

**T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BAZI SÜLFONAMİT VE FLOROKİNOLON GRUBU
ANTİBİYOTİKLERİN İYONLAŞMA VE LİPOFİLİSİTE
SABİTLERİNİN TERS FAZ SIVI KROMATOĞRAFİK YÖNTEM
İLE TAYİNİ**

Nurdan DE KRUIJFF

**Danışman
Prof. Dr. A. Güleren ALSANCAK**

**DOKTORA TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2023**



© 2023 [Nurdan DE KRUIJFF]

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iii
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
1.1. Sülfonamitler	2
1.1.1. Sülfonamitlerin kimyasal yapısı	2
1.1.2. Sülfonamitlerin yapı-aktivite ilişkisi	3
1.1.3. Sülfonamitlerin etki mekanizmaları	4
1.1.4. Sülfonamitlerin bakteri direnci	4
1.1.5. Sülfonamitlerin antibakteriyel etkisi.....	5
1.1.6. Sülfonamitlerin kullanım alanları	5
1.1.7. Sülfonamitlerin yan etkileri	6
1.1.8. Sülfonamitlerin fizikokimyasal özellikleri	6
1.1.9. Sülfonamitlerin iyonlaşma sabitleri	6
1.2. Kinolonlar.....	7
1.2.1. Kinolonların kimyasal yapısı.....	8
1.2.2. Kinolonların farmakokinetik özellikleri	9
1.2.3. Kinolonların yapı-aktivite ilişkisi.....	10
1.2.4. Kinolonların kullanım alanları.....	11
1.2.5. Kinolonların yan etkileri.....	12
1.2.6. Kinolonların absorpsiyonu ve atılımı	13
1.2.7. Kinolonların fizikokimyasal özellikleri	13
1.2.8. Kinolonların iyonlaşma sabitleri (pK _a).....	15
1.3. Lipofilisite	22
1.3.1. İlaç etkinliğinde lipofilisitenin önemi.....	23
1.3.2. Lipinski 5 kuralı (Rule of five).....	26
1.4. Oktanol-su dağılma katsayısı tayininde kullanılan yöntemler	28
1.4.1. Çalkalama (Shake flask) metodu	28
1.4.2. Potansiyometrik metot.....	30
1.4.3. Kromatografik metot	33
1.5. Kromatografide Temel Parametreler.....	39
1.5.1. Teorik tabaka sayısı (N)	40
1.5.2. Kuyruklanma faktörü (Tf)	40
1.5.3. Alıkonma süresi	41
1.5.4. Kapasite faktörü.....	41
1.5.5. Seçicilik, α	41
1.5.6. Ayırma gücü, (Rs)	41
1.5.7. Pik alanı ve yüksekliğinin tekrarlanabilirliği (%BSS).....	42
1.6. Kromatografide Mobil Faz Optimizasyonu	43
1.7. Kromatografide Tampon Seçimi	44
1.8. Sabit Faz Seçimi	46
1.9. Kromatografide Sıcaklık Etkisi	47
2. KAYNAK ÖZETLERİ	49

3. MATERYAL VE YÖNTEM	59
3.1. Kullanılan Cihazlar.....	59
3.1.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı	59
3.1.2. pH/iyon metre	59
3.1.3. Kromatografi kolonu	59
3.1.4. Tampon Çözelti	60
3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler	60
3.3. Kullanılan Çözeltiler	63
3.3.1. Kinolonların pKa ve logP tayininde kullanılan çözeltileri	63
3.3.1.1. % 17 (v/v) Asetonitril-su ikili karışımı	63
3.3.1.2. Urasil çözeltisi	64
3.3.1.3. Potasyum hidrojen fitalat çözeltisi.....	64
3.3.1.4. Standartların çözeltisi.....	64
3.3.2. Sülfonamidlerin pKa ve logP tayininde kullanılan çözeltileri.....	64
3.3.2.1. % 17 (v/v) Asetonitril-su ikili karışımı	65
3.3.2.2. % 15 (v/v) Asetonitril-su ikili karışımı.....	65
3.3.2.3. Standartların çözeltileri	66
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	67
4.1. X terra RP18 Kolon ile Standartların Alıkonmasına Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi	67
4.2. Kinetex F5 Kolon ile Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi	71
4.3. Bileşiklerin pKa değerlerinin tayini	73
4.3.1. Standartların X TERRA kolonda pKa tayini verileri	74
4.3.2. Sülfonamidlerin X Terra kolonda pKa tayini verileri	75
4.3.3. Kinolonların pKa tayini verileri.....	86
5. SONUÇ	94
KAYNAKLAR	98
ÖZGEÇMİŞ	116

ÖZET

Doktora Tezi

BAZI SÜLFONAMİT VE FLOROKİNOLON GRUBU ANTİBİYOTİKLERİN İYONLAŞMA VE LİPOFİLİSİTE SABİTLERİNİN TERS FAZ SIVI KROMATOĞRAFİK YÖNTEM İLE TAYİNİ

Nurdan DE KRUIJFF

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Güleren ALSANCAK

Sülfonamitler ve kinolonlar, çeşitli bakteriyel enfeksiyonlara karşı yaygın olarak kullanılan sentetik antimikrobiyal ajanlardır. Zwitteriyonik molekül özelliği nedeniyle gram-pozitif, gram-negatif ve mikobakteriyel patojenlerin yanı sıra anaeroblara karşı geniş bir antibakteriyel aktivite spektrumu gösterirler. İlaç moleküllerinin fizikokimyasal özelliklerinin, ilaçların pasif difüzyonunda, absorpsiyonu tahmin etmede yarar sağladığı düşünülmektedir. Son zamanlarda yapılan bazı çalışmalar, bunların insan bağırsak emilimindeki önemini göstermiştir, dolayısıyla birçok araştırmacı ilaç lipofilisitesi ile in vivo absorpsiyonu ilişkilendirmek için çaba göstermektedirler.

ADME (Absorpsiyon, Dağılım, Metabolizma ve Atılım) özellikleri bir ilacın davranışını belirlemede temel olduğu kadar kromatografik ayırmada da büyük önem taşır. Bir molekülün asidik veya bazik özellikleri ve dolayısıyla iyonlaşma derecesi, lipofilik davranışında temel bir rol oynar. Lipofilisite değerlendirmelerinde ters faz sıvı kromatografisi ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RPLC-HPLC), ekonomik kalkınma ve iş birliği örgütü (OECD) tarafından önerilen ve geniş uygulama alanı bulan bir tekniktir.

Bu çalışmada, ters faz sıvı kromatografik yöntemi (RPLC) ile sülfonamitlerin (sülfadiazin, sülfatiazol, sülfametazin, sülfadimetoksin, sülfametoksazol, sülfametoksipiridazin, sülfakinoksalin) ve florokinolonların (enrofloksasin, siprofloksasin, marbofloksasin, danofloksasin, ofloksasin, enoksasin) dağılım katsayılarının ve iyonlaşma sabitlerinin tayini amaçlanmıştır. Sülfonamitler ve florokinolonlar için yapılan deneysel çalışmalarda sırasıyla 0,8 mL/dakika akış hızında, X-Terra RP 18 (250 mm x 4,6 mm ID, 5 µm) ve 0,5 mL/dakika akış hızında, Kinetex F5 100 (150 mm x 4,6 mm ID, 2,6 µm) kromatografi kolonları kullanılmıştır. Bu tezde, ters faz sıvı kromatografisi (RPLC) yöntemiyle bazı sülfonamit ve florokinolon grubu antibiyotiklerin alıkonma zamanına pH, sıcaklık ve organik modifiyer derişiminin etkisi belirlenmiştir. Elde edilen bu kromatografik veriler kullanılarak çalışılan bileşiklerin pKa değerleri hesaplanmıştır. Sülfonamitlerin ve florokinolonların sudaki pKa değeri farklı ekstrapolasyon yöntemleriyle çalışılan asetonitril-su karışımlarında tayin edilen pKa değerlerinden hesaplanmıştır.

Çalışmada kullanılan antibiyotiklerin lipofilisite değerleri Mannhold ve ClogP yaklaşımı ve ters faz sıvı kromatografik yöntemle elde edilen alıkonma verileri kullanılarak hesaplanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Sülfonamidler, Florokinolonlar, RPLC, pKa, Alıkonma zamanı, İyonlaşma sabiti, Sıcaklık, Dağılma katsayısı, Lipofilisite, logP, Mannhold approach, ClogP, ADME.

2023, 117 sayfa



ABSTRACT

Ph.D. Thesis

DETERMINATION OF IONIZATION AND LIPOPHILICITY CONSTANTS OF SOME SULFONAMIDE AND FLUOROQUINOLONE GROUP ANTIBIOTICS BY REVERSE PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD

Nurdan DE KRUIJFF

**Süleyman Demirel University
Graduate School of Natural and Applied Sciences
Department of Chemistry**

Supervisor: Prof. Dr. A. Güleren ALSANCAK

Sulphonamides and quinolones are antimicrobial compounds generally used against several bacterial infections. Due to their zwitterionic molecular properties, they show a wide spectrum of antibacterial activity spectrum against mycobacterial pathogens, gram-positive, gram-negative bacteria and anaerobes. It is generally supposed that physicochemical properties of drug molecules can be useful for predicting absorption for passive diffusion of drugs. Some recent studies have shown their significance to the estimation of human intestinal absorption. Many studies have been made to correlate in vivo absorption with drug lipophilicity.

All processes of drug absorption, distribution and excretion in the pharmacokinetic phase of drug action are dynamic in nature, as are in chromatographic separation processes. The acidic or basic characteristics of a molecule, and therefore the degree of its ionization, play an essential role in its lipophilic behavior. Reversed-phase liquid chromatography (RPLC) is a technique, which has found a wide range of applications in lipophilicity assessments, also recommended by the Organization for Economic Development and Co-operation (OECD).

The aim of present work is the determination of partition coefficients and the ionization constants of a series of Sulphonamides (sulfadiazine, sulfathiazole, sulfamethazine, sulfadimethoxine, sulfamethoxazole, sulfamethoxypyridazine, sulfaquinoxaline) and fluoroquinolones (enrofloxacin, ciprofloxacin, marbofloxacin, danofloxacin, ofloxacin, enoxacin) by RPLC method. In experimental studies for Sulphonamides and fluoroquinolones X-Terra RP 18 (250 mm x 4,6 mm ID, 5 µm) at a flow rate of 0,8 mL/min ve Kinetex F5 100 (150 mm x 4.6 mm ID, 2.6 µm) at a flow rate of 0,5 mL/min chromatography columns were used, respectively. In this thesis, the effect of temperature, pH, and organic modifier concentration on the retention time of some sulfonamide and fluoroquinolone group antibiotics by reverse phase liquid chromatography (RPLC) method were determined. The pKa values of the compounds studied were calculated using these chromatographic data. The aqueous pKa value of sulfonamides and fluoroquinolones has been calculated from pKa values determined in

studied acetonitrile-water mixtures by means of different extrapolation methods. The lipophilicity values of studied antibiotics were calculated using Mannhold and ClogP approach and the retention data achieved by the RPLC method.

Keywords: Sulphonamides, Fluoroquinolones, RPLC, pKa, Retention time, Ionization constant, Temperature, Partition coefficient, Lipophilicity, logP, Mannhold approach, ClogP, ADME.

2023, 117 pages



TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesi ile aşmamda yardımcı olan değerli Danışman Hocam Prof. Dr. Güleren ALSANCAK'a ve tez çalışmalarım boyunca hoşgörüsünü ve yardımlarını esirgemeyen sevgili Hocam Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimi bitirmem için desteğini esirgemeyen değerli arkadaşlarım Emre ÖZDOĞAN, Zehra ÜSTÜN ve İlkay KONÇE'ye teşekkür ederim. Tezimin her aşamasında beni destekleyen sevgili eşim Adrianus DE KRUIJFF'a ve o eşsiz güzelliği, masumiyeti ve karşılıksız sevgisiyle motivasyonumu artıran sevgili kızım Luisa DE KRUIJFF'a ve bu zorlu yolculukta desteklerini esirgemeyen ve her zaman yanımda olan değerli AİLEM'e sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Nurdan DE KRUIJFF
ISPARTA, 2023

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Sülfonamitlerin genel yapısı	2
Şekil 1.2. N1 ve N4 amino grupları ile sülfonilamid yapısı	3
Şekil 1.3. Sülfonamitlerin etki mekanizması	4
Şekil 1.4. Sülfonamitlerin genel iyonlaşma prosesi	7
Şekil 1.5. Sülfonamitlerin iyonlaşma dengesi	7
Şekil 1.6. Kinolonların genel yapısı	8
Şekil 1.7. Kinolonların yapı-farmakokinetik ilişkisi	9
Şekil 1.8. Kinolonların yapı-aktivite ilişkisi	11
Şekil 1.9. Asidik kinolonların ve piperazinil kinolonların asit-baz dengesi	15
Şekil 1.10. Florokinolonların pKa değerlerine karşılık gelen spesifik türler	21
Şekil 1.11. Lipinski 5 kuralı	27
Şekil 1.12. Monoprotik zayıf asit, monoprotik zayıf baz için Bjerrum eğrileri..	30
Şekil 1.13. Çeşitli logP _{o/w} kombinasyonlarına sahip diprotik bir maddenin smule edilmiş Bjerrum eğrileri	32
Şekil 1.14. Kolonda analit bileşeninin ayrılması ve kromatogram	39
Şekil 1.15. Kuyruklanma faktörü	40
Şekil 1.16. İki ayrı pikin ayırma güçleri (Rs)	42
Şekil 1.17. MeOH/Su ortamında tampon ve pH'ın analit üzerine etkisi	44
Şekil 2.1. Bazı Sülfonamitlerin farklı sıcaklıklardaki dağılma katsayıları	54
Şekil 4.1. Metilparaben ve etilparaben için asetonitril:su ikili karışımında (% 15; v/v) üç farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği	68
Şekil 4.2. Asetanilit ve vanilin için asetonitril:su ikili karışımında (% 15; v/v) üç farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği	68
Şekil 4.3. Sülfametazin için asetonitril:su ikili karışımında (% 15; v/v) üç farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği	69
Şekil 4.4. Sülfametaksazol için asetonitril:su ikili karışımında (% 15; v/v) üç farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği	69
Şekil 4.5. Sülfadiazin için asetonitril:su ikili karışımında (% 15; v/v) üç farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği	69
Şekil 4.6. Sülfametoksipiridazin için asetonitril:su ikili karışımında (% 15; v/v) üç farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği	70
Şekil 4.7. Sülfadimetoksin için asetonitril:su ikili karışımında (% 15; v/v) üç farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği	70
Şekil 4.8. Sülfatiazol için asetonitril:su ikili karışımında (% 15; v/v) üç farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği	70
Şekil 4.9. Sülfakinoksalin için asetonitril:su ikili karışımında (% 15; v/v) üç farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği	71
Şekil 4.10. Metilparaben ve etilparaben için asetonitril:su ikili karışımında (% 17; v/v) üç farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği	71
Şekil 4.11. Asetanilit ve vanilin için asetonitril:su ikili karışımında (% 17; v/v) üç farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği	72
Şekil 4.12. Ofloksasin ve enoksasin için asetonitril:su ikili karışımında (% 17; v/v) dört farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği	72
Şekil 4.13. Marbofloksasin ve siprofloksasin için asetonitril:su ikili karışımında (% 17; v/v) dört farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği	73
Şekil 4.14. Enrofloksasin ve danofloksasin için asetonitril:su ikili karışımında (% 17; v/v) dört farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği	73

Şekil 4.15. Standartların kimyasal formülleri	74
Şekil 4.16. Vanillin, metilparaben ve etilparaben için X TERRA kolonda asetonitril: su ikili karışımında (% 17 ACN; v/v) pH –k grafiği	75
Şekil 4.17. Sülfonamidler için iyonlaşma davranışı	75
Şekil 4.18. Sülfodimetoksin için % 15 ve %17 ACN ortamlarına ait pH-k grafiği	77
Şekil 4.19. Sülfakinoksalin için % 15 ve %17 ACN ortamlarına ait pH-k grafiği	78
Şekil 4.20. Sülfametaksazol için % 15 ve %17 ACN ortamlarına ait pH-k grafiği	79
Şekil 4.21. Sülfametoksipiridazin için % 15 ve %17 ACN ortamlarına ait pH-k grafiği.....	80
Şekil 4.22. Sülfametazin için % 15 ve % 17 ACN ortamlarına ait pH-k grafiği	81
Şekil 4.23. Sülfadiazin için % 15 ve %17 ACN ortamlarına ait pH-k grafiği	82
Şekil 4.24. Sülfatiazol için % 15 ve %17 ACN ortamlarına ait pH-k grafiği	83
Şekil 4.25. Sülfadimetoksin için Yasuda ekstrapolasyonu	84
Şekil 4.26. Sülfakinoksalin için Yasuda ekstrapolasyonu	84
Şekil 4.27. Sülfametaksazol için Yasuda ekstrapolasyonu	84
Şekil 4.28. Sülfametazin için Yasuda ekstrapolasyonu	85
Şekil 4.29. Sülfametoksipiridazin için Yasuda ekstrapolasyonu	85
Şekil 4.30. Sülfatiazol için Yasuda ekstrapolasyonu	85
Şekil 4.31. Sülfadiazin için Yasuda ekstrapolasyonu	86
Şekil 4.32. Kinolonlar için iyonlaşma davranışı	86
Şekil 4.33. Pefloksasinin kimyasal yapısı	87
Şekil 4.34. Pefloksasin için iyonlaşma şeması.....	87
Şekil 4.35. Pefloksasin için 3 farklı ACN derişiminde pH-k ilişkisi (% 35; % 40; % 45).....	88
Şekil 4.36. Pefloksasin için % 35 ACN derişiminde pH-k doğrusal ilişkisi.....	89
Şekil 4.37. Pefloksasin için Yasuda grafiği	89
Şekil 4.38. Enrofloksasin için pH-k grafiği	90
Şekil 4.39. Enrofloksasin için Yasuda grafikleri	91
Şekil 4.40. Enrofloksasin için Yasuda grafikleri	91
Şekil 4.41. Ofloksasin için pH-k grafiği	92
Şekil 4.42. Ofloksasin için Yasuda grafikleri	93
Şekil 4.43. Ofloksasin için Yasuda grafikleri	93

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1. Bazı kinolonların literatür verilerine göre pKa değerleri.....	17
Çizelge 1.2. Bazı kinolonların kromatografik yöntemle hesaplanan pKa değerleri.....	22
Çizelge 1.3. Bazı kinolonların literatür verilerine göre logP değerleri.....	25
Çizelge 1.4. Bazı kinolonların literatür verilerine göre logD değerleri	25
Çizelge 1.5. Sülfonamitler için Lipinski Parametreleri.....	28
Çizelge 1.6. Kinolonlar için Lipinski Parametreleri	28
Çizelge 1.7. Asetonitril-su karışımları için solvatokromik parametreler	44
Çizelge 1.8. Ters faz sıvı kromatografisinde yaygın olarak kullanılan tamponlar	45
Çizelge 2.1. Bileşiklerin hesaplanan logP ve log K _d değerleri	50
Çizelge 2.2. Sülfonamitlerin kapiler elektroforez yöntemiyle belirlenen pKa değerleri.....	50
Çizelge 2.3. Sülfonamitlerin kapiler elektroforez yöntemiyle belirlenen pKa değerleri.....	51
Çizelge 2.4. Siprofloksasin için elde edilen deneysel dağılma katsayıları	52
Çizelge 2.5. Sülfonamitlerin suda ve % 15, 23 ve 30 asetonitril-su ikili karışımlarındaki pKa ₁ ve pKa ₂ değerleri.....	55
Çizelge 2.6. Sarafloksasinin farklı pH'lardaki logPapp değerleri.....	55
Çizelge 2.7. 310.5 K'de Kinolonların ΔH _{wl} , ΔS _{wl} , ΔG _{wl} değerleri	57
Çizelge 2.8. Çalışılan bileşiklerin deneysel verilerle hesaplanmış logP değerleri	58
Çizelge 3.1. Çalışılan Kinolon grubu antibiyotikler ve özellikleri	61
Çizelge 3.2. Çalışılan Sülfonamit grubu antibiyotikler ve özellikleri.....	62
Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	63
Çizelge 4.1. X TERRA kolonda standartların kapasite faktörleri.....	74
Çizelge 4.2. Sülfodimetoksin için % 15 ve %17 ACN ortamlarına ait kromatografik veriler.....	76
Çizelge 4.3. Sülfakinoksalin için % 15 ve %17 ACN ortamlarına ait kromatografik veriler.....	77
Çizelge 4.4. Sülfametaksazol için % 15 ve %17 ACN ortamlarına ait kromatografik veriler.....	78
Çizelge 4.5. Sülfametoksipiridazin için % 15 ve %17 ACN ortamlarına ait kromatografik veriler.....	79
Çizelge 4.6. Sülfametazin için % 15 ve %17 ACN ortamlarına ait kromatografik veriler	80
Çizelge 4.7. Sülfadiazin için % 15 ve %17 ACN ortamlarına ait kromatografik veriler	81
Çizelge 4.8. Sülfatiazol için % 15 ve %17 ACN ortamlarına ait kromatografik veriler	82
Çizelge 4.9. Pefloksasin için % 35, % 40 ve % 45 ACN derişiminde k verileri ..	88
Çizelge 4.10. Enrofloksasin için kapasite faktörü değerleri	90
Çizelge 4.11. Ofloksasin için kapasite faktörü değerleri	92
Çizelge 5.1. Standartların pKa değerleri	94
Çizelge 5.2. Çalışılan sülfonamitlerin pKa ₂ verileri	95
Çizelge 5.3. Pefloksasin için pKa ₁ değerleri ve uç kapasite faktörleri	95
Çizelge 5.4. Enrofloksasin ve ofloksasinin pKa ₁ ve pKa ₂ verileri.....	96
Çizelge 5.5. Enrofloksasin ve ofloksasinin intrinsik kapasite faktörü değerleri...	96
Çizelge 5.6. Mannhold logP ve ClogP değerleri.....	96

Çizelge 5.7. Hesaplanan logP verileri	97
---	----



SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACN	Asetonitril
ADME	Absorbsiyon, Dağılım, Metabolizma, Eliminasyon
BSS	Bağıl standart sapma
CE	Kapiler elektroforez
Da	Dalton
DT50	Bozunma yarı ömrü
EPA	Birleşik devletler çevre koruma ajansı
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografi
k	Kapasite faktörü
LC-DAD	Sıvı kromatografi- Diode array dedektör
LogP	Dağılım katsayısı
LSER	Lineer solvasyon enerji ilişkisi
N	Teorik tabaka sayısı
NLREG	Non lineer regresyon programı
OECD	Avrupa ekonomik kalkınma ve işbirliği örgütü
PABA	Para amino benzoik asit
pKa	Asit iyonlaşma sabiti
RPLC	Ters faz sıvı kromatografisi
Rs	Ayırma gücü
SPARC	Online asitlik sabiti hesaplama programı
SUT	Sistem uygunluk testi
Swiss ADME	Online fizokimyasal özellikleri hesaplama programı
T	Sıcaklık
α	Seçicilik

1. GİRİŞ

Antibiyotikler, halk sağlığının korunması ve bakteriyel hastalıkların tedavisi için kullanılan ilaçlardır. (Phillips vd., 2004). Ayrıca, antibiyotikler, bitkileri ciddi hastalıklardan korumak ve büyümelerine katkıda bulunmak için tarımsal faaliyetler için büyüme destekleyicileri olarak da kullanılmaktadır (Dibner ve Richards, 2005; Stockwell ve Duffy, 2012).

Sülfonamidler, geniş antibakteriyel aktivite spektrumuna sahip bir grup sentetik antimikrobiyal ajandır. Enfeksiyonları tedavi etmek ve profilaktik olarak yem verimliliğini artırmak ve büyümeyi teşvik etmek için kullanılırlar (Sternesjo vd., 1995).

Florokinolon antibiyotikler, çok çeşitli enfeksiyonların tedavisinde kullanılan gram-pozitif ve gram-negatif bakterilere karşı geniş spektrumlu sentetik antimikrobiyal ajanlardır (Sousa vd., 2012). Florokinolonların faydalı özellikleri arasında benzersiz bir antimikrobiyal aktivite spektrumu, elverişli yan etki profilleri, seyrek dozlama (uzun yarı ömürler) ve hem oral hem de parenteral uygulanabilir olmaları yer alır.

Dünya çapında devam eden SARS-CoV-2 (COVID-19) pandemisinin bir sonucu olarak, COVID-19' un bulaşmasını kontrol etmek için aralarında sülfonamidler ve florokinolonların da bulunduğu, antibiyotik kullanımı önemli ölçüde artmıştır (Usman vd., 2020; Biswal ve Balasubramanian, 2022). Bu nedenle, bu bileşiklerin gerek farmakokinetik gerek farmakodinamik özelliklerinin belirlenmesi için in vitro çalışmalara ve klinik deneylere olan ihtiyaç giderek önem kazanmaktadır.

Florokinolonların ve sülfonamidlerin farklı pH'lı çözeltilerde asit-baz davranışı çalışmaları, zwitteriyonik formun, nötr pH'a yakın olan izoelektrik noktalarında baskın olduğunu göstermiştir (Ball ve Mandell, 2003; Ott vd., 2008). Ortamın pH'ının lipofilite üzerindeki etkisi, pH'ın bir fonksiyonu olarak 1-oktanol ile su arasındaki dağılıma katsayısının ölçülmesiyle de değerlendirilmiştir. Elde edilen eğri (log ölçeğinde), izoelektrik noktada maksimum olan parabolik bir şekle sahiptir; bu, izoelektrik noktadaki baskın türlerin en lipofilik (zwitteriyonik ve nötr türler) türler olduğunu göstermektedir. Bu doktora çalışmasında kinolon ve sülfonamid grubu

antibiyotiklerin belirlenen mobil faz derişiminde izoelektronik noktadaki pH'da, dağılma katsayıları tayin edilmiştir.

Bu ilaçları ayırmadaki davranışlarında iyonlaşma sabitlerinin etkin olmasından dolayı öncelikle ters faz sıvı kromatografi yöntemiyle su-organik çözücü karışımlarındaki iyonlaşma davranışları incelenmiş ve pKa değerleri saptanmıştır.

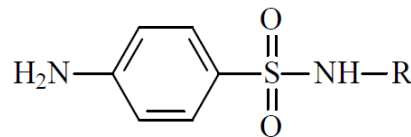
1.1. Sülfonamitler

Sülfonamitler, insanlarda sistemik enfeksiyonlarının tedavisinde kullanılan ilk antimikrobiyal ajanlardır. 1908'de sentezlenen ve boya üretiminde yaygın olarak kullanılan streptosid olarak bilinen ilk sülfonamitdir. Sülfonamitlerin 1935 yılında G. Domagk tarafından antibakteriyel özelliklere sahip olduğu keşfedilmiştir (Baran vd., 2011).

1938'de Domagk, sülfonamitin, prontosilin streptokoklara karşı aktivitesini üzerine yaptığı araştırmaları sonucu Nobel Tıp Ödülünü almaya hak kazanmıştır. Prontosil tedavisini takiben hayatı tehdit eden streptokok ve meningokok enfeksiyonlarının tedavileri, tıp dünyasını antibakteriyel kemoterapi uygulamalarına yönlendirmiştir (Mandell, 1996).

1.1.1. Sülfonamitlerin kimyasal yapısı

Tüm sülfonamitler beyaz veya hafif sarımsı, kokusuz tozlardır ve bazılarının acı bir tadı vardır. Bu maddelerin çoğu suda az çözünür ya da hemen hemen hiç çözünmez.



Şekil 1.1. Sülfonamitlerin genel yapısı (Dmitrienko vd., 2014)

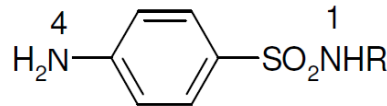
Sülfonamitlerin asitler ve alkaliler içindeki çözünürlüğü, Şekil 1.1.'de görüldüğü üzere yapısındaki bazik aromatik amino grubu (pKa₁ 2-2,5) ve asidik özelliklere sahip

kararsız bir hidrojen atomu içeren amit grubu nedeniyle (pK_{a2} 5-8) amfoterik özelliklerine bağlıdır.

Sülfonamitlerin asidik özellikleri bazik özelliklerinden daha belirgindir ve bu nedenle sülfonamitler asidik ortamda $pH < 2$ 'de pozitif yüklü, $pH 3 - 5$ 'te nötr ve $pH > 5$ 'te negatif yüklüdür (Kümmerer, 2009).

1.1.2. Sülfonamitlerin yapı-aktivite ilişkisi

Sülfonamitlerin antibakteriyel etkisi için minimum ön koşullar, Şekil 1.2 'de gösterildiği gibi sülfanilamidin kendisidir.



Şekil 1.2. N1 ve N4 amino grupları ile sülfonilamid yapısı (Baran vd., 2011)

Bu kemoterapötik ajanların kimyasal yapısı ile etki mekanizmaları arasındaki ilişkiyi gösteren bazı modeller bilinmektedir ve sülfonamitlerin fizyolojik aktivitesinin, kimyasal yapısında bulunan SO_2NH grubunun R pozisyonuna eklenen gruplara göre değiştirilebildiği söylenebilir (Baran vd., 2011).

$-SO_2NH_2$ grubu sadece kükürt atomu aracılığıyla benzen halkasına bağlandığında önemlidir. Şekil 1.2., N4 olarak belirlenmiş para- NH_2 grubunu ve kükürte N1 olarak bağlı NH_2 grubunu göstermektedir (Mandell ve Sande, 1985). Antibakteriyel etkinlik için para- NH_2 grubu esastır. Bu grup asillenirse sülfonamitin in vitro aktivitesi kaybolur (Mandell ve Sande, 1985). N1 amid üzerine heterosiklik aromatik bir halka grubunun geçmesi antibakteriyel etki üzerinde birçok etkiye sahip en etkili ilaçları oluşturur. Kemoterapötik aktivite, N1'deki asetilasyon veya bir amidin grubu süstitüe edilmesi ile engellenmez, ancak yeni özelliklere sahip olabilir. Benzen halkasına herhangi bir grubun bağlanması biyolojik olarak inaktif bileşikler oluşturur (Seydel vd. 1980).

1.1.3. Sulfonamidlerin etki mekanizmaları

Sulfonamidler bakteriyostatik etkiye sahiptir ve Gram-pozitif ve Gram-negatif mikroorganizmaların, bazı mantarların ve bazı protozoaların neden olduğu bazı enfeksiyonların tedavisinde yaygın olarak kullanılan ilaçlardır.



Şekil 1.3. Sulfonamidlerin etki mekanizması (Seydel vd., 1974)

Yapısal olarak sulfonamidler, bakterilerde folik asit (Pteroilglutamik asit, PGA) metabolizmasında hayati bir rol oynayan para-amino benzoik aside (PABA) benzerdir. Daha sonra DNA, RNA gibi esansiyel proteinlerin üretiminde kullanılmıştır. Seydel vd. (1974), E. coli'deki serbest hücre sistemindeki p-aminobenzoik asit türevlerinin etki şekli ve yapı-aktivite ilişkilerini tanımlayarak ve sulfonamidlerin etki mekanizmalarını asitlik sabitleri ile ilişkilendirmiştir. Fildes vd. (1940), p-aminobenzoik asidin (PABA), bakteriyel büyümede etkin rol oynayan bir metabolit olduğunu öne sürmüştür. Sülfanilamidler ve bu asit arasındaki yakın yapısal benzerliğe dikkat çekerek birincisinin, PABA'nın dahil olduğu ve birçok bakterinin normal büyüme ve gelişme için bağlı olduğu enzim sistemini veya sistemlerini bloke ederek hareket edebileceğini öne sürmüşlerdir.

1.1.4. Sulfonamidlerin bakteri direnci

Başlangıçta sulfonamidlere duyarlı bakteriler hem in vitro hem de in vivo direnç kazanabilir. Bu durumun bakteri mutasyonu, doğal seleksiyonu, plazmidlerin transferi, transformasyonu gibi nedenlerden kaynaklandığı varsayılmaktadır. Antibiyotiklerin yanlış kullanımı bakteriyel direncin gelişmesine yol açabilir. Bakteri hücresinin

değiştirilen enzimatik yapısı, sülfonamitlere karşı dirence neden olur. Bu değişiklikler şu şekilde karakterize edilebilir (Mandell vd. 1985).

1. PABA'yı kullanan enzimde değişiklik
2. Sülfonamitlerin inaktivasyonu veya imhası.
3. Esansiyel bir metabolitin alternatif bir yolla sentezlenmesi.

Tüm bunların yanı sıra, bakteriler ayrıca fazla miktarda esansiyel metabolit PABA'yı sentezleyebilir. Bakteriler, sülfonamitlerin etkisini antagonize etmek için aşırı PABA üretebilir. Plazmid-kaynaklı direnç sülfonamitler arasında en sık rastlanan direnç şeklidir ve kendisini ilaç penetrasyon mekanizmasında bozulma ve sülfonamit dirençli dihidropteroat sentetaz artışıyla gösterir. Sülfonamitlerin birine karşı direnç geliştiren organizma, genellikle diğer sülfonamitlere karşı da direnç gösterir (Radstrom vd., 1991).

1.1.5. Sülfonamitlerin antibakteriyel etkisi

Sülfonamitlerin biyolojik aktivitesi ile fizikokimyasal özellikleri arasında bir ilişki kurmak için çok sayıda araştırma yapılmıştır. Önemli kabul edilen çeşitli parametreler Hammett sabit σ , hidrofobiklik sabit π ve pKa değerleridir (Bock vd., 1974.) Mengelers vd. (1997), sülfonamitlerin pKa'larına karşı minimal inhibitör derişimi (MIC) arasında parabolik bir ilişki bulmuşlardır. Sülfonamitlerin optimum aktivitesi için pKa değerlerinin gerekli olduğunu vurgulamışlardır. Ayrıca, in vitro etkinliğin bu bileşiklerin hidrofobikliğinden etkilenmediği, ancak iyonik formların ilaç-reseptör etkileşimlerinde çok önemli olduğu gözlenmiştir.

1.1.6. Sülfonamitlerin kullanım alanları

Sülfonamitler, veteriner hekimlikte koksidiyoz, inflamatuvar bağırsak hastalığı ve çeşitli sistemik, solunum ve idrar yolu enfeksiyonları dahil olmak üzere birçok hastalığın tedavisinde kullanılır.

Veteriner dermatolojide sülfonamitler otitis eksterna tedavisinde ve yanık hastalarında enfeksiyonun önlenmesinde bölgesel olarak kullanılır ve gram pozitif bakteri türlerinin tedavisinde dozları artırılarak kullanılır (Campbell, 1999).

Yapılan araştırmalara göre, sülfonamitler ve florokinolonlar veterinerlik alanında en sık kullanılan antibiyotikler arasındadır. Örneğin, gıdalarda sülfonamitlerin bulunma sıklığı % 20 iken, diğer antibiyotiklerde bu oranlar florokinolonlar % 19, aminoglikozitler % 15, fenikoller % 15, β -laktamlar % 15, oksazolidinonlar % 8 ve tetrasiklinler % 8 şeklinindedir (Cháfer-Pericás vd., 2010).

1.1.7. Sülfonamitlerin yan etkileri

Sülfonamitlerin oluşturduğu çeşitli yan etkilerin sıklığı (% 5) ve şiddeti büyük ölçüde verilen dozla ilgilidir. Bazı sülfonamitler ishal, mide bulantısı, kusma gibi gastrointestinal yan etkiler oluştururlar, Candida mayasının aşırı büyümesi sonucu pamukçuk oluşabilir. Sülfonamitler sıklıkla alerjik reaksiyonlara neden olurlar. Geçmişte alerjik reaksiyon görülen hastalara sülfonamit tedavisi uygulanmamalıdır.

1.1.8. Sülfonamitlerin fizikokimyasal özellikleri

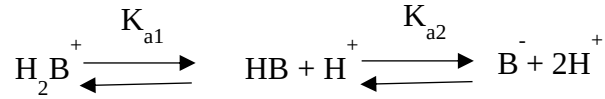
Sülfonamitler amfoterik özelliklerinden dolayı polar moleküllerdir. Aromatik amin (N4) pH 2-3'te protonlanırken, sülfo grubuna bağlı amin (N1) pH 4.5-11'de deprotonasyona uğrar. Toprağa kolayca dağılırlar (toprakta dağılma katsayıları 0.6–7.4 l kg⁻¹). Bu nedenle, çevreye kolay ve hızlı bir şekilde yayılırlar, sülfonamitler aktif karbon üzerine kolayca adsorbe olmazlar. Bozunma yarı ömründe (DT50) >1 yıl, foto ve termal olmak üzere kararlı maddeler olarak sınıflandırılırlar. Fenoller ve aminlerle alkali hidroliz ve etkileşim reaksiyonlarına girebilirler ve hidroksil radikali OH⁻ ile kolayca reaksiyona girebilirler (Baran vd.,2011).

1.1.9. Sülfonamitlerin iyonlaşma sabitleri

Çözücü bileşiminin bir fonksiyonu olarak pK_a değerlerini bilmek, iyonlaşan bileşiklerin ayrılması için sıvı kromatografi (LC) veya kapiler elektroforez (CE) uygulamalarında da önemli bir fayda sağlar. İyonlaşabilen bileşiklerin kromatografik alıkonması ve elektroforetik davranışı, büyük ölçüde bileşiğin pK_a'sına ve mobil faz pH'sına bağlıdır (Beltran vd., 2003; Erdemgil vd., 2007). Dolayısıyla, bir ilaç molekülünün iyonlaşma sabiti, çözünürlük ve ADME özelliklerini belirlediği için ilaç

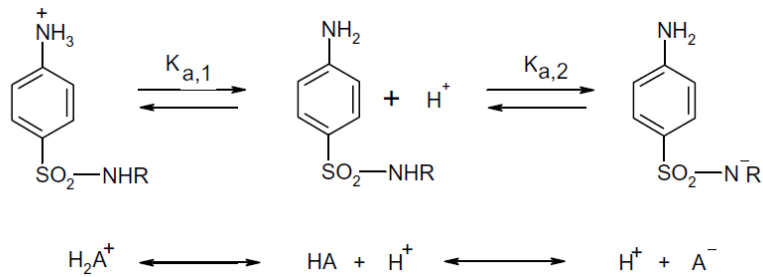
geliştirmede anahtar parametredir. Bu nedenle özellikle yeni ilaç aktif maddeleri geliştirmede pKa artan bir öneme sahiptir (Andrasi vd., 2007).

Sülfonamidler amfoterik bileşiklerdir ve genel iyonlaşma prosesi Şekil 1.4'deki gibidir.



Şekil 1.4. Sülfonamidlerin genel iyonlaşma prosesi

Moleküler form HB, pH azaldıkça katyonik forma, H_2B^+ , pH arttıkça anyonik forma dönüşür. Şekil 1.5., sülfonamidlerin iki aşamalı iyonlaşmasını göstermektedir. K_{a1} ve K_{a2} , sırasıyla aromatik amin ve sülfonik grupların iyonlaşma sabitleridir.



Şekil 1.5. Sülfonamidlerin iyonlaşma dengesi (Sanli vd., 2010)

Bilindiği üzere amitlerde karbonil grubu NH-grubu ile bağlıdır. Sülfonamidlerde ise karbonil grubu yerine SO_2 grubu bulunmaktadır. Sülfonamidler amitlerden ($\text{pK}_a > 14$) kuvvetli, karboksilik asitlerden (pK_a 3-5) zayıf olan antibakteriyellerdir (Sanli vd., 2010).

1.2. Kinolonlar

Kinolonlar, 4-kinolon bileşiğine bağlı bisiklik çekirdek yapısı içeren bir antibiyotik ailesidir (Bisacchi, 2015). Bu ilaçlarda, 1 ve 8 pozisyonlarında bir azot bulunan bir naftiridin çekirdeği ve pozisyon 1'de sadece bir azot içeren kinolin çekirdeği olmak üzere iki tip halka yapısı vardır (Park vd., 2002). Doğada her yerde bulunurlar ve ilaç

geliştirmede çok önemli bir rol oynayan modern ilaç tasarımıdaki anahtar farmakoforlardan biridir (Dhiman vd., 2019).

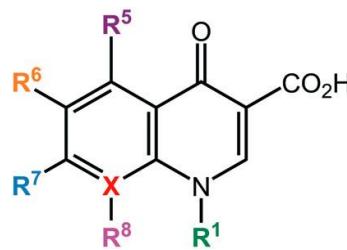
Kinolonların ilk üyesi olan Nalidiksik asit, 1962’de Lesher tarafından sıtma tedavisinde kullanılan klorokininin sentezi esnasında yan ürün olarak tesadüfen keşfedilmiştir. Fakat Nalidiksik asitin kullanım alanı, yetersiz farmakolojik özellikleri nedeniyle üriner sistem enfeksiyonlarının tedavisi ile sınırlı kalmıştır (Lesher vd., 1962; Ball, 2000).

1970-1980 arasında, kinolon sınıfının kapsamı, birinci nesil kinolona kıyasla çok daha geniş bir aktivite spektrumu ve gelişmiş farmakokinetik gösteren florokinolonların çığır açan gelişimi ile önemli ölçüde genişletilmiştir (Adjei vd., 2007).

Kinolonlar, yüksek etki gücü, geniş aktivite spektrumu, uygun biyoyararlanımları, elverişli formülasyonları ve yüksek serum konsantrasyonlarının yanı sıra nispeten düşük yan etki göstermesi nedeniyle elli yılı aşkın süredir antibiyotik olarak kullanılmaktadır (Andersson ve MacGowan, 2003).

1.2.1. Kinolonların kimyasal yapısı

Kinolonların kimyasal yapısı sabit olmayıp bileşiğe göre önemli değişiklikler gösterir. Temel yapı olarak 3-karboksil-4-kinolon çekirdeğini içerirler (Martinez vd., 2006).



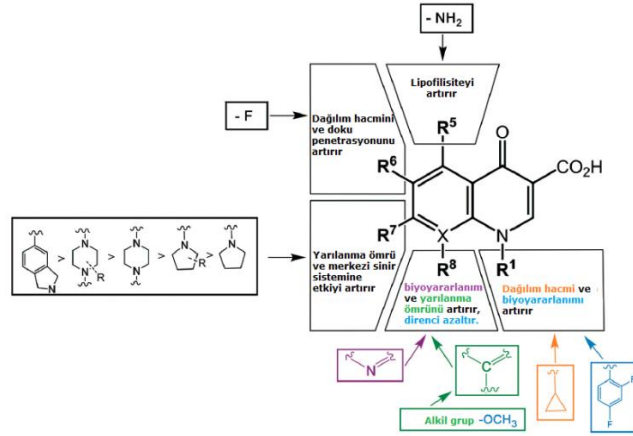
Şekil 1.6. Kinolonların genel yapısı (Pham vd., 2019)

Florokinolonların, moleküler ağırlıkları genellikle 300 ila 500 Da arasındadır. Yapısında bulunan karboksilik grup ve pozisyon 7’de bulunan amin grubu nedeniyle, florokinolonlar amfoterik özellik gösterirler. Bu nedenle, çözelti içinde pozitif, zwitter iyonik, nötr ve negatif formlara karşılık gelen dört farklı kimyasal tür olarak

bulunabilirler. Bu türlerin dağılımı, florokinolonun iyonlaşma sabitine ve çözeltinin pH'sına bağlıdır. Bu farklı moleküler türler, farklı fizikokimyasal özelliklere sahiptir. İyonlaşan formlar nötr formlara oranla daha lipofiliktir. Sudaki çözünürlükleri ve membran geçirgenliği daha yüksektir (Babić vd. 2007).

1.2.2. Kinolonların farmakokinetik özellikleri

Kinolonların farmakokinetiğini iyileştirmeye yönelik temel yapısal modifikasyonlar, R5, R6, R7 ve R8 pozisyonlarında yapılmaktadır. Bu modifikasyonlar, eliminasyon yarı ömrünün uzun olmasına, artan hacim dağılımına, doku penetrasyonunun ve biyoyararlanımın daha iyi olmasına imkan sağlar (Şekil 1.7.).



Şekil 1.7. Kinolonların yapı-farmakokinetik ilişkisi (Pham vd., 2019)

R5 konumuna bir amino grubunun eklenmesi, sparfloksasin yapısından da anlaşıldığı üzere kinolonların lipofilik özelliğini arttırmaktadır (Domagala, 1994). R6 pozisyonundaki flor sübstitüenti bakteri hücresine nüfuz etmeyi kolaylaştırır ve ayrıca ilacın dağılım hacmini geliştirmektedir (Gootz ve Brighty, 1996). R7 konumuna belli grupların eklenmesi ile yarı ömür ve bakteriyel doku penetrasyonu geliştirilmiştir (Adjei vd., 2006). R7'deki azabisiklik grup ve piperazin grubu, lipofilikliği artırarak ajanların yarı ömrünü uzatmaktadır (Brighty ve Gootz, 1997; Ball, 2000). Bu pozisyona ilave edilen diğer bir grup ise pirolidin halkalarıdır; bu modifikasyon ile kinolonların gücünü arttırmak amaçlansa da istenmeyen suda çözünürlük ve oral biyoyararlanım problemleri ile karşılaşmıştır. Bu problemleri bertaraf etmek için, gemifloksasin ve trovafloksasin gibi kinolonların, halkalarına bir metil grubu ilave

edilmiştir (Lowe ve Lamb, 2000). Bununla birlikte, halkaların R7 pozisyonundaki alkilasyonu, ajanların eliminasyon yarı ömrünü ve biyoyararlanımını artırmıştır. Piperazin halkalarına bir metil grubunun eklenmesi, yapısında sadece piperazin grubuna sahip olan kinolonlarla (enofloksasin, norfloksasin ve siprofloksasin) ile karşılaştırıldığında eliminasyon yarı ömrünü önemli ölçüde artırmıştır. R8 pozisyonundaki alkilasyonun eliminasyon yarı ömrünü ve ayrıca ajanların doku penetrasyonunu artırmıştır (Dong vd.,1998).

1.2.3. Kinolonların yapı-aktivite ilişkisi

Kinolonlar aktivite spektrumlarına göre dört kuşakta sınıflandırılır (Naber ve Adam, 1998). Daha geniş spektrum aktivitesi elde etmek için nesilden nesile kinolonların geliştirilmesi, çekirdek yapı üzerinde farklı pozisyonlara farklı sübstütientlerin eklenmesiyle ilerlemiştir.

Birinci nesil kinolon aktivitesi, *Pseudomonas* türleri hariç, yalnızca Gram negatif organizmalarla sınırlıdır (Blondeau, 2004).

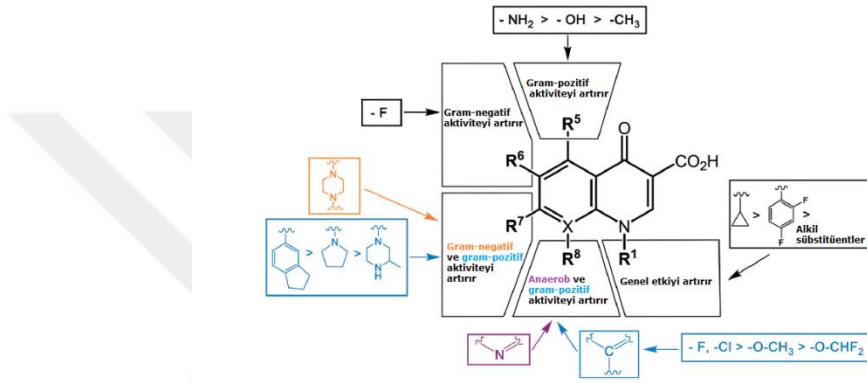
İlk ikinci nesil kinolon, flumequine, R6 pozisyonuna bir florin (F) atomu ekleyerek aktivite spektrumunu önemli ölçüde iyileştirebileceğini gösteren önemli bir keşiftir (Pharma vd., 2009). Dördüncü kuşaktan son bulunan bazı bileşikler haricinde, hemen hemen tüm kinolon antibiyotikleri florokinolonlar olarak adlandırılmaktadır ve bu değişiklik kinolon aktivitesini önemli ölçüde artırmaktadır.

İkinci kuşak florokinolonlar arasında, *Pseudomonas* türleri dahil tüm Gram-negatif organizmaları inhibe edebilen enoksasin, norfloksasin ve siprofloksasin bulunur (Patrick, 2003).

7 numaralı karbona bağlı piperazin halkası gram-negatif bakterilere karşı etkinliği artırırken, R1 pozisyonuna yerleştirilen bir substituent ise hem gram-pozitif hem de gram-negatif bakterilere karşı antimikrobiyal etkiyi artırmaktadır (Wright vd., 2000). Bu kombinasyon, siprofloksasini ikinci neslin ilk bileşikleri arasında en aktif bileşik haline getirirken aynı zaman da onu bugün *Pseudomonas aeruginosa*'ya karşı kullanılan ilk seçenek haline getirmiştir (El Solh ve Alhajhusain, 2009)

İkinci grubun R8 konumuna bir -OCH₃ sübstütientinin eklenmesi de Gram-pozitif aktivitenin iyileştirilmesine yardımcı olmuştur (Ledoussal vd., 1999).

Fleroksasin sentezi ile kinolonlar üçüncü nesilde de yerini almıştır. Bu nesil kinolonlar, alkillenmiş piperazin ve pirolidin gruplarının R7 konumuna ve -NH₂, -OH ve -CH₃ gruplarının R5 konumuna eklenmesi ile oluşturulmuştur. Üçüncü nesil kinolonlara ayrıca R8 pozisyonunda bir kloro grubu (Cl) gibi yeni sübstütientler eklenerek, ilacın anti-Gram-pozitif aktivitesini iyileştirilmiştir (Ledoussal vd., 1999).



Şekil 1.8. Kinolonların yapı-aktivite ilişkisi (Pham vd., 2019)

R5 pozisyonundaki grubun manipölasyonunun Gram-pozitif organizmalara karşı aktiviteyi arttırdığı gözlemlenmiştir (Yoshida, 1996; Macgowan, 1999). Bu pozisyonundaki yer değiştirme ile antibakteriyel etkinin sırasıyla -CH₃, -OH, -NH₂ düzeninde arttığı gözlenmiştir (Van Bambeke vd. 2005).

Dördüncü nesil bileşiklerin aktivite spektrumu, anaerobik organizmalara karşı aktivite ilavesi ile üçüncü neslin tüm kriterlerini kapsar (Naber ve Adam, 1998). R8 pozisyonunda nitrojen (N) varlığı, anaeroblara karşı geliştirilmiş aktiviteden sorumluyken (Tillotson, 1996), N pozisyonundaki 2,4-diflorofenil grubu ilacın genel etkinliğini iyileştirir (Domagala, 1994).

1.2.4. Kinolonların kullanım alanları

Florokinolonlar en yaygın kullanılan ilaçlardır. Basit idrar yolu enfeksiyonları için, genellikle E. coli gibi duyarlı organizmaların neden olduğu sistiti olan genç kadınlarda, kullanılmaktadır (Gupta vd., 2003). Ancak tam tedavi için 7 günlük bir kullanım

önerilmektedir (Nicolle, 2002). Florokinolonların prostat tedavisinde de önemli bir yere sahip olduğu kanıtlanmıştır (Dalhoff ve Weidner, 1988).

Birçok solunum yolu patojeni, *H. influenzae*, *M. catarrhalis*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* ve *L. pneumophila* dahil florokinolonlara duyarlıdır (Lee vd., 1991). Siprofloksasin, levofloksasin ve moksifloksasin, akut bakteriyel sinüzit tedavisi için diğer ajanlara eşdeğer bulunmuştur (Siegert vd., 2000; Poole vd., 2006).

Karşılaştırmalı araştırmalar, florokinolonların, basit deri enfeksiyonlarının tedavisinde baskın patojenler olarak diğer oral ajanlar (genellikle sefalekssin) kadar etkili olduğunu göstermektedir (Karchmer, 2003).

Basit enfeksiyonlar için özel bir avantaj sağlamazlar, ancak geniş spektrumlarının cerrahi veya travmatik yara enfeksiyonlarının, ısırıkların veya diyabetik ayak ülserlerini de kapsayan daha ileri derece enfeksiyonların tedavisinde özellikle faydalıdır (Gentry, 1991; Graham vd., 2002; Giordano vd., 2005)

Florokinolonlar, kolera, antraks, veba, bruselloz ve tulerami gibi durumlarda kullanılmaktadır.

Tüm dünyada hala devam etmekte olan SARS-CoV-2 (COVID-19) pandemisinde COVID-19' un bulaşmasını kontrol etmek ve tedavi etmek için florokinolon grubu antibiyotikler kullanılmaktadır (Usman vd., 2020; Biswal ve Balasubramanian, 2022).

1.2.5. Kinolonların yan etkileri

Kinolonlar ne kanserojen ne de mutajeniktir. Kinolon antibiyotikleri alırken ortaya çıkan önemli yan etkiler nadirdir ve hastaların sadece % 2'si toksisite nedeniyle tedaviyi bırakmaktadır (Hooper ve Wolfson, 1991).

En sık görülen yan etki mide bulantısı, baş ağrısı, kusma veya abdominal rahatsızlıktır ve hastaların % 7' sine kadar görülür. Hastaların % 14'ünde baş ağrısı, baş dönmesi ve uyku bozuklukları meydana gelir. Büyük psikotik hastalıklar için tedavi gören hastalarda deliryum ve halüsinasyonlar dahil daha şiddetli davranış bozuklukları

bildirilmiştir. Hastaların yaklaşık % 2'sinde geri dönüşümlü, spesifik olmayan bir deri döküntüsü olmaktadır ve nadiren de olsa ışığa karşı duyarlılık ortaya çıkar (Hooper ve Wolfson, 1991).

Kinolon kullanımıyla ilişkili diğer nadir reaksiyonlar, artraljiler, kristalüri, hafif lökopeni, anemi ve karaciğer fonksiyon testi anormallikleridir (Christian, 1996).

1.2.6. Kinolonların absorpsiyonu ve atılımı

Kinolon antibiyotiklerinin oral uygulamadan sonra emilimi oldukça iyidir ve hücrelere, ekstrasvasküler alanlara ve dokulara çok iyi nüfuz ederler. Kinolonlar kemik, böbrek, prostat ve beyaz kan hücrelerinde yoğunlaşmıştır. Çoğu salgıda bulunurlar, idrarda ve dışkıda birikirler (Walker ve Wright, 1991). Fakat bu durumun aksine aksine, merkezi sinir sistemine penetrasyon minimumdur; ofloksasin bir istisnadır. Bu ilaçların yarılanma ömürleri uzun olup doz sonrası güçlü baskılayıcı etkileri vardır (Saravanos ve Duff, 1992).

Böbrekler tarafından değişmeden atılan ofloksasin dışında kinolonlar, hepatik metabolizma ve renal atılım ile elimine edilir. Bununla birlikte, böbrek yetmezliği, eliminasyonu karaciğer fonksiyon bozukluğundan daha büyük ölçüde etkiler. Çünkü hepatik metabolizma, tüm bu ajanların eliminasyonunun küçük bir bileşenidir (Neu, 1992; Stratton, 1992).

1.2.7. Kinolonların fizikokimyasal özellikleri

Florokinolonlar yapılarında iki iyonlaşan fonksiyonel grup içeren kimyasal yapıları nedeniyle zwitteriyonik türler olarak adlandırılırlar. Düşük pK_a değeri asidik karboksilik grupla ilişkilendirilirken diğer pK_a değeri bazik amin grubu ile bağlantılıdır. (Martinez vd., 2006).

Amfoterik florokinolonlar, belirli pH'ta çözeltideki bir molekülün yüklenmesinden sorumlu olan, benzer bazikliğe sahip iki proton bağlayıcı bölge (bir karboksil ve bir sekonder amin grubu) içerir ve bu nedenle iyonlaşan bileşikler için logP değeri pH değerine bağlıdır (Langlois vd., 2005).

Ancak bazı araştırmacılar üç pK_a değerine sahip olduğu kanısındayken, diğer grup, florokinolonlarda bir karboksilik grup ve 3 bazik azot grubunun varlığını dikkate alarak dört pK_a değerine sahip olduğunu savunmaktadırlar (Lin vd., 2004; Qiang ve Adams, 2004). Takács-Novák ve ekibi ise sadece nötral türlerin lipofilik olduğunu dolayısıyla organik fazdaki iyonların çözünürlüğünün ihmal edilebileceği görüşündedirler (Takács-Novák vd., 1995).

pK_a tayinlerinde, kullanılan tampon sistemi ve deneysel koşullara göre değerlerin farklılık göstereceği dikkate alınmalıdır. (Barbosa vd., 1999; Barron vd., 2001; Sanz-Nebot vd., 2001).

Amfoterik karakterlerinden dolayı çoğu florokinolonun fizyolojik pH değeri nötraldir. Bu özellik florokinolonların biyolojik membranlar aracılığıyla serbest difüzyon yapmasını sağlar.

pH değerleri pK_{a1} değerinin altında kalıyorsa bu kinolonların pozitif yüklendiği anlamına gelmektedir. Bu düşük pK_a değerleri, sulu çözeltide çözünen ilacın pH aralığını belirler, dolayısıyla süspansiyonların ve tabletlerin çözünmesinde önemli bir rol oynar. pK_{a2} değerinin üzerinde kalan pH değerlerinde kinolonlar negatif yüklüdürler.

Florokinolonların suda çözünürlüğü genellikle, pH 6 ve pH 8 aralığında düşüktür. pK_{a1} ve pK_{a2} arasında kalan pH değerlerinde ise bu zwitteriyonik türler negatif yüklüdür. Böylece biyolojik membranlardan kolayca geçebilirler. Fakat sıvı çözeltilerde çözünürlükleri düşüktür. Bu nedenle; kinolonların oral ve parenteral uygulamalarının sıvı formülasyonlarında, kolay çözünebilen tuzlar kullanılmaktadır. Tablet, kapsül gibi katı formülasyonlarında ise ya betain ya da hidroklorik tuzu formundadır (Aiello ve Mays, 1998).

Pasif difüzyon, florokinolonlarda iki iyonlaşabilen türün pK_a değerleriyle ilişkili olan lipofilisitenin bir fonksiyonudur. pK_a 'nın biyoyararlanım üzerine etkisi enrofloksasin ve ofloksasin üzerinden daha net anlaşılabilir. Enrofloksasinin suda çözünürlüğü pH 5,02'de maksimum iken, pH 6,0-8,0 aralığında ise en düşük çözünürlüğe sahiptir. Buna karşın aynı pH aralığında maksimum lipit çözünürlüğüne sahiptir. Bu durum

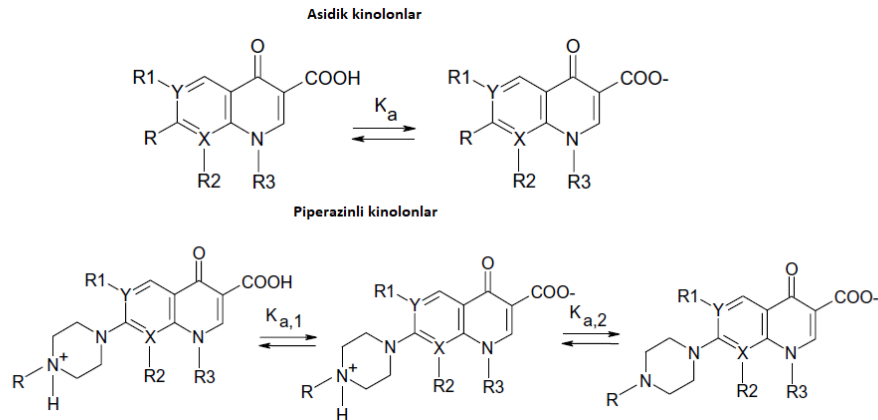
biyolojik dokulara olan difüzyonu kolaylaştırır. İlacın en fazla su fazından yağ fazına (oktanol/su dağılımı) geçtiği pH değeri ise 7,0'dır (Lizondo vd., 1997).

Enrofloksasinle benzer olarak, ofloksasinde de en yüksek absorpsiyon, lipit çözünürlüğünün maksimum olduğu nötral pH'da gerçekleşmektedir. pH 7,0'nin altında veya üstünde ofloksasinin absorpsiyonu azalmaktadır (Rabbaa vd., 1997).

1.2.8. Kinolonların iyonlaşma sabitleri (pK_a)

Sıvı kromatografi uygulamalarında florokinolonların iyonlaşma sabitlerini bilmek özellikle önemlidir, çünkü alıkonma süreleri, çözelti içinde bulunan moleküler türlere bağlıdır (Babić vd., 2007).

4. pozisyondaki karboksilik grup, bu bileşikleri asidik yapar. 7-piperazinil kinolonlar bazik olan ek amin grupları içerir, bu nedenle sulu bir çözelti içinde 7-piperazinil kinolonlar katyonik, zwitteriyonik ve anyonik üç farklı tür gösterirken diğer kinolonlar yalnızca nötr veya anyonik olabilir. Bu iki tür kinolon için mevcut denge, Şekil 1. 9. 'da gösterilmektedir (Babić vd., 2007)



Şekil 1.9. Asidik kinolonların ve piperazinil kinolonların asit-baz dengesi (Babic vd., 2007)

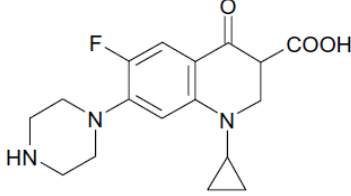
Yalnızca bir pK_a değerine sahip kinolonlar, asidik kinolonlar olarak adlandırılır ve iki pK_a değeri olanlara (bir piperazinil halkasının varlığından dolayı) piperazinil kinolonlar olarak adlandırılır. Asidik kinolonlar (flumekin ve nalidiksik asit) için

bildirilen pK_a değerleri 5,95 ila 6,35 arasında değişmektedir (Hernández-Arteseros vd., 2002; Park vd., 2002)

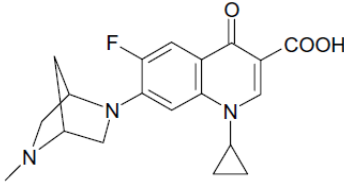
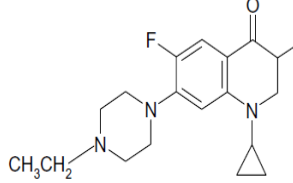
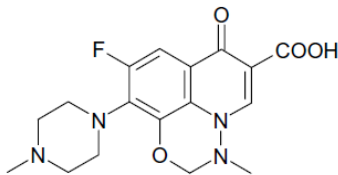
Tüm kinolonlar, amonyum grubundan daha güçlü asit olan bir karboksil grubuna sahiptir ve pK_a değeri 6 ± 1 dir. Bu nedenle pK_{a1} değerlerinin, karboksil grubu ile ilişkili olduğu düşünölmektedir. pK_{a2} değerleri, bir piperazin halkasının varlığı ile ilişkili olduğu düşünölmektedir. NMR ölçümleri protonlanmanın, piperazin halkasının N4'ünde bazik bölgede geręekleřtięini kanıtlamıştır (Barbosa vd., 1997).



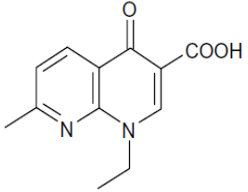
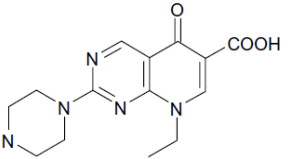
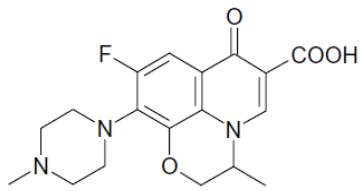
Çizelge 1.1. Bazı kinolonların literatür verilerine göre pKa değerleri

Bileşik adı	Kimyasal yapı	pK _a	Yöntem	Referans
Siprofloksasin		6,42 ± 0,01; 8,29 ± 0,04	UV/pH titrasyon (MDM-su)	(Völgyi vd., 2002)
		6,28 ± 0,02; 8,56 ± 0,05	UV/pH titrasyon (MeOH-su)	
		6,09; 8,62	Potansiyometri	(Barbosa vd., 1997)
		5,86 ± 0,05; 8,24 ± 0,07	Kapiler elektroforez	(Jiménez-Lozano vd., 2002)
		6,33 ± 0,01; 8,84 ± 0,04	Kapiler elektroforez-DAD	
		3,01 ± 0,30; 6,14 ± 0,13; 8,70 ± 0,09; 10,58 ± 0,30	Potansiyometri	(Qiang ve Adams, 2004)
		5,05 ± 0,15; 6,35 ± 0,07; 8,95 ± 0,04	Kapiler elektroforez	(Lin vd., 2004)
		5,90 ± 0,15; 8,89 ± 0,11	Potansiyometri/ florometri	(Drakopoulos ve Ioannou, 1997)
		6,08; 8,58	UV/pH	(Montero vd., 1997)
		6,16; 8,62	Potansiyometri	(Bermejo vd., 2004)
		6,18 ± 0,01; 8,73 ± 0,01	Spektrofotometri	(Sun vd., 2002)
		6,19; 8,54	Robertson Microlit Laboratories	(Renau vd., 1995)
		6,00; 8,80		(Kitzes-Cohen, 1987)
		6,09; 8,74	Çözünürlük (Solubility method)	(Ross vd., 1992)
		5,51 ± 0,03; 8,38 ± 0,13	Kapiler elektroforez-DAD	

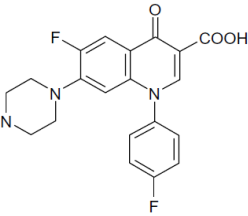
Çizelge 1.1. Bazı kinolonların literatür verilerine göre pKa değerleri (Devam)

Bileşik adı	Kimyasal yapı	pKa	Yöntem	Referans
Danofloksasin		$6,07 \pm 0,06; 8,56 \pm 0,07$	Kapiler elektroforez	(Jiménez-Lozano vd., 2002)
		$6,32 \pm 0,02; 8,73 \pm 0,05$	Kapiler elektroforez-DAD	
Enrofloksasin		$5,88 \pm 0,03; 7,74 \pm 0,03$	Kapiler elektroforez	(Jiménez-Lozano vd., 2002)
		$6,09 \pm 0,01; 7,91 \pm 0,05$	Kapiler elektroforez-DAD	
		$3,85 \pm 0,30; 6,19 \pm 0,18; 7,59 \pm 0,25; 9,86 \pm 0,30$	Potansiyometri	(Qiang ve Adams, 2004)
		$5,89 \pm 0,05; 8,24 \pm 0,07$	Kapiler elektroforez	
		$6,12 \pm 0,05; 7,68 \pm 0,42$	UV/pH	(Montero vd., 1997)
		$6,27; 8,3$		(Tolls, 2001)
Marbofloksasin		$5,69 \pm 0,10; 8,02 \pm 0,20$	Kapiler elektroforez	(Jiménez-Lozano vd., 2002)
		$5,51 \pm 0,03; 8,38 \pm 0,13$	Kapiler elektroforez-DAD	

Çizelge 1.1. Bazı kinolonların literatür verilerine göre pKa değerleri (Devam)

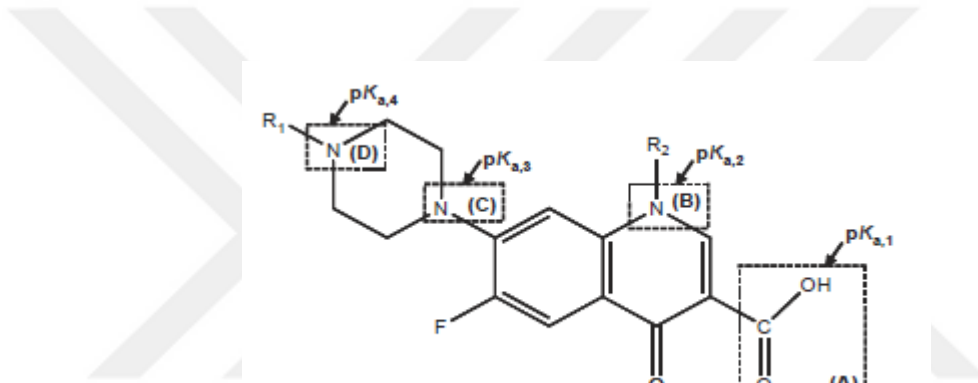
Bileşik adı	Kimyasal yapı	pKa	Yöntem	Referans
Nalidiksik asit		5,95	Potensiyometri	(Barbosa vd., 1997)
		6,01 ± 0,05	Kapiler elektroforez	(Jiménez-Lozano vd., 2002)
		6,04 ± 0,05	Kapiler elektroforez-DAD	
		6,00 ± 0,01	Kapiler elektroforez	(Lin vd., 2004)
		5,95	Spektrofotometrik	(Ross vd., 1992)
Pipedimik asit		5,42 ± 0,05; 8,18 ± 0,09	Kapiler elektroforez	(Jiménez-Lozano vd., 2002)
		5,59 ± 0,02; 8,33 ± 0,01	Kapiler elektroforez-DAD	
		5,25 ± 0,12; 6,15 ± 0,06; 8,90 ± 0,04	Kapiler elektroforez	(Park vd., 2002)
Ofloksasin		6,22 ± 0,05; 7,81 ± 0,08	UV/pH titrasyon (MDM-su)	(Völgyi vd., 2002)
		6,15 ± 0,04; 8,19 ± 0,06	UV/pH titrasyon (MeOH-su)	
		6,05; 8,11	Potensiyometri	(Barbosa vd., 1997)
		5,20 ± 0,06; 6,20 ± 0,03; 8,20 ± 0,02	Kapiler elektroforez	(Lin vd., 2004)
		5,97 ± 0,08; 8,28 ± 0,02	Potansiyometri/ florometri	(Drakopoulos ve Ioannou, 1997)
		6,05; 8,22	Spektrofotometrik	(Ross vd., 1992)
		5,70; 7,90		(Kitzes-Cohen, 1987)

Çizelge 1.1. Bazı kinolonların literatür verilerine göre pKa değerleri (Devam)

Bileşik adı	Kimyasal yapı	pKa	Yöntem	Referans
Sarafloksasin		5,62 ± 0,08; 8,18 ± 0,09	Kapiler elektroforez	(Jiménez-Lozano vd., 2002)
		5,87 ± 0,01; 8,88 ± 0,08	Kapiler elektroforez-DAD	
		5,89; 8,59	Potansiyometri	(Bermejo vd., 2004)
		6,02; 8,59	Robertson Microlit Laboratories	(Renau vd., 1995)

Bir florokinolon, bir karboksilik grup ve üç temel azot bölgesi içerir. Bu nedenle muhtemelen maksimumda dört pK_a değerine sahiptir.

1-naftoik asidin benzen halkasına bağlı karboksilik gruba karşılık gelen bir pK_a 'ya (3,69) sahip olduğu bilinmektedir. 1-naftoik asit ve florokinolonlar arasındaki yapısal benzerlik nedeniyle, florokinolonların pK_{a1} 'i karboksilik grubu olarak düşünülebilir. Kalan üç pK_a değerini azotlu bölgelerde belirlemek zordur. (Qiang ve Adams, 2004). Buckingham vd. (1990) iyonlaşma sırasına göre A, B ve D kısımları olarak üç asidik sabite dikkat çekmektedir. Elektron yoğunluğuna bağlı olarak türlerin bulunma yoğunluğunun, B'den D'ye arttığı üç azot bölgesinde pK_{a2} ; B, pK_{a3} ; C ve pK_{a4} te D'yi temsil etmektedir.



Şekil 1.10. Florokinolonların pK_a değerlerine karşılık gelen spesifik türler (Qiang ve Adams, 2004)

Quiang ve Adams (2004) bunu baz alarak yaptıkları çalışmada siprofloksasin, enrofloksasin ve norfloksasin için pK_{a4} 'ün sırasıyla 10,58, 9,86 ve 10,56 olduğunu belirlemişlerdir. Siprofloksasin ve norfloksasin, aynı D türünü (dimetilamine benzer) içerir bu nedenle benzer pK_{a4} davranışı sergiler; bu arada, enrofloksasin, farklı bir pK_{a4} değeri ile sonuçlanan farklı bir D türü (trimetilamine benzer) içerir; Dimetilamin ve trimetilaminin pK_a değerleri sırasıyla 10,73 ve 9,80'dir (Albert ve Serjeant, 1984). Bunlar siprofloksasin, enrofloksasin ve norfloksasinin'un pK_{a4} 'ü ile uyumludur.

Barbosa vd., (1998), bazı kinolonların kromatografik yöntemle iyonlaşma davranışlarını incelemişlerdir ve Çizelge 1.2'de gösterilen asetonitril yüzdesi 30, 35, 40,50 olan asetonitril-su ikili karışımlarını kullanılarak pK_a değerleri elde etmişlerdir.

Çizelge 1.2. Bazı kinolonların kromatografik yöntemle hesaplanan pKa değerleri (Barbosa vd., 1998)

Bileşik adı	% 30		% 35		% 40		% 50	
	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₁	pKa ₂	pKa ₁	pKa ₂
Norfloksasin	6,27 (0,08)	8,35 (0,07)	6,14 (0,15)	8,61 (0,15)	6,53 (0,15)	8,28 (0,13)	6,88 (0,06)	8,82 (0,07)
Fleroksasin	5,83 (0,04)	7,58 (0,03)	5,84 (0,05)	7,71 (0,05)	5,96 (0,10)	7,71 (0,09)	6,32 (0,05)	8,05 (0,05)
Enoksasin	6,28 (0,11)	8,28 (0,11)	–	–	6,59 (0,15)	8,13 (0,12)	6,81 (0,06)	8,73 (0,07)
Ofloksasin	6,10 (0,04)	7,99 (0,03)	–	–	6,45 (0,12)	7,95 (0,10)	6,63 (0,06)	8,42 (0,06)
Flumekin	–	–	7,84 (0,04)		–	–	–	–

Sonuç olarak, oluşumlarını, davranışlarını ve etkilerini tahmin etmek için ilgili ilaç etkin maddelerinin iyonlaşma sabitlerini bilmek çok önemlidir.

1.3. Lipofilisite

n-oktanol-su dağılma katsayısı (logP) veya dağılma katsayısının (logD) logaritması ile ifade edilen lipofilisite, iyonlaşan moleküler türler içeren yeni ilaç moleküllerinin tasarımında, toksikolojik özellikleri etkilediği gibi hem farmakokinetik hem de farmakodinamik davranışı etkileyen büyük öneme sahip bir fizikokimyasal özelliktir (Giaginis vd., 2018). Yirminci yüzyılın başlarında, Meyer (1899) ve Overton (1901)'un narkozun korelasyonunu, yağ-su dağılma katsayıları ile açıklamalarıyla biyolojik aktivitede lipit çözünürlüğünün önemi, ortaya konmuştur. Bununla birlikte, lipofilisite üzerine yapılan sistematik çalışmaların öncüsü olan Hansch ve Fujita (1964) ve Leo (1971) tarafından, bu özelliği hem bir ilacın etki alanına erişme olasılığı hem de makromoleküllere hidrofobik bağlanması ile ilişkilendirmişlerdir. Yine aynı ekip, n-oktanol-su kavramını, dağılma katsayıları için deneysel bir skala oluşturmuşlar ve referans sistem olarak bilim dünyasına kazandırmışlardır. LogP' yi, bileşiğin monomerik türlerde bulunduğunu dikkate alarak, dağılma çözücüsündeki (n-oktanol) bileşiğin nötral türlerinin konsantrasyonunun sudaki aynı türlerin konsantrasyonuna logaritması olarak tanımlamışlardır.

$$\log P = \log [n\ddot{o}tral\ t\ddot{u}rler]_{oct} / [n\ddot{o}tral\ t\ddot{u}rler]_{su} \quad (1.1)$$

Lipofilisite, iyonlaşabilen bileşikler için pH'nın bir fonksiyonu olarak değişir. LogD değeri, belirli bir pH'ta lipofilisiteyi gösterir ve organik ve sulu fazdaki tüm elektriksel (monomerik) türlerin konsantrasyonlarının oranının logaritmasına karşılık gelir.

$$\log D = \log [tüm\ türler]_{oct} / [tüm\ türler]_{su} \quad (1.2)$$

Tek bir iyonlaşan gruba sahip bir çözünen için, logD, nötr tür P^N 'nin dağılma katsayısı ve iyonlaşan tür P^I 'nin dağılma katsayısının, her biri karışımında bulunan fraksiyonu f ile çarpılarak toplanması ile bulunur.

$$\log D_{pH} = \log(f_N \cdot P^N + f_I \cdot P^I) \quad (1.3)$$

Eğer çözünen maddenin pK_a 'sı biliniyorsa, logP ve logD, sadece nötral türlerin organik çözücüye dağılması şartıyla birbirine dönüştürülebilir.

$$\log P = \log D + \log[10^{\pm(pH-pK_a)}] \quad (1.4)$$

Bununla birlikte iyonlaşmanın yüksek olduğu durumlarda, yüklü türler bir karşıt iyon ile birlikte, n-oktanol'de dağılabilen iyon çiftleri oluşturarak gerçek logD (true logD) değerine katkıda bulunurlar. Ayrıca n-oktanol de bulunan doymuş suya da dağılabilirler (Tsantili-Kakoulidou, 1997; Avdeef, 2003).

LogP ve logD hesaplamalarında birden fazla iyonlaşabilen gruba sahip çözünen maddeler için, tüm pK_a 'ların hesaba katıldığı, karmaşık denklemler kullanılır. Amfolitler söz konusu olduğunda, logP, logD'den sadece asidik pK_a , bazik pK_a dan büyükse hesaplanabilir. Zwitteriyonik türler oluşturan amfolitler için, gerçek logP değeri (true logP values) olmadığı için izoelektrik noktadaki maksimum logD (logD_{max}) dikkate alınır. Zwitterionik ilaçların belirli özellikleri, farmakokinetik özelliklerini de etkileyebilir (Pagliara vd., 1997)

1.3.1. İlaç etkinliğinde lipofilisitenin önemi

Lipofilisite, membran geçirgenliğini etkilediği için, ilacın etki alanına erişebilirliği açısından temel bir parametredir. Membran geçirgenliğinde belirli biyolojik engellerden geçme için optimum logP (logP_o) veya logD (logD_o) değerleri

tanımlanmıştır (Hansch vd., 1987; Dearden, 1990; Tsopelas, 2017). Kan-beyin bariyeri ve merkezi sinir sistemi bariyeri penetrasyonu için, optimum bir lipofilisite değeri 2 civarında kabul edilir. Geçirgenlik ve logD arasındaki sigmoidal ilişkiler de rapor edilmiştir (Camenisch, 1998a, b).

Öte yandan, hidrofobik bağlanma genellikle logP ile doğrusal olarak ilişkilidir. Hidrofobik bağlanma, dolaylı, spesifik olmayan bir "bağ" olarak kabul edilir. Su moleküllerinin, polar olmayan yüzeyler ile etkileşime girerek yer değiştirmesi ve dolayısıyla entropi de artışa yol açmasının sonucunda ortaya çıkar (Freire, 2004; Snyder, 2011). İlaç moleküllerinin yüksek lipofilikliği, hidrofobik bağlanmayı kolaylaştırır ve hedef reseptöre afiniteyi artırabilir. Bu tür bağlanma çalışmalarında lipofilikliğin, iyonlaşan bileşiklerin varlığında bile nötral türlerin logP'si ile ifade edildiği unutulmamalıdır.

Bununla birlikte, yüksek lipofilisitenin istenmeyen ilaç özellikleriyle ilişkili olduğuna dair güçlü kanıtlar vardır. Genel olarak, çok lipofilik bileşiklerin biyotransformasyon için "tercih edilen" hedefler olduğu ve dolayısıyla ileri derecede ve öngörülemez metabolizmaya yol açtıkları düşünülmektedir. İlaç etkinliğini ve ilaç güvenliğini etkileyen ve genellikle ilaç-ilac etkileşimlerinden sorumlu olan yüksek plazma protein bağlanması, yüksek düzeyde lipofilik bileşiklerin yanı sıra hedef dışı rastgele bağlanma veya dokularda da gözlemlenir (Rowley vd, 1997; Smith ve van de Waterbeemd, 1999; Lambrinidis vd., 2015).

Hansch vd. (1987) bu tür sorunları ilk ana hatlarıyla belirleyenlerdir ve 1987'de yayınlanan bir makalede minimum hidrofobisite kavramını formüle etmişlerdir. Bu kavrama göre, araştırmalar biyolojik eylemleri için gerekenden daha fazla lipofilikliğe sahip olmayan bileşikler üzerine yapılmalıdır. On yıl sonra, logP değerleri için üst sınırlar Lipinski vd.(2001) tarafından öngörülmüştür ve meşhur 5 kuralı (RoF) içine lipofilisite kavramı da (clogP olarak) dahil edilmiştir. 5 kuralı, oral biyoyararlanım için bir uyarı veya filtre olarak formüle edilen "başparmağın" ilk kuralıdır.

Çizelge 1.3. Bazı kinolonların literatür verilerine göre logP değerleri

Bileşik adı	LogP	Referanslar
Norfloksasin	-1,55	(Merino vd., 1995)
	-1,60	(Bermejo vd., 1999)
	-1,36	(Pérez vd., 2002)
Danofloksasin	0,44	(Grabowski vd., 2010)
Marbofloksasin	-1,11	(Grabowski vd., 2010)
Sarafloksasin	-1,36	(Pérez vd., 2002)
	1,07	(Grabowski vd., 2010)
Siprofloksasin	-1,12	(Merino vd., 1997)
	-1,07	(Bermejo vd., 1999)
	-1,36	(Pérez vd., 2002)
Pefloksasin	0,27	Merino vd. 1995
	0,22	(Bermejo vd., 1999)
	0,47	(Pérez vd., 2002)
Enrofloksasin	0,53	Merino vd. 1997
	0,48	(Bermejo vd., 1999)
	0,24	(Pérez vd., 2002)
Ofloksasin	-0,03	(Pérez vd., 2002)
Enoksasin	-2,77	(Pérez vd., 2002)

Çizelge 1.4. Bazı kinolonların literatür verilerine göre logD değerleri

Bileşik adı	LogD	Referanslar
Norfloksasin	-0,95	(Zlotos vd.,1998)
	-1,07	(Völgyi vd., 2012)
	-1,03	(Takács-Novák vd., 1992)
Sarafloksasin	-0,89	(Çaço vd., 2010)
Siprofloksasin	-1,1	(Zlotos vd.,1998)
	-1,07	(Völgyi vd., 2012)
	-1,08	(Takács-Novák vd., 1992)
	-0,99	Rose vd.1992
	-1,13	Montero vd. 1997
Pefloksasin	0,21	(Zlotos vd.,1998)
	0,37	(Völgyi vd., 2012)
	0,27	(Takács-Novák vd., 1992)

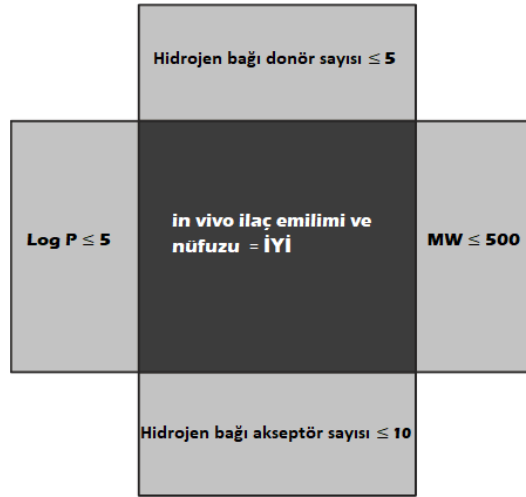
Çizelge 1.4. Bazı kinolonların literatür verilerine göre logD değerleri (Devam)

Bileşik adı	LogD	Referanslar
Enrofloksasin	0,27	(Zlotos vd.,1998)
Ofloksasin	-0,47	(Zlotos vd.,1998)1998
	-0,44	(Völgyi vd., 2012)
	-0,39	Takács-Novák vd. 1992
Enoksasin	-1,02	(Zlotos vd.,1998)
	-0,82	(Völgyi vd., 2012)
Nalidiksik asit	0,15	(Zlotos vd.,1998)
Pipedimik asit	-2,07	(Zlotos vd.,1998)

1.3.2. Lipinski 5 kuralı (Rule of five)

İlaç geliştirmede, fizikokimyasal özellikler dikkatlice değerlendirilirse ve doğru bir şekilde uygulanırsa, ilaçların daha etkili tasarlanabileceği iyi bilinmektedir. Örneğin Lipinski'nin 5 kuralı (Şekil 1.11.), Emilimi, dağılımı, metabolizması ve atılımı (ADME) dahil olmak üzere, bir ilacın insan vücudundaki farmakokinetiği için önemli olan moleküler özellikleri açıklar ve genel olarak, oral yoldan aktif bir ilacın aşağıdaki kriterlerden ikiden fazlasını ihlal etmediğini belirtir:

1. Hidrojen bağı donör sayısı (OH ve NH grupları) ≤ 5
2. MA ≤ 500
3. LogP ≤ 5
4. Hidrojen bağı akseptör sayısı (N ve O sayısı) ≤ 10
5. Veber tarafından, <10 dönebilen bağ sayısı (biyoyararlılığı) olduğu bulunmuştur.



Şekil 1.11. Lipinski 5 kuralı (Arnott ve Planey, 2012).

Fizikokimyasal özelliklerin, 5 kuralı ile uyumlu olanların ötesinde, bir moleküldeki dönebilen bağların sayısı dahil olmak üzere, ilaç Emilimi için önemli olduğu da vurgulanmaktadır. Veber'e göre, daha düşük moleküler esnekliğe sahip bileşikler, dönebilir bağların sayısı ile ölçüldüğünde, daha iyi oral biyoyararlanıma sahip olma eğilimindedir (Veber vd., 2002).

Lipofilisite ilaç keşfi ve tasarımında önemli bir parametredir (Leeson ve Springthorpe, 2007). Çünkü tıbbi kimyadaki en bilgilendirici ve başarılı tek fizikokimyasal özelliği oluşturmaktadır (Testa vd., 2000). Lipofilisite, ilaçların, çözünürlük ve membranlar yoluyla geçirgenlikleri üzerine etki eder (Waring, 2009; Liu vd. 2011). Böylece etkinlik, seçicilik, metabolizma, farmakokinetik özellikler ve ayrıca farmakodinamik ve toksikolojik profillerini etkileyerek ilaçların ADMET özelliklerine katkıda bulunur (Hughes vd., 2008). Pazarlanan oral ilaçları gelişimin erken aşamalarındaki bileşiklerle karşılaştırıldığında yüksek lipofilisitenin (> 5) hızlı metabolik dönüşe (Van De Waterbeemd, 2001) düşük çözünürlüğe ve zayıf absorpsiyona (Lipinski vd., 2012) yol açtığı sıklıkla gözlemlenmiştir. Lipofilisite çok yüksekse, in vitro reseptör karışıklığı ve in vivo toksisite olasılığının yanı sıra zayıf çözünürlük ve metabolik klirens söz konusudur. Lipofilisite çok düşükse, ilaç genellikle zayıf ADMET özellikleri sergileyecektir (Arnott ve Planey, 2012). Sülfonamidlerin ve kinolonların Lipinski parametreleri çizelge 1.5 ve çizelge 1.6'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.5. Sülfonamidler için Lipinski Parametreleri

Bileşik	Akseptör bağ sayısı	Donör bağ sayısı	Dönebilen bağ sayısı	LogPo/w	Molekül ağırlığı
Sülfatiazol	3	2	3	0,05	255,32
Sülfadiazin	4	2	3	-0,09	250,28
Sülfadimetoksin	6	2	5	1,63	310,33
Sülfametaksazol	4	2	3	0,89	253,28
Sülfametoksipiridazin	5	2	4	0,32	280,30
Sülfakinoksalin	4	2	3	1,68	300,34
Sülfametazin	4	2	3	0,28	278,33

Çizelge 1.6. Kinolonlar için Lipinski Parametreleri

Bileşik	Akseptör bağ sayısı	Donör bağ sayısı	Dönebilen bağ sayısı	LogPo/w	Molekül ağırlığı
Siprofloksasin	5	2	3	-1,08	333,34
Enrofloksasin	5	1	4	-0,25	359,39
Marbofloksasin	6	1	2	-0,49	362,36
Danofloksasin	5	1	3	-0,35	357,38
Ofloksasin	6	1	2	-0,39	361,37
Enoksasin	6	2	3	-0,20	320,32

1.4. Oktanol-su dağılma katsayısı tayininde kullanılan yöntemler

Deneysel $\log P_{o/w}$ değerleri doğrudan veya dolaylı yöntemlerle elde edilebilir. Doğrudan yöntemler, Ekonomik İş birliği ve Kalkınma Teşkilatı (OECD) (OECD, 1995) tarafından standart bir yöntem olarak önerilen klasik çalkalama yöntemini (Shake-flask) ve ayrıca potansiyometrik yöntemleri içerir. Ters fazlı sıvı kromatografisi (RPLC), oktanol-su dağılma sabitlerini tayininde yüksek verim, safsızlıklara ve bozunma ürünlerine karşı duyarsızlık, geniş dinamik aralık, çevrim içi tayin imkanı ve numune parçacık boyutu gibi avantajları nedeniyle OECD tarafından önerilen en yaygın dolaylı yöntemdir.

1.4.1. Çalkalama (Shake flask) metodu

Oktanöl-su dağılma sabitini ölçmek için kullanılan en yaygın yöntem, geleneksel çalkalama yöntemidir (OECD, 1995). Bu yöntemde, her ikisi de bir şişeye

yerleştirilmiş dağılma çözücülerine (su ile doyurulmuş n-oktanol ve n-oktanol ile doyurulmuş su), bir bileşik eklenir. Daha sonra, dağılma dengesini hızlandırmak için şişe çalkalanır, fazlar ayrılır ve $\log P_{o/w}$ değerini elde etmek için her fazdaki bileşik miktarı belirlenir. pH'ın çok iyi bir şekilde kontrol edilmesi koşuluyla, iyonlaşabilir bileşikler için $\log D_{o/w}$ 'yi ölçmek için de benzer bir yöntem kullanılabilir. Bu nispeten basit bir yöntemdir, ancak güvenilir sonuçlar elde etmek için önemli sayıda parametrenin kontrol edilmesi gerekir:

i. Sıcaklık: Bu, kontrol edilmesi gereken en önemli parametrelerden biridir. Her iki çözücünün doygunluğu istenen sıcaklıkta yapılmalı ve işlem boyunca sıcaklık kontrol edilmelidir.

ii. Fazlar arası hacim: Oranı optimize etmek için, bileşiğin $\log \log P_{o/w}$ veya $D_{o/w}$ değerinin bir tahmini gereklidir, çünkü çoğu lipofilik bileşik daha büyük sulu hacimlere ihtiyaç duyarken lipofilitesi düşük bileşikler için de bunun tam tersi geçerlidir (Andrés vd. 2015). Yönergeler (OECD, 1995; EPA, 1996), en az üç farklı hacim oranının test edilmesini, yani beklenen $\log P$ 'ye göre daha tutarlı olan, hemen yukarısında bir oran ve hemen altındaki bir oranın test edilmesini önerir. Ayrıca, her oran iki kez test edilmelidir.

iii. Sulu fazın pH'ı: İyonlaşabilen bileşikler için, doğru $\log D_{o/w}$ veya $\log P_{o/w}$ değerlerini elde etmek için sulu fazın pH'ı kontrol edilmelidir. Sulu fazın pH'ını kontrol etmek için tampon çözeltileri kullanıldığında, bileşiklerin iyonlaşan formu bazı tampon bileşenleriyle iyon çiftleri oluşturabilir. Bu durumda $\log D_{o/w}$ değeri, bu ikincil kimyasal denge tarafından değiştirilecektir ve tampon derişiminin, son $\log D_{o/w}$ değeri üzerinde doğrudan bir etkisi olacaktır.

iv. Çalkalama ve denge adımlarının süresi: Genel olarak, iki faz arasındaki dengeye, kullanılan şişelerin tipine (cam tüpler, kromatografik viyaller, 96 vb.) ve çalkalamanın ne kadar şiddetli olduğuna bağlı olmasına rağmen oldukça hızlı bir şekilde ulaşılır. Dengeyi sağlamak için genellikle 1 saat çalkalama yeterlidir. Geriye kalan faz ayrımını zorlaştıran emülsiyon oluşumunu en aza indirmek için şiddetli karıştırma tavsiye edilmez.

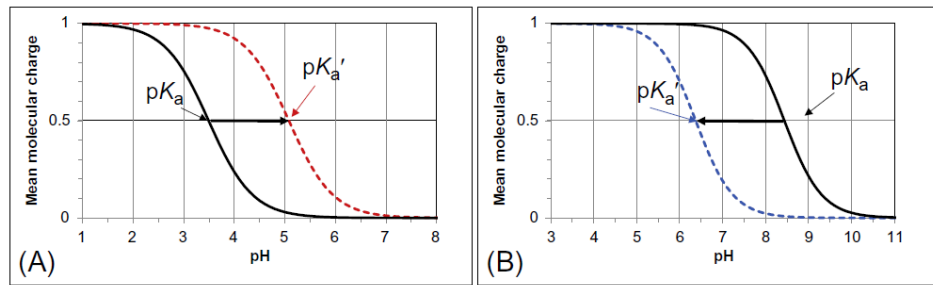
v. Fazların ayrımı: Faz ayırma yöntemi ve her bir fazın analiz için nasıl örneklendiği de önemlidir. Çapraz kontaminasyon bu aşamadaki dezavantajlardan biridir ve sulu fazın hacmi için özellikle önemlidir çünkü sulu faza ulaşmak için şırınga iğnesinin oktanol fazından geçmesi gerekir.

vi. Miktarın ölçümü: Her fazdaki bileşik miktarının belirlenmesi, en yaygın olanı UV spektroskopisi ve UV veya MS sıvı kromatografi olmak üzere çeşitli analitik tekniklerle yapılabilir (Amézqueta vd., 2020).

Çalkalama yönteminin temel avantajı, özel enstrümantasyon gerektirmemesidir. Bununla birlikte, en büyük dezavantajı, düşük otomasyon seviyesidir.

1.4.2. Potansiyometrik metot

Potansiyometrik yöntem, iyonlaşabilen bileşikler için geçerlidir. Bu teknik, istenen herhangi bir pH'ta $\log D_{o/w}$ değerini hesaplamak için kullanılabilen, pK_a ve $\log P_{o/w}$ 'nin eşzamanlı tayinine olanak sağlar. Bu yöntemde, titrasyon iki fazlı bir oktanol su sisteminde bir yapılır ve pK_a 'daki kayma belirlenir. Bileşiğin pK_a 'sını içeren bir pH aralığı üzerinde bileşiğin iki titrasyonu gerçekleştirilir. İlk titrasyon sulu fazda gerçekleştirilir ve pK_a elde edilir. İkinci titrasyon, bir oktanol-su karışımında gerçekleştirilir ve sulu pK_a değerinden kaydırılan gerçek pK'_a tayini yapılır.



Şekil 1.12. (A) Monoprotik zayıf asit, (B) monoprotik zayıf baz için Bjerrum eğrileri (Amézqueta vd., 2020)

Şekil 1.12'de tam çizgili eğri suda yapılan titrasyonu, kesikli çizgili eğriler n-oktanol-su karışımındaki titrasyonu temsil etmektedir. Nötral form n-oktanol içinde

çözüldüğünde, bir monoprotik zayıf asit (HA) ve bir monoprotik zayıf baz (B) için pK_a kaymasını göstermektedir. Monoprotik zayıf bir asit için pK_a' , sulu çözeltideki değerden daha büyüktür. Bunun nedeni, asidin nötral formunun konsantrasyonunun, sulu fazda n-oktanole dağılması nedeniyle azalması, bu nedenle dengenin hidrojen iyon oluşumunun tersi yönünde kayması ve maddenin daha bazik görünmesine neden olmasıdır ($pK_a' > pK_a$). Bu durumun tersine, monoprotik bir zayıf baz (B) için, sulu fazdaki nötr formun azalması, bileşiğin daha asidik görünmesine ve pK_a 'nın daha düşük değerlere ($pK_a' < pK_a$) kaymasına neden olarak bir pH düşüşüne neden olur (Clarke, 1984; Avdeef, 1992; Råfols, 2012).

Her iki durumda da, kaymanın boyutu türlerin dağılmasına bağlıdır. pK_a ve pK_a' arasındaki büyük fark, büyük bir $P_{o/w}$ değerini gösterir.

$$P_{(HA)} = \frac{10^{(pK_a' - pK_a)} - 1}{r} \quad (1.5)$$

$$P_{(B)} = \frac{10^{(pK_a - pK_a')} - 1}{r} \quad (1.6)$$

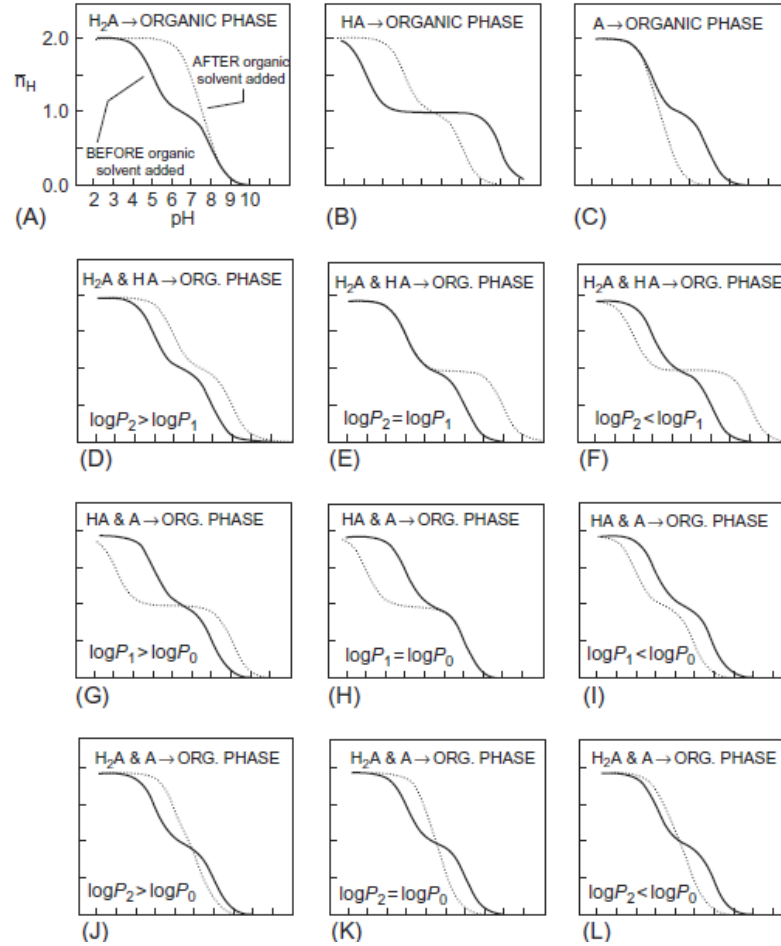
Burada ilk denklem monoprotik asitleri, diğer denklem monoprotik bazları temsil etmektedir. pK_a' ise organik çözücü varlığında görünen pK_a (apparent pK_a)'dır. Denklemde r (V_o/V_w), oktanol hacminin (V_o) sulu fazın hacmine (V_w) oranıdır. İyonik türler oktanol fazına dağıldığında, pK_a 'ya göre pK_a' 'daki kayma her iki türe de (iyonik ve nötr) bağlıdır. İyonlaşma sabiti ile dağılma katsayısı arasındaki ilişki aşağıdaki denklemde görülmektedir.

$$|pK_a' - pK_a| = \log \frac{1 + rP_n}{1 + rP_i} \quad (1.7)$$

P_n ve P_i sırasıyla bileşiğin nötral ve iyonik türlerinin dağılma katsayısını göstermektedir. $|pK_a' - pK_a|$, gerçek (apparent) ve sulu pK_a arasındaki farkların mutlak büyüklüğünü gösterir. Çünkü asitler daha yüksek değerlere kayarken bazların daha düşük değerlere kayması söz konusudur. İyonik türün dağılma katsayısını (P_i) tahmin etmek için üçüncü bir parametre olduğundan, biri n-oktanol içermeyen ve iki farklı faz oranlarına sahip oktanol su karışımlarında olmak üzere üç titrasyon gerçekleştirilmelidir: Genellikle, monoprotik zayıf asitler ve bazlar için, iyonlaşan

türlerin oktanol fazına dağılması, nötral türe göre 10^3 ila 10^4 kat daha azdır. Bu nedenle, üçüncü titrasyondaki n-oktanol hacmi, ikinci titrasyon için olandan daha büyük olmalıdır. Denklemdaki iki pK_a kayması ve r_1 ve r_2 hacim oranlarından, üç sabit pK_a , $\log P_n$ ve $\log P_i$ hesaplanabilir (Avdeef, 1992; Ràfols, 2012)

Poliprotik bileşikler analiz edildiğinde denklemler daha karmaşıktır. Bjerrum eğrileri, hangi türlerin oktanole dağıldığını belirlemeye yardımcı olur. Şekil 1.13, bir diprotik asit için olası eğrileri gösterir (Avdeef, 1992). Bu nedenle, poliprotik bileşikler için Bjerrum eğrilerinin çizilmesi, n-oktanolde dağılan türlerin tanımlanmasına ve sonuç olarak, ilgili dağılma sabitlerini tahmin etmek için uygun denklemin seçilmesine olanak sağlar.



Şekil 1.13. Çeşitli $\log P_{o/w}$ kombinasyonlarına sahip diprotik bir maddenin smüle edilmiş Bjerrum eğrileri

Potansiyometrik $\log P_{o/w}$ yöntemi, numunenin su veya n-oktanol içinde çözülmesi koşuluyla, organik fazda iyon çift dağılımı ve dimerizasyona uğrayan maddeler için kullanılabilir. Yöntem, çift fazlı sistemde pH ölçüldüğünden, tam faz ayrılmasına gerek kalmadan geniş bir oktanol-su hacim oranları aralığında kullanılabilir. Bununla birlikte, değerler ölçülebilir aralığın (2-12) dışında pK'_a 'ya kayarsa, bu yöntem yüksek veya düşük pK_a değerlerine sahip hidrofobik zayıf asitler ve bazlar için kullanılamaz. Ölçüm aralığı sonuç olarak hacim oranı ile tanımlanır ve 0,15 M KCl'de $\log P_{o/w}$ yaklaşık olarak 2'den 6'ya kadar genişler (Comer, 1995).

Bu yöntemlerin her ikisi de bir bileşiğin lipofilisitesinin tayininde kullanılabilir, ancak bunların dezavantajları da vardır. Birincisi bozunabilen bileşikler için uygun değildir ve otomasyona daha az yatkındır. İkincisi iyonlaşan bileşiklerle sınırlıdır ve iyonlaşma merkezleri gerektirir. Her ikisi de diğer bazı yöntemlere kıyasla daha fazla zaman ve iş gücü gerektirir (Gocan, 2016).

1.4.3. Kromatografik metot

Kromatografik teknikler ve özellikle ters fazlı sıvı kromatografi (RPLC) yöntemi ile, uygun koşullar altında, alıkonma faktörleri kullanılarak, oktanol-su dağılma katsayılarının tahmini de yapılabilir ve dolayısıyla yöntem lipofilisite değerlendirmeleri için güzel bir alternatif sunar. Kromatografik tekniklerin hız, doğruluk, tekrarlanabilirlik, daha geniş dinamik aralık (özellikle yüksek lipofilisite alanları), yüksek otomasyon yeteneği, safsızlık ve bozunma ürünlerine duyarsızlık ve düşük derişimde ve küçük parçacıklı maddelerle çalışma gibi avantajları vardır (Bechalany vd.,1991; Dorsey ve Khaledi,1993; Giaginis ve Tsantili-Kakoulidou, 2007). Bu nedenle son yıllarda HPLC bazlı lipofilisite çalışmalarının geleneksel oktanol-su dağılma metotlarına kıyasla daha fazla kullanıldığı görülmektedir (Van de Waterbeemd vd., 1996; Vrakas vd., 2005; Giaginis ve Tsantili-Kakoulidou, 2007).

RPLC'de alıkonmadan sorumlu ana mekanizma, bileşiğin bir sulu mobil faz ile bir organik sabit faz arasında dağılmasıdır. Pek çok çalışmada, oktanol-su dağılma sistemi olarak uygun mobil ve sabit fazların kullanıldığı rapor edilmiştir (Valkó, 2004). Genellikle tercih edilen, sabit faz n-oktanol ve mobil fazın su olmasıdır (Gocan vd.,

2006). Kromatografik sistem, bilinen $\log P_{o/w}$ değerlerine sahip bir dizi standart bileşiğin alıkonma faktörü ($\log k$) ölçülerek kalibre edilir. Bu yaklaşımın ana sorunu, durgun fazda sabitlenmiş belli bir n-oktanol konsantrasyonunu o değerde tutmak ve dağılma sabitlerini geniş bir aralıkta görebilmek için oktanol/su hacim oranını değiştirmektir ($-1 < \log P_{o/w} < 5$) Bu problem, birçok araştırmacıyı, ticari olarak temin edilebilen kolonları (çoğunlukla C18 ve daha yakın zamanda IAM kolonları) su-organik çözücü mobil faz (asetonitril-su ve metanol-su) ile kullanmanın uygulanabilirliğini incelemeye sevk etmiştir. Bu sistemlerde, aşağıdaki ilişkiyi elde etmek için standartların $\log P_{o/w}$ değerleri, ölçülen standartların ($\log k$) alıkonma faktörü ile ilişkilendirilir (Kerns, 2001):

$$\log P = a \log k (\text{veya } \log k_w) + b \quad (1.8)$$

İzokratik $\log k_w$ veya % 100 sulu fazda elde edilen $\log k_w$ için alıkonma faktörleri Collander tipi denklemlere göre $\log P$ ile ilişkilidir. Burada a ve b, lineer regresyon analizi ile türetilen sabitlerdir.

HPLC ile lipofilite değerlendirmelerinin başlangıcında karşılaşılan yaygın sorun silanofilik etkidir. Örneğin, ayırma mekanizmasında etkin rol oynayan ters faz C18-silanize kolonların kalan serbest silanol grupları ile etkileşimlerdir (Bechalany vd., 1991; Giaginis ve Tsantili-Kakoulidou, 2007). Bu tür etkileşimler, uygun sabit ve mobil fazların seçilmesiyle azaltılabilir.

En yaygın kullanılan sabit fazlar, end-capped (BDS kolonu) veya polar gömmeli (ABZ +, Discovery RP-Amide C16, Discovery BioWide Pore C-18 kolonu) olan C18-silanize silika jel kolonlarıdır. End-capped kolonlarda, serbest silanol grupları ikinci bir silanizasyon işleminde küçük alkollerle reaksiyona girer. Buna karşın, polar gömmeli kolonlar, silanol bölgelerine elektrostatik koruma sağlayan bir amid fonksiyonel grubu içerirken, alkil zincirlerinin yüksek derecede oryantasyonu sağlanır (Pagliara vd., 1995). Polar end-capped Aquasil kolonu hidrofilik bileşikler için de önerilmiştir (Giaginis vd., 2013).

Mobil fazın saf sulu fraksiyonu, ters fazlı kolonun sınırlı uygulama alanı olması ve kuvvetli hidrofobik çözünen maddeler için oldukça uzun alıkonma süreleri nedeniyle

elde edilememesinden dolayı, $\log k_w$ değeri genellikle ekstrapolasyon ile türetilir. Snyder-Soczewinski Denklemi, $\log k_w$ elde etmek için kullanılan en yaygın denklemdir (Snyder vd., 1979; Valkó vd., 1993).

$$\log k = \log k_w - S_\phi \quad (1.9)$$

Burada ϕ , mobil fazdaki organik modifiyerin hacim oranıdır ve S, lineer regresyon analizi ile türetilen bir sabittir. $\log k_w$ 'nin ekstrapolasyonunda, en az dört izokratik $\log k$ değeri kullanılmalıdır. Bu yaklaşım, tüm organik modifiyer derişimler aralığı için doğrusal değildir, ancak $0 < \log k < 1$ çalışma sınırları dahilinde iyi bir yaklaşımdır (Giaginis ve Tsantili-Kakoulidou, 2007). Bu iki denklem lipofilisite ölçümlerinde HPLC yönteminin temelini oluşturur.

Lipofilisite değerlendirmeleri için alternatif bir diğer kromatografik ölçü, sabit ve hareketli fazlar arasında bileşiklerin eşit dağılımını ($\log k = 0$) sağlayan organik modifiyerin fraksiyonuna (ϕ_0) karşılık gelen kromatografik hidrofobiklik indeksidir (CHI) (Valkó, 1997; 2004). Denklemden eğimin kesime oranı olan organik modifiyer fraksiyonu (ϕ_0) $\log P$ ile iyi bir korelasyon sergilerken (Valkó, 1993) gradient alıkonma süreleri ile ilişkili olduğu gösterilmiştir. Böylece, CHI indeksleri hızlı gradient yöntemi ile belirlenebilir ve standart bileşiklerin ölçülen oktanol-su $\log D$ değerleri ile oluşturulan bir kalibrasyon denklemi aracılığıyla $\log D$ tahmini yapılabilir. (Valkó, 1993; 2004). CHI tayini için organik modifiyer olarak asetonitril ve tampon olarak amonyum asetat kullanılır. Bu koşullar, silanofilik etkileşimlerin etkisini hesaba katmazken, asetonitril, sabit faza herhangi bir polar işlev sağlamaz (Bechalany, 1991). Bu nedenle, CHI indeksleri bileşiklerin nötral formunda daha iyi performans gösterir (Valkó 1997). Ancak, organik modifiyerin varlığında çok hızlı elüe olan hidrofilik bileşikler için uygulanamazlar.

Bazı araştırmacılar, çalışmalarını $\log P$ veya $\log D$ değerleri olarak kullanılan en uygun $\log k_w$ alıkonma faktörleri için kromatografik koşulların standardizasyonuna ve genel kullanım için ilgili bir kalibrasyon denkleminin oluşturulmasına yönlendirmektedir (Lombardo vd., 2001; Liu vd., 2005; Giaginis vd., 2006; 2007). Çalışmalar pratikte nötr ve bazik bileşikler için olduğu kadar asidik bileşikler için de uygulanabilmektedir.

Bu gibi durumlarda 1:1 korelasyonlar, eşitlikteki a ve b ile elde edilir. Eşitlikteki a ve b değerleri sırasıyla 1 ve 0'a yakındır.

$$\log P = a \log k(\text{veya } \log k_w) + b \quad (1.10)$$

Bu tip çalışmalarda, $\log k_w$ 'nin $\log P$ (veya $\log D$) ile daha iyi örtüşmesi için sabit faza "oktanol benzeri bir karakter" oluşturan mobil faz katkı maddesi olarak küçük miktarlarda n-oktanol eklemesi önemlidir. n-oktanolün alıkonma üzerindeki etkisi, artan lipofilisite ile azalır ve $\log P > 2$ olan bileşikler için etkisi ihmal edilebilir düzeydedir (Giaginis, 2007).

Bazık ve nötral ilaçlar için, ElogD yaklaşımı, ABZ⁺ kolonunun ve az miktarda n-desilamin ve n-oktanol ilavesiyle, metanol / MOPS, (pH 7.4) karışımlarından oluşan mobil fazların kullanılmasını önermektedir (Lombardo vd., 2001).

Log k_w alıkonma faktörleri, lipofilisite aralığına bağlı olarak sadece üç izokratik logk değerinin ekstrapolasyonu ile elde edilir. Yaklaşım, çoğu durumda tekrarlanabilirlik ve iyi doğruluk ile <20 dakika ortalama tayin süresine olanak sağlar. Bununla birlikte, bu yaklaşım ölçümlerin $\log k/\phi$ ilişkisinin lineer aralığında olmasını garanti etmediğinden, organik modifiyerin yalnızca üç fraksiyonunun kullanılması her zaman uygun olmayabilir.

Lombardo vd. (2001) sabit faz ve mobil faz koşulları Minick'e benzer bir LC-ABZ kolonu önermişlerdir (organik modifiyer olarak metanol + % 0,25 n-oktanol, n-oktanol doymuş tampon olarak MOPS ve toplam hacme göre % 0,15 n-desilamin). Çeşitli yapısal farklılıklara sahip 163 bazık ve nötral ilaç seti için, yedi log biriminden daha geniş bir dinamik aralığı kapsayan denklem (1.11) 'de görüldüğü üzere bir kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Üç lipofilisite aralığına göre üç izokratik logk değeri kullanılarak $\log k_w$ değerleri ekstrapolasyon ile elde edilmiştir (n=163, r=0,949, s=0,369, F=3000).

$$\log D_{7,4} = 1.08(\pm 0.02) \log k_w + 0.20(\pm 0.04) \quad (1.11)$$

Denklem, bire yakın bir eğim ve sıfıra yakın bir kesim ile 1:1 genel bir korelasyonu temsil eder ve pH 7,4'te $\log D$ değerlerini hesaplamak için kullanılır. ElogD_{7,4} olarak

bilinen yöntem, çok sayıda nötral ve bazik ilaç için doğrulanmıştır (Giaginis ve Tsantili-Kakoulidou, 2007).

Polar ve polar olmayan etkileşimlerin sonucu lipofilisitenin ikili doğası ortaya çıkmaktadır (Yang vd., 1986; El Tayar vd., 1992; Raevsky vd., 1995; Testa vd., 1996; Tsantili-Kakoulidou vd., 1999). Polar olmayan etkileşimler, hidrofobisite ile özdeşleştirilmekte olup, lipofilisite tayininde önemli olan, moleküler hacim, polarizlenebilirlik ve molar refraktiflik gibi yapısal terimlerle ifade edilmektedir. Daha karmaşık olan, iyon-dipol, dipol-dipol veya hidrojen bağı etkileşimlerini bünyesinde barındıran polar etkileşimlerdir ve elektronik sabitler, dipol momentleri veya hidrojen bağı parametreleriyle açıklanırlar. Aromatik veya heterosiklik sistemlerdeki sübstütientler, moleküllerdeki konjuge sistemler ve hidrojen bağları gibi belli yapısal özelliklerin ortaya çıkardığı molekül içi etkileşimler, moleküller arası kuvvetleri önemli derecede etkileyen lipofilisite üzerinde önemli rol oynamaktadır (Bradshaw ve Taylor, 1989; Gago vd. 1994; Vrakas vd., 2003). Ayrıca polar ve polar olmayan ortamın neden olduğu konformasyonel değişiklikler de molekülleri beklenenden hidrofilik veya daha lipofilik hale dönüştürebilmektedir (Giaginis ve Tsantili-Kakoulidou, 2008). İyonizasyon, nötral bileşikler için oluşturulan eklenebilirlik kurallarının geçerliliğini sınırlayarak, yüklü merkez dahil olmak üzere her türlü molekül içi etkileşimi değiştirir (Caron ve Ermondi, 2006; Dellis vd., 2007).

Polar ve polar olmayan türler için, moleküller arası ve molekül içi etkileşimlerin sonucu olarak aşağıdaki denklem oluşturulmuştur.

$$\text{Lipofilisite} = \text{hidrofobisite} - \text{polarite} \quad (1.12)$$

Bu denklem iki fazlı sistemler için geçerlidir ve çözücüye bağlıdır. Sistemler arasındaki farklılıklar solvatokromik analiz ile açıklanabilir (Kamlet vd., 1988; Abraham vd., 1990; 1994; 1999). Dağılma katsayıları, denklem de açıklandığı gibi, farklı moleküller arası etkileşimleri ifade eden sterik ve polar terimlerle çarpanlara ayrılmıştır.

$$SP = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (1.13)$$

Bu denklemde V McGowan'ın karakteristik hacmi, $((\text{cm}^3.\text{mol}^{-1})/100)$, A ve B sırasıyla hidrojen bağı asitliği ve bazlığını, S dipolarlık/polarlanabilirlik ve E ise aşırı molar kırılmayı $(\text{cm}^3.\text{mol}^{-1})/10$ temsil eder. v, a, b, s, e, c, kolon/mobil faz/ çözünen sistemi karakterize eden sabitlerdir ve çoklu doğrusal regresyon analizi ile türetilir (Abraham, 1987;1990).

Son yıllarda Abraham tarafından önerilen Lineer Solvasyon Enerji İlişkisi (LSER) eşitliği yine Abraham tarafından n-oktanol/su sistemine uygulanmıştır ve iyi sonuçlar verdiği için yaygın olarak kullanılmaktadır.

$$\log P_{o/w} = 0.088 + 0.562E - 1.054S + 0.034A - 3.460B + 3.814V \quad (1.14)$$

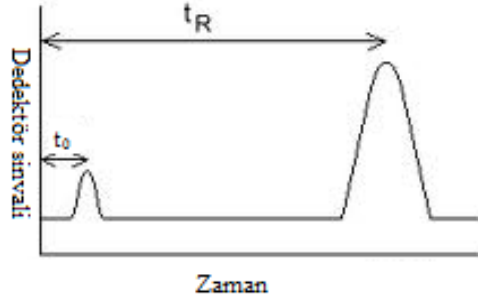
Denklem, $\log P$ 'yi (oct) karakterize eden katsayıları gösterir ve 0.11 log birimi standart sapma ile 600'den fazla $\log P$ (oct) ölçümünden elde edilmiştir.

Denklem tam olarak $\log k'$ değerlerini etkileyen çözünen faktörleri göstermektedir. Kullanılan mobil fazların çoğu için, r katsayısı pozitifdir, böylece çözünen, molar kırılma, $\log k'$ değerinde bir artışa yol açar, yani sabit faz baskındır. Dipolarite / polarlanabilirlik katsayısı her zaman negatiftir, bu nedenle çözünen mobil fazı destekler ve $\log k'$ 'de bir azalmaya yol açar. Çözünen hidrojen bağı asitliğinin etkisi çok büyük değildir, ancak a katsayısı her zaman negatiftir, bu nedenle asitlikteki bir artış $\log k'$ 'de bir azalmaya yol açar. Çözünen hidrojen bağı bazikliği, mobil fazı çok büyük ölçüde destekler ve yine $\log k''$ 'de bir azalmaya yol açar, çözünen hacmi ise büyük ve zıt bir etkiye sahiptir.

LSER denklemindeki (1.13) katsayılar, HPLC $\log k$ 'değerlerine uygulandığında, mobil faz ve sabit fazın özelliklerindeki farkı yansıtır. Elbette, sabit fazın mobil faz ile, muhtemelen tercihen bir veya diğer bileşenle doyurulacağı, böylece sabit faz özelliklerinin sürekli sabit olmadığı anlaşılmalıdır. Genel olarak pozitif r katsayısı ve negatif s katsayısı, durgun fazın mobil fazlardan daha polarlanabilir olduğunu ancak daha az dipolar olduğunu gösterir. Negatif a katsayısı, hareketli fazların sabit fazdan daha bazik olduğunu gösterir ve büyük negatif b katsayısı, mobil fazların durgun fazdan çok daha asidik olduğunu gösterir (Abraham ve Rosés, 1994b).

1.5. Kromatografide Temel Parametreler

Kromatogram, tayini yapılan numunenin her bir bileşeni için belirli zamanlarda derişim değeriine karşı elde edilen cevabın uygun dedektörle saptanması ile elde edilmiş pik grafiklerdir (Şekil 1.14). Kromatografide veri yorumlanmasında kromatogram esas alınır



Şekil 1.14. Kolonda analit bileşeninin ayrılması ve kromatogram

Bir kromatogramın yorumlanabilmesi için bazı sistem uygunluk testlerinin (SUT) yapılması gerekir. SUT, kromatografik yöntemlerin bir parçasıdır ve yöntemin kabul edilebilir doğruluk ve kesinlikte olduğunu belirtir. Gerekli işlem ve hesaplamalar yöntem geliştirilmesi ve validasyon işlemlerinin tamamlanmasından sonra veya işlemler sırasında yapılır.

Amerikan Farmakopesi 24 Tarafından Tanımlanan Sut Parametreleri

1. Teorik tabaka (plaka) sayısı (N)
2. Kuyruklanma faktörü (T)
3. Alıkonma zamanı (t_R)
4. Kapasite faktörü (k)
5. Seçicilik faktörü (α)
6. Ayırım gücü (Resolution) (R_s)
7. Pik yüksekliği veya alanının %BSS'ı

Bu kriterlerden en az 2 tanesinin gerekli şartları sağlaması yöntemin sistem uygunluğunu göstermektedir (Riley ve Rosanske, 1996; USP 24).

1.5.1. Teorik tabaka sayısı (N)

Kolondan çıkan pikin sivri ve dar olması ve piklerin birbirlerinden iyi ayrılması ile ilgili olması münasebetiyle kolonun en önemli parametresidir. N'nin sayısal değeri, analizi yapılan maddenin cinsine bağlı olduğu gibi deney koşullarına (akış hızı, sıcaklık, kolon kalitesi gibi) da bağlıdır. Tavsiye edilen değer $N > 2000$ dir.

Bir kromatografik ayırmada etkin tabaka sayısı, aşağıdaki bağıntıyla ifade edilir:

$$N = 5,54(t_R/W_{0,5})^2 \quad (1.15)$$

Yukarıdaki bağıntıya göre;

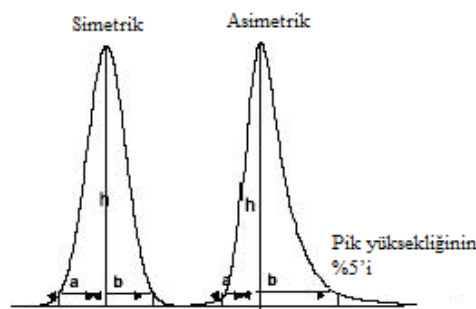
N: Teorik tabaka sayısı

t_R : Bileşene ait alıkonma zamanı

$W_{0,5}$: Pikin yarı yüksekliğindeki pik genişliğidir.

1.5.2. Kuyruklanma faktörü (T_f)

Kromatografide bir diğer önemli faktör de kuyruklanma faktörüdür. Pik yüksekliğinin % 5' inde hesaplanır. Pikin simetrik davranışını ifade eder. Simetrik bir pikte bu faktör 1'e eşittir. Rakamın 1 den farklı olması, kuyruklanmayı gösterir (Şekil 1.15).



Şekil 1.15. Kuyruklanma faktörü

1.5.3. Alıkonma süresi

Analitin enjeksiyonu ile bu pikin dedektöre ulaşması için geçen süreye alıkonma süresi denir ve t_R simgesiyle gösterilir (Skoog vd., 2011). Kolonda tutunmayan türe ait pik süresi, ölü zaman (t_0) olarak adlandırılır. Bu değer, kapasite faktörlerinin hesabında gereklidir.

1.5.4. Kapasite faktörü

Kapasite faktörü (k) önemli bir deneysel parametre olup, tayin edilen analitlerin kolonda göç hızlarını tanımlamakta yaygın olarak kullanılır. Bu parametre aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır:

$$k = (t_R - t_0) / t_0 \quad (1.16)$$

Bir çözünen madde için alıkonma faktörü birden çok küçük ise, elüsyon çok hızlı olur. Öte yandan alıkonma faktörü 10 dan daha büyük ise, elüsyon süreleri gereksiz şekilde uzar. Karışımındaki çözünenler için alıkonma faktörlerinin 1 ile 10 arasında olmasını sağlayan şartlarda ayırmalar en ideal şekilde yapılır (Skoog vd., 2011).

1.5.5. Seçicilik, α

Kolonda daha uzun süre tutulan bileşene ait kapasite faktörünün, daha kısa süre tutulan bileşenin kapasite faktörüne oranı seçiciliği verir. Seçicilik faktörünün matematiksel ifadesi, Eşitlik 1.17’de verilmiştir. α değeri, 1,15 ise iki bileşiğin % 98 oranında birbirinden ayrıldığı kabul edilir.

$$\alpha = k_2/k_1 = (t_{R2} - t_{R0}) / (t_{R1} - t_{R0}) \quad (1.17)$$

1.5.6. Ayırma gücü, (R_s)

Bir numunede bulunan bileşenlerin ne derece ayrıldıklarını gösteren kantitatif terimdir. Aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır.

$$R_s = \frac{2\Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2[(t_R)_A - (t_R)_B]}{W_A + W_B} \quad (1.18)$$

Burada,

R_s : Pik çifti için ayırma gücü

W: Kromatogramdaki pikin kenarından çizilen teğetlerle taban çizgisi arasında kalan uzaklıktır. Birbirini izleyen iki pik arasındaki ayırma gücü, R_s , için farklı hesaplama yöntemleri geliştirilmiştir. Aşağıdaki bağıntı kullanılarak da hesaplama yapılabilir:

$$R_s = \frac{\sqrt{N}}{4} \frac{(\alpha-1)}{\alpha} \frac{k_2}{1+k_2} \quad (1.19)$$

Burada;

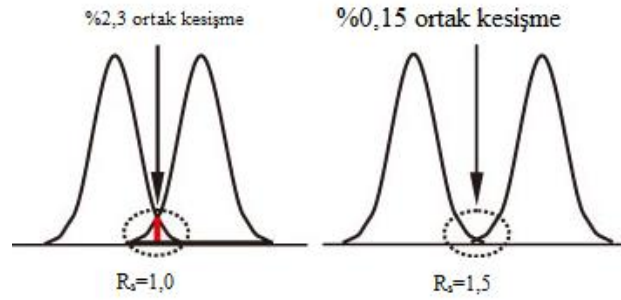
R_s : Pik çifti için ayırma gücü,

N: Etkin tabaka sayısı,

α : Seçicilik faktörü,

k_2 : İkinci pikin kapasite faktörüdür.

Bir kromatografik ayırmada en az ayrılan pikler, kritik pik çifti olarak adlandırılır. Sıvı kromatografide metot geliştirmede tüm pikler için ayırma gücünün $R_s \geq 1,5$ olması gerekmektedir. Şekil 1.16'da iki R_s değerinde ayrılma görülmektedir.



Şekil 1.16. İki ayrı pikin ayırma güçleri (R_s)

1.5.7. Pik alanı ve yüksekliğinin tekrarlanabilirliği (%BSS)

En az 6 defa tekrarlanan deneyler sonucu elde edilen pik alanı veya yüksekliklerinin bağıl standard sapmalarının (% BSS) hesaplanması ile elde edilir. Genel ayırımlarda % BSS < %1,5, biyolojik sıvılardan yapılan çalışmalarda %BSS < % 5.0, eser madde miktar tayininde % BSS değeri % 5-15 kabul edilebilir değerlerdir.

1.6. Kromatografide Mobil Faz Optimizasyonu

Mobil fazın bileşimi, ters faz sıvı kromatografide bileşiklerin alıkonma davranışlarında en önemli rolü oynar (Dolan vd., 1979; Barwick, 1997). RPLC de çözücü gücü, polaritenin bir fonksiyonu olarak ifade edilebilir. RPLC çözücülerinde ayırma gücü, polarite ile terslik gösterir. Diğer bir deyişle su gibi polar bir çözücünün tetrahidrofuran gibi apolar bir çözücünün yanında zayıf elüsyon gücü gösterdiğini söyleyebiliriz. Bilindiği gibi sıvı kromatografide mobil faz olarak genellikle su-organik çözücü ikili karışımları kullanılır. Mobil faz olarak kullanılan çözücü karışımlarında polarite, mobil fazın elue etme gücünün bir ölçüsüdür ve RPLC’de çözünenin alıkonmasını etkileyen temel faktördür. RPLC de alıkonma, mobil fazın organik çözücü içeriğinin artması ile azalır. Bu güç, çoğu zaman organik çözücü-su karışımlarında organik fazın yüzdesi ile ifade edilir. Sabit pH’da alıkonmanın çözücü bileşimi (φ) ile değişimini belirlemek üzere aşağıdaki doğrusal yaklaşım kullanılır (Schoenmakers vd., 1991).

$$\log k_i = \log k_0 - S \varphi \quad (1.20)$$

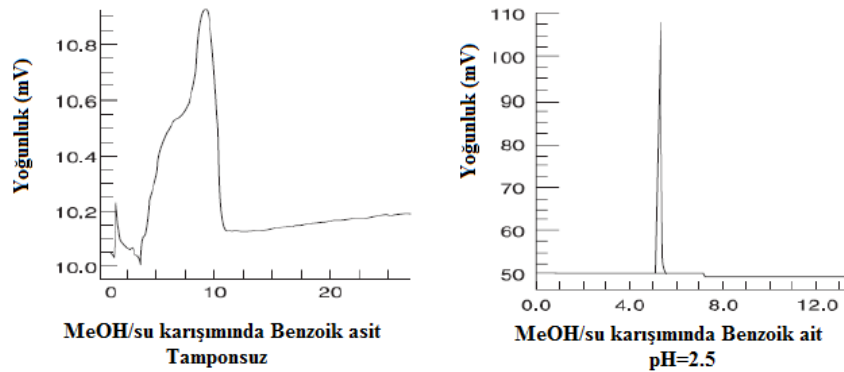
Bu lineer bağıntının geliştirilmesi için organik modifiyerin farklı derişimlerinde kapasite faktörleri belirlenir ve x ekseninde organik modifiyerin derişimi, y ekseninde kapasite faktörlerinin logaritması kullanılarak grafik hazırlanır. Bu tür bir lineer grafikte S, eğimdir; organik çözücünün çözücü gücü ile ilgili faktördür. Kapasite faktörü 1-10 arasında değilse log k’nın φ ’ye göre çizimi doğrusal olmayan bir ilişki verir. İkinci dereceden denklemi kullanmamak için kapasite faktörünün 1-10 arasında olması istenir. Bu bağıntıda k_0 , φ sıfır olduğunda yani mobil fazın organik modifiyer ihtiva etmemesi diğer bir deyişle saf su veya sulu tampon çözelti mobil faz olarak kullanıldığı koşuldaki kapasite faktörüdür. Bu bağıntı, RPLC de metot geliştirmede mobil fazın çözücü gücünün hesaplanmasında kullanılır. S değerleri, su için 0; metanol için 2,6; asetonitril için 3,2 ve tetrahidrofuran için 4,5 dir. Asetonitril-su çözücü karışımları için α , β ve π^* ile E_T^N nin çözücü derişimine bağılılığıyla ilgili değerler, Çizelge 1.8’ de verilmiştir (Roses ve Bosch, 1993; Bosch vd., 1994).

Çizelge 1.7. Asetonitril-su karışımları için solvatokromik parametreler

Hacimce yüzde (%v/v)	Ağırlıkça yüzde (%w/w)	Mol kesri x	α	β	π^*	E_T^N
0	0	0	1,13	0,580	1,14	1
5,0	3,9	0,0177	1,088	0,590	1,132	0,98
10,0	8,0	0,0366	1,047	0,590	1,114	0,95
12,5	10,0	0,0465	1,029	0,600	1,104	0,94
15,0	12,1	0,0568	1,012	0,600	1,095	0,92
20,0	16,3	0,0787	0,981	0,600	1,075	0,90
25,0	20,6	0,1022	0,956	0,610	1,055	0,88
30,0	25,0	0,1277	0,937	0,610	1,035	0,86
35,0	29,5	0,1553	0,923	0,610	1,014	0,84
37,5	30,0	0,1583	0,922	0,610	1,012	0,84
40,0	34,2	0,1855	0,913	0,610	0,993	0,83
45,0	38,9	0,2184	0,908	0,610	0,971	0,82
47,5	40,0	0,2264	0,908	0,610	0,966	0,82
50,0	43,8	0,2546	0,906	0,610	0,949	0,81
55,0	48,8	0,2945	0,906	0,610	0,927	0,80
57,5	50,0	0,3051	0,906	0,610	0,922	0,80
60,0	53,9	0,3387	0,905	0,600	0,905	0,79
65,0	59,1	0,3881	0,903	0,600	0,884	0,78
70,0	64,5	0,4435	0,897	0,600	0,863	0,77

1.7. Kromatografide Tampon Seçimi

Bir kromatografik ayırmada mobil faz pH sı, tamponlarla belirlenir. Ters faz sıvı kromatografide mobil faz pH'sının iyonlaşan analitlerin alıkonmasında etkileri kullanılan tampon tipi/derişimine bağlıdır. Uygun olmayan tampon seçimi iyonlaşabilen polar bileşiklerin ayrılmasında tekrar edilemeyen alıkonmalara ve kuyruklanmalara yol açabilir (Şekil 1.17). Kısmen iyonlaşan analitlerin kalıntı silanol gruplarıyla etkileşimleri gibi problemler doğru tampon seçimi ile giderilebilir.



Şekil 1.17. MeOH/Su ortamında tampon ve pH'ın analit üzerine etkisi

Tampon tipi ve derişimi aynı zamanda elüsyon sırasını da etkilemektedir. Sıvı kromatografide kullanılan mobil fazların pH'sı, önceleri sulu çözeltinin pH'sı olarak alınmıştır. Günümüzde organik modifiyer ilavesi ile pH değişiminin göz önünde bulundurulması gerektiği belirtilmektedir (Roses vd., 1996; Augiar de vd., 1997).

Çizelge 1.8. Ters faz sıvı kromatografisinde yaygın olarak kullanılan tamponlar

Tampon	pK	Tampon aralığı	UV (nm)
TFA	0,5	(% 0,05 v/v)	210 nm
Fosforik	2,1	1,1-3,1 asit	<200 nm(10 mM)
Mono/dihidrojenfosfat	7,2 12,3	6,2-8,2 11,3-13,3	<200 nm (10 mM)
Formik asit	3,8	2,8-4,8	210 nm (10 mM)
Asetik asit	4,8	3,8-5,8	210 nm (10 mM)
Sitrat	3,1 4,7 5,4	2,1-4,1 3,7-5,7 4,4-6,4	230 nm (10 mM)
Trisaminometan (TRIS)	8,1	7,1-9,1	205 nm (10 mM)
Borat	9,2	8,2-10,2	<200 nm (10 mM)
Dimetilamin	10,7	9,7-11,7	<200 nm (10 mM)
Trietilamin	10,8	9,8-11,8	<200 nm (10 mM)
Amonyak	9,3	8,3-10,3	<200 nm (10 mM)
Pirolidin	11,3	10,3-12,3	<205 nm (10 mM)
N-Metilpirolidin	10,3	9,3-11,3	<205 nm (10 mM)
Piperidin	11,1	10,1-12,1	<205 nm (10 mM)
Amonyum asetat	4,8 9,3	3,8-5,8 (asetat) 8,3-10,3 (amonyum)	210 nm (10 mM)
Amonyum bikarbonat	6,4 10,3 9,3	5,4-7,4 (karbonat,1) 9,3-11,3(karbonat,2) 8,3-10,3 (amonyum)	<200 nm (10 mM)

pH'nın sudaki pH yerine mobil fazdaki değerinin kullanılması, çözünenin tutulması ile pH arasındaki ilişkiye çok daha iyi uyum göstermektedir. RPLC mobil fazında organik modifiyer olarak genellikle asetonitril ve metanol tercih edilir. Bu ortamlarda pH

standardizasyonu ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Barbosa vd., 1999, Barbosa ve Sanz-Nebot, 1995; Mussini vd., 1985). Tampon seçimi yapılırken tamponun, etkin pH aralığı ve çözücünün absorbands davranışının gözlemlendiği dalga boyu sınırlamaları göz önünde bulundurulmalıdır.

1.8. Sabit Faz Seçimi

Bir HPLC sisteminin kalbi kolondur. Bir kolonun değiştirilmesi, yöntem geliştirme sırasında analitlerin çözünürlüğü üzerinde en büyük etkiye sahip olacaktır. Uygulama için en uygun kolonun seçilmesi, sabit faz kimyasının, alıkonma kapasitesinin, parçacık boyutunun ve kolon boyutlarının dikkate alınmasını gerektirir. Genel olarak, durgun fazın doğası kapasite faktörü, seçicilik, verimlilik ve ayırma üzerinde en büyük etkiye sahiptir. Ayırma için en iyi durgun fazın belirlenmesi, kolon seçiminin en kritik adımıdır ve karar, numune çözünürlüğüne ve çalışılan bileşikler arasındaki kimyasal farklılıklara dayanmalıdır (Shah vd., 2012).

HPLCde sabit faz dolgu maddesi olarak kullanılanların çoğu silika esaslı bağlı fazlar içerir. RP ayırmalarında da etkin olan bu dolgu maddelerinin hidrofobik yüzeyi genellikle kovalent bağlı organosilanların silika yüzeyine tutturulmasıyla elde edilir. Bu olay da monofonksiyonel alkildimetilklorosilanların yüzeydeki silanol gruplarıyla etkileşimiyle gerçekleşir. Ticari olarak uygun ve yaygın olarak kullanılan oktadesilsilan da(C₁₈) bunlardan biridir. Ayrıca farklı sayıda karbon atomu içeren (C₁, C₄, C₈, C₁₂) alkil tipi ligantlar ve fenil fonksiyonlu fazlarda kullanılabilir (Claessens, 1998).

Silika desteğinin doğası, şekli ve parçacık boyutu ayrılmayı etkiler. Daha küçük partiküller, daha fazla sayıda teorik plaka veya daha fazla ayırma verimliliği ile sonuçlanır. Bununla birlikte, daha küçük parçacıkların kullanımı da kromatografi sırasında karşı basıncın artmasına neden olur ve kolon daha kolay tıkanır. Bu nedenle 5 Å kolonları, geliştirme çalışmalarında 3 Å kolonlarından daha sık kullanılır. Silika parçacıklarının daha dar parçacık boyutu dağılımı da daha iyi çözünürlükle sonuçlanır. Bu nedenle, farklı üreticilerin benzer faz kolonları veya aynı imalattan farklı sayıda kolon, farklı matris hazırlama yöntemleri nedeniyle çok farklı ayırma özelliklerine sahip olabilir (Shah vd., 2012).

Çalışmada Kinolon grubu antibiyotikler için Kinetex F5 100 Å (150 mm x 4,6 mm ID, 2,6 µm) kromatografi kolonu kullanılmıştır. Kinetex F5 kolon diğer F5 kolonlara kıyasla daha iyi tekrarlanabilirlik sağlar. pH aralığı 1,5-8,5 arasında olan Kinetex F5 yapısında bulundurduğu florlanmış grupları ve karbon halkası sayesinde, hem polar hem de polar olmayan bileşiklerin tayininde, yanı sıra halojenlenmiş, konjuge veya izomerik bileşikleri içeren yöntemler için tercih edilen bir kromatografi kolonudur.

XTerra RP18 kolonları, son derece bazik bileşiklerin ayrımında pik şekillerinin iyileştirilmesi üzerine tasarlanmış, karbon yüklemesi % 18 olan polar gömmeli, hibrit bazlı ters faz kolonlardır. X Terra RP C-18 kolonu, silika yüzeyinde serbest silanol grupları ile bazik analitlerin polar gruplarının etkileşimini engellemek için polar karbamat grubu içeren organosilan sübstientlerden oluşmuştur. Bu birinci nesil kolonlar, silika bazlı bir kolona kıyasla çok daha iyi bir pH kararlılığı sağlar. 2-12 arasında olan geniş pH aralığı, metod geliştirmede araştırmacıların optimum seçicilik için istenen pH'ta çalışmasına olanak tanır. Sülfonamidlerin pik simetrisi ve alıkonma zamanları da dikkate alınarak çalışmada X-Terra RP 18 (250 mm x 4,6 mm ID, 5 µm) kolon kullanılmıştır.

1.9. Kromatografide Sıcaklık Etkisi

Kolon sıcaklık kontrolü, sıcaklık seçiciliği etkileyebileceğinden, yöntem tekrarlanabilirliği için önemlidir. 30-40 °C aralığında bir hedef sıcaklık normalde iyi bir tekrarlanabilirlik için yeterlidir. Sıcaklık, HPLC'de genellikle göz ardı edilen bir parametre olmuştur ve yüksek kolon sıcaklıklarının, özellikle mobil fazın viskozitesinin azalmasına ve daha yüksek sıcaklıkta analit difüzyonunun artmasını sağlayan kinetik özelliklerinin iyileştirerek çalışmacıya avantaj sağlar. Çoğu durumda, yüksek veya yüksek sıcaklık kullanmanın amacı, daha yüksek verimlilik ve daha hızlı sonuçlar elde etmek için ayırma hızını arttırmaktır, ancak seçiciliğin sıcaklık değişimi yoluyla manipüle edilebileceği bazı durumlar vardır. Sıcaklık programlı HPLC, çalışma sırasında çözücü gücünün değişmesi için gradient çalışmaya alternatif olarak kullanılabilir ve bu durumda, düşük termal kütleye sahip küçük gözenekli kolonların tercih edilmesi önerilir. Sıcaklığın kapasite faktörü k üzerindeki etkisi, van't Hoff denklemi ile tanımlanabilir, kapasite faktörü sıcaklığın artmasıyla azalır (Shah vd., 2012).

$$\ln t_R = \Delta H^\circ / RT + \Delta S^\circ / R \quad (1.21)$$

Van't hof eşitliği ile (Eşitlik 1.21), çalışılan bileşiklerin $\ln t_R$ değeriyle sıcaklıklarının (Kelvin biriminde) tersi arasında lineer ilişki bulunmaktadır. Eşitlikte ΔH entalpi değişimini, ΔS ise entropi değişimini temsil etmektedir ve sırasıyla grafiğin eğim ve kesiminden hesaplanabilirler. R evrensel gaz sabitidir ($8,314 \text{ JK}^{-1}\text{mol}^{-1}$). Eşitliğe göre hesaplanan ΔH ve ΔS değerleri kullanılarak eşitlik 'deki bağıntıdan çalışılan bileşiklerin serbest entalpi değişimi (Gibbs enerji değişimi, ΔG) hesaplanabilir.

ΔH° negatif olduğunda, alıkonma prosesi ekzotermiktir ve genellikle ters faz kromatografisinde olduğu gibi, analitin mobil fazdan sabit faza aktarılması tercih edilir. ΔH° ne kadar negatif olursa, analit ve durgun faz arasındaki etkileşim o kadar elverişlidir, bu da genellikle daha büyük k değerlerini verir (Linford vd., 2012)

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bell ve Romblin (1942) yaptıkları çalışmada sülfanilamid türevlerinin asit ayrışma sabitlerinin kemoterapötik aktiviteleriyle ilişkili olduğunu gözlemlemişlerdir. Çok sayıda sülfanilamid türevi bileşiklerin asitlik sabitlerini tayin etmişlerdir. Bakteriyostatik aktiviteye karşı asit sabitlerini incelemişler ve bir N sübstitüentli sülfanilamid türevinin SO₂ grubu ne kadar negatif olursa, bakteriyostatik etkisi de o kadar büyük olur teorisini öne sürmüşlerdir.

Ross vd., (1992) çalışmalarında bileşiklere ait oktanol/su dağılma katsayılarını sıvı kromatografik ve spektrofotometrik yöntemle tayin etmişlerdir. 25°C’de gerçekleştirilen çalışmada pH değerleri 5, 7 ve 9 olarak belirlenmiş ve iyonik şiddet 0,15 olacak şekilde ayarlanmıştır. Bileşiklerin dağılması genel olarak zwitter iyonik bölgede tutarlıdır, böylece en yüksek dağılma sulu çözeltinin pH’ı izoelektrik noktanın pH’ına (pH:7) yakın olduğunda gözlemlenmiştir. Buna karşın normal dağılma davranışının dışında, sekonder amin içeren bileşikler olan florokinolonlarda dağılmanın arttığı pH değeri 5 olarak belirlenmiştir. Çalışmada dağılma katsayılarını belirlerken 1964’te Hansch ve arkadaşları tarafından geliştirilen bileşiklerin fonksiyonel gruplarıyla ilişkili bir eşitlik (Eşitlik 2.1) kullanmışlardır.

$$\pi_x = \log P_x - \log P_H \quad (2.1)$$

Verilen eşitlikte, π_x , sübstitüent sabiti, $\log P_H$ ve $\log P_x$ ise sırasıyla bileşiğin ve türevlerinin dağılma katsayısıdır. Bjerrum türlerinin sulu fazdaki dağılımı, hidrojen iyonu konsantrasyonuna $[H^+]$ ve iyonlaşma sabitlerine (K_{a1} ve K_{a2}) bağlıdır. Buna bağlı olarak gerçek dağılma katsayılarını Eşitlik 2.2’ye göre hesaplamışlardır.

$$D = \frac{[HQ^\pm]_o + [HQ^0]_o}{[H_2Q^+]_w + [HQ^\pm]_w + [HQ^0]_w + [Q^-]_w} \quad (2.2)$$

Termodinamik dağılma katsayıları için ise aşağıdaki eşitliği kullanmışlardır.

$$K_d = D \left(\frac{K_a + [H^+]}{[H^+]} \right) \quad (2.3)$$

Çizelge 2.1. Bileşiklerin hesaplanan logP ve log K_d değerleri

Bileşik	Hesaplanan logP ^a	Ölçülen termodinamik log K _d ^b
Amifloksasin	-1,75	0,34
Siprofloksasin	-0,75	-0,94
Difloksasin	-0,42	0,89
Enoksasin	-0,91 ^c	-0,91
Fleroksasin	-1,27	-0,53
Lomefloksasin	0,26	-0,83
Nalidiksik asit	0,78	1,59
Norfloksasin	-1,00 ^c	-1,00
Ofloksasin	-0,04	-0,28
Temafloksasin	0,53	-0,20

Ricci ve Cross (1993), 22 adet sülfonamitin ayrımını kapiler elektroforez yöntemi ile incelemiştir. Çalışmada sülfonamitlerin ayrımının gerçekleştiği optimum pH değerini pH 7-7,5 olarak belirlemiştir. Çalışmada ayrıca pH 7 de kullanılan fosfat tamponu derişiminin (30mM, 50mM ve 100mM) alıkonma ve pK_a üzerine etkisini incelemişler ve artan tampon derişimi ile alıkonmanın arttığını ve pK_{a2} değerlerinin azaldığını gözlemlemiştir. Bu çalışmada sülfonamitlerin belirlenen pK_a değerleri, Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Sülfonamitlerin kapiler elektroforez yöntemiyle belirlenen pK_a değerleri

Bileşik Adı	pK _{a1}	pK _{a2}
Sülfotiazol	-	7,2
Sülfometazin	2,4	7,4
Sülfometoksipiridazin	-	6,7
Sülfodiazin	2	6,5
Sülfokinoksalin	-	5,5
Sülfometaksazol	-	5,6

Lin vd (1997), 13 adet sülfonamitin pK_a değerlerini kapiler elektroforez yöntemi ile tayin etmişlerdir. Çalışmada tampon derişimi, sıcaklık ve pH nın elektroforetik mobilite üzerindeki etkisi incelenmiştir ve pH ve mobilite ilişkisi yardımı ile pK_a

değerleri hesaplanmıştır. Sülfonamitlerin ayrılmasında optimum koşul, sitrat tamponunun 60 mM olduğu ve pH'nın 6,9 olduğu koşul olarak belirlenmiştir. Sülfonamitlerin tayininde sıcaklığın ise 25-35°C aralığında olması gerektiği de tavsiye edilmektedir.

Çizelge 2.3. Sülfonamitlerin kapiler elektroforez yöntemiyle belirlenen pK_a değerleri

Bileşik adı	pK _{a1}	pK _{a2}
Sülfotiazol	2,08	7,07
Sülfometazin	2,28	7,42
Sülfometoksipiridazin	2,09	6,95
Sülfisomidin	2,68	7,26
Sülfomerazin	2,17	6,77
Sülfometer	1,87	6,57
Sülfodiazin	2,10	6,28
Sülfokinoksalin	1,86	5,56
Sülfomonometoksin	1,98	5,96
Sülfodimetoksin	1,87	5,86
Sülfokloropiridazin	1,90	5,40
Sülfometaksazol	1,83	5,57
Sülfisaksazol	1,66	4,71

Barbosa ve ekibi (2001), çalışmalarında zwitter iyonik yapıdaki kinolonların asetonitril-su karışımlarındaki pK_a değerlerini farklı teknikler kullanarak tayin etmişlerdir. Çalışmada 0,1 ve 0,02 M KOH çözeltileri asetonitril-su karışımında hazırlanmış ve potasyum hidrojen fitalat (KHP) ile standardize edilmiştir. Bu çalışmada siprofloksasin, ofloksasin, sarofloksasin, norfloksasin, pipemidik asit, enoksasin, fleroksasin, danofloksasin, enrofloksasin, difloksasin ve marbofloksasin pK_a değerleri tayin edilen bileşiklerdir. % 50 asetonitril içeren asetonitril-su karışımında potansiyometrik yöntemle ofloksasinin pK_{a2} değeri 8,76; pipemidik asidin 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} değeri ise 8,95 olarak bulunmuştur.

Vazquez vd., (2001), çalışmalarında homolog bir N-4 piperazinil sirprofloksasin serisinin n-oktanol-su dağılma katsayılarını farklı pH'larda (4,80; 7,40 ve 9,10) belirlemişlerdir. Termodinamik dağılma katsayıları deneysel değerlerden hesaplanmış ve iki farklı model kullanılarak ifade edilmiştir. N-oktanol ve tampon türleri arasındaki deneysel dağılma katsayısını (D), Ross ve ekibinin (1992) geliştirdikleri bir yöntemi kullanarak belirlemişlerdir. Deneysel dağılma katsayısı (D), organik fazdaki nötr ve zwitter iyonik türlerin toplamı ile sulu fazdaki tüm türlerin konsantrasyonlarının toplamı arasındaki oran olarak ifade edilebilir. Alternatif olarak, organik fazdaki nötr formun konsantrasyonu ile sulu fazdaki tüm türlerin konsantrasyonlarının toplamı arasındaki oran olarak dağılma katsayısını ifade etmek mümkündür (Takacs-Novak vd.,1995). Çizelge 2.4'te gösterilen, siprofloksasin için elde edilen deneysel dağılma katsayıları Ross ve Riley'in bulduğu değerler ile yakınlık göstermektedir.

Çizelge 2.4. Siprofloksasin için elde edilen deneysel dağılma katsayıları

pH	D	Standart sapma
4,8	0,067	0,004
7,4	0,074	0,005
9,1	0,031	0,005

Martinez ve Gómez (2002), yapısal olarak birbirine benzeyen bazı sülfonamitlerin 1-oktanol-sulu tamponda ve iki farklı lipozom-sulu tampon sisteminde termodinamik yaklaşım kullanarak 20-50°C arasındaki dağılma davranışlarını incelemişlerdir. 1-oktanol-sulu sistemde Dağılma katsayıları (P), sülfodiazin, sülfometazin, sülfatiazol ve sülfometaksazol için sırasıyla 0,899 (0,006), 1,965 (0,012), 1,042 (0,026) ve 7,81 (0,15)'dir. P değerleri sülfodiazin ve sülfometazin için sıcaklıkla artarken, sülfometaksazol için azalmıştır. Diğer 2 lipozom-sulu ortamında ise P değerlerinin tüm sülfonamitler için arttığını gözlemlemişlerdir.

Qiang ve Adams (2004), çalışmalarında 26 adet insan ve hayvanların tedavisinde kullanılan antibiyotiğin asitlik sabitltlerini (pK_a) potansiyometrik yöntemle tayin etmişlerdir. Titrasyonda kullanılan NaOH ve HCl'nin çözeltileri 0,01M ve 0,1M olacak şekilde hazırlanmış olup, sırasıyla potasyum asit fitalat ve sodyum karbonat ile

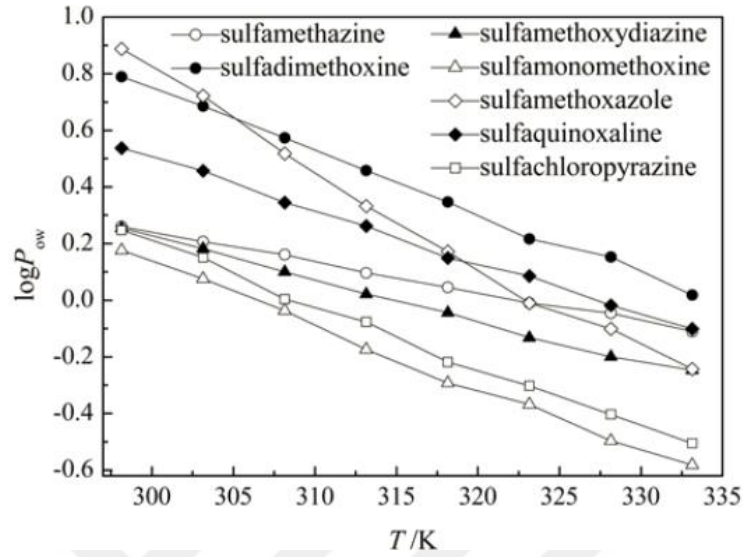
ayarlanarak pKa değerlerini hesaplamışlardır. Sülfonamidler için, pKa₁ değerlerinin yaklaşık 2 ve pKa₂ değerleri için 5-7,5 arasında olduğunu rapor etmişlerdir.

Kasap ve arkadaşları, (2005) yılında siprofloksasin ve norfloksasinin kantitatif tayinleri için sıvı kromatografik bir yöntem geliştirerek yöntemin validasyonunu yapmışlardır. Bileşiklerin analizleri LiChrospher RP-18 (5 µm, 125 mm x 4 mm) kolon ve su: asetonitril: trietilamin (80:20:0,3 v/v/v) içeren mobil faz kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Mobil faz pH'sı fosforik asit kullanılarak 3,3'e ayarlanmıştır. Oda sıcaklığında gerçekleştirilen analizde akış hızı 1 mL/dakika olarak ayarlanmış ve dalga boyu 279 nm olarak belirlenmiştir.

Barbato vd., (2007) yapmış oldukları çalışmada antibakteriyel ajan olan on kinolonun alıkonma davranışını sıvı kromatografik yöntem kullanarak incelemişlerdir. Asidik ve zwitter iyonik yapıdaki kinolonların alıkonması çeşitli lipofilisite skalaları ile ilişkilendirilmiştir. Bunlar teorik hesaplanan logP değerleri, pH 7,4'te çalkalama metodu kullanılarak elde edilen veriler ve iyon çifti kullanılarak gerçekleştirilen RPLC metotlarıdır. İyon çifti RPLC'de % 55 metanol içeren ve pH'ı 7,0 olan mobil faz kullanılmış ve iyon çifti olarak sulu faza tetrabütülamonyumhidroksit eklenmiştir. Akış hızı 0,8 ml/dk olarak ayarlanmış ve oda sıcaklığında çalışılmıştır. Sonuç olarak asidik ve zwitter iyonik türlerin logP değerlerinin nötral formdaki değerlere çok yakın olduğu belirlenmiştir. Serum proteinleri ve logP değerleri arasında ilişki olmadığı sonucuna varılmıştır. Shake flask metodu; kinoksasin, oksolinik asit, nalidiksik asit ve flumekin gibi asidik yapıdaki kinolonlara uygulanabilirken ve nötral formdaki logP değerleri bulunabilirken (0,061, 0,354, 0,449 ve 0,565), pipedimik asit, pirodimik asit, siprofloksasin, norfloksasin, ofloksasin ve rufloksasin gibi zwitter iyonik yapıdaki kinolonların logP değerlerini çalkalama metoduyla tayin edememişlerdir.

Congliang vd. (2007), bazı sülfonamidlerin oktanol-su dağılma katsayılarını çalkalama metodu ile belirlemişlerdir. Yöntemde, sıcaklığa bağlı olarak (298,15-333,15 K), n-oktanol / su dağılma katsayısının termodinamik ilişkisi kullanılmış ve sırasıyla n-oktanol / sudaki sülfonamidlerin dağılması katsayılarının hesabında entalpi, entropi ve Gibbs serbest enerji fonksiyonlarından yararlanılmıştır. Sülfometaksazol ve sülfometazin için tayin edilen dağılma katsayıları sırasıyla, 0,8869 ve 0,2594'tür ve

literatür verileri ile uyum içinde olduğu gösterilmiştir. Sonuçlar her bir sülfonamitin dağılma katsayısının sıcaklık artışı ile azaldığını göstermiştir.



Şekil 2.1. Bazı Sülfonamitlerin farklı sıcaklıklardaki dağılma katsayıları

Cañada-Cañada vd., (2007) yaptıkları çalışmada enrofloksasin, pipemidik asit, marbofloksasin, siprofloksasin, enoksasin, flumekuin, danofloksasin, lomefloksasin, difloksasin, sarafloksasin, nalidiksik asit, okzolonik asit ve piromidik asitin idrar ve farmasötik numunelerde tayini için ters faz sıvı kromatografik bir yöntem geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırım C18 ters faz analitik kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Metanol-asetonitril-10 mM sitrat tamponu içeren ve pH'sı 3,5 ve pH 4,5 olan mobil fazlar kullanılarak en uygun gradient program seçilmiş ve kromatografik ayırım 26 dakikada tamamlanmıştır.

Sanli vd. (2009), yapmış oldukları çalışmada on sülfonamite ait pK_a değerlerini hem suda hem de asetonitril-su ikili karışımlarında belirlemişlerdir. UV-spektroskopi metodunun kullanıldığı çalışmada % 15, 23, ve 30 asetonitril-su ikili karışımları kullanılmıştır ve Kamlet ve Taft solvatokromik parametreleri, π^* , α ve β ile ilişkilendirilmiştir. Kamlet Taft'ın genel denklemi kombine faktör analizi ve hedef faktör analizi ile iki terime indirgenmiştir. Bu karışımlarda: bağımsız terim, polarite / polarize edilebilirlik, π^* , solvatokromik bir parametredir. Çalışma sonucunda bileşiklerin pK_a değerleri ile organik çözücünün mol kesirleri arasında doğrusal bir ilişki olduğu bulunmuştur.

$$pK_{a,\phi} = pK_{a,w} + \phi \Delta pK \quad (2.4)$$

Eşitlik 2.4 kullanılarak elde edilmiş pKa değerleri çalışılan sülfonamidler için çizelge 2.5.'de gösterilmektedir. Burada, pK_{a,w} sudaki iyonlaşma sabitini, φ, organik çözücünün mol kesrini, ΔpK, doğrusal denklemdeki eğimi göstermektedir.

Çizelge 2.5. Sülfonamidlerin suda ve % 15, 23 ve 30 asetonitril-su ikili karışımlarındaki pKa₁ ve pKa₂ değerleri

	Su	% 15 (v/v) ACN	% 23 (v/v) ACN	% 30 (v/v) ACN
Sülfadiazin	1,94; 6,33	1,62; 6,62	1,47; 6,88	1,43; 7,11
Sülfamerazin	2,27; 6,71	1,84; 7,07	1,74; 7,31	1,83; 7,49
Sülfametoksazol	1,49; 5,41	1,39; 5,65	1,30; 5,87	1,28; 5,91
Sülfatiazol	1,89; 7,12	1,79; 7,33	1,72; 7,37	1,62; 7,49
Sülfamonometoksin	1,73; 6,22	1,63; 6,32	1,52; 6,36	1,52; 6,40
Sülfametokspiridazin	2,09; 6,83	2,09; 7,02	2,05; 7,31	1,74; 7,60
Sülfadimetoksin	2,11; 6,17	2,18; 6,40	2,19; 6,51	2,20; 6,60
Sülfafurazol	2,28; 5,19	2,44; 5,34	2,49; 5,45	2,61; 5,49
Sülfadoksin	2,38; 5,77	2,25; 5,91	2,15; 6,32	2,08; 6,54
Sülfakinoksalin	2,34; 5,97	2,24; 6,16	2,40; 6,27	2,34; 6,33

Caço vd., (2010) yılında yapmış oldukları çalışmada sarafloksasine ait apparent dağılma katsayısını (Papp.) çalkalama metodu ile tayin etmişlerdir. 25°C'de gerçekleştirilen çalışmada bileşiğin iyonlaşma sabiti spektrofotometrik metotla tayin edilmiştir. Çizelge 2.6'te sarafloksasinin farklı pH'larda elde edilen logPapp değerleri standart sapmalarıyla birlikte verilmiştir. Sarafloksasine ait apparent dağılma katsayısı Eşitlik 2.5 yardımıyla hesaplanmıştır.

Çizelge 2.6. Sarafloksasinin farklı pH'lardaki logPapp değerleri

pH	LogP _{app}	SD	n
3,0	-0,841	0,021	6
5,0	-0,652	0,020	6
7,0	-0,888	0,024	6
9,0	-1,261	0,001	6

$$P_{app} = \frac{A_i - A_f}{A_f} \frac{V_w}{V_o} \quad (2.5)$$

Eşitlikte verilen A; sarafloksasinin sulu fazda sırasıyla, dağılmadan önceki ve sonraki absorbansını ifade eder. V değerleri ise oktanol-su sisteminde sulu faz ve mobil faz hacimlerini ifade etmektedir. Sonuç olarak sarafloksasinin n-oktanol/tampon sisteminde pH-dağılma profili yorumlandığında sarafloksasinin nötral türlerinin maksimum derişimde bulunduğu pH 5,5 izoelektrik noktasında maksimum lipofilisiteyi gösterdiği rapor edilmiştir. Bu pH'nın altında veya üstünde kinolonların polaritesinin yüksek olmasından dolayı dağılma katsayısının azaldığı gözlenmiştir.

Sanli vd. (2010), yapmış oldukları çalışmada yedi sülfonamite ait pK_a değerlerini asetonitril-su ikili karışımlarında belirlemişlerdir. LC ve LC-PDA yöntemlerinin kullanıldığı çalışmada % 15, 30, 40 ve 50 asetonitril içeren ve pH'ları 1,7 ve 9,0 arasında değişen mobil fazlar kullanılmıştır. 25°C'de yürütülen çalışmada Phenomenex Prodigy ODS-3 kolon (250 x 4,6 mm x 5 mm) tercih edilmiştir. Çalışma sonucunda bileşiklerin pK_a değerleri ile organik çözücünün mol kesirleri arasında doğrusal bir ilişki olduğu bulunmuştur.

$$pK_{a,j} = pK_{a,w} + j\Delta pK \quad (2.6)$$

Eşitlik 2.6 kullanılarak elde edilmiş pK_a değerleri sülfadiazin, sülfatiazol, sülfamerazin, sülfametazin, sülfamonometoksin, sülfadoksin ve sülfametoksazol için sırasıyla 6,57; 7,21; 7,14; 7,31; 6,33; 6,17 ve 5,98 şeklindedir. Burada, pK_a , w sudaki iyonlaşma sabitini, j, organik çözücünün mol kesrini, ΔpK , doğrusal denklemdeki eğimi göstermektedir.

Zhang Congliang vd. (2010), bazı kinolonların oktanol-su dağılma katsayılarını çalkalama metodu ile belirlemişler ve dağılma katsayılarına 293,15 K'den -323,15 K'e kadar sıcaklığın etkisini incelemişlerdir. Akışkan faz denge teorisine dayanarak, 1-oktanol / su dağılma katsayısının sıcaklığa bağlı termodinamik ilişkisi incelenmiş ve 1-oktanol / su içine dağılan kinolonların entalpi, entropi ve Gibbs serbest enerjisindeki değişimleri aşağıdaki formüllerle sırasıyla belirlemişlerdir.

$$\Delta G_{wl} = \Delta H_{wl} - T\Delta S_{wl} \quad (2.7)$$

ΔG_{wl} , Gibbs serbest enerji değişimi, ΔH_{wl} , entalpi değişimini ve $T\Delta S_{wl}$ entropi değişimini temsil etmektedir.

$$\Delta G_{wl} = -2.3026R \lg K_{ow} \quad (2.8)$$

R, gaz sabiti, T mutlak sıcaklık ve K_{ow} dağılma katsayısını ifade etmektedir.

İlaç ve biyofilm arasındaki etkileşimin Gibbs serbest enerji değişimi (ΔG_{wl}), dağılma sürecindeki entalpi değişimine (ΔH_{wl}) ve entropi değişimine (ΔS_{wl}) göre hesaplanabilir. Eşitlik 2.7'nin Eşitlik 2.8'ye uygulanması ile kinolonların 1-oktanol / su dağılma katsayısının logaritması elde edilebilir. (Eşitlik 2.9)

$$\log K_{ow} = \frac{-\Delta H_{wl}}{2.3026RT} + \frac{-\Delta S_{wl}}{2.3026R} \quad (2.9)$$

1-oktanol/su sisteminde dağılan altı kinolon için ΔH_{wl} değerlerinin hepsinin pozitif olduğunu gözlemlemişlerdir ve bu da dağılmanın endotermik olduğunu göstermektedir. Bu durumu su moleküllerinin ilaç moleküllerini 1-oktanol moleküllerinden daha kolay çözmesiyle ilişkilendirmişlerdir. Ayrıca her bir kinolonun dağılma katsayısının sıcaklık artışı ile arttığını gözlemlemişlerdir.

Çizelge 2.7. 310.5 K'de Kinolonların ΔH_{wl} , ΔS_{wl} , ΔG_{wl} değerleri

Bileşik	$\Delta H_{wl} / (\text{kJ mol}^{-1})$	$\Delta S_{wl} / (\text{J mol}^{-1} \cdot \text{K}^{-1})$	$\Delta G_{wl} / (\text{kJ mol}^{-1})$
Ofloksasin	23,28	70,79	1,324
Norfloksasin	18,35	89,60	-9,439
Lomefloksasin	19,76	44,41	5,986
Siprofloksasin	26,44	68,51	5,192
Pefloksasin	46,31	139,6	3,013
Pipedimik asit	20,33	44,59	6,500

Kłosińska-Szmurło vd., (2014) çalışmalarında bazı kinolonların logP değerlerini paket programlar ve çalkalama metoduyla deneysel olarak tayin etmişlerdir. 25°C'de yürütülen çalışmada pH 6,8 olarak belirlenmiştir. Hesaplama için, Eşitlik 2.10'dan faydalanılmıştır.

$$\log P_{o/w} = -\Delta G^\circ / 2.303RT \quad (2.10)$$

Verilen eşitlikte; 298 K ve 1 atm basınçta T, R ve ΔG° sırasıyla; mutlak sıcaklık, gaz sabiti, serbest bağlanma enerjisidir. Çalışmada pefloksasine ait logP değeri pozitif olarak hesaplanırken diğer kinolonların negatif değerlere sahip olması bu bileşiklerin pH 6,8’de polar ortamda yüksek benzerlik göstermesi olarak yorumlanmıştır. Çalışmada paket programlarla hesaplanan teorik verilerin birbirleriyle uyumlu olmadığı vurgulanmıştır. Çalışmada elde edilen deneysel değerler, Çizelge 2.8’de verilmiştir.

Çizelge 2.8. Çalışılan bileşiklerin deneysel verilerle hesaplanmış logP değerleri

	LogP
Siprofloksasin	-0,55
Norfloksasin	-0,92
Pefloksasin	0,19
Sparfloksasin	-0,11
Gatifloksasin	-0,80

Cardenas-Youngs vd., (2015) çalışmalarında kinolonların oktanol-su dağılma katsayılarını çalkalama metodunu kullanarak belirlemişlerdir. Kinolonların konsantrasyonları HPLC metoduyla tayin edilmiş olup çalışmada floresans dedektör kullanılmıştır. 25°C’de gerçekleştirilen çalışma, pH 3-9 aralığında yürütülmüştür. Çalışmada maddelerin lipofilisite değerleri düşük olarak yorumlanmış ve logK_{ow} değerlerinin -1.09-0.68 aralığında olduğu belirlenmiştir. Çalışılan bileşiklerin iyonlaşma sabitlerinin, önceki çalışmalardan yararlanarak pK_{a1} değerleri 5,59 ve 6,50 ve pK_{a2} değerlerinin ise 7,99 ve 8,96 aralığında olduğu rapor edilmiştir.

Hazhir vd. (2017), çalışmalarında sülfametazin ve sülfamerazinin sudaki termodinamik ve yapısal özelliklerini teorik olarak belirlemişlerdir. 298,15 K’de Tomasi metoduyla elde edilen pK_a değerlerini deneysel olarak elde edilen (Babic vd. 2007) pK_a değerleri ile karşılaştırmışlardır. Sülfametazin ve sülfamerazin için pK_a değerleri sırasıyla 7,58 ve 6,70 hesaplanmıştır. Hesaplanan teorik pK_a değerlerinin deneysel pK_a değerleriyle uyumlu olduğu gözlemlenmiştir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu bölümde sülfonamitlerin ve kinolonların iyonlaşma sabitleri ve dağılma katsayılarının kromatografik yöntemle tayininde kullanılan cihazlar ve kimyasallar hakkında bilgi verilmiştir.

3.1. Kullanılan Cihazlar

3.1.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı

Çalışılan bileşiklerin kapasite faktörü tayinleri ve sıvı kromatografik ayırmaları, Shimadzu marka HPLC cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sistemde, sistem kontrol ünitesi (CBM 20A), pompa (LC20 AD), dedektör (SPDM 20A Foto Diyod Array), kolon fırını (CTO 20 AC) ve gaz giderme ünitesi (DGU 20 A) bulunmaktadır. Çalışmada kolon etüvü kullanılarak çeşitli sıcaklıklarda çalışılmıştır. Sabit faz olarak X-Terra RP 18 (250 mm x 4,6 mm ID, 5 µm) ve Kinetex F5 100 Å (150 mm x 4,6 mm ID, 2,6 µm) ters faz sıvı kromatografi kolonları kullanılmıştır.

3.1.2. pH/iyon metre

HPLC mobil fazının pH ölçümlerinde Metleer Toledo MA 235 pH/iyon analiz cihazı kullanılmıştır. pH ölçümlerinde Hamilton pH elektrotan yararlanılmıştır. pH ölçümlerinde sabit sıcaklık su banyosu (HETO CBN 8-30 ve HETO HMT 200 sıcaklık kontrol ünitesi) kullanılarak 25°C±0,1°C sıcaklıkla çalışılmıştır.

3.1.3. Kromatografi kolonu

Çalışmada Kinolon grubu antibiyotikler için Kinetex F5 100 Å (150 mm x 4,6 mm ID, 2,6 µm) kromatografi kolonu kullanılmıştır. Sülfonamitlerin pik simetritleri ve alıkonma zamanları da dikkate alınarak çalışmada X-Terra RP 18 (250 mm x 4,6 mm ID, 5 µm) kolon kullanılmıştır.

3.1.4. Tampon Çözelti

Bu çalışmada bileşiklerin ayrılma ve alıkonma süreleri de göz önünde bulundurularak 25 mM fosfat tamponu kullanılmıştır.

3.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

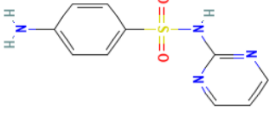
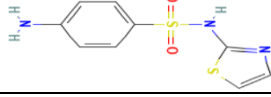
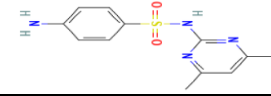
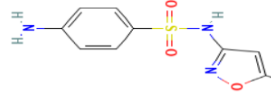
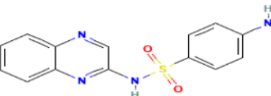
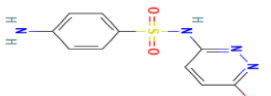
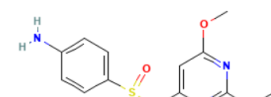
Deneylerde kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya HPLC saflıktadır.



Çizelge 3.1. Çalışılan Kinolon grubu antibiyotikler ve özellikleri

Bileşik Adı	Markası	Kimyasal Yapısı	Molekül Formülü	Özellikler
Enrofloksasin CAS No: 93106-60-6	Riedel-de-Haen		$C_{19}H_{22}FN_3O_3$ Ma= 359,401g/mol	E.N. : 219-221 °C HPLC saflıkta> %98
Danofloksasin CAS No: 112398-08-0	Riedel-de-Haen		$C_{19}H_{20}FN_3O_3$ Ma= 357,385 g/mol	E.N. :263 °C HPLC saflıkta > %98
Ofloksasin CAS No: 82419-36-1	Riedel-de-Haen		$C_{18}H_{20}FN_3O_4$ Ma=361,367 g/mol	E.N. : 250 - 257 °C HPLC saflıkta > %98
Marbofloksasin CAS No: 115550-35-1	Riedel-de-Haen		$C_{17}H_{19}FN_4O_4$ Ma=362.36 g/mol	E.N. : 250-257 °C HPLC saflıkta > %98
Siprofloksasin CAS No: 85721-33-1	Riedel-de-Haen		$C_{17}H_{18}FN_3O_3$ Ma=331.34 g/mol	E.N. : 255-257°C HPLC saflıkta > %98
Enoksasin CAS No: 74011-58-8	Riedel-de-Haen		$C_{15}H_{17}FN_4O_3$ Ma=320.32 g/mol	E.N. : 220-224 °C HPLC saflıkta > %98

Çizelge 3.2. Çalışılan Sülfonamit grubu antibiyotikler ve özellikleri

Bileşik Adı	Markası	Kimyasal Yapısı	Molekül Formülü	Özellikler
Sülfadiazin CAS No: 68-35-9	Riedel-de-Haen		C ₁₀ H ₁₀ N ₄ O ₂ S Ma= 250,28 g/mol	E.N. : 254-255 °C HPLC saflıkta> %99
Sülfatiazol CAS No: 72-14-0	Riedel-de-Haen		C ₉ H ₉ N ₃ O ₂ S ₂ Ma= 255,32 g/mol	E.N. :200,8-202 °C HPLC saflıkta > %99
Sülfametazin CAS No: 57-68-1	Riedel-de-Haen		C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₂ S Ma=278,33 g/mol	E.N. : 197 °C HPLC saflıkta > %99
Sülfametaksazol CAS No: 723-46-6	Riedel-de-Haen		C ₁₀ H ₁₁ N ₃ O ₃ S Ma 253,28= g/mol	E.N. : 166 °C HPLC saflıkta > %99
Sülfakinoksalin CAS No: 59-40-5	Riedel-de-Haen		C ₁₄ H ₁₂ N ₄ O ₂ S Ma=300,34 g/mol	E.N. : 247-248°C HPLC saflıkta > %99
Sülfametoksipiridazin CAS No: 80-35-3	Riedel-de-Haen		C ₁₁ H ₁₂ N ₄ O ₃ S Ma=280,31 g/mol	E.N. : 182 °C HPLC saflıkta > %99
Sülfadimetoksin CAS No: 122-11-2	Riedel-de-Haen		C ₁₂ H ₁₄ N ₄ O ₄ S Ma= 310,33g/mol	E.N. : 200°C HPLC saflıkta > %99

Çalışmada kullanılan diğer kimyasal maddeler ve özellikleri, Çizelge 3.3’de verilmiştir.

Çizelge 3.3. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Adı	Kullanım amacı	Açıklama
Potasyum hidrojen fitalat	pH metre için kalibrasyon çözeltisi	Merck (Referans Değer Standardı)
Fosforik asit	Mobil faz pH’ının ayarlanmasında	Merck, analitik saflıkta
Sodyum hidroksit	Mobil faz pH’ının ayarlanmasında	Merck, analitik saflıkta
Asetonitril	Su ile ikili karışımları halinde çalışılan ortam	Merck , HPLC saflığında
Urasil	Kolonda tutunmayan türün kolonu terk etme zamanını belirlemede	Sigma, HPLC saflıkta

3.3. Kullanılan Çözeltiler

3.3.1. Kinolonların pKa ve logP tayininde kullanılan çözeltileri

Kinolonların tayininde %17 asetonitril (%v/v) ortamında mobil fazın pH sı pH 3,50-8,50 aralığında ayarlanarak pH’nın kapasite faktörü üzerinde etkisi incelenmiş olup, pH 6,5 de 30°C, 37°C ve 44°C’de kapasite faktörü üzerinde sıcaklık etkisi incelenmiştir.

Kromatografik çalışmada, tayini yapılan bileşiklerin her biri günlük olarak hazırlanmıştır. Analitik saflıkta temin edilen bileşiklerin her birinden 0,0010 g, 10 mL mobil fazda çözülerek 100 ppm’lik stok çözeltileri hazırlanmış ve +4°C’ de muhafaza edilmişlerdir. Hazırlanan çalışma çözeltilerinden 20 µL sıvı kromatografi cihazına enjekte edilmiştir. Çalışma, 0,5 mL/dakika akış hızı ile yürütülmüştür. Çalışma dalga boyları, kinolon grubu antibiyotikler için 280-290 nm olarak seçilmiştir.

3.3.1.1. % 17 (v/v) Asetonitril-su ikili karışımı

100 mL’lik stok ortam için 83 mL saf su alınmış ve üzerine 17 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim

büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Mobil faza 25 mM derişimde olacak şekilde H_3PO_4 (% 85 (a/a); 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran su-asetonitril karışımında hazırlanmış NaOH'den (1 M) ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen pH değeri incelenecek değere ayarlanmıştır. pH 8,5 değeri için mobil faz ortamına derişim 25 mM olacak şekilde katı NH_4Cl ilave edilerek, istenilen pH değeri derişik NH_3 ilavesiyle ayarlanmıştır. Mobil faz ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

3.3.1.2. Urasil çözeltisi

Çalışılan koşullarda kapasite faktörlerinin belirlenmesi için kullanılan urasil çözeltisi, derişimi % 0,01 (w/v) olacak şekilde suda hazırlanmıştır. Urasilın hazırlanan bu çözeltisinden 20 μL enjekte edilerek kolonda tutunmayan türe özgü t_0 alıkonma zamanı belirlenmiştir.

3.3.1.3. Potasyum hidrojen fitalat çözeltisi

$C_6H_4(COOK)(COOH)$, primer standart pH referans çözeltisi olarak 0,05 molal derişimde kullanılmış ve pH metre bu bileşik için gerekli değere ayarlandıktan sonra mobil fazların pH değerleri ayarlanmıştır. 2 saat 110°C'da kurutulmuştur.

3.3.1.4. Standartların çözeltisi

Kromatografik çalışmada bileşiklerin her birinden 0,0010 g, 10 mL mobil fazda çözülerek 100 ppm'lik çözeltileri hazırlanmıştır. Sıvı kromatografi cihazına her bir stok çözeltiden 20 μL enjekte edilmiştir. Her bir bileşik için ikişer kez enjeksiyon yapılarak ortalama alıkonma zamanları belirlenmiştir.

3.3.2. Sülfonamitlerin pKa ve logP tayininde kullanılan çözeltileri

Sülfonamitlerin tayininde % 15 ve % 17 asetonitril (% v/v) ortamında mobil fazın pH sı pH 3,50-8,50 aralığında ayarlanarak pH'nın kapasite faktörü üzerinde etkisi

incelenmiş olup, % 15 asetonitril (%v/v) ortamında pH 4,5' da 25°C, 30°C ve 37°C'de kapasite faktörü üzerinde sıcaklık etkisi incelenmiştir.

Kromatografik çalışmada, tayini yapılan bileşiklerin her biri günlük olarak hazırlanmıştır. Analitik saflıkta temin edilen bileşiklerin her birinden 0,0010 g, 10 mL mobil fazda çözülerek 100 ppm'lik stok çözeltileri hazırlanmış ve +4°C' de muhafaza edilmişlerdir. Hazırlanan çalışma çözeltilerinden 20 µL sıvı kromatografi cihazına enjekte edilmiştir. Çalışma, 0,8 mL/dakika akış hızı ile yürütülmüştür. Çalışma dalga boyları, sülfonamit grubu antibiyotikler için 250-265 nm olarak seçilmiştir.

3.3.2.1. % 17 (v/v) Asetonitril-su ikili karışımı

100 mL'lik stok ortam için 83 mL saf su alınmış ve üzerine 17 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril- su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Mobil faza 25 mM derişimde olacak şekilde H₃PO₄ (%85 (a/a); 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran su- asetonitril karışımında hazırlanmış NaOH'den (1 M) ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen pH değeri incelenecek değere ayarlanmıştır. pH 8,5 değeri için mobil faz ortamına derişim 25 mM olacak şekilde katı NH₄Cl ilave edilerek, istenilen pH değeri derişik NH₃ ilavesiyle ayarlanmıştır. Mobil faz ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

3.3.2.2. % 15 (v/v) Asetonitril-su ikili karışımı

100 mL'lik stok ortam için 85 mL saf su alınmış ve üzerine 15 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Mobil faza 25 mM derişimde olacak şekilde H₃PO₄ (% 85 (a/a) ; 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran su - asetonitril karışımında hazırlanmış NaOH'den (1 M) ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen pH değeri incelenecek değere ayarlanmıştır. pH 8,5 değeri için mobil faz ortamına derişim 25 mM olacak şekilde katı NH₄Cl ilave edilerek, istenilen pH değeri derişik NH₃

ilavesiyle ayarlanmıştır. Mobil faz ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

3.3.2.3. Standartların çözeltileri

Kromatografik çalışmada bileşiklerin her birinden 0,0010 g, 10 mL mobil fazda çözülererek 100 ppm’lik çözeltileri hazırlanmıştır. Sıvı kromatografi cihazına her bir stok çözeltiden 20 µL enjekte edilmiştir. Her bir bileşik için ikişer kez enjeksiyon yapılarak ortalama alıkonma zamanları belirlenmiştir.

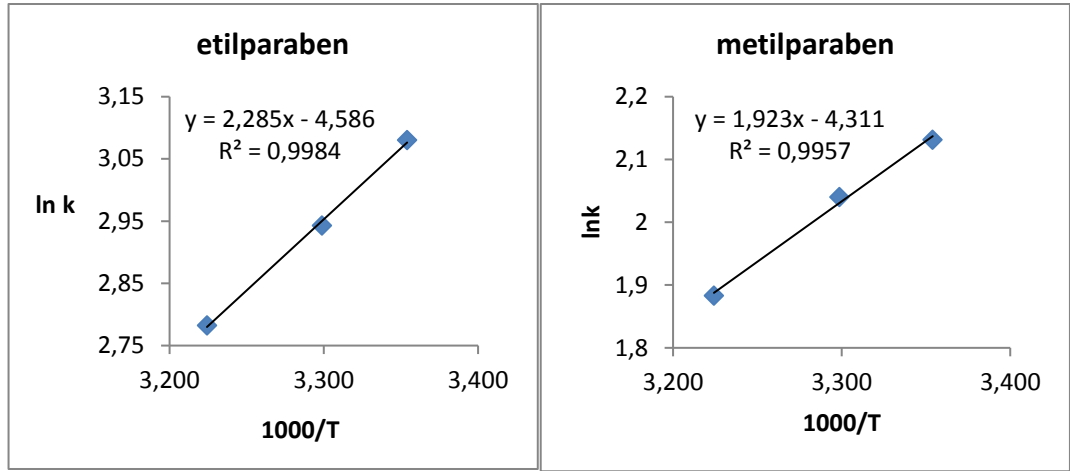


4. ARAŞTIRMA BULGULARI

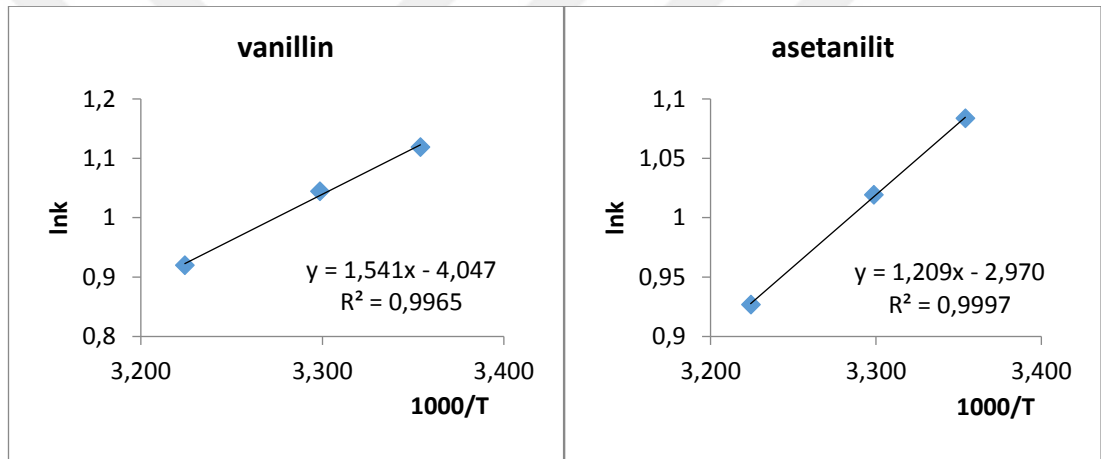
Bu tez çalışmasında çalışılan bazı sülfonamitlerin ve kinolonların lipofilisite değerlerinin belirlenmesi için metilparaben, etilparaben, asetanilit ve vanillin standart olarak seçilmiştir. Standartların seçiminde oktanol-su dağılma katsayılarının sülfonamitlerle uyumu göz önünde bulundurulmuştur. Bu bileşiklerin pK_a değerleri ve oktanol-su dağılma katsayılarının sıcaklıkla değişimi konusunda yeterli veri literatürde mevcuttur. Bu bilgiler gerekli bağıntılarda tez için faydalıdır. Lipofilisite tayini için kullanılan standartlarla ilgili çalışmalar, pK_a tayini ve sıcaklık çalışmaları olmak üzere iki başlıkta incelenmiştir. Standartların alıkonmasına farklı sıcaklıkların etkisi Kinetex F5 ve X TERRA kolonda gerçekleştirilmiştir.

4.1. X terra RP18 Kolon ile Standartların Alıkonmasına Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi

Bu tez çalışmasında sülfonamit bileşiğinin çalışılan kolonun üç farklı sıcaklığındaki alıkonma zamanlarının sıcaklıkla değişimi Van't Hoff bağıntısı ile incelenmiştir. Kapasite faktörü üzerine kolon sıcaklığının etkisi, 25 mM fosfat içeren %15 ACN-su ikili karışımında pH 4,5'da çalışılmıştır. Akış hızı 0,8 mL/dakikadır. Kolon olarak X terra RP18 kullanılmıştır. Van't Hoff eşitliğinin temel alındığı bu çalışmalarda seçilen standartlar, sülfonamitler ile aynı koşulda enjekte edilmişlerdir. Metilparaben, etilparaben, asetanilit ve vanilin için $\ln k-1000/T$ grafikleri, Şekil 4.1 ve Şekil 4.2'de verilmiştir.



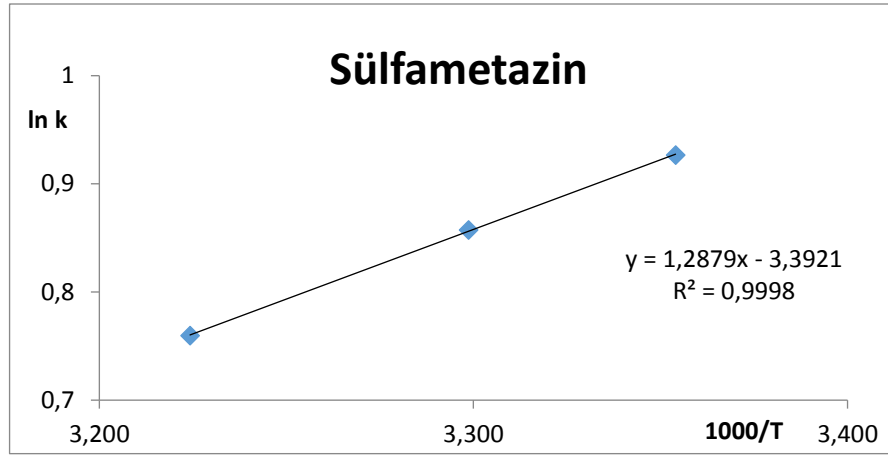
Şekil 4.1. Metilparaben ve etilparaben için asetonitril:su ikili karışımında (% 15; v/v) üç farklı sıcaklıkta $\ln k$ -1000/T grafiği



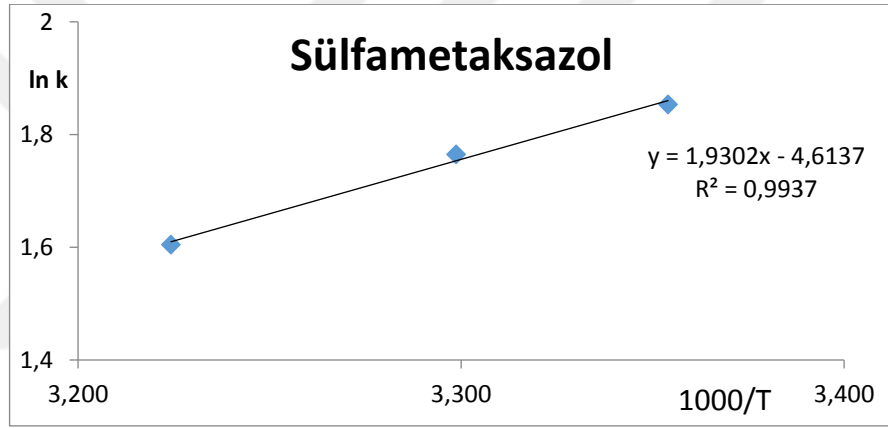
Şekil 4.2. Asetanilit ve vanilin için asetonitril:su ikili karışımında (% 15; v/v) üç farklı sıcaklıkta $\ln k$ -1000/T grafiği

Bileşiklerin alıkonma zamanı veya kapasite faktörü değerlerinin doğal logaritması ile sıcaklık (Kelvin biriminde) değerlerinin tersi arasında doğrusal bir ilişki bulunmaktadır.

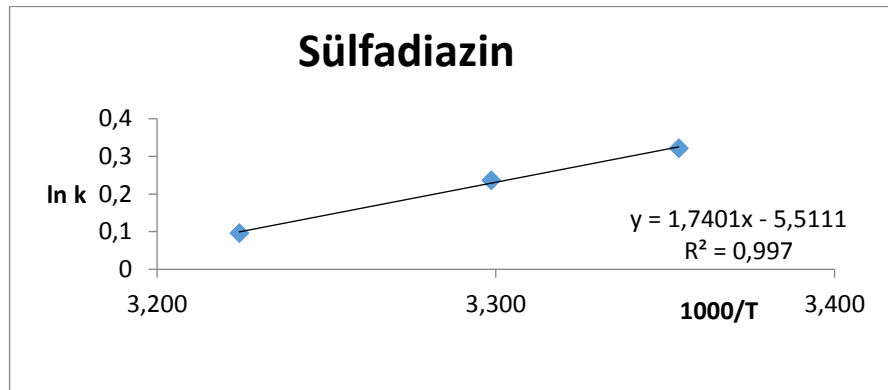
Standartlarla aynı koşulda sülfonamit grubu ilaçlar enjekte edilmiştir. Sülfadiazin, sülfatiazol, sülfakinoksalin, sülfametazin, sülfadimetoksin, sülfametaksozazol ve sülfometokspiridazin için $\ln k$ -1000/T grafikleri, Şekil 4.3- Şekil 4.9'da verilmiştir.



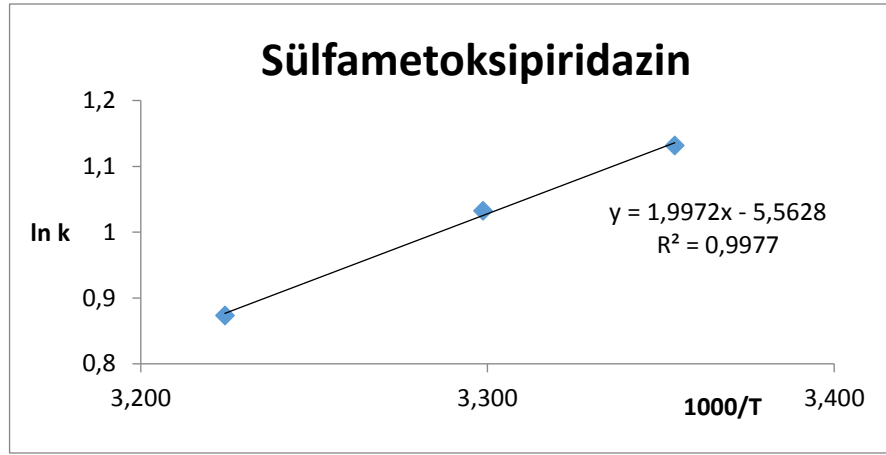
Şekil 4.3. Sülfametazin için asetonitril:su ikili karışımında (% 15; v/v) üç farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği



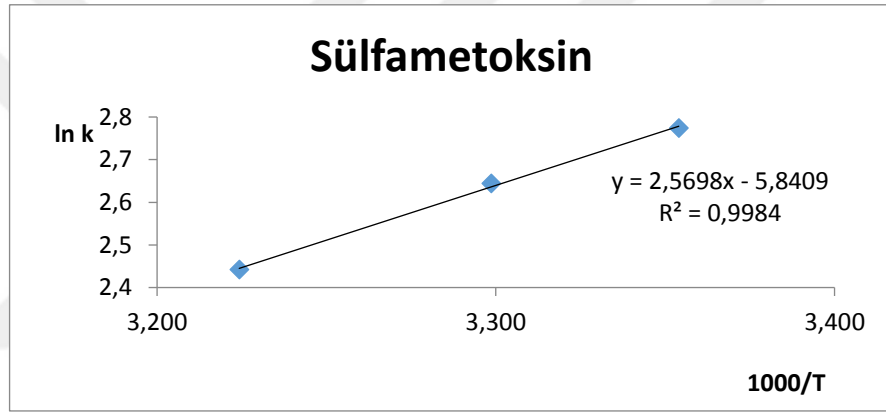
Şekil 4.4. Sülfametaksazol için asetonitril:su ikili karışımında (% 15; v/v) üç farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği



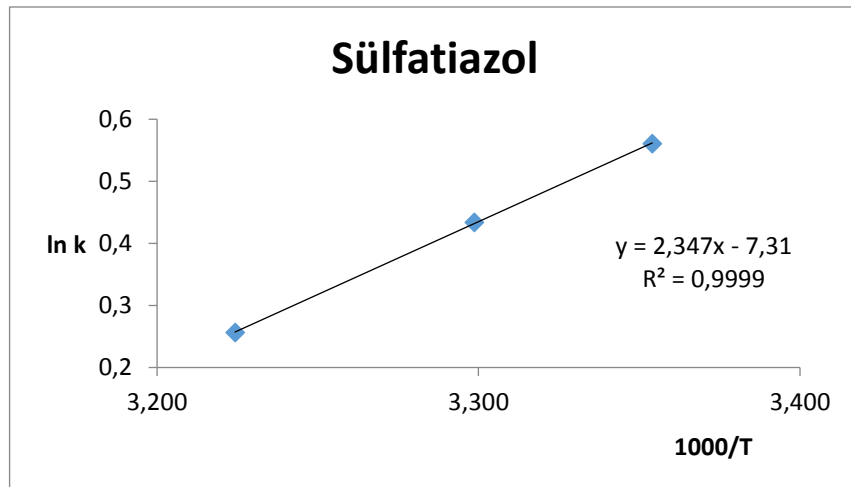
Şekil 4.5. Sülfadiazin için asetonitril:su ikili karışımında (% 15; v/v) üç farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği



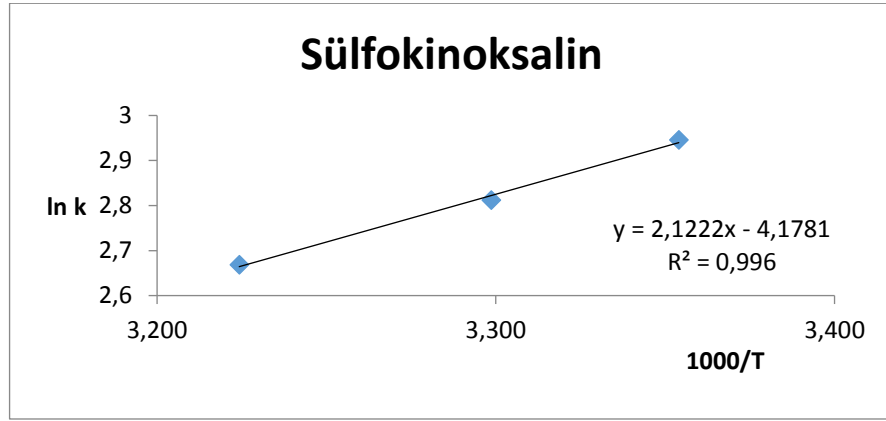
Şekil 4.6. Sülfametoksipiridazin için asetonitril:su ikili karışımında (% 15; v/v) üç farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği



Şekil 4.7. Sülfadimetoksin için asetonitril:su ikili karışımında (% 15; v/v) üç farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği



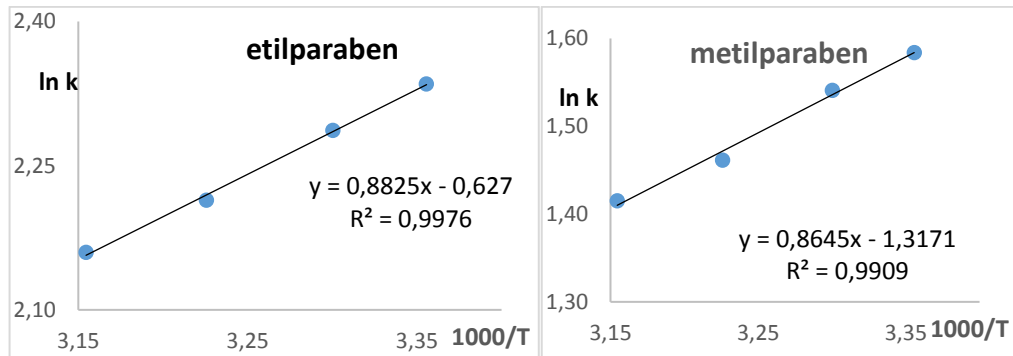
Şekil 4.8. Sülfatiazol için asetonitril:su ikili karışımında (% 15; v/v) üç farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği



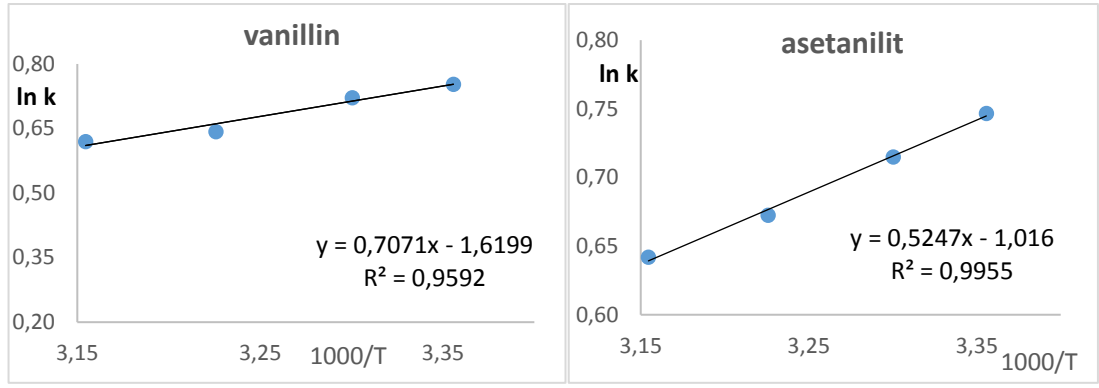
Şekil 4.9. Sülfakinoksalin için asetonitril:su ikili karışımında (% 15; v/v) üç farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği

4.2. Kinetex F5 Kolon ile Sıcaklık Etkisinin İncelenmesi

Bu tez çalışmasında kinolon bileşiğinin çalışılan kolonun üç farklı sıcaklığındaki alıkonma zamanlarının sıcaklıkla değişimi Van't Hoff bağıntısı ile incelenmiştir. Kapasite faktörü üzerine kolon sıcaklığının etkisi, 25 mM fosfat içeren % 17 ACN-su ikili karışımında pH 4,5'da çalışılmıştır. Akış hızı 0,5 mL/dakikadır. Kolon olarak Kinetex F5 Kolon kullanılmıştır. Van't Hoff eşitliğinin temel alındığı bu çalışmalarda seçilen standartlar, kinolonlar ile aynı koşulda enjekte edilmişlerdir. Metilparaben, etilparaben, asetanilit ve vanilin için ln k-1000/T grafikleri, Şekil 4.10 ve Şekil 4.11'de verilmiştir.

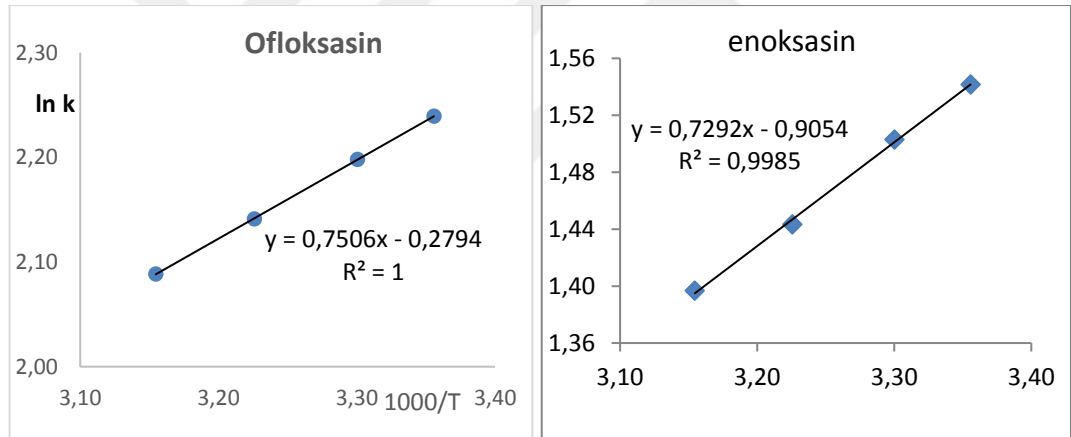


Şekil 4.10. Metilparaben ve etilparaben için asetonitril:su ikili karışımında (% 17; v/v) üç farklı sıcaklıkta ln k-1000/T grafiği

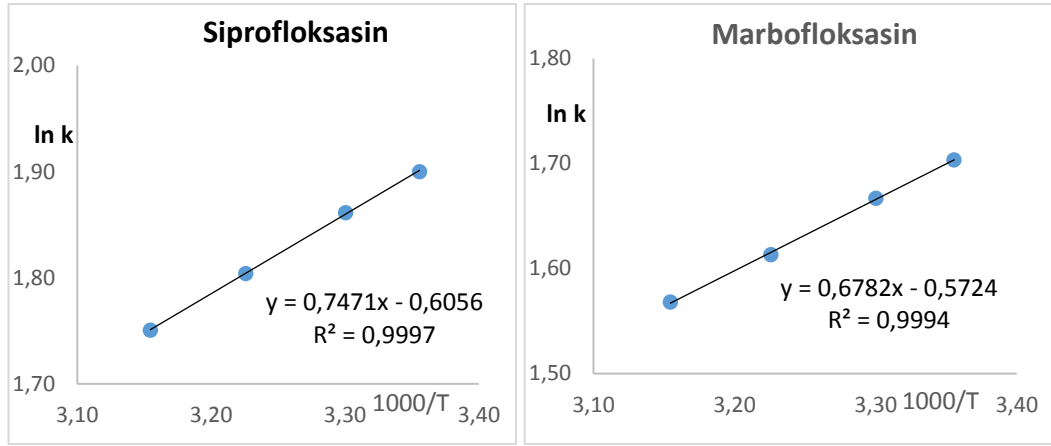


Şekil 4.11. Asetanilit ve vanilin için asetonitril:su ikili karışımında (% 17; v/v) üç farklı sıcaklıkta $\ln k$ -1000/T grafiği

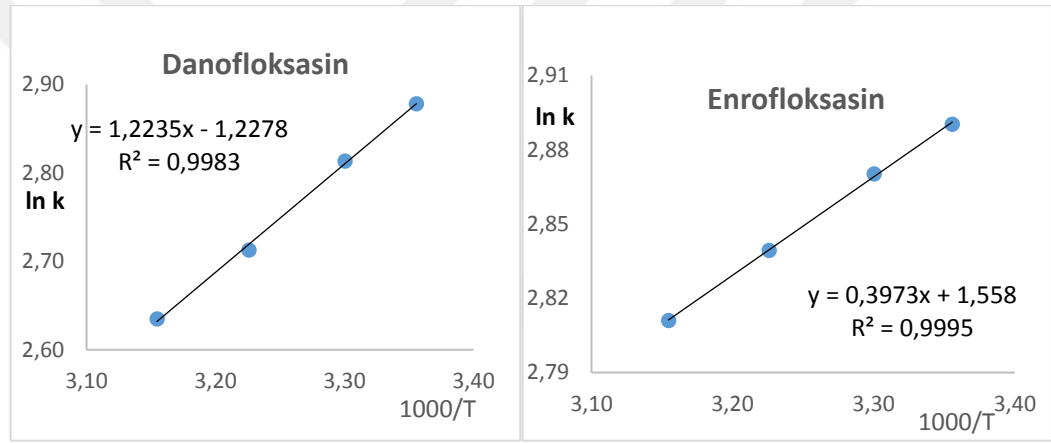
Standartlarda aynı koşulda kinolonlarda 4 farklı sıcaklıkta enjekte edilmiştir. Ofloksasin, enoksasin, marbofloksasin, siprofloksasin, enrofloksasin ve danofloksasin için $\ln k$ -1000/T grafikleri, Şekil 4.12- Şekil 4.14’de verilmiştir.



Şekil 4.12. Ofloksasin ve enoksasin için asetonitril:su ikili karışımında (% 17; v/v) dört farklı sıcaklıkta $\ln k$ -1000/T grafiği



Şekil 4.13. Marbofloksasin ve siprofloksasin için asetonitril:su ikili karışımında (% 17; v/v) dört farklı sıcaklıkta $\ln k$ -1000/T grafiği



Şekil 4.14. Enrofloksasin ve danofloksasin için asetonitril:su ikili karışımında (% 17; v/v) dört farklı sıcaklıkta $\ln k$ -1000/T grafiği

4.3. Bileşiklerin pK_a değerlerinin tayini

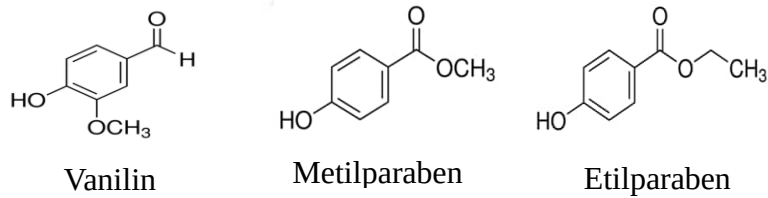
Günümüzde sudaki çözünürlüğü az olan kimyasalların asit-baz davranışları, su-organik çözücü ikili karışımlarında belirlenebilmekte; bu bilgiler ile iyonlaşan bileşiklerin ayırımı için analitik prosedürler optimize edilebilmektedir. Çözücü kompozisyonun bir fonksiyonu olarak pK_a değerlerinin bilinmesi, iyonlaşabilen maddelerin sıvı kromatografik yöntemle ayrılmasında oldukça yararlıdır; çünkü iyonlaşan bileşiklerin kromatografik alıkonmaları, bileşiğin pK_a 'sına ve mobil fazın pH'sına bağlıdır. İyonlaşan bileşiğin alıkonma zamanını etkileyen üç etken vardır. Bunlar, moleküler ve iyonik tür/türlerin alıkonma zamanı ve bileşiğin iyonlaşma sabitidir. Bu üç deneysel değer de organik modifiyerin derişimine bağlı değerlerdir.

Bu bağıntı, herhangi bir iyonlaşan bileşikte organik modifiyerin belli derişimi için fonksiyonel grup sabitleri ve su-organik çözücü ikili karışımının hidronyum derişimi biliniyorsa, bize teorik kapasite faktörlerini hesaplama imkanı sağlar. Asidik veya bazik bileşiklerin iyonlaşma/protonasyon sabitlerinin tayininde sıvı kromatografik yöntemle hesaplama yapabilen non-lineer regresyon programları da bu amaçla geliştirilmiştir. Çalışmacıya verilerin istatistiksel yorumlanması imkanı sağlar.

Çalışmada seçilen bileşiklerin pK_a değerleri su-asetonitril ikili karışımlarında tayin edilmiştir. Bu çalışmada pK_a değerleri incelenecek bileşikler, analitik saflıkta temin edilmiştir. Bu kromatografik çalışmada, organik modifiyer olarak asetonitril seçilmiştir. ACN-su ikili karışımında farklı pH larda bileşiklerin alıkonma davranışı incelenmiştir.

4.3.1. Standartların X TERRA kolonda pK_a tayini verileri

Bu tez çalışmasında metilparaben, etilparaben ve vanilin için % 17 ACN derişiminde pH etkisi incelenerek pK_a değerleri tayin edilmiştir (Şekil 4.15).

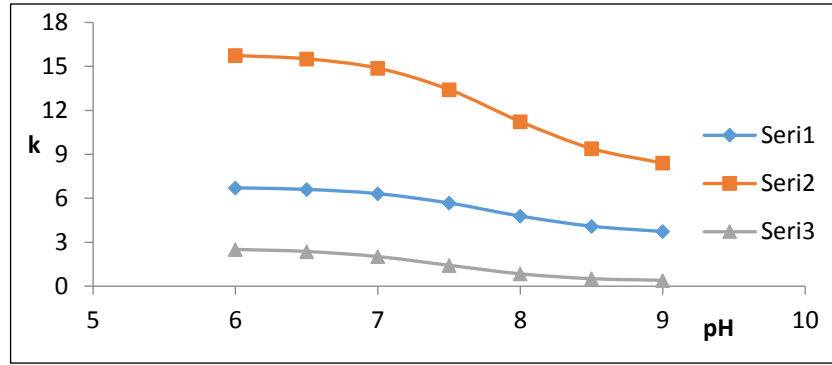


Şekil 4.15. Standartların kimyasal formülleri

Farklı pH değerlerinde elde edilen kapasite faktörleri, Çizelge 4.1’de ve pH- k ilişkisi Şekil 4.16’da verilmiştir.

Çizelge 4.1. X TERRA kolonda standartların kapasite faktörleri

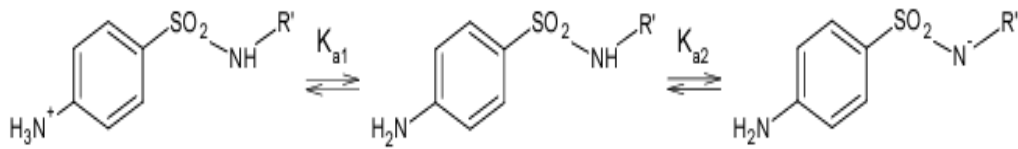
pH	Vanilin	Metilparaben	Etilparaben
6,00	2,511	6,711	15,743
6,50	2,368	6,606	15,517
7,00	2,020	6,314	14,880
7,50	1,424	5,676	13,423
8,00	0,841	4,785	11,236
8,50	0,512	4,094	9,400
9,00	0,400	3,730	8,400



Şekil 4.16. Vanillin, metilparaben ve etilparaben için X TERRA kolonda asetonitril:su ikili karışımında (% 17 ACN; v/v) pH –k grafiği

4.3.2. Sülfonamitlerin X Terra kolonda pK_a tayini verileri

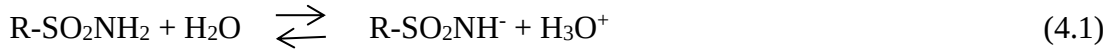
Yapısında sulfonil fonksiyonel grubunun amin fonksiyonel grubuna bağlı olduğu sentetik organik bileşikler, sülfonamitler olarak bilinirler. Sülfonamitler, amfoterik bileşiklerdir ve iyonlaşmaları iki aşamalı olarak verilir (Şekil 4.17). Sülfonamitler farmasötik açıdan önemli pH aralığı olan 4-9 aralığında 2 fonksiyonel grup içerirler. Yapıdaki aromatik amin ($H_3N^+-C_6H_4-SO_2-NH-R$) yapısında amin azot atomu proton tutabilirken amit azotu proton vermektedir. Amin grubundaki iyonlaşma pK_{a1} ile, sülfonik asit grubundaki ($H_2N-C_6H_4-SO_2-NH-R$) amit protonun iyonlaşması pK_{a2} ile ifade edilir.



Şekil 4.17. Sülfonamitler için iyonlaşma davranışı (Babić vd. 2007)

Sülfonamit yapısında amin grubu primer, sekonder veya tersiyer olabilir. Sülfonamit grubu bileşiklerin pK_{a1} değerleri 2-3 aralığında; pK_{a2} değerleri ise 5-9 aralığında veriler olduğu bilinmektedir. Sülfonamitler, bulundukları ortamda pH 3'ten küçük olduğunda, katyonik halde; bileşik pH 3-5 aralığında nötral formda, ve pH 5'ten büyük olduğunda ise anyonik durumdadırlar.

Bu tezde sülfadimetoksin, sülfakinoksalin, sülfametaksazol, sülfametazin, sülfametoksipiridazin, sülfadiazin ve sülfatiazolün sülfonamitlerin yapısında primer amin grubu bulunmaktadır. Sübstitüent değişikliği amit grubuna bağlı kısımdadır. Bileşiklerin bu amin grubu ile ilişkili pK_{a1} değerleri, kromatografik verilerde yeterli değişim görülmediği için tayin edilememiştir. Çalışmada seçilen sülfonamitlerin pK_{a2} değerlerinin tayinde X TERRA kolonda çalışılmıştır. İlgili iyonlaşma dengesi aşağıda verilmiştir (Eşitlik 4.1).

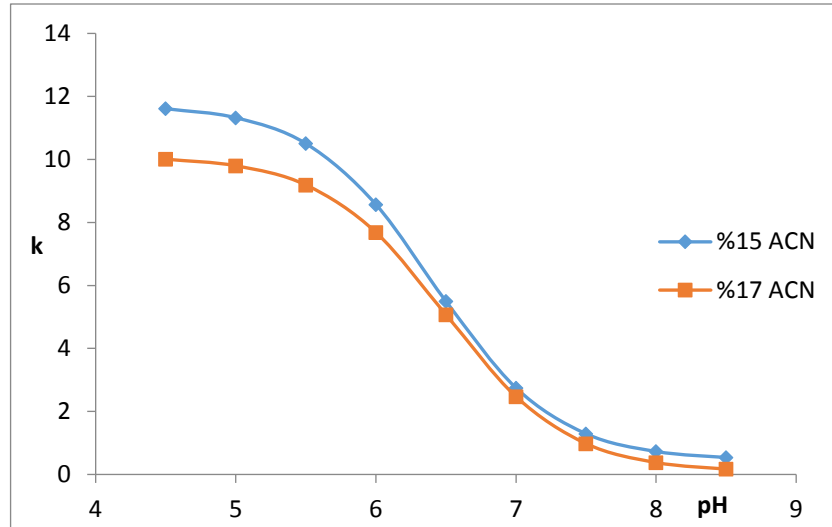


Hacimce % 15 ve % 17 ACN içeren asetonitril su ikili karışımları ile pK_{a2} değerlerinin tayinde elde edilen kromatografik veriler, Çizelge 4.2 - Çizelge 4.8’de ve elde edilen sigmoidal eğriler, Şekil 4.18-Şekil 4.31’de verilmiştir.

Sülfodimetoksin yapısında bulunan iki metoksi grubu nedeniyle bu ilaç, bileşikler içinde kolonda en çok tutunan bileşiklerden biridir.

Çizelge 4.2. Sülfodimetoksin için % 15 ve % 17 ACN ortamlarına ait kromatografik veriler

pH	k	k
4,50	11,611	10,008
5,00	11,324	9,798
5,50	10,505	9,190
6,00	8,572	7,686
6,50	5,500	5,075
7,00	2,749	2,472
7,50	1,293	0,980
8,00	0,729	0,378
8,50	0,538	0,171

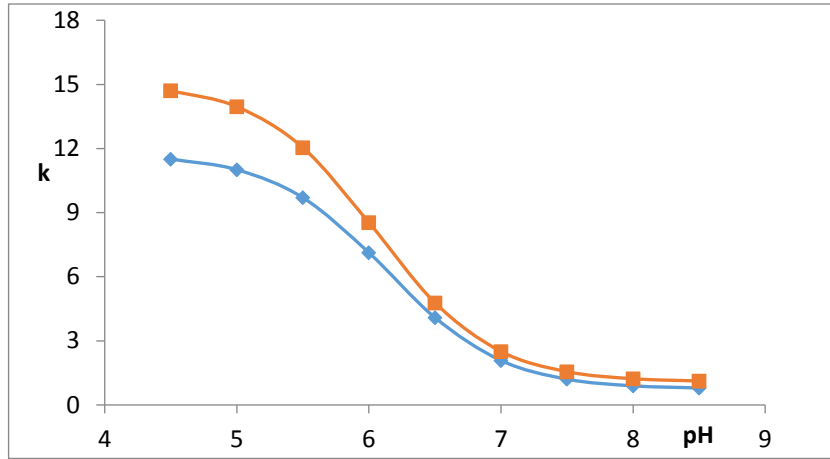


Şekil 4.18. Sülfodimetoksin için %15 ve %17 ACN ortamlarına ait pH-k grafiği

Sülfakinoksalin kimyasal yapısında iki adet altı atomlu heterokinoksalin grubu vardır. Bu bileşiğin pK_{a2} değerinin tayini için kromatografik veriler, Çizelge 4.3’de; pH–k grafiği, Şekil 4.19’da verilmiştir.

Çizelge 4.3. Sülfakinoksalin için % 15 ve % 17 ACN ortamlarına ait kromatografik veriler

pH	k	k
4,50	14,709	11,506
5,00	13,957	11,009
5,50	12,043	9,700
6,00	8,537	7,127
6,50	4,784	4,089
7,00	2,504	2,080
7,50	1,558	1,206
8,00	1,228	0, 896
8,50	1,120	0,794

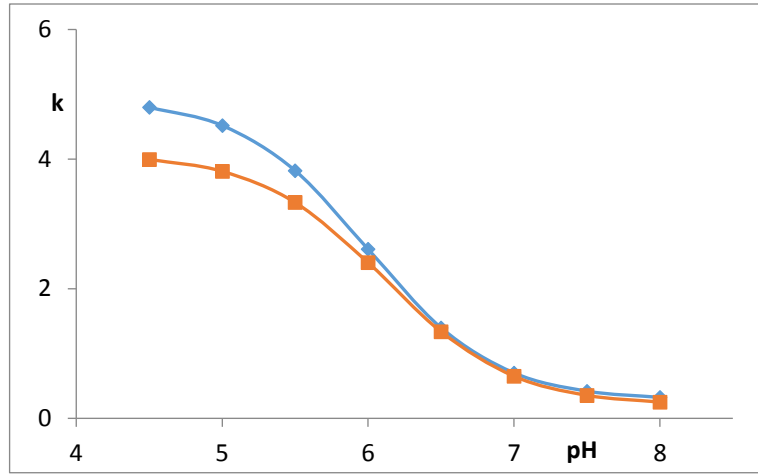


Şekil 4.19. Sülfakinoksalin için % 15 ve % 17 ACN ortamlarına ait pH-k grafiği

Sülfametaksazol yapısında metil grubu bulunan oksazol grubu vardır. Bu bileşiğin pK_{a2} değerinin tayini için elde edilen kromatografik veriler, Çizelge 4.4’de; pH–k grafiği, Şekil 4.20’de verilmiştir.

Çizelge 4.4. Sülfametaksazol için % 15 ve %17 ACN ortamlarına ait kromatografik veriler

pH	k	k
4,50	4,800	3,996
5,00	4,519	3,812
5,50	3,822	3,331
6,00	2,611	2,403
6,50	1,399	1,338
7,00	0,702	0,651
7,50	0,421	0,356
8,00	0,324	0,251

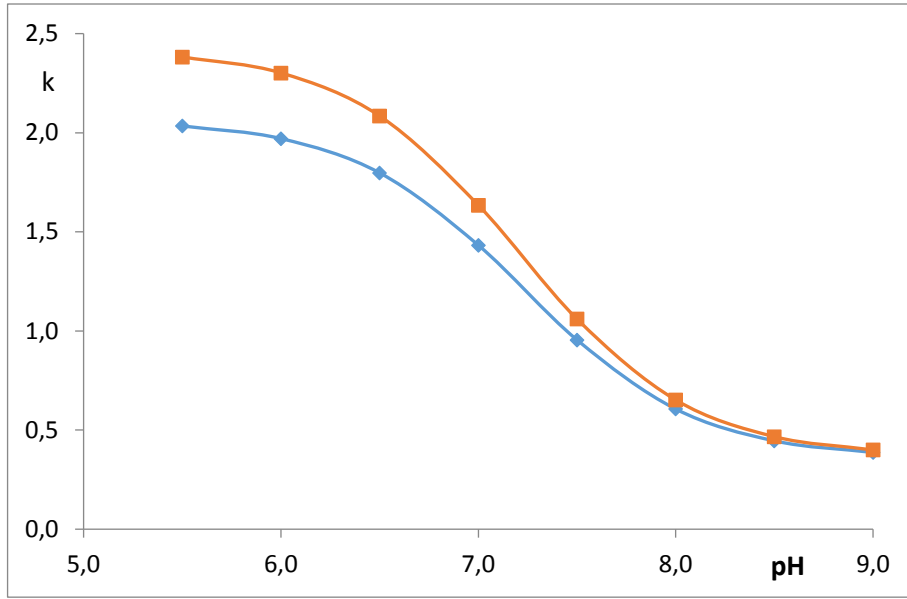


Şekil 4.20. Sülfametaksazol için % 15 ve % 17 ACN ortamlarına ait pH-k grafiği

Sülfametoksipiridazin 6 nolu pozisyonunda metoksi grubu bulunan piridazin yapısına sahiptir. Bu bileşik için kromatografik veriler, Çizelge 4.5’de; pH–k grafiği, Şekil 4.21’de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Sülfametoksipiridazin için % 15 ve % 17 ACN ortamlarına ait kromatografik veriler

pH	k	k
5,5	2,382	2,034
6,0	2,302	1,971
6,5	2,085	1,797
7,0	1,635	1,433
7,5	1,060	0,955
8,0	0,652	0,606
8,5	0,467	0,446

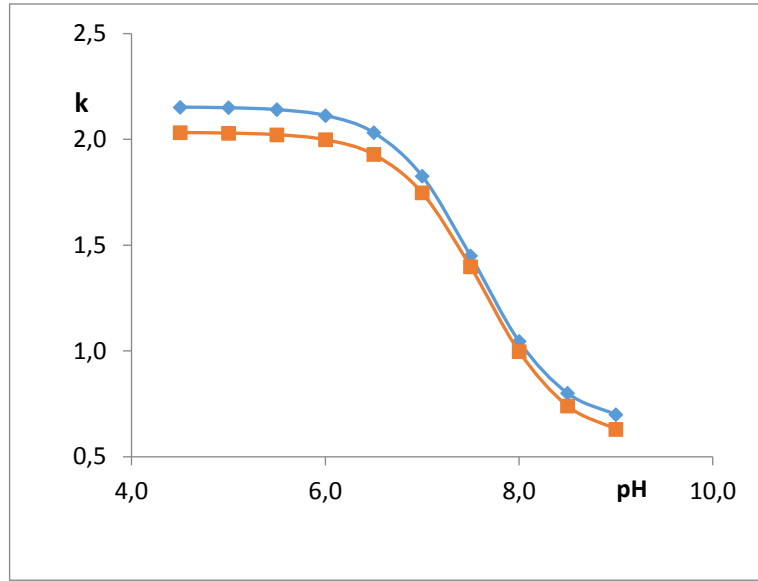


Şekil 4.21. Sülfametoksipiridazin için % 15 ve % 17 ACN ortamlarına ait pH-k grafiği

Sülfametazin kemoterapötik ilaç sınıfındadır. Bu bileşiğin pK_{a2} değerinin tayini için isokratik çalışma koşulunda elde edilen kromatografik veriler, Çizelge 4.6'da; pH-k grafiği, Şekil 4.22'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Sülfametazin için % 15 ve % 17 ACN ortamlarına ait kromatografik veriler

pH	k	k
4,50	2,153	2,032
5,00	2,150	2,030
5,50	2,141	2,022
6,00	2,113	1,999
6,50	2,033	1,929
7,00	1,827	1,748
7,50	1,450	1,398
8,00	1,046	0,998
8,50	0,801	0,741
9,00	0,699	0,631

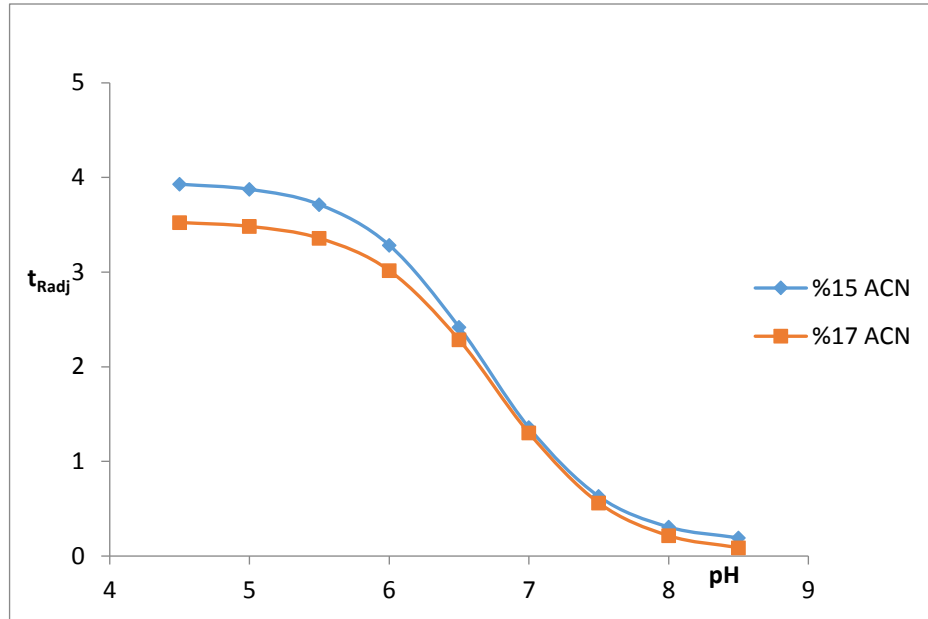


Şekil 4.22. Sülfametazin için % 15 ve % 17 ACN ortamlarına ait pH-k grafiği

Sülfadiazin, sulfamerazin ve sulfametazin, üçlü sulfonamid ilaç olarak bilinen üç sulfonamid ilacından biridir. Bu bileşiğin pK_{a2} değerinin tayini için izokratik çalışma koşulunda elde edilen kromatografik veriler, Çizelge 4.7’de, pH – $t_{r,adj}$ grafiği, Şekil 4.23’de verilmiştir. Bu bileşik çalışılan bileşikler içinde kolonda en az tutunan iki bileşikten birisidir. Alıkonma zamanları ölü zaman için düzeltilmiş ve pH- $t_{r,adj}$ ilişkisi incelenmiştir.

Çizelge 4.7. Sülfadiazin için % 15 ve %17 ACN ortamlarına ait kromatografik veriler

pH	t_{Radj}	t_{Radj}
4,5	3,930	3,525
5,0	3,876	3,483
5,5	3,715	3,359
6,0	3,286	3,018
6,5	2,420	2,286
7,0	1,358	1,301
7,5	0,631	0,562
8,0	0,308	0,215
8,5	0,192	0,088

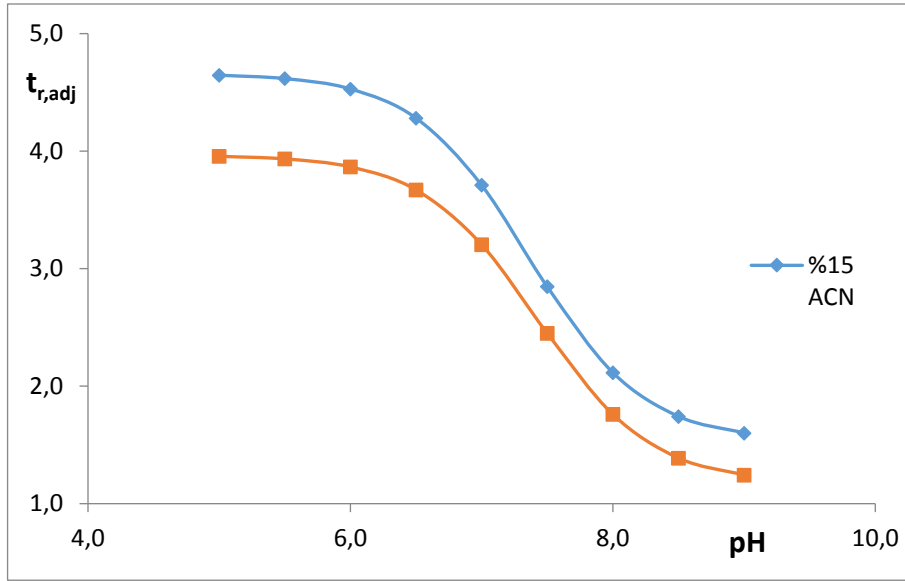


Şekil 4.23. Sülfadiazin için % 15 ve % 17 ACN ortamlarına ait pH-k grafiği

Sülfatiazol yapısında tiazol ve sülfonilamit grubu bulunduran polar bir sülfonamit grubu ilaçtır. Bu bileşiğin pK_{a2} değerinin tayini için izokratik çalışma koşulunda elde edilen kromatografik veriler, Çizelge 4.8’de ;pH – t_{Radj} grafiği, Şekil 4.24’de verilmiştir. Bu bileşik çalışılan bileşikler içinde kolonda en az tutunan iki bileşikten birisidir. Alıkonma zamanları ölü zaman için düzeltilmiş ve pH- t_{Radj} ilişkisi incelenmiştir.

Çizelge 4.8. Sülfatiazol için % 15 ve % 17 ACN ortamlarına ait kromatografik veriler

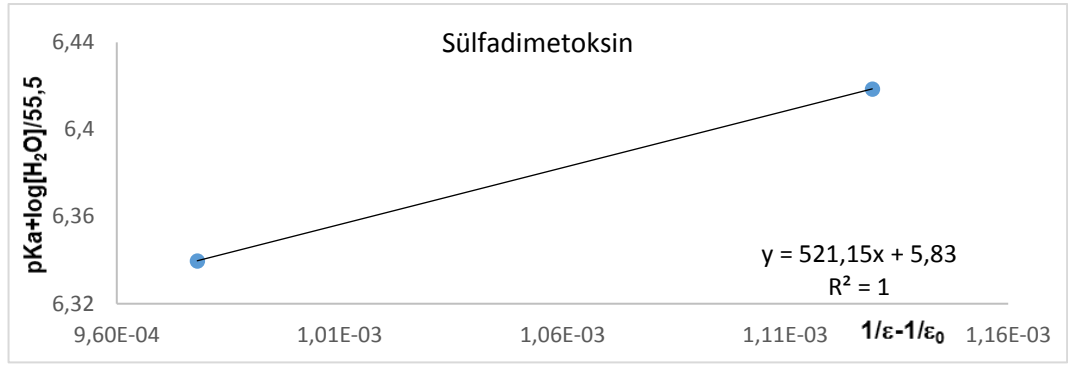
pH	t_{Radj}	t_{Radj}
5,0	4,646	3,956
5,5	4,617	3,934
6,0	4,529	3,865
6,5	4,281	3,670
7,0	3,710	3,204
7,5	2,847	2,450
8,0	2,115	1,760
8,5	1,743	1,388
9,0	1,601	1,243



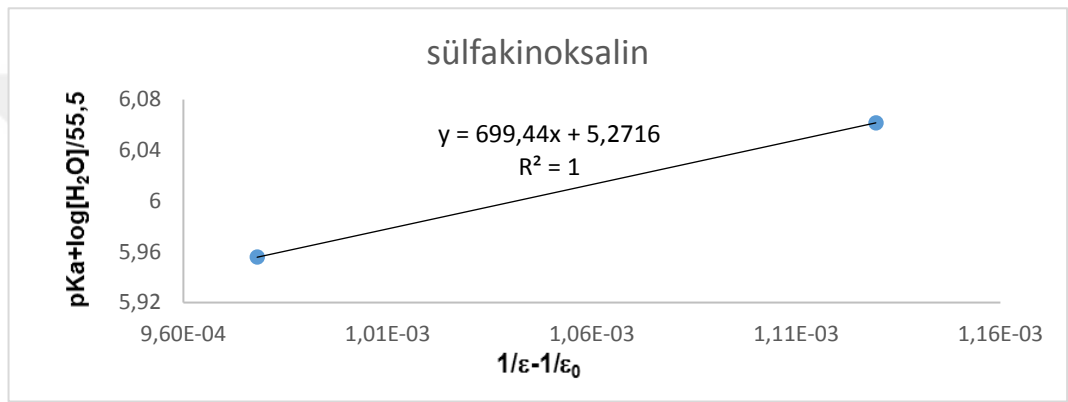
Şekil 4.24. Sülfatiazol için %15 ve %17 ACN ortamlarına ait pH-k grafiği

Bilindiği gibi bu tezde sudaki pK_{a2} değerlerine geçiş amaçlanmıştır. Bilindiği gibi suda çözünürlüğü yeterli olmayan bileşiklerin pK_a değerleri, su organik çözücü karışımlarında tayin edilmekte ve bu verilerin su ortamına özgü pK_a değerlerine geçişte kullanılması tercih edilmektedir. Bu amaçla önerilen grafik, Yasuda grafiğidir. Bu yaklaşımda x ekseninde çalışılan ortama ait dielektrik sabitlerinin 1/değer şeklinde ifade edilmesi yaygın kullanımdır. Ancak yapılan çalışmalar incelendiğinde x ekseninde su ve çalışılan ortama ait dielektrik sabitlerinin 1/değer şeklinde ifade edilmesi ve bu değerler arasında farkın alınması durumunda daha uygun sonuç verdiği ifade edilmektedir. Yasuda ekstrapolasyonu bu şekilde yapıldığında grafiğin kesim noktası bize bileşiklerin sudaki pK_a değerini vermektedir.

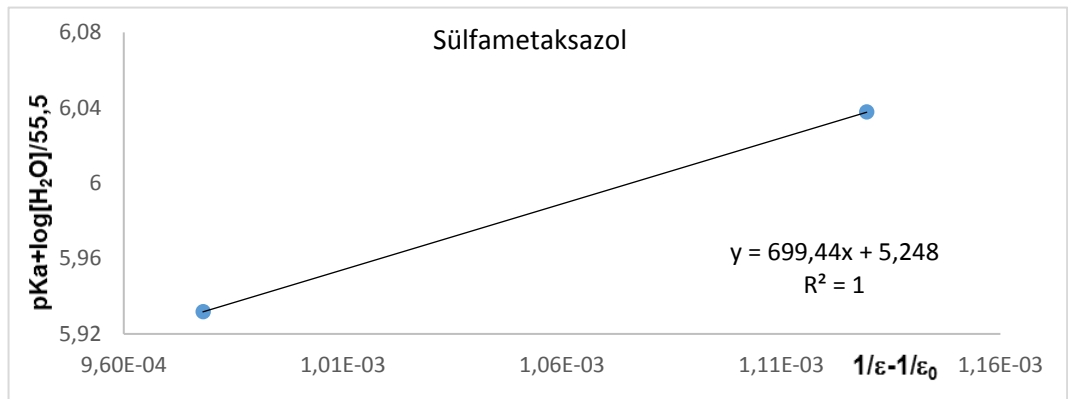
Asetonitrilin iki derişiminde elde edilen değerlere Yasuda ekstrapolasyonu uygulanarak elde edilen veriler, bu bileşiklerin sudaki pK_a değerleridir. Grafik üzerinde verilen lineer fonksiyonun kesim noktası bu değerleri vermektedir. Ekstrapolasyon grafikleri, Şekil 4.25-4.31’de verilmiştir.



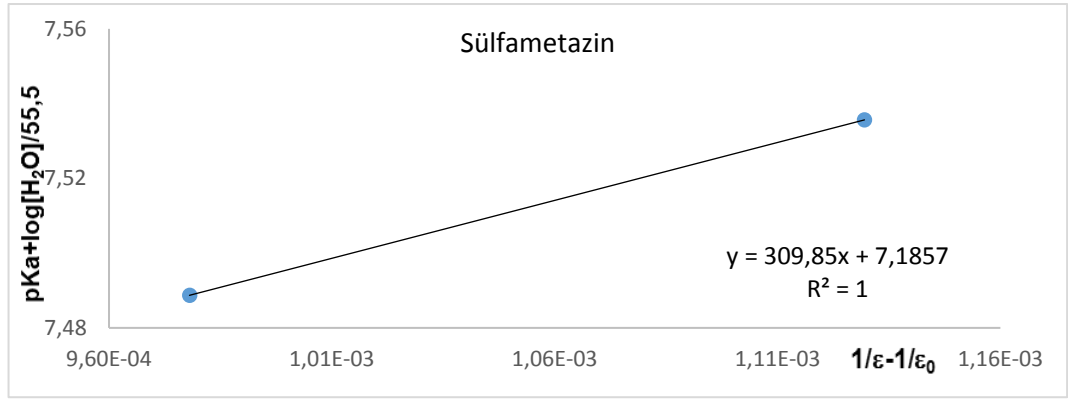
Şekil 4.25. Sülfadimetoksin için Yasuda ekstrapolasyonu



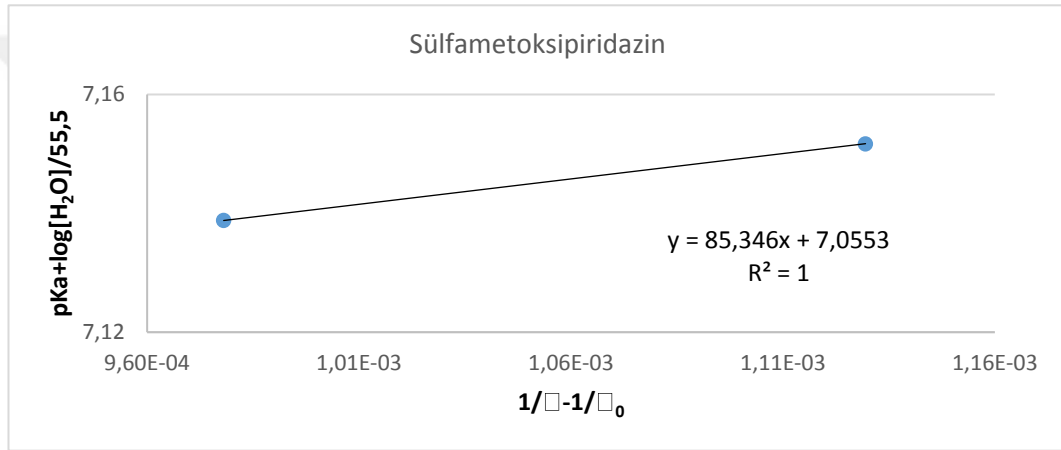
Şekil 4.26. Sülfakinoksalin için Yasuda ekstrapolasyonu



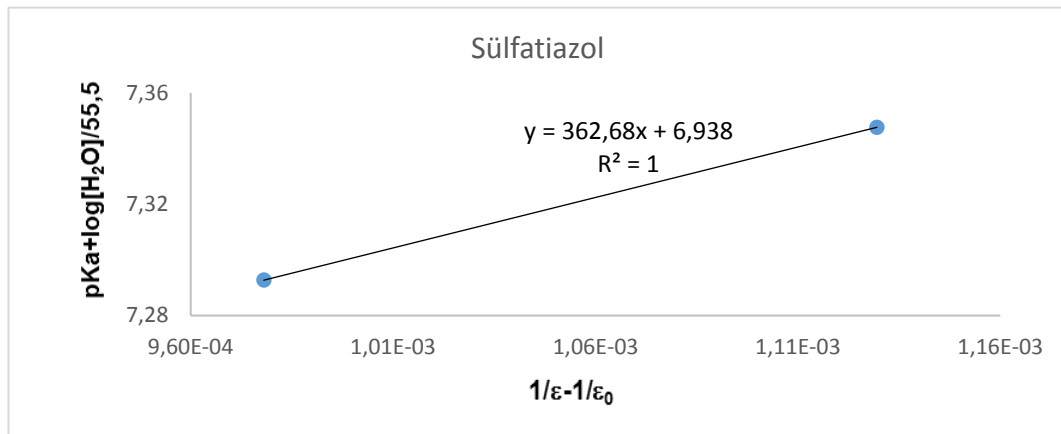
Şekil 4.27. Sülfametaksazol için Yasuda ekstrapolasyonu



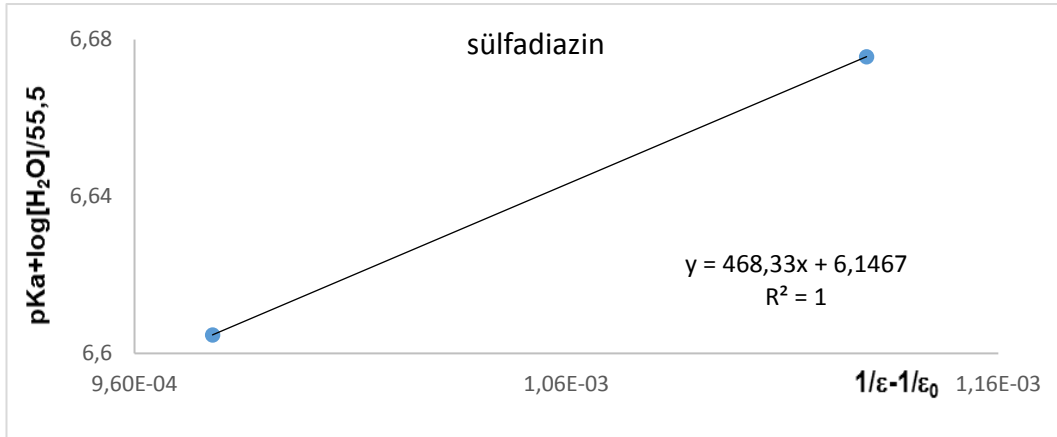
Şekil 4.28. Sülfametazin için Yasuda ekstrapolasyonu



Şekil 4.29. Sülfametoksipiridazin için Yasuda ekstrapolasyonu



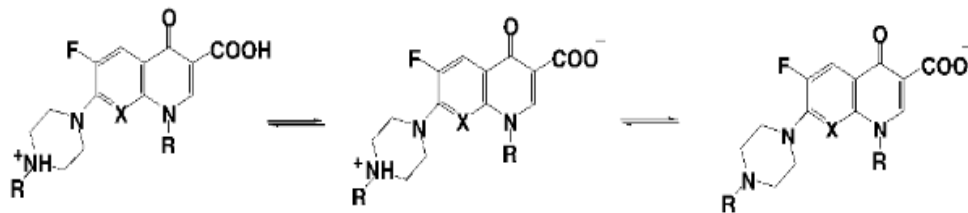
Şekil 4.30. Sülfatiazol için Yasuda ekstrapolasyonu



Şekil 4.31. Sülfadiazin için Yasuda ekstrapolasyonu

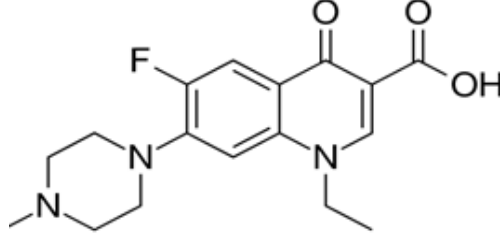
4.3.3. Kinolonların pKa tayini verileri

Kinolonlar için pKa değerleri farklı çalışmalarda yayınlanmıştır. İkiz iyon yapıları olan bu bileşiklerde asidik grup olarak karboksilik asit grubu ve bazik grup olarak genellikle piperazin halkası bulunmaktadır. pK_{a1} ve pK_{a2} değerleri için 5-6 aralığında değerler verilmektedir. Bu değerlerin keton grubu nedeniyle karboksilik asit grubundaki zayıflamanın sonucu olduğu düşünülmektedir. Çalışmalarda kinolonların pK_{a1} değerlerinin yakın olduğu; ancak pK_{a2} değerlerinin farklı olduğu görülmektedir. Kinolonlarda pH çalışmaları (pH 3,2 - 4,5), karboksil grubu için yapıldığında bu pH değerlerinde karboksilik asit grubunun iyonlaşmamış yapıda olduğu; bu pH aralığında piperazin grubunun pozitif yüklü olduğu düşünülmektedir. Kinolonlarda ikinci fonksiyonel grubun piperazin halkası olduğu görülmektedir. Yapılar arasında temel farklılık sadece amin grubunun sekonder veya tersiyer oluşu ile ilgilidir. pK_{a2} değerleri, amin grubunun sekonder veya tersiyer oluşuna göre değişmektedir (Şekil 4.32).



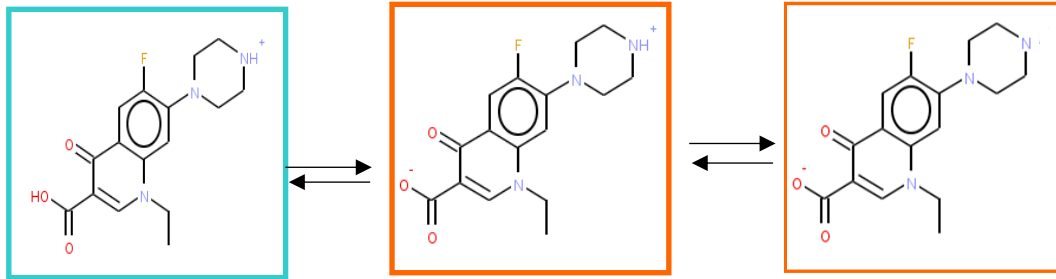
Şekil 4.32. Kinolonlar için iyonlaşma davranışı (Barbosa vd., 1999)

Bu çalışmada pKa değerleri incelenen bileşiklerden biri pefloksasindir (Şekil 4.33). 1979 yılında sentetik olarak üretilmiştir. 3. jenerasyondadır. İlk fonksiyonel grup karboksil grubu; ikinci fonksiyonel grup piperazindir. Tersiyer yapı söz konusudur.



Şekil 4.33. Pefloksasinin kimyasal yapısı

Bu kinolonun iyonlaşma şeması ilk iyonlaşan fonksiyonel grubun karboksilik asit grubu olduğunu göstermektedir. İkinci iyonlaşan grup amin grubudur (Şekil 4.34). Çalışmada kolon olarak Nucleosil 100 C18 (150x4.6 mm I.D., 5 µm) kolon kullanılmıştır. pH aralığı 4-8 olarak belirlenmiştir. Bu değerler, kolonun pH çalışma aralığına uygun seçilmiştir. Bu aralık pefloksasinin pKa₁ değerinin tayini için uygundur.



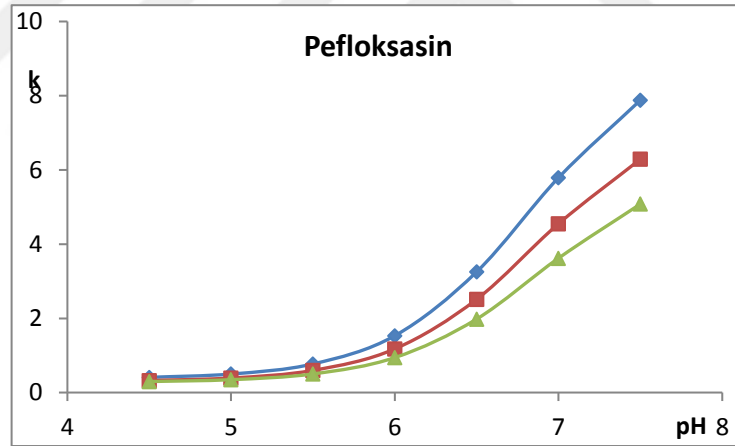
Şekil 4.34. Pefloksasin için iyonlaşma şeması

Bu bileşikle ilgili kromatografik çalışmada, organik modifiyer olarak asetonitril seçilmiştir. %35, 40 ve 45, v/v, asetonitril (ACN)-su ikili karışımında farklı pH'larda pefloksasinin alıkonma davranışı incelenmiştir. Mobil faza 25 mM derişimde olacak şekilde H₃PO₄ eklenmiştir. Mobil faz pH'sı, çalışmada etkisi incelenmek istenen pH değerlerine 1 M NaOH'den ilave edilerek ayarlanmıştır. Pefloksasin farklı pH'larda (5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 7,0 ve 7,5) ölçülen kapasite faktörleri belirlenmiştir (Çizelge 4.9).

Çizelge 4.9 . Pefloksasin için % 35, % 40 ve % 45 ACN derişiminde k verileri

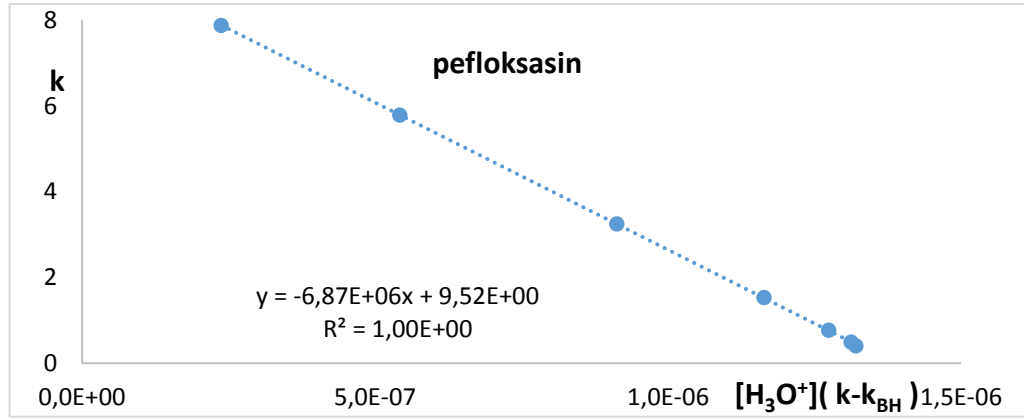
pH	% 35 ACN	% 40 ACN	% 45 ACN
	k	k	k
5,0	0,499	0,368	0,347
5,5	0,771	0,574	0,502
6,0	1,532	1,156	0,943
6,5	3,254	2,498	1,982
7,0	5,791	4,542	3,622
7,5	7,879	6,287	5,081

Her 3 ortama ait pH- k grafiği karboksilik asitin alıkonma davranışına aittir (Şekil 4.35). Veriler, NLREG programında değerdendirilerek bu bileşğin pK_{a1} değerdeleri hesaplanmıştır. Ayrıca mobil faz pH değerdeleri, deneysel alıkonma değerdeleri ve pK_a değerdeleri kullanılarak Horvath-Melander yaklaşımıyla alıkonma değerdeleri hesaplanmıştır.



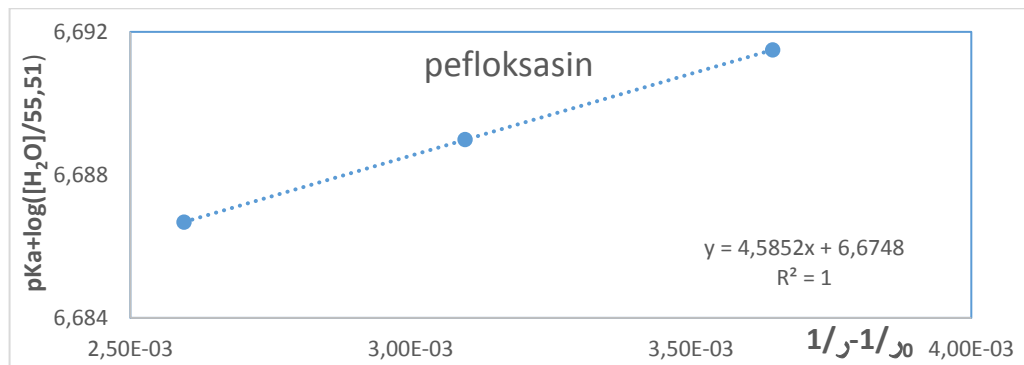
Şekil 4.35. Pefloksasin için 3 farklı ACN derişiminde pH-k ilişkisi (%35; %40; %45)

Bu tür grafikler doğrusal şekilde de ifade edilmektedir (Şekil 4.36)



Şekil 4.36. Pefloksasin için %35ACN derişiminde pH-k doğrusal ilişkisi

Bilindiği gibi suda çözünürlüğü yeterli olmayan bileşiklerin pK_a değerleri, su organik çözücü karışımlarında tayin edilmekte ve bu verilerin su ortamına özgü pK_a değerlerine geçişte kullanılması tercih edilmektedir. Bu amaçla önerilen grafik, Yasuda grafiğidir. Bu yaklaşımda x ekseninde çalışılan ortama ait dielektrik sabitlerinin 1/değer şeklinde ifade edilmesi yaygın kullanımdır. Ancak yapılan çalışmalar incelendiğinde x ekseninde su ve çalışılan ortama ait dielektrik sabitlerinin 1/değer şeklinde ifade edilmesi ve bu değerler arasında farkın alınması durumunda daha uygun sonuç verdiği ifade edilmektedir. Yasuda ekstrapolasyonu bu şekilde yapıldığında grafiğin kesim noktası bize bileşiklerin sudaki pK_a değerini vermektedir. Farklı asetonitril derişimlerinde pefloksasin için belirlenen değerler, Yasuda eşitliğinde kullanılarak pefloksasin için sudaki değere geçilmiştir (Şekil 4.37). Su ortamı için hesaplanan değer 6,675'dir.



Şekil 4.37. Pefloksasin için Yasuda grafiği

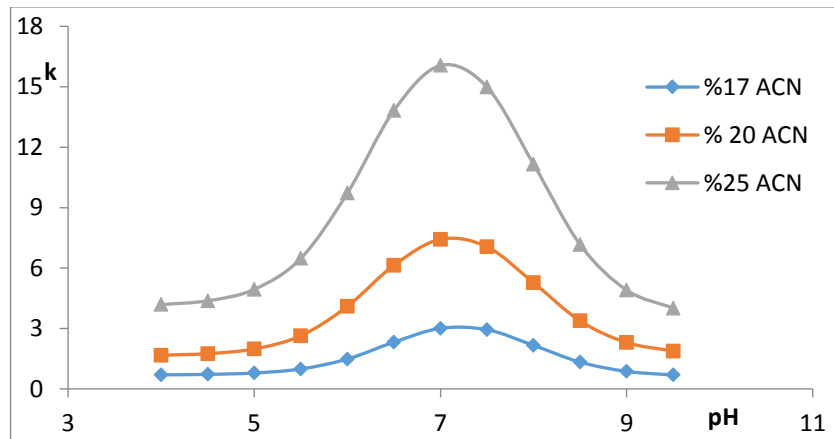
Enrofloksasin için % 17, 20 ve 25, v/v, asetonitril (ACN)-su ikili karışımında farklı pH'larda, Gemini NX kolonda enrofloksasinin alıkonma davranışı incelenmiştir.

Mobil faza 25 mM derişimde olacak şekilde H₃PO₄ eklenmiştir. Mobil faz pH'sı, çalışmada etkisi incelenmek istenen pH değerlerine 1 M NaOH'den ilave edilerek ayarlanmıştır. Enrofloksasinin llen kapasite faktörleri belirlenmiştir. (izelge 4.10).

Çizelge 4.10. Enrofloksasin için kapasite faktörü değerleri

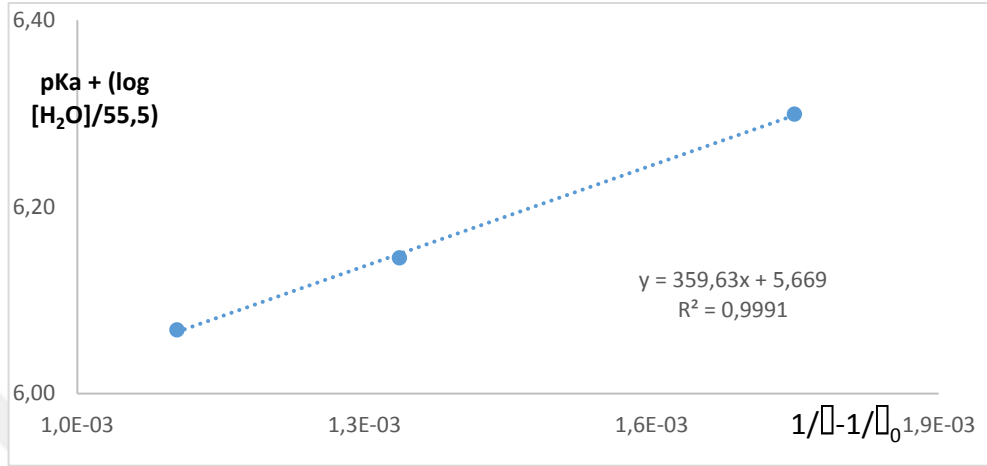
pH	% 25	% 20	% 17
4,0	0,700	1,674	4,187
4,5	0,722	1,751	4,375
5,0	0,791	1,986	4,941
5,5	0,990	2,639	6,479
6,0	1,483	4,097	9,717
6,5	2,319	6,136	13,818
7,0	3,008	7,426	16,058
7,5	2,940	7,055	14,983
8,0	2,163	5,273	11,161
8,5	1,331	3,377	7,166
9,0	0,871	2,305	4,909
9,5	0,690	1,879	4,010

Bileşiğin pH ve kapasite faktörü değerleri kullanılarak çizilen sigmoidal grafikleri şekil 4.38'de verilmiştir.

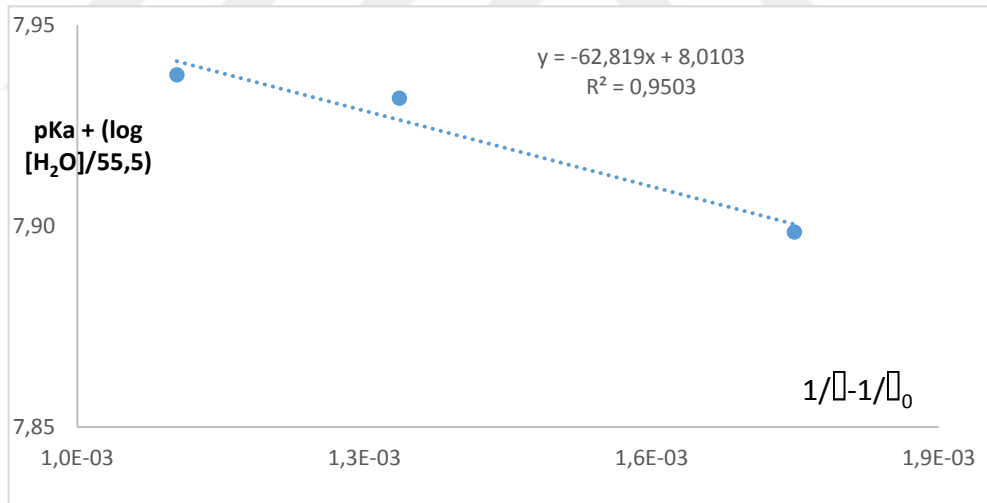


şekil 4.38. Enrofloksasin için pH-k grafiği

Farklı asetonitril derişimlerinde enrofloksasin için belirlenen değerler, Yasuda eşitliğinde kullanılarak sudaki değere geçilmiştir (Şekil 4.39-4.40). Enrofloksasin için su ortamındaki pK_{a1} değeri 5,669; pK_{a2} değeri 8,01 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.39. Enrofloksasin için Yasuda grafikleri



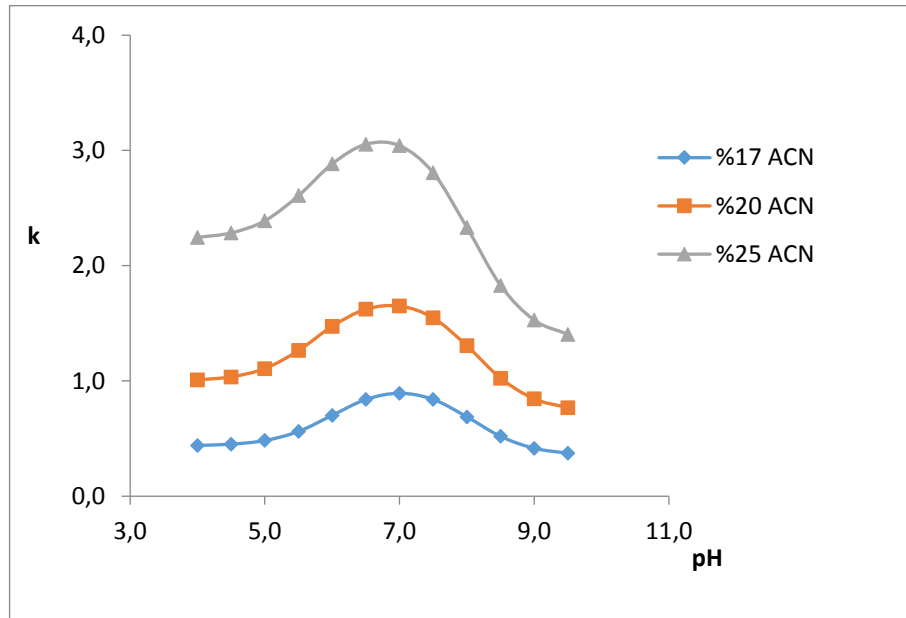
Şekil 4.40. Enrofloksasin için Yasuda grafikleri

Ofloksasin için % 17, 20 ve 25, v/v, asetonitril (ACN)-su ikili karışımında farklı pH'lerde, Gemini NX kolonda ofloksasinin alıkonma davranışı incelenmiştir. Mobil faza 25 mM derişimde olacak şekilde H_3PO_4 eklenmiştir. Mobil faz pH'sı, çalışmada etkisi incelenmek istenen pH değerlerine 1 M NaOH'den ilave edilerek ayarlanmıştır. Ofloksasinin ölçülen kapasite faktörleri belirlenmiştir. (Çizelge 4.11).

Çizelge 4.11. Ofloksasin için kapasite faktörü değerleri

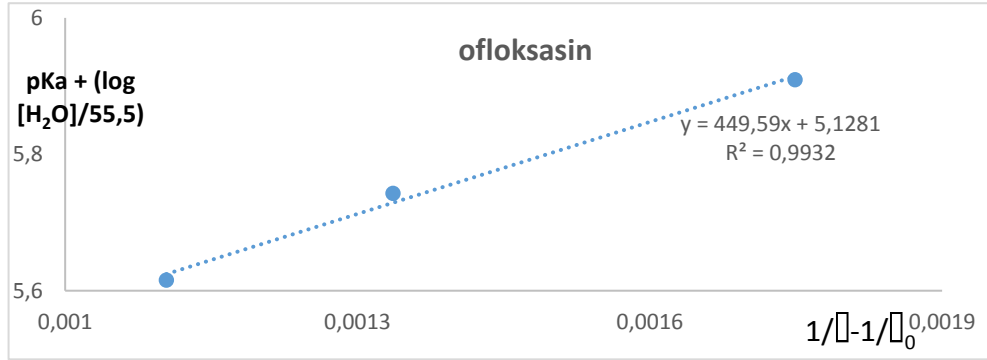
pH	% 25	% 20	% 17
4,0	0,441	1,010	2,246
4,5	0,452	1,036	2,285
5,0	0,483	1,108	2,390
5,5	0,562	1,264	2,609
6,0	0,702	1,475	2,884
6,5	0,840	1,623	3,054
7,0	0,893	1,650	3,042
7,5	0,840	1,547	2,807
8,0	0,689	1,306	2,333
8,5	0,519	1,025	1,829
9,0	0,416	0,845	1,528
9,5	0,373	0,768	1,405

Bileşiğin pH ve kapasite faktörü değerleri kullanılarak çizilen sigmoidal grafikleri, Şekil 4.41’ de verilmiştir.

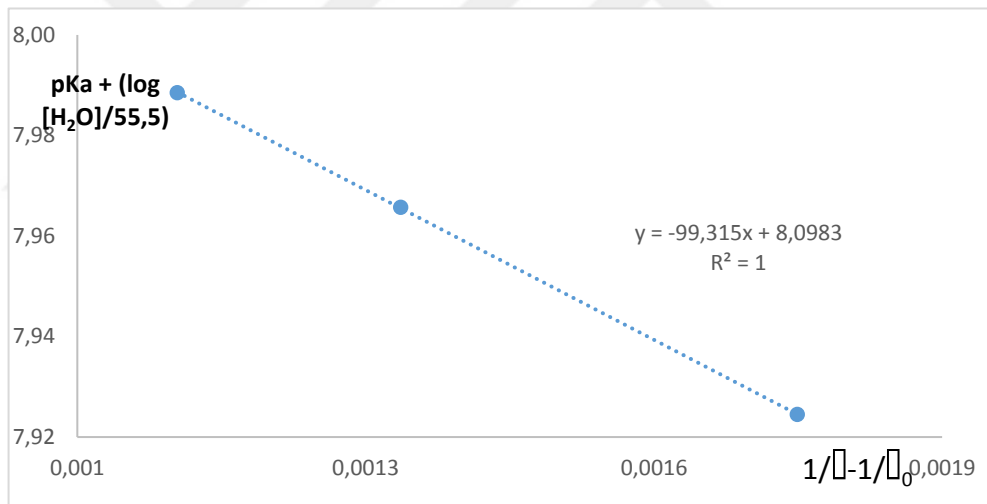


Şekil 4.41. Ofloksasin için pH-k grafiği

Farklı asetonitril derişimlerinde ofloksasin için belirlenen değerler, Yasuda eşitliğinde kullanılarak sudaki değere geçilmiştir (Şekil 4.42-4.43). Ofloksasin için su ortamındaki pK_{a1} değeri 5,090; pK_{a2} değeri 7,935 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.42. Ofloksasin için Yasuda grafikleri



Şekil 4.43. Ofloksasin için Yasuda grafikleri

5. SONUÇ

Bu tez çalışmasında X TERRA kolonda 37 °C’de analizlenen standartların farklı pH değerlerinde elde edilen kapasite faktörü değerleri kullanılarak bileşiklerin pK_a değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. Standartların pK_a değerleri

Bileşikler	pK_a	k_{HA}	k_{A-}
Vanilin	7,474 (0,001)	2,586 (0,001)	0,326 (0,001)
Metilparaben	7,796 (0,001)	6,759 (0,001)	3,551 (0,001)
Etilparaben	7,857 (0,001)	15,745 (0,001)	7,919 (0,001)

Bu tezde ters faz sıvı kromatografik yöntem tercih edilmiş ve sülfonamitlerin pK_{a2} değerleri, ACN-su ortamı (%15 ve 17 ,v/v) için X TERRA kolonda 37°C' de elde edilmiş olan pH-alıkonma verileri kullanılarak NLREG programı ile hesaplanmıştır. Ters faz sıvı kromatografik yöntem, amfoterik türlerle çalışmada makroskopik pK_a değerlerinin belirlenmesi için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Bu teknik pI değerlerini belirlememizi sağlayan tek tekniktir. Suda çözünürlüğü az olan bileşiklerin fonksiyonel grup sabitlerinin tayininde su ile her oranda karışan organik çözücülerin karışımları kullanılır. Bileşiklerin asetonitril-su ikili karışımlarındaki pK_a değerlerinin belirlenebilmesi için pH-k davranışlarının incelenmesi gereklidir. Kapasite faktörlerinin küçük olması durumunda ölü zaman için düzeltilmiş alıkonma zamanları ($t_{r,adj}$) kullanılır. Her 2 koşula pH-alıkonma verilerine ait grafikler verilmiştir. Bu tür grafiklerin sigmoidal olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada buna uygun grafikler elde edilmiştir.

Yapıdaki aromatik aminin (H_3N^{+})- C_6H_4 - SO_2 -NH-R) yapısında amin grubundaki iyonlaşma pK_{a1} ile, sülfonik (H_2N - C_6H_4 - SO_2 -NH-R) asit grubunun iyonlaşması pK_{a2} ile ifade edilir. Sülfonamit grubu bileşiklerin pK_{a1} değerleri 2-3 aralığında; pK_{a2} değerleri ise 5-9 aralığında veriler olduğu bilinmektedir. Sülfonamitler, bulundukları ortamda pH 3’ten küçük olduğunda, katyonik halde; bileşik pH 3-5 aralığında nötral formda, ve pH 5’ten büyük olduğunda ise anyonik durumdadırlar. Çalışmada pK_{a1} değerleri kromatografik verilerde yeterli değişim görülmediği için tayin edilmemiştir. Sülfadimetoksin, sülfakinoksalin, sülfametaksazol, sülfametazin,

sülfametoksipiridazin, sülfadiazin ve sülfatiazolün pK_{a2} değerlerinin tayinde X TERRA kolonda çalışılmıştır. Hesaplanan veriler, Çizelge 5.2’de verilmiştir.

Çizelge 5.2. Çalışılan sülfonamitlerin pK_{a2} verileri

Bileşikler	% 15 ACN			% 17 ACN		
	pK_{a2}	k_{HA}	k_{A^-}	pK_{a2}	k_{HA}	k_{A^-}
Sülfadimetoksin	6,408(0,001)	11,749(0,001)	0,448(0,001)	6,497(0,001)	10,108(0,001)	0,072(0,001)
Sülfametazin	7,557(0,001)	2,154(0,001)	0,647(0,001)	7,614(0,001)	2,034(0,001)	0,573(0,001)
Sülfametoksi- piridazin	7,207(0,001)	2, 422(0,001)	0,367(0,001)	7,230(0,001)	2,065(0,001)	0,359(0,001)
Sülfametaksazol	6,000(0,001)	4,943(0,001)	0,277(0,001)	6,116(0,001)	4,088(0,001)	0,201(0,001)
Sülfakinoksalin	6,024(0,001)	14,934(0,001)	1,150(0,001)	6,140(0,001)	11,753(0,001)	0,746(0,001)
	pK_{a2}	t_{RHA}	t_{RA^-}	pK_{a2}	t_{RHA}	t_{RA^-}
Sülfatiazol	7,361(0,001)	4,659(0,001)	1,531(0,001)	7,426 (0,001)	3,966(0,001)	1,170(0,001)
Sülfadiazin	6,673(0,001)	3,955(0,001)	0,136(0,001)	6,754 (0,001)	3,544(0,001)	0,026(0,001)

Çizelge 5.2’de görüldüğü gibi mobil fazda asetonitril miktarı arttıkça analizlenen bileşiklerin pK_{a2} değerleri artmaktadır.

Çalışılan florokinolonlar için deneysel çalışmalardan elde edilen veriler doğrusal olmayan regresyon programında değerlendirildiğinde pefloksasinin pK_{a1} değerleri hesaplanmıştır. Veriler Çizelge 5.3’de sunulmuştur.

Çizelge 5.3. Pefloksasin için pK_{a1} değerleri ve uç kapasite faktörleri

ACN derişimi,%v/v	pK_{a1}	k_{BH^+}	k_B
35	6,836(0,001)	0,367(0,001)	9,506(0,001)
40	6,867(0,001)	0,293(0,001)	6,867(0,001)
45	6,901(0,001)	0,272(0,001)	6,294(0,001)

Enrofloksasin ve ofloksasin için hesaplanan pK_{a1} ve pK_{a2} verileri, Çizelge 5.4’de; NLREG programı ile hesaplanan intrinsik kapasite faktörü değerleri, Çizelge 5.5’de verilmiştir.

Çizelge 5.4. Enrofloksasin ve ofloksasinin pK_{a1} ve pK_{a2} verileri

Bileşikler	%17 ACN		%20ACN		%25 ACN	
	pK _{a1}	pK _{a2}	pK _{a1}	pK _{a2}	pK _{a1}	pK _{a2}
Enrofloksasin	6,143 (0,001)	8,012 (0,001)	6,235 (0,001)	8,015 (0,001)	6,414 (0,001)	8,014 (0,001)
Ofloksasin	5,666 (0,001)	8,064 (0,001)	5,740 (0,001)	8,146 (0,001)	6,005 (0,001)	8,135 (0,001)

Çizelge 5.5. Enrofloksasin ve ofloksasinin intrinsik kapasite faktörü değerleri

Bileşikler	% 17 ACN			% 20ACN			% 25 ACN		
	k_{+HBAH}	k_{+HBA^-}	k_{BA^-}	k_{+HBAH}	k_{+HBA^-}	k_{BA^-}	k_{+HBAH}	k_{+HBA^-}	k_{BA^-}
Enrofloksasin	4,043 (0,001)	18,521 (0,001)	3,517 (0,001)	1,612 (0,001)	8,752 (0,001)	1,642 (0,001)	0,682 (0,001)	3,667 (0,001)	0,585 (0,001)
Ofloksasin	2,224 (0,001)	3,196 (0,001)	1,336 (0,001)	0,996 (0,001)	1,734 (0,001)	0,723 (0,001)	0,435 (0,001)	0,970 (0,001)	0,345 (0,001)

Çalışmada lipofilisite tayini için seçilen standartlar için hesaplanmış logP değerleri 2 farklı programdan alınmıştır (Çizelge 5.6).

Çizelge 5.6. Mannhold logP ve ClogP değerleri

Bileşikler	Mannhold logP değerleri	ClogP değerleri
Metilparaben	2,01	1,96
Etilparaben	2,12	2,47
Vanillin	-	1,29
Asetanilit	-	1,16

Standartlara ait Mannhold logP değerleri ve ClogP değerleri esas alınarak sülfonamitlerin 25°C deki logP değerleri, Eşitlik 5.1 ile hesaplanmıştır. Literatürde mevcut değerlerin çoğu bilgisayar programlarıyla hesaplanmış değerlerdir. Bu değerler arasında belirgin farklılıklar vardır. Bu nedenle deneysel çalışma son derece önemlidir. Literatürde Deneysel değer olarak sülfometaksazol için logP 1,75 değeri vardır (Çizelge 5.7).

$$\log P = \frac{(\log P_1 - \log P_2) \cdot t_R + t_1 \cdot \log P_2 - t_2 \cdot \log P_1}{t_1 - t_2} \quad (5.1)$$

Çizelge 5.7. Hesaplanan logP verileri

Bileşikler	Deneysel değerler Mannhold	Deneysel değerler ClogP	Mannhold programı
Sülfakinoksalin	2,10	2,37	2,23
Sülfadimetoksin	2,07	2,25	1,79
Sülfametaksazol	1,98	1,88	1,79
Sülfametoksipiridazin	1,93	1,76	1,79
Sülfametazin	1,92	1,73	-
Sülfatiazol	1,91	1,71	1,68
Sülfadiazin	1,91	1,69	1,79
Enrofloksasin	2,28	3,17	2,78
Ofloksasin	2,10	2,38	2,56

Bir ilaç aktif için sıklıkla logP optimal değerleri 1 ile 3 arasında olmalıdır. Yüksek lipofilisite düşük çözünürlük ve zayıf absorpsiyona yol açar. Lipofilisite çok düşükse, ilaç genellikle zayıf ADMET özellikleri sergileyecektir. Bu nedenle ilaç geliştirmenin erken aşamasında ilacın iyonlaşma ve lipofilisite sabitleri büyük bir öneme sahiptir.

HPLC metodu ile standartlar ve analizlenen bileşiklerin kapasite faktörü değerleri ve iki farklı programdan elde edilen logP değerleri kullanılarak yapılan hesaplamalar sonucunda elde edilen veriler Mannhold programından elde edilen değerlerle uyum içerisindedir ve istenilen optimal logP aralığına girmektedir. Çalışmadan elde edilen bu veriler, kullanılan bileşiklerin iyonlaşma ve lipofilisite sabitleri ile ilacın ADMET özelliklerini tahmin etmede diğer çalışmacılara katkı sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Abraham, M. H., Chadha, H. S., Whiting, G. S., Mitchell, R. C., 1994a. Hydrogen bonding. 32. An analysis of water-octanol and water-alkane partitioning and the $\Delta\log P$ parameter of Seiler. *Journal of pharmaceutical sciences*, 83(8), 1085-1100.
- Abraham, M. H., Grellier, P. L., Prior, D. V., Morris, J. J., Taylor, P. J., Doherty, R. M., 1990. Hydrogen-bonding. Part 11. A quantitative evaluation of the hydrogen-bond acidity of imides as solutes. *The Journal of Organic Chemistry*, 55(7), 2227-2229.
- Abraham, M. H., McGowan, J. C., 1987. The use of characteristic volumes to measure cavity terms in reversed phase liquid chromatography. *Chromatographia*, 23(4), 243-246.
- Abraham, M. H., Platts, J. A., Hersey, A., Leo, A. J., Taft, R. W., 1999. Correlation and estimation of gas-chloroform and water-chloroform partition coefficients by a linear free energy relationship method. *Journal of pharmaceutical sciences*, 88(7), 670-679.
- Abraham, M. H., Rosés, M., 1994b. Hydrogen bonding. 38. Effect of solute structure and mobile phase composition on reversed-phase high-performance liquid chromatographic capacity factors. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 7(12), 672-684.
- Adjei, M. D., Deck, J., Heinze, T. M., Freeman, J. P., Williams, A. J., Sutherland, J. B. 2007. Identification of metabolites produced from N-phenylpiperazine by *Mycobacterium* spp, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34 (3), 219–224.
- Aiello, S. E., Mays, A., 1998. *The Merck Veterinary Manual*. Whitehouse Station, NJ: Merck & Co. Inc, 8, 2187-2197.
- Albert, A., Serjeant, E.P. 1984. The ionization constants of typical acids and bases. In: *The Determination of Ionization Constants*. 136–75 (Chapter 9). Chapman and Hall London.
- Amézqueta, S., Subirats, X., Fuguet, E., Rosés, M., & Ràfols, C., 2020. Octanol-water partition constant. *Liquid-phase extraction*, 183-208.
- Andersson, M. I., MacGowan, A. P., 2003. Development of the quinolones, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51(1), 1–11.
- Andrasi, M., Buglyo, P., Zekany, L., Gaspar, A., 2007. A comparative study of capillary zone electrophoresis and pH-potentiometry for determination of dissociation constants. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 44(5), 1040-1047.

- Andrés, A., Rosés, M., Ràfols, C., Bosch, E., Espinosa, S., Segarra, V., Huerta, J. M., 2015. Setup and validation of shake-flask procedures for the determination of partition coefficients (logD) from low drug amounts. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 76, 181-191.
- Arnott, J. A., Planey, S. L., 2012. The influence of lipophilicity in drug discovery and design. *Expert opinion on drug discovery*, 7(10), 863-875.
- Avdeef A., 2003. Absorption and drug development. Solubility, permeability and charge state. 287p, Wiley, Hoboken, NJ.
- Avdeef, A. 1992. PH-metric logP. Part 1. Difference plots for determining ion-pair octanol-water partition coefficients of multiprotic substances. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 11(4), 510-517.
- Babić, S., Horvat, A. J., Pavlović, D. M., Kaštelan-Macan, M., 2007. Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *Trends in Analytical Chemistry*, 26(11), 1043-1061.
- Ball, P., 2000. Quinolone generations: natural history or natural selection?, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46 (1), 17-24.
- Ball, P., Mandell, L., 2003. Treatment of community-acquired respiratory tract infections. In Hooper, D.C., Rubinstein E. (Ed.) *Quinolone antimicrobial agents* (227-243). ASM Press Washington.
- Baran, W., Adamek E., Ziemianska J., Sobczak, A., 2011. Effects of the presence of sulfonamides in the environment and their influence on human health, *Journal of Hazardous Materials*, 196, 1– 15.
- Barbato, F., di Martino, G., Grumetto, L., La Rotonda, M. I., 2007. Retention of quinolones on human serum albumin and α 1-acid glycoprotein HPLC columns: Relationships with different scales of lipophilicity. *European journal of pharmaceutical sciences*, 30(3-4), 211-219.
- Barbosa, J., Barron, D., Cano, J., Jimenez-Lozano, E., Sanz-Nebot, V., Toro, I., 2001. Evaluation of electrophoretic method versus chromatographic, potentiometric and absorptiometric methodologies for determing pKa values of quinolones in hydroorganic mixtures. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 24(5-6), 1087-1098.
- Barbosa, J., Barrón, D., Jiménez-Lozano, E., 1999. Electrophoretic behaviour of quinolones in capillary electrophoresis: Effect of pH and evaluation of ionization constants. *Journal of Chromatography A*, 839(1-2), 183-192.
- Barbosa, J., Bergés, R., Sanz-Nebot, V., 1998. Retention behaviour of quinolone derivatives in high-performance liquid chromatography: Effect of pH and evaluation of ionization constants. *Journal of Chromatography A*, 823(1-2), 411-422.

- Barbosa, J., Bergés, R., Toro, I., Sanz-Nebot, V., 1997. Protonation equilibria of quinolone antibacterials in acetonitrile-water mobile phases used in LC. *Talanta*, 44(7), 1271-1283.
- Barbosa, J., Sanz-Nebot, V. 1995. Assignment of reference pH-values to primary standard buffer solutions for standardization of potentiometric sensors in acetonitrile-water mixtures. *Fresenius' journal of analytical chemistry*, 353(2), 148-155.
- Barron, D., Jimenez-Lozano, E., Barbosa, J. 2001. Prediction of electrophoretic behaviour of a series of quinolones in aqueous methanol. *Journal of Chromatography A*, 919(2), 395-406.
- Barrón, D., Jiménez-Lozano, E., Cano, J., Barbosa, J., 2001. Determination of residues of enrofloxacin and its metabolite ciprofloxacin in biological materials by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 759(1), 73-79.
- Bechalany, A., Tsantili-Kakoulidou, A., El Tayar, N., Testa, B., 1991. Measurement of lipophilicity indices by reversed-phase high-performance liquid chromatography: comparison of two stationary phases and various eluents. *Journal of Chromatography A*, 541, 221-229.
- Bell, P.H., Romblin, R.O., 1942. The relationship of structure to activity of sulfanilamide type compounds. *Journal of American Chemical Society*, 64, 2905-2917.
- Beltran, J. L., Sanli, N., Fonrodona, G., Barron, D., Özkan, G., Barbosa, J., 2003. Spectrophotometric, potentiometric and chromatographic pKa values of polyphenolic acids in water and acetonitrile–water media. *Analytica chimica acta*, 484(2), 253-264.
- Bermejo, M., Avdeef, A., Ruiz, A., Nalda, R., Ruell, J. A., Tsinman, O., ..., Merino, V. 2004. PAMPA—a drug absorption in vitro model: 7. Comparing rat in situ, Caco-2, and PAMPA permeability of fluoroquinolones. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 21(4), 429-441.
- Bermejo, M., Merino, V., Garrigues, T. M., Pla Delfina, J. M., Mulet, A., Vizet, P., .., Mercier, C., 1999. Validation of a biophysical drug absorption model by the PATQSAR system. *Journal of pharmaceutical sciences*, 88(4), 398-405.
- Bisacchi, G. S., 2015. Origins of the quinolone class of antibacterials: an expanded “discovery story” miniperspective. *Journal of medicinal chemistry*, 58(12), 4874-4882.
- Biswal, B. K., Balasubramanian, R., 2022. Adsorptive removal of sulfonamides, tetracyclines and quinolones from wastewater and water using carbon-based materials: Recent developments and future directions. *Journal of Cleaner Production*, 131421.
- Blondeau, J. M., 2004. Fluoroquinolones: mechanism of action, classification, and development of resistance. *Survey of Ophthalmology*, 49(2) , 73–78.

- Bock, L., Miller, G. H., Schaper, K. J., Seydel, J. K., 1974. Sulfonamide structure-activity relations in a cell-free system. 2. Proof for the formation of a sulfonamide-containing folate analog. *Journal of medicinal chemistry*, 17(1), 23-28.
- Bosch, E., Bou, P., Rosés, M., 1994. Linear description of solute retention in reversed-phase liquid chromatography by a new mobile phase polarity parameter. *Analytica chimica acta*, 299(2), 219-229.
- Bradshaw, J., Taylor, P. J., 1989. Rationalisations among Heterocyclic Partition Coefficients. Part 3: π -Excessive Heterocycles. Some Comments on the CLOGP Algorithm. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 8(4), 279-287.
- Brighty, K. E., Gootz, T. D., 1997. The chemistry and biological profile of trovafloxacin. *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 39(2), 1-14.
- Buckingham, D. A., Clark, C. R., Nangia, A., 1990. The acidity of norfloxacin. *Australian Journal of Chemistry*, 43(2), 301-309.
- Caço, A. I., Tomé, L. C., Dohrn, R., & Marrucho, I. M., 2010. Protonation equilibria and lipophilicity of sarafloxacin. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 55(9), 3160-3163.
- Camenisch G, Folkers G, van de Waterbeemd, H., 1998b. Shapes of membrane permeabilitylipophilicity curves: extension of theoretical models with an aqueous pore pathway. *European journal of pharmaceutical sciences*, 6(4):321–329.
- Camenisch, G., Alsenz, J., van de Waterbeemd, H., Folkers, G., 1998a. Estimation of permeability by passive diffusion through Caco-2 cell monolayers using the drugs' lipophilicity and molecular weight. *European journal of pharmaceutical sciences*, 6(4), 317-324.
- Campbell K. L., 1999. Sulphonamides: updates on use in veterinary medicine. *Veterinary Dermatology*, 10 (3), 205-215.
- Cañada-Cañada, F., Espinosa-Mansilla, A., & Muñoz de la Peña, A., 2007. Separation of fifteen quinolones by high performance liquid chromatography: Application to pharmaceuticals and ofloxacin determination in urine. *Journal of separation science*, 30(9), 1242-1249.
- Cardenas-Youngs, G. M., Beltrán, J. L., 2015. Dissociation constants and octanol–water partition equilibria for several fluoroquinolones. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 60(11), 3327-3332.
- Caron, G., Ermondi, G., 2006. New insights into the lipophilicity of ionized species. *Pharmacokinetic Profiling in Drug Research: Biological, Physicochemical, and Computational Strategies*, 165-185.

- Cháfer-Pericás, C., Maquieira, A., Puchades, R., 2010. Fast screening methods to detect antibiotic residues in food samples. *Trends in Analytical Chemistry*, 29(9), 1038-1049.
- Christian, J. S. 1996. The quinolone antibiotics. *Primary Care Update for OB/GYNS*, 3(3), 87-92.
- Claessens, H. A., 1998. Characterization of stationary phases for HPLC column testing clarification and chemical stability. conference; Symposium SON werkgemeenschap Analytische Chemie; 1998-11-01; 1998-11-01.
- Clarke, F. H., 1984. Ionization constants by curve fitting: application to the determination of partition coefficients. *Journal of pharmaceutical sciences*, 73(2), 226-230.
- Comer, J. A., Avdeef, A., Box, K. J., 1995. Limits for successful measurement of pKa and logP by pH-metric titration. *American laboratory (Fairfield)*, 27(6), 36C-36I.
- Cong-liang, Z., Yan, W., 2010. Determination and correlation of 1-octanol/water partition coefficients for six quinolones from 293.15 K to 323.15 K. *Chemical Research in Chinese Universities*, 26(4), 636-639.
- Congliang, Z., Yan, W., Fuan, W., 2007. Determination and temperature dependence of n-octanol/water partition coefficients for seven sulfonamides from (298.15 to 333.15) K. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 28(7), 1183-1186.
- Dalhoff, A., Weidner, W. 1988. Diffusion of ciprofloxacin into prostatic fluid. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 7(3), 438-439.
- De Aguiar, P. F., Bourguignon, B., Massart, D. L., 1997. Comparison of models and designs for optimisation of the pH and solvent strength in HPLC. *Analytica chimica acta*, 356(1), 7-17.
- De Smet, J., Boussery, K., Colpaert, K., De Sutter, P., De Paepe, P., Decruyenaere, J., Van Bocxlaer, J., 2009. Pharmacokinetics of fluoroquinolones in critical care patients: a bio-analytical HPLC method for the simultaneous quantification of ofloxacin, ciprofloxacin and moxifloxacin in human plasma. *Journal of Chromatography B*, 877(10), 961-967.
- Dearden, J. C., 1990. Molecular structure and drug transport. In: Ramsden C.A., Hansch, C., Sammer, P.G., Taylor, J.B. (Ed.) *Comprehensive medicinal chemistry. The rational design, mechanistic study & therapeutic applications of chemical compounds*, vol 4. Pergamon, p 375–411, Oxford,
- Dellis, D., Giaginis, C., Tsantili-Kakoulidou, A., 2007. Physicochemical profile of nimesulide: Exploring the interplay of lipophilicity, solubility and ionization. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 44(1), 57-62.
- Dibner, J. J., Richards, J. D., 2005. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. *Poultry science*, 84(4), 634-643.

- Dmitrienko, S. G., Kochuk, E. V., Apyari, V. V., Tolmacheva, V. V., Zolotov, Y. A. 2014. Recent advances in sample preparation techniques and methods of sulfonamides detection—a review. *Analytica chimica acta*, 850, 6-25.
- Domagala, J. M., 1994. Structure-activity and structure-side-effect relationships for the quinolone antibacterials. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 33(4), 685-706.
- Domagala, J. M., Hagen, S. E., 2003. Structure-activity relationships of the quinolone antibacterials in the new millennium: some things change and some do not. *Quinolone antimicrobial agents*, 1-18.
- Dong, Y., Xu, C., Zhao, X., Domagala, J., Drlica, K., 1998. Fluoroquinolone action against mycobacteria: effects of C-8 substituents on growth, survival, and resistance. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 42(11), 2978-2984.
- Dorsey, J. G., Khaledi, M. G., 1993. Hydrophobicity estimations by reversed-phase liquid chromatography: Implications for biological partitioning processes. *Journal of chromatography A*, 656(1-2), 485-499.
- 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(1-3), 197-204.
- El Solh, A. A., Alhajhusain, A., 2009. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 64(2), 229-238.
- El Tayar, N., Testa, B., Carrupt, P. A., 1992. Polar intermolecular interactions encoded in partition coefficients: an indirect estimation of hydrogen-bond parameters of polyfunctional solutes. *The journal of physical chemistry*, 96(3), 1455-1459.
- EPA U. Product properties test guideline, 1996. OPPTS 830.7550 Partition coefficient (n-octanol / H₂O), shake flask method, Erişim Tarihi: 02.12.2022. <http://www.regulations.gov/#!documentDetail;D=EPA-HQ-OPPT-2009-0151-0031>
- Erdemgil, F. Z., Şanlı, S., Şanlı, N., Özkan, G., Barbosa, J., Guiteras, J., Beltrán, J. L., 2007. Determination of pK_a values of some hydroxylated benzoic acids in methanol–water binary mixtures by LC methodology and potentiometry. *Talanta*, 72(2), 489-496.
- Fildes P., Camb M.B., 1940. A Rational Approach to Research in Chemotherapy. *The Lancet*, 235, 955–957.
- Freire, E., 2004. Isothermal titration calorimetry: controlling binding forces in lead optimization. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1(3), 295-299.

- Fu, K. P., Lafredo, S. C., Foleno, B., Isaacson, D. M., Barrett, J. F., Tobia, A. J., Rosenthale, M. E., 1992. In vitro and in vivo antibacterial activities of levofloxacin (l-ofloxacin), an optically active ofloxacin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 36(4), 860-866.
- Gago, F., Pastor, M., Pérez-Butragueño, J., López, R., Alvarez-Builla, J., Elguero, J., 1994. Hydrophobicity of Heterocycles: Determination of the π Values of Substituents on N-Phenylpyrazoles. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 13(2), 165-171.
- Gentry, L. O. 1991. Review of quinolones in the treatment of infections of the skin and skin structure. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 28(C), 97-110.
- Giaginis, C., Theocharis, S., Tsantili-Kakoulidou, A., 2006. Contribution to the standardization of the chromatographic conditions for the lipophilicity assessment of neutral and basic drugs. *Analytica chimica acta*, 573, 311-318.
- Giaginis, C., Theocharis, S., Tsantili-Kakoulidou, A., 2007. Octanol/water partitioning simulation by reversed-phase high performance liquid chromatography for structurally diverse acidic drugs: Effect of n-octanol as mobile phase additive. *Journal of Chromatography A*, 1166(1-2), 116-125.
- Giaginis, C., Theocharis, S., Tsantili-Kakoulidou, A., 2013. Octanol/water partitioning simulation by RP-HPLC for structurally diverse acidic drugs: Comparison of three columns in the presence and absence of n-octanol as the mobile phase additive. *Journal of separation science*, 36(24), 3830-3836.
- Giaginis, C., Tsantili-Kakoulidou, A., 2007. Current state of the art in HPLC methodology for lipophilicity assessment of basic drugs. A review. *Journal of liquid chromatography & related technologies*, 31(1), 79-96.
- Giaginis, C., Tsantili-Kakoulidou, A., 2008. Alternative measures of lipophilicity: from octanol–water partitioning to IAM retention. *Journal of pharmaceutical sciences*, 97(8), 2984-3004.
- Giaginis, C., Tsopeles, F., Tsantili-Kakoulidou, A., 2018. The impact of lipophilicity in drug discovery: rapid measurements by means of reversed-phase HPLC. In Mavromoustakos, T., Kellici, T. F., *Rational Drug Design* (217-228). Humana Press, New York.
- Giordano, P., Song, J., Pertel, P., Herrington, J., Kowalsky, S., 2005. Sequential intravenous/oral moxifloxacin versus intravenous piperacillin-tazobactam followed by oral amoxicillin-clavulanate for the treatment of complicated skin and skin structure infection. *International journal of antimicrobial agents*, 26(5), 357-365.
- Gleeson, M. P., 2008. Generation of a set of simple, interpretable ADMET rules of thumb. *Journal of medicinal chemistry*, 51(4), 817-834.
- Gleeson, M. P., Hersey, A., Montanari, D., Overington, J., 2011. Probing the links between in vitro potency, ADMET and physicochemical parameters. *Nature reviews Drug discovery*, 10(3), 197-208.

- Gocan, S., Cimpan, G., Comer, J., 2006. Lipophilicity measurements by liquid chromatography. *Advances in chromatography*, 44, 79-176.
- Gootz, T.D., Brighty, K.E., 1996. Fluoroquinolone antibacterials: SAR, mechanism of action, resistance, and clinical aspects, *Medicinal Research Reviews*, 16 (5), 433-486.
- Grabowski, T., Jaroszewski, J. J., Piotrowski, W., 2010. Correlations between no observed effect level and selected parameters of the chemical structure for veterinary drugs. *Toxicology in Vitro*, 24(3), 953-959.
- Graham, D. R., Talan, D. A., Nichols, R. L., Lucasti, C., Corrado, M., Morgan, N., Fowler, C. L., 2002. Once-daily, high-dose levofloxacin versus ticarcillin-clavulanate alone or followed by amoxicillin-clavulanate for complicated skin and skin-structure infections: a randomized, open-label trial. *Clinical infectious diseases*, 35(4), 381-389.
- Gupta K. Naber K. Stamm W., 2003. Treatment of urinary tract infections. In Hooper D.C., Rubinstein E. (Ed.), *Quinolone antimicrobial agents*, 3rd edn. ASM Press, Washington.
- Hansch, C., Björkroth, J. P., Leo, A., 1987. Hydrophobicity and central nervous system agents: on the principle of minimal hydrophobicity in drug design. *Journal of pharmaceutical sciences*, 76(9), 663-687.
- Hansch, C., Fujita, T., 1964. ρ - σ - π Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. *Journal of the American Chemical Society*, 86(8), 1616-1626.
- Hazhir, N., Kiani, F., Tahermansouri, H., Hasan Saraei, A. G., Koohyar, F. 2017. Prediction of thermodynamic and structural properties of sulfamerazine and sulfamethazine in water using DFT and ab initio methods. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 62(1), 1-13.
- Hernández-Arteseros, J. A., Barbosa, J., Compano, R., Prat, M. D., 2002. Analysis of quinolone residues in edible animal products. *Journal of Chromatography A*, 945(1-2), 1-24.
- Hooper, D. C., Wolfson J. S. 1991. Fluoroquinolone antimicrobial agents. *N Engl J Med*, 324, 384-94.
- Jiménez-Lozano, E., Marqués, I., Barrón, D., Beltrán, J. L., Barbosa, J., 2002. Determination of pKa values of quinolones from mobility and spectroscopic data obtained by capillary electrophoresis and a diode array detector. *Analytica Chimica Acta*, 464(1), 37-45.
- Kamlet, M. J., Doherty, R. M., Abraham, M. H., Marcus, Y., Taft, R. W., 1988. Linear solvation energy relationship. 46. An improved equation for correlation and prediction of octanol/water partition coefficients of organic nonelectrolytes (including strong hydrogen bond donor solutes). *The Journal of Physical Chemistry*, 92(18), 5244-5255.

- Karchmer, A.W., 2003. Treatment of skin and soft tissue infections. In Hooper D.C., Rubinstein, E. (Ed.) Quinolone antimicrobial agents, 311-321. ASM Press, Washington.
- Kerns, E. H., 2001. High throughput physicochemical profiling for drug discovery. *Journal of pharmaceutical sciences*, 90(11), 1838-1858.
- Kitzes-Cohen, R., 1987. Quinolones in CNS infections. *Pharma-cokinetics. Quinolones Bull*, 3, 11-14.
- Kłosińska-Szmurło, E., Pluciński, F. A., Grudzień, M., Betlejewska-Kielak, K., Biernacka, J., Mazurek, A. P., 2014. Experimental and theoretical studies on the molecular properties of ciprofloxacin, norfloxacin, pefloxacin, sparfloxacin, and gatifloxacin in determining bioavailability. *Journal of biological physics*, 40(4), 335-345.
- Koizumi, T., Arita, T., Kakemi, K., 1964. Absorption and Excretion of Drugs. XIX. Some Pharmacokinetic Aspects of Absorption and Excretion of Sulfonamides.(1). Absorption from Rat Stomach. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. 12 (4), 413-420.
- Kubinyi, H. (1979). Lipophilicity and biological activity. Drug transport and drug distribution in model systems and in biological systems. *Arzneimittelforschung*, 29(8), 1067-1080.
- Kümmerer K., 2009. Antibiotics in the aquatic environment. *Chemosphere*, 75 (4), 417–434.
- Lambrinidis, G., Vallianatou, T., Tsantili-Kakoulidou, A., 2015. In vitro, in silico and integrated strategies for the estimation of plasma protein binding. A review. *Advanced drug delivery reviews*, 86, 27-45.
- Langlois, M. H., Montagut, M., Dubost, J. P., Grellet, J., Saux, M. C., 2005. Protonation equilibrium and lipophilicity of moxifloxacin. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 37(2), 389-393.
- Ledoussal, B., Almstead, J. K., Flaim, C. P., 1999. Novel fluoroquinolone, structure activity, and design of new potent and safe agents. Program and abstracts of the 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1999. San Francisco.
- Lee, B. L., Padula, A. M., Kimbrough, R. C., Jones, S. R., Chaisson, R. E., Mills, J., Sande, M. A., 1991. Infectious complications with respiratory pathogens despite ciprofloxacin therapy. *New England Journal of Medicine*, 325(7), 520-521.
- Leeson, P. D., Springthorpe, B., 2007. The influence of drug-like concepts on decision-making in medicinal chemistry. *Nature reviews Drug discovery*, 6(11), 881-890.
- Leo, A., Hansch, C., Elkins, D., 1971. Partition coefficients and their uses. *Chemical reviews*, 71(6), 525-616.

- Leshner, G. Y., Froelich, E. J., Gruett, M. D., Bailey, J. H., Brundage, R. P., 1962. 1, 8-Naphthyridine derivatives. A new class of chemotherapeutic agents. *Journal of Medicinal Chemistry*, 5(5), 1063-1065.
- Lin, C. E., Deng, Y. J., Liao, W. S., Sun, S. W., Lin, W. Y., Chen, C. C., 2004. Electrophoretic behavior and pKa determination of quinolones with a piperazinyl substituent by capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1051(1-2), 283-290.
- Lin, C., E., Chang, C., C., Lin, W., C., 1997. Migration behavior and separation of sulfonamides in capillary zone electrophoresis. III. Citrate buffer as a background electrolyte. *Journal of Chromatography A*, 768, 105-112.
- Linford, M., Jensen, D., Clark, J., Teutenberg, T., 2012. Elevated temperatures in liquid chromatography, part III: A closer look at the van't Hoff equation. *LCGC North America*, 30(12), 1052-1057.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J., 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings1. *Advanced drug delivery reviews*, 46 (1-3), 3-26.
- Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W., Feeney, P. J., 2012. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced drug delivery reviews*, 64, 4-17.
- Liu, X., Tanaka, H., Yamauchi, A., Testa, B., Chuman, H., 2005. Determination of lipophilicity by reversed-phase high-performance liquid chromatography: Influence of 1-octanol in the mobile phase. *Journal of Chromatography A*, 1091(1-2), 51-59.
- Liu, X., Testa, B., Fahr, A., 2011. Lipophilicity and its relationship with passive drug permeation. *Pharmaceutical research*, 28(5), 962-977.
- Lizondo, M., Pons, M., Gallardo, M., Estelrich, J., 1997. Physicochemical properties of enrofloxacin. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 15(12), 1845-1849.
- Lombardo, F., Shalaeva, M. Y., Tupper, K. A., Gao, F., 2001. ElogDoct: a tool for lipophilicity determination in drug discovery. 2. Basic and neutral compounds. *Journal of medicinal chemistry*, 44(15), 2490-2497.
- Lowe, M. N., Lamb, H. M., Gemifloxacin 2000. *Drugs*, 59, 1137-1147.
- MacGowan, A. P., Wootton, M., Holt, H. A., 1999. The antibacterial efficacy of levofloxacin and ciprofloxacin against *Pseudomonas aeruginosa* assessed by combining antibiotic exposure and bacterial susceptibility. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 43(3), 345-349.

- Mandell, G. L., Sande, M. A. 1985. Antimicrobial Agents. In Gilman, A. G., Goodman, L. S., Rall, T. W. and Murad, F. (Ed.); Goodman and Gilman's The pharmacological basis of therapeutics (1095-1346) Macmillan Press, New York.
- Mandell, G.L., Petri, W.A, 1996. Jr. Sulfonamides, trimethoprim sulfamethoxazole, quinolones, and agents for urinary tract. Hardman, J.G., Limbird, L.E., Molinoff, P.B., Ruddon, R.W., Gilman, A.G. (Ed.), in Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis of Therapeutics, (1057-1072). McGraw-Hill, New York.
- Martínez, F., Gómez, A., 2002. Thermodynamics of partitioning of some sulfonamides in 1-octanol–buffer and liposome systems. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 15 (12), 874-880.
- Martinez, M., McDermott, P., Walker, R., 2006. Pharmacology of the fluoroquinolones: a perspective for the use in domestic animals. *The Veterinary Journal*, 172(1), 10-28.
- Mengellers, M. J. B., Hougee, P. E., Janssen, L. H. M., Van Miert, A. S. J. P. A. M., 1997. Structure-activity relationships between antibacterial activities and physicochemical properties of sulfonamides. *Journal of veterinary pharmacology and therapeutics*, 20(4), 276-283.
- Merino, V., Freixas, J., del Val Bermejo, M., Garrigues, T. M., Moreno, J., Plá-Delfina, J. M., 1995. Biophysical models as an approach to study passive absorption in drug development: 6-Fluoroquinolones. *Journal of pharmaceutical sciences*, 84(6), 777-782.
- Merino, V., Martín-Algarra, R. V., Rocher, A., Garrigues, T. M., Freixas, J., Polache, A., 1997. Effects of Ethanol on Intestinal Absorption of Drugs. I. In Situ Studies with Ciprofloxacin Analogs in Normal and Chronic Alcohol-Fed Rats. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 21(2), 326-333.
- Meyer, H. (1899). Theorie der Alkoholnarkose, *Arch Exp Pathol. Pharmacol*, 42, 109-18.
- Montero, M. T., Freixas, J., & Hernandez-Borrell, J., 1997. Expression of the partition coefficients of a homologous series of 6-fluoroquinolones. *International journal of pharmaceutics*, 149(2), 161-170.
- Msagati, T.A.M., Nindi, M. M., 2004. Multiresidue determination of sulfonamides in a variety of biological matrices by supported liquid membrane with high pressure liquid chromatography-electrospray mass spectrometry detection, *Talanta*, 64, 87-100.
- Mussini, T., Covington, A. K., Longhi, P., Rondinini, S., 1985. Criteria for standardization of pH measurements in organic solvents and water+ organic solvent mixtures of moderate to high permittivities. *Pure and applied chemistry*, 57(6), 865-876.

- Naber, K., Adam, D., 1998. Classification of fluoroquinolones. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 10 (4), 255–257.
- Neu, H. C. 1992. Quinolone antimicrobial agents. *Annual review of medicine*, 43(1), 465-486.
- Nicolle, L. E., 2002. Urinary tract infection: traditional pharmacologic therapies. *The American journal of medicine*, 113(1), 35-44.
- OECD 107 Method, 1995. OECD guideline for the testing of chemicals adopted by the council on 27th July 1995 partition coefficient (n-octanol/water): shake flask Method. Erişim Tarihi: 02.12.2022. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948169.pdf>.
- Ott, S. R., Allewelt, M., Lorenz, J., Reimnitz, P., Lode, H. 2008. Moxifloxacin vs ampicillin/sulbactam in aspiration pneumonia and primary lung abscess. *Infection*, 36(1), 23-30.
- Overton, C. E., 1901. Studien über die Narkose: zugleich ein Beitrag zur allgemeinen Pharmakologie. G. Fischer, 195p, Jena/Germany
- Pagliara, A., Carrupt, P. A., Caron, G., Gaillard, P., Testa, B., 1997. Lipophilicity profiles of ampholytes. *Chemical reviews*, 97(8), 3385-3400.
- Pagliara, A., Khamis, E., Trinh, A., Carrupt, P. A., Tsai, R. S., Testa, B., 1995. Structural properties governing retention mechanisms on RP-HPLC stationary phases used for lipophilicity measurements. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 18(9), 1721-1745.
- Park, H. R., Kim, T. H., Bark, K. M., 2002. Physicochemical properties of quinolone antibiotics in various environments. *European journal of medicinal chemistry*, 37(6), 443-460.
- Patrick, G. L., 2003. *An introduction to Medicinal Chemistry*, Oxford University Press, 379–435, Oxford, United Kingdom.
- Pérez, M. A. C., Dı́az, H. G., Teruel, C. F., Plá-Delfina, J. M., & Sanz, M. B., 2002. A novel approach to determining physicochemical and absorption properties of 6-fluoroquinolone derivatives: experimental assessment. *European journal of pharmaceutics and biopharmaceutics*, 53(3), 317-325.
- Peterson, L. R. 2001. Quinolone molecular structure-activity relationships: what we have learned about improving antimicrobial activity. *Clinical Infectious Diseases*, 33 (3), 180-186.
- Pham, T. D. M., Ziora, Z. M., Blaskovich, M. A. T., 2019. Quinolone antibiotics. *MedChemComm*, 10, 1719-1739.
- Pharma, P., Jain, A., Jain, S. 2009. Fluoroquinolone Antibacterials: A Review On Chemistry, Microbiology And Therapeutic Prospects. *Acta Pol. Pharm.*, 66 (6) 587–604.

- Phillips, I., Casewell, M., Cox, T., De Groot, B., Friis, C., Jones, R., ..., Waddell, J., 2004. Does the use of antibiotics in food animals pose a risk to human health? A critical review of published data. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 53(1), 28-52.
- Poole, M., Anon, J., Paglia, M., Xiang, J., Khashab, M., Kahn, J. 2006. A trial of high-dose, short-course levofloxacin for the treatment of acute bacterial sinusitis. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 134(1), 10-17.
- Qiang, Z., Adams, C., 2004. Potentiometric determination of acid dissociation constants (pKa) for human and veterinary antibiotics. *Water research*, 38(12), 2874-2890.
- Rabbaa, L., Dautrey, S., Colas-Linhart, N., Carbon, C., Farinotti, R., 1997. Absorption of ofloxacin isomers in the rat small intestine. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 41(10), 2274-2277.
- Rådström, P., Swedberg, G. O. T. E., Sköld, O., 1991. Genetic analyses of sulfonamide resistance and its dissemination in gram-negative bacteria illustrate new aspects of R plasmid evolution. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 35(9), 1840-1848.
- Raevsky, O. A., Schaper, K. J., Seydel, J. K., 1995. H-Bond Contribution to Octanol-Water Partition Coefficients of Polar Compounds. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 14(5), 433-436.
- Ràfols, C., Bosch, E., Ruiz, R., Box, K. J., Reis, M., Ventura, C., ..., Martins, F., 2012. Acidity and hydrophobicity of several new potential antitubercular drugs: isoniazid and benzimidazole derivatives. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 57(2), 330-338.
- Renau, T. E., Sanchez, J. P., Shapiro, M. A., Dever, J. A., Gracheck, S. J., Domagala, J. M., 1995. Effect of lipophilicity at N-1 on activity of fluoroquinolones against mycobacteria. *Journal of medicinal chemistry*, 38(15), 2974-2977.
- Ricci, M. C., Cross, R. F., 1993. Capillary Electrophoresis Separation of Sulphonamides and Dihydrofolate Reductase Inhibitors. *Journal of Microcolumn Separations*, 5 (3), 207-215.
- Riley, C. M., & Rosanske, T. W. (Ed.), 1996. Development and validation of analytical methods. Elsevier, 351p, U.S.A.
- Rosés, M., Bosch, E., 1993. Linear solvation energy relationships in reversed-phase liquid chromatography. Prediction of retention from a single solvent and a single solute parameter. *Analytica chimica acta*, 274(1), 147-162.
- Rosés, M., Canals, I., Allemann, H., Siigur, K., Bosch, E., 1996. Retention of ionizable compounds on HPLC. 2. Effect of pH, ionic strength, and mobile phase composition on the retention of weak acids. *Analytical chemistry*, 68(23), 4094-4100.

- Ross, D. L., Elkinton, S. K., Riley, C. M., 1992. Physicochemical properties of the fluoroquinolone antimicrobials. III. 1-Octanol/water partition coefficients and their relationships to structure. *International journal of pharmaceutics*, 88(1-3), 379-389.
- Ross, D. L., Riley, C. M., 1990. Aqueous solubilities of some variously substituted quinolone antimicrobials. *International Journal of Pharmaceutics*, 63(3), 237-250.
- Rowley, M., Kulagowski, J. J., Watt, A. P., Rathbone, D., Stevenson, G. I., Carling, R. W., ..., Leeson, P. D., 1997. Effect of plasma protein binding on in vivo activity and brain penetration of glycine/NMDA receptor antagonists. *Journal of medicinal chemistry*, 40(25), 4053-4068.
- Rubinstein, E. (Ed.), in *Quinolone antimicrobial agents* (3-18), ASM Press, Washington.
- Sánchez-Castaño, G., Ruíz-García, A., Bañón, N., Bermejo, M., Merino, V., Freixas, J., ..., Plá-Delfina, J. M., 2000. Intrinsic absolute bioavailability prediction in rats based on in situ absorption rate constants and/or in vitro partition coefficients: 6-Fluoroquinolones. *Journal of pharmaceutical sciences*, 89(11), 1395-1403.
- Sanli N., Sanli S., Özkan G., Denizli A. 2010. Determination of pKa Values of Some Sulfonamides by LC and LC-PDA Methods in Acetonitrile-Water Binary Mixtures. *The Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21 (10): 1952-1960.
- Sanli, N., Şanlı, S., Özkan, G., & Denizli, A., 2010. Determination of pKa values of some sulfonamides by LC and LC-PDA methods in acetonitrile-water binary mixtures. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21, 1952-1960.
- Sanli, S., Altun, Y., Sanli, N., Alsancak, G., Beltran, J. L., 2009. Solvent Effects on pKa values of Some Substituted Sulfonamides in Acetonitrile– Water Binary Mixtures by the UV-Spectroscopy Method. *Journal of chemical & engineering data*, 54(11), 3014-3021.
- Sanz-Nebot, V., Toro, I., Barbosa, J., 2001. Prediction of retention behaviour and evaluation of pKa values of peptides and quinolones in liquid chromatography. *Journal of Chromatography A* 933, 45– 56.
- Saravanos, K., Duff, P., 1992. The quinolone antibiotics. *Obstetrics and gynecology clinics of North America*, 19(3), 529-537.
- Seydel, J. K., Trettin, D., Cordes, H. P., Wassermann, O., Malyusz, M., 1980. Quantitative structure-pharmacokinetic relationships derived on antibacterial sulfonamides in rats and its comparison to quantitative structure-activity relationships. *Journal of Medicinal Chemistry*, 23(6), 607-613.
- Shah, B. P., Jain, S., Prajapati, K. K., Mansuri, N. Y., 2012. Stability indicating HPLC method development: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 3(9), 2978.

- Siegert, R., Gehanno, P., Nikolaidis, P., Bagger-Sjöbäck, D., Ibanez, J. M., Hampel, B., ..., Sinusitis Study Group. 2000. A comparison of the safety and efficacy of moxifloxacin (BAY 12-8039) and cefuroxime axetil in the treatment of acute bacterial sinusitis in adults. *Respiratory medicine*, 94(4), 337-344.
- Smith, D. A., van de Waterbeemd, H., 1999. Pharmacokinetics and metabolism in early drug discovery. *Current opinion in chemical biology*, 3(4), 373-378.
- Snyder, L. R., Dolan, J. W., Gant, J. R., 1979. Gradient elution in high-performance liquid chromatography: I. Theoretical basis for reversed-phase systems. *Journal of Chromatography A*, 165(1), 3-30.
- Snyder, P. W., Mecinović, J., Moustakas, D. T., Thomas III, S. W., Harder, M., Mack, E. T., Whitesides, G. M., 2011. Mechanism of the hydrophobic effect in the biomolecular recognition of arylsulfonamides by carbonic anhydrase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(44), 17889-17894.
- Solh, A. A. E., Alhajhusain, A., 2009. Update on the treatment of *Pseudomonas aeruginosa* pneumonia. *J. Antimicrob. Chemother.*, 64 (2), 229–238.
- Sousa, J., Alves, G., Fortuna, A., Falcão, A., 2012. Analytical methods for determination of new fluoroquinolones in biological matrices and pharmaceutical formulations by liquid chromatography: a review. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 403(1), 93-129.
- SPARC V3.1. (<http://ibmlc2.chem.uga.edu/sparc/>).
- Sternesjo, A., Mellgren, C., Bjorck, L., 1995. Determination of sulfamethazine residues in milk by a surface plasmon resonance-based biosensor assay. *Analytical Biochemistry*, 226(1), 175-181.
- Stockwell, V. O., Duffy, B., 2012. Use of antibiotics in plant agriculture. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, 31(1).
- Stratton, C., 1992. Fluoroquinolone antibiotics: properties of the class and individual agents. *Clinical therapeutics*, 14(3), 348-75.
- Sun, J., Sakai, S., Tauchi, Y., Deguchi, Y., Chen, J., Zhang, R., Morimoto, K., 2002. Determination of lipophilicity of two quinolone antibacterials, ciprofloxacin and grepafloxacin, in the protonation equilibrium. *European journal of pharmaceuticals and biopharmaceuticals*, 54(1), 51-58.
- Takács-Novák, K., Józán, M., Hermecz, I., Szász, G., 1992. Lipophilicity of antibacterial fluoroquinolones. *International Journal of Pharmaceutics*, 79(1-3), 89-96.
- Takács-Novák, K., Józán, M., Szász, G., 1995. Lipophilicity of amphoteric molecules expressed by the true partition coefficient. *International journal of pharmaceutics*, 113(1), 47-55.

- Testa B, Carrupt P-A, Gaillard P, Tsai R-S. 1996. Intramolecular Interactions encoded in Lipophilicity: Their nature and significance. In: Pliska V, Testa B, van de Waterbeemd H.(Ed.) Lipophilicity in drug action and toxicology (49–71). VCH, Weinheim.
- Testa, B., Crivori, P., Reist, M., Carrupt, P. A., 2000. The influence of lipophilicity on the pharmacokinetic behavior of drugs: Concepts and examples. *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 19(1), 179-211.
- Tillotson, G. S., 1996. Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. *J. Med. Microbiol.*, 44 (5) , 320–324.
- Tolls, J., 2001. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soils: a review. *Environmental science & technology*, 35(17), 3397-3406.
- Tsantili-Kakoulidou A, Piperaki S, Panderi I.,1997. Prediction of distribution coefficients from structure. The influence of ion pair formation as reflected in experimental and calculated values. *QSAR Comb Sci* 16 (4):315–316.
- Tsantili-Kakoulidou, A., Varvaresou, A., Siatra-Papastaikoudi, T., Raevsky, O. A., 1999. A Comprehensive Investigation of the Partitioning and Hydrogen Bonding Behavior of Indole Containing Derivatives of 1, 3, 4-Thiadiazole and 1, 2, 4-Triazole by means of Experimental and Calculative Approaches. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 18(5), 482-489.
- Tsopelas, F., Giaginis, C., Tsantili-Kakoulidou, A., 2017. Lipophilicity and biomimetic properties to support drug discovery. *Expert opinion on drug discovery*, 12(9), 885-896.
- Usman, M., Farooq, M., Hanna, K., 2020. Environmental side effects of the injudicious use of antimicrobials in the era of COVID-19. *Science of the Total Environment*, 745, 141053.
- Valkó, K., 2004. Application of high-performance liquid chromatography based measurements of lipophilicity to model biological distribution. *Journal of chromatography A*, 1037(1-2), 299-310.
- Valkó, K., Bevan, C., Reynolds, D., 1997. Chromatographic hydrophobicity index by fast-gradient RP-HPLC: a high-throughput alternative to logP/logD. *Analytical chemistry*, 69(11), 2022-2029.
- Valkó, K., Slégel, P., 1993. New chromatographic hydrophobicity index ($\log k'$) based on the slope and the intercept of the log k' versus organic phase concentration plot. *Journal of Chromatography A*, 631(1-2), 49-61.
- Valkó, K., Snyder, L. R., Glajch, J. L., 1993. Retention in reversed-phase liquid chromatography as a function of mobile-phase composition. *Journal of Chromatography A*, 656(1-2), 501-520.
- Van Bambeke, F., Michot, J. M., Van Eldere, J., Tulkens, P. M., 2005. Quinolones in 2005: an update. *Clinical Microbiology and infection*, 11(4), 256-280.

- Van de Waterbeemd, H., Kansy, M., Wagner, B., Fischer, H., 1996. Lipophilicity measurement by reversed-phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC). In Pilska, V., Testa B., Van de Waterbeemd, H. (Ed.) Lipophilicity in drug action and toxicology, 73-87. VCH, Weinheim.
- Van De Waterbeemd, H., Smith, D. A., Beaumont, K., Walker, D. K., 2001. Property-based design: optimization of drug absorption and pharmacokinetics. *Journal of medicinal chemistry*, 44(9), 1313-1333.
- Vazquez, J. L., Montero, M. T., Trias, J., Hernandez-Borrell, J., 1998. 6-Fluoroquinolone-liposome interactions: fluorescence quenching study using iodide. *International journal of pharmaceutics*, 171(1), 75-86.
- Veber, D. F., Johnson, S. R., Cheng, H. Y., Smith, B. R., Ward, K. W., Kopple, K. D., 2002. Molecular properties that influence the oral bioavailability of drug candidates. *Journal of medicinal chemistry*, 45(12), 2615-2623.
- Völgyi, G., Ruiz, R., Box, K., Comer, J., Bosch, E., Takács-Novák, K., 2007. Potentiometric and spectrophotometric pKa determination of water-insoluble compounds: validation study in a new cosolvent system. *Analytica chimica acta*, 583(2), 418-428.
- Völgyi, G., Vizserálek, G., Takács-Novák, K., Avdeef, A., Tam, K. Y., 2012. Predicting the exposure and antibacterial activity of fluoroquinolones based on physicochemical properties. *European journal of pharmaceutical sciences*, 47(1), 21-27.
- Vrakas, D., Panderi, I., Hadjipavlou-Litina, D., Tsantili-Kakoulidou, A., 2005. Investigation of the relationships between logP and various chromatographic indices for a series of substituted coumarins. Evaluation of their similarity/dissimilarity using multivariate statistics. *QSAR & Combinatorial Science*, 24(2), 254-260.
- Vrakas, D., Tsantili-Kakoulidou, A., Hadjipavlou-Litina, D., 2003. Exploring the consistency of logP estimation for substituted coumarins. *QSAR & Combinatorial Science*, 22(6), 622-629.
- Walker, R. C., Wright, A. J., 1991. The fluoroquinolones. In *Mayo Clinic Proceedings*, 66 (12), 1249-1259.
- Waring, M. J., 2009. Defining optimum lipophilicity and molecular weight ranges for drug candidates—molecular weight dependent lower logD limits based on permeability. *Bioorganic & medicinal chemistry letters*, 19(10), 2844-2851.
- Warren, J. W., Abrutyn, E., Hebel, J. R., Johnson, J. R., Schaeffer, A. J., Stamm, W. E., 1999. Guidelines for antimicrobial treatment of uncomplicated acute bacterial cystitis and acute pyelonephritis in women. *Clinical Infectious Diseases*, 29(4), 745-759.
- Wright, D.H., Brown, G.H., Peterson, M.L., Rotschafer, J.C. 2000. Application of fluoroquinolone pharmacodynamics. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 46 (5), 669- 683.

- Yang, G. Z., Lien, E. J., Guo, Z. R., 1986. Physical factors contributing to hydrophobic constant π . Quantitative Structure-Activity Relationships, 5(1), 12-18.
- Yoshida, T., Yamamoto, Y., Orita, H., Kakiuchi, M., Takahashi, Y., Itakura, M., Kado, N., Mitani, K., Yasuda, S., Kato H., Itoh, Y., 1996. Studies on Quinolone Antibacterials. IV. 1) Structure-Activity Relationships of Antibacterial Activity and Side Effects for 5- or 8-Substituted and 5, 8-Disubstituted-7-(3-amino-1-pyrrolidinyl)-1-cyclopropyl-1, 4-dihydro-4-oxoquinoline-3-carboxylic Acids. Chem. Pharm. Bull., 44 (5), 1074–1085.
- Zlotos, G., Bucker, A., Kinzig-Schippers, M., Sorgel, F., & Holzgrabe, U., 1998. Plasma protein binding of gyrase inhibitors. Journal of pharmaceutical sciences, 87(2), 215-220.

