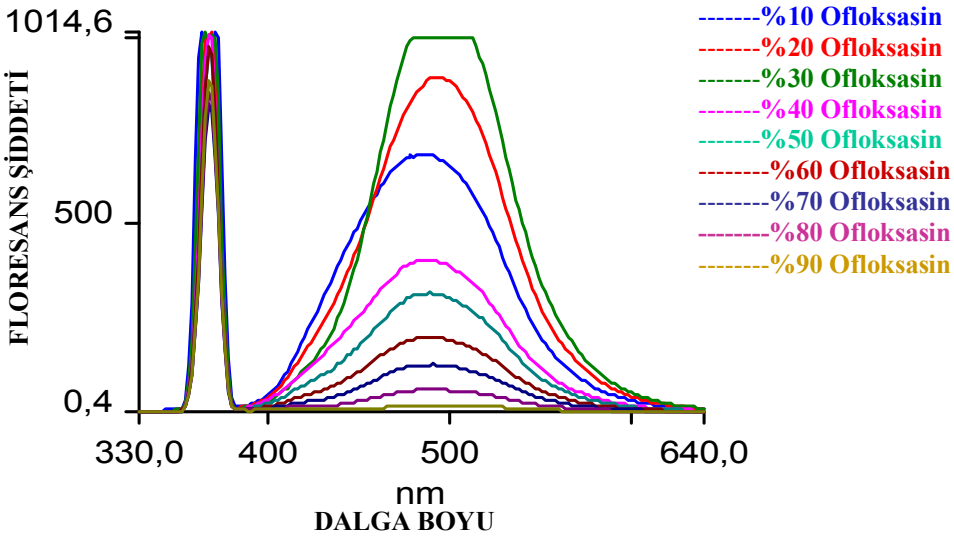


Şekil-4.38. Pefloksasin %10-90 DMSO-SU karışımlarındaki emisyon spektrumları (λekz: 360,40 nm)

Çizelge 4.18. 10^{-5} M Pefloksasin ve Dimetil Sülfoksitin λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

% ÇÖZÜCÜ	λekz (nm)	λems (nm)	Çözücü floresans şiddeti	Çözelti floresans şiddeti
10	360,4	440,3	32,0	662,2
20	360,4	441,5	21,4	559,6
30	360,4	441,8	29,4	461,4
40	360,4	441,8	39,7	425,4
50	360,4	442,1	62,1	444,0
60	360,4	445,9	70,9	1000
70	360,4	445,9	88,7	873,9
80	360,4	440,2	106,4	525,3
90	360,4	410,3-435,6	126,3-121,2	113,7-115,3

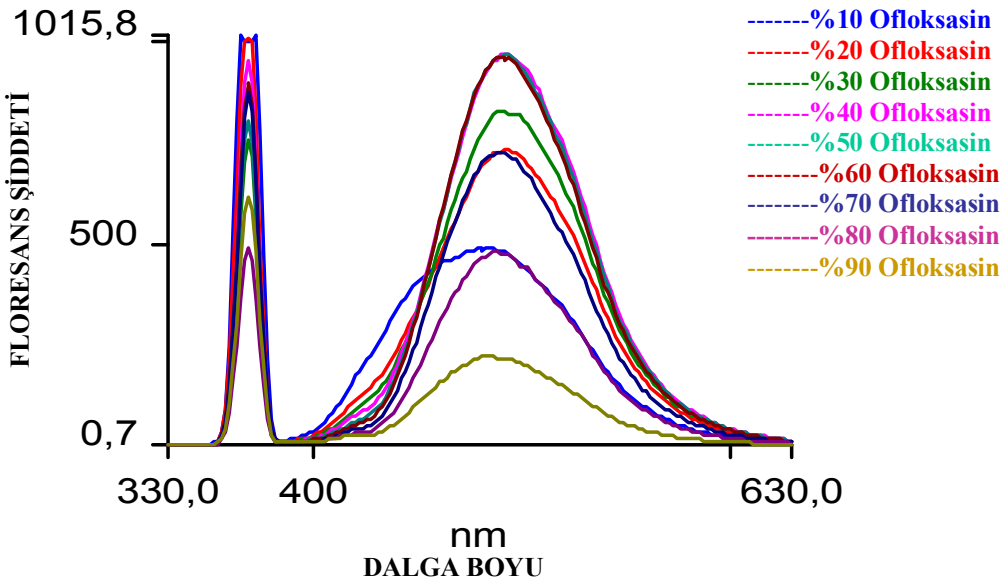
Pefloksasinin %10-%90 su karışımlı organik çözücülerdeki (asetonitril, metanol, DMF ve DMSO) emisyon spektrumları incelendiğinde; %90ACN, %10 metanol, %10 DMF ve %60 DMSO ortamlarında en yüksek floresans şiddeti verdiği ve metanol ve DMF ortamlarında organik çözücü yüzdesi arttıkça floresans şiddeti düzenli bir azalma gösterirken, DMSO ortamında %50ye kadar artmış daha sonra azalıp %60da birden bir artış göstermiş ve sonra yeniden azalmıştır. DMSO ortamında enoksasinin sergilediği davranış asetonitril ortamında da gözlenmiş ve %90 asetonitril ortamında ani bir floresans şiddeti artışı olmuştur. Bu durumda pefloksasinin floresans özelliklerinin tayini için en yüksek floresans şiddeti gösterdiği %10 metanol, %10 DMF ve %60 DMSO ortamlarının yanı sıra, asetonitril ortamı için %90 yerine %40 ortamında çalışılmasının daha uygun olacağı sonucuna varılmıştır.



Şekil-4.39. Ofloksasin %10-90 ACN-SU karışımlarındaki emisyon spektrumları (λekz: 367,38 nm)

Çizelge 4.19. 10^{-5} M Ofloksasin ve Asetonitrilin λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

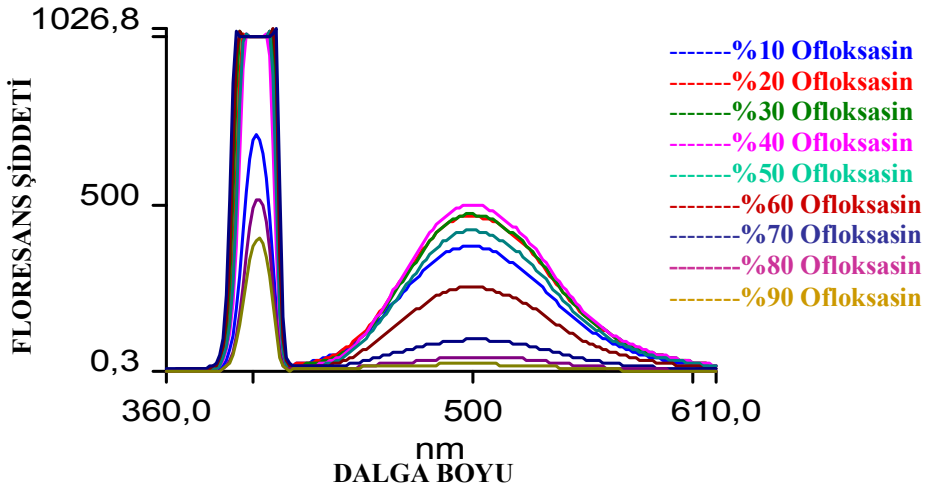
% ÇÖZÜCÜ	λekz (nm)	λems (nm)	Çözücü floresans şiddeti	Çözelti floresans şiddeti
10	367,38	483,82	2,22	688,74
20	367,38	493,53	1,32	894,56
30	367,38	496,51	1,37	1000
40	367,38	484,88	2,07	407,47
50	367,38	487,20	2,18	316,71
60	367,38	488,37	2,37	198,38
70	367,38	491,86	1,11	126,53
80	367,38	490,69	1,54	59,55
90	367,38	503,48	0,86	17,22



Şekil-4.40. Ofloksasin %10-90 METANOL-SU karışımlarındaki emisyon spektrumları (λekz: 367,15 nm)

Çizelge 4.20. 10^{-5} M Ofloksasin ve Metanolün λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

% ÇÖZÜCÜ	λekz (nm)	λems (nm)	Çözücü floresans şiddeti	Çözelti floresans şiddeti
10	367,15	484,81	1,84	490,53
20	367,15	491,14	2,35	732,79
30	367,15	489,85	1,22	827,61
40	367,15	489,85	1,00	967,89
50	367,15	491,14	1,02	968,74
60	367,15	488,56	0,87	961,98
70	367,15	491,14	8,07	725,20
80	367,15	485,97	9,77	482,45
90	367,15	485,97	1,31	219,95



Şekil-4.41. Ofloksasin %10-90 DMF-SU karışımlarındaki emisyon spektrumları (λekz: 399,15 nm)

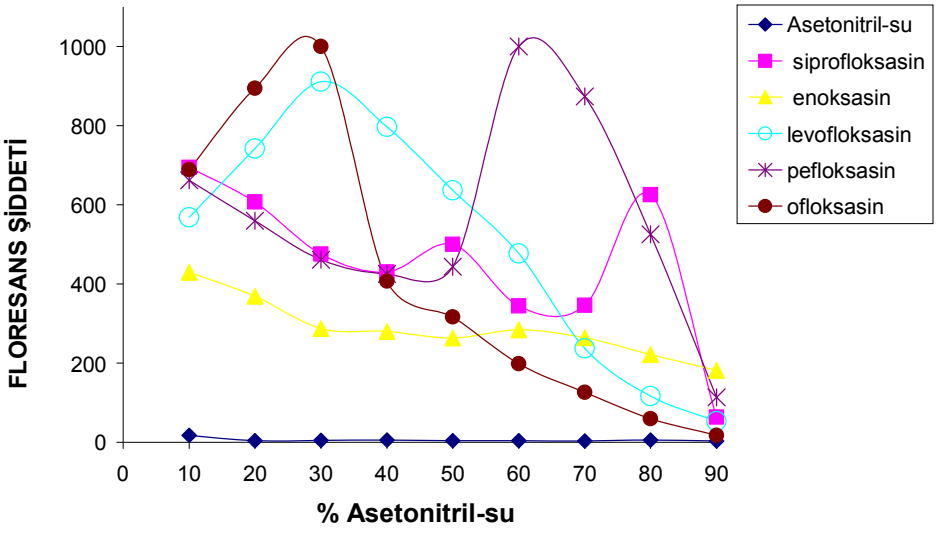
Çizelge 4.21. 10^{-4} M Ofloksasin ve Dimetil Formamitin λekz, λem ve floresans şiddeti değerleri

% ÇÖZÜCÜ	λekz (nm)	λems (nm)	Çözücü floresans şiddeti	Çözelti floresans şiddeti
10	399,15	498,79	3,05	375,59
20	399,15	499,96	1,65	466,47
30	399,15	497,61	5,63	470,52
40	399,15	496,79	1,69	497,76
50	399,15	499,26	1,48	420,35
60	399,15	499,26	0,89	254,11
70	399,15	504,20	1,65	95,11
80	399,15	499,26	4,03	43,68

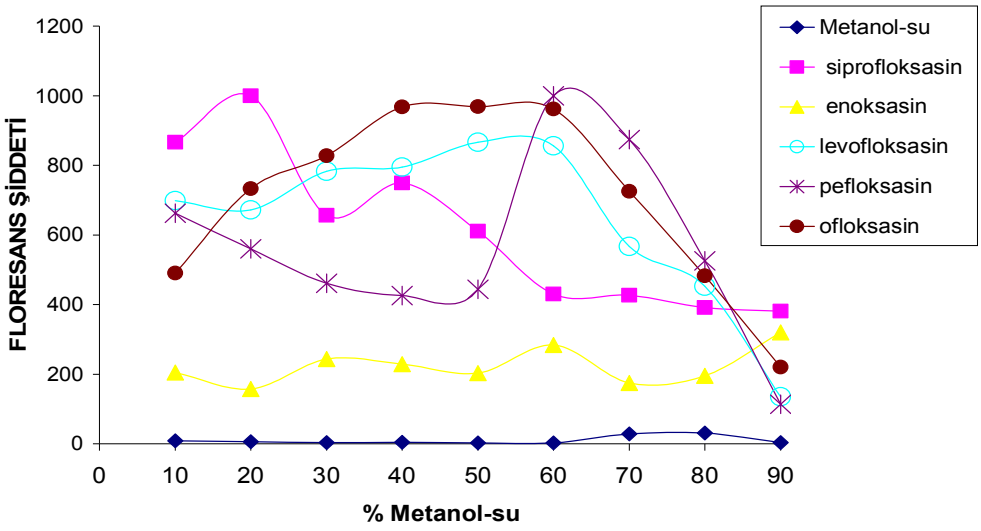
Ofloksasinin %10-%90 su karışımlı organik çözücülerdeki (asetonitril, metanol, DMF ve DMSO) emisyon spektrumları incelendiğinde; %30ACN, %40, %50 ve %60 metanol ve %40 DMF ortamlarında en yüksek floresans şiddeti verdiği ve bu değerlerin üzerinde, organik çözücü yüzdesi arttıkça floresans şiddetinin düştüğü gözlenmiştir. Bu durumun ofloksasinin ortalama %50 organik çözücü ortamlarında çözünme özelliğinin daha fazla olmasından kaynaklandığı düşünülebilir.

4.2.2. Florokinolonların % Çözücü-Floresans Şiddeti Grafikleri

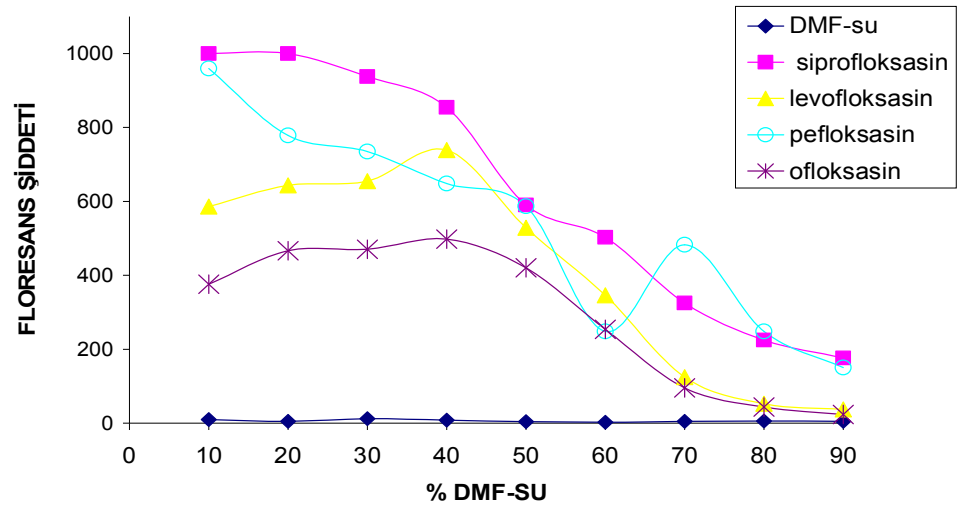
Florokinolonların %10-%90 asetonitril, %10-%90 metanol, %10-%90 DMF, %10-%90 DMSO içeren sulu çözeltilerinin floresans şiddetleri ölçülerek % çözücü ortamına karşı grafikleri çizilmiştir. Böylelikle farklı yüzdedeki organik çözücü–su karışım ortamlarında Florokinolonların florimetrik davranışları incelenmiştir. Oluşturulan organik çözücü-su karışımlarında maddenin floresans şiddetinin değiştiği gözlendi.



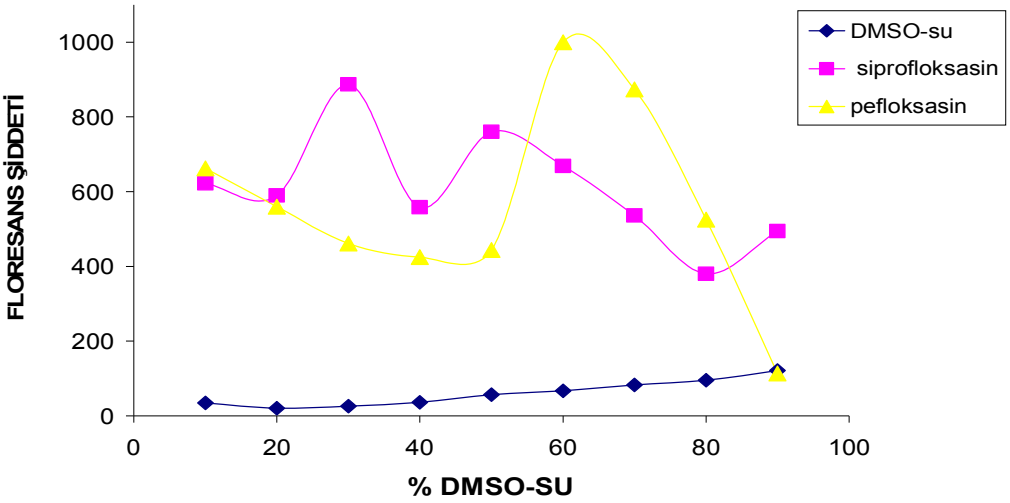
Şekil-4.42. Siprofloksasin, Levofloksasin, Enoksasin, Pefloksasin ve Ofloksasin asetonitril-su ortamındaki % çözücü-floresans şiddeti grafiği



Şekil-4.43. Siprofloksasin, Levofloksasin, Enoksasin, Pefloksasin ve Ofloksasin metanol-su ortamındaki % çözücü-floresans şiddeti grafiği



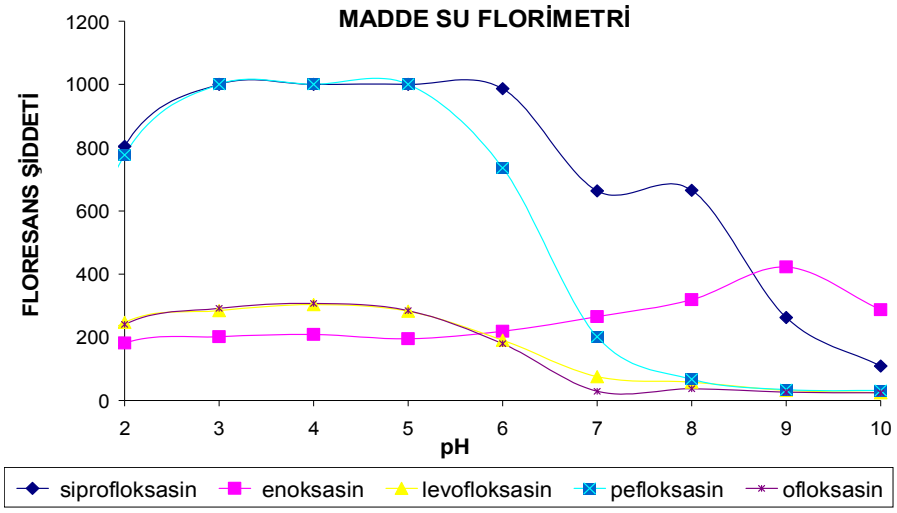
Şekil-4.44. Siprofloksasin, Levofloksasin, Pefloksasin ve Ofloksasin DMF-SU ortamındaki % çözücü-floresans şiddeti grafiği



Şekil-4.45. Siprofloksasin ve Pefloksasin DMSO-su ortamındaki % çözücü-floresans şiddeti grafiği

Çizelge : Siprofloksasin, Levofloksasin, Enoksasin, Pefloksasin ve Ofloksasinin Floresans şiddeti değerleri

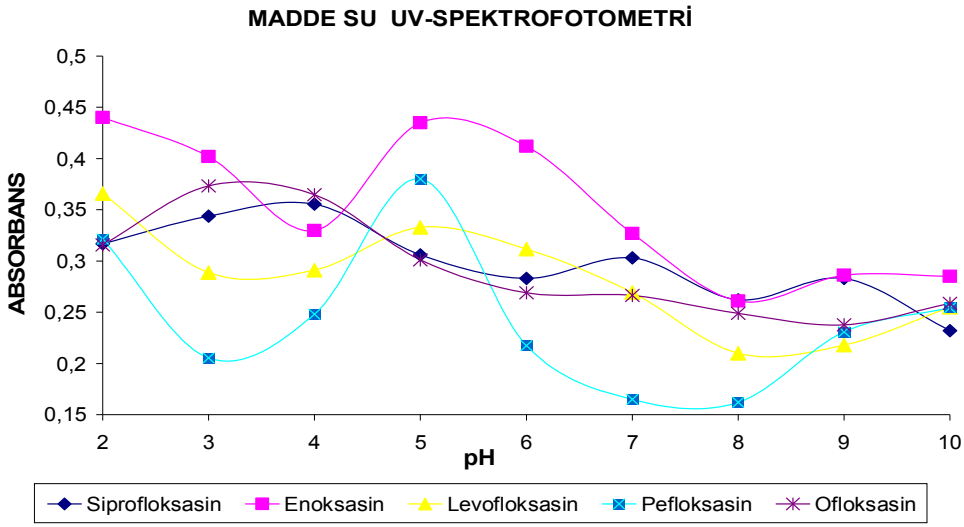
	Ciprofloksasin	**Enoksasin**	**Levofloksasin**	**Pefloksasin**	**Ofloksasin**
pH	**Floresans şiddeti**	**Floresans şiddeti**	**Floresans şiddeti**	**Floresans şiddeti**	**Floresans şiddeti**
2	1000,00	286,73	223,52	756,16	226,09
3	1000,00	425,22	275,50	983,32	284,72
4	1000,00	396,31	287,81	1000,00	294,22
5	1000,00	357,65	266,02	947,95	273,65
6	919,30	292,41	167,97	694,05	176,01
7	687,92	270,15	72,89	227,59	57,37
8	602,74	225,62	56,36	70,73	40,04
9	249,63	223,64	31,45	40,00	28,50
10	109,46	183,38	24,22	31,41	24,24



Şekil-4.46. Siprofloksasin, Levofloksasin, Enoksasin, Pefloksasin ve Ofloksasinin su ortamındaki pH-floresans şiddeti grafiği

Çizelge : Siprofloksasin, Levofloksasin, Enoksasin, Pefloksasin ve Ofloksasinin Absorbans değerleri

	Siprofloksasin	Enoksasin	Levofloksasin	Pefloksasin	Ofloksasin
pH	Absorbans	Absorbans	Absorbans	Absorbans	Absorbans
2	0,31675	0,43999	0,36593	0,32146	0,31567
3	0,34378	0,40196	0,28860	0,20545	0,37341
4	0,35539	0,32962	0,29097	0,24797	0,36477
5	0,30602	0,43505	0,33294	0,38017	0,30100
6	0,28289	0,41202	0,31169	0,21746	0,26882
7	0,30319	0,32672	0,26922	0,16480	0,26644
8	0,26200	0,26085	0,20988	0,16208	0,24888
9	0,28297	0,28623	0,21796	0,23084	0,23773
10	0,23188	0,28515	0,25482	0,25425	0,25853

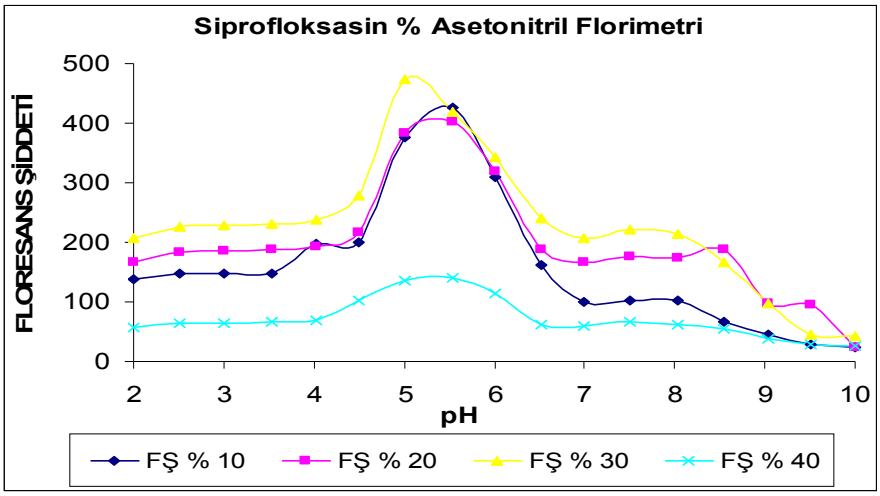


Şekil-4.47. Siprofloksasin, Levofloksasin, Enoksasin, Pefloksasin ve Ofloksasinin su ortamındaki pH-Absorbans grafiği

4.3. Florokinolonların İyonlaşma Sabitlerinin Tayini

4.3.1. Florimetrik yöntemle iyonlaşma sabitlerinin tayini

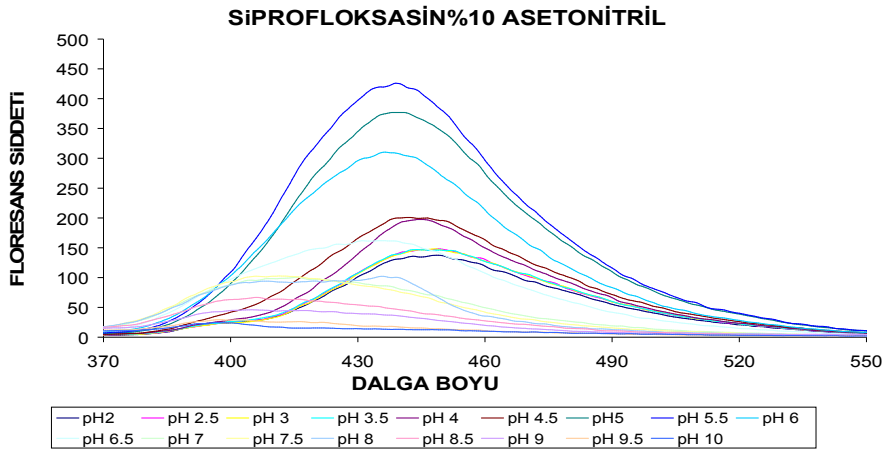
Florokinolonların %10-40 asetonitril sulu karışımlarında ve sadece su ortamında, pH 2-10 arasında floresans şiddetleri ölçülerek pH-floresans şiddeti grafikleri çizilmiş ve bu grafiklerden her birinin pKa değerleri, sigmoidal grafiklerin yarı nötralizasyon noktasına karşılık gelen pH değerlerinden belirlenmiştir.



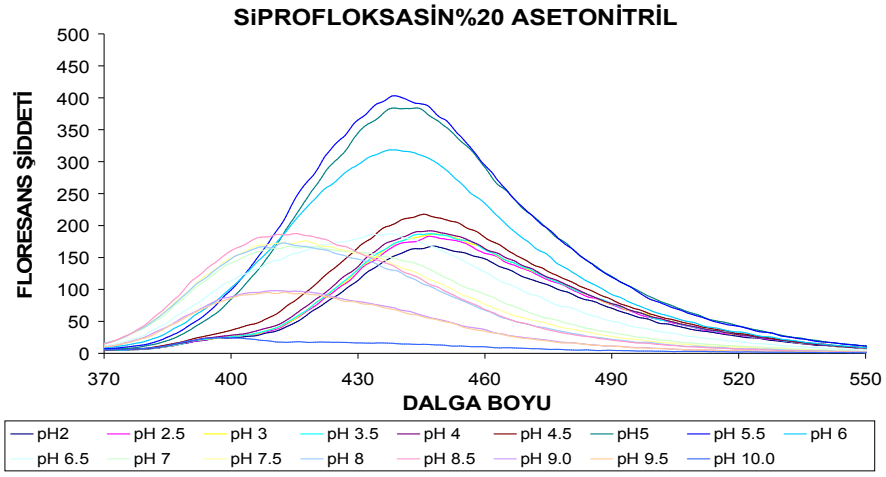
Şekil-4.48. Siprofloksasinin %10-%40 pH - Floresans şiddeti grafiği

Çizelge 4.22. Siprofloksasinin pH- %10-%40 Floresans şiddeti değerleri

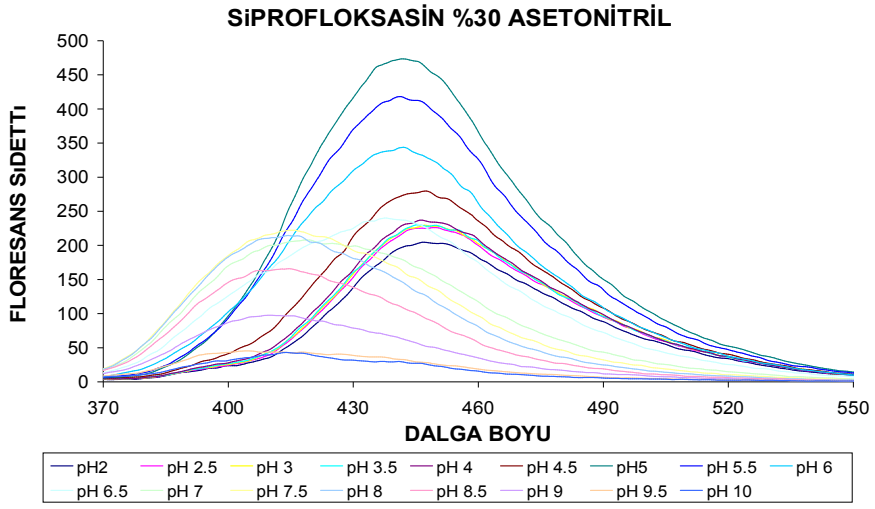
SİPROFLOKSASİN				
pH	**FŞ % 10**	**FŞ % 20**	**FŞ % 30**	**FŞ % 40**
2,0	137,37	167,22	207,59	57,13
2,5	148,01	183,02	226,11	63,34
3,0	147,96	186,88	229,47	64,98
3,5	146,89	187,07	229,93	66,81
4,0	197,43	191,76	236,96	69,19
4,5	200,80	217,42	279,56	102,33
5,0	376,78	383,88	473,19	135,60
5,5	426,03	403,10	418,15	139,77
6,0	310,27	318,37	343,52	114,39
6,5	161,56	187,28	240,11	62,98
7,0	100,37	167,34	207,89	59,10
7,5	102,57	175,84	222,12	65,87
8,0	102,57	172,88	214,16	63,00
8,5	66,70	187,38	165,73	55,91
9,0	45,88	98,10	97,65	38,34
9,5	29,31	95,67	45,37	28,90
10,0	24,41	24,64	43,00	25,89



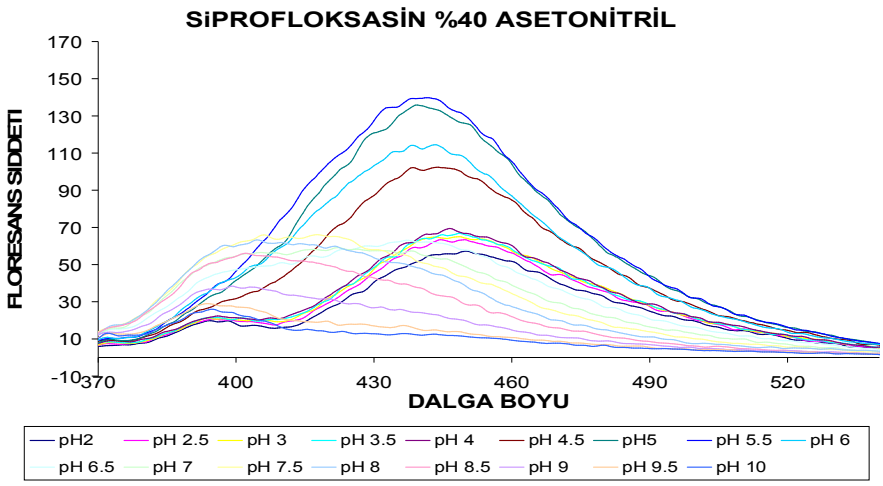
Şekil-4.49. 1.10^{-5} M Siprofloksasin % 10 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları (λekz:348,79 nm)



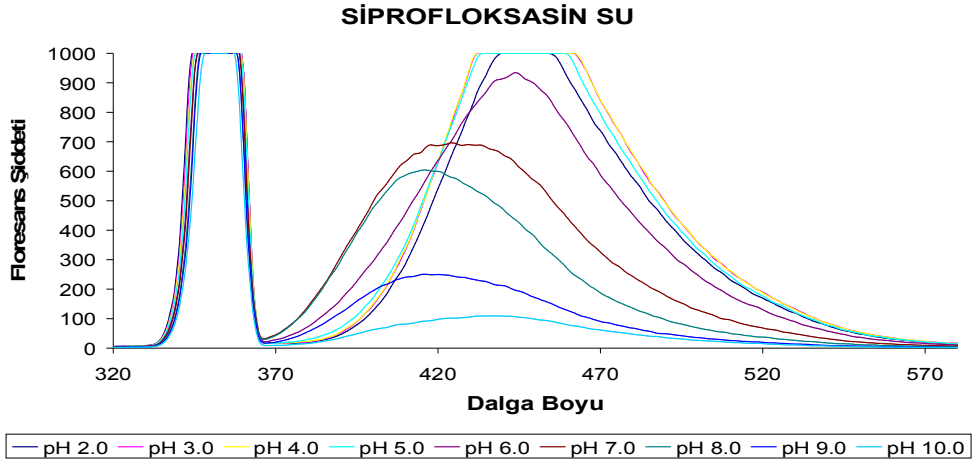
Şekil-4.50. 1.10^{-5} M Siprofloksasin % 20 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları (λekz:348,79 nm)



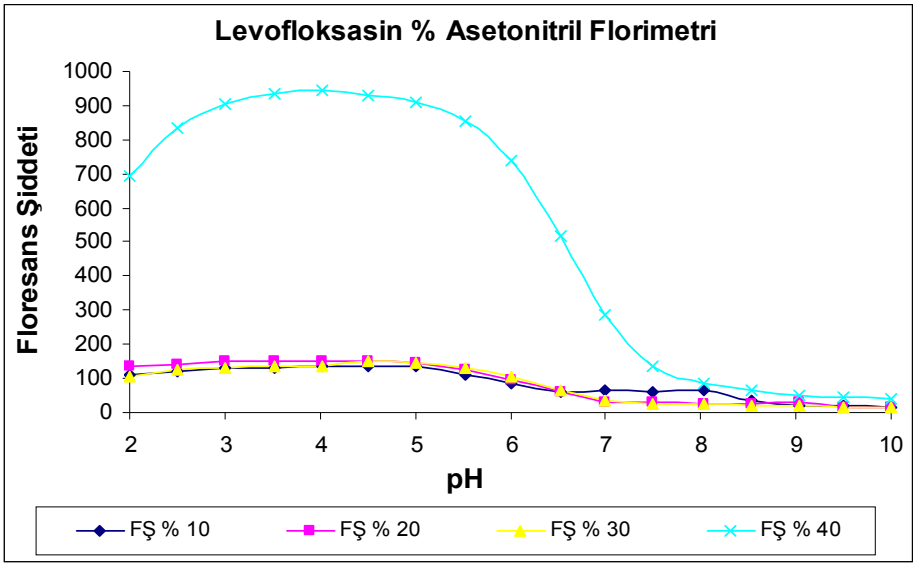
Şekil-4.51. 1.10^{-5} M Siprofloksasin % 30 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları (λekz:348,79 nm)



Şekil-4.52. 1.10^{-5} M Siprofloksasin % 40 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları (λekz:348,79 nm)



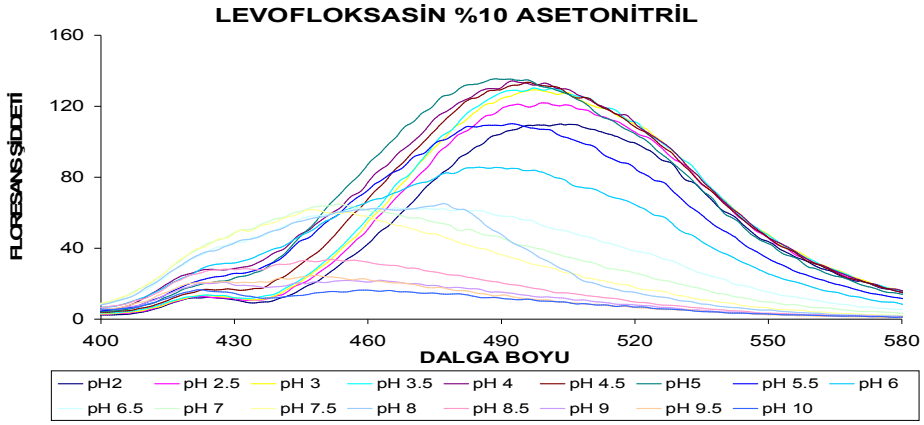
Şekil-4.53. 1.10^{-4} M Siprofloksasin -su ortamındaki pH spektrumları (λekz:352,42 nm)



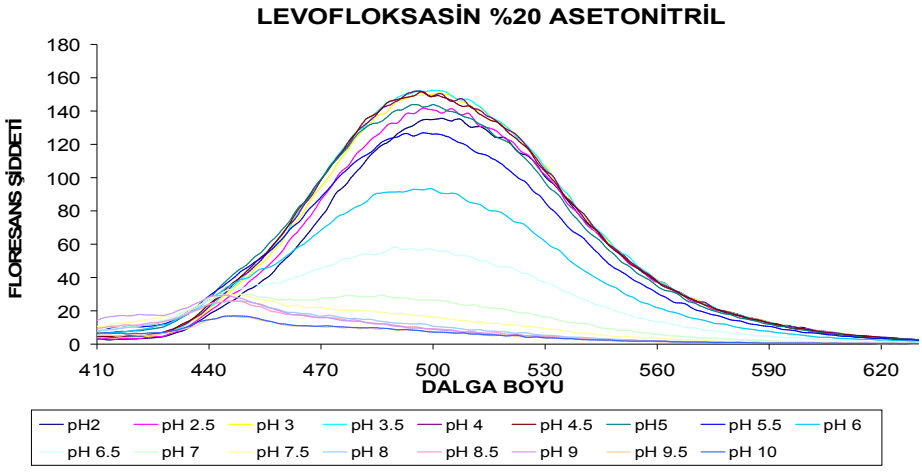
Şekil-4.54. Levofloksasinin %10-%40 pH - Floresans şiddeti grafiği

Çizelge 4.23. Levofloksasinin pH- %10-%40 Floresans şiddeti değerleri

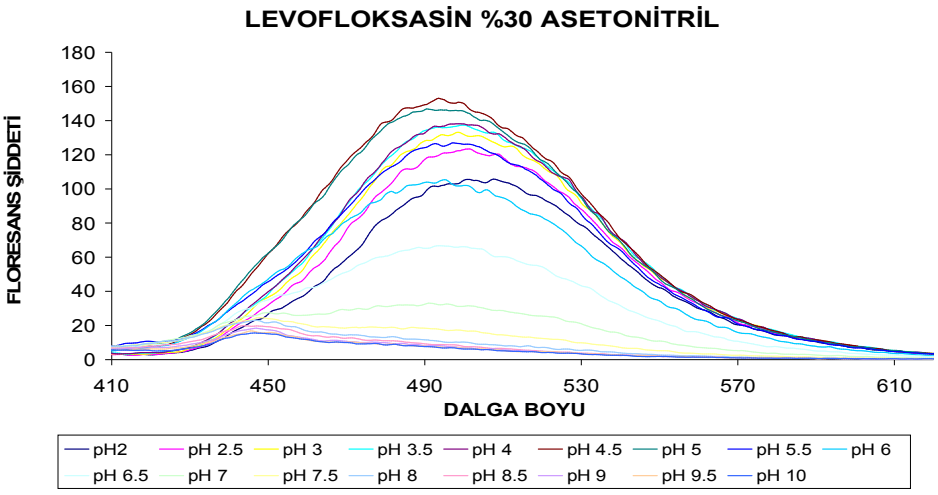
LEVOFLOKSASİN				
Ph	**FŞ % 10**	**FŞ % 20**	**FŞ % 30**	**FŞ % 40**
2,0	109,96	135,26	105,53	694,65
2,5	121,92	141,63	123,37	833,45
3,0	130,15	150,85	133,00	905,01
3,5	130,22	152,48	137,36	935,03
4,0	134,25	151,96	138,14	942,71
4,5	133,52	151,32	152,80	930,71
5,0	135,22	143,83	146,60	910,95
5,5	110,75	126,88	130,71	854,81
6,0	87,65	93,36	105,30	737,22
6,5	62,62	58,12	66,68	517,89
7,0	64,79	29,17	33,00	284,80
7,5	61,67	29,70	24,56	134,08
8,0	63,10	25,91	22,94	83,95
8,5	33,58	26,01	19,92	64,02
9,0	21,84	29,39	18,31	50,76
9,5	21,36	16,72	16,69	43,40
10,0	16,57	16,97	15,48	41,53



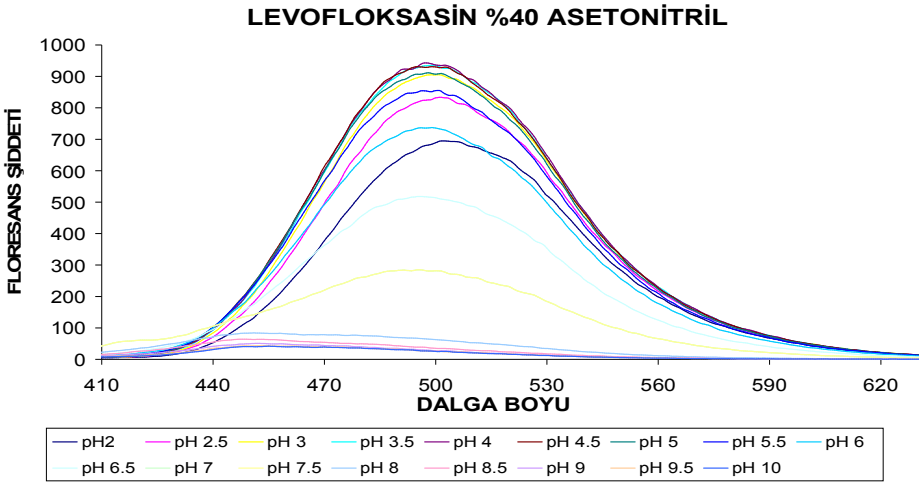
Şekil-4.55. 1.10^{-5} M Levofloksasin % 10 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları (λekz: 368,94 nm)



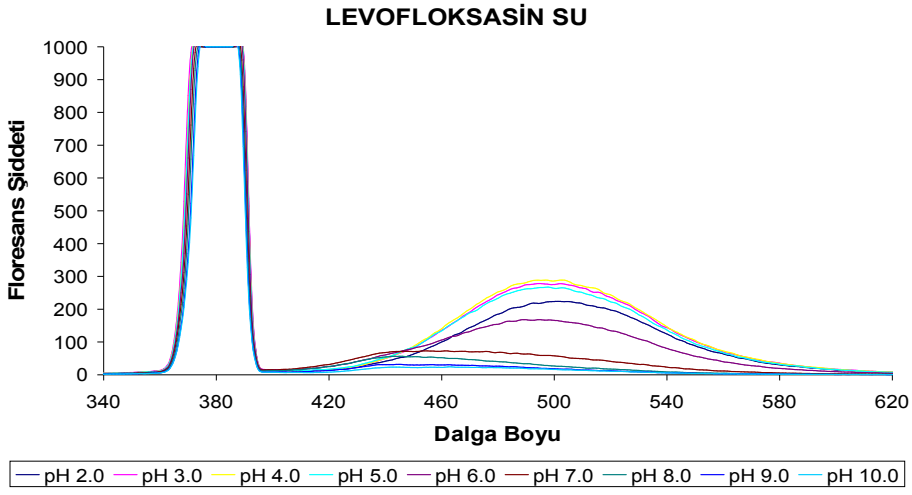
Şekil-4.56. 1.10^{-5} M Levofloksasin % 20 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları (λekz: 368,94 nm)



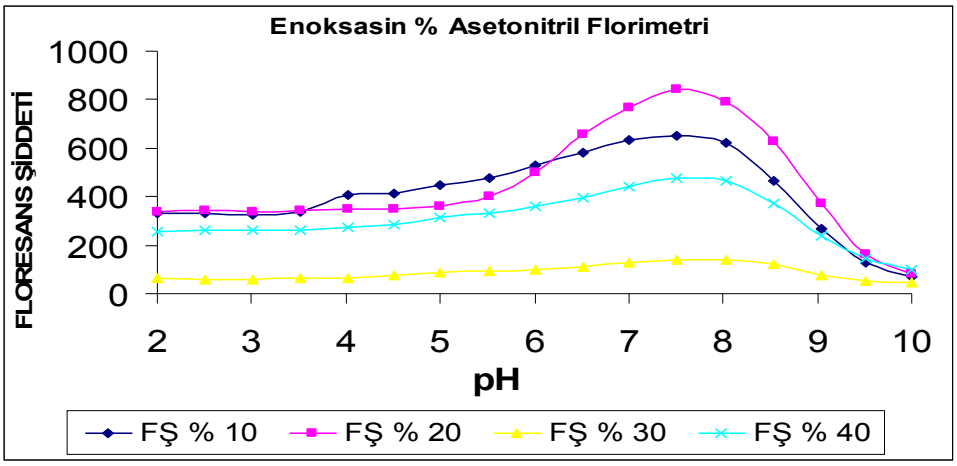
Şekil-4.57. 1.10^{-4} M Levofloksasin % 30 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları



Şekil-4.58. 1.10^{-4} M Levofloksasin % 40 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları



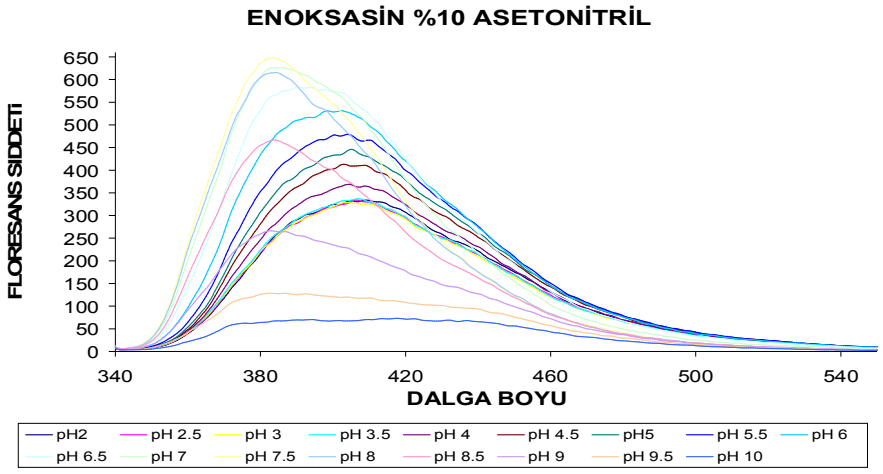
Şekil-4.59. 1.10^{-4} M Levofloksasin -su ortamındaki pH spektrumları (λekz: 381,23 nm)



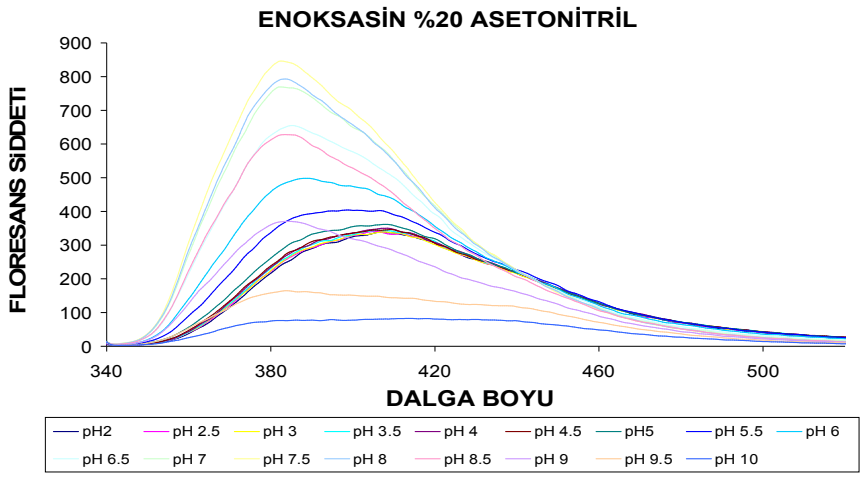
Şekil-4.60. Enofloksasinin %10-%40 pH - Floresans şiddeti grafiği

Çizelge 4.23. Enoxacinin pH- %10-%40 Floresans şiddeti değerleri

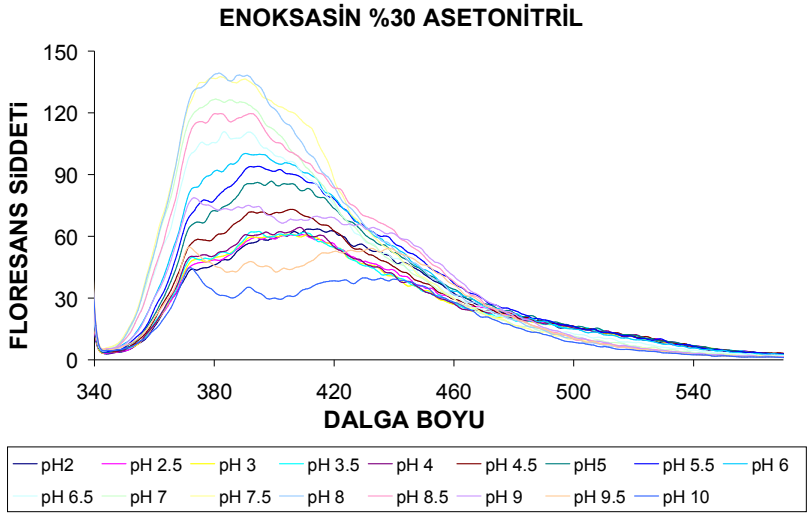
ENOKSASİN				
pH	**FŞ % 10**	**FŞ % 20**	**FŞ % 30**	**FŞ % 40**
2,0	333,79	338,65	63,51	256,62
2,5	334,00	340,72	60,71	260,17
3,0	325,72	339,20	60,94	261,32
3,5	336,72	343,92	61,86	261,62
4,0	404,19	349,81	64,26	270,61
4,5	413,01	346,23	73,04	286,89
5,0	446,11	361,60	86,64	311,75
5,5	479,04	404,02	93,98	330,36
6,0	530,19	498,08	100,19	360,56
6,5	582,57	654,46	110,63	397,53
7,0	631,16	769,17	126,54	440,37
7,5	648,42	845,88	137,42	478,66
8,0	619,38	792,86	139,13	463,27
8,5	466,92	627,86	119,66	371,23
9,0	266,53	370,46	78,48	239,30
9,5	128,32	165,00	54,71	143,36
10,0	71,21	82,66	44,54	100,60



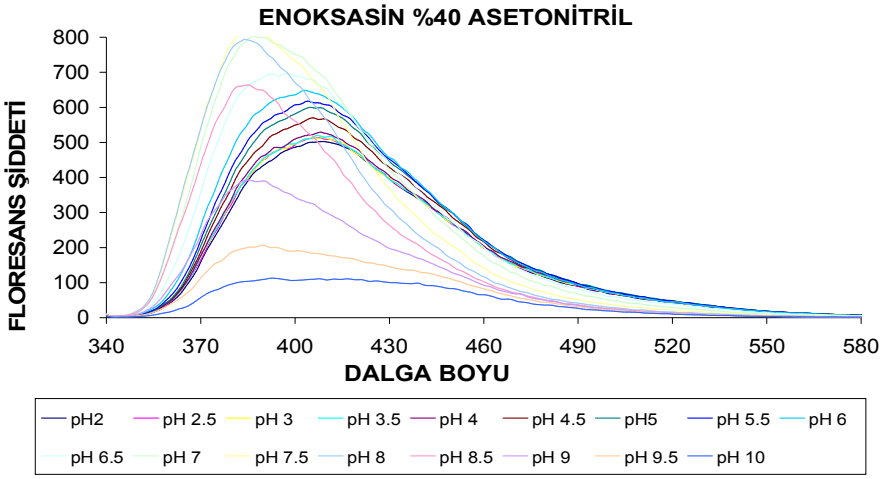
Şekil-4.61. 1.10^{-4} M Enoksasin % 10 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları (λekz: 327.78 nm)



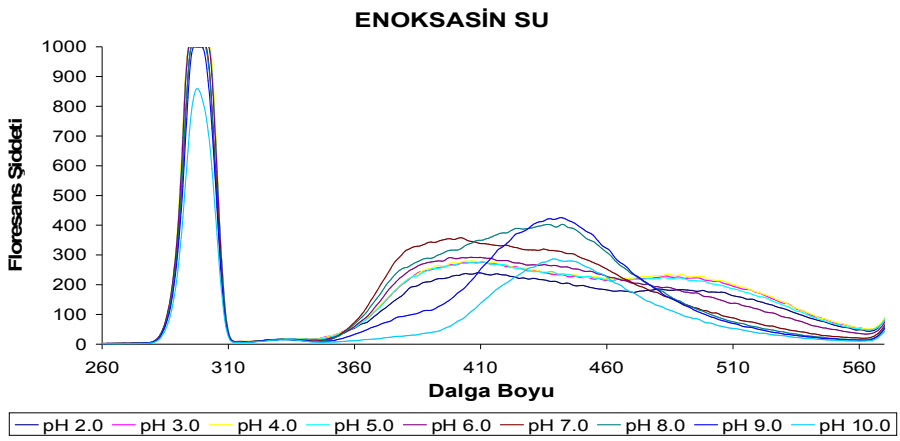
Şekil-4.62. 1.10^{-4} M Enoksasin % 20 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları (λekz: 327.78 nm)



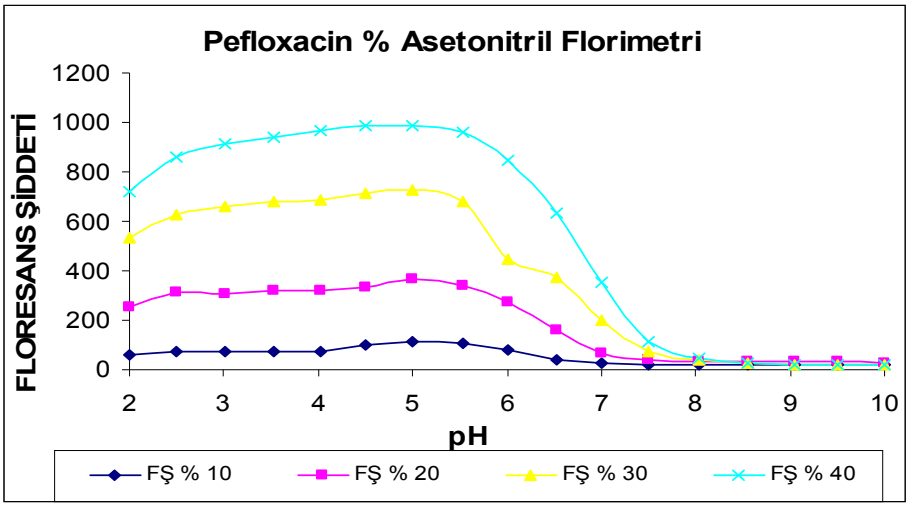
Şekil-4.63. 1.10^{-4} M Enoksasin % 30 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları (λekz: 327.78 nm)



Şekil-4.64. 1.10^{-4} M Enoksasin % 40 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları (λekz: 327.78 nm)



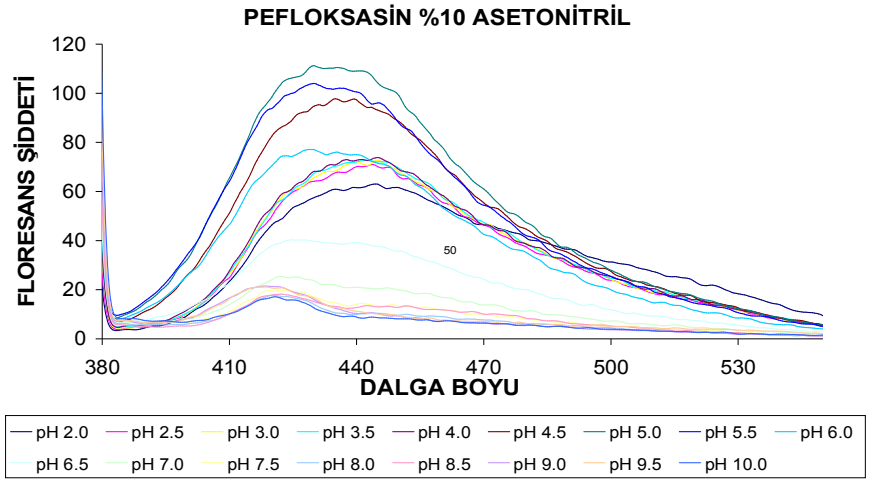
Şekil-4.65. 1.10^{-4} M Enoksasin -su ortamındaki pH spektrumları (λekz: 297,86 nm)



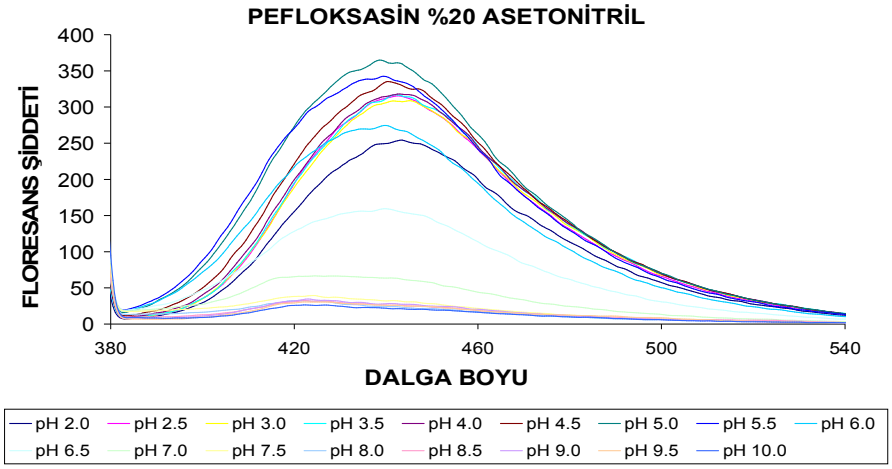
Şekil-4.66. Pefloksasinin %10-%40 pH - Floresans şiddeti grafiği

Çizelge 4.24. Pefloksasinin pH- %10-%40 Floresans şiddeti değerleri

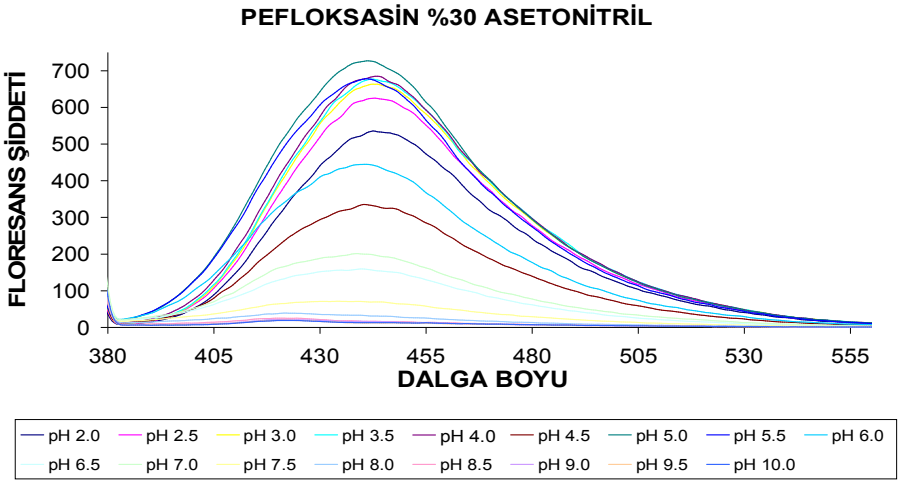
PEFLOKSASİN				
pH	**FŞ % 10**	**FŞ % 20**	**FŞ % 30**	**FŞ % 40**
2,0	63,01	254,00	535,57	722,35
2,5	70,95	315,48	624,79	863,32
3,0	72,10	308,55	663,30	911,60
3,5	72,62	316,83	677,15	939,68
4,0	73,78	317,86	684,81	966,35
4,5	97,69	334,84	716,33	988,55
5,0	110,24	364,71	726,91	990,00
5,5	103,80	342,05	678,01	957,96
6,0	77,07	274,48	444,60	849,11
6,5	40,26	159,38	371,72	633,99
7,0	25,38	66,57	201,26	350,66
7,5	19,60	39,43	71,22	114,52
8,0	17,67	32,13	39,16	46,75
8,5	18,20	32,35	25,40	28,04
9,0	21,47	34,53	21,51	21,92
9,5	21,07	30,50	19,46	20,36
10,0	17,12	26,39	19,15	19,46



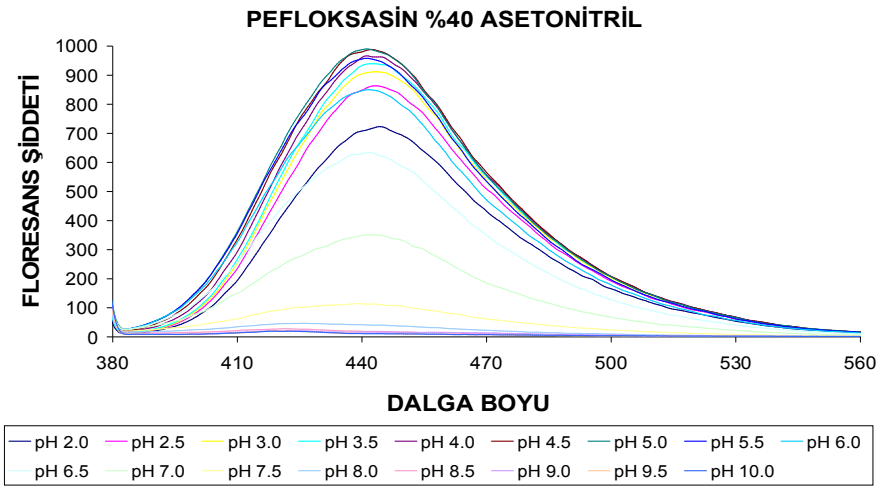
Şekil-4.67. 1.10^{-5}M Pefloksasin % 10 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları (λekz: 367,68 nm)



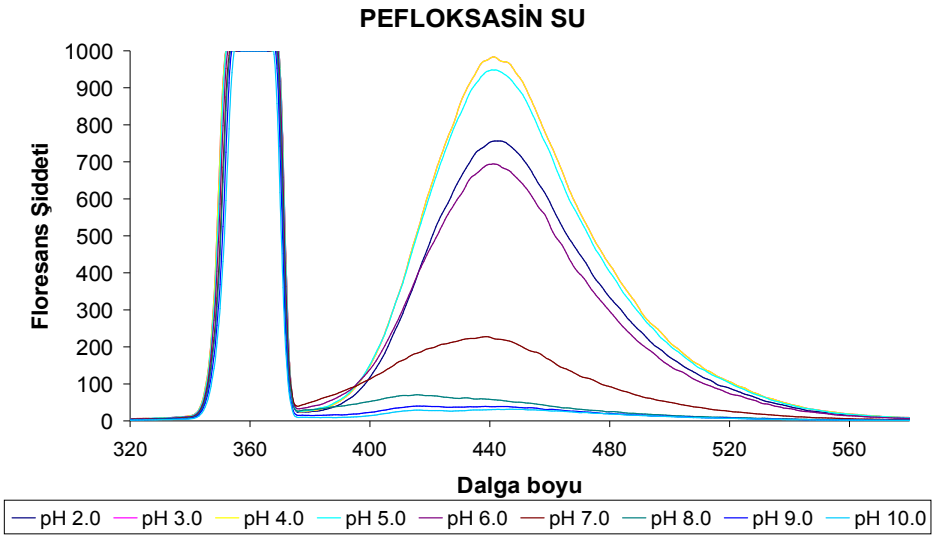
Şekil-4.68. 1.10^{-4} M Pefloksasin % 20 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları (λekz: 367,68 nm)



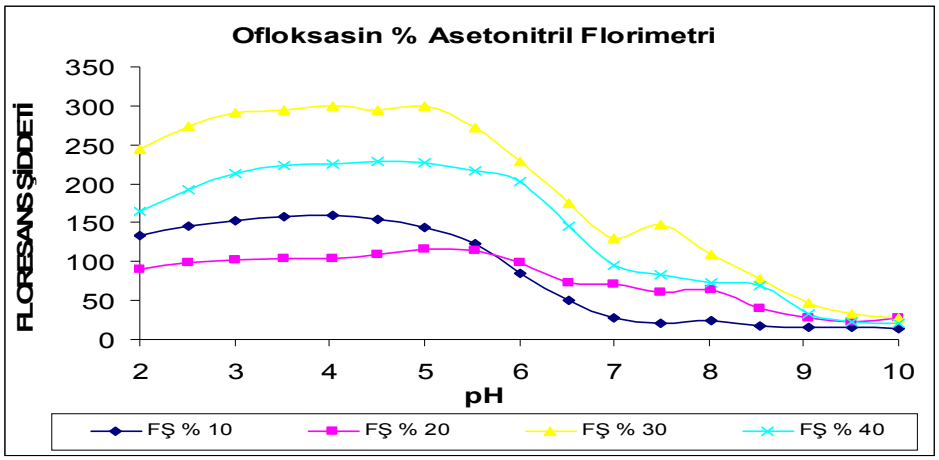
Şekil-4.69. 1.10^{-4} M Pefloksasin % 30 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları (λekz: 367,68 nm)



Şekil-4.70. 1.10^{-4} M Pefloksasin % 40 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları (λekz: 367,68 nm)



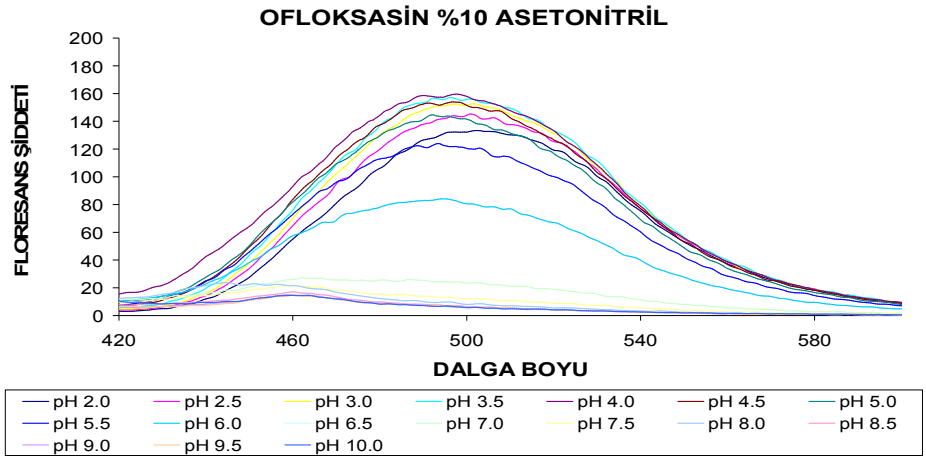
Şekil-4.71. 1.10^{-4} M Pefloksasin -su ortamındaki pH spektrumları (λekz: 297,86 nm)



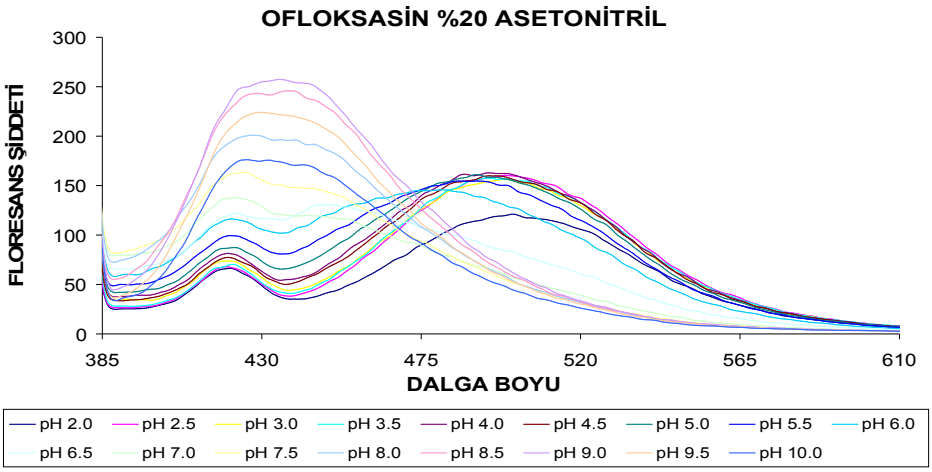
Şekil-4.72. Ofloksasinin %10-%40 pH - Floresans şiddeti grafiği

Çizelge 4.25. Ofloksasinin pH- %10-%40 Floresans şiddeti değerleri

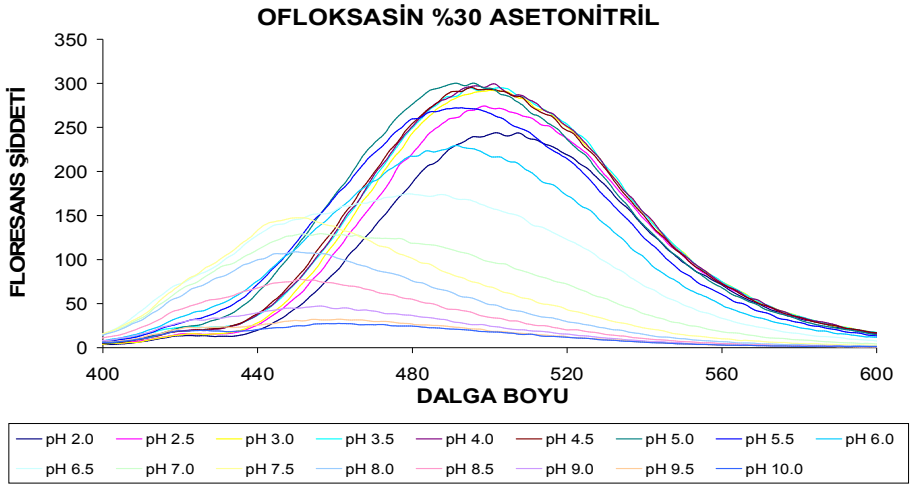
OFLOKSASİN				
pH	**FŞ % 10**	**FŞ % 20**	**FŞ % 30**	**FŞ % 40**
2,0	133,38	89,35	243,60	164,31
2,5	145,10	98,88	274,09	193,11
3,0	152,30	102,06	291,16	212,98
3,5	157,04	104,06	295,00	222,77
4,0	159,61	103,63	299,26	226,05
4,5	153,82	108,91	295,27	228,11
5,0	144,34	115,73	299,95	226,50
5,5	123,54	113,58	272,10	217,38
6,0	84,12	99,23	229,27	203,24
6,5	50,90	73,38	174,48	145,22
7,0	27,13	70,21	129,32	95,29
7,5	21,57	59,98	147,35	82,78
8,0	23,64	63,79	108,69	72,90
8,5	16,97	40,04	77,55	68,85
9,0	14,92	27,66	47,17	32,63
9,5	14,82	22,42	32,23	22,74
10,0	14,52	27,30	27,44	20,93



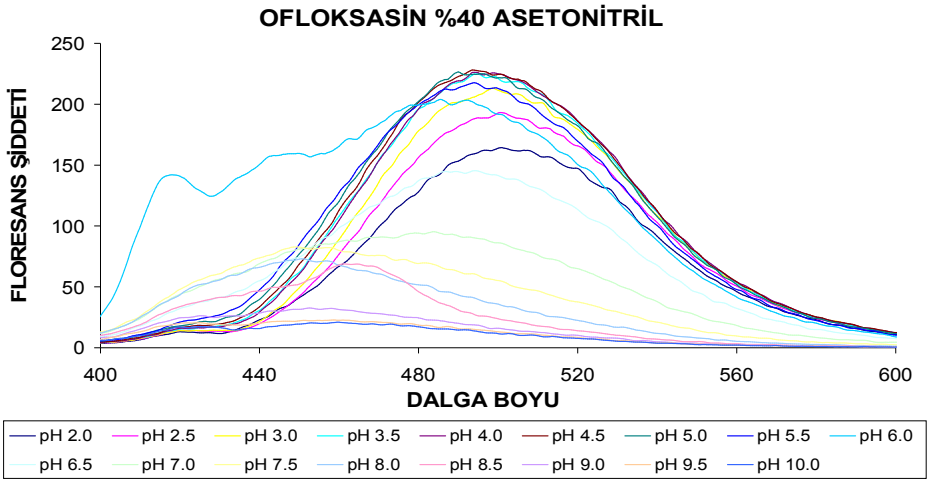
Şekil-4.73. 1.10^{-4} M Ofloksasin % 10 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları (λekz: 399,15 nm)



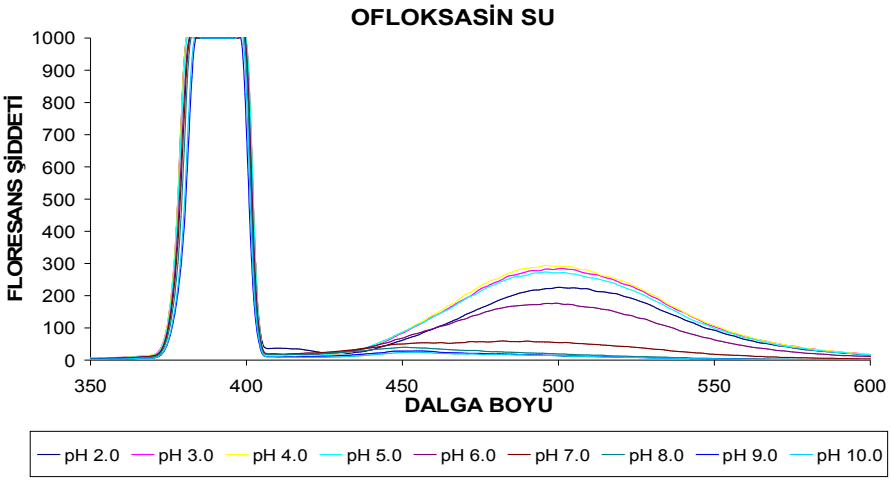
Şekil-4.74. 1.10^{-5} M Ofloksasin % 20 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları (λekz: 399,15 nm)



Şekil-4.75. 1.10^{-4} M Ofloksasinin % 30 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları



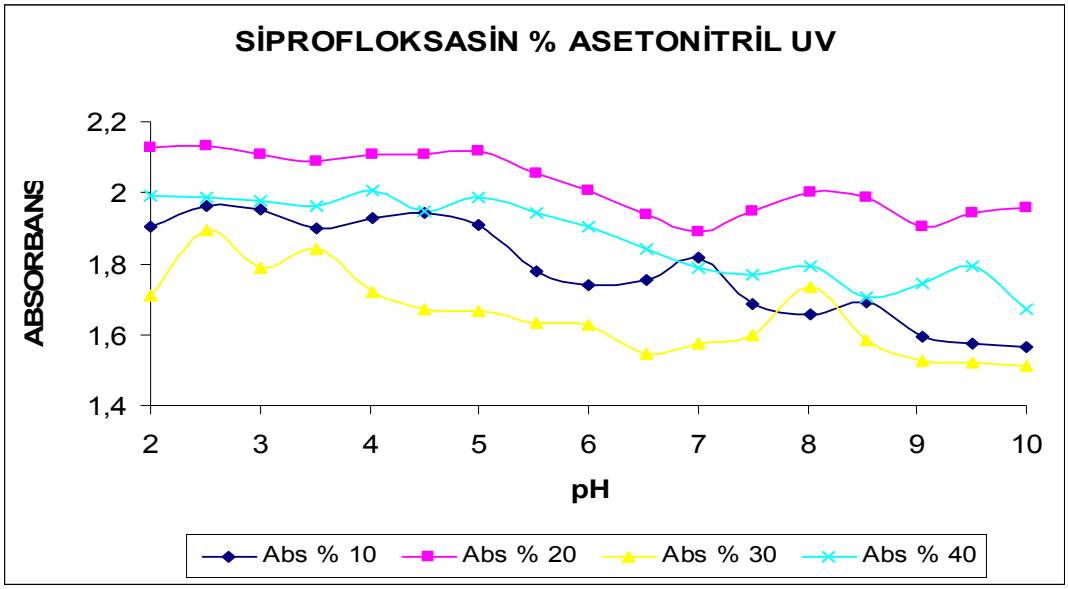
Şekil-4.76. 1.10^{-4} M Ofloksasinin % 40 asetonitril-su ortamındaki pH spektrumları



Şekil-4.77. 1.10^{-4} M Ofloksasinin su ortamındaki pH spektrumları (λekz: 390,83 nm)

4.3.2. Spektrofotometrik yöntemle iyonlaşma sabitlerinin tayini

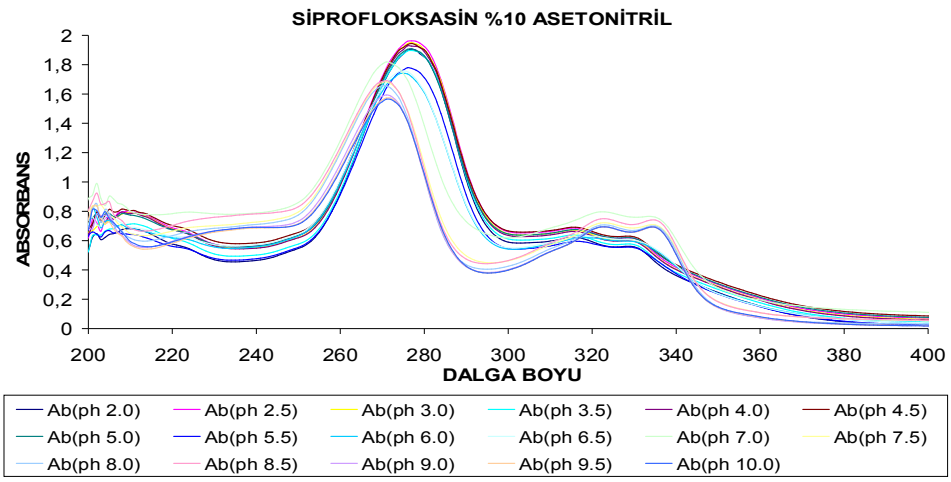
Flrorokinolonların 5.10^{-4}M konsantrasyonda %10-40 asetonitril sulu karışımlarında, pH 2-10 arasında her bir titrasyon çözeltisinin absorbans değerleri ölçülerek pH-absorbans grafikleri çizilmiş ve bu grafiklerden her birinin pKa değerleri belirlenmiştir. Aynı zamanda dalgaboyu ve absorbans değerlerinden pKa değerlerini hesaplayan STAR programıyla da çizilen grafiklerden florokinolonların asetonitril-su karışımlarında pKa değerleri hesaplanmıştır.



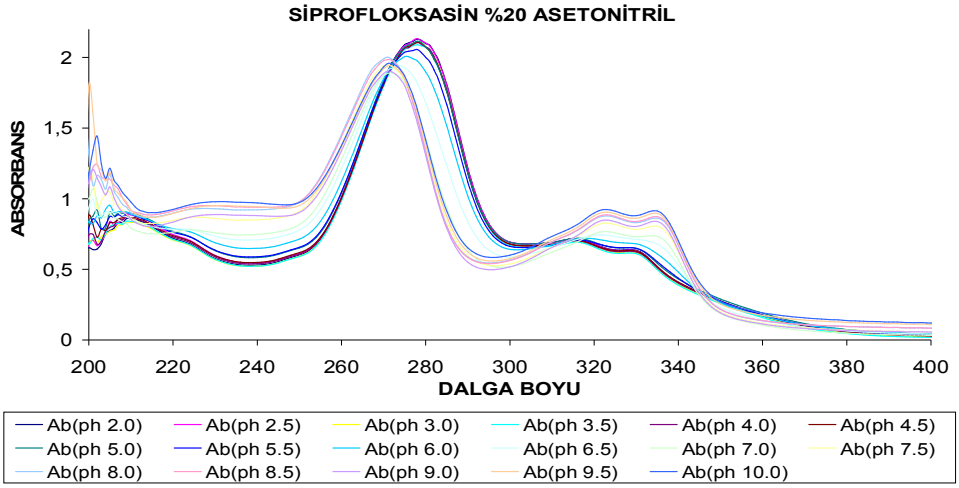
Şekil-4.78. 5.10^{-4} M Siprofloksasinin %10-%40 pH - Absorbans grafiği

Çizelge 4.26. Siprofloksasinin pH- %10-%40 Absorbans değerleri

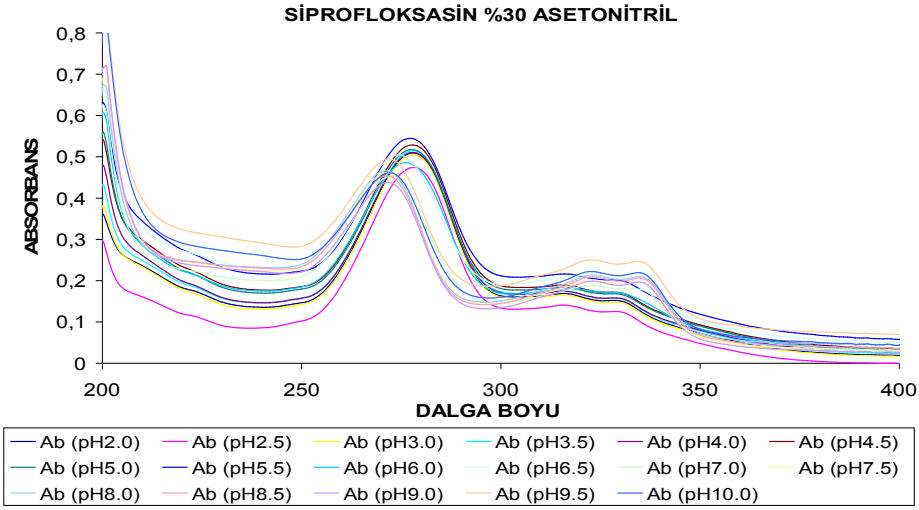
SİPROFLOKSASİN				
pH	**Abs % 10**	**Abs % 20**	**Abs % 30**	**Abs % 40**
2,0	1,90600	2,12910	1,71220	0,16036
2,5	1,96260	2,13410	1,89350	0,17229
3,0	1,95100	2,11020	1,78800	0,39527
3,5	1,89700	2,09070	1,84170	0,37772
4,0	1,92640	2,10980	1,72210	0,12296
4,5	1,94400	2,10560	1,67390	0,26266
5,0	1,90780	2,11530	1,66480	0,16126
5,5	1,77960	2,05660	1,63120	0,14015
6,0	1,74040	2,00570	1,62580	0,23516
6,5	1,75630	1,94040	1,54550	0,22739
7,0	1,81830	1,89020	1,57350	0,26280
7,5	1,68440	1,94930	1,59830	0,13430
8,0	1,65640	2,00240	1,73300	0,15918
8,5	1,69100	1,98560	1,58510	0,54712
9,0	1,59360	1,90510	1,52770	0,21586
9,5	1,57260	1,94110	1,52080	0,17729
10,0	1,56420	1,95730	1,51110	0,16891



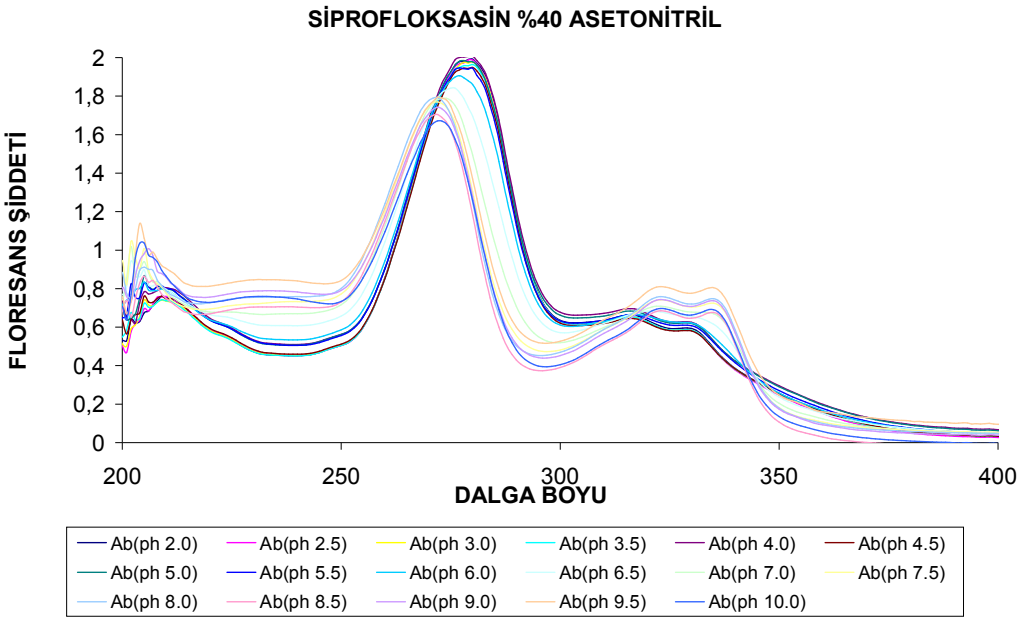
Şekil-4.79. Siprofloksasin % 10 asetonitril-su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



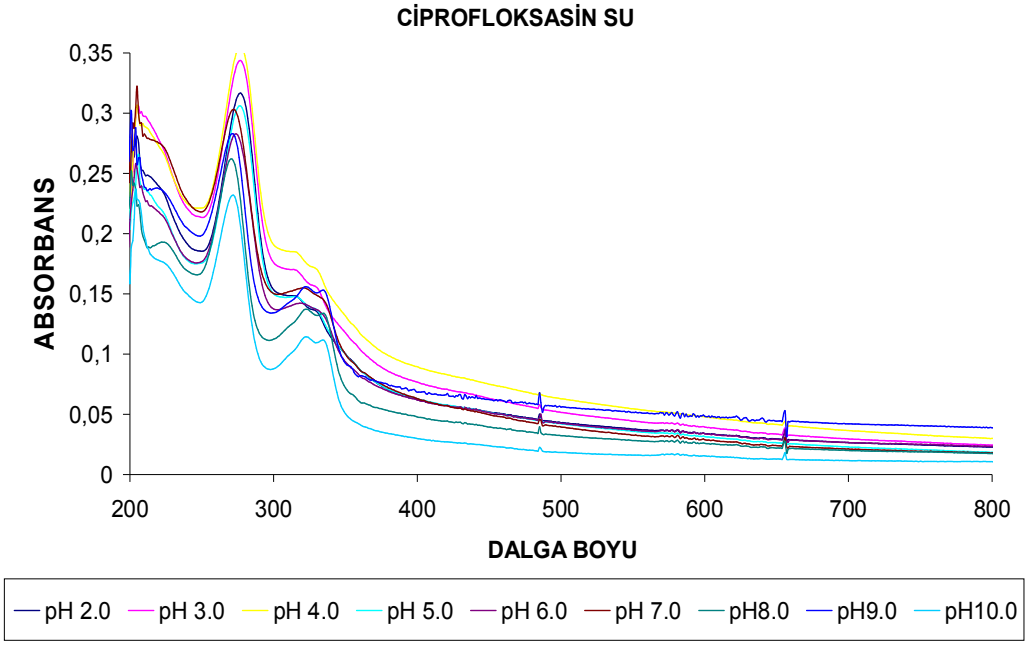
Şekil-4.80 Siprofloksasin % 20 asetonitril-su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



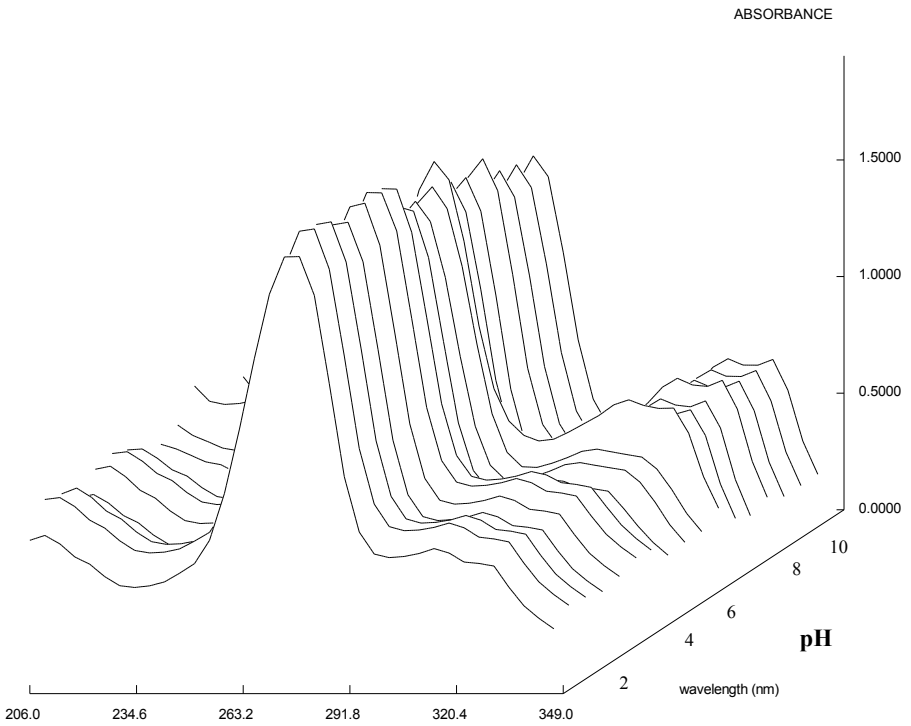
Şekil-4.81. Siprofloksasin % 30 asetonitril-su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



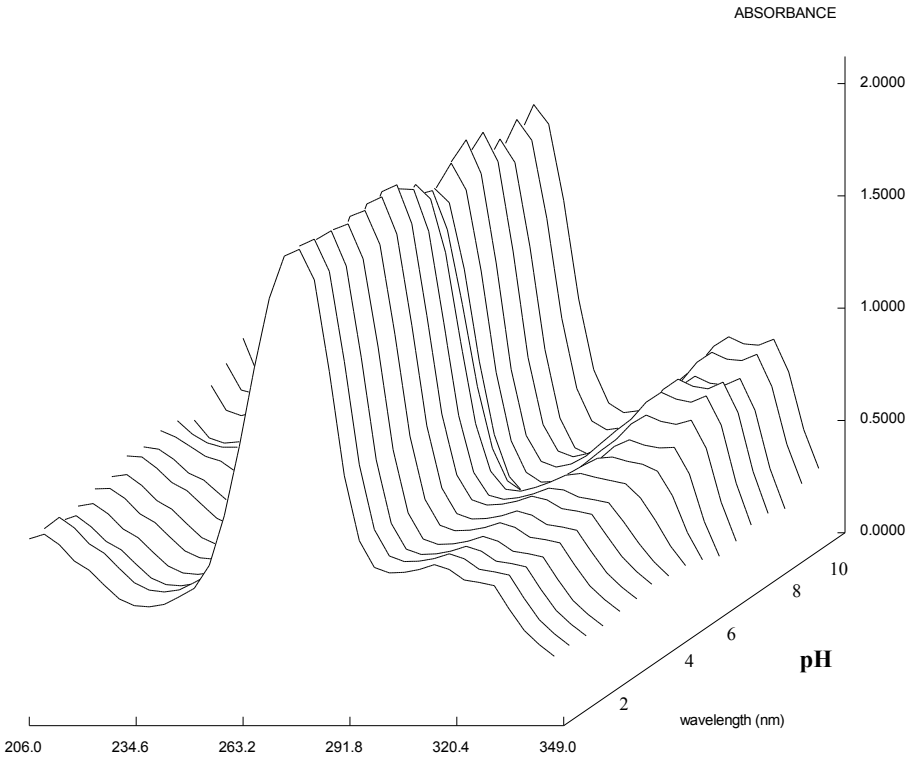
Şekil-4.82. Siprofloksasin % 40 asetonitril-su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



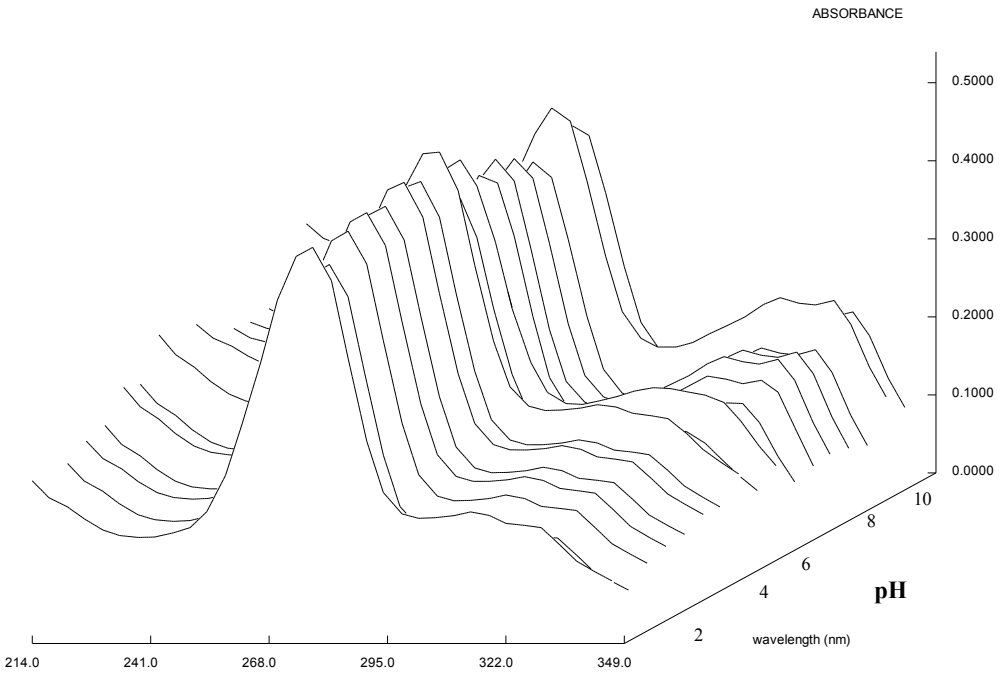
Şekil-4.83. 10^{-4} M Siprofloksasin su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



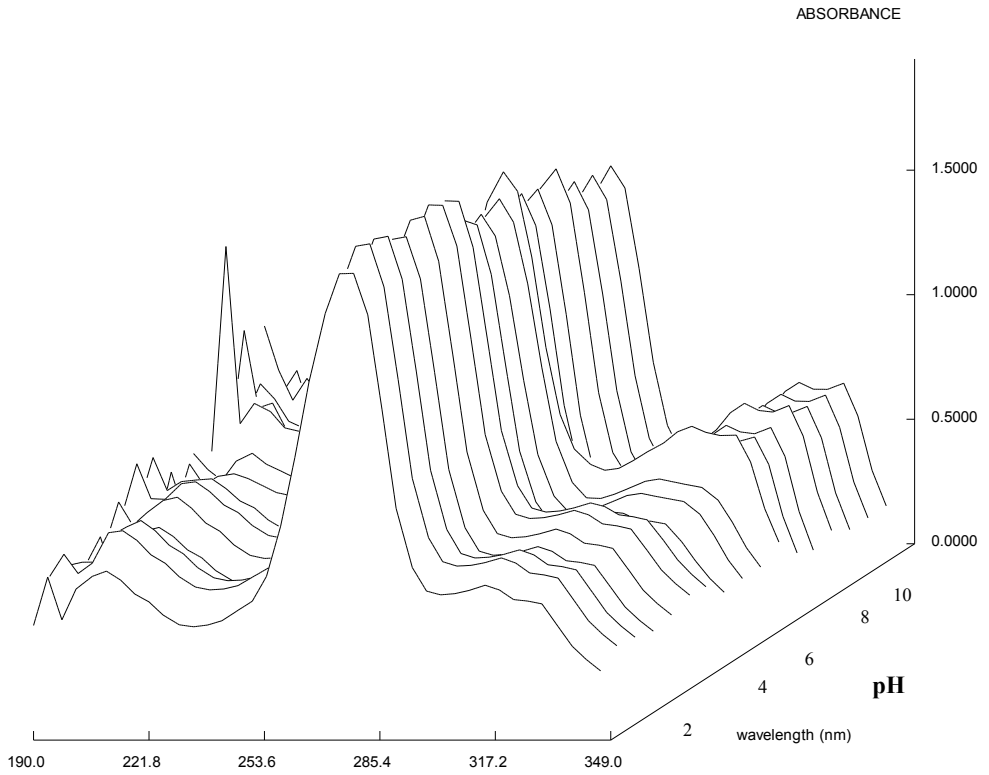
Şekil-4.84. Siprofloksasinin %10 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği



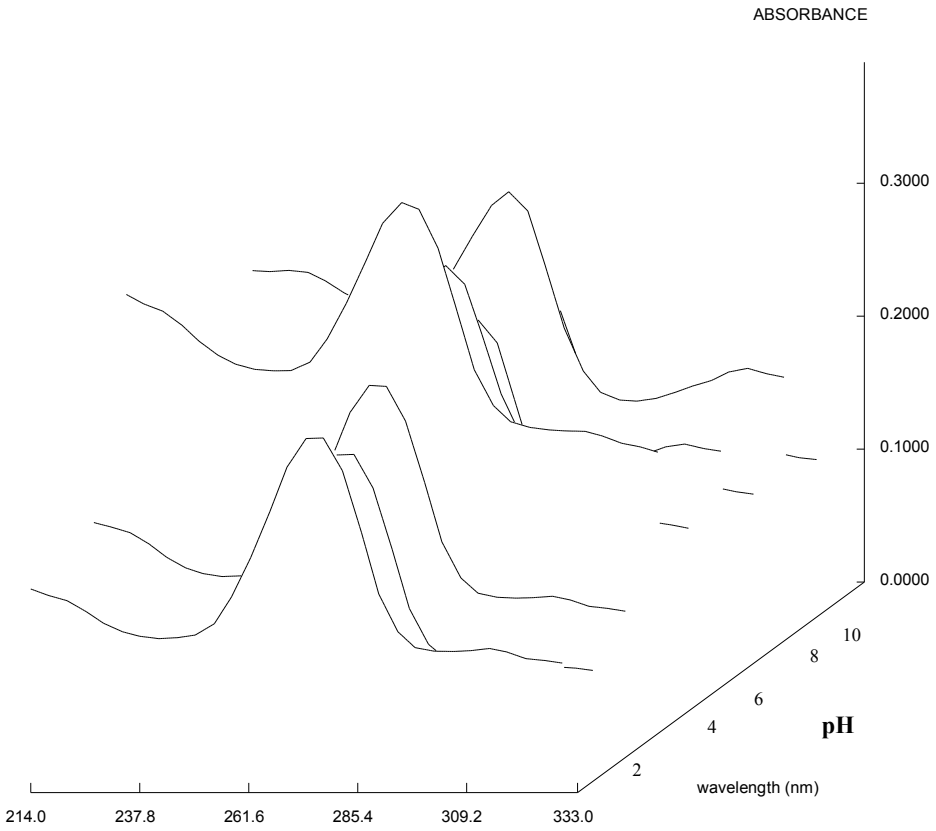
Şekil-4.85. Siprofloksasinin %20 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği



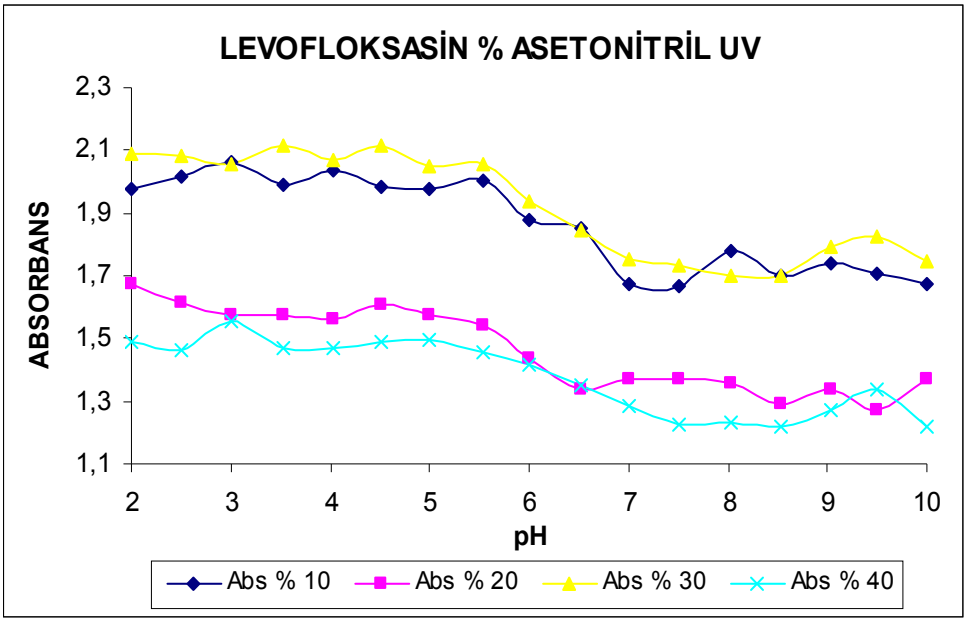
Şekil-4.86. Siprofloksasinin %30 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği



Şekil-4.87. Siprofloksasinin %40 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği



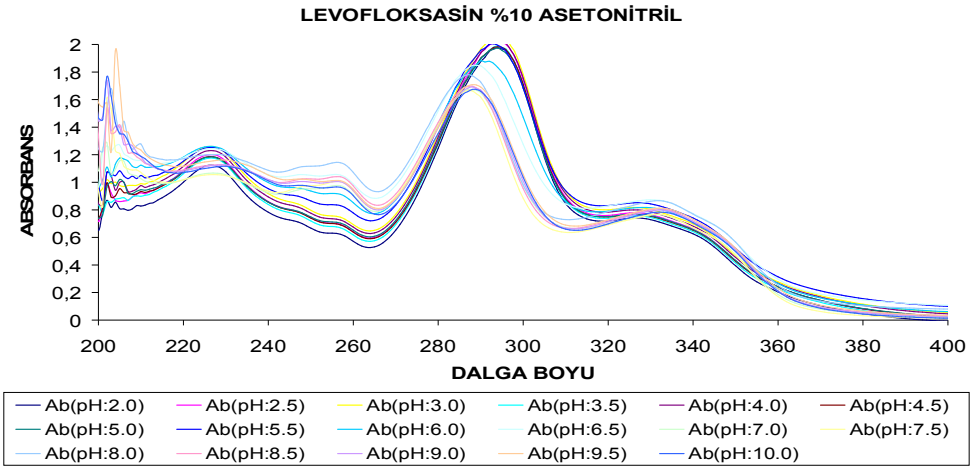
Şekil-4.88. Siprofloksasinin su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği



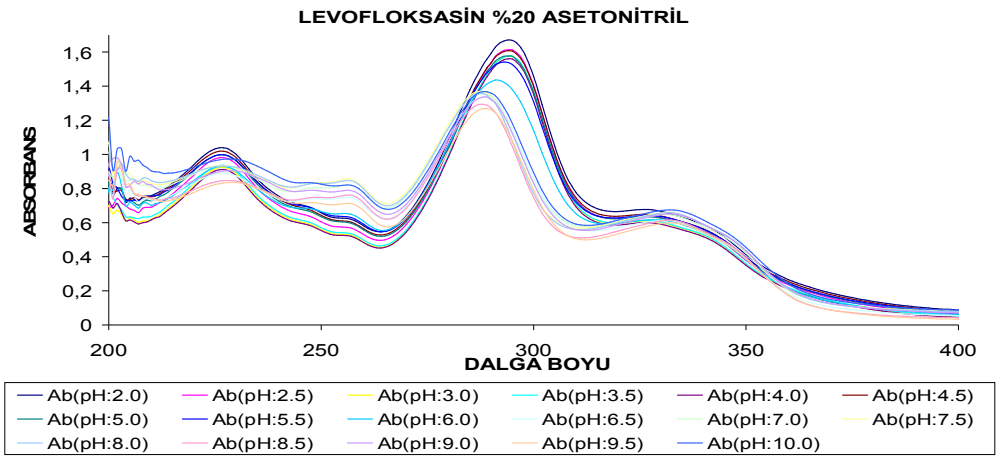
Şekil-4.89. 5.10^{-4} M Levofloksasinin %10-%40 pH - Absorbans grafiği

Çizelge 4.27. Levofloksasinin pH- %10-%40 Absorbans değerleri

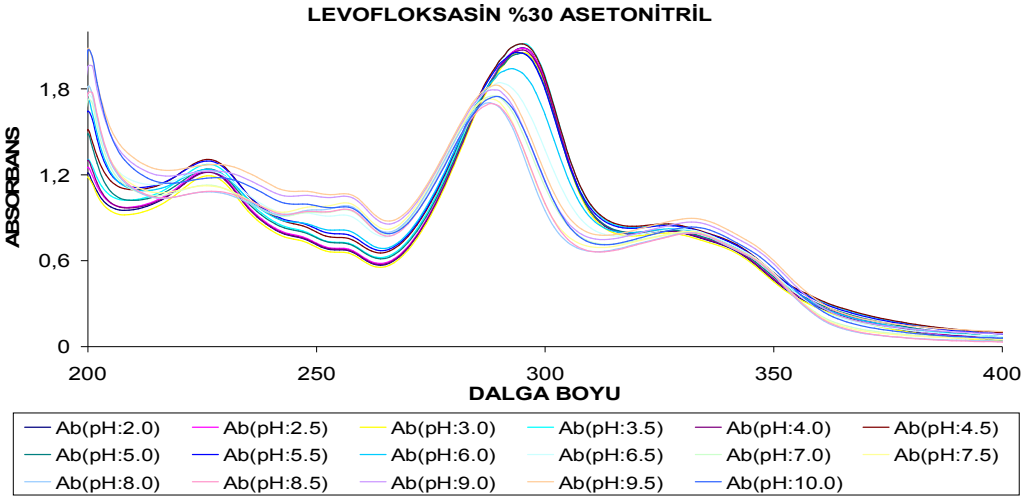
LEVOFLOKSASİN				
pH	**Abs % 10**	**Abs % 20**	**Abs % 30**	**Abs % 40**
2,0	1,97530	1,67100	2,08700	1,48900
2,5	2,01960	1,61400	2,08340	1,46510
3,0	2,06410	1,57610	2,05320	1,55390
3,5	1,99010	1,57740	2,11470	1,46710
4,0	2,03460	1,56030	2,07150	1,47240
4,5	1,98250	1,60780	2,11380	1,48880
5,0	1,97380	1,57640	2,04890	1,49800
5,5	2,00490	1,54130	2,05380	1,45360
6,0	1,87820	1,43590	1,94060	1,41770
6,5	1,84840	1,33940	1,84370	1,34980
7,0	1,67230	1,36770	1,75090	1,28490
7,5	1,66390	1,36760	1,73080	1,22250
8,0	1,78060	1,35500	1,70250	1,23440
8,5	1,69680	1,29360	1,69710	1,22080
9,0	1,74050	1,33540	1,79260	1,27000
9,5	1,70850	1,26860	1,82560	1,34020
10,0	1,67340	1,36760	1,74590	1,21690



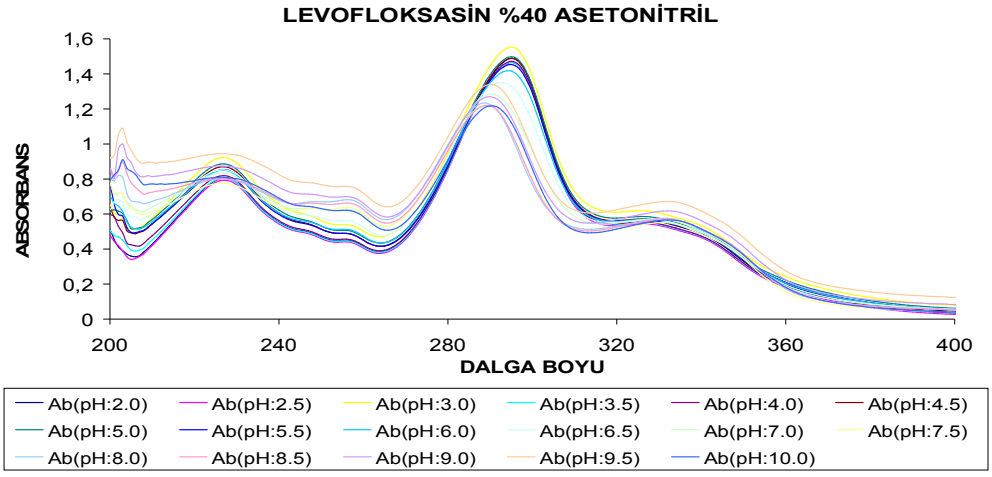
Şekil-4.90. Levofloksasin % 10 asetonitril-su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



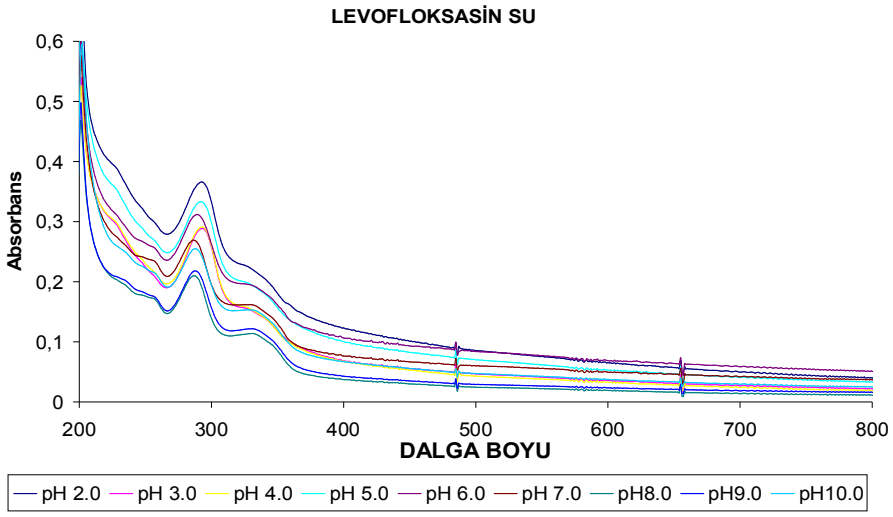
Şekil-4.91. Levofloksasin % 20 asetonitril-su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



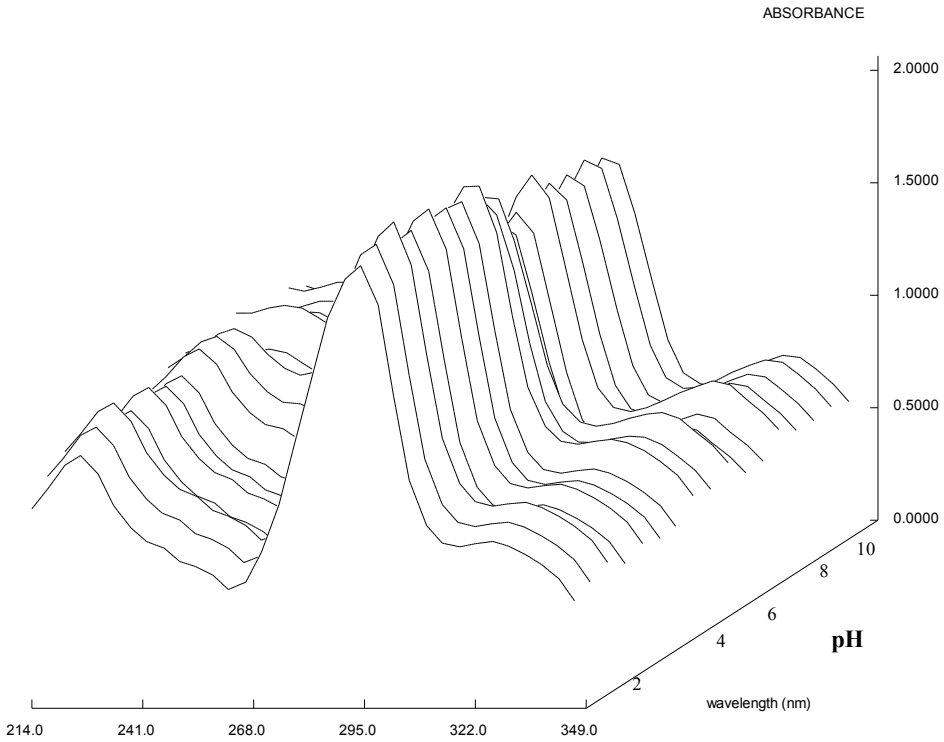
Şekil-4.92. Levofloksasin % 30 asetonitril-su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



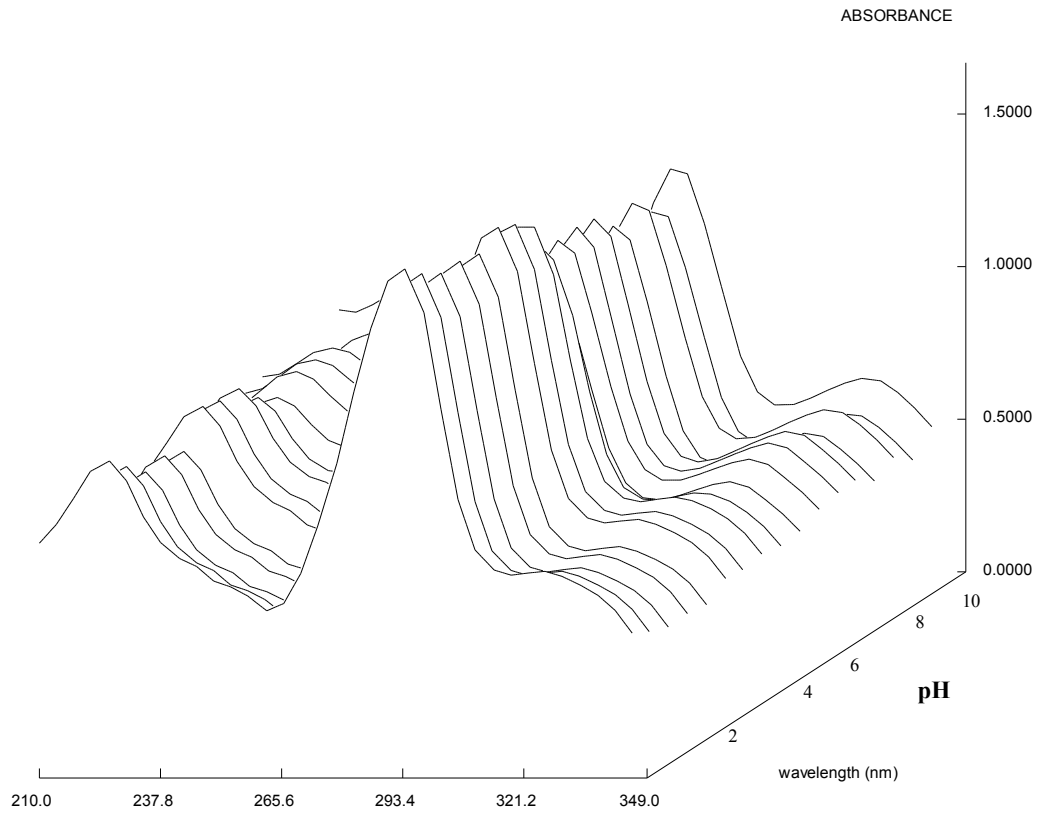
Şekil-4.93. Levofloksasin % 40 asetonitril-su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



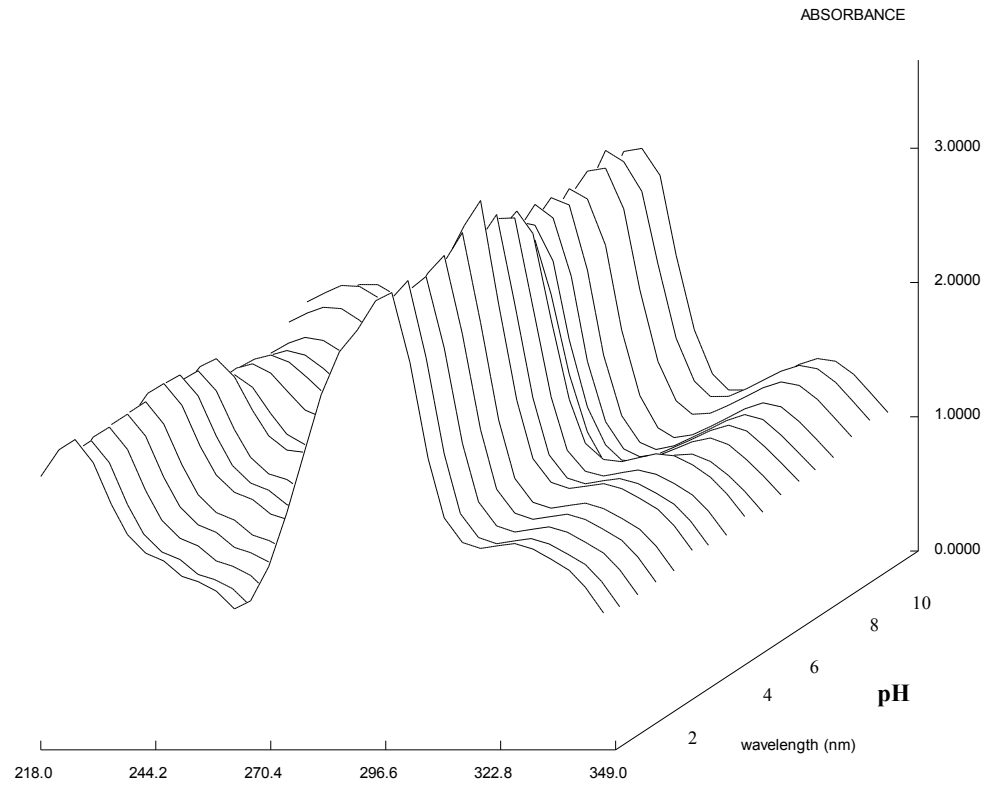
Şekil-4.94. 1.10^{-4} M Levofloksasin % 40 asetonitril-su ortamında spektrofotometredeki pH spektrumları



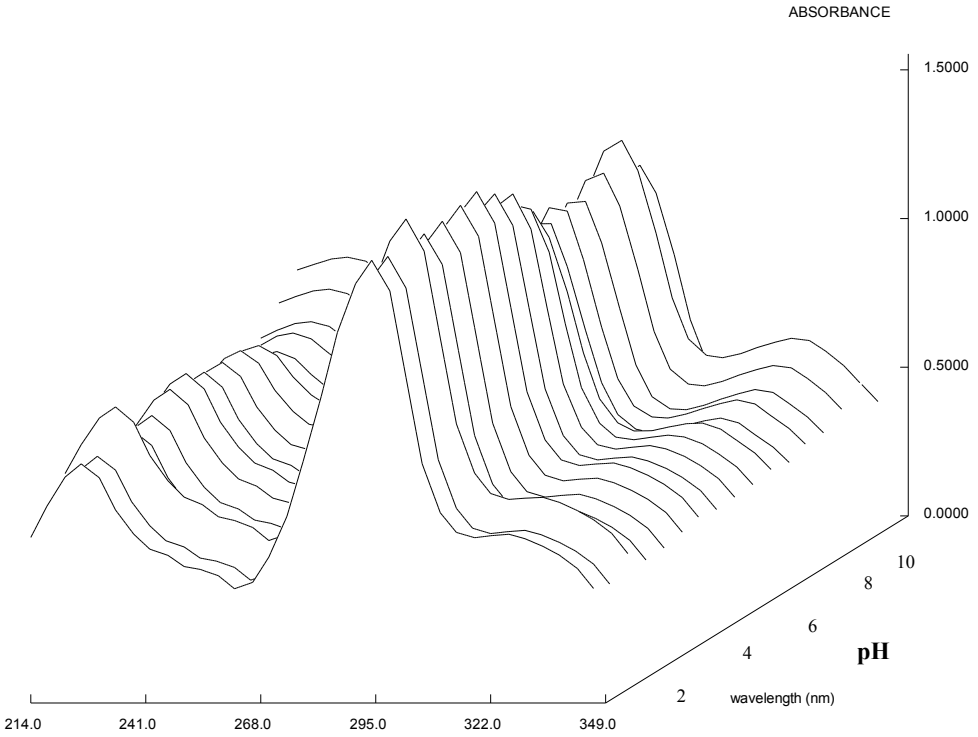
Şekil-4.95. Levofloksasinin %10 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği



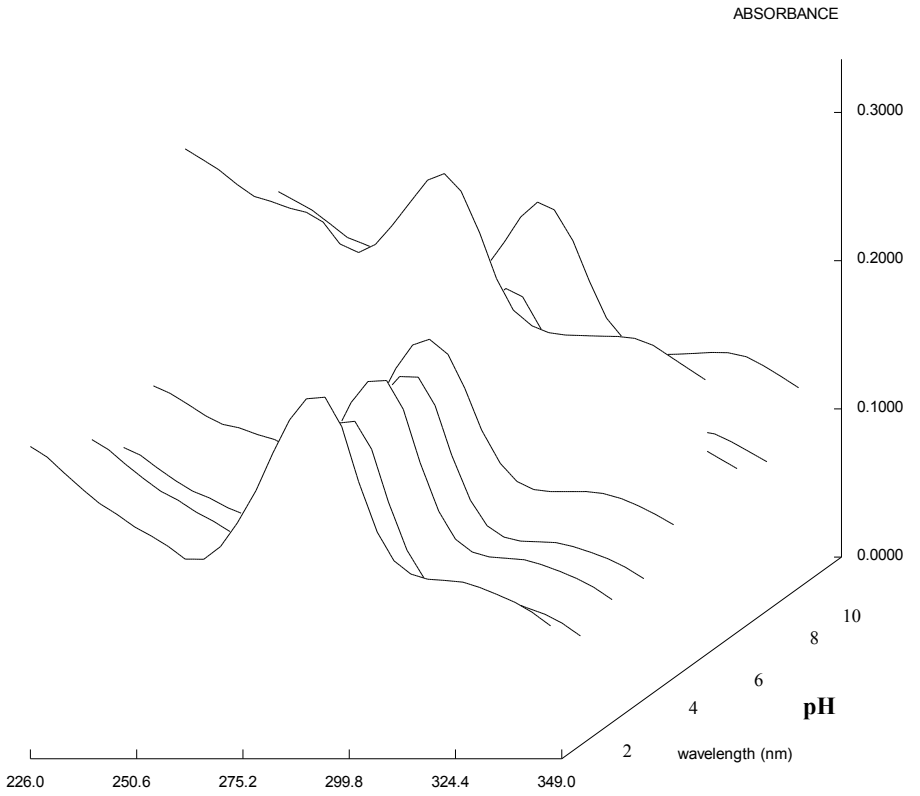
Şekil-4.96. Levofloksasinin %20 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği



Şekil-4.97. Levofloksasinin %30 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği



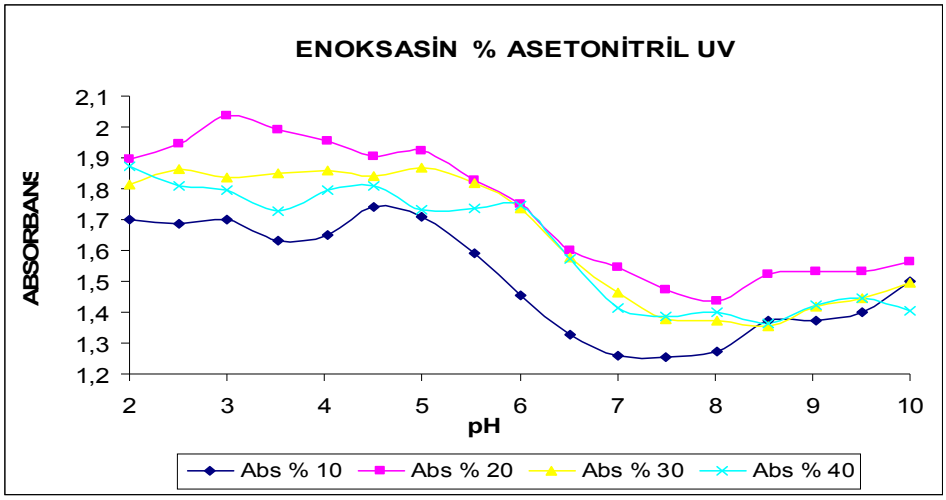
Şekil-4.98. Levofloksasinin %40 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği



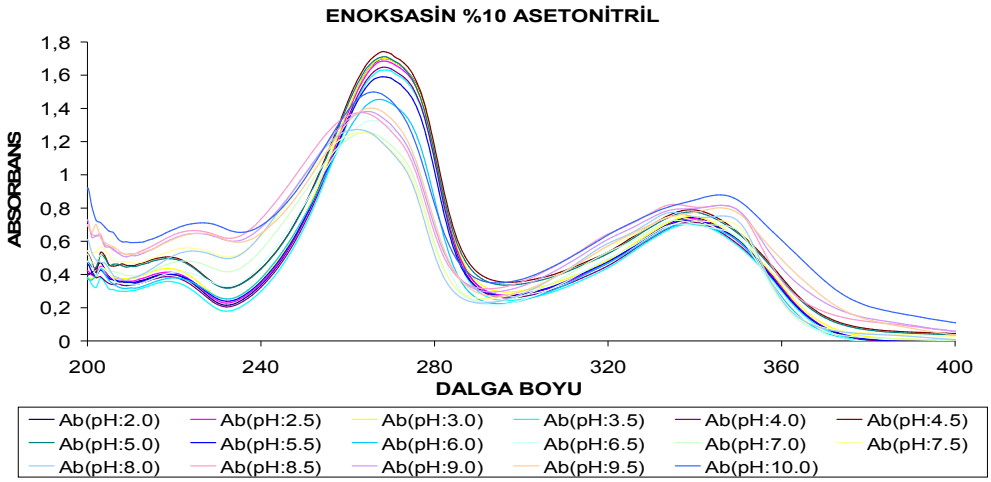
Şekil-4.99. Levofloksasinin su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği

Çizelge 4.28. Enoxacinin pH- %10-%40 Absorbans değerleri

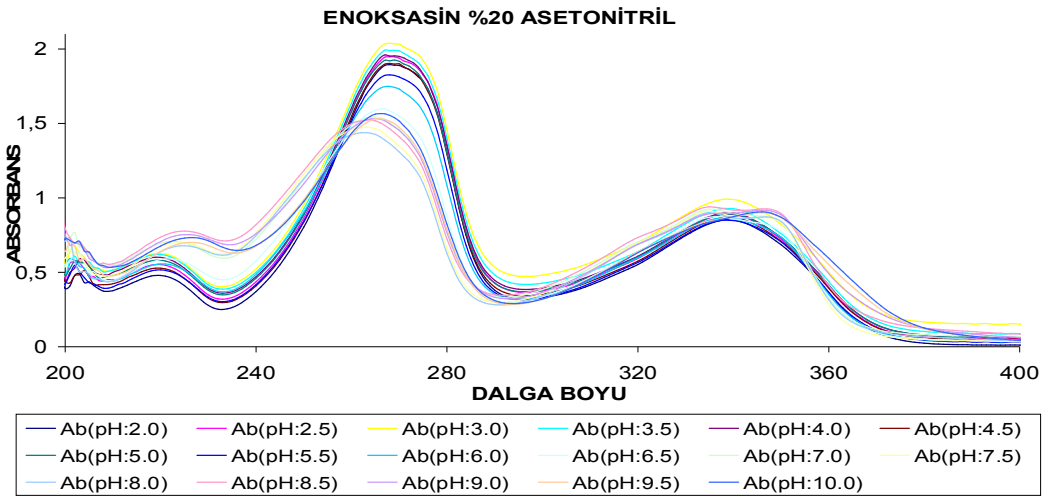
ENOKSASİN				
pH	**Abs % 10**	**Abs % 20**	**Abs % 30**	**Abs % 40**
2,0	1,69960	1,89450	1,81520	1,87400
2,5	1,68480	1,94710	1,86300	1,80890
3,0	1,70100	2,03820	1,83570	1,79540
3,5	1,63040	1,99080	1,85160	1,72530
4,0	1,64780	1,95380	1,85710	1,79500
4,5	1,74220	1,90260	1,84100	1,80910
5,0	1,71020	1,92490	1,86990	1,73320
5,5	1,59050	1,82530	1,81970	1,73600
6,0	1,45330	1,74820	1,73750	1,74750
6,5	1,32670	1,59790	1,57810	1,57070
7,0	1,25740	1,54380	1,46310	1,41330
7,5	1,25480	1,47480	1,37880	1,38860
8,0	1,27270	1,43850	1,37370	1,40220
8,5	1,37490	1,52360	1,35420	1,36240
9,0	1,37140	1,53290	1,41750	1,42290
9,5	1,40130	1,53140	1,44580	1,44680
10,0	1,49960	1,56590	1,49740	1,40550



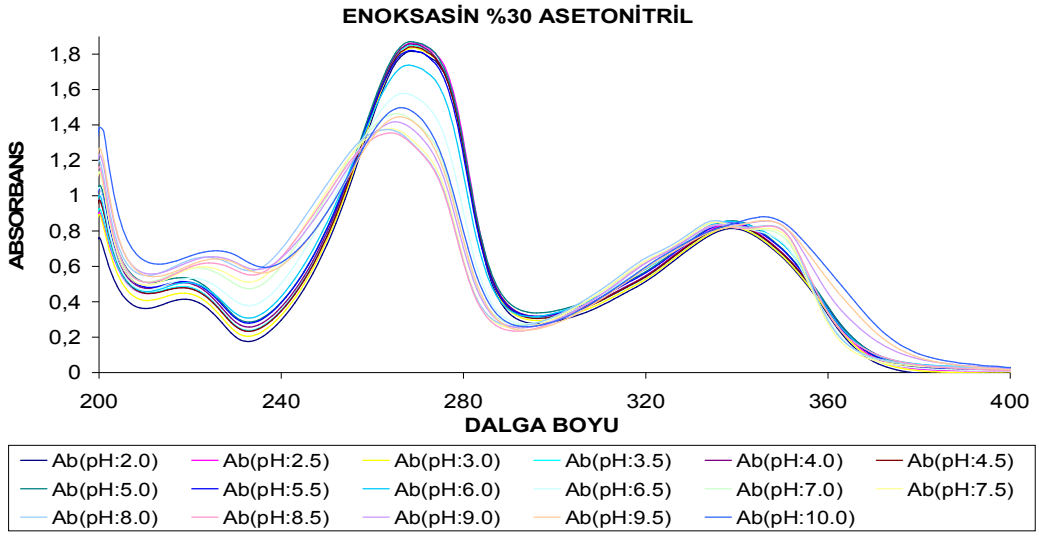
Şekil-4.100. 5.10^{-4} M Enoksasinin %10-%40 pH - Absorbans grafiği



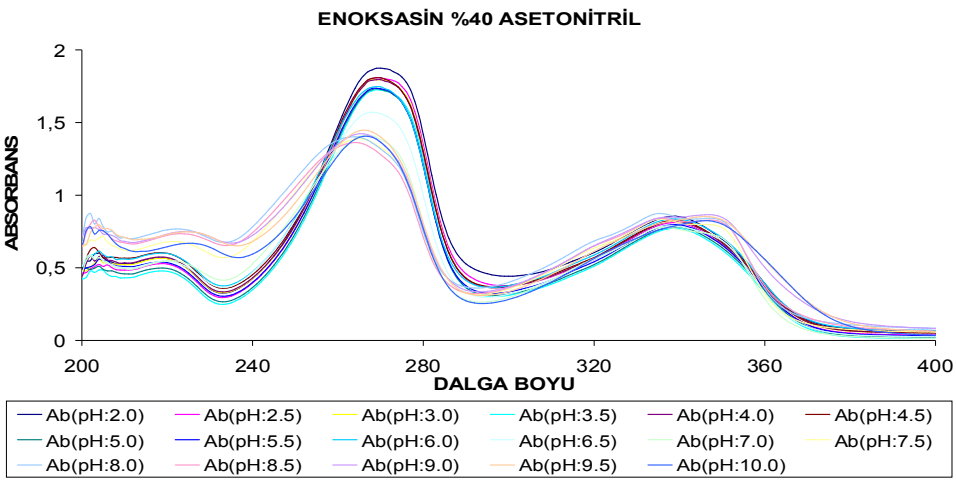
Şekil-4.101. Enoksasin % 10 asetonitril-su ortamında spektrofotometredeki pH spektrumları



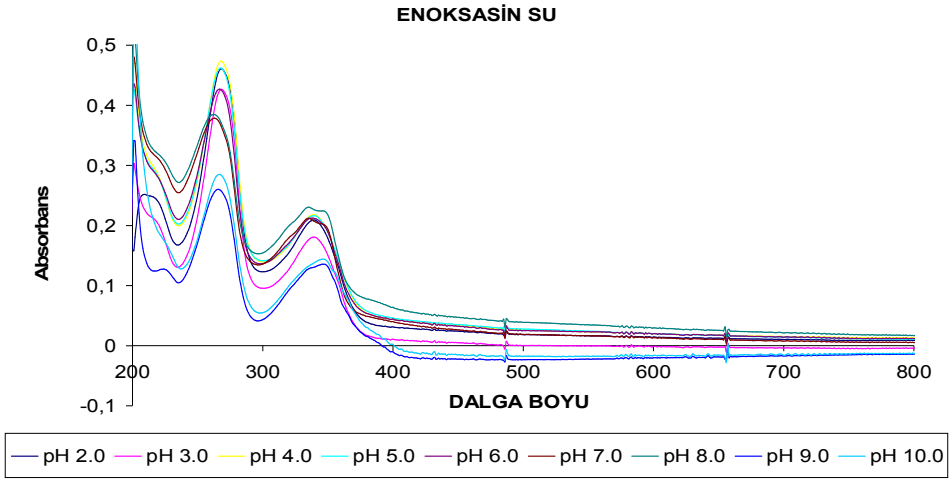
Şekil-4.102. Enoksasin % 20 asetonitril-su ortamında spektrofotometredeki pH spektrumları



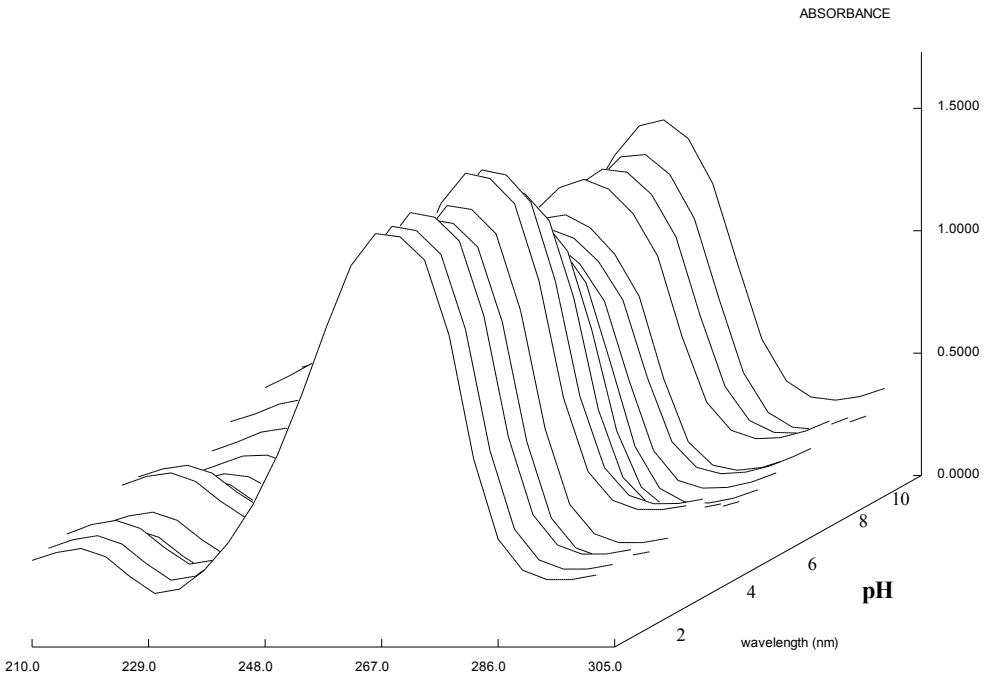
Şekil-4.103. Enoksasin % 30 asetonitril-su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



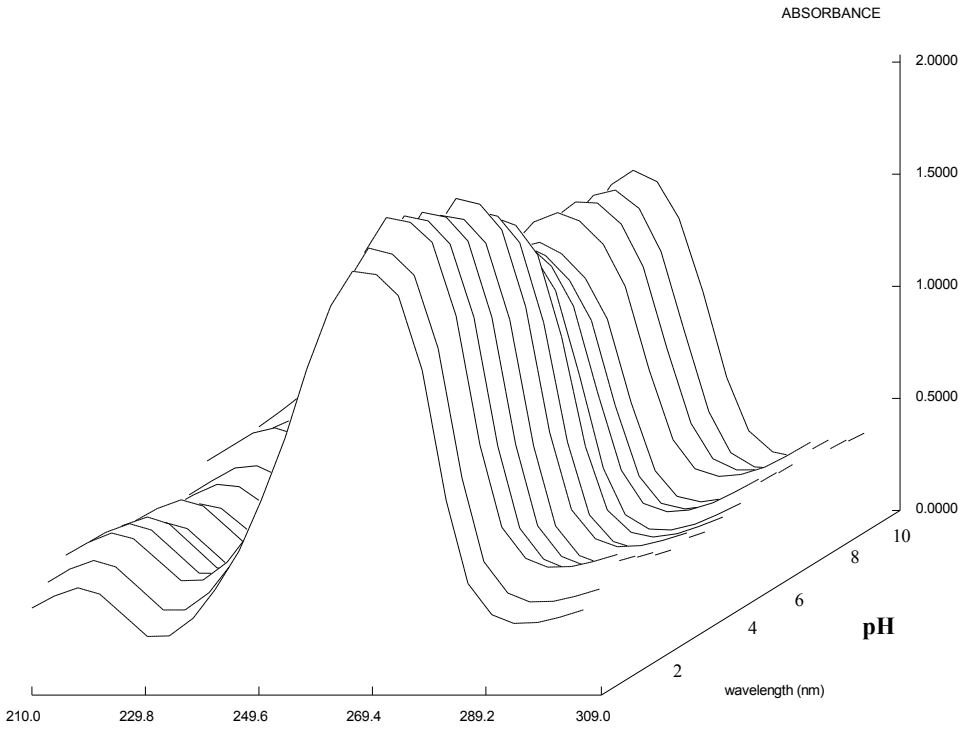
Şekil-4.104. Enoksasin % 40 asetonitril-su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



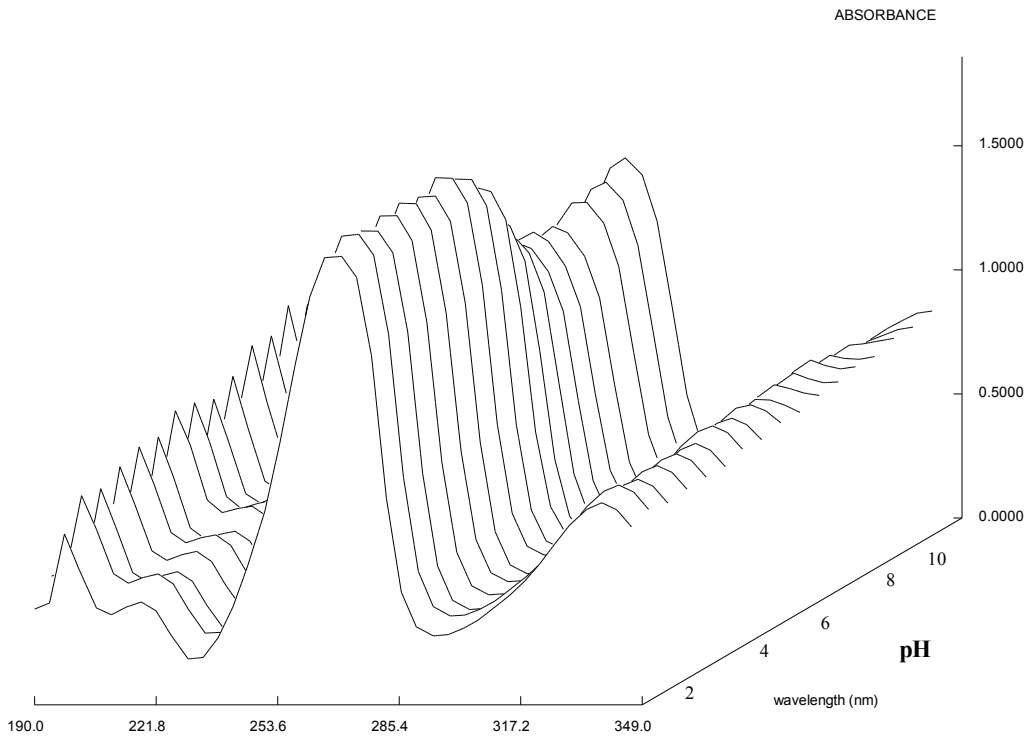
Şekil-4.105. Enoksasinin su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



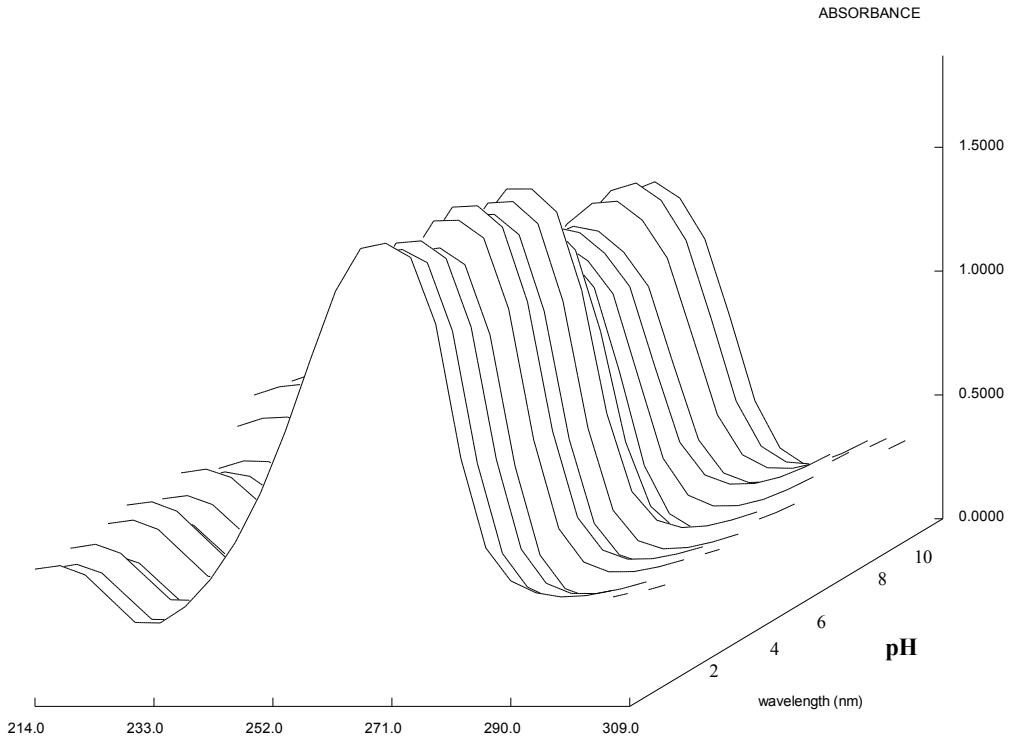
Şekil-4.106. Enoksasinin %10 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği



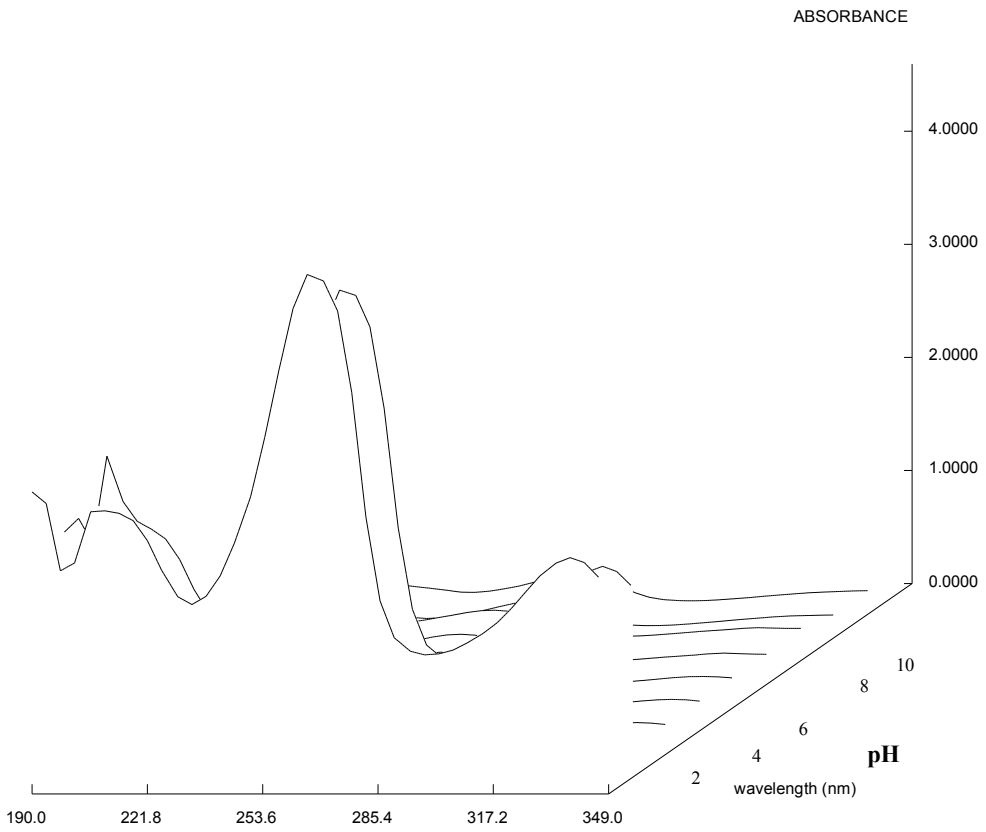
Şekil-4.107. Enoksasinin %20 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği



Şekil-4.108. Enoksasinin %30 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği



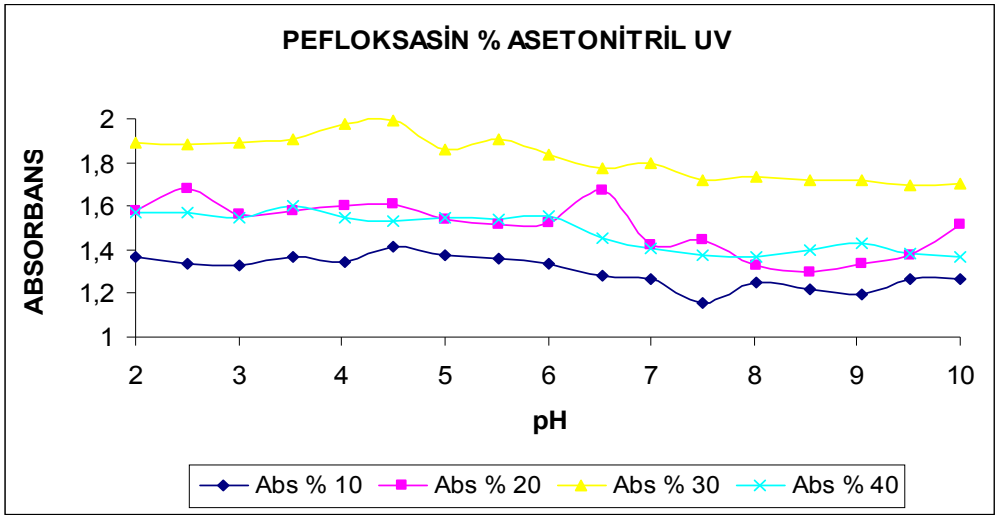
Şekil-4.109. Enoksasinin %40 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği



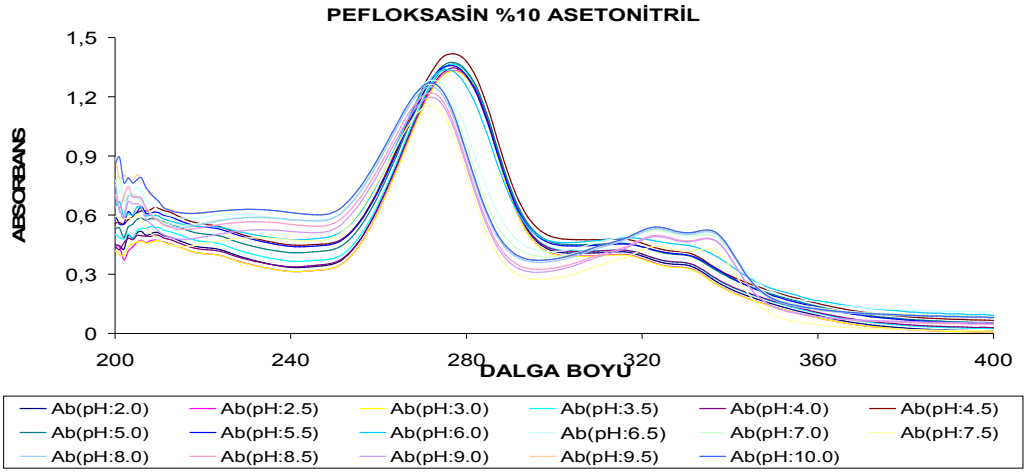
Şekil-4.110. Enoksasinin su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği

Çizelge 4.29. Pefloksasinin pH- %10-%40 Absorbans değerleri

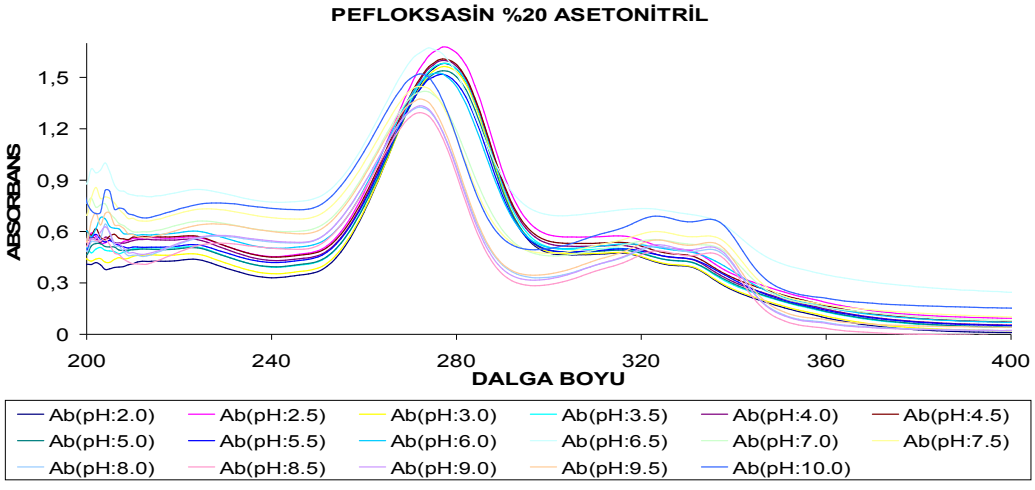
PEFLOKSASİN				
pH	**Abs % 10**	**Abs % 20**	**Abs % 30**	**Abs % 40**
2,0	1,36530	1,58090	1,89290	1,56730
2,5	1,33260	1,67700	1,88260	1,56650
3,0	1,32880	1,56290	1,88880	1,54660
3,5	1,36450	1,58180	1,90300	1,60470
4,0	1,34670	1,59880	1,97510	1,54910
4,5	1,41730	1,60780	1,99080	1,53320
5,0	1,37700	1,53820	1,85800	1,54580
5,5	1,35730	1,51820	1,90530	1,53620
6,0	1,33760	1,52530	1,83260	1,55400
6,5	1,28320	1,67260	1,77440	1,45120
7,0	1,26280	1,41860	1,79360	1,40990
7,5	1,15540	1,44680	1,72080	1,37610
8,0	1,24950	1,32650	1,73450	1,36640
8,5	1,21900	1,29370	1,71940	1,39620
9,0	1,19730	1,33430	1,71730	1,43000
9,5	1,26630	1,37380	1,69580	1,37950
10,0	1,26940	1,51950	1,70090	1,36470



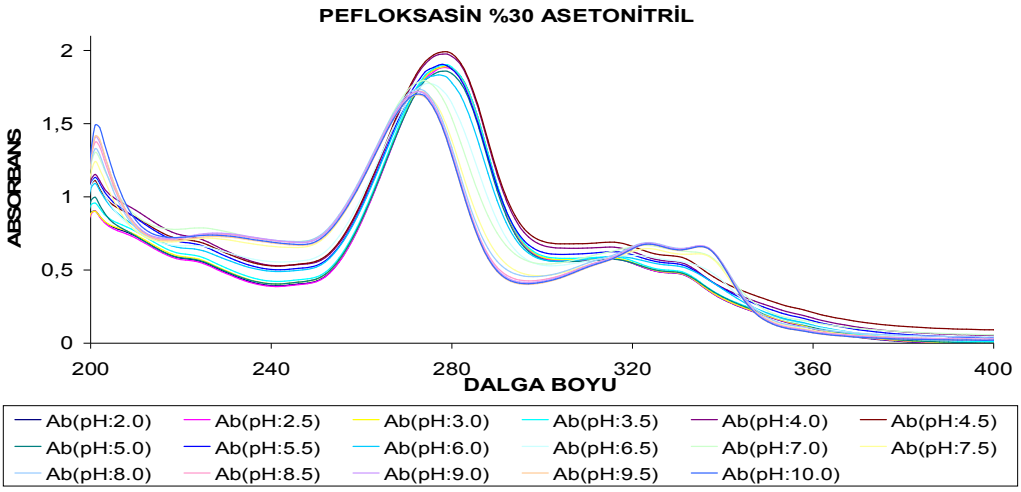
Şekil-4.111. Pefloksasin %10-%40 pH - Absorbans grafiği



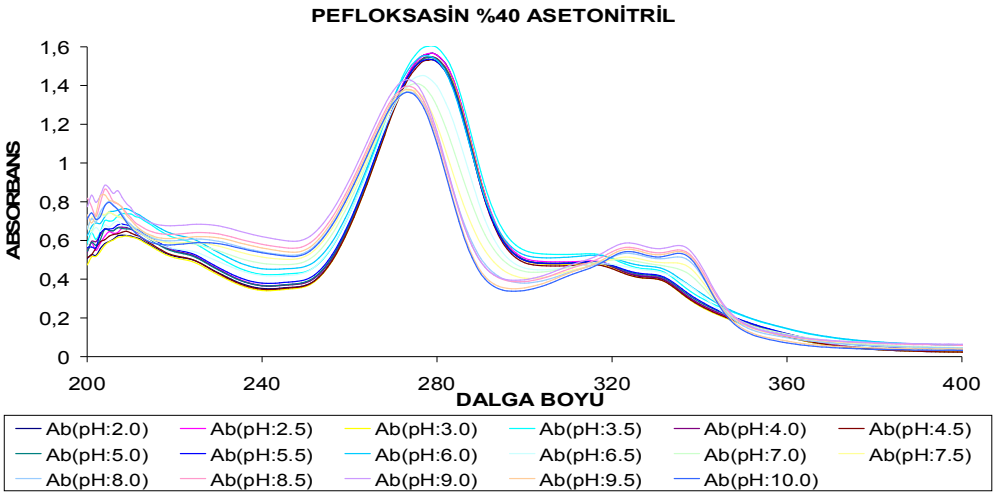
Şekil-4.112. Pefloksasin % 10 asetonitril-su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



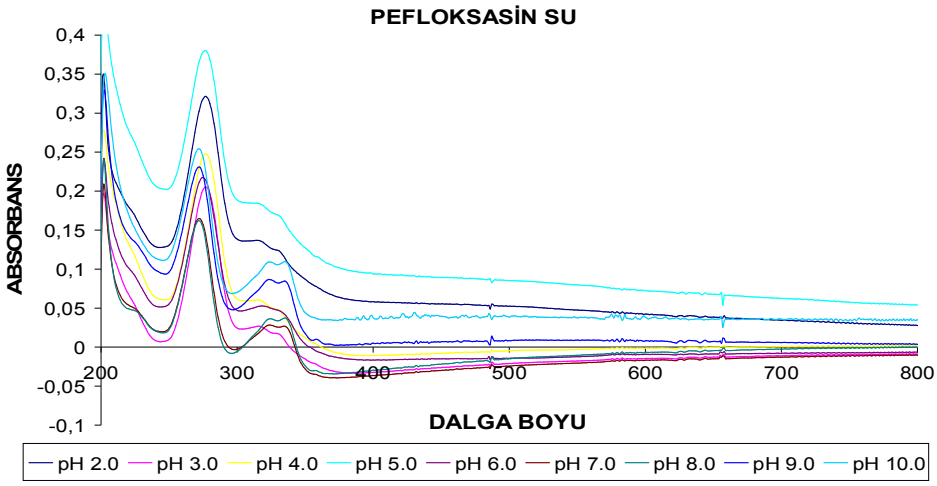
Şekil-4.113. Pefloksasin % 20 asetonitril-su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



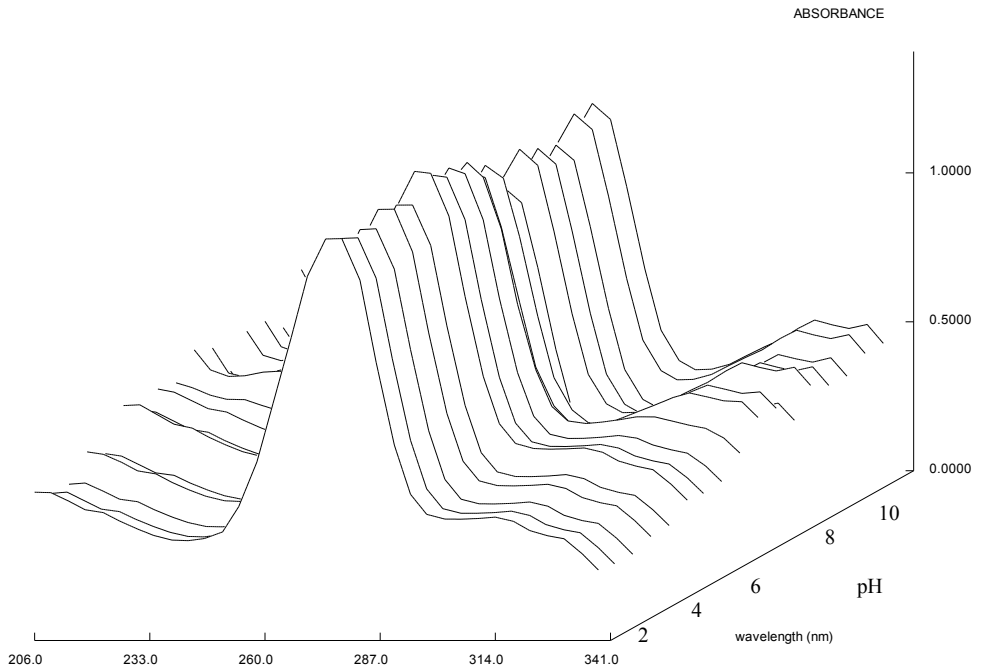
Şekil-4.114. Pefloksasin % 30 asetonitril-su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



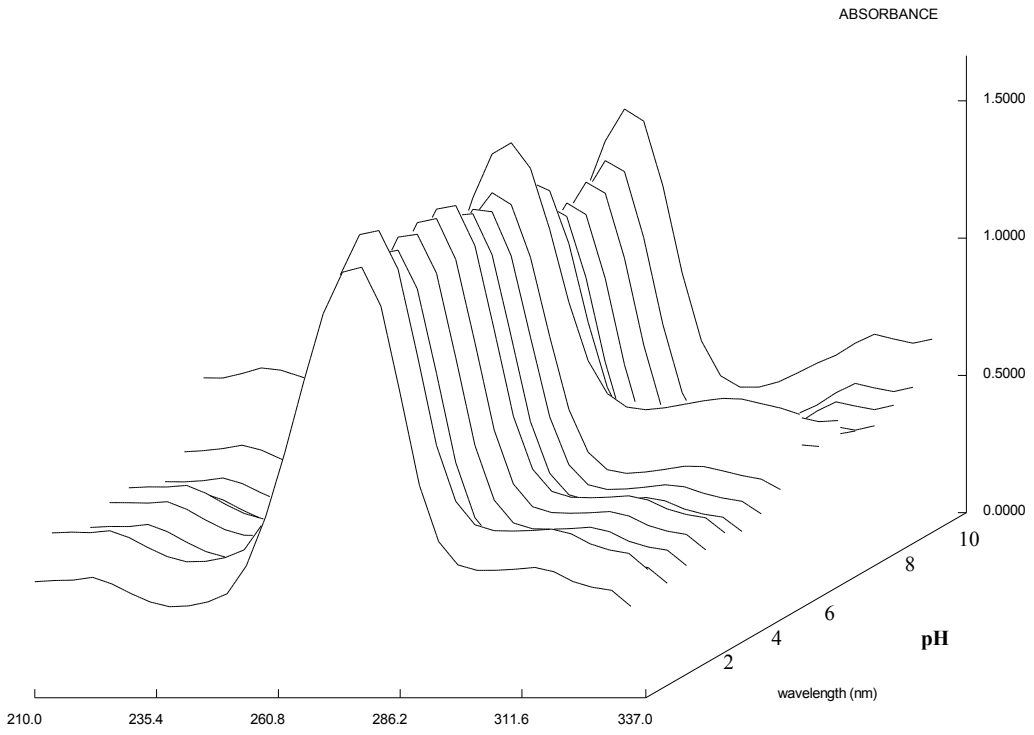
Şekil-4.115. Pefloksasin % 40 asetonitril-su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



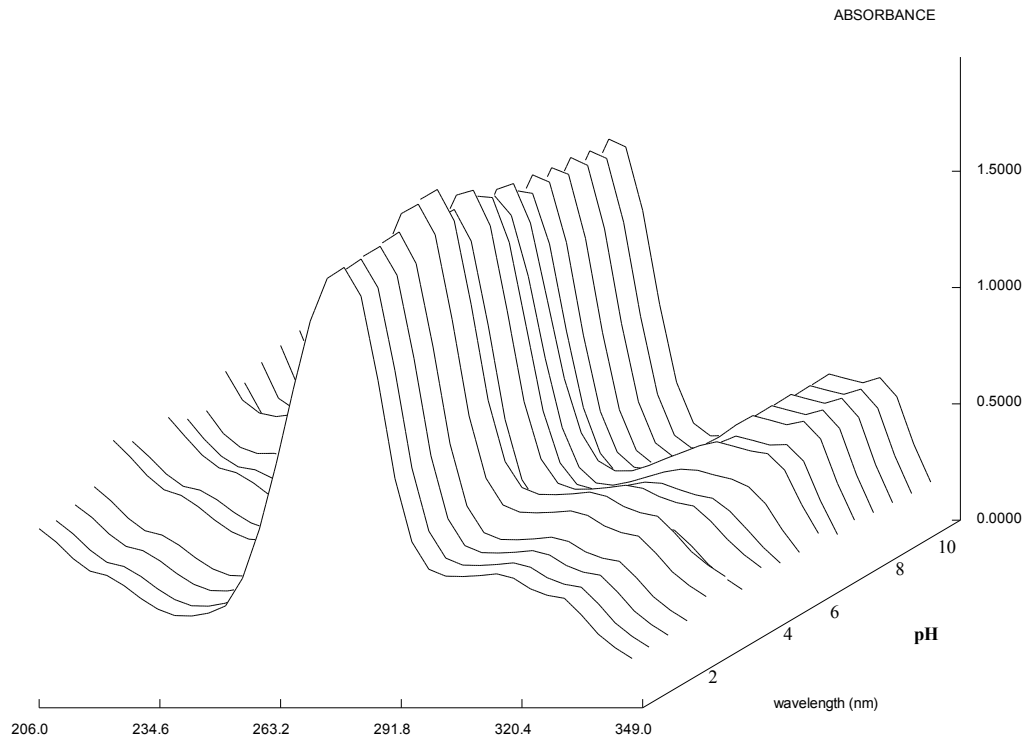
Şekil-4.116. Pefloksasinin su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



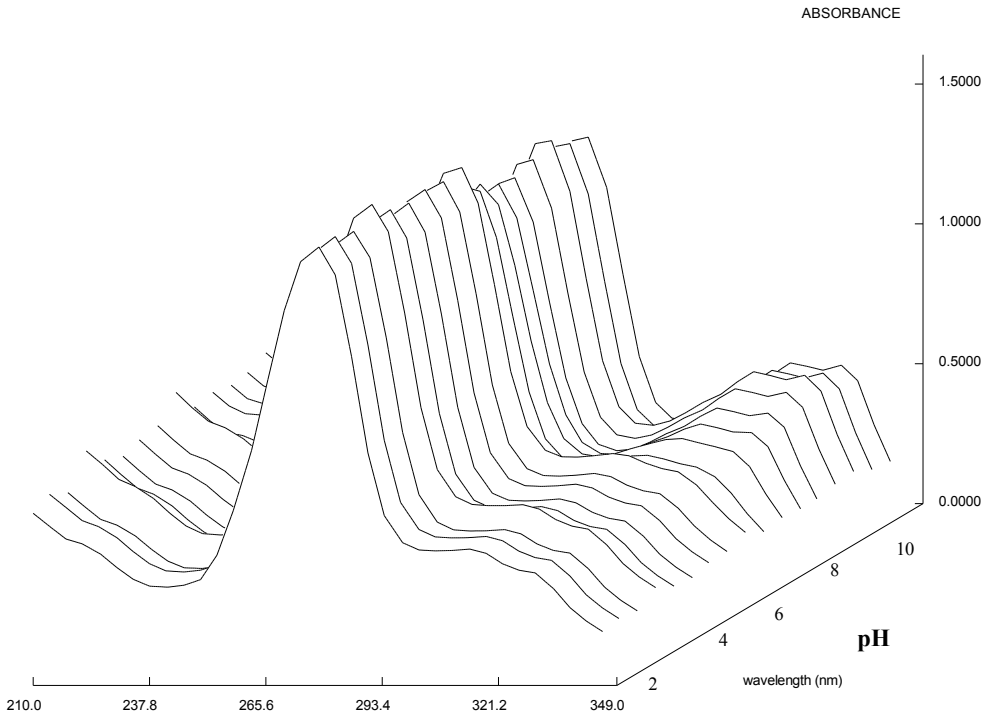
Şekil-4.117. Pefloksasinin %10 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği



Şekil-4.118. Pefloksasinin %20 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği



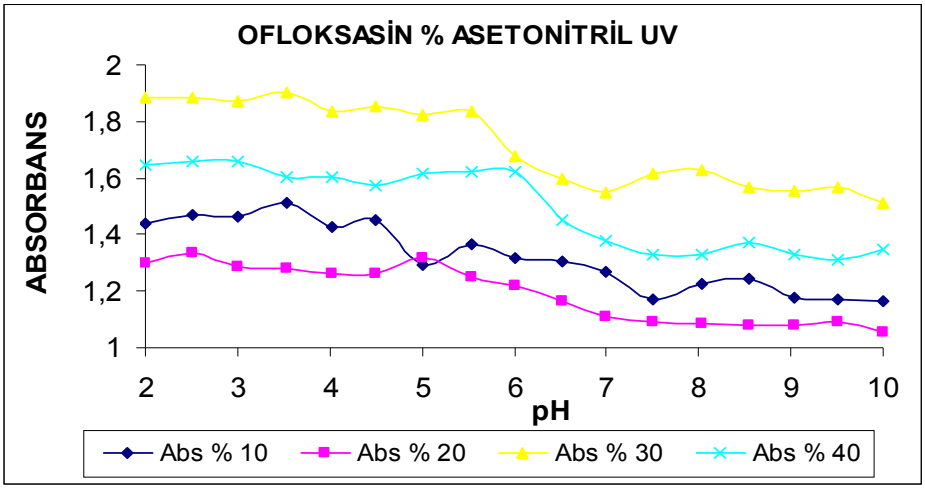
Şekil-4.119. Pefloksasinin %30 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği



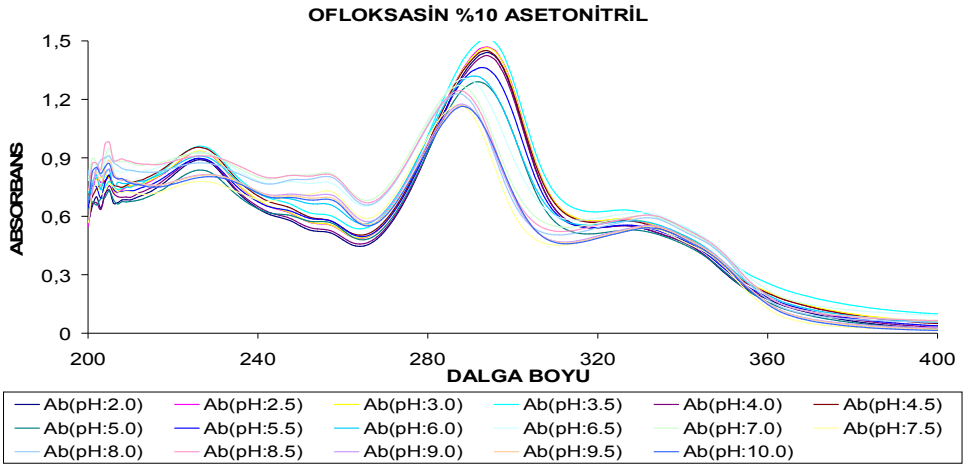
Şekil-4.120. Pefloksasinin %40 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği

Çizelge 4.30. Ofloksasinin pH- %10-%40 Absorbans değerleri

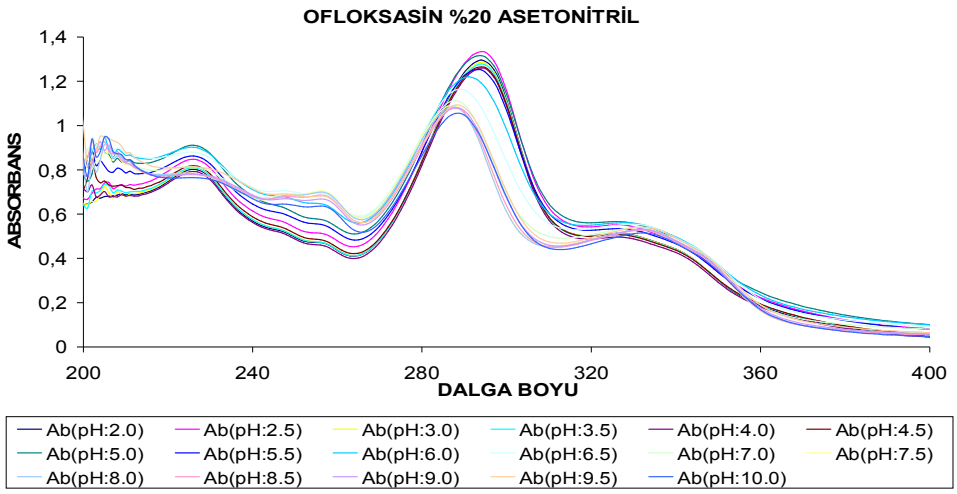
OFLOKSASİN				
pH	**Abs % 10**	**Abs % 20**	**Abs % 30**	**Abs % 40**
2,0	1,44100	1,29580	1,88430	1,64690
2,5	1,46870	1,33450	1,88700	1,65870
3,0	1,46500	1,28600	1,86960	1,65570
3,5	1,51240	1,27850	1,90070	1,60410
4,0	1,42470	1,25980	1,83700	1,60390
4,5	1,45040	1,26500	1,85070	1,57400
5,0	1,28980	1,31580	1,82290	1,61800
5,5	1,36290	1,25260	1,83820	1,62180
6,0	1,31920	1,22020	1,67630	1,62250
6,5	1,30700	1,16410	1,59630	1,44860
7,0	1,27080	1,11180	1,54830	1,37790
7,5	1,17090	1,09150	1,61490	1,32670
8,0	1,22800	1,08410	1,62540	1,32790
8,5	1,24430	1,07940	1,56420	1,37160
9,0	1,17590	1,07980	1,55410	1,32660
9,5	1,16880	1,09230	1,56470	1,31130
10,0	1,16400	1,05530	1,51030	1,34740



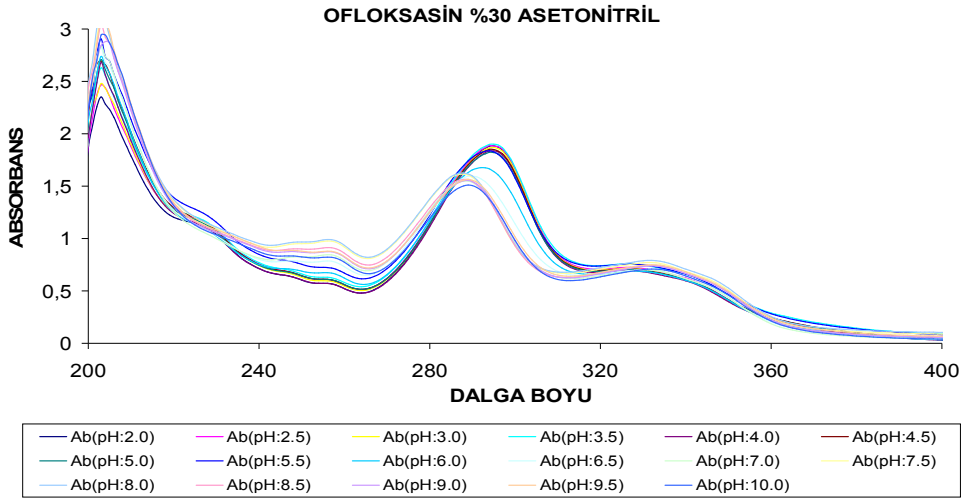
Şekil-4.121. Ofloksasin %10-%40 pH - Absorbans grafiği



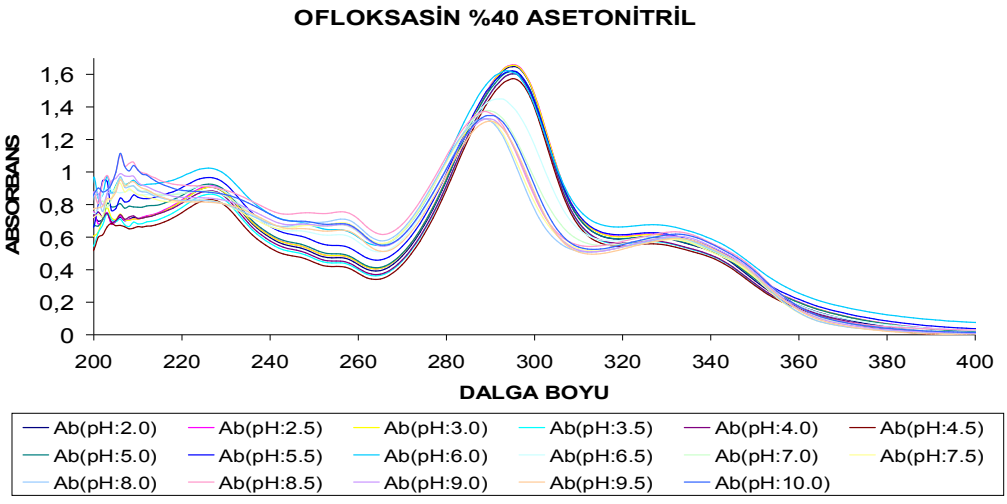
Şekil-4.122. Ofloksasin % 10 asetonitril-su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



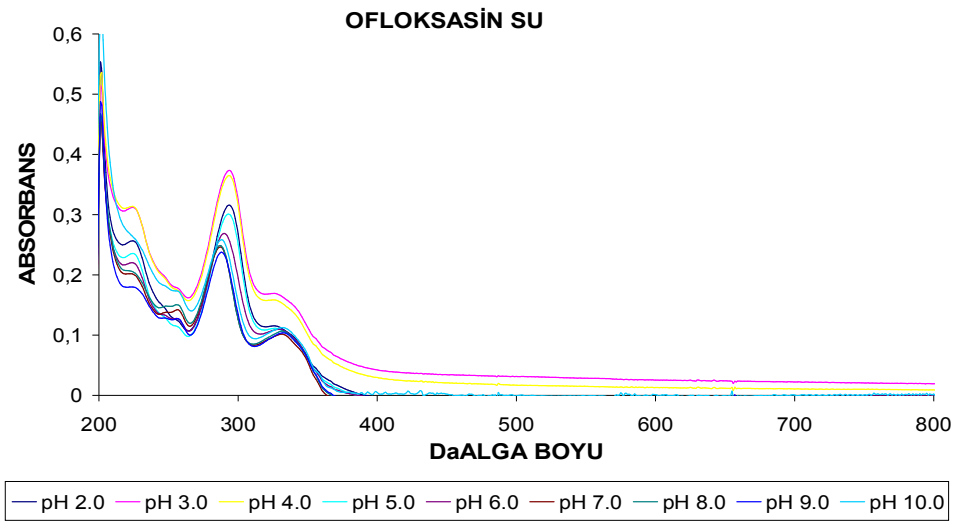
Şekil-4.123. Ofloksasin % 20 asetonitril-su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



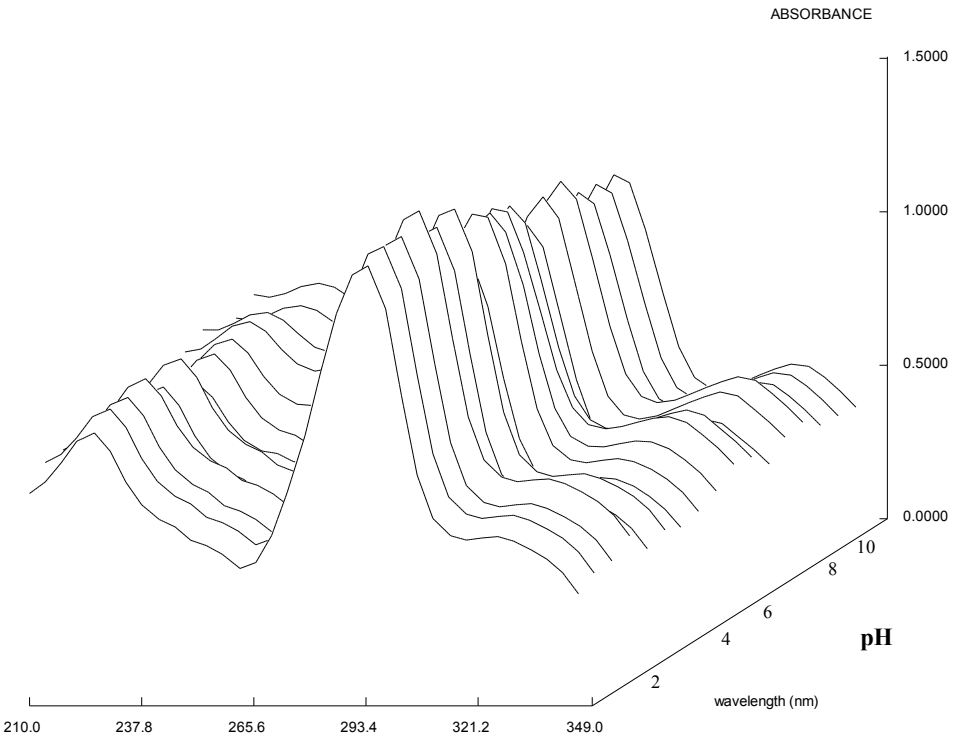
Şekil-4.124. Ofloksasin % 30 asetonitril-su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



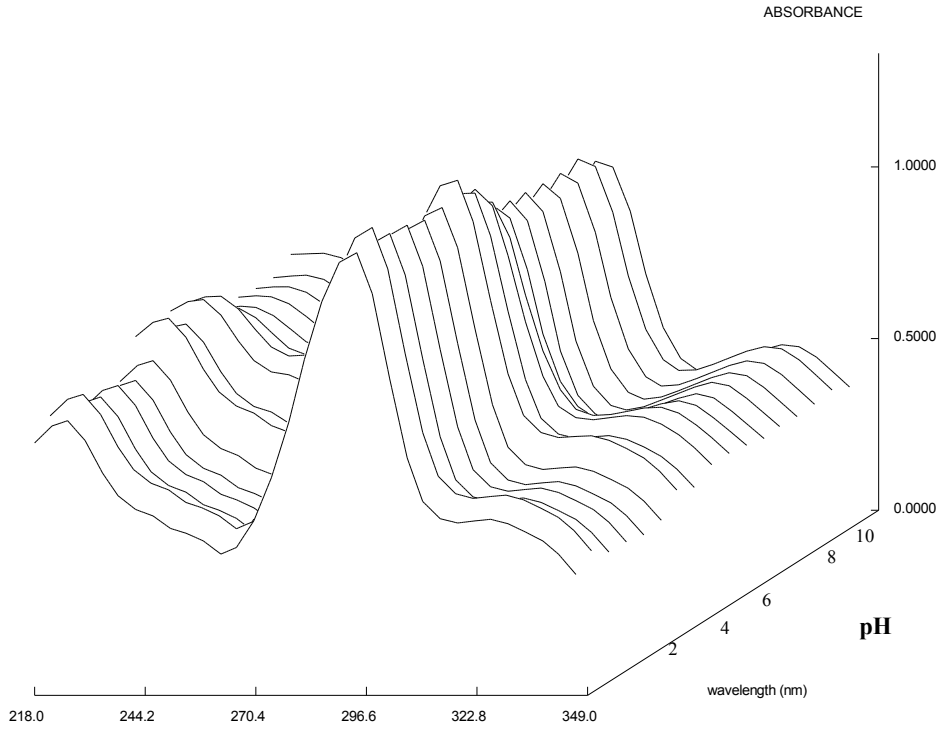
Şekil-4.125. Ofloksasin % 40 asetonitril-su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



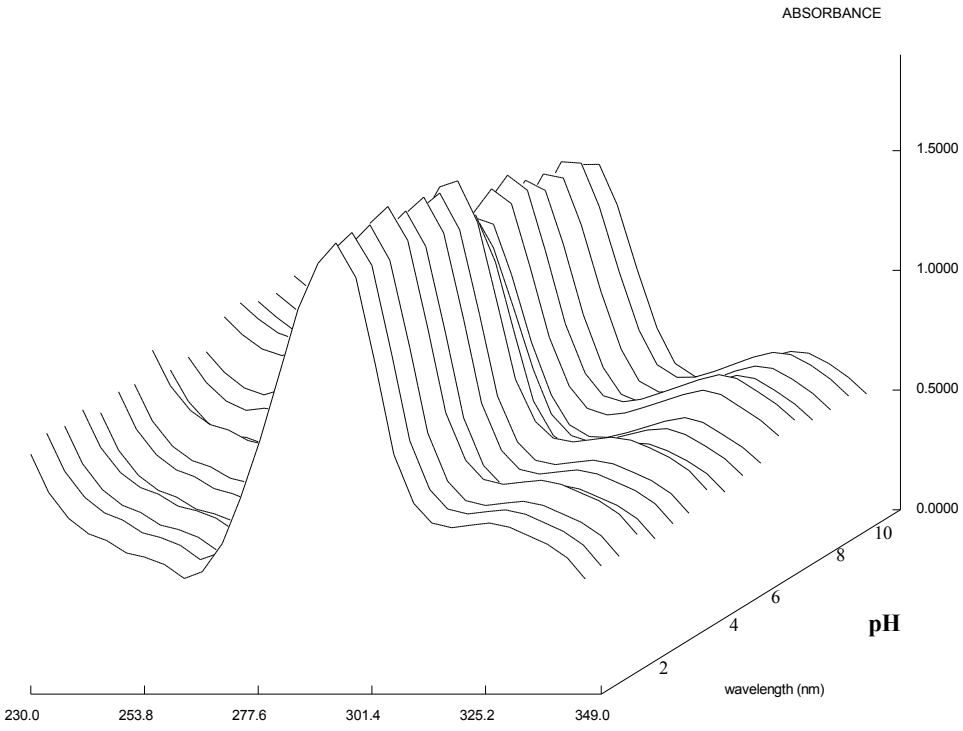
Şekil-4.126. Ofloksasin % 40 asetonitril-su ortamındaki spektrofotometredeki pH spektrumları



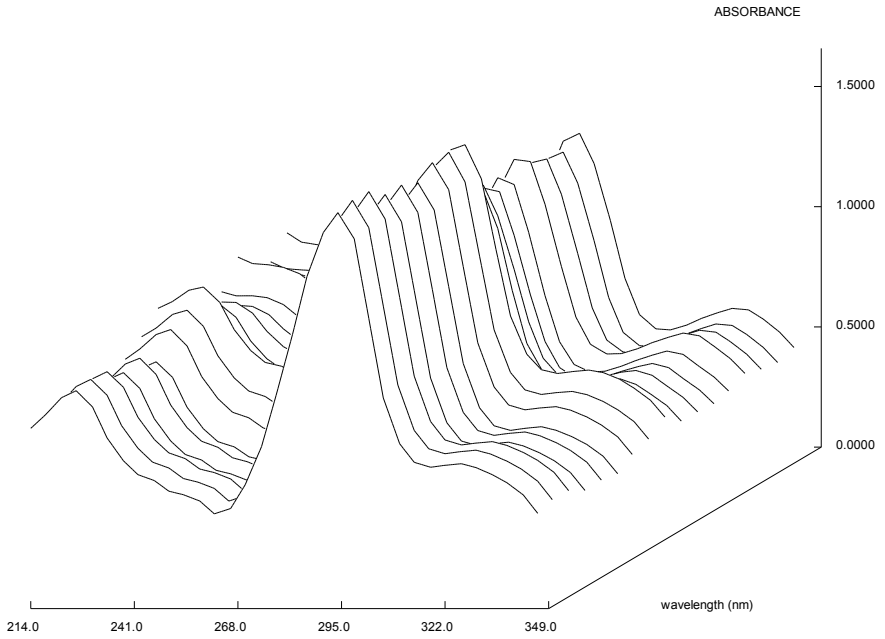
Şekil-4.127. Ofloksasinin %10 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği



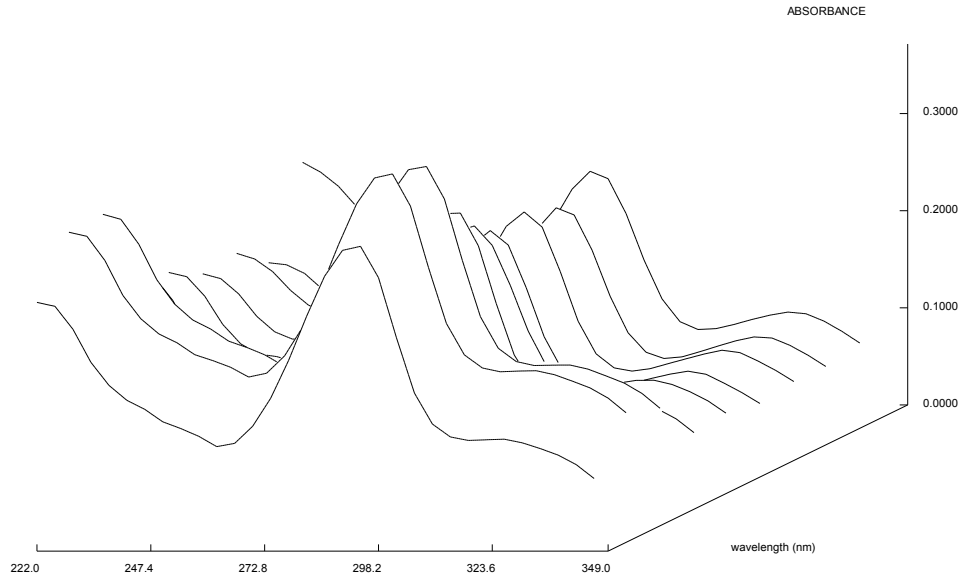
Şekil-4.128. Ofloksasinin %20 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği



Şekil-4.129. Ofloksasinin %30 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği



Şekil-4.130. Ofloksasinin %40 asetonitril-su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği



Şekil-4.131. Ofloksasinin su ortamındaki dalga boyu-pH-Absorbans grafiği

Florokinolonların hem spektroflorimetrik hem de spektrofotometrik yöntemle belirlenen iyonlaşma sabitleri incelendiğinde, %10-%40 asetonitril ortamlarında belirlenen pKa değerlerinin, teorik pKa değerlerin su ortamında elde edilenlerden çok daha yakın oluğu belirlenmiştir. Ayrıca çözücü yüzdesi arttırıldığında özellikle spektroflorimetrik yöntemle belirlenen iyonlaşma sabitlerinin çok farklı değerlerde olmadığı, bu nedenle de %10 asetonitril ortamının florokinolonların iyonlaşma sabitlerinin tayininde tercih edilebilecek bir ortam olduğu sonucuna varılmıştır.

5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

5.1. Sonuçlar

Bu konu ile ilgili kaynaklar incelendiğinde bu ilaçların suda ve su-organik çözücü ikili karışımlarındaki iyonlaşma sabitleri ile ilgili yeterli çalışmanın bulunmadığı anlaşılmaktadır. Bu nedenle bu çalışmada, enoksasin, levofloksasin, ciprofloksasin, pefloksasin ve ofloksasin gibi florokinolonların belirli yüzdelerdeki asetonitril-su, metanol-su, DMF-su ve DMSO-su karışımlarında florimetrik parametrelerin optimize edilmiş, daha sonra pH ve çözücü yüzdesinin florimetrik parametrelere etkisi incelenerek, optimum uyarma ve emisyon dalga boyları ve çözücü yüzdelerinde pH-floresans şiddeti grafikleri çizilerek pKa değerleri belirlenmiştir. Nötral ve iyonik türlerin farklı floresans özellikleri olmasına dayanan spektroflorimetrik yöntem ile belirlenen pKa değerleri, online teorik pKa hesaplama programı olan SPARC sonuçlarıyla karşılaştırılmıştır. Böylece, florokinolonlar su ve ikili çözücü karışımlardaki asit-baz dengeleri ile ilgili davranışları hakkında bilgi sahibi olunmuştur.

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

Florokinolonlar, karboksil ve amino grupları gibi asidik ve bazik özellikteki fonksiyonel gruplara sahiplerdir. Florokinolonların pH 2-10 aralığında farklı florimetrik özelliğe sahip iyonlaşmış türler oluşturduğu gözlenmiştir. Bu türlerin bazıları, siprofloksasin ve enoksasinin asidik türlerinde olduğu gibi floresent iken, bazıları da her üç türün bazik türlerindeki gibi floresent değildir. Spektroflorimetrik yöntemle elde edilen pKa değerlerinin, teorik olarak bileşiklerin pKa değerlerini hesaplayan SPARC programıyla elde edilen pKa değerlerine, spektrofotometrik yöntemle bulunup STAR programında hesaplanan pKa değerlerinden çok daha yakın olduğu görülmüştür (Çizelge 5.1 ve 5.2).

Çizelge 5.1. Florokinolonların %10-40 asetonitril-su ortamlarındaki teorik ve deneysel pKa değerleri.

BİLEŞİK ADI		SPARC	DENEYSEL pKa	Asetonitril Yüzdesi %10	%20	%30	%40
SİPROFLOKSASİN	Ka_1	5.64	Spektroflorimetrik	4.80	4.80	4.70	4.60
	Ka_2	8.87		6.20	6.18	5.90	6.10
				8.60	8.85	8.80	8.90
			STAR (Spektrofotometrik)	6.69	7.12	4.20	6.49
				10.22	13.00	6.75	11.39
ENOKSASİN	Ka_1	5.40	Spektroflorimetrik	6.30	6.50	6.80	6.80
	Ka_2	7.02		8.80	8.80	8.70	8.80
			STAR (Spektrofotometrik)	6.64	6.16	6.43	6.82
				12.02	6.81	10.80	9.75
OFLOKSASİN	Ka_1	5.72	Spektroflorimetrik	6.10	6.25	6.20	6.50
	Ka_2	8.28		8.50	8.50	8.40	8.80
			STAR (Spektrofotometrik)	6.13	6.35	6.29	6.31
				9.67	11.97	9.99	11.80
PEFLOKSASİN	Ka_1	5.64	Spektroflorimetrik	6.02	6.28	6.37	6.76
	Ka_2	8.02		-	-	-	-
			STAR (Spektrofotometrik)	6.25	6.40	6.80	7.40
				12.24	9.54	11.03	13.55
LEVOFLOKSASİN	Ka_1	5.72	Spektroflorimetrik	6.05	6.25	6.24	6.43
	Ka_2	8.28		8.36	-	-	-
			STAR (Spektrofotometrik)	6.42	6.03	6.60	6.88
				10.39	8.76	11.95	10.66

Çizelge 5.2. Florokinolonların su ortamındaki teorik ve deneysel pKa değerleri.

BİLEŞİK ADI		SPARC	DENEYSEL pKa	SU ORTAMINDA
SİPROFLOKSASİN	Ka_1	5.64	Spektroflorimetrik	6.50
	Ka_2	8.87		8.50
			STAR (Spektrofotometrik)	3.60
				6.62
ENOKSASİN	Ka_1	5.40	Spektroflorimetrik	5.50
	Ka_2	7.02		
			STAR (Spektrofotometrik)	2.01
				6.52
OFLOKSASİN	Ka_1	5.72	Spektroflorimetrik	6.00
	Ka_2	8.28		
			STAR (Spektrofotometrik)	4.36
				6.86
PEFLOKSASİN	Ka_1	5.64	Spektroflorimetrik	6.40
	Ka_2	8.02		
			STAR (Spektrofotometrik)	5.29
				6.58
LEVOFLOKSASİN	Ka_1	5.72	Spektroflorimetrik	6.00
	Ka_2	8.28		
			STAR (Spektrofotometrik)	4.00
				5.96

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 (solvatokromik parametreleri, α, β, π*, DN ve AN düşüktür). 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.

Farklı çözücü yüzdelerinde, florokinolonların floresans davranışları incelendiğinde, asetonitril-su ortamlarında, asetonitril yüzdesi arttıkça, siprofloksasin ve enoksasin azalıyor, ancak diğer florokinolonların floresans şiddeti ilk önce artıyor daha sonra azalıyor. Florokinolonların hepsi, asetonitril, metanol ve su çözücüsünde çok iyi pik veriyor. Ancak, DMF çözücüsünde enoksasin, DMSO çözücüsünde enoksasin, levofloksasin ve ofloksasin iyi pik vermiyor. Şekillerden de görüldüğü gibi; birbirinden ayrı pik vermediği için bu maddeler, bu çözücülerle çalışılamaz.

5.2. Öneriler

Spektroflorimetrede ölçümler, spektrofotometreye göre daha hassastır. Çünkü. özellikle bu çalışmada spektroflorimetrede daha düşük derişimlerde (10^{-3}-10^{-8}M) çalışılabilirken. spektrofotometrede 10^{-4} M derişime kadar çalışılabilmiştir.

Florokinolonlar gibi ilaç etken maddelerin iyonlaşma sabitlerinin tayinlerinde spektroflorimetre ve spektrofotometre kullanılabilir.

İyonlaşma sabitlerinin tayini (pKa değerlerinin tayini) sadece asetonitril-su karışımlarında değil Metanol-su, DMF(dimetil formamit)-su ve THF (tetra hidrofuran)-su karışımlarında da yapılabilir.

İlaçların etki mekanizmalarının tam olarak açıklanabilmesi için ilaç etken maddelerinin tüm kimyasal özelliklerinin bilinmesi gerekir. Aynı zamanda asitlik ve bazlık sabitleri de ilaç etken maddelerinin en önemli kimyasal özellikleridir.

KAYNAKLAR

Akkan A. G., 1997, Antibiyotiklerin sınıflandırılmaları, İ.Ü. Cerrahpaşla Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri Pratikte Antibiyotik Kullanımı Sempozyumu, İstanbul, 53-62.

Akkan A. G., 2000, Farmakoloji Ders Kitabı, Editörler: Bökesoy, T. A., Çakıcı, İ., Melli, M., Gazi Kitabevi, Bölüm:11.1 F, Ankara, 565.

Akkan, H.A., Karaca, M., 2003, Veteriner iç hastalıklarında antibiyotiklerin kullanımı, YYÜ Vet. Fak. Derg., 14(2), 72-77.

Altınışık. M., 2004, Spektroskopik Analiz Yöntemleri, ADÜTÜTF Biyokimya AD, www.mustafaaltinisik.org.uk/78uzm-05.ppt [Ziyaret Tarihi:26 Mayıs 2011]

Avdeef, A., Box, K.J., Comer, J.E.A., Gilges, M., Hadley, M., Hibbert, C., Patterson, W., Tam, K.Y., 1999, pH Metric logP. 11.pKa determination of water-insoluble drugs in organic solvent-water mixtures, J. Pharm. Biomed. Anal., 20(4), 631-641.

Babić S., Alka Horvat J.M., Mutavdžić Pavlović D., Kaštelan-Macan M., 2007, Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients, Trends in Analytical Chemistry, 26 (11), 1043-1061.

Ballesteros, O., Vílchez, J. L., Navalón. A., 2002, Determination of the antibacterial ofloksasin in human urine and serum samples by solid-phase spectrofluorimetry, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 30, 1103-1110.

Barbosa, J., Baron, D., Jiménez-Lozano, E., Sanz-Nebot, V., 2001, Comparison between capillary electrophoresis, liquid chromatography, potentiometric and spectrophotometric techniques for evaluation of pK_a values of zwitterionic drugs in acetonitrile-water mixtures, Analytica Chimica Acta, 437, 309-321.

Barrón, D., Jiménez-Lozano, E., Irles, A., Barbosa, J., 2000, Influence of pH and pK_a values on electrophoretic behaviour of quinolones in aqueous and hydroorganic media, Journal of Chromatography A, 871, 381-389.

Beltrán, J. L., Şanlı, N., Fonrodona, G., Barrón, D., Özkan, G., Barbosa, J., 2003, Spectrophotometric. potentiometric and chromatographic pKa values of polyphenolic substances in water and acetonitrile-water media, Analytica Chimica Acta, 484 (2), 253-264.

Dökmeci, İ., Akçasu, A., Banoglu, N., Berkarda, S. ve ark., 1992, Farmakoloji, İlaç uygulamalarında temel kavramlar, Nobel Tıp Kitabevleri, 705-785.

Drakopoulos, A.I., Ioannou, P.C., 1997, Spectrofluorimetric study of the acid-base equilibria and complexation behavior of the fluoroquinolone antibiotics ofloxacin. norfloxacin. ciprofloxacin and pefloxacin in aqueous solution, Analytica Chimica Acta, 354, 197-204.

Du, L. M., Yang, Y. Q., Wang, Q. M., 2004, Spectrofluorometric determination of certain quinolone through charge transfer complex formation, Analytica Chimica Acta, 516, 237–243.

Espinosa-Mansilla, A., Muñoz de la Peña, A., González Gómez, D., Salinas, F., 2005, HPLC determination of enoxacin. ciprofloxacin. norfloxacin and ofloxacin with photoinduced fluorimetric (PIF) detection and multiemission scanning Application to urine and serum, Journal of Chromatography B, 822, 185-193.

González, J. A. O., Mochón, M. C., Barragán R. F. J., 2000, Spectrofluorimetric determination of levofloksasin in tablets. human urine and serum, Talanta, 52, 1149–1156.

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

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

Kayaalp, O., 1991, Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, 6. baskı. Feryal Matbaacılık, Ankara, 826-863.

Kayaalp, O., 2000, Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, 8. baskı, 1.cilt. Hacettepe-Tas Yayınları, Ankara, 175-292.

Kayaalp, O., 2005, Florokinolonlar, 11. baskı, 1.cilt, Hacettepe-TAŞ Yayınları, Ankara, 233-238.

Lee, H.-B., Peart, T. E., Svoboda, M. L., 2007, Determination of ofloksasin. norfloksasin. and Siprofloksasin in sewage by selective solid-phase extraction. liquid chromatography with fluorescence detection. and liquid chromatography–tandem mass spectrometry, Journal of Chromatography A, 1139, 45–52.

Lin, C.E., Deng, Y.J., Liao, W.S., Sun, S.W., Lin, W.Y., Chen, C.C., 2004, Electrophoretic behavior and pK_a determination of quinolones with a piperazinyl substituent by capillary zone electrophoresis, Journal of Chromatography A, 1051, 283-290.

Marquès, I., Fonrodona, G., Butí, S., Barbosa, J., 1999, Solvent effects on mobile phases used in liquid chromatography: factor analysis applied to protonation equilibria and solvatochromic parameters, Trends in Analytical Chemistry, 18 (7), 472-479 .

Parker, C. A., 1968, Photoluminescence of Solutions, With Applications to Photochemistry and Analytical Chemistry, Elsevier Pulishing Company, London, 332-337.

Qiang, Z., Adams, C., 2004, Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics, Water Research, 38, 2874- 2890.

Rizk, M., Belal, F., Ibrahim, F., Ahmed, S., El-Enany, N., 2000, Spectrofluorimetric analysis of certain 4-quinolone in pharmaceuticals and biological fluids, Pharmaceutica Acta Helvetiae, 74, 371–377.

Rosés, M., Bosch, E. 2002, Influence of mobile phase acid–base equilibria on the chromatographic behaviour of protolytic compound, Journal of Chromatography A, 982,1–30.

Sanz-Nebot, V., Toro, I., Barbosa, J., 2001, Prediction of retention behaviour and evaluation of pK values of peptides and quinolones in liquid chromatography, Journal of Chromatography A., 933, 45–56.

Sardohan, T., 2006, Bazı kinolonların iyonlaşma sabitlerinin su, metanol ve su-metanol ikili karışımlarında potansiyometrik yöntemle tayini, Yüksek lisans tezi, Isparta.

Seifrtová, M., Nováková, L., Linob, C., Penab, A., Solich, P., 2009, An overview of analytical methodologies for the determination of antibiotics in environmental waters, Analytica Chimica Acta, 649, 158–179.

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Çeviri: Kılıç, E., Köseoğlu, F., 1996, Analitik Kimya. Bilim Yayıncılık, Ankara, 601-609.

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

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

Süslü, İ., Tamer, A., 2002, Spectrophotometric determination of enoxacin as ion-pairs with bromophenol blue and bromocresol purple in bulk and pharmaceutical dosage form, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 29, 545–554.

Şahin, H., 2006, Schıff bazları kullanarak bazı metal iyonlarının spektrofotometrik ve spektrofluorometrik yöntemle tayini, Yüksek Lisans Tezi Kimya Anabilim Dalı, Konya.

Şanlı, Y., Kaya, S., 1994, Veteriner farmakoloji ve ilaçla sağıtım seçenekleri, Medisan Yayınevi, Ankara, 571-650.

Şanlı, N., 2007, Bazı sülfonamitlerin sıvı kromatografi yöntemi ile tayini, Doktora Tezi., Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Isparta.

Şanlı, N., Fonrodona, G., Barrón, D., Özkan, G., Barbosa, J., 2002, Prediction of chromatographic retention. pKa values and optimization of the separation of polyphenolic acids in strawberries, Journal of Chromatography A., 975 (2), 299-309.

Tatar Ulu, S., 2009, Highly sensitive spectrofluorimetric determination of lomefloksasin in spiked human plasma. urine and pharmaceutical preparations, European Journal of Medicinal Chemistry, 44, 3402–3405.

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

Yaman, M., Enstrümental Analiz Ders Notları, http://www.profdrmehmetyaman.com/dersnotlari/ens.pdf [Ziyaret Tarihi: 26 Haziran 2011].

Zhang, L.-W., Wang, K., Zhang, X.-X.., 2007, Study of the interactions between fluoroquinolones and human serum albumin by affinity capillary electrophoresis and fluorescence method, Analytica Chimica Acta, 603, 101-110.

http://www.infeksiyon.org/detail.Kinolonlar

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı	**:**	ŞÜKRAN KÜÇÜKKARTALLAR
Uyruğu	**:**	T.C
Doğum Yeri ve Tarihi	**:**	KONYA 21.01.1986
Telefon	**:**	03322550544 / 05368245932
E-mail	**:**	sukran_k_kartal@hotmail.com sukran19861@hotmail.com

EĞİTİM

Derece		**Adı. İlçe. İl**	**Bitirme Yılı**
Lise	:	ATATÜRK KIZ LİSESİ	**2003**
Üniversite	:	SELÇUK ÜNİVERSİTESİ	**2008**
Yüksek Lisans	:	SELÇUK ÜNİVERSİTESİ	**2011**

İŞ DENEYİMLERİ

Yıl	**Kurum**	**Görevi**
2008-2011	SELÇUK ÜNİVERSİTESİ ANALİTİK KİMYA ANABİLİM DALI	YÜKSEK LİSANS ÖĞRENCİSİ

YABANCI DİL: İNGİLİZCE

BELİRTMEK İSTEĞİNİZ DİĞER ÖZELLİKLER

Selçuk üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya bölümünü 3.34 ortalama ile ikincilikle bitirdim. Aynı yıl mülakat sınavına girmeden yüksek lisansa başladım.

Tezli yüksek lisans yaparken 2011 yılında Pedagojik formasyon aldım.