

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

**BENZİMİDAZOL VE İMİDAZOL GRUBU İLAÇLARIN BAZI  
FİZİKOKİMYASAL PARAMETRELERİNİN TERS FAZ SIVI  
KROMATOĞRAFİ YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ**

**Kader POTURCU**

**Danışman  
Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY**

**DOKTORA TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
ISPARTA - 2019**



© 2019 [Kader POTURCU]

## TEZ ONAYI

Kader POTURCU tarafından hazırlanan "**Benzimidazol ve İmidazol Grubu İlaçların Bazı Fizikokimyasal Parametrelerinin Ters Faz Sıvı Kromatografi Yöntemiyle Belirlenmesi**" adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

**Danışman**

**Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY**  
Süleyman Demirel Üniversitesi



**Jüri Üyesi**

**Prof. Dr. A. Güleren ALSANCAK**  
Süleyman Demirel Üniversitesi



**Jüri Üyesi**

**Prof. Dr. Esengül KIR**  
Süleyman Demirel Üniversitesi



**Jüri Üyesi**

**Doç. Dr. Hale SEÇİLMİŞ CANBAY**  
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi



**Jüri Üyesi**

**Dr. Öğr. Üyesi Tuğba SARDOHAN KÖSEOĞLU**  
Isparta Uygulamalı Bilimler Üniversitesi



**Enstitü Müdürü**

**Doç. Dr. Şule Sultan UĞUR**

## **TAAHHÜTNAME**

Bu tezin akademik ve etik kurallara uygun olarak yazıldığını ve kullanılan tüm literatür bilgilerinin referans gösterilerek tezde yer aldığını beyan ederim.

**Kader POTURCU**



## İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER.....	i
ÖZET.....	v
ABSTRACT.....	vii
TEŞEKKÜR.....	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xvi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Anthelmintik İlaçlar/ Benzimidazoller.....	1
1.1.1. Albendazol.....	3
1.1.2. Astemizol.....	6
1.1.3. Mebendazol.....	8
1.1.4. Tiyabendazol.....	11
1.2. İmidazol Halkası Bulunduran Bileşikler.....	13
1.2.1. Klotrimazol.....	15
1.2.2. Metimazol (Tiyamazol).....	18
1.2.3. Metronidazol.....	20
1.3. Kromatografi.....	22
1.4. Sıvı Kromatografi.....	24
1.5. Kromatografik Analizlerde Çözücü-Çözünen Etkileşimleri.....	32
1.5.1. Molekül içi etkileşimler.....	32
1.5.2. Moleküller arası etkileşimler.....	35
1.5.3. Dağılma kuvvetleri.....	36
1.5.4. Dipol-Dipol etkileşimleri.....	37
1.5.5. Hidrojen bağı.....	38
1.5.6. İyonik etkileşimler.....	39
1.5.7. Yük transferi veya $\pi$ - $\pi$ etkileşimleri.....	39
1.6. Ters Faz Sıvı Kromatografik Analizlerde Kullanılan Durgun Faz ve Mobil Fazlar.....	40
1.7. RPLC'de Kullanılan Organik Modifiyerler.....	42
1.8. RPLC'de Kullanılan Tamponlar.....	42
1.9. Sıvı Kromatografide Kullanılan Terimler.....	45
1.9.1. Alıkonma zamanı.....	46
1.9.2. Kapasite faktörü.....	46
1.9.3. Kromatografik kolon etkinliği.....	48
1.9.4. Tabaka teorisi.....	49
1.9.5. Tabaka yüksekliğini etkileyen faktörler.....	51
1.9.5.1. Eddy difüzyonu.....	51
1.9.5.2. Konsantrasyon farkı difüzyonu (boyuna difüzyon).....	52
1.9.5.3. Kütle aktarımı.....	52
1.10. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Cihazı.....	57
1.10.1. HPLC'de kullanılan kolon çeşitleri.....	57
1.10.2. HPLC'de kullanılan dedektörler.....	61
1.10.3. HPLC'de kullanılan pompalar.....	62
1.11. Fizikokimyasal Özellikler.....	62
1.11.1. Asit-Baz İyonlaşma Sabiti ( $pK_a$ ).....	65

1.11.2. Çözünürlük .....	70
1.11.3. Lipofilite ( $\log P_{o/w}$ ) .....	72
1.14. Azot Atomu İçeren Bazı Heterosiklik Bileşikler ve $pK_a$ Değerleri....	72
1.15. $pK_a$ Tayininde Kullanılan Metotlar .....	79
1.15.1. $pK_a$ tayininde kullanılan kompütasyonel yaklaşımlar .....	79
1.15.2. $pK_a$ tayininde kullanılan deneysel metotlar .....	80
1.16. Lineer Solvasyon Enerji İlişkisi (Linear Solvation Energy Relationship, LSER) .....	81
1.16.1. Abraham solvasyon parametreleri modeli .....	83
1.16.1.1. Abraham solvasyon parametreleri modelinin genel ilkeleri.....	85
1.16.1.2. Solvasyon parametreleri modelinde kullanılan çözünen tanımlayıcıları.....	90
1.16.1.2.1. McGowan karakteristik hacmi .....	90
1.16.1.2.2. Aşırı molar kırılma tanımlayıcısı (E) .....	91
1.16.1.2.3. Dipolarite/polarlanabilirlik tanımlayıcısı (S) .....	92
1.16.1.2.4. Hidrojen bağı asitliği ve bazlığı tanımlayıcıları.....	92
1.16.1.3. Abraham solvasyon parametreleri modelinin kalitatif açıklanması .....	95
1.16.1.4. Abraham solvasyon parametreleri modelinde kullanılan hesaplamalar .....	96
1.17. Çözünürlük .....	98
1.17.1. Çözünürlük için kullanılan terimler .....	101
1.17.2. Çözünürlüğün belirlenmesinde kullanılan yöntemler .....	102
1.17.3. Çözünürlük hesaplamalarında kullanılan eşitlikler .....	105
1.18. Lipofilite .....	108
1.19. Kan Beyin Bariyeri.....	113
1.20. Validasyon.....	117
1.20.1. Doğruluk (Accuracy) .....	120
1.20.2. Kesinlik (Precision).....	120
1.20.3. Doğrusallık (Linearity) .....	123
1.20.4. Aralık (Range) .....	124
1.20.5. Gerçeklik (Trueness) .....	125
1.20.6. Sağlamlık, dayanıklılık (Robustness/Ruggedness) .....	125
1.20.7. Tayin sınırı, gözlenebilme sınırı (Limit of Detection, LOD).....	126
1.20.8. Kantitatif yorum sınırı (Limit of Quantification, LOQ) .....	127
1.20.9. Seçicilik (Selectivity) .....	128
1.20.10. Duyarlılık (Sensitivity) .....	128
2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	130
2.1. Literatürden Elde Edilen Asit/Baz İyonlaşma Sabiti ( $pK_a$ ) Değerleri .....	130
2.1.1. Benzimidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen asit/baz iyonlaşma sabiti ( $pK_a$ ) değerleri.....	131
2.1.2. İmidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen asit/baz iyonlaşma sabiti değerleri.....	133
2.2. Literatürden Elde Edilen Oktanol/Su Dağılım Katsayısı ( $\log P_{o/w}$ ) Değerleri.....	135

2.2.1. Benzimidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen logP <sub>o/w</sub> değerleri .....	136
2.2.2. İmidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen logP <sub>o/w</sub> değerleri .....	137
2.3. Literatürden Elde Edilen Çözünürlük Değerleri.....	138
2.3.1. Benzimidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen çözünürlük değerleri.....	138
2.3.2. İmidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen çözünürlük değerleri.....	139
2.4. Literatürden Elde Edilen Validasyon Çalışmaları ile İlgili Veriler .....	140
3. MATERYAL VE METOT .....	146
3.1. Tezde Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	146
3.2. Tezde Kullanılan Cihazlar ve Kolonlar .....	149
3.2.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı .....	149
3.2.2. Kolonlar .....	150
3.3. Bileşiklerin Kromatografik Davranışlarının Tayininde Kullanılan Çözeltiler .....	150
3.4. Optimum Ayırma Koşulunun Belirlenmesi .....	154
3.5. Yöntem Geliştirme.....	155
3.5.1. Sıvı kromatografik yöntemle pK <sub>a</sub> tayini.....	155
3.5.2. Hareketli fazın belirlenmesi .....	155
3.5.3. Hareketli faz pH'ı ve kolon sıcaklığının belirlenmesi .....	156
3.5.4. Dalga boyu seçimi.....	156
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	157
4.1. Bileşiklerin Chemicalize Programı ile Hesaplanan İyonlaşma / Protonasyon Sabiti Değerleri.....	157
4.2. İyonlaşma/Protonasyon Sabiti Hesaplanması için Yapılan Çalışmalar .....	159
4.2.1. Albendazol için elde edilen sıvı kromatografik veriler.....	159
4.2.2. Astemizol için elde edilen sıvı kromatografik veriler .....	163
4.2.3. Mebendazol için elde edilen sıvı kromatografik veriler .....	169
4.2.4. Tiyabendazol için elde edilen sıvı kromatografik veriler .....	173
4.2.5. Klotrimazol için elde edilen sıvı kromatografik veriler.....	177
4.2.6. Metimazol (Tiyamazol) için elde edilen sıvı kromatografik veriler.....	182
4.2.7. Metronidazol için elde edilen sıvı kromatografik veriler .....	184
4.3. Bileşiklerin Su Ortamındaki pK <sub>a</sub> Değerlerinin Hesaplanması.....	189
4.3.1. Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle sudaki pK <sub>a</sub> değerinin hesaplanması.....	190
4.3.2. Mol kesri yöntemiyle sudaki pK <sub>a</sub> değerinin hesaplanması .....	193
4.4. Çalışılan Bileşiklerin 37°C'deki pK <sub>a</sub> Değerlerinin Hesaplanması.....	197
4.5. Çözünürlük (logS) değerlerinin hesaplanması.....	198
4.6. Lipofilite (log P) değerlerinin hesaplanması .....	199
4.7. İlaç Moleküllerinin Kan Beyin Bariyerinden Geçiş.....	199
4.8. Metot Optimizasyonu.....	200
4.9. Metot Validasyonu.....	203
4.9.1. Kalibrasyon ve duyarlılık .....	203
4.9.2. Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları.....	205
4.9.3. Geri kazanım çalışmaları .....	206

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR.....	208
5.1. Bileşiklerin Termodinamik pK <sub>a</sub> Değerlerinin Hesaplanması .....	208
5.2. Abraham Çözünen Parametreleri ile Bileşiklerin logP <sub>o/w</sub> , logS ve logBB Değerlerinin Hesaplanması .....	217
5.3. Geliştirilen Metodun Validasyonu.....	220
KAYNAKLAR .....	223
ÖZGEÇMİŞ.....	263





## ÖZET

Doktora Tezi

### BENZİMİDAZOL VE İMİDAZOL GRUBU İLAÇLARIN BAZI FİZİKOKİMYASAL PARAMETRELERİNİN TERS FAZ SIVI KROMATOĞRAFİ YÖNTEMİYLE BELİRLENMESİ

Kader POTURCU

Süleyman Demirel Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY

Bileşiklerin oral absorpsiyonunun değerlendirilmesinde, hesaplanmış ve deneysel olarak ölçülen fizikokimyasal parametreleri içeren çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. İyonlaşma/protonasyon sabiti ( $pK_a$ ), çözünürlük ve lipofilisite ( $\log P_{o/w}$ ) iyi oral absorpsiyona sahip ilaçları tanımlayan en önemli fizikokimyasal parametreler arasındadır. Bu parametreler ilaç adayı moleküllerin absorpsiyon, dağılım, metabolize edilme ve atılım (ADME) davranışının tahminine de izin vermektedir.

Bu tez çalışmasında benzimidazol ve imidazol fonksiyonel grubu içeren anthelmintik ve antifungal özellik taşıyan (albendazol, astemizol, mebendazol, tiyabendazol, klotrimazol, metimazol (tiyamazol) ve metronidazol) ilaç moleküllerinin ters faz sıvı kromatografik yöntemle alıkonma davranışı incelenmiştir. Kullanılan bu yöntemde altı bileşik için Kinetex Core-Shell C8 (Phenomenex, 150mm×2,6  $\mu$ m, 4,6 mm) kolon; metimazol için Kinetex Core-Shell EVO C18 (Phenomenex, 250mm × 4,6 mm, 5  $\mu$ m) kolon ile 25°C'de 0,8 mL/dakika akış hızında, analizler gerçekleştirilmiştir. Bu kromatografik analizlerden elde edilen veriler kullanılarak bileşiklerin farklı asetonitril-su derişimlerinde  $pK_a$  değerleri deneysel olarak belirlenmiştir.

Diğer iki fizikokimyasal özellik olan çözünürlük ve lipofilisite değerleri Abraham çözünen tanımlayıcıları kullanılarak hesaplanmıştır. Bu tanımlayıcılar kullanılarak ilaç moleküllerinin kan beyin bariyerinden geçişi de hesaplanmıştır.

Geliştirilen kromatografik metotta bileşiklerin mümkün olan en kısa sürede analizini gerçekleştirmek ve bileşiklerin simetrik piklerini elde etmek amaçlanmıştır. Bunun için optimum ayırma koşulları belirlenmiştir. Geliştirilen RPLC metodunun geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla metot validasyonu gerçekleştirilmiş ve Uluslararası Uyum Konferansı (International Conference on

Harmonization, ICH) tarafından önerilen parametreler test edilerek metodun performansı ve güvenilirliği değerlendirilmiştir.

**Anahtar Kelimeler:**  $pK_a$ , ters faz sıvı kromatografi, fizikokimyasal parametreler, Abraham çözünen tanımlayıcıları, validasyon.

**2019, 265 sayfa**



## ABSTRACT

Ph.D. Thesis

### DETERMINATION OF SOME PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF BENZIMIDAZOLE AND IMIDAZOLE GROUP DRUGS WITH REVERSED PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD

Kader POTURCU

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY

In the evaluation of oral absorption of compounds, there is a need for studies including calculated and experimentally measured physicochemical parameters. Ionization/protonation constant ( $pK_a$ ), solubility and lipophilicity ( $\log P_{o/w}$ ) are among the most important physicochemical parameters that define drugs with good oral absorption. These parameters also define prediction of ADME behaviour of drug candidates.

In this thesis, retention behaviour of benzimidazole and imidazole functional group carrying anthelmintic and antifungal drug molecules (albendazole, astemizole, mebendazole, thiabendazole, clotrimazole, methimazole (thiamazole) and metronidazole) was investigated with reversed phase liquid chromatographic method. Analyses were carried out with Kinetex Core-Shell C8 (Phenomenex, 150mm×2,6  $\mu$ m, 4,6 mm) column for six compounds and Kinetex Core-Shell EVO C18 (Phenomenex, 250mm × 4,6 mm, 5  $\mu$ m) column for methimazole with 0,8 mL/minute flow rate at 25 °C. By using the data obtained from these chromatographic analyses,  $pK_a$  values of the compounds were determined experimentally at different acetonitrile-water concentrations.

Two other physicochemical properties, the solubility and lipophilicity values, were calculated using Abraham solute descriptors. Using these solute descriptors, the transport of drug molecules through the blood brain barrier was also calculated.

In the developed chromatographic method, it is aimed to perform the analysis of the compounds as soon as possible and to obtain symmetrical peaks of the compounds. For this purpose, optimum separation condition was determined. Method validation has been performed to prove the validity of the developed RPLC method and the parameters proposed by ICH were tested and the performance and reliability of the method were evaluated.

**Keywords:**  $pK_a$ , reversed phase liquid chromatography, physicochemical parameters, Abraham solute descriptors, validation.

2019, 265 pages

## TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda beni yönlendiren, zamanı iyi kullanma ve dakikliği ile beni her zaman etkileyen Danışman Hocam Sayın Ebru ÇUBUK DEMİRALAY'a teşekkürlerimi sunarım. Bilim ışığının tekrar içimde oluşmasını sağlayan ve laboratuvar imkanlarından faydalanmama izin veren Sayın Prof. Dr. A. Güleren ALSANCAK'a saygılarımı sunarım.

Sevgili arkadaşım Sayın Serdar AYDIN'a her zamanki ışığı ve umudu için minnettarım. Sevgili arkadaşım İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Öğretim Görevlisi Dr. Zübeyde BÜLBÜL'e tüm iyi kalbi ve desteği için teşekkürlerimi sunarım.

ÖYP-05234-Dr-2013 Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Öğretim Üyesi Yetiştirme Programı Koordinatörlüğü'ne teşekkür ederim.

5020-ÖYP-D2-17 no'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Yönetim Birimi Başkanlığı'na teşekkür ederim.

TÜBİTAK 2211-A Genel Yurtiçi Doktora Burs Programı 2014/2 ile tezimi destekleyen TÜBİTAK'a teşekkürlerimi sunarım.

Doğruluğu ve çalışmayı ilke edinen Sevgili Anne ve Babama tüm kalbimle sevgi, saygı ve minnetlerimi sunarım.

Kader POTURCU  
ISPARTA, 2019

## ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Benzimidazolün kimyasal yapısı .....	2
Şekil 1.3. Benzimidazol molekülünün A) asidik ve B) bazik koşullar altında iyonlaşma dengesi .....	2
Şekil 1.3. Albendazolün kimyasal yapısı .....	3
Şekil 1.4. Albendazol ve üç ana metabolitinin kimyasal yapısı .....	5
Şekil 1.5. Albendazolün iyonlaşmasında pH etkisi .....	6
Şekil 1.7. Astemizolün kimyasal yapısı.....	8
Şekil 1.7. Mebendazolün kimyasal yapısı .....	10
Şekil 1.9. Mebendazolün amino-imino tautomerleri .....	11
Şekil 1.9. Tiyabendazolün kimyasal yapısı .....	12
Şekil 1.10. İmidazolün kimyasal yapısı .....	13
Şekil 1.11. İmidazol molekülünün A) asidik ve B) bazik koşullar altında iyonlaşma dengesi .....	14
Şekil 1.12. Histidinin kimyasal yapısı .....	14
Şekil 1.13. Ergosterol biyosentezi ve bu sürece antifungallerin etkisi .....	16
Şekil 1.15. Klotrimazolün kimyasal yapısı .....	18
Şekil 1.15. Metimazolün kimyasal yapısı.....	19
Şekil 1.16. Metimazolün tautomerik formları .....	20
Şekil 1.18. Metronidazolün kimyasal yapısı.....	22
Şekil 1.18. Klasik kolon kromatografisinin şematik gösterimi .....	23
Şekil 1.19. Ayırma prensibine göre sıvı kromatografinin şematik gösterimi.....	27
Şekil 1.20. Ters faz sıvı kromatografide kullanılan durgun faz çeşitleri .....	29
Şekil 1.21. a) Apolar çözünen ile durgun fazın etkileşimi b) Polar çözünen ile mobil fazın etkileşimi .....	29
Şekil 1.22. Monosüstitüe benzen bileşiklerinin alıkonması üzerine farklı süstitüentlerin etkisi .....	30
Şekil 1.23. Mobil faz pH'ına bağlı olarak bazik analitin alıkonma davranışı	31
Şekil 1.24. Mobil faz pH'ına bağlı olarak asidik analitin alıkonma davranışı	32
Şekil 1.25. NaCl'de iyonik bağın gösterimi.....	33
Şekil 1.26. a) Kovalent bağın ve b) Polar kovalent bağın gösterimi.....	34
Şekil 1.27. Metallerde elektron denizi modeli .....	34
Şekil 1.29. Birbirine bağlı atomlar arasındaki elektronegatiflik farkı ve % iyonik karakter ile bağ türündeki değişimler .....	35
Şekil 1.30. Molekül içi etkileşimler (Kovalent bağ) ile moleküller arası etkileşimlerin gösterimi .....	36
Şekil 1.30. London dağılıma kuvvetlerinin şematik gösterimi .....	37
Şekil 1.31. a) Katı ACN'de b) Sıvı ACN'de dipol-dipol etkileşimleri .....	38
Şekil 1.32. RPLC'de çözünenin alıkonmasına katkı sağlayan molekül içi etkileşimler.....	39
Şekil 1.33. a) Silika jelin yapısı, b) Baz hidrolizine karşı dayanıklı silika (silisyum atomları arasında oksit köprüleri yerine etilen köprüleri içerir).....	40
Şekil 1.34. Silika yüzeyin kovalent olarak modifiye edilmesi.....	41
Şekil 1.35. a) Kalıntı silanol gruplarının bulunduğu silika yüzey b) End-capping yapılan silika yüzey .....	41

Şekil 1.36. Analitin ve kolonda tutunmayan türün alıkonma zamanı .....	46
Şekil 1.37. Pik genişliğinin ve yarı yükseklikteki pik genişliğinin gösterimi	50
Şekil 1.38. Eddy difüzyonunun şematik gösterimi .....	51
Şekil 1.39. Boyuna difüzyonun şematik gösterimi.....	52
Şekil 1.40. Van Deemter Eşitliği.....	53
Şekil 1.41. Mobil faz pH'ındaki küçük değişimlerin ayırmaya etkisi .....	54
Şekil 1.42. Seçiciliğin şematik olarak gösterimi.....	55
Şekil 1.43. Etkinlik ve seçiciliğin ayırma üzerine etkisi.....	56
Şekil 1.44. Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazının şematik gösterimi.....	57
Şekil 1.45. Core shell parçacıkların şematik gösterimi. ....	59
Şekil 1.46. Core-shell parçacıkların farklı tiplerinin şematik gösterimi .....	60
Şekil 1.47. Yüksek hızlı HPLC ayırmalarında parçacık tipleri .....	61
Şekil 1.48. HPLC'nin yüksek basınçlı piston pompası .....	62
Şekil 1.49. İlaç araştırma süreçlerinin aşamaları .....	63
Şekil 1.50. Biyofarmasötik sınıflandırma sistemi (BCS).....	66
Şekil 1.51. Zayıf asitin iyonlaşmasının Bronsted ve Lowry asit-baz tanımına göre gösterimi .....	67
Şekil 1.52. pKa'nın altındaki ve üstündeki pH değerlerinde asidik ve bazik bileşiklerin nötral ve iyonik türleri için derişiminin gösterilmesi. .....	68
Şekil 1.53. İlaçların içerdikleri fonksiyonel gruba göre mevcut yüzdeleri....	69
Şekil 1.54. pKa'nın diğer fizikokimyasal özelliklere etkisi ve diğer parametreler ile ilişkisi.....	70
Şekil 1.55. pKa'sı 5 olan asidik bileşiğin permeabilite ve çözünürlüğünün gösterimi.....	71
Şekil 1.56. Amonyak, primer, sekonder ve tersiyer aminlerin gösterimi .....	72
Şekil 1.57. Primer, sekonder ve tersiyer amin örnekleri .....	73
Şekil 1.58. Yaygın olarak bilinen dört arilaminin kimyasal yapısı .....	73
Şekil 1.59. Heterosiklik amin örnekleri.....	74
Şekil 1.60. NH <sub>3</sub> 'ün üçgen piramit şeklinin gösterimi .....	75
Şekil 1.61. Bazı heterosiklik bileşiklerin sudaki pKa değerleri .....	76
Şekil 1.62. Amin grubu taşıyan bileşiklerin pKa değerlerinin karşılaştırılması-1 .....	78
Şekil 1.63. Amin grubu taşıyan bileşiklerin pKa değerlerinin karşılaştırılması-2.....	79
Şekil 1.64. Gaz fazdan suya, gaz fazdan çözücüye ve sudan çözücüye çözünen molekülün transferi.....	85
Şekil 1.65. Solvasyon süreci modeli.....	87
Şekil 1.66. a) İntermoleküler (moleküller arası) b) Intramoleküler (molekül içi) H bağı.....	93
Şekil 1.67. Çözücü ve çözünen moleküller arasında tercih edilen ve edilmeyen etkileşimler .....	95
Şekil 1.68. İlaç araştırma ve geliştirme süreçleri .....	99
Şekil 1.69. İlaç araştırmalarındaki stratejiler .....	99
Şekil 1.70. Gastrointestinal boşluğun şematik gösterimi.....	100
Şekil 1.71. Hücre zarının yapısı.....	108
Şekil 1.72. Bazık yapıdaki ilaç molekülünün n-oktanol ve su arasındaki dağılımının gösterimi .....	109

Şekil 1.73. Kan beyin bariyeri .....	114
Şekil 1.74. Kan beyin bariyerindeki yolaklar .....	115
Şekil 1.75. Doğruluk ve kesinliğin şematik gösterimi.....	123
Şekil 1.76. Kalibrasyon grafiğinin gösterimi .....	124
Şekil 1.77. Aralığın gösterimi .....	125
Şekil 1.78. HPLC'de sinyal ve gürültünün şematik gösterimi .....	126
Şekil 4.1. A) %35 (v/v) B) %40 (v/v) C) %45 (v/v) ACN içeren ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımlarında albendazolün deneysel ve hesaplanan log <sub>TR</sub> ilişkisini gösteren grafikler .....	160
Şekil 4.2. A) %35 (v/v) B) %40 (v/v) C) %45 (v/v) ACN içeren ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımlarında albendazolün pH-alıkonma zamanı ilişkisi.....	162
Şekil 4.3. A ve B %35 (v/v); C ve D %40 (v/v); E ve F %45 (v/v) ACN içeren ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımlarında astemizolün deneysel ve hesaplanan log <sub>TR</sub> ilişkisini gösteren grafikler .....	166
Şekil 4.4. A %35 (v/v); B %40 (v/v); C %45 (v/v) ACN içeren ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımlarında astemizolün pH-alıkonma zamanı ilişkisi.....	168
Şekil 4.5. A) %35 (v/v) B) %40 (v/v) C) %45 (v/v) ACN içeren ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımlarında mebendazolün deneysel ve hesaplanan log <sub>TR</sub> ilişkisini gösteren grafikler .....	171
Şekil 4.6. A) %35 (v/v) B) %40 (v/v) C) %45 (v/v) ACN içeren ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımlarında mebendazolün pH-alıkonma zamanı ilişkisi.....	172
Şekil 4.7. A) %15 (v/v) B) %20 (v/v) C) %25 (v/v) ACN içeren ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımlarında tiyabendazolün deneysel ve hesaplanan log <sub>TR</sub> ilişkisini gösteren grafikler .....	175
Şekil 4.8. A) %15 (v/v) B) %20 (v/v) C) %25 (v/v) ACN içeren ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımlarında tiyabendazolün pH-alıkonma zamanı ilişkisi.....	176
Şekil 4.9. A) %35 (v/v) B) %40 (v/v) C) %45 (v/v) ACN içeren ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımlarında klotrimazolün deneysel ve hesaplanan log <sub>TR</sub> ilişkisini gösteren grafikler .....	179
Şekil 4.10. A) %35 (v/v) B) %40 (v/v) C) %45 (v/v) ACN içeren ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımlarında klotrimazolün pH-alıkonma zamanı ilişkisi.....	181
Şekil 4.11. %100 su ortamında metimazolün deneysel ve hesaplanan log <sub>TR</sub> ilişkisini gösteren grafikler .....	183
Şekil 4.12. %100 su ortamında metimazolün deneysel ve hesaplanan log <sub>TR</sub> ilişkisini gösteren grafikler .....	184
Şekil 4.13. A) %15 (v/v) B) %20 (v/v) C) %25 (v/v) ACN içeren ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımlarında metronidazolün deneysel ve hesaplanan log <sub>TR</sub> ilişkisini gösteren grafikler .....	186
Şekil 4.14. A) %15 (v/v) B) %20 (v/v) C) %25 (v/v) ACN içeren ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımlarında metronidazolün pH-alıkonma zamanı ilişkisi.....	188
Şekil 4.15. Albendazol için YS ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen grafik.....	190
Şekil 4.16. Astemizolün <i>wwpKasu1</i> değeri için YS ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen grafik.....	191

Şekil 4.17. Astemizolün $w_{wp}K_{su2}$ değeri için YS ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen grafik.....	191
Şekil 4.18. Mebendazol için YS ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen grafik.....	192
Şekil 4.19. Tiyabendazol için YS ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen grafik.....	192
Şekil 4.20. Klotrimazol için YS ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen grafik.....	193
Şekil 4.21. Metronidazol için YS ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen grafik.....	193
Şekil 4.22. Albendazol için $\chi_{ACN-pK_a}$ grafiği .....	194
Şekil 4.23. Astemizolün su ortamındaki $pK_{a1}$ değeri için $\chi_{ACN-pK_a}$ grafiği.....	195
Şekil 4.24. Astemizolün ikinci $pK_{a2}$ değeri için $\chi_{ACN-pK_a}$ grafiği .....	195
Şekil 4.25. Mebendazol için $\chi_{ACN-pK_a}$ grafiği .....	196
Şekil 4.26. Tiyabendazol için $\chi_{ACN-pK_a}$ grafiği.....	196
Şekil 4.27. Klotrimazol için $\chi_{ACN-pK_a}$ grafiği .....	197
Şekil 4.28. Metronidazol için $\chi_{ACN-pK_a}$ grafiği.....	197
Şekil 4.29. Optimum ayırma koşulunda elde edilen kromatogramlar .....	202
Şekil 4.30. Albendazol, mebendazol ve klotrimazolün kalibrasyon grafikleri. ....	204
Şekil 4.31. A) Klotrimazol içeren Canesten krem analizine ait kromatogram 1-klotrimazol; 2-dikloksasilin (IS) B) Mebendazol içeren Vermazol tabletine ait kromatogram 1-mebendazol 2-albendazol (IS) C) Albendazol içeren Andazol tabletine ait kromatogram 1-albendazol 2- klotrimazol (IS).....	206
Şekil 5.1. Abraham çözünen tanımlayıcıları ve SwissADME programından elde edilen $\log P_o/w$ değerlerinin uyumu.....	218
Şekil 5.2. Abraham çözünen tanımlayıcıları ve SwissADME programından elde edilen $\log S$ değerlerinin uyumu.....	219



## ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1. RPLC'de kullanılan organik modifiyerlerin bazı özellikleri .....	42
Çizelge 1.2. RPLC'de kullanılan tamponlar ve özellikleri .....	43
Çizelge 1.3. HPLC'de kullanılan organik çözücülerin özellikleri .....	45
Çizelge 1.4. Williams ve Dünya ilaç endeksinin verilerine göre asit ve bazların yüzdesi .....	69
Çizelge 1.5. Aminlerin fiziksel özellikleri .....	75
Çizelge 1.6. pK <sub>a</sub> tahmininde kullanılan kompütasyonel yaklaşımlar .....	79
Çizelge 1.7. Tezde çalışılan bileşikler için SPARC'dan elde edilen pK <sub>a</sub> değerleri .....	80
Çizelge 1.8. Abraham çözünen tanımlayıcıları .....	87
Çizelge 1.9. Çeşitli bazıklığa sahip çözünenler için H bağı bazlığı .....	94
Çizelge 1.10. Mono, di ve triprotik moleküller için kullanılan pH-çözünürlük eşitlikleri .....	106
Çizelge 1.11. Tezde çalışılan bileşiklerin Abraham çözünen tanımlayıcıları .....	113
Çizelge 1.12. Validasyon parametreleri ve yer aldığı protokoller .....	119
Çizelge 1.13. Sistem uygunluk testi (SUT) için geçerli parametreler ve değerleri .....	129
Çizelge 2.1. Benzimidazolün literatürden elde edilen pK <sub>a</sub> değerleri .....	130
Çizelge 2.2. İmidazolün literatürden elde edilen pK <sub>a</sub> değerleri .....	131
Çizelge 2.3. Benzimidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen pK <sub>a</sub> değerleri .....	131
Çizelge 2.4. İmidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen pK <sub>a</sub> değerleri .....	133
Çizelge 2.5. Benzimidazolün literatürden elde edilen logP <sub>o/w</sub> değerleri .....	136
Çizelge 2.6. İmidazolün literatürden elde edilen logP <sub>o/w</sub> değerleri .....	136
Çizelge 2.7. Benzimidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen logP <sub>o/w</sub> değerleri .....	136
Çizelge 2.8. İmidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen logP <sub>o/w</sub> değerleri .....	137
Çizelge 2.9. Benzimidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen çözünürlük değerleri .....	138
Çizelge 2.10. İmidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen çözünürlük değerleri .....	140
Çizelge 2.11. Validasyon çalışması ve sistem uygunluk testleri ile elde edilen sonuçlar .....	141
Çizelge 2.12. Av köpeği ve maymun plazmasında gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri .....	142
Çizelge 2.13. Albendazol ve albendazol sülfoksit için elde edilen gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri .....	144
Çizelge 2.14. Metronidazol ve mikonazol nitratın doğrusal regresyon analizi ile ilgili sonuçlar .....	145
Çizelge 3.1. Tezde çalışılan bileşikler ve bazı özellikleri .....	146
Çizelge 3.2. Kromatografik çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve kullanım amaçları .....	148

Çizelge 4.1. Bileşiklerin Chemicalize programı ile hesaplanan pKa Değerleri .....	157
Çizelge 4.2. %35 (v/v) ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımında albendazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri.....	159
Çizelge 4.3. %40 (v/v) ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımında albendazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri .....	159
Çizelge 4.4. %45 (v/v) ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımında albendazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri.....	160
Çizelge 4.5. %35 (v/v) ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımında astemizol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri.....	163
Çizelge 4.6. %40 (v/v) ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımında astemizol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri.....	164
Çizelge 4.7. %45 (v/v) ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımında astemizol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri.....	165
Çizelge 4.8. %35 (v/v) ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımında mebendazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri.....	169
Çizelge 4.9. %40 (v/v) ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımında mebendazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri.....	170
Çizelge 4.10. %45 (v/v) ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımında mebendazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri .....	170
Çizelge 4.11. %15 (v/v) ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımında tiyabendazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri .....	173
Çizelge 4.12. %20 (v/v) ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımında tiyabendazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri .....	174
Çizelge 4.13. %25 (v/v) ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımında tiyabendazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri .....	174
Çizelge 4.14. A) %15 (v/v) B) %20 (v/v) C) %25 (v/v) ACN içeren ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımlarında klotrimazolün pH-alıkonma zamanı ilişkisi.....	177
Çizelge 4.15. %40 (v/v) ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımında klotrimazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri .....	178
Çizelge 4.16. %45 (v/v) ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımında klotrimazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri .....	178
Çizelge 4.17. %100 su ortamında metimazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri.....	182
Çizelge 4.18. %100 su ortamında metimazolün deneysel ve hesaplanan log <sub>T<sub>R</sub></sub> ilişkisini gösteren grafikler .....	184
Çizelge 4.19. %20 (v/v) ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımında metronidazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri .....	185
Çizelge 4.20. %25 (v/v) ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımında metronidazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri .....	185
Çizelge 4.21. Tezde çalışılan bileşiklerin Abraham çözünen tanımlayıcıları	198
Çizelge 4.22. Albendazol ve klotrimazol için optimum ayırma koşuluna ait değerler .....	201
Çizelge 4.23. Mebendazol ve albendazol için optimum ayırma koşuluna ait değerler .....	201
Çizelge 4.24. Klotrimazol ve dikloksasilin için optimum ayırma koşuluna ait değerler .....	201

Çizelge 4.25. Bileşiklere ait kalibrasyon fonksiyonları, doğrusal aralıklar, LOD ve LOQ değerleri .....	203
Çizelge 4.26. Bileşiklere ait gün içi ve günlerarası değerlendirme sonuçları.....	205
Çizelge 4.27. İlaç formülasyonlarının içerdikleri etken madde miktarı ve geri kazanım sonuçları .....	206
Çizelge 5.1. Albendazol, mebendazol, klotrimazol, metronidazol ve tiyabendazol için hesaplanmış, termodinamik pK <sub>a</sub> değerleri ....	208
Çizelge 5.2. Astemizol için hesaplanmış, termodinamik pK <sub>a1</sub> ve pK <sub>a2</sub> değerleri .....	209
Çizelge 5.3. Metimazol için su ortamındaki hesaplanmış pK <sub>a</sub> değeri .....	209
Çizelge 5.4. Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle albendazolün pK <sub>a</sub> değeri için elde edilen değerler .....	210
Çizelge 5.5. Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle mebendazolün pK <sub>a</sub> değeri için elde edilen değerler .....	210
Çizelge 5.6. Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle klotrimazolün pK <sub>a</sub> değeri için elde edilen değerler .....	211
Çizelge 5.7. Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle tiyabendazolün pK <sub>a</sub> değeri için elde edilen değerler .....	211
Çizelge 5.8. Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle metronidazolün pK <sub>a</sub> değeri için elde edilen değerler .....	211
Çizelge 5.9. Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen astemizolün pK <sub>a1</sub> değerleri.....	211
Çizelge 5.10. Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen astemizolün pK <sub>a2</sub> değerleri .....	212
Çizelge 5.11. Albendazol, astemizol, mebendazol ve klotrimazol için $\chi_{ACN}$ -pK <sub>a</sub> değerleri .....	212
Çizelge 5.12. Tiyabendazol ve metronidazol için $\chi_{ACN}$ -pK <sub>a</sub> değerleri .....	212
Çizelge 5.13. 25°C'de deneysel olarak elde edilen pK <sub>a</sub> değerleri kullanılarak hesaplanan 37°C'de ACN-H <sub>2</sub> O ikili karışımlarında ve sudaki pK <sub>a</sub> değerleri.....	214
Çizelge 5.14. Abraham çözünen tanımlayıcıları ve SwissADME programı kullanılarak hesaplanan logP <sub>o/w</sub> değerleri .....	217
Çizelge 5.15. Abraham çözünen tanımlayıcıları ve SwissADME programı kullanılarak elde edilen bileşiklerin sudaki çözünürlük değerleri .....	218
Çizelge 5.16. Abraham çözünen tanımlayıcıları kullanılarak bileşiklerin asetonitrildeki hesaplanan çözünürlük değerleri.....	219
Çizelge 5.17. Abraham çözünen tanımlayıcıları kullanılarak bileşiklerin hesaplanan logBB değerleri.....	220

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Tüm H bağı asitliği
ABZ-2-NH <sub>2</sub> SO <sub>2</sub>	Albendazol-2-amino-sülfon
ABZ-SO	Albendazol sülfoksit
ABZ-SO <sub>2</sub>	Albendazol sülfon
ACN	Asetonitril
ADME	Absorpsiyon, dağılma, metabolizma ve atılım
ADMET	Absorpsiyon, dağılma, metabolizma, atılım ve toksisite
APHA	Amerikan halk sağlığı birliği
AZT	Azidotimidin
B	Tüm H bağı bazlığı
BBB	Kan beyin bariyeri
BCS	Biyofarmasötik sınıflandırma sistemi
CADD	Bilgisayar destekli ilaç tasarımı
CE	Kapiler elektroforez
cGMP	Mevcut iyi üretim uygulamaları
CNS	Merkezi sinir sistemi
CV	Varyasyon katsayısı
CZE	Kapiler zone elektroforezi
Da	Dalton
DAD	Diode array dedektör
DMSO	Dimetilsülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
E	Aşırı molar kırılma
<i>Eag1</i>	<i>Eter a go-go 1</i> kanalları
FDA	Amerikan gıda ve ilaç kurumu
GC	Gaz kromatografi
GLC	Gaz sıvı kromatografi
GLP	İyi laboratuvar uygulamaları
GMP	İyi imalat teknikleri
GSE	Genel çözünürlük eşitliği
( <i>HERG</i> )K <sup>+</sup>	İnsan <i>Eter a go-go potasyum</i> kanalları
HH eşitliği	Henderson-Hasselbalch Eşitliği
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografi
HTS	Yüksek verimli tarama teknolojisi
I	Kovats'ın alıkonma indeksi
ICH	Uluslararası uyum konferansı
ISO/IEC 17025	Uluslararası standardizasyon örgütü/ uluslararası elektroteknik komisyonu
k	Kapasite faktörü
L	Gaz hegzadekan dağılma katsayısı
LC	Sıvı kromatografi
LOD	Tayin sınırı, gözlenebilme sınırı
log P <sub>e</sub>	Geçirgenlik
logk	Kapasite faktörünün logaritması
logP	Lipofilisite
logP <sub>o/w</sub> , logP	Oktan-ol-su dağılma katsayısı
logt <sub>(rel)</sub>	Bağıl alıkonma verileri

LOQ	Kantitatif tayin sınırı
LSER	Lineer solvasyon enerji ilişkisi
m	Kalibrasyon doğrusunun eğimi
M	Molar
MeOH	Metanol
MLR	Çoklu lineer regresyon
MR <sub>x</sub> :	Molar kırılma indisi
MSF	Minyatürize çalkalama metodu
N	Serbestlik derecesi
N	Teorik plaka sayısı
NDA	Ulusal ilaç uygulamaları
NP	Normal faz sıvı kromatografi
PIC/S	İlaç denetim işbirliği programı ve Avrupa
pK <sub>a</sub>	Asit-baz iyonlaşma sabiti
ppb	Milyarda bir
ppm	Milyonda bir
QSAR	Kantitatif yapı-aktivite ilişkisi
QSPR	Kantitatif yapı-özellik ilişkisi
r	Korelasyon katsayısı
r <sup>2</sup>	Tanımlayıcılık katsayısı
RPLC	Ters faz sıvı kromatografi
R <sub>s</sub>	Ayırma gücü
RSD	Bağıl standart sapma
S	Dipolarite/polarlanabilirlik
s	Numune standart sapması
S/G	Sinyal/gürültü oranı
SP	Bağımlı değişkenler
SUT	Sistem uygunluk testleri
T <sub>f</sub>	Kuyruklanma faktörü
THF	Tetrahidrofur
USP	Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi
V	McGowan'ın karakteristik hacmi
VAMCE	Vakum destekli multipleks kapiler elektroforez
WHO	Dünya Sağlık Örgütü
β	Beta
η	20 °C'de saf sıvı bileşiğin refraktif indeksi
σ	Popülasyon standart sapması
$\bar{x}_i$	Tekrar deneylerinden elde edilen ortalama değer
μ <sub>T</sub>	Doğru kabul edilen değer
μDISS	Miniaturized rotating disk dissolution cihazı
μg/mL	Mikrogram/mililitre

# 1. GİRİŞ

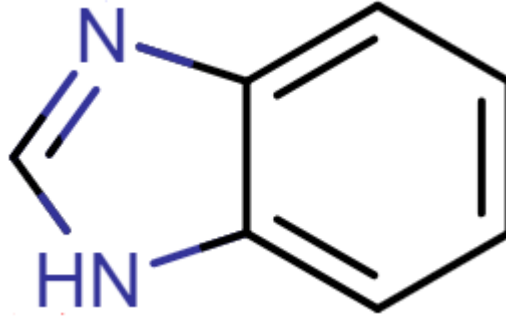
## 1.1. Anthelmintik İlaçlar/ Benzimidazoller

Brown ve arkadaşları tarafından gastrointestinal nematodlara (yuvarlak solucan) karşı güçlü aktiviteye sahip olan tiyabendazolün keşfi, geniş spektrumlu anthelmintik ajanlar olan benzimidazollerin veterinerlikte ve insanların medikal kullanımındaki gelişimine ışık tutmuştur. Test edilen yüzlerce türev arasında en çok terapötik kullanımı olan bileşikler, benzimidazol halka sisteminin 2 ve/veya 5 pozisyonunda modifikasyona sahip olanlardır. Benzimidazol halkası içeren albendazol, mebendazol ve tiyabendazol insan leishmania enfeksiyonlarının (şark çıbanı) tedavisi için yaygın şekilde kullanılmaktadır (Brunton vd., 2009).

Benzimidazollerin antifungal aktiviteleri bulunduğu halde insan mikozlarında (mantar enfeksiyonlarında) klinik kullanımı kısıtlıdır. Bu grupta bulunan ilaçlar suda az çözünürler ve çözünürlüklerindeki küçük değişiklikler ilacın emilimini büyük oranda etkiler. Benzimidazol grubu içeren ilaçların üstün güvenlik profilleri bulunmaktadır.

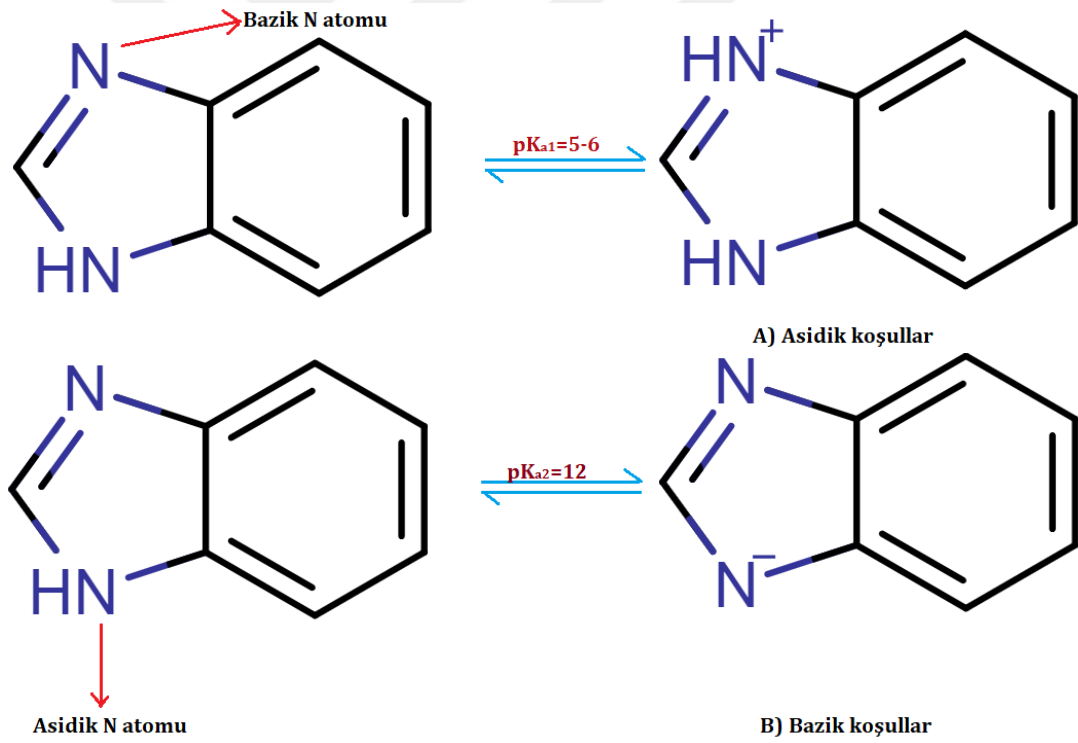
Bugüne kadar milyonlarca çocuk, solucan kemoterapi programlarında topluca tedavi edilmiştir. Yan etkilerin insidansı öncelikle ılımlı gastrointestinal semptomları tedavi edilen çocukların sadece %1'inde ortaya çıkmıştır (Brunton vd., 2009). Benzimidazollerin kullanımında sadece 2 yaş altındaki çocuklarda yan etkilerin olabileceğine dair veriler bulunmaktadır. Benzimidazol grubu ilaçlar klinik olarak diğer ilaçlarla daha az etkileşmektedir.

Benzimidazollerin kimyasal yapısına yapısına bakıldığında, heterosiklik imidazol halkasının 4 ve 5 pozisyonunda kaynaşmış benzen halkası içeren bisiklik halka sistemleridir (Şekil 1.1) (Chen vd., 2010).



Şekil 1.1. Benzimidazolün kimyasal yapısı

Benzimidazollerin iyonlaşma davranışı incelendiğinde benzimidazol halkasıyla kaynaşmış durumda olan imidazolün iki N atomunun protonasyonu/deprotonasyonu ile ilgili olarak iki iyonlaşma sabiti değeri mevcuttur (Şekil 1.2) (Danaher vd., 2007).

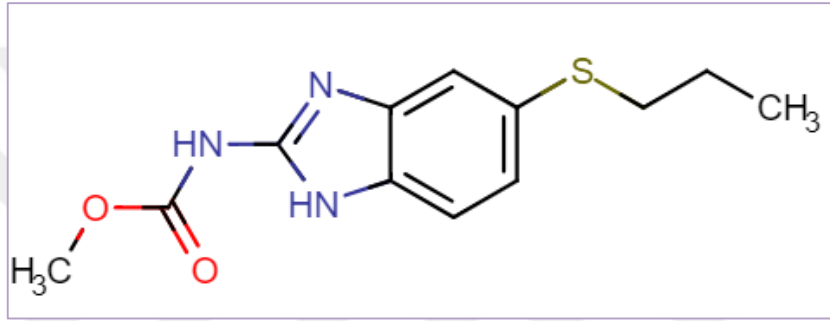


Şekil 1.2. Benzimidazol molekülünün A) asidik ve B) bazik koşullar altında iyonlaşma dengesi (Danaher vd., 2007)

Tez kapsamında seçilmiş olan benzimidazol ve imidazol grubu bileşikler ile ilgili kapsamlı bilgi aşağıdaki bölümlerde verilmiştir.

### 1.1.1. Albendazol

Parazitik helmintik enfeksiyonlar dünya çapında hastalık ve ölümlerin en önemli nedenleri arasındadır. Bu enfeksiyonların tedavisi için Dünya Sağlık Örgütü'nün zaruri ilaçlar listesinin anthelmintik ilaçlar sınıfında albendazol bulunmaktadır (WHO Model List of Essential Medicines, 2017). Albendazol, metil N-(6-propilsülfanil-1H-benzimidazol-2-il) karbamat (Şekil 1.3), 1979'da patenti alınan, tıpta ve veterinerlik uygulamalarında kullanılan, etkili, geniş spektrumlu aktiviteye sahip anthelmintik ajandır (Cook, 1990; Horton, 2000).



Şekil 1.3. Albendazolün kimyasal yapısı (Chemicalize, 2018)

Albendazol, bağırsak boşluğunda veya vücut dokularında bulunan kıl kurdu, yuvarlak solucan (Askaris, trişirünyaz, strongiloidiyaz) ve bağırsak kurdu (*Echinococcus granulosus*, domuz tenyası larvalarının neden olduğu nörosistiserkoz, köpek tenyasının neden olduğu karaciğer, akciğer ve karın zarı hidatik kist hastalıkları) gibi helmint fonksiyonlarının azaltılmasında veya yok edilmesinde kullanılan benzimidazol karbamat türevi ilaçtır (Prochazkova vd., 2000; Rosenthal, 2012).

Albendazolün etki mekanizmasına bakıldığında, intestinal helmintlere maruz kalan farklı türlere albendazol ile müdahale edildiğinde parazitin farklı bölgelerinde metabolik yıkım gerçekleştiği deneysel olarak gözlemlenmiştir (Horton, 2000). Benzimidazol grubu bileşikler için en yaygın metabolik yıkım yolağı, sitoplazmik mikrotübül sentezinin inhibisyonuna dayanan  $\beta$ -tübülün depolimerizasyonudur (Lacey, 1988). Bu depolimerizasyonla helmintin glikoz alımına ve sindirim fonksiyonlarına zarar verilerek parazit yok edilir (Kulik vd.,



2011). Yapılan çalışmalarda, albendazolün sadece bağırsakta yaşayan olgun helmintleri öldürmediği, aynı zamanda bu helmintlerin yumurtalarını ve larvalarını da öldürdüğü görülmüştür (Maisonneuve vd., 1985).

Kistik ekinokokkoz (kist hidatik) insanlarda *Echinococcus granulosus*'un neden olduğu bir rahatsızlıktır. İnsan ve hayvan sağlığının yanı sıra, sebep olduğu ekonomik kayıplar nedeniyle dünyanın birçok bölgesinde ve ülkemizde halk sağlığı problemi olarak ortaya çıkmaktadır. Ülkemizde veteriner kontrolü olmadan kesilen hayvanların kistli karaciğerlerinin köpeklere yedirilmesi sonucu köpekler, gerek insanlar gerekse diğer hayvanlar için enfeksiyon kaynağı haline gelmektedir. Bu hastalığın tedavisinde benzimidazol grubu anthelmintiklerden albendazol kullanılmaktadır (Türkiye Hidatidoloji Derneği, 1999).

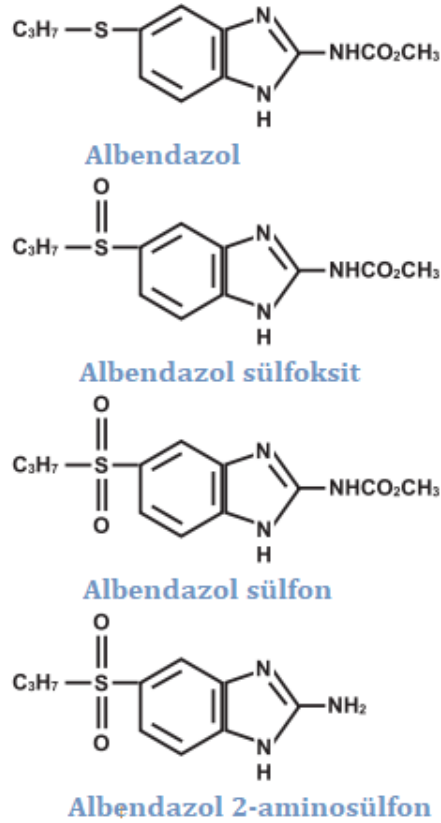
Gelişmekte olan ülkelerde nörosistiserkoz, helmintlerden kaynaklanan, ciddi sağlık problemlerine neden olan çok yaygın bir sinir sistemi rahatsızlığıdır (Takayanagui vd., 2004). Bu rahatsızlığa müdahalede 20 yıldan daha uzun süredir albendazol ve praziquantel kullanılmaktadır. Albendazol tedavide daha etkili olmasına rağmen, bazı hastalarda albendazol kullanımından sonra hastalık tekrarlayabilmektedir. Bu durumda ikili ilaç kombinasyonları tercih edilmektedir (Palomares vd., 2006).

Albendazol anthelmintik özelliğinin yanında anti-kanser ilacı olarakta yaygın şekilde kullanılmaktadır (Kim vd., 2012).

Lösemi en yaygın karşılaşılan kanser hastalıklarından biridir ve bu hastalığa yakalanan hastaların üçte birinde ilaca direnç gelişmesinden dolayı ölüm gerçekleşmektedir. Bu kanser türünün tedavisinde tübülün/mikrotübül sistemini hedef alan ilaçların kullanımı yaygındır.  $\beta$ -tübüline bağlanarak polimerizasyonu engelleyen ve en güvenilir  $\beta$ -tübülün inhibe edici ajanlar arasında yer alan albendazol, lösemi hücrelerinin çoğalmasının önlenmesinde oldukça etkilidir (Khalilzadeh vd., 2007). Buna ek olarak, albendazol hepatoselüler karsinoma hücrelerinin çoğalmasını önlemede (Pourgholami vd.,

2001), kolorektal (Pourgholami vd., 2005) ve yumurtalık kanserlerinin (Pourgholami vd., 2006) tedavisinde de kullanılmaktadır.

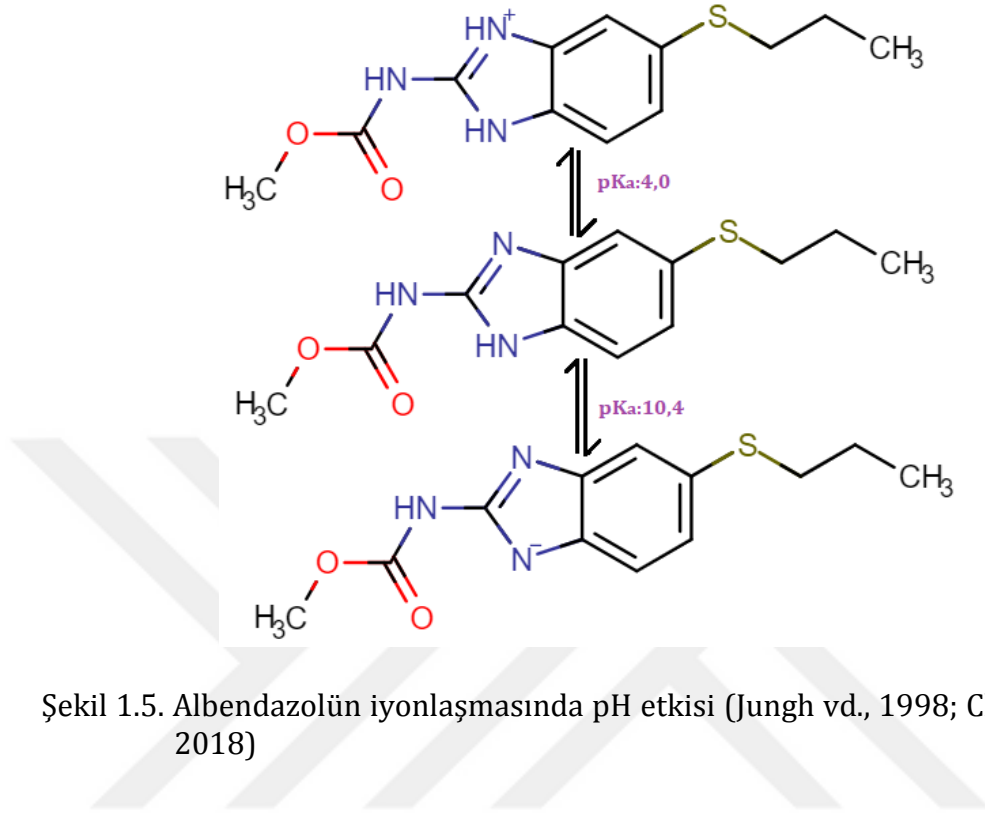
Albendazol karaciğerdeki hepatik mikrosomal sitokrom P-450 enzimleri tarafından ilk olarak albendazol sülfoksit (ABZ-SO) metabolize edilir. Albendazol sülfoksit, gut florası tarafından tersinmez olarak yükseltgenerek albendazol sülfona (ABZ-SO<sub>2</sub>) dönüşür (Lanusse vd., 1992). Albendazol sülfonun karbamat grubu deasetillenerek polar ve inaktif metabolit olan albendazol-2-amino-sülfona (ABZ-2-NH<sub>2</sub>SO<sub>2</sub>) dönüştürülür (Şekil 1.4). Albendazol ve albendazol sülfoksit biyolojik olarak aktif metabolit olmasına rağmen, albendazol sülfon inaktif metabolittir (Dominguez vd., 1995). Albendazol gibi albendazol sülfoksitte önemli anthelmintik aktiviteye sahip bileşiktir (Shaik vd., 2003).



Şekil 1.4. Albendazol ve üç ana metabolitinin kimyasal yapısı (Carlsson vd., 2011)

Albendazolün iyonlaşma davranışı incelendiğinde bu bileşik amfoterik özelliktedir. Bileşiğin yaklaşık 10,4 olan pK<sub>a</sub> değeri ise benzimidazol halkasının

1 no'lu N atomuna ait değerdir; yaklaşık 4,0 olan pKa değeri benzimidazol halkasının 3 pozisyonundaki azotuna ait değerdir (Şekil 1.5) (Jungh vd., 1998).



Şekil 1.5. Albendazolün iyonlaşmasında pH etkisi (Jungh vd., 1998; Chemicalize, 2018)

### 1.1.2. Astemizol

Histamin Sir Henry Dale tarafından 1910'da keşfedilen L-histidin aminoasidinden histidin dekarboksilaz enzimi aracılığıyla sentezlenen biyojenik aminlerdir (Yanai vd., 2017). Histamin reseptörleri H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub>, H<sub>3</sub>, H<sub>4</sub> olarak dört alt gruba ayrılır, bunlar G protein çifti reseptörleri ailesine aittir (Leurs vd., 2002). Bu dört reseptör aracılığıyla çeşitli biyolojik fonksiyonlar gerçekleşir (Yanai vd., 2017).

Antihistaminler, histamini taklit ederek reseptör bölgelere bağlanan, doğal histaminin bu bölgelerle etkileşime girmesini engelleyen ve 1940'lardan beri alerjiyle mücadelede kullanılan kimyasallardır (Estelle vd., 2011). 1937'de ilk antihistamin sentezlenmiş ve bu antihistaminin insanlara toksik olduğu belirlenmiştir. Daha sonra sentezlenen pirilamin ve prometazin, antipsikotik ve antidepresan olarak birçok merkezi sinir sistemi ilacı için model haline gelmiştir

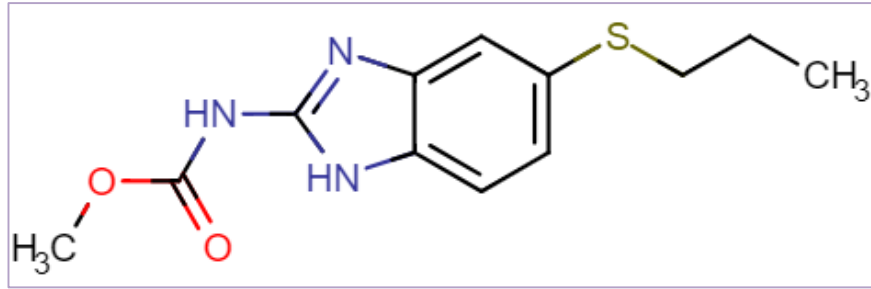
(Yanai vd., 2017). 1980 ve 1990 yılları arasında sentezlenen astemizol, benzimidazol grubuna sahip, alerjik rahatsızlıklarla mücadelede kullanılan, uzun süre etkili ikinci jenerasyon seçici H<sub>1</sub> antagonisti antihistaminik ilaçtır (Laduron vd., 1982; Back vd., 2015).

Astemizol, antihistaminik ilaç olarak geliştirilmesine rağmen voltaja duyarlı potasyum kanalları ailesine ait, transmembran protein olan *Eter a go-go 1* (*Eag1*) kanallarını (Warmke vd., 1994; Ludwig vd., 1994) bloke ettiği, hastalarda kalp ritim bozukluğu ve kardiyak aritmiden kaynaklı ani ölümlere neden olduğu (Genovese ve Spadaro, 1997; Zhou vd., 1999) gerekçesiyle 1999'da piyasadan kaldırılmıştır (Redfern vd., 2003; Izumi-Nakaseko vd., 2016).

*Ether à-go-go (Eag)*, *Human ether à-go-go related gene (HERG)*K<sup>+</sup> kanallarının çeşitli kanser hücrelerinde yüksek derecede ifade edildiği ve bu kanalların birinin bloke edilmesiyle kanserin çoğalmasının önlendiğinin araştırmacılar tarafından ortaya çıkartılması ile (García-Ferreiro vd., 2004) astemizol anti-kanser ilacı olarak yeniden dikkat çekmektedir (Izumi-Nakaseko, vd., 2016; de Guadalupe Chávez-López, vd., 2014; Garcia-Quiroz ve Camacho, 2011). Günümüzde astemizolün rahim boynu kanserini baskıladığı (de Guadalupe Chávez-López, vd., 2014) ve farelere üç hafta 50 mg/kg/gün olarak verildiğinde göğüs kanseri hücrelerinin gelişimini inhibe ettiği görülmüştür (García-Quiroz vd., 2014; Izumi-Nakaseko, vd., 2016). Ayrıca astemizolün sıtmaya müdahalede etkili olduğu bulunmuştur. Astemizolün, sıtmayla mücadelede kullanılan klorokin ile benzer mekanizmaya sahip olduğu ve hatta astemizolün klorokine dirençli parazitlere karşı bile etki gösterdiği yapılan çalışmalarda belirtilmektedir (Chong vd., 2006).

Astemizol (1-[(4-florofenil) metil]-N-{1-[2-(4-metoksifenil) etil] piperidin-4-il}-1H-1,3-benzodiazol-2-amin)'ün iyonlaşma davranışı incelendiğinde iki protonasyon bölgesine sahip (pK<sub>a1</sub>:5,6 ve pK<sub>a2</sub>: 8,5 (Fischer vd., 1998)) bir bileşiktir (Şekil 1.6). Bu bileşik oldukça lipofilik zayıf bazdır. Astemizolün protonlanmış formu yüklüdür ve hücre membranından geçemez;

protonlanmamış formu yüksüzdür ve hücre membranından geçer (García-Ferreiro vd., 2004).



Şekil 1.6. Astemizolün kimyasal yapısı (Chemicalize, 2018)

### 1.1.3. Mebendazol

Mebendazol, tıpta ve veterinerlikte çeşitli türdeki parazitik enfeksiyonlara müdahalede kullanılan, etkili, geniş spektrumlu anthelmintik özellik gösteren metil karbamat türevi ilaçtır (Dayan, 2003).

Benzimidazol karbamatın prototipi olan mebendazol 30 yıldan daha uzun bir süre önce yapılmış çalışmanın sonucu olarak intestinal helmint enfeksiyonlarından (Dawson ve Watson, 1985), *askaris* (silindir biçiminde, uçları ince, kahverengimsi sarı renkli, 25-35 cm uzunluğunda solucandır. Dışkıyla atılan yumurtalar toprakta bir yıl canlı kalabilir. Yumurta içindeki embriyo uygun çevre koşulları altında üç haftada yeterli olgunluğa erişir. Bu yumurtalar suyla, yıkanmadan çiğ yenen sebzelerle ya da topraktan ellere bulaşarak ve elden ağza geçerek sindirim sistemine girer), unsinarya (bağırsaklardaki kancalı kurt hastalığı), oksiyüriazis (kıl kurtlarının bağırsakta meydana getirdiği enfeksiyon) ve trikuriyaz'a (bağırsaktaki kamçı şeklindeki *Trichuris trichiura* yuvarlak solucanının neden olduğu hastalık) müdahalede oral yolla etkili şekilde kullanılır (Ghosh ve Brindisi, 2015). Mebendazol hızlı metabolize olduğundan ve absorpsiyonu sınırlı olduğundan sadece yüksek ve sürdürülen dozları sistemik enfeksiyonlara müdahalede etkilidir. (Horton, 1990).

Mebendazolün helmintler üzerine etkisine bakıldığında, nematod ve sestoda bu ilaçla müdahale edildiğinde canlıda zamana bağımlı gelişen morfolojik değişimler meydana gelir. Parazitik bağırsak kurdunun, intestinal hücrelerinin (sindirim sistemi) veya tegümental hücrelerinin (canlının vücudunu örten tabaka) sitoplazmik mikrotübülleri yok olur. Bu mikrotübüllerin yok olması ve akabinde salgı vaziküllerinin bloke olması ile hücre membranı bozulur ve bunun sonucunda besinlerin sindiriminde ve absorpsiyonunda azalma meydana gelir. Yani, mebendazol nematod ve sestodun *in vivo* ve *in vitro* glikoz alımını etkileyerek ATP aktivitesinde azalma yoluyla canlı üzerinde etkisini gösterir (Van Den Bossche, 1980; Al-Kurdi vd., 1999). Buna rağmen mebendazol, memelilerin tübülüne bağlandığında hayvanlara ve insanlara toksiktir. Daha da önemlisi, mebendazol memelilerde DNA (Deoksiribonükleik asit) hasarını aktive edebilir ve bu aktivasyonun memelilerde teratojen olduğu kanıtlanmıştır. Bunun sonucunda FDA (The United States Food and Drug Administration, Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu) tarafından mebendazolün hamilelikte kullanımı yasaklanmıştır. Besin üreten hayvanlarda da mebendazol kullanımında tedbirli olunmalıdır (Dayan, 2003; Xiao vd., 2017).

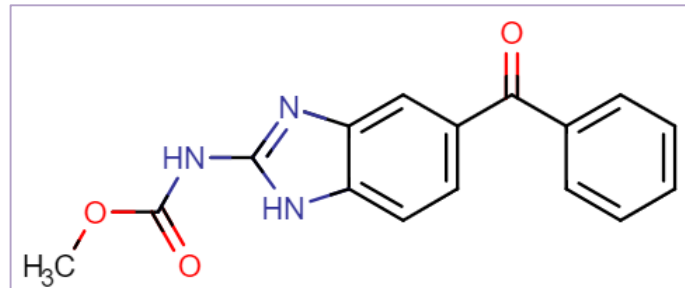
Maya benzeri patojen *Cryptococcus neoformans* immün sistemi baskılanmış bireylerde menenjit gibi ciddi beyin hasarlarına neden olmaktadır (Kwon-Chung vd., 2014). Mebendazol, *Cryptococcus neoformans*'ta biyofilm oluşumunu (bir yüzeye yapışarak kendi ürettikleri polimerik yapıda jelsi bir tabaka içinde yaşayan mikroorganizmaların oluşturduğu topluluk) engelleyip morfolojik değişimlere neden olarak antifungal aktivite gösterir (Joffe vd., 2017).

Kist hidatik hastalığı ülkemizde özellikle hayvanlarda çok yaygın olması nedeniyle, önemli halk sağlığı sorunlarına neden olan ve ciddi ekonomik kayıplara yol açan bir hastalıktır (T.C. Sağlık Bakanlığı, 2015). Kistik echinococcosis olarak bilinen bu hastalık *Echinococcus granulosus*'un neden olduğu, sıklıkla karaciğerde daha sonra akciğerde görülen parazitik rahatsızlıktır (Sheikhy vd., 2015). Erkeklerde özellikle cerrahi uzaklaştırma sırasında hidatik kistlere müdahale edildiğinde kistin dökülmesi durumunda

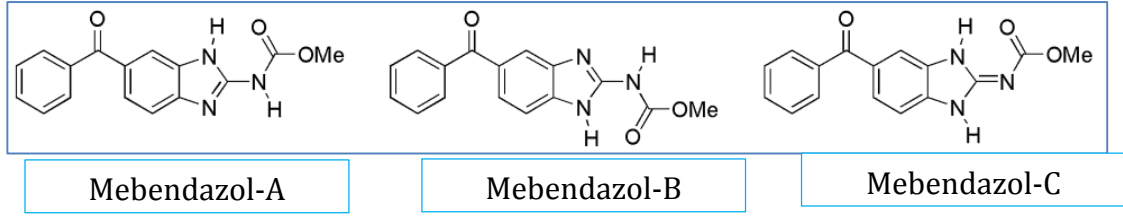
veya cerrahi olarak ulaşılamayan bölgelerde kist bulunduğunda mebendazol kemoteröpatik ajan olarak kullanılır (Heath ve Chevis, 1974; Bekhti vd., 1977).

Uzun süredir anthelmintik ilaç olarak kullanılan mebendazolün, son zamanlarda hayvan modellerinde hem merkezi sinir sistemi tümörlerinde hem de beyin tümörlerinde önemli teröpatik etkiye sahip olduğu görülmektedir (Bai vd., 2011; Bai vd., 2015a). Mebendazolün *in vivo* ve *in vitro* çalışmalarda mide kanserini de içeren farklı kanser hücrelerinin gelişimini inhibe ettiği kanıtlanmıştır (Mukhopadhyay vd., 2002; Doudican vd., 2008; Martarelli vd., 2008;. Bai vd., 2011; Pinto vd., 2015). Buna ek olarak tedaviye dirençli ve tedavisi güç kanser hastalıklarında da bu ilaç aktivite göstermektedir (Dobrosotskaya vd., 2011; Nygren ve Larsson, 2014) Mebendazolün anti-tümör aktivitesi birincil olarak tübülün ihibisyon yeteneğine dayanmaktadır; diğer mekanizmalar protein kinaz ihibisyonu, anti-anjiyogenez (kan damarları ağı oluşumunun engellenmesi) ve Hedgehog yolağının inhibisyonu'nu içermektedir (Bloma vd., 2017; Larsen vd., 2015).

Mebendazol ((metil N-(6-benzoil-1H-benzimidazol-2-il) karbamat)) biyofarmasötik sınıflandırma sisteminde (BCS) sınıf II'ye ait benzimidazol grubu anthelmintiktir (Şekil 1.7). Bu ilacın gastraintestinal boşluktan emilimi en fazla %5-10 düzeyindedir ve yağlı gıdalarla birlikte alındığında ilacın emilimi artmaktadır. İlaç amino-imino tautomerizmi gösterir ve 3 tane polimorfa sahiptir (A-C) (Şekil 1.8) (Calvo vd., 2016).



Şekil 1.7. Mebendazolün kimyasal yapısı (Chemicalize, 2018)



Şekil 1.8. Mebendazolün amino-imino tautomerleri (Calvo vd., 2016)

Mebendazolün düşük çözünürlüğü ve polimorflarının farklı çözünürlükleri farklı terapötik sonuçlara neden olmaktadır. A formunun çok düşük çözünürlüğü ilacın etkinliğinin kaybolmasına sebebiyet vermekte ve ilaç kullanılamamaktadır. B formu daha çok çözünür ve daha az karardır; fakat antikanser ve anthelmintik testlerde çok toksiktir (Rodriguez-Caabeiro vd., 1987; Bai vd., 2015b). C formu ise A formundan daha çok çözünür özelliğe sahip olduğundan ve en iyi ayrışma profili sergilediğinden tıpta ve veterinerlikte terapötik uygulamalar için daha çok tercih edilmektedir (Calvo vd., 2016).

#### 1.1.4. Tiyabendazol

Tiyabendazol başlangıçta anthelmintik ajan olarak sentezlenen, evcil hayvanlarda gastrointestinal nematodlara karşı iyi etkinlik gösterdiği ortaya çıkınca da veterinerlikte uygulanmaya başlanan benzimidazol türevi ilaçtır (Brown vd., 1961).

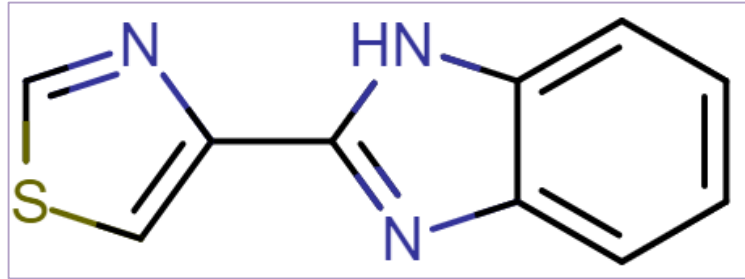
Bitkilerde bazı fungal hastalıkların kontrolünde etkili olduğundan antifungal ajan olarakta kullanılmaktadır (Davidse ve Flach, 1978). Günümüzde, uzun transfer süresi ve depolamadan kaynaklanan küf ve diğer bitki hastalıklarından meyve ve sebzeleri korumak için yaygın şekilde tercih edilir (Müller vd., 2014).

Trematodlar, sestodlar ve nematodlar olarak sınıflandırılan helmint enfeksiyonlarından olan *Strongyloides stercoralis*, insan nüfusunun büyük bir kısmını etkileyen intestinal nematoddur (Scowden vd., 1978). Strongiloidiyaz, *Strongyloides stercoralis*'ten kaynaklanan ve çoğunlukla tropikal ve subtropikal bölgelerde endemik olarak, Türkiye'de ise sınırlı sayıda görülen ve sıklıkla toprakla bulaşan bir hastalıktır (Grove, 1996; Kadılar vd., 2015). Enfeksiyon toprakta bulunan filariform larvalarının deriden girmesiyle oluşur.



Strongiloidiyaz birçok insanda kronik sağlık problemidir ve bu hastalığın temel belirtileri deride döküntü, ishalleri karın ağrısı, öksürük, hırıltılı solunum ve bağışıklık reaksiyonlarında rol oynayan eozonofil akyuvarlarının sayısındaki artış şeklinde görülür (Ardıç, 2009). Strongiloidiyaz sağlıklı kişilerde asemptomatik olabileceği gibi immün sistemi baskılanmış kişilerde ölümcül olabilmektedir Anthelmintiklerle bu hastalığa müdahale edildiğinde, Strongiloidiyaz müdahaleden en az etkilenen intestinal helmintiyazlardan biridir (Johnston vd., 2005). Anthelmintik ajan olarak görev yapan tiyabendazol insanda strongiloidiyaza müdahalede yaygın şekilde kullanılır (Grove, 1982). Bu ilaç birçok intestinal parazite karşı etkili olmasına rağmen, ilacın iştahsızlık, bulantı, halsizlik, baş dönmesi ve uyuklama gibi yan etkileri mevcuttur (Grove, 1982; Smith ve Reynard, 1992; Gann vd., 1994). Tiyabendazol vücuda girdikten sonra sindirim sisteminden hızlı şekilde absorplanmaktadır (Kapoor, 1987).

Tiyabendazol (4-(1H-benzimidazol-2-il)-1,3-tiyazol), 1961'de Merck laboratuvarlarında geliştirilen geniş spektrumlu biyolojik aktiviteye sahip bir benzimidazol bileşiğidir (Şekil 1.9) (Kapoor, 1987).



Şekil 1.9. Tiyabendazolün kimyasal yapısı (Chemicalize, 2018)

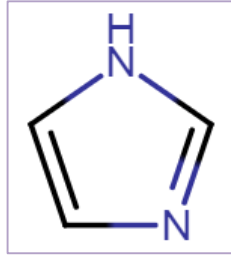
Tiyabendazol etilen köprüsü ( $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ ) aracılığıyla konjuge olur; çift bağı bir ucunda sübstituent olarak bir azot atomu, diğer ucunda yüksek yük yoğunluklu beş üyeli halka sistemi (tiyazol) mevcuttur. Bu yapı ilacın biyolojik aktivitesinden sorumludur (Canoira vd., 1989).

Tiyabendazol pH 7,0'de nötral halde bulunur.  $\text{pK}_a$  11,3 değeri benzimidazol halkasındaki 1 nolu N'a bağlı protonunun kaybıyla gerçekleşir ve anyonik tür oluşur. Proton NMR verileri asidik ortamda tiyabendazolün imidazol halkası

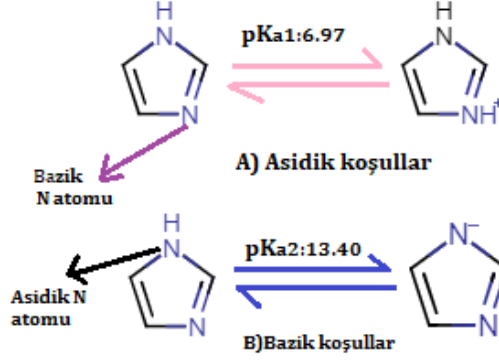
üzerinden protonlandığını gösterir. İmidazol halkasının protonlanması rezonans yapının oluşmasına izin verir. Protonlanmış tiyabendazoldeki imidazol halkasının NMR spektrumu ile protonlanmış benzimidazoldeki imidazolün NMR spektrumları benzerdir. Bu benzimidazolde olduğu gibi tiyabendazolde de protonlanmanın imidazol halkası üzerinden gerçekleştiğini gösterir. Tiyazol halkasının protonlanması ise çok düşük pH'larda gerçekleşir ( $pK_a \approx 0,5$ ).  $pK_a$  çalışmaları ve NMR verileri tiyabendazolün pH 5,0'in altında imidazol halkası üzerinden protonlanarak katyon oluşturduğunu, pH 5,0-11,0 aralığında nötral molekül olduğunu, 11,0'den büyük pH'larda anyon formunda bulunduğunu göstermektedir (Tway ve Love, 1982).

## 1.2. İmidazol Halkası Bulunduran Bileşikler

İmidazol (1,3-diaza-2,4-siklopentadien)  $C_3H_4N_2$  formülüne sahip beş üyeli bir heterosiklik aromatik amindir (Şekil 1.10). İmidazol amfoterik bir bileşiktir ve yapısında iki adet azot bulunmaktadır. Yapısında bulunan bu iki N atomunun biri katyon oluşturmak üzere proton alırken, diğeri ise başka bir bileşiğe proton vermesine olanak sağlar (Scheiner ve Yi, 1996). Hem asidik hem de bazik özellik gösteren bu yapıya ait iki adet iyonlaşma/protonasyon sabiti ( $pK_a$ ) değeri bulunmaktadır. Tahmini hesap yapan programlarla asidik azota ait  $pK_a$  değeri 13,40; bazik azota ait  $pK_a$  değeri ise 6,97 olarak hesaplanmıştır (Şekil 1.11) (Chemicalize, 2018).

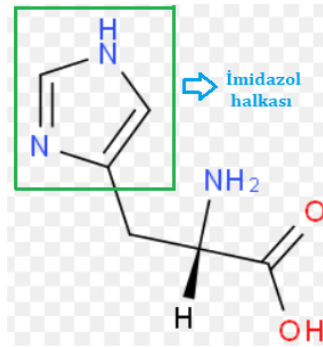


Şekil 1.10. İmidazolün kimyasal yapısı (Chemicalize, 2018)



Şekil 1.11. İmidazol molekülünün A) asidik ve B) bazik koşullar altında iyonlaşma dengesi (Chemicalize, 2018)

İmidazol halkası doğal olarak birçok bileşiğin yapısında bulunan ve sentetik yollarla da elde edilebilen biyoaktif bir bileşiktir. Metallerle ligand olarak bağlanma özelliği ve proteinler ile hidrojen bağı yapabilme yeteneği sayesinde biyoajan olarak birçok alanda kullanılmaktadır. Yapısında imidazol halkası bulunduran en çok bilinen bileşik histidin amino asididir (Şekil 1.12). Histidin birçok proteinin ve enzimin yapısında bulunur ve hemoglobinin bağlanma işlevlerinde oldukça önemli bir rol oynamaktadır. İmidazolü yapısında bulunduran diğer doğal bileşikler; biyotin, esansiyel amino asitler, histamin ve pilokarpin alkaloidleri iken, sentetik bileşiklerin bazıları ise simetidin, losartan, fungusitler, herbisitler, bitki büyüme düzenleyicileri ve terapötik ajanlardır (Molina vd., 2012).



Şekil 1.12. Histidin kimyasal yapısı (Pubchem, 2018)

İmidazoller; antifungal, antikanser, antiviral, antibakteriyel, antitüberküloz, antiparazitik, antihistaminik, anti-inflamatuar, antinöropatik, antiobezite ve antihipertansif özellik gösteren oldukça geniş bir biyolojik aktiviteye sahip

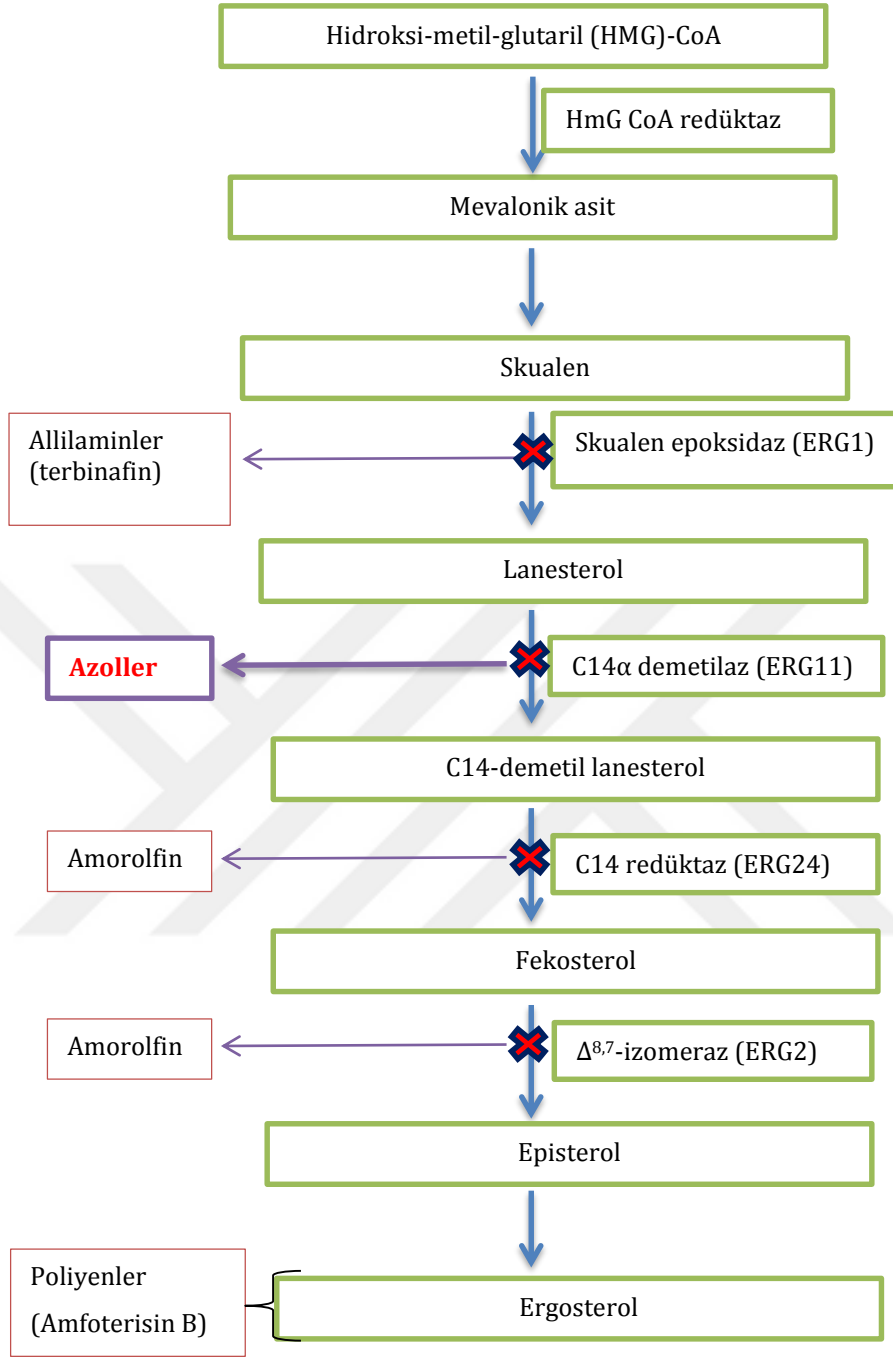
bileşiklerdir. Günümüzde bilim insanları arasında imidazollerin antikanser ilacı olarak güvenli bir alternatif olarak geliştirilmesiyle bu grubu içeren ilaçlara ilgi daha da artırmıştır. Bu ilgiden yola çıkılarak imidazollerin farmakolojik özellikleri aktif olarak incelenmiş ve piyasada mevcut olan imidazollerin antikanser ilaçlara eşit ve hatta daha iyi terapötik etkilere sahip olduğu görülmüştür (Richardson, 2005; Ali vd., 2017).

Tez çalışmasında sıvı kromatografik tayini yapılan imidazol halkası içeren klotrimazol, metimazol (tiyamazol) ve metronidazol ile ilgili kapsamlı bilgi aşağıda verilmiştir.

### **1.2.1. Klotrimazol**

Klotrimazol, geniş spektrumlu antimikrobiyal aktiviteye sahip, toksik olmayan sentetik imidazoldür (Abdel-Moety, E.M., 2002; Solich, P., 2002). 1960'ların sonunda iki farklı laboratuvardan antifungal ajan olarak literatüre kazandırılan üç azol bileşiğinden biridir ve ilk geliştirilen imidazol antifungal ilaçları arasındadır. 1969'da Bayer firmasındaki kimyagerler tarafından sentezlenmiş, fakat sentezi 1972'ye kadar açıklanmamıştır (Beggs vd., 1981).

Ergosterol, fungal hücre membranlarının anahtar bileşenlerinden biridir. Mayalarda ve mantarlarda temel sterol olan ergosterol, hücrenin büyümesi ve normal membran fonksiyonu için gereklidir. Bu hücre membranı bileşeni membranın akışkanlığı, asimetrisi ve membran bütünlüğünün düzenlenmesine, besin transferi ve kitin sentezinde görevli olan membrana bağlı enzimlerin uygun şekilde çalışmasına katkı sağlar (Lupetti vd., 2002). Klotrimazol, fungal hücrelerin temel sterol bileşeni olan ergosterol biyosentezinde sitokrom P450 lanosterol C14 $\alpha$ -demetilaz (EC 1.14.14.1) aktivitesini inhibe ederek etki gösteren azol fungusitidir (Hitchcock vd., 1990) (Şekil 1.13)



Şekil 1.13. Ergosterol biyosentezi ve bu sürece antifungallerin etkisi

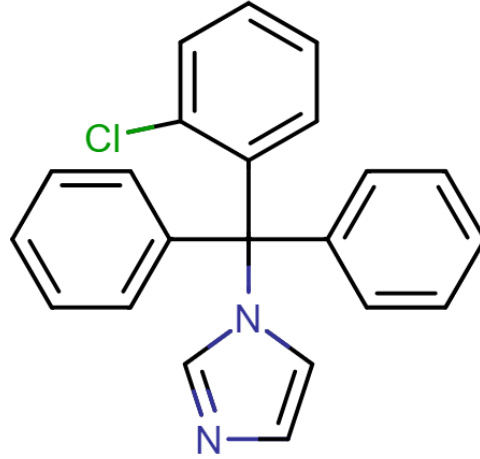
*Candida albicans* insanda oral, gastrointestinal ve vajinal bölgelerin mukozal yüzeylerinde yaşayan insana patojenik fungustur. *Candida albicans* uygun yaşam koşullarında yüzeysel olarak etki gösterse de insan yaşamını tehdit edici özelliğe sahip sistemik enfeksiyondur (Kasper vd., 2015). Vulvajinal kandidiyaz, *Candida albicans*'ın neden olduğu bir mantar enfeksiyonudur. Ağızda, vajende, sindirim sisteminde ve ciltte bulunur. Sağlıklı kadınlar için bile zaman zaman

problem olan bu hastalık, immün sistemi zayıflamış kadınlarda çok ciddi sađlık problemi haline gelebilmektedir. Çođu olguda tekrarlayan ve Őiddetini artıran bu rahatsızlık, HIV enfeksiyonunun ilk semptomudur (Őatırođlu ve Aydınuraz, 2007). Klotrimazol patojenik dermatofitlere, mayalara, Candida, Trichophyton, Microsporum, Epidermophyton, Malassezia'nın çeŐitli tűrlerine karŐı etki gűsteren geniŐ spektrumlu anti-mikotik ajandır. Hem dermal enfeksiyonlara műdahalede hem de vulvajinal kandidiyaza karŐı etki gűsterir (Hoogerheide ve Wyka, 1982).

*Trichomonas vaginalis*, insan űrogenital sistemine yerleŐen kamçılı bir protozondur. Tedavisi yapılmayan Trichomoniasis olgularında HIV enfeksiyonuna yakalanma riski daha yűksektir (Sađlıkocađım, 2015). Klotrimazol, anti-mikotik aktivitesine ek olarak, metronidazole direnç gűsteren ve dűnya çapında yaklaŐık 170 milyon vakaya sebep olan *Trichomonas vaginalis*'in neden olduđu Trikomonaza (Cudmore vd., 2004) ve gram pozitif bakterilere műdahalede de kullanılmaktadır.

Piyasada çok sayıda sıtma ilacı mevcut olmasına rađmen, Dűnya çapında sıtma enfeksiyonlarından kaynaklı hastalık ve űlűm oranları hala çok yűksektir. Dűnya sađlık űrgűtű (WHO) verilerine gűre 1,2 milyar insan yűksek enfeksiyon riski altındadır. Gűnűműzde bilinen tűm sıtma ilaçları, ilaca direnç gűsteren *Plasmodium falciparum*'un yayılmasını űnleyememektedir. Sıtma ile műcadelede klotrimazol temelli anti-malaryel ilaçlar űmit vericidir (Tiffert vd., 2000; Crowley ve Gallagher, 2014).

Klotrimazolűn (1-[(2-klorofenil)-difenilmetil] imidazol), kimyasal yapısına bakıldıđında bileŐik dűrt aromatik halka içerir, bunlar tetrahedral Őekilde ( $sp^3$  hibritleŐmesi) karbon atomuna bađlıdır (Őekil 1.14). Aromatik gruptan birisi imidazol halkasıdır, bu halka biyolojik sistemlerde elektron transfer reaksiyonlarına aracılık eder (Eaton ve Wilson, 1978). Kalan aromatik halkalar, trifenil sistemini ihtiva eder; bu sistem radikal ara űrűnleri oluŐturan ve kararlı hale getiren yapı olarak bilinir. Bu halkalardan birtanesine C2 pozisyonunda klor bađlanmıŐtır (Crowley ve Gallagher, 2014).



Şekil 1.14. Klotrimazolün kimyasal yapısı (Chemicalize, 2018)

### 1.2.2. Metimazol (Tiyamazol)

Birçok bileşik, tiroid hormonlarının sentezinde ve salınımında, doğrudan veya dolaylı olarak rol alır. Tiroid hormonları iyot içeren, tiroid bezinden salgılanan ve metabolizmayı kontrol etmekten sorumlu yapılardır. İnsan vücudunda protein, yağ ve karbonhidrat metabolizmasını düzenleyen tiroid hormonları tüm hücrelerin gelişmesi için gereklidir. Birçok bileşiğin geçici veya uzamış hipertiroidizmin kontrolünde büyük klinik değeri vardır (Manna vd., 2013). Bu bileşikler altı gruba ayrılır:

**1. Tiyoamidler:**(—N—CS—R) genel kimyasal yapısına sahip bileşiklerdir.

Metimazol (tapazol, tiyamazol), propil tiyourasil ve karbimazol bu grupta yer alır.

**2. Anyon İnhibitörleri:** Perklorat ( $\text{ClO}_4^-$ ), perteknetat ( $\text{TcO}_4^-$ ) ve tiyosiyanat ( $\text{SCN}$ ) tiroid bezi tarafından iyodür alımını inhibe eden monovalent anyonlardır.

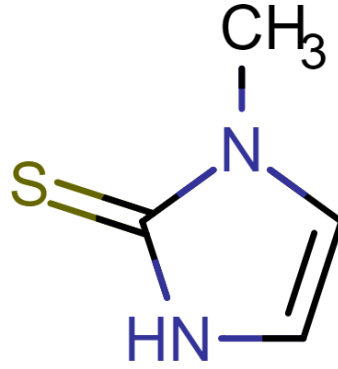
**3. İyodür:** Tiroid bezi üzerine çoklu etkiye sahip kimyasaldır. 1940'ta tiyoamidler piyasaya sürülünceye kadar en fazla kullanılan antitiroid ajandı, günümüzde ise nadiren kullanımı mevcuttur.

4. **İyotlu kontrast madde:** İyot içeren radyografik boyadır. Günümüzde radyolojide yaygın şekilde kullanılarak vücudun hemen hemen her yerine uygulanabilmektedir. Hipertiroidizmde kullanılan iyotlu kontrast maddeler ipodat ve iopanoik asittir (Singh ve Daftary, 2008).

5. **Radyoaktif iyot:** Tirotoksikoz (zehirli guatr) müdahalede kullanılan tek izotop  $^{131}\text{I}$ 'dir, diğerleri teşhis amacıyla kullanılmaktadır.

6. **Adrenoseptör bloke edici ajanlar:** Guanetidin ve beta-blokerlerden (beta adrenoseptör blokerler) propranolol tirotoksikozun (zehirli guatr) tedavisinde en yaygın kullanılan ilaçlardır (Greenspan ve Dong, 1998).

Yukarıda sınıflandırılması verilen antitroid ilaçlardan olan metimazol (3-metil-1H-imidazol-2-tiyon), heterosiklik halka içinde sülfidril grubu ve tiyoüre bulunduran, tiyoamid olarak bilinen oldukça küçük bir moleküldür (Cooper, 2005) (Şekil 1.15).



Şekil 1.15. Metimazolün kimyasal yapısı (Chemicalize, 2018)

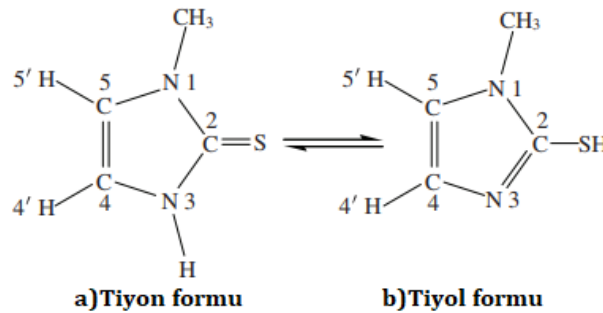
Metimazolün pro-drug'ı olan karbimazol (Furman, 2007), pH 4,0 veya 9,0'da on dakikadan daha kısa sürede metimazole metabolize olarak (Meulemans vd., 1980), gastrointestinal boşluktan emilir ve tiroid bezine ulaşır (Kusmieriek ve Bald, 2007). Vücutta, sülfenik (R-SOH) ve sülfenik asit (R-SO<sub>2</sub>H) aracılığıyla, N-metilimidazol ve sülfite (S<sup>2-</sup>) metabolize edilir (Poulsen vd., 1979).



Metimazol anti-tiroid etkisinin yanında, hipertiroidizmin en yaygın şekli olan Graves hastalığında immün sistem baskılayıcı ajan olarak görev alır (Furman, 2007). Metimazol, anti-kanser pro-drug olan siklofosamid ile birlikte kullanıldığında anti-tümoral etkiye sahiptir (Huang vd., 2000).

Metimazol hayvanlarda yasal olmayan şekilde kullanılarak deri altında, kas dokularında ve gastrointestinal boşlukta suyun tutulmasını sağlayarak hayvanda kilo artışına neden olmaktadır. Kâr elde etmek için yapılan bu uygulama sonucunda daha kalitesiz et üretilmektedir (Abuín vd., 2008; Kong vd., 2009).

Metimazolün kimyasal yapısına bakıldığında, bileşik tiyol grubu ve iki tane azot atomu içerir. Azot, bir çift elektronunu tiyokarbonil grubuna verir; böylece metimazolün tiyol ve tiyon olarak iki tautomerik formu oluşur (Şekil 1.16) (Zhang vd., 2010). Raman ve FTIR ile yapılan karakterizasyon çalışmaları metimazolün tiyon formunda bulunduğunu göstermektedir. 12,0'den büyük pH'larda bu molekül, tiyolat (anyon) formunda bulunmaktadır (Biswas vd., 2009).



Şekil 1.16. Metimazolün tautomerik formları (Cvijanovic vd., 2012)

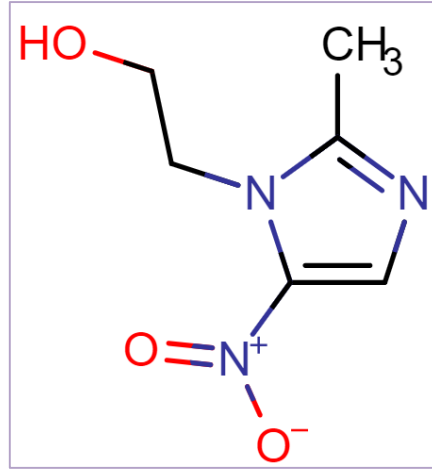
### 1.2.3. Metronidazol

Tıpta ve veterinerlik uygulamalarında enfeksiyonlara müdahalede ve enfeksiyonları önlemede antibiyotikler önemli yer tutmaktadırlar (Rahmatinia ve Rahmatinia, 2018). Metronidazol bakteri, protozoa ve parazitlerin neden olduğu enfeksiyonlara müdahalede kullanılan nitroimidazol sınıfı antibiyotiktir.

Nitroimidazollerin canlı üzerindeki etki mekanizmasına bakıldığında, bu ilaç grubu canlıda nükleik asit biyosentezini inhibe eder (Kümmerer vd., 2000). Düşük molekül ağırlığına sahip bu bileşik anaerobik ve aerobik hücre membranlarından kolaylıkla geçebilmektedir (Tally ve Sullivan, 1981). Metronidazol, çok sayıda parazite karşı aktivite gösterdiğinden geniş spektrumlu ajan olarak tanımlanır. Trichomoniasis, gardnerella (*Gardnerella vaginalis* isimli anaerob bir bakteri tarafından oluşan vajinal enfeksiyon), bakteriyel vajinozisi de içeren vajinal enfeksiyonlara müdahalede sıklıkla kullanılır. Metronidazol, pelvik inflamatuvar hastalıklar gibi jinekolojik hastalıklar, menenjit, zatürre; mide, deri, kemik ve eklem enfeksiyonlarına müdahalede kullanılır. Peritonit (karın zarı iltihabı), amipli dizanteri, tetanoz, gazlı ishal, karaciğer absesi, diş ve diş eti hastalıkları, amebiyazis (*Entamoeba histolytica*'nın bağırsak duvarı üzerinde ciddi seviyede tahribata neden olarak bölge genelinde yara oluşturması) ve insanlarda en yaygın görülen bağırsak parazitozu *Giardia lamblia*'nın (Shakeel vd., 2014) neden olduğu enfeksiyonlara müdahalede ve bakterilerin neden olduğu mide ülserlerinin tedavisinde de bu ilacın uygulamaları mevcuttur (Carson-DeWitt ve Glaza,2015). Metronidazol hipoksik hücrelerde kanser tedavisinde ışına duyarlı ajan olarakta kullanılmaktadır (Allars vd., 1985).

Yüksek dozlarda ve uzun süre verilen metronidazol, kemirgenlerde karsinojenik ve bakterilerde mutajeniktir. Metronidazol ile terapötik dozlarda tedavi edilen ve idrarında metronidazolün çok miktarda metabolitini bulunduran hastalara mutajenik aktivite eşlik etmektedir. Bununla birlikte metronidazolün terapötik dozlarının insanda kanser riskini belirgin olarak arttırdığına dair herhangi bir kanıt bulunmamaktadır (Brunton vd., 2009).

Metronidazol 2-(2-metil-5-nitro-imidazol-1-il) etanol; suda iyi çözünen,  $\log K_{o/w}$  değeri  $-0,1$  olan bazik özellikli nitroimidazol bileşiğidir (Şekil 1.17). Yapısında bulunan imidazol halkasındaki bazik azota ait  $pK_a$  değeri  $2,5$ 'dur (Budavari vd., 1989).

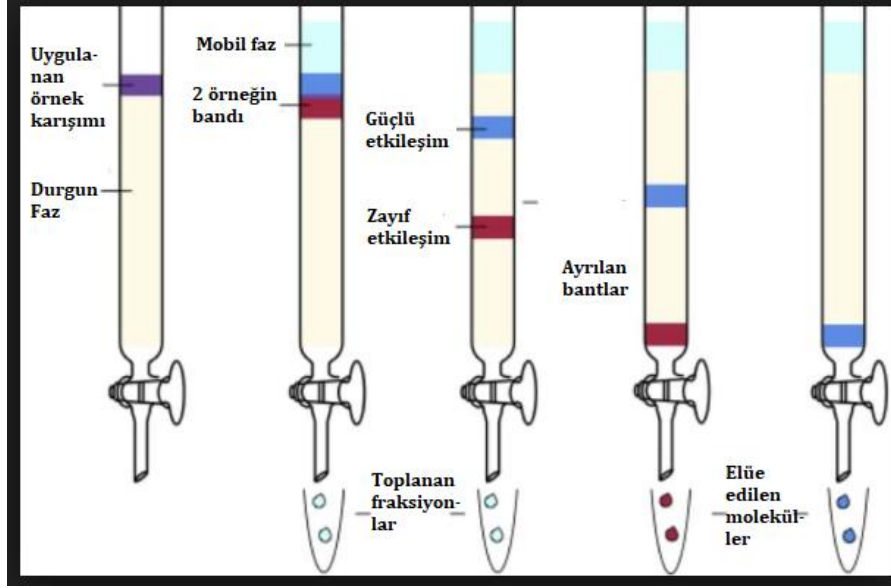


Şekil 1.17. Metronidazolün kimyasal yapısı (Chemicalize, 2018)

Metronidazolün  $pK_a$  değeri protonlanmış haldeki 3 no'lu N atomuna aittir. İmidazol ile karşılaştırıldığında ( $pK_a$  değeri yaklaşık 7,0), metronidazol daha zayıf bazdır. Bunun nedeni 5 pozisyonundaki  $NO_2$  grubudur (Perrin, 1965; Cho vd., 1982; Rivera-Utrilla vd., 2010).

### 1.3. Kromatografi

Kromatografi, 1900'lerde bugün bilinen adıyla klasik kolon kromatografi olarak uygulanmaya başlayan ayırma tekniğidir. O zaman yapılan çalışmalarda, silindir şeklindeki cam kolona toz halde kalsiyum karbonat doldurularak kolonun üstünden örnek uygulanmış ve çözücü dökülmüştür. Yerçekiminin etkisiyle çözücü kolondan aşağı doğru hareket ederken örneğin bileşenleri de kolonda farklı hızlarda hareket ederek ayrılmıştır. Kolondan alınan fraksiyonlar kısım kısım toplanarak çözücüsü uçurulmuş ve ayrılan bileşenler analiz için elde edilmiştir. Kromatografinin bu ilk çalışmalarında renkli örneklerle çalışma tercih edilmiş ve böylece kolon içinde bileşenlerin ayrılması gözle takip edilebilmiştir. Her bileşen için yeni kolona ihtiyaç duyulduğundan ve kolonun içinin doldurulması manuel olarak gerçekleştirildiğinden çok zahmetli ve zaman alıcı bir işlem olarak görülmüştür (Şekil 1.18) (Snyder vd., 2010).



Şekil 1.18. Klasik kolon kromatografisinin şematik gösterimi (Bitesizebio, 2018)

Kromatografinin gelişim basamakları incelendiğinde,

- ✚ Kromatografinin öncüleri; 1900'den önceki gelişmeler (Bussemas ve Ettre, 2004),
- ✚ 1900'lerin başlarında M.S. Tswett tarafından kromatografinin keşfi (Ettre ve Sakodynskii, 1993; Ettre, 2003),
- ✚ 1930'lerin başlarında kromatografinin yeniden keşfi (Ettre, 2007),
- ✚ 1940'lerin başlarında A.J.P. Martin'in dağılma ve kağıt kromatografisini keşfi (Ettre, 2001),
- ✚ S. Moore ve W. S. Stein tarafından 1950'lerin sonlarında amino asit analizörünün geliştirilmesi (Ettre ve Gehrke, 2006),
- ✚ 1960'lerin başlarında Waters tarafından jel geçirgenlik kromatografisinin geliştirilmesi (Ettre, 2005),

olarak sınıflandırılabilir.

1890'larda David Day klasik kolon kromatografisine benzer şekilde bir teknikle petrolün bileşenlerine ayrılmasını gerçekleştirmiştir, fakat Day'in amacı ayırma tekniği geliştirmek değildir. 1900'lerin başlarında Rus bilim adamı botanikçi Mikhail Semenovitch Tswett klasik kolon kromatografisini keşfetmiş ve farklı bitki ekstraktlarını, kalsiyum karbonatla doldurulmuş cam bir kolondan

geçirerek çözültide bulunan klorofil, ksantofil gibi renkli maddeleri kolonda ayrı tabakalar halinde ayırmıştır. Bu renkli tabakaları göz önünde bulundurarak yaptığı ayırmaya Yunanca 'chroma=renk' anlamına gelen **Kromatografi** adını vermiştir. Bu çalışma kromatografinin başlangıcı olarak kabul edilmiş fakat bundaki sonraki yaklaşık yirmi yıl boyunca bu çalışmanın önemi fark edilmemiştir. 1930'ların başlarında Tswett'in çalışması tekrar keşfedilmiş ve kromatografideki gelecek çalışmalara öncülük etmiştir. A.J.P. Martin tarafından 1943'te kağıt kromatografisinin keşfi, 1930-1950 yılları arasında ince tabaka kromatografisinin gelişmesine öncülük etmiştir (Snyder vd., 2010).

1950'lerde amino asit analizörünün piyasaya girmesi yüksek performanslı sıvı kromatografi (High performance liquid chromatography, HPLC)' nin keşfinin habercisi olmuştur. Bunu Moore tarafından jel geçirgenlik kromatografisinin keşfi ile Waters tarafından piyasaya sürülmesi takip etmiştir. Bu amino asit analizöründe ve jel geçirgenlik kromatografisinde küçük parçacık boyutuna sahip, tekrar kullanılabilen dolgu maddesi içeren kolon içine yüksek basınçta çözücü pompalanmış, kolondan çıkan madde dedektör tarafından sürekli görüntülenerek zamana karşı dedektör sinyali şeklinde kromatogram elde edilmiştir (Ettre ve Gehrke, 2006).

1960'ların başlarında genel amaçlı HPLC sisteminin geliştirilmesi Amerika'da Csaba Horvath ve Avrupa'da Josef Huber'in liderliğinde gerçekleştirilmiştir. 1960'ların sonlarında ticari ekipman olarak HPLC cihazı Waters ve DuPont tarafından piyasaya sürülmüştür. 1960'ların sonlarından itibaren HPLC cihazı yaygın şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Ettre, 2005).

#### **1.4. Sıvı Kromatografi**

Kromatografik ayırma biri sabit öteki hareketli olan iki faz arasında gerçekleştirilir. Sıvı kromatografik yöntemde hareketli faz sıvı, durgun faz ise katıdır.

Sıvı kromatografi (Harris, 2011),

## A. Ayırma prensibine göre

1. Adsorpsiyon kromatografisi
2. İyon değişim kromatografisi
3. Dağılma kromatografisi
4. Size-exclusion kromatografisi
5. Afinite kromatografisi (Gündüz, 2007; Harris, 2011)

## B. Elüsyon tekniğine göre

1. İzokratik ayırma
2. Gradient ayırma (Gündüz, 2007)

## C. Kromatografinin biçimine göre

1. Normal faz sıvı kromatografisi
  2. Ters faz sıvı kromatografisi (Bala, 2012)
- olarak sınıflandırılır.

## A. Ayırma prensibine göre

**1. Adsorpsiyon kromatografisi:** Durgun fazın katı, hareketli fazın sıvı ya da gaz halde olduğu kromatografisi çeşididir. Analit katı haldeki durgun fazın yüzeyine adsorpsiyon ile tutunur. En kuvvetli tutunan analit en yavaş şekilde hareket ederken, az tutunan tür daha hızlı hareket eder (Şekil 1.19).

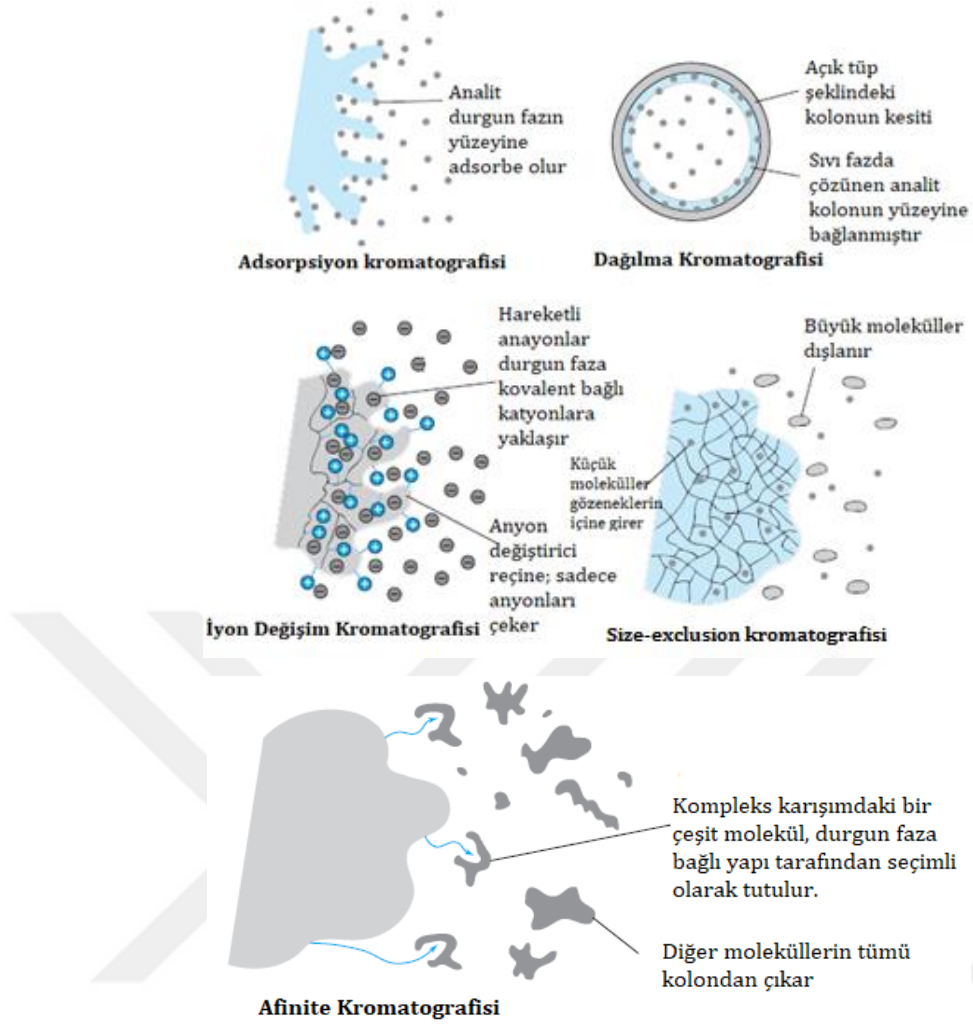
**2. Dağılma kromatografisi:** Sıvı haldeki durgun faz katının yüzeyine bağlanmıştır. Analit durgun fazdaki sıvı ile hareketli faz arasında bir denge gereğince dağılır (Şekil 1.19).

**3. İyon değişim kromatografisi:**  $-SO_3^-$  gibi anyonlar veya  $-N(CH_3)_3^+$  yapısındaki katyonlar, genellikle bir reçine olan durgun faza kovalent olarak

bağlanır. Zıt yüklü analit iyonları durgun faza doğru çekilir. Hareketli faz sıvıdır (Şekil 1.19).

**4. Size-exclusion kromatografisi:** Jel geçirgenlik kromatografisi olarakta adlandırılan bu teknik, molekülleri boyutlarına göre ayırır. Daha çok sıvı ya da gaz halde bulunan hareketli faz bir gözenekli jelin arasından geçer. Büyük moleküller bu akım sırasında gözeneklere girmeksizin dışlanırlar ve kolonu terk ederler. Dolayısıyla boyut olarak daha büyük olan analit kolonu en çabuk terk eder. Küçük moleküller ise gözeneklerin arasına girebilecek kadar küçük olduklarından kolondan çıkmaları uzun süre alır (Şekil 1.19).

**5. Afinite kromatografisi:** Analit ile durgun faza kovalent bağlanmış (immobilize edilmiş) ikinci bir molekül arasındaki kendine özgü etkileşimlere dayanır. Durgun faza bağlanmış molekül belirli bir proteinin antikoru olabilir. Binlerce protein içeren bir karışım bu kolona uygulandığında sadece antikor tanıyan protein, kolon ile etkileşir. Diğer tüm proteinler kolondan elüe olur. İstenilen protein en son aşamada ya pH'yı ya da iyonik şiddeti değiştirerek kolondan alınır (Şekil 1.19) (Harris, 2011).



Şekil 1.19. Ayırma prensibine göre sıvı kromatografinin şematik gösterimi (Harris, 2011).

## B. Elüsyon tekniğine göre

1. **İzokratik elüsyon:** Kromatografik analizlerde tek çözücü kullanarak veya sabit bileşimli çözücü karışımı kullanarak yapılan elüsyondur.
2. **Gradient elüsyon:** Kromatografik analizlerde iki ya da daha fazla çözücü sisteminin polaritesinin değiştirilmesiyle uygulanır. Elüsyon başladıktan sonra çözücülerin oranı programlı bir şekilde değiştirilerek gradient elüsyon uygulanır (Harris, 2011).



## **C. Kromatografinin biçimine göre**

### **1. Normal faz sıvı kromatografi (NP)**

Normal faz sıvı kromatografi, polar dolgu maddesi içeren durgun faz ve apolar elüent içeren hareketli fazdan oluşur. Normal faz sıvı kromatografide alıkonma, hidrojen bağı, elektrostatik etkileşimler ve daha spesifik olarak dipol-dipol etkileşimlerinden meydana gelir. Bu kromatografi tipinde en yaygın kullanılan durgun fazlar silika, alümina; kimyasal bağlı fazlar ise aminopropil, siyanopropil, nitrofenil ve dioldür (LoBrutto, 2000).

Normal faz sıvı kromatografi çok yaygın kullanılamamaktadır çünkü bu yöntemde saf organik çözücü mobil faz olarak kullanıldığından, asidik ve bazik bileşiklerde bazen iyi sonuçlar verirken bazen bu bileşiklerin alıkonma davranışı tahmin edilememektedir. Bunun üzerine alkilkloro silanlar ile kimyasal olarak modifiye edilmiş silika desteği içeren ters faz sıvı kromatografi yöntemi geliştirilmiş, asidik ve bazik bileşiklerin iyonlaşması elüent pH'nın fonksiyonu olarak değiştiğinden ve daha tahmin edilebilir alıkonma mekanizmaları elde edildiğinden bu yöntem çok tercih edilir hale gelmiştir (LoBrutto, 2000).

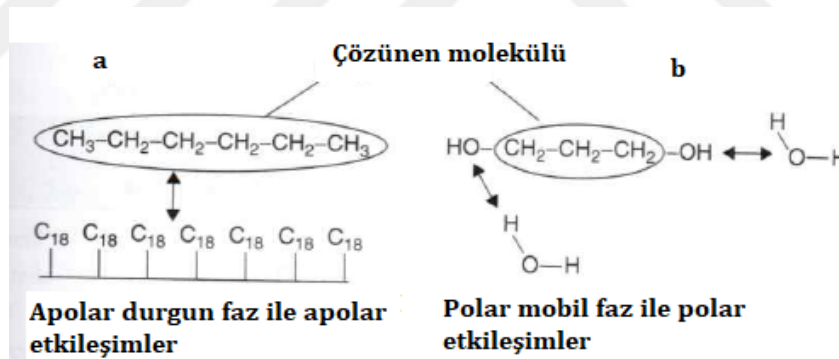
### **2. Ters faz sıvı kromatografi (RPLC)**

En yaygın kullanılan sıvı kromatografi tekniği ters faz sıvı kromatografi (reversed phase liquid chromatography, RPLC)'dir ve bu teknikte C18 en yaygın kullanılan durgun fazdır. Silika yüzeye C18 kimyasal olarak bağlandığından, kararlılık, tekrarlanabilirlik ve seçicilik bu kolonlarda çok iyidir (Horvath ve Melander, 1977; Lee vd., 1996). RPLC'de kullanılan diğer durgun faz çeşitleri Şekil 1.20'de gösterilmektedir.

• C-2	Etil silil	-Si-CH <sub>2</sub> -CH <sub>3</sub>
• C-8	Oktil silil	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>7</sub> -CH <sub>3</sub>
• C-18	Oktadesil silil	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>17</sub> -CH <sub>3</sub>
• CN	Siyanopropil silil	-Si-(CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> -CN

Şekil 1.20. Ters faz sıvı kromatografide kullanılan durgun faz çeşitleri (Bala, 2012)

Ters faz sıvı kromatografi apolar durgun faz içeren kolon ile su ve organik çözücü ikili karışımlarını içeren polar özellikli mobil fazdan oluşur. Polar çözünenler kendisi gibi polar olan mobil fazla etkileşime girip, mobil fazla sürüklenmeyi tercih ederler ve kolonda az tutunurlar; apolar çözünenler ise apolar durgun fazla etkileşime girerek kolonda daha fazla tutunurlar (Şekil 1.21).

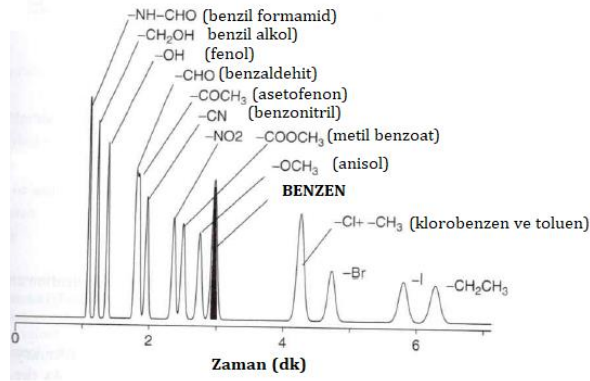


Şekil 1.21. a) Apolar çözünen ile durgun fazın etkileşimi b) Polar çözünen ile mobil fazın etkileşimi (Snyder vd., 2010)

Mono sübstitüe benzen bileşiklerinin kromatogramları Şekil 1.22'de görülmektedir. Benzene bağlı farkı sübstitüentler alıkonma süresini etkilemektedir. -NHCHO,

-CH<sub>2</sub>OH, -OH polar sübstitüentlerdir ve sübstitüe olmayan benzen bileşiklerinden daha az tutunurlar. Ters faz sıvı kromatografi kolonunda ayırma yapılırken klor, metil, brom, iyot ve etil gibi hidrofobik sübstitüentler benzene

bağlandığında süstitüe olmayan benzen bileşiklerinden daha fazla tutunurlar (Tan vd., 1996; Snyder vd., 2010).



Şekil 1.22. Monosüstitüe benzen bileşiklerinin alıkonması üzerine farklı süstitüentlerin etkisi (Snyder vd., 2010)

Asidik ve bazik özellikteki bileşiklerin iyonlaşma davranışı incelendiğinde ortamın pH'ına bağlı olarak alıkonma değişmektedir.

Zayıf asidik türün iyonlaşma dengesi,



Zayıf asidik türün iyonlaşma sabiti,

$$K_a = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]} \quad (1.2)$$

Zayıf bazik türün iyonlaşma dengesi,



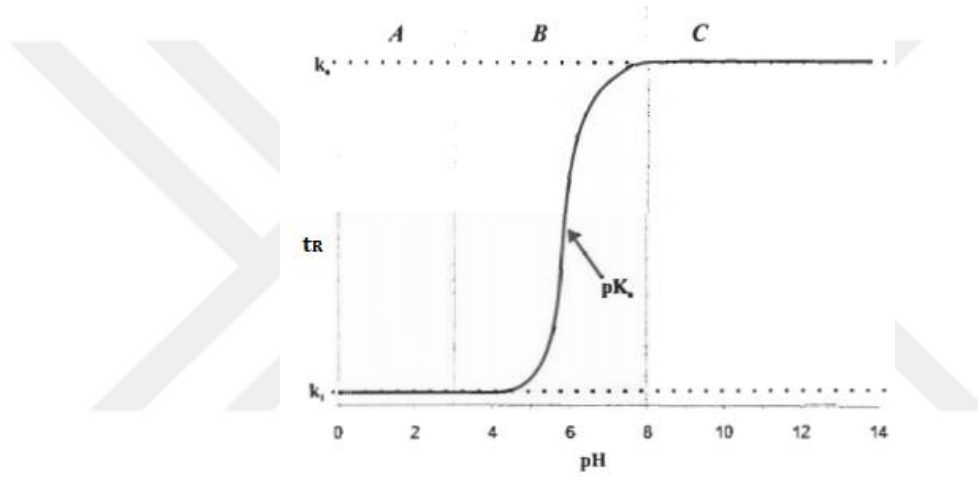
Zayıf bazik türün iyonlaşma sabiti

$$K_a = \frac{[H_3O^+][B]}{[BH^+]} \quad (1.4)$$

Zayıf asidik grup taşıyan moleküllerde, HA moleküler türü ifade ederken,  $A^-$  türü iyonik türü ifade eder. Zayıf bazik grup taşıyan moleküllerde,  $BH^+$  iyonik türü ifade ederken, B türü moleküler türü ifade etmektedir (Mycek vd., 2001).

Mobil faz pH'ına bağımlı olarak iyonlaşan analitin alıkonma davranışı incelendiğinde,

Bazik bileşikler için pH'ın fonksiyonu olarak alıkonma davranışı grafiğe geçirildiğinde sigmoidal eğri elde edilmektedir (Şekil 1.23) (LoBrutto, 2000).



Şekil 1.23. Mobil faz pH'ına bağlı olarak bazik analitin alıkonma davranışı (LoBrutto, 2000)

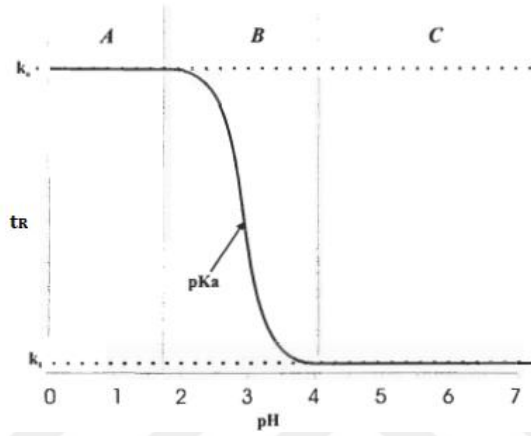
Bazik bileşikler için elde edilen sigmoidal eğri incelendiğinde,

**A bölgesinde** tamamen protonlanmış analit düşük alıkonma değerine sahiptir. Çünkü analit en hidrofobik formdadır ve hidrofobik durgun faz ile etkileşimi baskılandığından kolondan hızlı şekilde elüe olur.

**B bölgesinde** analit kısmen protonlanmış haldedir. Mobil fazda analit protonlanmış ve deprotonlanmış form olarak iki formda bulunmaktadır ve bu formlar denge halindedir, pik şekli kötüdür ve alıkonma davranışı kararsızdır. Çünkü analitin nötral formu protonlanmış formundan durgun faz ile daha çok etkileşime girdiğinden alıkonma artmaktadır.

**C bölgesinde** ise analit nötral formdadır ve hidrofobik haldedir; uzun alıkonma değerine sahiptir.

Asidik bileşikler için de mobil faz pH'ına karşı alıkonma grafiğe geçirildiğinde sigmoidal eğri elde edilmektedir. Elde edilen sigmoidal, bazik bileşiklerin ayna görüntüsüdür (Şekil 1.24).



Şekil 1.24. Mobil faz pH'ına bağlı olarak asidik analitin alıkonma davranışı (LoBrutto, R., 2000)

## 1.5. Kromatografik Analizlerde Çözücü-Çözünen Etkileşimleri

Kromatografik analizlerde kolon içerisinde çözünen ile çözücü molekülleri arasında molekül içi etkileşimler, dağılma kuvvetleri, dipol-dipol etkileşimleri, hidrojen bağı oluşumu, iyonik etkileşimler ve  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri mevcuttur (Snyder vd., 2010).

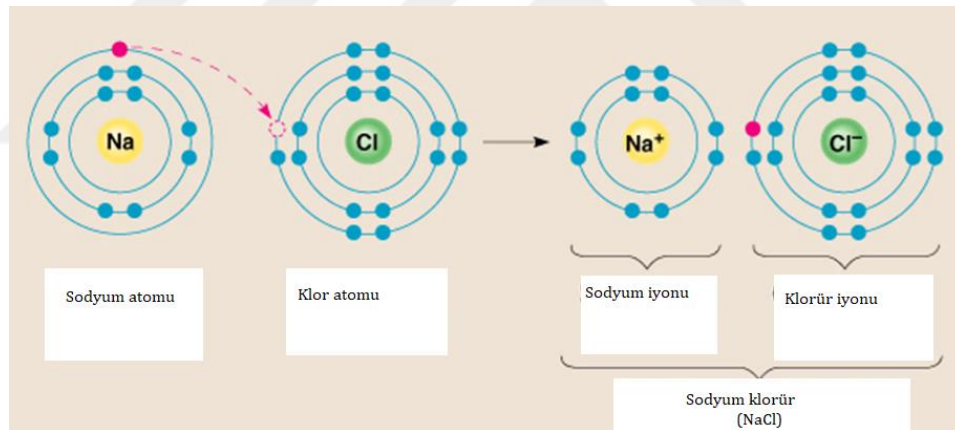
### 1.5.1. Molekül içi etkileşimler

Molekül içi etkileşimler kimyasal bağ oluşumundan sorumludurlar. Pozitif yüklü çekirdek ve negatif yüklü elektronlar arasındaki elektrostatik etkileşimlerle atomlar birarada tutulurlar. Bu etkileşimler kimyasal bağlar tarafından iki atomun birbirini tutmasına izin verir (Tzimopoulos vd., 1990).

Kimyasal bağlar:

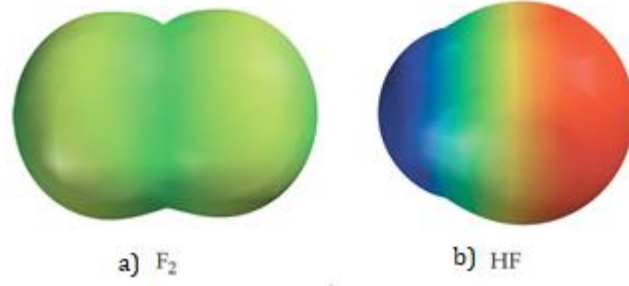
- a) İyonik bağlar
  - b) Kovalent bağlar
  - c) Metalik bağlar
- olarak 3'e ayrılır.

Metaller elektronlarını verip pozitif yüklü iyon oluşturmaya eğilimliken, ametaller elektron alıp negatif yüklü olma eğilimindedirler. İyonik bağ, metal ve ametal atomları arasındaki elektron alışverişine dayanan; metal atomunun elektron vererek pozitif yüklü hale geldiği ametal atomunun elektron alarak negatif yüklü hale geldiği kimyasal bağ türüdür. NaCl'de Na atomu bir elektronunu elektronegatif klor atomuna vererek +1 yüklü hale geçmektedir; klor atomu da bu elektronu alarak oktetini 8'e tamamlamaktadır. NaCl iyonik katısı oluşmaktadır (Şekil 1.25).



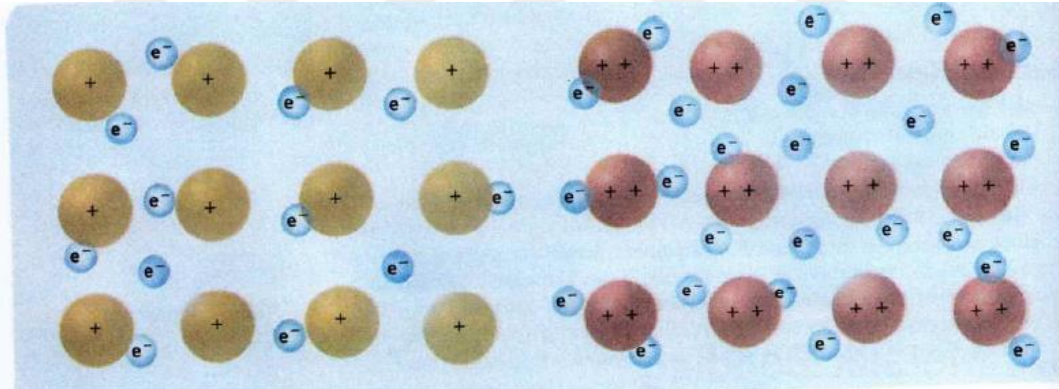
Şekil 1.25. NaCl'de iyonik bağın gösterimi (Tutorvista, 2015)

Kovalent bağ ametal-ametal atomları arasında meydana gelen ve elektron ortaklaşmasına dayanan kimyasal bağ türüdür (Şekil 1.26a). Kovalent bağı oluşturan iki atom elektronları ortak şekilde paylaşmadığında bağda dipol meydana gelir. Burada oluşan bağa polar kovalent bağ denir. Bu bağda da elektronların ortaklaşa kullanılması mevcuttur, fakat elektronlar eşit şekilde paylaşılmazlar. HF bileşiğinde, hidrojenden daha elektronegatif olan F atomu bağ elektronlarını kendine daha çok çekerek daha fazla elektron yoğunluğuna sahip olur (Şekil 1.26b).



Şekil 1.26. a) Kovalent bağın ve b) Polar kovalent bağın gösterimi

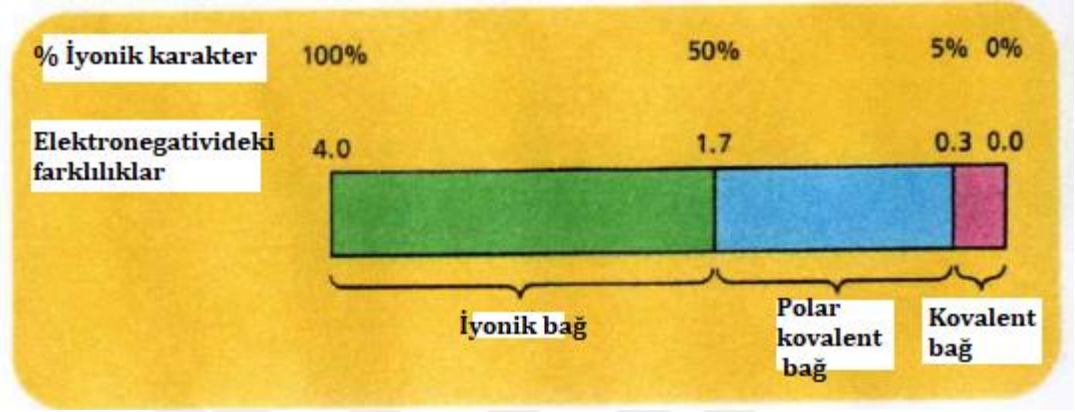
Metal atomları az sayıda değerlik elektronlarına sahiptirler. Genellikle düşük iyonlaşma enerjisine ve elektronegatiflik değerine sahiptirler ve elektronlarını kolaylıkla verebilirler. Metalik bağ, metal atomundaki pozitif iyonlarla bunları saran hareketli elektronlar arasındaki çekime dayanan kimyasal bağ çeşididir. Bu bağda pozitif iyonlar elektron denizi ile çevrili durumdadırlar (Şekil 1.27) (Tzimopoulos vd., 1990). Metalik bağ van der Waals kuvvetlerinden daha güçlüdür (Cavas, 2015).



Şekil 1.27. Metallerde elektron denizi modeli (Tzimopoulos vd., 1990)

Metallerin özelliklerine bakıldığında moleküler veya iyonik bileşiklerden farklı olduğu görülmektedir. Bu farklılıkta metallerde meydana gelen metalik bağın iyonik ve kovalent bağlanmadan farklı olmasıyla açıklanmaktadır. Metaller ısıyı iyi iletirler. İyonik ya da moleküler katıların çoğundan daha kolay deforme olurlar. Katı halde elektriği çok iyi iletirler hatta erimiş haldeki iyonik bileşiklerden bile daha iyi elektrik iletkenliğine sahiptirler. Bu özellik katı haldeki metalde mevcut olan yüklü parçacıkların (değerlik elektronların) bulunmasıyla açıklanır (Tzimopoulos vd., 1990).

Kimyasal bağlar karşılaştırıldığında, bağı oluşturan atomlar arasındaki elektronegatiflik farkı ve yüzde iyonik karakter göz önünde bulundurulur. Birbirine bağlı atomlar arasındaki elektronegatiflik farkı 1,7-4,0 ise iyonik bağ; 0,3-1,7 ise polar kovalent bağ; 0,2'den küçük ise kovalent bağ oluşumu söz konusudur (Şekil 1. 28) (Tzimopoulos vd., 1990).



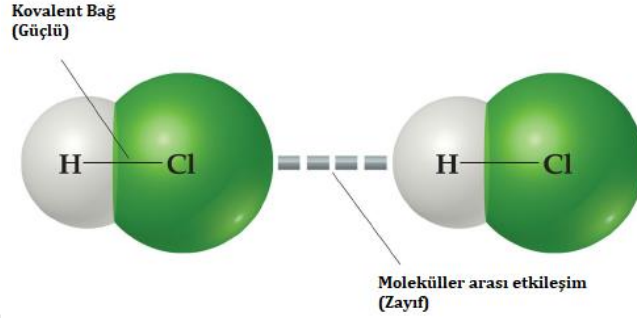
Şekil 1.28. Birbirine bağlı atomlar arasındaki elektronegatiflik farkı ve % iyonik karakter ile bağ türündeki değişimler (Tzimopoulos vd., 1990)

Sıvı kromatografide birbirine komşu çözünen molekülleri ile çözücü molekülleri arasındaki etkileşimler farklı moleküller arası etkileşimlerin sonucunda oluşmaktadır.

### 1.5.2. Moleküller arası etkileşimler

Moleküller arasındaki çekim kuvvetleri bileşikleri bir arada tutan molekül-içi çekim kuvvetleri kadar kuvvetli değildirler (Şekil 1.29). Bunun yanında bu kuvvetler kaynama ve erime noktası, buhar basınçları ve viskozite gibi fiziksel özellikleri kontrol edebilecek kadar güçlüdürler. Moleküller arasındaki çekim kuvvetleri genel olarak van der Waals kuvvetleri olarak adlandırılırlar (Cavas, 2015).





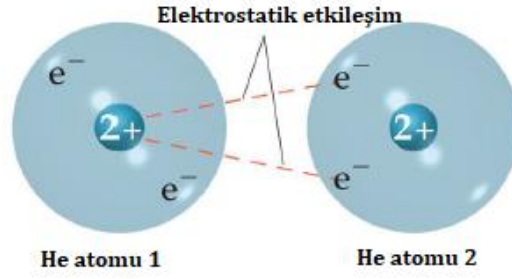
Şekil 1.29. Molekül içi etkileşimler (Kovalent bağ) ile moleküller arası etkileşimlerin gösterimi

### van der Waals kuvvetleri

- ✚ London dağılma kuvvetleri
- ✚ Dipol-dipol etkileşimleri
- ✚ Hidrojen bağları olarak sınıflandırılır.

### **1.5.3. Dağılma kuvvetleri**

London dağılma kuvvetleri anlık dipol ve indüklenmiş dipol arasındaki çekim kuvvetleridir. He'un 1s orbitalindeki elektronlar birbirlerini ittiklerinden birbirinden uzakta durmaya çalışırlar ve atomun tek bir yüzeyinde dolaşırlar. Bu anda He atomu polardır, çünkü birtarafında elektronların fazlası varken diğer tarafında elektron azalması vardır. Bu etkiden yakındaki ikinci He atomu da etkilenir ve kendi kendine indüklenerek dipole sahip olur. Burada ikinci He atomunun elektronları birinci He'un elektronlarını iterler (Şekil 1.30, Şekil 1.32 a,b). Bu şekilde anlık dipol ve indüklenmiş dipol arasındaki çekim kuvvetlerinden London dağılma kuvvetleri oluşur. London dağılma kuvvetleri polar veya apolar yapıya sahip tüm moleküllerde mevcuttur (Cavas, 2015).



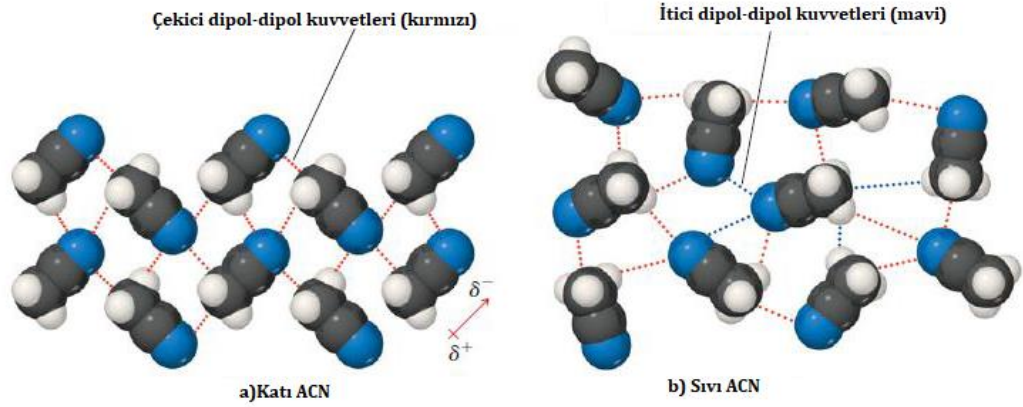
Şekil 1.30. London dağılma kuvvetlerinin şematik gösterimi

Sıvı kromatografide dağılma kuvvetleri, çözücü veya çözünen moleküllerin birbirine komşu atomları çevresindeki elektronların anlık ve rastgele hareketinden meydana gelir. Çözücü veya çözünen moleküllerin anlık dipol momentleri elektrostatik etkileşimi destekler. Dağılma kuvvetlerinin gücü iki komşu atomun polarlanabilirliği ile artar (Şekil 1.26a). Çözünen molekülün polaritesi molekülün büyüklüğü ve refraktif indeks ile artar; bu yüzden aromatik bileşiklerde ve yüksek molekül ağırlığına sahip sübstitüentler (sülfür, klor, brom) içeren moleküllerde dağılma kuvvetleri daha güçlüdür (Snyder vd., 2010).

Dağılma kuvvetleri hidrofobik etkileşimlere destek sağlar, bu yüzden dağılma kuvvetlerinin etkisi arttıkça (daha büyük, daha apolar çözünen molekülleri), çözünen molekülün kolonda alıkonma zamanı artar.

#### 1.5.4. Dipol-Dipol etkileşimleri

Dipol-dipol etkileşimleri polar moleküller arasında meydana gelen etkileşimlerdir. Polar molekülün negatif ucu komşu molekülün pozitif ucunu çekerek etkileşime girer. Buna çekici dipol-dipol kuvvetleri denir (Tzimopoulos vd., 1990). Polar molekülde benzer yüke sahip iki ucun birbirini itmesine de itici dipol-dipol kuvvetleri denir (Şekil 1.31).



Şekil 1.31. a) Katı ACN'de b) Sıvı ACN'de dipol-dipol etkileşimleri (Cavas, 2015)

Sıvı kromatografide çözücü (asetonitril,  $\text{CH}_3\text{C}\equiv\text{N}$ ) ve çözünen molekülleri arasında (nitroalkan,  $\text{RNO}_2$ ) meydana gelen dipol etkileşimleri Şekil 1.32'de görülmektedir. Bu iki moleküldeki fonksiyonel gruplar ( $-\text{C}\equiv\text{N}$ ,  $-\text{NO}_2$ ), bir molekülün pozitif ucu ile diğer molekülün negatif ucu arasındaki elektrostatik etkileşimlerden kaynaklanan dipol momente sahiptir. Dipol momentin gücü etkileşim içinde olan iki molekülün dipol momentleri ile orantılıdır; çünkü dipol etkileşimler çok yakın mesafelerde etkilidir (Snyder vd., 2010).

### 1.5.5. Hidrojen bağı

Dipol dipol etkileşimlerinin daha güçlü türü olan H bağı, H atomunun elektronegatif F, O, N atomlarıyla etkileşmesiyle meydana gelir (Tzimopoulos vd., 1990). Sıvı kromatografide asidik çözücünün (metanol) bazik çözünen ile (N,N-dimetilanilin) veya bazik çözücünün (THF) asidik çözünen (fenol) ile etkileşmesiyle (Şekil 1.32c) H bağı meydana gelir. Hidrojen bağının gücü, etkileşim içinde olan iki türün hidrojen bağı asitliğinin ve bazlığının artmasıyla artar.

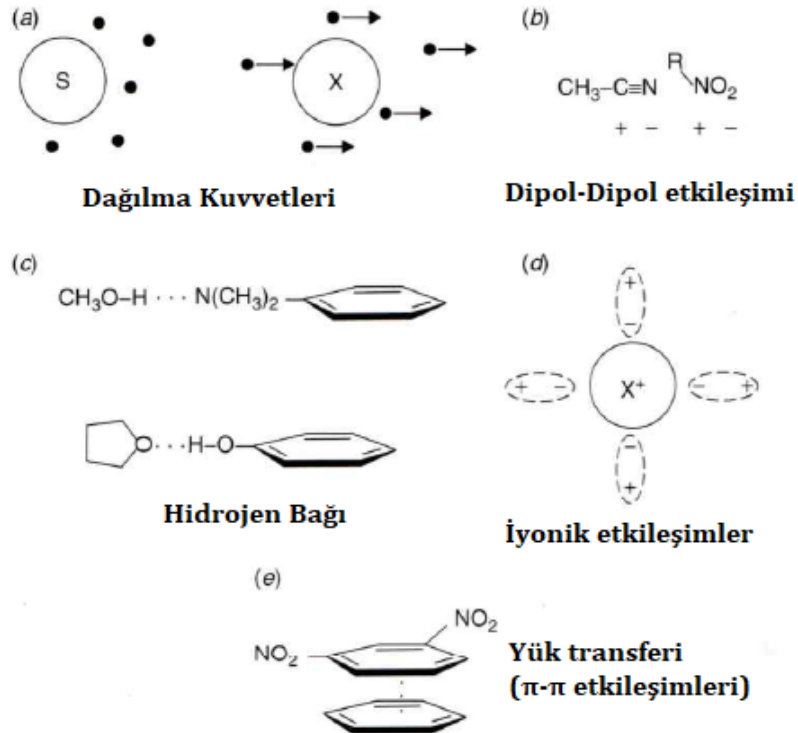
Dipol-dipol kuvvetleri ile dağılma kuvvetleri karşılaştırıldığında, eğer iki molekül karşılaştırılabilir bir boyut ve şekildeyse, dipol-dipol etkileşimleri daha baskın olma eğilimindedir. Eğer bir molekül diğerinden çok daha büyükse fiziksel özellikleri dağılma kuvvetleri belirleyecektir (Cavas, 2015).

### 1.5.6. İyonik etkileşimler

İyonik etkileşimler, pozitif yüklü çözünen molekülleriyle, bu moleküllerin etrafını saran polarlanabilir çözücü moleküllerinin etkileşiminden kaynaklanır. Pozitif yüklü çözünen molekülleri, maksimum elektrostatik etkileşim için çözücü moleküllerinin yükünde değişime sebep olur (Şekil 1.32d). İyonik etkileşimlerin gücü çözücünün dielektrik sabitinin artmasıyla artar (Snyder vd., 2010).

### 1.5.7. Yük transferi veya $\pi$ - $\pi$ etkileşimleri

Elektronca zayıf çözünen 1,3-dinitrobenzen ve elektronca zengin çözücü benzen için  $\pi$ - $\pi$  etkileşimleri Şekil 1.32'e de gösterilmektedir. Bu etkileşimler herhangi aromatik iki tür arasında meydana gelir. Asetonitril  $\pi$  asididir ve aromatik çözünenler ile  $\pi$ - $\pi$  etkileşimine girer (Snyder vd., 2010).



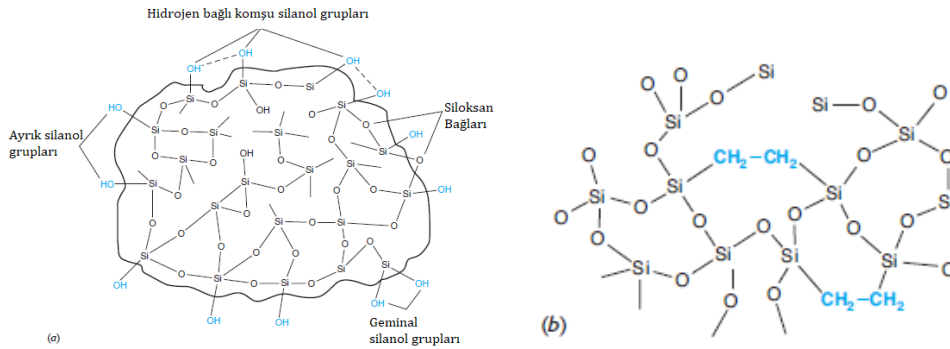
Şekil 1.32. RPLC'de çözünenin alıkonmasına katkı sağlayan molekül içi etkileşimler (Snyder vd., 2010).

## 1.6. Ters Faz Sıvı Kromatografik Analizlerde Kullanılan Durgun Faz ve Mobil Fazlar

Kromatografide kullanılan hareketli ve sabit fazlara bakıldığında, hareketli faz olarak su ve organik çözücülerin tamamı farklı oranlarda karıştırılarak kullanılabilir

Durgun faz olarak: silikajel, alumina, kömür, florisil, kalsiyum karbonat ve kalsiyum oksit, magnezyum karbonat ve magnezyum oksit, kizelgurlar, diatome toprak, poliamitler, nişasta, toz şeker ve talk kullanılabilir (Gündüz, 2007).

Bu durgun faz dolgu maddelerinden silikanın yüzeyi asidik özellikte, alüminanın yüzeyi bazik özellikte, kömürün yüzeyi ise nötral yapıdadır. En yaygın kullanılan durgun faz dolgu materyali, çözücünün geçebildiği ve gram başına yüzlerce metrekarelik bir yüzey alanına sahip oldukça saf, küresel, mikro gözenekli silika parçacıklarıdır. Birçok silika dolgu materyali bazlarda çözündüğü için pH 8'in üzerinde kullanılamaz. pH 8-12'deki bazik bileşikleri ayırmak için hidrolize direnen etilen köprülü silika kullanılır (Şekil 1.33a-b) (Harris, 2011).

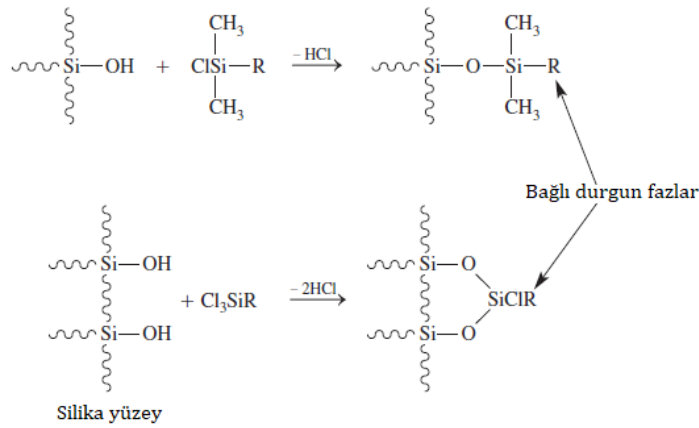


Şekil 1.33. a) Silika jelin yapısı, b) Baz hidrolizine karşı dayanıklı silika (silisyum atomları arasında oksit köprüleri yerine etilen köprüleri içerir) (Harris, 2011)

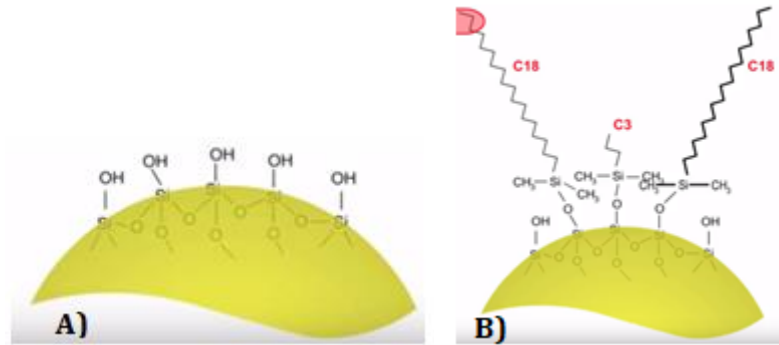
Silika jelin yapısında molekül içi hidrogen bağları ve siloksan bağları mevcuttur. Yapıdaki -OH grupları yapıya asidik özellik kazandırır. Bir silika yüzeyinde 8 µmol'e kadar silanol grupları (Si-OH) bulunur. Silanol grupları yaklaşık olarak pH 2-3'te protonlanır. Bu gruplar pH 3'ün üstündeki geniş bir pH aralığında Si-

O<sup>-</sup>'ye ayrışırlar. Si-O<sup>-</sup> gruplarına sahip eski Tip A silika, protonlanmış bazları (RNH<sub>3</sub><sup>+</sup>) kuvvetli olarak tutar ve kuyruk oluşumuna neden olur. Tip A silikada bulunan metalik safsızlıklar da kuyruk oluşumuna neden olur. Silanol gruplarına daha az sahip olan ve daha az metalik safsızlıkları olan Tip B silika günümüzde en yaygın kullanılan dolgu maddesidir. Tip C silikada Si-OH gruplarının %90'ı çözünen maddelerle hidrojen bağı yapmayan Si-H bağlarıyla değiştirildiğinden kuyruk oluşumu daha da az olur (Harris, 2011).

Silika yüzeyindeki kalıntı silanol grupları kuyruk oluşmasına yol açan polar adsorpsiyon merkezlerini uzaklaştırmak için ClSi(CH<sub>3</sub>)<sub>3</sub> (trimetilsilil klorür) ile tepkimeye sokularak trimetilsilil grupları ile kapatılır (Şekil 1.34-1.35). Bu işleme end-capping adı verilir.



Şekil 1.34. Silika yüzeyin kovalent olarak modifiye edilmesi (Harris, 2011)



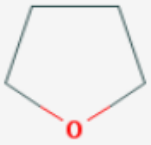



Şekil 1.35. a) Kalıntı silanol gruplarının bulunduğu silika yüzey b) End-capping yapılan silika yüzey (Arden Scientific, 2017)

## 1.7. RPLC'de Kullanılan Organik Modifiyerler

Günümüzde yüksek performanslı sıvı kromatografik ayırmaların büyük çoğunluğu kimyasal olarak bağlı ters faz dolgu maddelerinin kullanılmasıyla gerçekleştirilmektedir. RPLC genellikle hidrofobik polar olmayan analitlerle ilişkilendirilirken, polar analitlerin RPLC'de ayrılmaları da günümüzde oldukça önem arz etmektedir. Mobil faz bileşeni olarak metanol (MeOH), asetonitril (ACN) veya tetrahidrofuran (THF), ters faz sıvı kromatografik ayırmalarda çok önemli yer tutmaktadır (McCormick ve Karger, 1980).

RPLC'de kullanılan organik modifiyerlerin bazı özellikleri Çizelge 1.1'de verilmiştir (Bochem Instrumente GmbH, 2011; Van der Wal, 1985).

Çizelge 1.1. RPLC'de kullanılan organik modifiyerlerin bazı özellikleri (Van der Wal, 1985)

Organik modifiyerin adı	Kimyasal yapısı	$\epsilon$	$\mu$	UV Cutoff (nm)	Viskozite (cP)
Tetrahidrofuran		7,58	1,75	212	0,55
Metanol		32,7	1,70	205	0,55
Asetonitril		37,5	3,45	190	0,38
Su		80,1	1,82	-	0,89

## 1.8. RPLC'de Kullanılan Tamponlar

Tampon çözeltiler kimyasal işlemlerde pH kontrolü için yaygın şekilde kullanılmaktadır. Ters faz sıvı kromatografide asit/baz özellikli bileşiklerin ayrılmasında, mobil faz pH'nın kontrolü için ve elektrot sisteminin

kalibrasyonunda uygun tampon çözeltilere ihtiyaç duyulmaktadır (Espinosa vd., 2002).

Ters faz sıvı kromatografide yaygın şekilde kullanılan mobil fazlarda ve suda, pH standardizasyonu gerçekleştirilmektedir ve IUPAC tarafından bu standardizasyon kabul görmektedir. RPLC'de pH ölçümlerinde üç farklı pH skalası kullanılmaktadır.  $^w_pH$  skalasında elektrot sistemi sudaki tamponda kalibre edilir ve istenilen pH'ya ayarlama yapıldıktan sonra organik modifiyer eklenir.  $^s_pH$  skalasında elektrot sistemi sudaki tamponda kalibre edilir ve organik çözücü ile su karıştırıldıktan sonra mobil fazda pH ayarlaması yapılır.  $^s_pH$  skalasında ise organik çözücü-su ikili karışımında elektrot sistemi kalibre edilir ve organik çözücü-su ikili karışımı mobil faz olarak ayarlanır ve bu ikili karışımında pH ayarlaması gerçekleştirilir. RPLC'de pH ve alıkonma arasında  $^w_pH$  ve  $^s_pH$  skalasında daha iyi sonuçlar elde edilmektedir (Espinosa vd., 2002).

Ters faz sıvı kromatografide zayıf asit ve bazların alıkonma davranışları incelendiğinde bu bileşiklerin mobil faz pH'ına karşı çok duyarlı olduğu görülmektedir. Mobil faz pH'ı organik çözücü su karışımına tampon eklenerek ayarlanır ve mobil fazın dikkatli şekilde hazırlanması gerekir (Chromacademy, 2011).

Tamponlar zayıf asit ve onun konjuge bazı ya da zayıf baz veya onun konjuge asidinden oluşan, asit baz ilavesinde pH değişimlerine karşı direnç gösteren sistemlerdir. HPLC'de kullanılan tampon çözeltiler Çizelge 1.2'de gösterilmektedir (Dolan, 2002).

Çizelge 1.2. RPLC'de kullanılan tamponlar ve özellikleri (Dolan, 2002)

Tampon adı	pKa	pH aralığı	UV cut off (nm)
Fosfat tamponu	pKa1: 2,1	1,1-3,1	<200
	pKa2:7,2	6,2-8,2	
	pKa3:12,3	11,3-13,3	
Asetat tamponu	4,8	3,8-5,8	210 (10 mM)



Çizelge 1.2. RPLC'de kullanılan tamponlar ve özellikleri (Dolan, 2002) (Devam)

<b>Sitrat tamponu</b>	<b>3,1</b>	<b>2,1-4,1</b>	<b>230</b>
	4,7	3,7-5,7	
	5,4	4,4-6,4	
<b>Karbonat tamponu</b>	6,1	5,1-7,1	<200
	10,3	9,3-11,0	
<b>Format tamponu</b>	3,8	2,8-4,8	210 (10 mM)
<b>Amonyum bikarbonat tamponu</b>	7,6	6,6-8,6	230
<b>Borat tamponu</b>	9,3	8,3-10,3	N/A

Tamponlarla ilgili genel terimlere bakıldığında,

**Tampon Kapasitesi:** Tampon çözeltinin pH'ının önemli oranda değişmeden nötrleştirilebileceği asit ya da baz miktarıdır. Genel olarak bir zayıf asidin ve onun konjuge bazının derişimleri yüksek ve birbirine yaklaşık eşitse tamponlama kapasitesi en yüksektir (Petrucci vd., 2002).

**Tampon aralığı:** Tampon çözeltiye eklenen asit ve bazların tampon pH'ı üzerine etkisinin çok az olduğu ve dolayısıyla pH değerinin hemen hemen sabit kaldığı pH aralığıdır (Petrucci vd., 2002).

Tampon çözeltilerin tamponlama kapasitesi  $pK_a$  değeri  $\pm 1$  pH birimidir; mobil fazda  $pK_a \pm 2$  pH biriminde de yeterli tamponlama kapasitesi sağlanır (Dolan, 2002).

Apolar durgun fazlar için kullanılan elüentler polar çözücüler ya da onların karışımlarıdır. Genellikle çözücünün polaritesi azaldığında elüsyon gücü artmaktadır. Snyder, kromatografik sistemler için alümina polar durgun fazını kullanarak elüentlerin elüotropik serisini hazırlamıştır. Snyder serisinde artan polariteye göre elüentlerin sıralaması yapılmıştır; bu seride verilen çözücülerin elüsyon gücü sıralaması ters faz sıvı kromatografide kullanılan çözücüler için yaklaşık olarak ters dizilimdedir (Karch vd., 1976). Ters faz sıvı kromatografide kullanılan çeşitli çözücüler için bazı özellikler Çizelge 1.3'te gösterilmektedir.

Çözücünün dielektrik sabiti ve yüzey gerilimi analitin alıkonma davranışında önemlidir (Horvath ve Melander, 1977).

Çizelge 1.3. HPLC’de kullanılan organik çözücülerin özellikleri (Horvath ve Melander, 1977)

Organik çözücü	M <sub>A</sub> (g/mol)	K.N. (°C)	Refraktif indeks (25°C)	UV cut off (nm)	Yoğunluk (20°C)	Viskozite (cP) (20°C)	Dielek-trik sabiti	Dipol moment (μ, Debye)	Yüzey gerilimi (dyncm <sup>-1</sup> )	Elüotro-pik değerler ( <sup>a</sup> )
Aseton*	58,1	56	1,357	330	0,791	0,322	20,7	2,72	23	0,56
Asetonitril	41,0	82	1,342	190	0,787	0,358	38,8	3,37	29	0,65
Dioksan	88,1	101	1,420	215	1,034	1,260	2,21	0,45	33	0,56
Etanol	46,1	78	1,359	205	0,789	1,190	24,5	1,68	22	0,88
Metanol	32,0	65	1,326	205	0,792	0,584	32,7	1,66	22	0,95
Izo-propanol	60,1	82	1,375	205	0,785	2,390	19,9	1,68	21	0,82
n-propanol	60,1	97	1,383	205	0,804	2,200	20,3	1,65	23	0,82
THF	72,1	66	1,404	210	0,889	0,510	7,58	1,70	27,6	0,45
Su	18,0	100	1,333	170	0,998	1,000	78,5	1,84	73	-

\*UV dedektörle kullanımı uygun değildir.

<sup>a</sup>) Snyder’e göre alümina üzerinde elde edilen elütropik değerler

Çizelge 1.3’te verilen çözücüler için polarite ve yüzey gerilimi su için en yüksektir; dolayısıyla su ters faz sıvı kromatografide en zayıf elüenttir. Metanol ve asetonitril ters faz sıvı kromatografide en yaygın kullanılan organik modifiyerlerdir çünkü UV-cut off ve viskozite değerleri oldukça düşüktür. Ters faz sıvı kromatografide birçok uygulamada metanol ve asetonitril en güçlü elüentlerdir. Bu çözücülerin elüsyon gücünü azaltmak için su ile ya da sudaki tampon ile bu çözücüler karıştırılır (Horvath ve Melander, 1977).

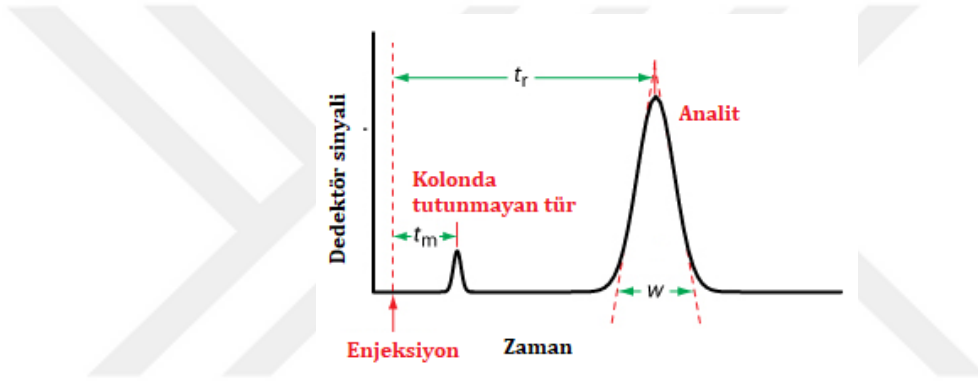
### 1.9. Sıvı Kromatografide Kullanılan Terimler

HPLC’de yaygın şekilde kullanılan terimler aşağıdaki şekilde ifade edilmektedir.

### 1.9.1. Alıkonma zamanı

HPLC’de analiz edilen her bir madde için, alıkonma zamanı ( $t_R$ ) örneğin enjekte edilmesinden kromatogramda pikin tepe noktasının görünmesine kadar geçen süre olarak tanımlanır (Şekil 1.36).

Analiz edilen maddenin kolondaki hızı, hareketli faz olarak kullanılan çözücü moleküllerinin ortalama hızı olarak kabul edilir. Bu da ölü zaman ( $t_0$ ) ile ifade edilir. Bu zamanı tespit etmek için hareketli faza kolonda tutunmayan bileşikler eklenerek enjeksiyon yapılır (Gündüz, 2007).



Şekil 1.36. Analitin ve kolonda tutunmayan türün alıkonma zamanı (LCresources, 2016)

### 1.9.2. Kapasite faktörü

Kapasite faktörü (alıkonma faktörü) analitin alıkonma zamanının kolonda tutunmayan türün alıkonma zamanına oranı olarak tanımlanır. Kromatografik analizi yapılan türlerin kolon içinde geçme hızlarının tayininde kapasite faktörü eşitliği kullanılır.

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1.5)$$

$t_R$ : analitin alıkonma zamanı,

$t_0$ : kolonda tutunmayan türün alıkonma zamanını ifade eder.

Kromatografik analizde 1 ve 10 arasındaki kapasite faktörü değerleri anlamlıdır. Kapasite faktörü çok yüksek veya çok düşük olduğunda, ayırma gücü zayıftır. En iyi ayırma  $1 < k < 5$  aralığında elde edilir. Daha kompleks örnek karışımları için bu aralık  $2 < k < 10$  olarak genişletilebilir. Eğer analitin kapasite faktörü 10'un üstündeyse, istenilen ayırma gücü değerine ulaşmak için ayırmada seçicilik veya etkinliğin artırılması sağlanmalıdır (Gündüz, 2007). Kromatografik ayırmada alıkonma faktörü mobil fazın organik modifiyer miktarının değiştirilmesiyle değiştirilir. Ters faz sıvı kromatografide durgun faz apolar özellikte olduğundan, mobil fazın polaritesinin artırılması yani organik modifiyer miktarının azaltılması ile analitin kolonda daha uzun süre tutulması sağlanır. Mobil fazın organik modifiyer içeriği %10 azaltıldığında yaklaşık olarak kapasite faktörü 2-3 birim artmaktadır. Çok düşük organik modifiyer içeriğine sahip mobil fazlarda alıkonma süresi uzundur ve analit kolonla çok güçlü şekilde etkileşir (Chromacademy, 2011).

Kolonda tutunmayan ve kolaylıkla belirlenebilen türe ait, kolon ölü zamanının ( $t_0$ ) belirlenmesinde; 220 nm'nin altında çalışılan UV dedeksiyonunda tiyoüre, urasil gibi bileşikler  $t_0$ 'ın belirlenmesinde kullanılabilir.

Analitin kolondaki ortalama hızına  $\bar{v}$  denilirse

$$\bar{v} = l/t_R \quad (1.6)$$

Çözücü moleküllerinin ortalama hızına  $u$  denilirse

$$u = l/t_0 \quad (1.7)$$

$l$  kolonun uzunluğu

$t_R$  analitin alıkonma süresi

$t_0$  çalışılan çözücünün dedektöre ulaşması için geçen ortalama zamandır (Gündüz, 2007; Snyder vd., 2010).

Analitin alıkonma zamanı ile durgun faz ve mobil faz arasındaki dağılım katsayısı ilişkisine bakıldığında; analitin alıkonma zamanının yüzde kaçını mobil

fazda geçirdiği ya da herhangi bir anda analit taneciklerinin yüzde kaçının mobil fazda bulunduğuna bakılır. Bu yüzden analitin mobil fazdaki mol sayısının toplam mol sayısına oranıyla ifade edilir (Gündüz, 2007).

$$\bar{v} = u \frac{\text{Hareketli fazdaki analitin mol sayısı}}{\text{Analitin toplam mol sayısı}} \quad (1.8)$$

$$\bar{v} = u \frac{C_M V_M}{C_M V_M + C_D V_D} \quad (1.9)$$

Kromatografik ayırmanın durgun faz ve mobil faz arasındaki dağılıma dengesine dayandığı varsayıldığında

$$A_{(\text{hareketli faz})} \rightleftharpoons A_{(\text{durgun faz})} \quad (1.10)$$

K dağılım katsayısı, analitin durgun faz ve mobil fazdaki dağılım oranları olarak tanımlanır (Gündüz, 2007).

$$K = C_D / C_M \quad (1.11)$$

bağıntısı elde edilir.

HPLC'de sıcaklık önemli bir değişkendir ve kapasite faktörü üzerine önemli etkiye sahiptir. HPLC'de birçok çözünen molekülün alıkonması sıcaklıktan etkilenir. Van't Hoff eşitliği ile açıklanır

$$\log k = A + \frac{B}{T_k} \quad (1.12)$$

A ve B sıcaklığa bağlı olmayan değişkenlerdir,  $T_k$  ise Kelvin cinsinden sıcaklıktır. Genellikle sıcaklık arttıkça kapasite faktörü azalır (Gündüz, 2007; Snyder vd., 2010).

### 1.9.3. Kromatografik kolon etkinliği

Kromatografik kolon etkinliğini kantitatif olarak ifade etmek için iki terim kullanılır:

- a) Teorik plaka sayısı (N)
- b) Tabaka yüksekliği (H)

Teorik plaka sayısı Martin ve Synge tarafından 1941 yılında ortaya atılmıştır. Hız teorisi ise 1956 yılında Van Deemter tarafından ortaya koyulmuştur (Niper Pharma Analysis, 2015).

Teorik plaka sayısı ve tabaka yüksekliği arasındaki bağıntı Eşitlik 1.13 ile ifade edilir:

$$H = l/N \quad (1.13)$$

$l$  kromatografik analizde kullanılan kolonun uzunluğu,  $H$  teorik tabakanın cm olarak yüksekliğidir.

#### **1.9.4. Tabaka teorisi**

Martin ve Synge tarafından ortaya atılan tabaka teorisine göre, bir kromatografi kolonunda üst üste sıralanmış çok sayıda tabaka mevcuttur. Her tabakada analitin taneciklerinin hareketli fazdaki konsantrasyonu ile sabit fazdaki konsantrasyonu arasında bir denge kurulduğu düşünülmektedir (Gündüz, 2007).

Kromatografik kolonun etkinliğinin artması tabaka sayısının artmasıyla sağlanır. Teorik tabaka sayısının artması tabaka yüksekliğinin azalmasına bağlıdır. Bu taneciklerin kolonda yukarıdan aşağıya indiği yani bir tabakadan ötekine geçtiği düşünülmektedir; bu kabullede türün normal dağılım eğrisi vermesi açıklanabilmektedir. Fakat bu teoride bant genişlemesi açıklanamamaktadır. Bant genişlemesini açıklamak için hız teorisi geliştirilmiştir (Gündüz, 2007; Snyder vd., 2010).

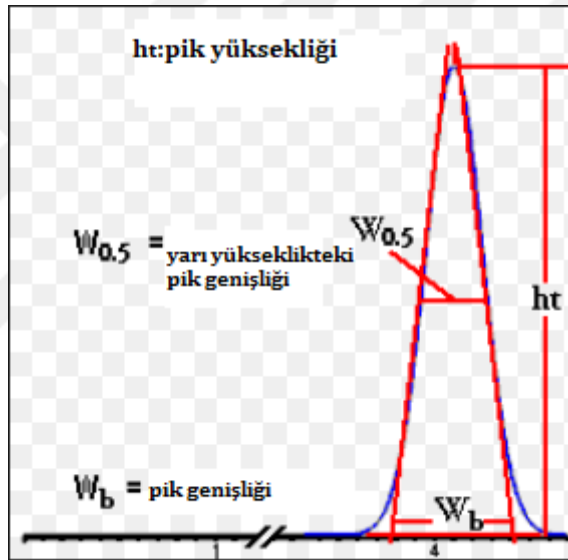
Kolonun dolgu maddesinin parçacık büyüklüğündeki azalma, genellikle teorik tabaka sayısında artışa neden olur. Küçük parçacık büyüklüğüne sahip kolonlarla yüksek basınçta ayırma yapıldığında teorik plaka sayısında maksimum değere ulaşılır.

Gerçekte de tabaka teorisine göre her tabakada bir analitin tanecikleri için denge kurulması mümkün değildir; çünkü fazlardan biri hareketlidir ve bu fazda denge kurulmaz (Gündüz, 2007).

İdeal kromatografik pik Gauss eğrisi şeklindedir. Bu yüzden pik genişliği Gauss eğrisinin standart sapması açısından  $\sigma$  ifade edilir (Şekil 1.37).

$$W=4\sigma \quad (1.14)$$

$$N = \left(\frac{t_R}{\sigma}\right)^2 \quad (1.15)$$



Şekil 1.37. Pik genişliğinin ve yarı yükseklikteki pik genişliğinin gösterimi

Teorik tabaka sayısının pik genişliği ile ilişkisini açıklamak için Eşitlik 1.16'daki bağıntı kullanılır:

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W}\right)^2 \quad (1.16)$$

N: Teorik plaka sayısı

$t_R$ : Alıkonma zamanı

W: Pik genişliği'ni ifade eder.

Pik genişliği yarı yükseklikteki pik genişliği ( $W_{1/2}$ ) kullanılarak belirlenebilir:

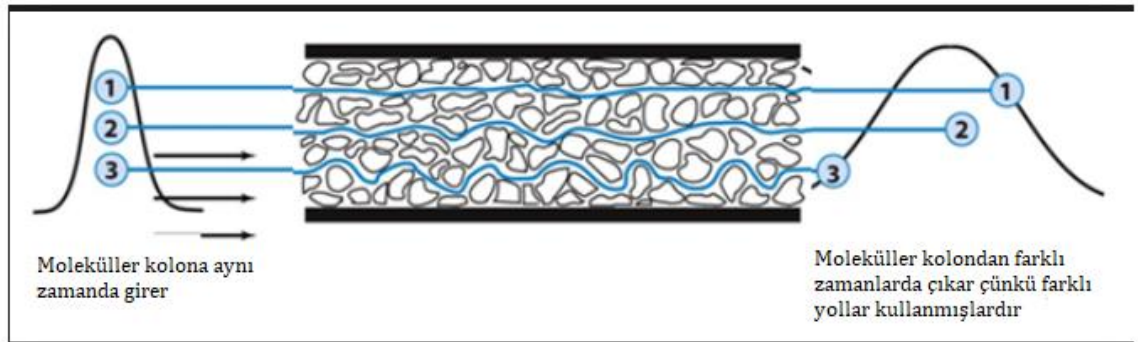
$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (1.17)$$

### 1.9.5. Tabaka yüksekliğini etkileyen faktörler

Tabaka yüksekliğini etkileyen faktörlerden teorik plaka sayısı (N) ve  $t_R$ 'den yukarıda bahsedilmiştir. Diğer faktörler aşağıda anlatılmaktadır.

#### 1.9.5.1. Eddy difüzyonu

Analiz edilen maddenin taneciklerinin birtanesinin yolu ikinci tanecikten farklıdır. Bu iki tanecik farklı yollar kullanarak kolonun çıkışına gelir. Dolayısıyla bu iki taneciğin kolonun çıkışına gelmeleri farklı sürelerde gerçekleşir. Bunun sonucunda da pikin zemin çizgisi (W) genişler. W değerinin artması pikin tabaka yüksekliğinin artmasına neden olur. Bir türün taneciklerinin farklı yollardan kolonun çıkışına gelmeleri olayına *Eddy difüzyonu* denir (Şekil 1.38). Eddy difüzyonu çözücü hızından bağımsızdır fakat akış hızı yavaşsa etkilenme daha fazla olur (Snyder vd., 2010).



Şekil 1.38. Eddy difüzyonunun şematik gösterimi (Chemistry Libretexts, 2016)

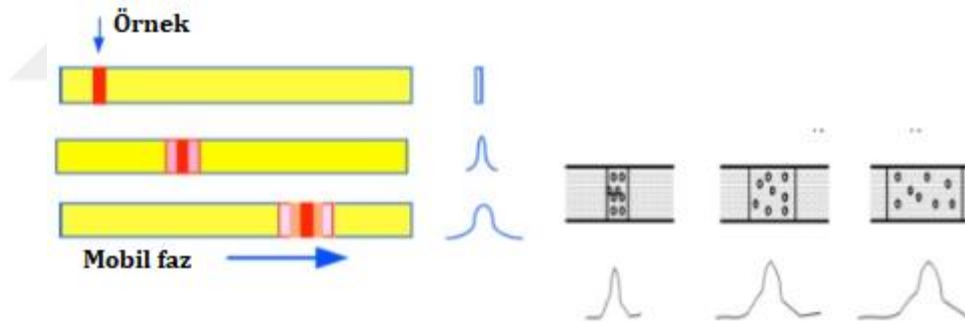
Taneciklerin hareketlerini etkileyen Eddy difüzyonuna ilaveten sabit fazda bulunan küçük çözücü birikintilerini de dikkate almak gerekir. Sabit faz olarak katı madde kullanıldığı zaman bu katı maddenin gözenekleri mobil faz ile dolar. Bu gözeneklerde bulunan analit tanecikleri veya molekülleri hareketli faza



geçmeden önce, bu gözeneklerde bulunan mobil fazdan difüzlenererek çıkması gerekir. Bu durum analit moleküllerinin fazlar arasındaki geçişini yavaşlatır ve dolayısıyla tabaka yüksekliğini artırır (Gündüz, 2007).

### 1.9.5.2. Konsantrasyon farkı difüzyonu (boyuna difüzyon)

Tabaka yüksekliğinde etkili olan ikinci faktör konsantrasyon farkı difüzyonudur. Madde kolon içinde aşağıya doğru indikçe tabakalardaki analit konsantrasyonunda değişme meydana gelir ve analitin tanecikleri bantların orta kısımlarında toplanmaya meyillendirler. Böylece bantların orta kısmında konsantrasyon artması olur. Konsantrasyon farkı olan yerlerde difüzyon başlar. Difüzyon, konsantrasyonu büyük olan kısımdan öne ve arkaya doğru olur. Bu da bant genişlemesine neden olur. Bant genişlemesi meydana gelince tabaka yüksekliği artar. Bu olay kolon uzunluğunca meydana geldiğinden buna boyuna difüzyon da denir (Şekil 1.39) (Gündüz, 2007).



Şekil 1.39. Boyuna difüzyonun şematik gösterimi (Slideplayer, 2010)

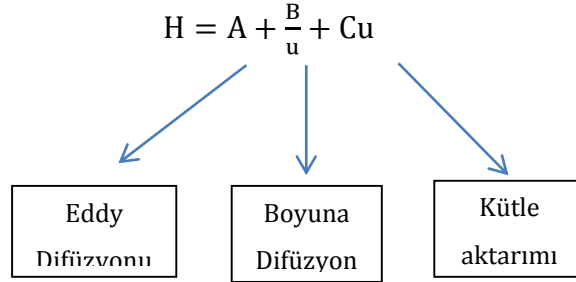
Kolonda kısa süre kalan örneğin kolona difüze olması daha azken, kolonda uzun süre kalan örnek daha çok difüze olur ve daha fazla bant genişlemesine neden olur (Slideplayer, 2010).

### 1.9.5.3. Kütle aktarımı

Bazı analit molekülleri difüzyonla durgun fazın gözeneklerinin içine nüfuz eder, burada uzun süre kalırlar. Bu süreçte diğer moleküller gözeneklerden ayrılırken

daha kısa süre vakit geçirirler; bu gözenekte daha az vakit geçiren moleküller kolonda daha ileriye taşınırlar ve bant genişlemesine neden olurlar.

Yukarıda verilen üç faktörün tabaka yüksekliğine etkisi Van Deemter tarafından formülize edilmiştir (Şekil 1.40).



Şekil 1.40. Van Deemter Eşitliği

**A**, Analit taneciklerinin kolon içinde farklı yollar izlemesi

**B/u**, Boyuna difüzyon

**Cu**, Kütle aktarımı

**u** hareketli fazın kolon içindeki hızıdır (Gündüz, 2007).

### **A faktörü**

A faktörüne Eddy difüzyonu da denir. Bu faktör analit taneciklerinin kolon içinde farklı yollar izlemesinden kaynaklanır. İyi doldurulmuş dar bir kolonda bu faktör ihmal edilebilir hale gelir.

### **B/u faktörü**

Boyuna difüzyondan ileri gelen bant genişlemesidir. Genelde hareketli fazın hızıyla ters orantılıdır. Hareketli faz ne kadar yavaş hareket ederse, analit kolonda o kadar çok difüzlenmiş olur.

## Cu faktörü

Cu mobil fazın hızıyla doğru orantılıdır. Mobil faz kolonda ne kadar hızlı hareket ederse denge kurulmasına yetecek zaman bulunamaz ve dolayısıyla kolonda bant genişlemesi meydana gelmez (Snyder vd., 2010).

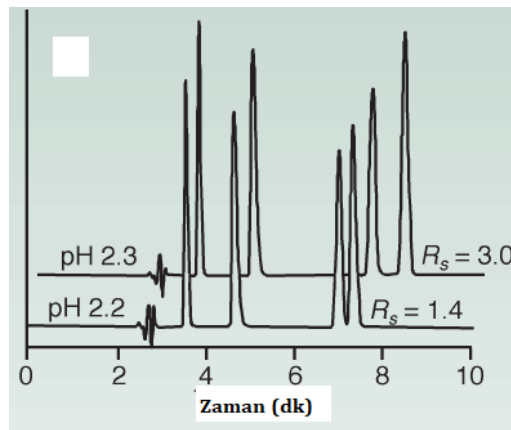
## Kolon ayırma gücü (Rezolüsyon)

Kolonun ayırma gücü HPLC'de analiz edilen numunelerin birbirinden ne kadar ayrıldıklarını gösteren kantitatif bir terimdir.  $R_s$  ile gösterilir ve Purnell eşitliği (1.18) ile hesaplanır.

Purnell eşitliği,

$$R_s = 1/4 \sqrt{N} \times \left( \frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \times \left( \frac{k_2}{1+k_2} \right) \quad (1.18)$$

Şekil 1.41'da pH 2.2'de 4-kloroanilin ve 3-aminobenzonitrile ait  $R_s$  değeri 1,4 tür ve ayrılma gerçekleşmemiştir. pH 2,3'e getirilerek iki bileşiğin ayrılması gerçekleştirilmiştir ( $R_s$ :3,0) (Dolan, 2002).



Şekil 1.41. Mobil faz pH'ındaki küçük değişimlerin ayırmaya etkisi (Dolan, 2002)

HPLC'de ayırma gücü, seçicilik, etkinlik ve alıkonmaya bağlıdır. Purnell eşitliğindeki  $1/4 \sqrt{N}$  etkinliği,  $\frac{\alpha-1}{\alpha}$  seçiciliği,  $\frac{k_2}{1+k_2}$  alıkonmayı ifade eder.

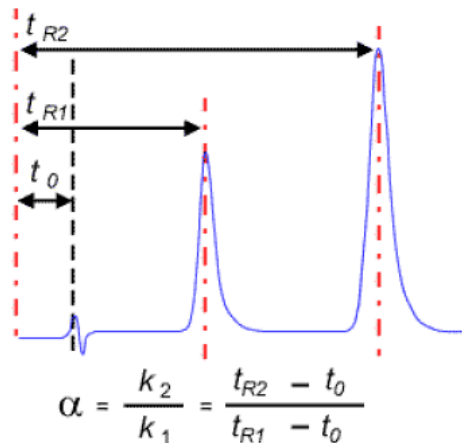
### Etkinlik

Kromatografik bir pikin etkinliği analitin HPLC sistemi ve kolondan geçerken analitin dağılımının ölçüsüdür. İdeal kromatografik pikin ince bir çizgi olması beklenir fakat dağılma (dispersiyon) etkisinden dolayı pik Gauss eğrisine benzer.

### Seçicilik faktörü

Seçicilik faktörü ( $\alpha$ ), kromatografik sistemlerin örnek bileşenlerini kimyasal olarak ayırabilme yeteneğidir (Şekil 1.42). Eş zamanlı analiz edilen iki pikin kapasite faktörlerinin oranıyla hesaplanır. Seçicilik, Eşitlik 1.19 yardımıyla hesaplanır (Chromacademy, 2011).

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R2} - t_0}{t_{R1} - t_0} \quad (1.19)$$

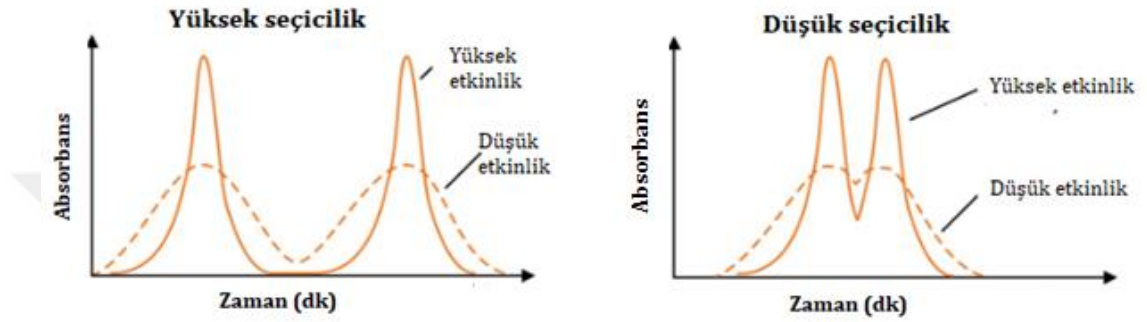


Şekil 1.42. Seçiciliğin şematik olarak gösterimi

Kromatografik ayırmada seçicilik faktörünün 1'den büyük olması gerekir. Seçicilik faktörü 1 olduğunda iki pik birlikte elüe olur ve ayırma gerçekleşmez.

1,15 seçicilik faktörü değeri kromatografik analizler için uygundur (Chromacademy, 2011).

Kromatografik kolonun etkinliğini kalitatif ölçüsü olan N, elüsyon sırasında pikin ne kadar simetrik ve dar olduğunu yansıtır. İki analitin ayrılması seçicilik ile belirlenir. Etkinlik düşük bile olsa yüksek seçicilik değeri yeterli ayırmayı sağlayabilir. Ayırmada ideal olan ise yüksek etkinlik ve yüksek seçiciliğin elde edilmesidir (Şekil 1.43) (Hegyi vd., 2013).



Şekil 1.43. Etkinlik ve seçiciliğin ayırma üzerine etkisi (Hegyi ve Kovács, M., 2016)

Ters faz sıvı kromatografide seçiciliği etkileyen parametrelere bakıldığında;

- Organik modifiyerin çeşidini değiştirmek,
- Mobil faz pH'ını değiştirmek (asidik veya bazik karakterli analitlerin iyonlaşma derecesini değiştireceğinden hidrofobisitesini etkiler),
- Kolonu değiştirmek (seçiciliğin değiştirilmesinde kullanılan en yaygın yoldur),
- Kolon sıcaklığını değiştirmek (Chromacademy, 2011).

seçiciliği etkilemektedir.

İyonlaşabilen analitlerle çalışıldığında mobil faz pH'ının değiştirilmesi genellikle seçiciliğin optimizasyonunda anahtar parametredir. Mobil faz değiştirilirken dikkat edilmesi gereken nokta kolonun çalışabileceği pH aralıklarının dışına çıkılmamasıdır.

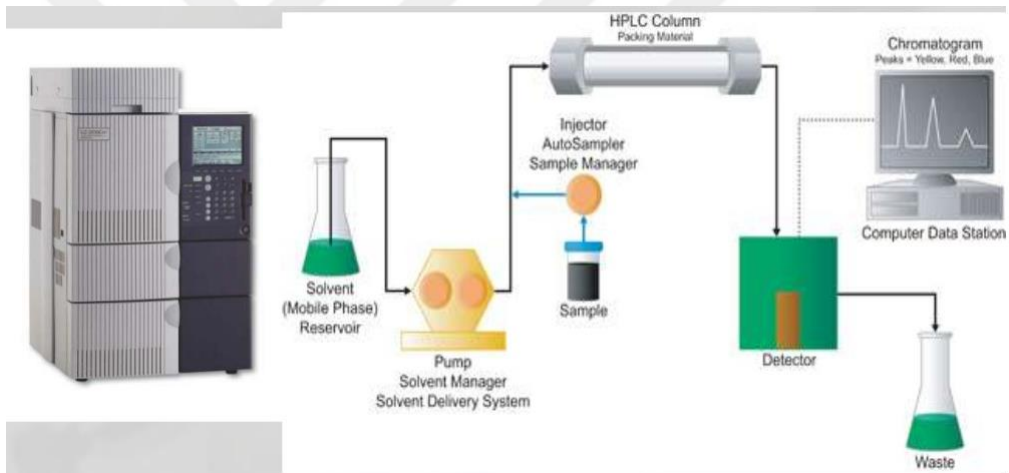
## Alıkonma zamanı

Alıkonma zamanı başlığı altında detaylı şekilde açıklanmıştır.

### 1.10. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Cihazı

Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi cihazı,

- ❖ Kolon
- ❖ Dedektör
- ❖ Yüksek basınçlı pompa
- ❖ Enjeksiyon ünitesi
- ❖ Kromatografik yazılım sisteminden oluşmaktadır (Şekil 1.44).



Şekil 1.44. Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazının şematik gösterimi (Waters, 2011)

#### 1.10.1. HPLC'de kullanılan kolon çeşitleri

1. Silika temelli durgun fazlar
2. Hidrofilik interaction liquid chromatography (HILIC) için durgun fazlar
3. Zirkonyum oksit temelli durgun fazlar
4. Polimerik durgun fazlar
5. Monolitik durgun fazlar
6. Hibrid durgun fazlar (2 mikrondan küçük fazlar)
7. Core-shell durgun fazlar olarak sınıflandırılmaktadır (Solich, 2015).

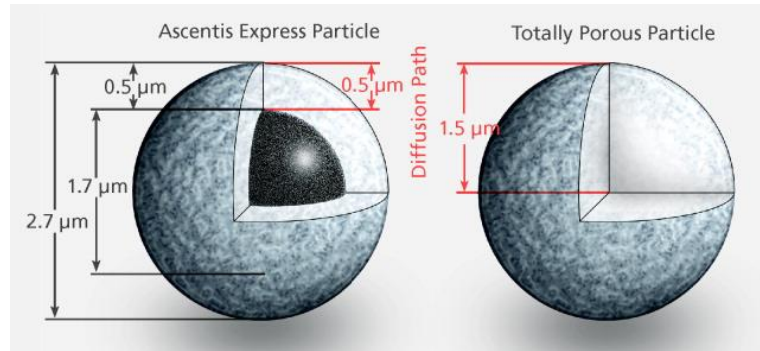
Kromatografi çeşitleri arasında HPLC, araştırma, klinik testler teşhis ve üretim için gerekli analizlerde en yaygın kullanılan kromatografik tekniktir (Snyder, vd., 2010). HPLC'de packed (dolgu maddesi içeren, paketlenmiş) ve monolitik kolonlar durgun faz olarak rutin analizlerde tercih edilir. Silika, packed kolonlarda en yaygın kullanılan dolgu materyalidir. Monolitik kolonlarda ise hem gözenekli silika hem de çapraz bağlı polimerler sıklıkla kullanılmaktadır (Fekete vd., 2012).

Yüksek derecede birbirine bağlı gözeneklerden oluşan monolitler, düşük geri basınç ve hızlı ayırma için monolitik kolonlarda yaygın şekilde kullanılır (Unger, vd., 2008). Geniş gözenekler makro gözenek kategorisindedir (>50 nm). Silika monolitler için, silika duvarda makro gözeneklere ek olarak mezaporlar (2-50 nm) bulunur. Yüksek derecede birbirine bağlı gözenekler sayesinde yüksek akış hızında bile yüksek geçirgenlik ve düşük geri basınç sağlanabilmektedir. Monolitik kolonlardaki en büyük engel gözenek yapısının tekrar üretilebilirliğindeki zorluklar ve kolon içine monoliti uygun şekilde kaplayabilmektir. Buna ek olarak monolitik kolonlarda mekanik kararlılık genellikle zayıftır. Polimer monolitlerde ise çözücü varlığında şişme problemi ile karşılaşılmaktadır (Hayes vd., 2014).

Silika mikroküreler içeren packed kolonlar yaygın şekilde piyasada kullanılmaktadır. Çeşitli polimer ve seramik mikroküreler dolgu materyali olarak yaygın şekilde kullanılmasına rağmen, silika mikroküreler en çok araştırılan ve en yaygın kullanılan dolgu materyalidir. Gözenekli olmayan küçük parçacıklar için, ayırma parçacığın yüzeyinde meydana gelir ve kısa difüzyon yolundan bant genişlemesi azaltılmıştır ve bu hızlı kütle transferine izin verir. Fakat küçük yüzey alanından ötürü alıkonma, seçicilik ve ayırma gücü sınırlıdır. Yükleme kapasitesi ciddi bir konudur. Gözenekli silika mikroküreler için, parçacık yüzeyine ek olarak gözenek yüzeyleri de analit ile etkileşim için daha fazla yüzey alanı sağlamaktadır. Sıvı fazda ayırmalar için yeterli kütle transferine izin vermesi için gözenek boyutunun 7 nm'den büyük olması gerekmektedir (Unger vd., 2008).

Silika parçacıkların boyutu ve dolgu maddesi hazırlama kalitesi packed kolonların performansını önemli derecede etkilemektedir. Küçük çaplı monodispers silika parçacıklar yüksek performanslı ayırmayı sağlamak için kullanılır. Fakat bu küçük parçacıklar ile geri basınç önemli derecede artmaktadır. 2  $\mu\text{m}$ 'den küçük mikroküreler, porlu silika mikroküreler için günümüzde en gelişmiş materyaldir. Silika mikroküreler üzerinde hızlı ayırmayı başarmak için doğru yaklaşım akış hızını artırmak ve kolon boyunca basıncı düşürmektir. Bu şekilde ultra yüksek basınçlı sıvı kromatografi geliştirilmiştir (Hayes vd., 2014).

Son zamanlarda yüksek akış hızı ve oldukça düşük geri basınçlı etkili ayırmalar için, core-shell silika parçacıklar (solid core (katı çekirdek) ve porlu kabuk (shell) veya yüzeysel gözenekli (superficially porous) yapılar yaygın şekilde kullanılmaktadır (Şekil 1.45) (Guiochona ve Gritti, 2011). Solid core ve gözenekli kabuk daha geniş parçacık boyutu ile ayırma meydana gelirken porlu kabuk ve solid core daha geniş yüzey alanı sağlamaktadır (Brice vd., 2009). Dolgu materyali olarak core shell parçacıkların avantajı, küçük por hacminin boyuna difüzyonda (Van Deemter eşitliğindeki B terimi) bant genişlemesi için mevcut olan hacmi azaltmaktır. Kısa difüzyon yolu hızlı kütle transferinden ötürü C teriminin katkısını da azaltmaktadır (Van Deemter vd., 1956; Wu ve Clausen, 2007).

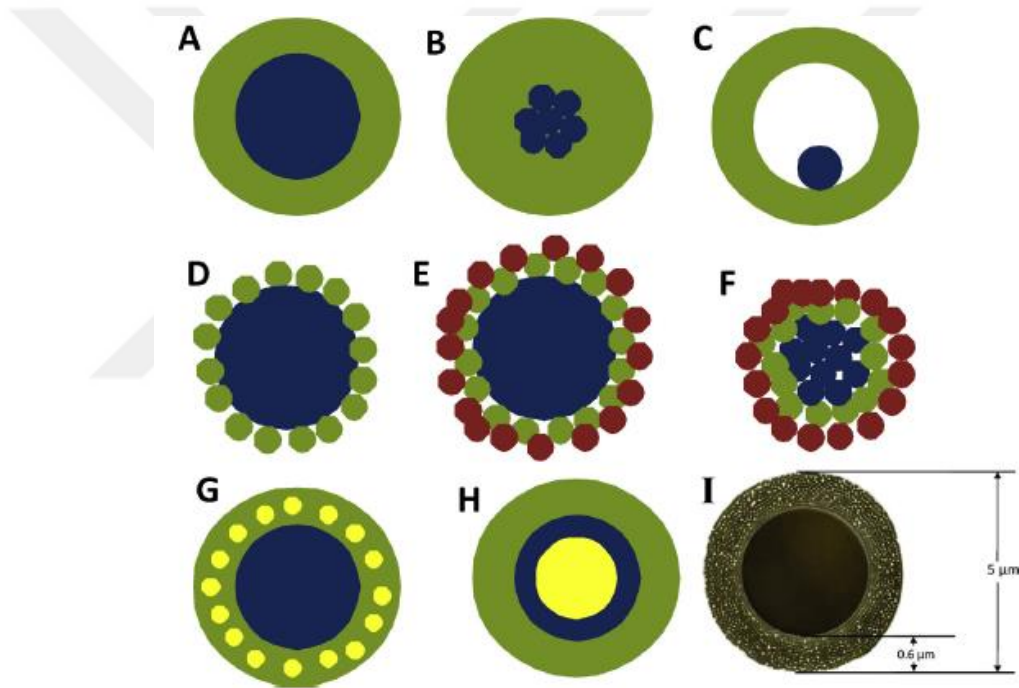


Şekil 1.45. Core shell parçacıkların şematik gösterimi (Solich, 2015).

Core-shell parçacıkları adından da anlaşılacağı üzere core (çekirdek) ve shell (kabuk)'den oluşan parçacıklardır. Çekirdek ve kabuk aynı materyalden



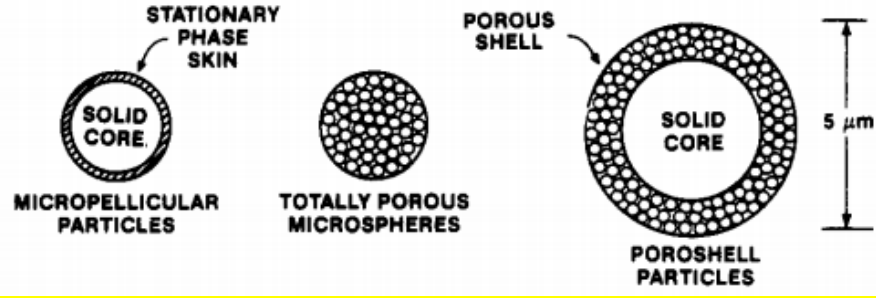
olabileceği gibi farklı materyallerden de oluşabilir. Çekirdek tekli kürelerden (1.46A) oluşabileceği gibi çeşitli küçük kürelerin bir araya gelmesiyle de oluşabilir (1.46B). Kabuk yapısı küçük kürelerin içeride olduğu, içi boş kabuğa da sahip olabilir (1.46C) (Liu vd., 2011). Kabuk yapısı sürekli bir tabaka şeklinde (1.46A-C) ya da küçük kürelerin büyük çekirdek küre üzerine bağlanmasıyla (1.46D ve 1.46E); veya çekirdek kürelerin biraraya toplanmasıyla da meydana gelir (1.46F). Kompleks core-shell yapıları küçük kürelerin kabuk içinde (1.46G) (Insin, vd., 2008), ya da çoklu kabuklar (1H) ile birleşmesi aracılığıyla da yapılır. Hem kabuk hem de çekirdek porlu olmayan katılardan veya istenilen gözenekli yapıdan oluşturulabilir (Şekil 1.46).



Şekil 1.46. Core-shell parçacıkların farklı tiplerinin şematik gösterimi

Core-shell parçacıkları iki basamaklı ya da daha fazla basamak içeren prosedürler ile sentezlenebilir. Core parçacığı ilk olarak sentezlenir ardından core parçacığın üzerine kabuk oluşturulur. Core-shell mikroküreler için, polistiren, polimetilmetakrilat ve silika mikroküreler core yapıda kullanılır. Kabuk yapısında ise metal nanoparçacıklar veya okside nanoparçacıklar kullanılır (Deng ve Marlow, 2012).

5- $\mu\text{m}$  katı core ve 1- $\mu\text{m}$ -kalınlığındaki dış tabakaya sahip silika mikrokürelerin hazırlanması Şekil 1.47’de gösterilmiştir (Kirkland, 1992).



Şekil 1.47. Yüksek hızlı HPLC ayırmalarında parçacık tipleri (Kirkland, 1992)

### 1.10.2. HPLC’de kullanılan dedektörler

HPLC dedektörleri kromatografik kolondan elüe olan karışım bileşenlerini görünür kılmak için kullanılır (Bala, 2012).

HPLC’de kullanılan dedektörler,

- UV dedektörler
- Refraktif indeks dedektörler
- Floresans dedektör
- Elektrik iletkenlik dedektörü
- Elektrokimyasal dedektör
- Transport dedektörler
- Buharlaştırmalı ışık saçılması dedektörü
- Kütle spektrometresi
- Radyoaktivite dedektörü’dür (Beşergil, 2015).

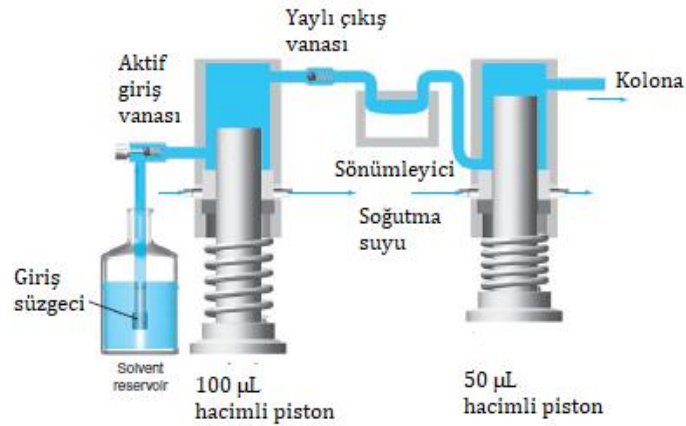
Sıvı kromatografi sistemleri için çok çeşitli dedektörler geliştirilmiş olmasına rağmen burada, HPLC’de en yaygın kullanılan UV dedektörden bahsedilecektir.

İdeal bir dedektör her analitin düşük derişimine duyarlı, doğrusal yanıt veren ve kromatografiden çıkan piki genişletmeyen özelliktedir. Ayrıca sıcaklık ve çözücü

bileşiminde meydana gelebilecek herhangi bir değişikliğe karşı duyarsızdır. UV dedektör HPLC’de en sık kullanılan dedektör çeşididir, çünkü birçok madde mor ötesi ışını absorplama özelliğindedir. Basit sistemler, 254 nm’de şiddetli bir emisyon yapan bir civa buharı lambası veya çinko ya da kadmiyum buharı lambalarından üretilen diğer kesikli morötesi dalga boylarını kullanırlar (Harris, 2011).

### 1.10.3. HPLC’de kullanılan pompalar

HPLC’de kullanım için kaliteli bir pompa bu pompanın ne kadar kararlı ve tekrarlanabilir bir akış oluşturabilmesiyle ölçülür. Yükselip alçalan bir akış hızı zayıf sinyalleri engelleyen bir dedektör gürültüsü oluşturabilir (Şekil 1.48) (Harris, 2011).



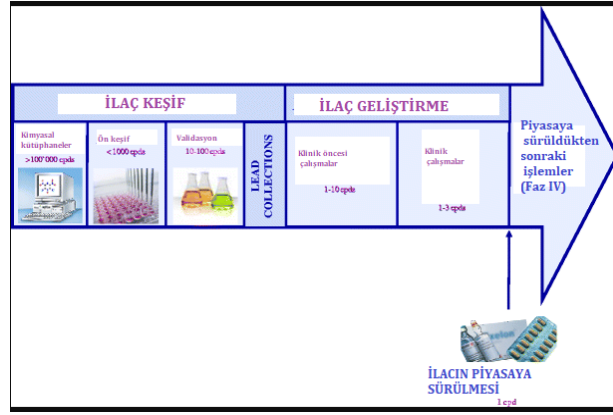
Şekil 1.48. HPLC'nin yüksek basınçlı piston pompası (Harris, 2011)

### 1.11. Fizikokimyasal Özellikler

İlaç araştırmaları kompleks ve zaman alıcı süreçlerdir (Henchoz vd., 2009). Farmasötik bir ürünün piyasaya sürülmesi, maliyeti bir milyon dolardan fazla olan, 12-15 yıllık bir zaman dilimini kapsar. İlaç araştırma süreci ikiye ayrılır:

- i) İlaç keşif çalışmaları: hedef belirleme, ön keşif ve ön optimizasyondan oluşur.

ii) İlaç geliştirme çalışmaları: klinik öncesi ve klinik çalışmalardan meydana gelir (Şekil 1.49).



Şekil 1.49. İlaç araştırma süreçlerinin aşamaları (Henchoz vd., 2009)

İlaç keşif çalışmalarında, mümkün olan en kısa sürede, tercihen ilaç adayı molekül ön optimizasyon fazına girmeden önce bu çalışmaların gerçekleştirilmesine büyük önem verilmektedir. Bu yolla sadece yüksek potansiyelli ve uygun farmakokinetik özelliklere sahip bileşikler ilaç geliştirme çalışmaları için seçilmektedir (Faller ve Wohnsland, 2001; Henchoz vd., 2009).

Yüksek verimli tarama teknolojisinin (high throughput screening, HTS) ve kombinatoriyal (bütünleştirici) kimyanın ortaya çıkışı ve farmasötik araştırmaların artan maliyeti, ilaç keşif çalışmalarının erken aşamalarında bileşiğin farmakokinetik özelliklerinin tahmini ve daha iyi anlaşılması için etkili metotların geliştirilmesine ihtiyaç duymaktadır. Biyoyararlanımlı oral ilaçların tasarımında (Curatolo, 1998; Krämer, S.D., 1999; Yoshida ve Topliss, 2000), kanbeyin dağılımında (van de Waterbeemd ve Kansy, 1992; Chikhale vd., 1994) ve oral dozaj form için formülasyon geliştirmede (Leuner ve Dressman, 2000), fizikokimyasal özellikler çok önemlidir (Kibbey vd., 2001).

Fizikokimyasal özellikler ilacın gelişme zamanını/maliyetini artıracak ve klinik girişi geciktirecek olan formülasyon, proses geliştirme ve güvenlik konusunda oluşabilecek gelişme güçlüklerine erken uyarı vermektedir (Kerns, 2001).

İlaç keşif çalışmalarında fizikokimyasal parametreler absorpsiyon, dağılma, metabolizma ve atılım (ADME; absorption, distribution, metabolism ve excretion) davranışını etkileyen anahtar özelliklerin erken aşamada anlaşılmasına olanak verir. Ayrıca ilaç keşif deneylerinin doğru bir şekilde planlanmasını ve yorumlanmasını sağlar (Kerns ve Di, 2004). Bu parametrelerin bilinmesi birçok ADME prosedürüne kıyasla maliyetten, zamandan ve deney hayvanlarının kullanımından da tasarruf sağlar (Faller ve Wohnsland, 2001).

Yapılan kapsamlı literatür çalışmalarında ilaçların fizikokimyasal özellikleri ile beyin-kan dağılımı arasında bir ilişki mevcuttur. Son zamanlarda, tek başına kimyasal yapıya dayanan hesaplamalar kullanılarak, yapısal olarak farklı, çok sayıda bileşik için beyinde ilaç dağılımının tahmini başarılmıştır (van de Waterbeemd ve Kansy, 1992; Lombardo vd., 1996; Basak vd., 1996; Curatolo, 1998).

İlaç araştırmalarının erken basamaklarında bilinmesi gerekli beş ana fizikokimyasal parametre vardır. Bunlar iyonlaşma sabiti ( $pK_a$ ), çözünürlük, permeabilite (geçirgenlik), kararlılık ve lipofilisite ( $\log P_{o/w}$ )'dir (Kerns ve Di, 2004).

Çözünürlük,  $\log P_{o/w}$  ve  $pK_a$  iyi oral absorpsiyona sahip ilaçları tanımlayan en önemli fizikokimyasal parametreler arasındadır (Kibbey vd., 2001). Bu fizikokimyasal özellik bileşiğin ADME davranışının tahminine izin vermektedir (Smith vd., 1996; Kerns, 2001). Çünkü ilaç adayı moleküllerin % 30'u ilaç geliştirme çalışmalarının son aşamalarında ADME davranışındaki eksiklikler nedeniyle reddedilmektedir (Halliday vd., 1997; Pascoe vd., 2006).

Bileşiklerin oral absorpsiyonunun değerlendirilmesinde, hesaplanmış ve deneysel olarak ölçülen fizikokimyasal parametrelerin birleşimine dayanan ve belirlenmiş kuralları içeren çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Lipinski'nin 5 kuralı, bileşikler molekül ağırlığı,  $\log P$ , H bağı donör-akseptör sayısı ve sudaki çözünürlük gibi parametrelere dayalı olarak sınıflandırmaktadır (Kibbey vd., 2001).

Lipinski'nin 5 kuralına göre,

- ✚ H-bağı donör sayısı 5'ten fazla olduğunda,
- ✚ Molekül ağırlığı 500'den büyük olduğunda,
- ✚ logP 5'ten büyük olduğunda (veya MlogP 4,15ten büyük olduğunda)
- ✚ H bağı akseptör sayısı 10'dan büyük olduğunda (N ve O'ların toplamı olarak ifade edilir),

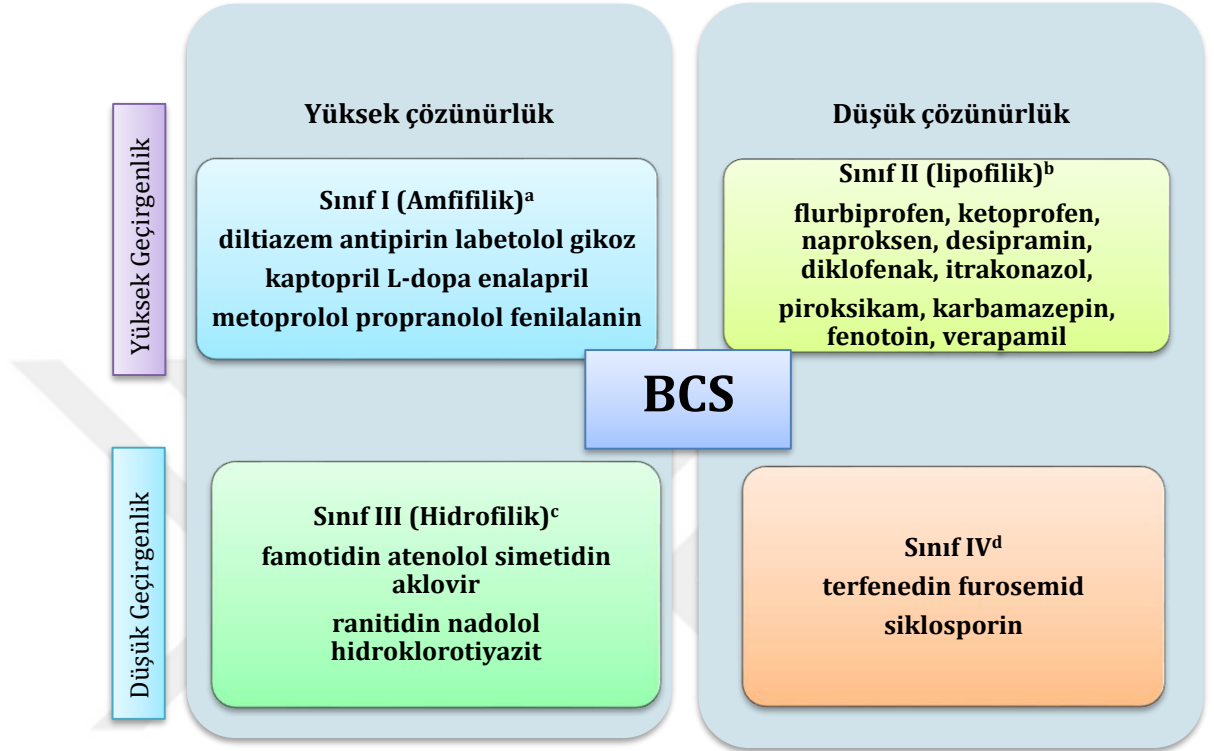
İlaç moleküllerinin düşük absorpsiyonu muhtemeldir. Biyolojik taşıyıcıların substratları olan bileşik sınıfları Lipinski'nin beş kuralının dışındadır (Lipinski vd., 2001).

### **1.11.1. Asit-Baz İyonlaşma Sabiti (pK<sub>a</sub>)**

İlaç adayı moleküllerin fizikokimyasal özelliklerinin belirlenmesi oldukça önemlidir; çünkü uygun olmayan fizikokimyasal özellikler geliştirme fazında ilaç adayı moleküllerin yaklaşık %30-40'ının geri çekilmesine sebep olmaktadır. Biyofarmasötik sınıflandırma sisteminde (biopharmaceutic classification system, BCS) (Şekil 1.50) (Avdeef, 2003) ilaç adayı moleküller için en önemli iki fizikokimyasal parametre çözünürlük ve geçirgenliktir (Avdeef, 2001) ve bu parametreler diğer fizikokimyasal özelliklerden etkilenmektedirler. Örneğin geçirgenlik doğrudan membranda alıkonmayla ilişkili olan lipofiliseteden ve ilacın aktivasyon bölgesinin pH'ından etkilenmektedir. Bu yüzden asidik ve bazik bileşikler için ilacın geçirgenliğinin temel faktörü ilacın asit-baz iyonlaşma sabiti (pK<sub>a</sub> değeri)'dir.

Asit-baz iyonlaşma sabitinin (pK<sub>a</sub>), ilaç ve kimyasalların biyofarmasötik özellikleri üzerindeki etkisi, ilaç ve kimya endüstrisinde uzun süredir bilinmektedir. İlaçların büyük çoğunluğu zayıf asidik veya bazik fonksiyonel grup taşıdığından, her bir durumda iyonlaşma sabitinin bilinmesi farklı pH değerlerinde molekülün hangi formda bulunacağıyla ilgili bilgi verir. Molekülün hücre membranından geçme hızı ve kan beyin bariyeri gibi engellerden difüze olduğu fizyolojik sistemlerde, pK<sub>a</sub> özellikle önemlidir. Bir ilacın pK<sub>a</sub>'sı, ADME

gibi farmakokinetik (PK) özellikleri doğrudan etkileyen lipofiliteyi, çözünürlüğü, protein bağlanma ve geçirgenliği de etkiler (Avdeef, 2001; Kerns ve Di, 2004; Manallack, 2007)

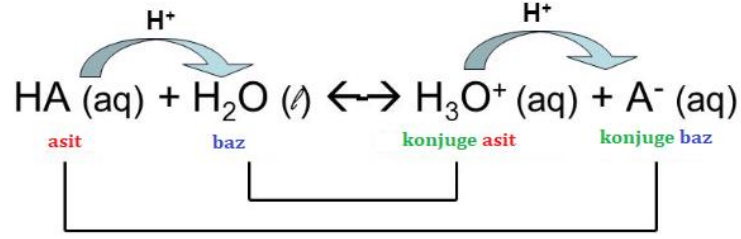


- Çözünme hızı *in vivo* absorpsiyonu sınırlandırır.
- Çözünürlük absorpsiyon akışını sınırlandırır.
- Geçirgenlik hızı belirler.
- IVIV (*in vivo-in vitro*) korelasyon beklenmektedir (Avdeef, 2003)

Şekil 1.50. Biyofarmasötik sınıflandırma sistemi (BCS) (Avdeef, 2003)

Günümüzde ilaç moleküllerinin çoğu asidik veya bazik karaktere sahip olacak şekilde tasarlanmaktadır. İlaç moleküllerinin hasta vücudunda farklı dozaj formlarında başladıkları yolculukta, bu moleküllerin vücuttaki dağılımları molekülün asidik-bazik karakterinden önemli derecede etkilenmektedir (Beale ve Block, 2010).

İlaç kimyacıları moleküllerin asidik veya bazik karakterinin belirlenmesinde Brønsted ve Lowry tarafından geliştirilen asit-baz kavramını kullanmaktadır. Brønsted ve Lowry'e göre asit proton veren tür; baz ise proton kabul eden tür olarak tanımlanmaktadır (Şekil.1. 51) (Beale ve Block, 2010).



Şekil 1.51. Zayıf asitin iyonlaşmasının Bronsted ve Lowry asit-baz tanımına göre gösterimi (Slideplayer, 2016)

Zayıf asidik özellik gösteren ilaç molekülünün iyonlaşma dengesine bakıldığında,



Zayıf asidik özellik gösteren ilaç molekülünün iyonlaşma sabiti,

$$K_a = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (1.21)$$

Zayıf bazik özellik gösteren ilaç molekülünün iyonlaşma dengesi,



Zayıf bazik özellik gösteren ilaç molekülünün iyonlaşma sabiti,

$$K_a = \frac{[\text{H}_3\text{O}^+][\text{B}]}{[\text{BH}^+]} \quad (1.23)$$

eşitlikleriyle ifade edilir.

İyonlaşma sabitinin eksi logaritması  $pK_a$  değerini verir.  $pK_a$ , molekülün fonksiyonel gruplarının (tek iyonlaşabilen grup içeren moleküller) %50'sinin iyonlaştığı pH değeri olarak tanımlanır (Blagbrough vd., 2011).

$$pK_a = -\log K_a \quad (1.24)$$

$pK_a$ , pH, iyonlaşan ve iyonlaşmayan türlerin ilişkisi Henderson-Hasselbalch eşitliği ile açıklanır (Henderson, 1908).



Zayıf asidik türler için Henderson–Hasselbalch eşitliği,

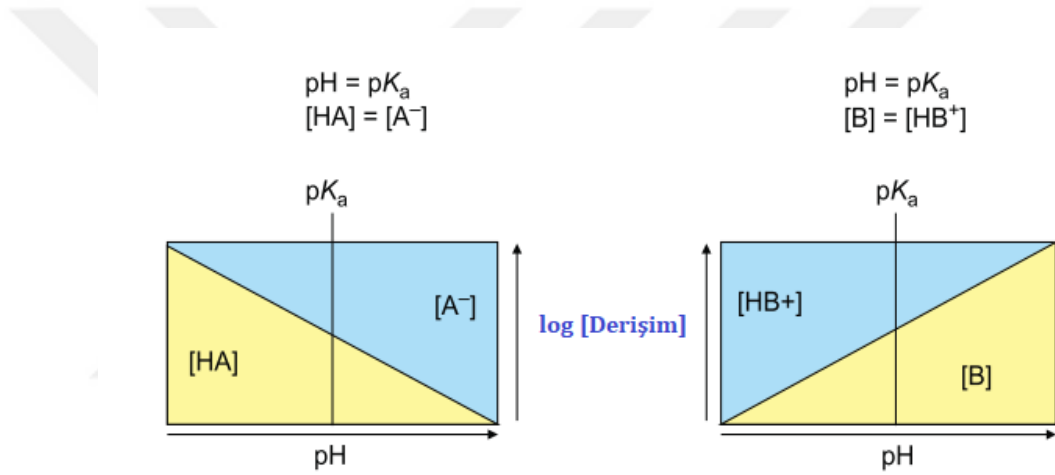
$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{konjuge baz}]}{[\text{asit}]} = \text{pK}_a + \log \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (1.25)$$

Zayıf bazik türler için Henderson–Hasselbalch eşitliği,

$$\text{pH} = \text{pK}_a - \log \frac{[\text{konjuge asit}]}{[\text{baz}]} = \text{pK}_a - \log \frac{[\text{BH}^+]}{[\text{B}]} \quad (1.26)$$

şeklindedir (Blagbrough vd., 2011).

Henderson-Hasselbalch eşitliğine göre pH'ın pK<sub>a</sub>'ya eşit olduğu durumda çözeltide iyonik ve nötral türün derişimi birbirine eşittir (Şekil 1.52).

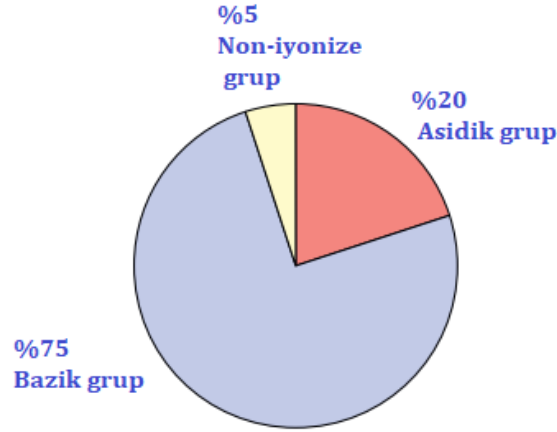


Şekil 1.52. pK<sub>a</sub>'nın altındaki ve üstündeki pH değerlerinde asidik ve bazik bileşiklerin nötral ve iyonik türleri için derişiminin gösterilmesi (Di ve Kerns, 2016)

Organik asitler düşük pK<sub>a</sub> değerine sahipken (karboksilik asitler  $\cong 4$ ) bu pK<sub>a</sub> değeri arttıkça molekülün asitliği azalmaktadır. Organik bazlar ise yüksek pK<sub>a</sub> değerine sahiptir (alifatik aminler  $\cong 9.5$ ), pK<sub>a</sub> değeri azaldıkça bazlık değeri azalmaktadır (Di ve Kerns, 2016).

İlaç moleküllerinin çoğu en az bir tane asidik ve/veya bazik fonksiyonel grup içerir ve ticari olarak mevcut ilaçların %95'i fizyolojik pH'ta iyonlaşmaktadır (Wan ve Ulander, 2006). İlaç moleküllerinin çoğunluğu bazik grup taşıırken, asidik grup taşıyanların miktarı daha azdır (Şekil 1.53). Williams ve Dünya ilaç endeksinin verilerine göre asidik, bazik ve nötral fonksiyonel grup taşıyan ilaç

moleküllerinin yüzdeleri Şekil 1.53 ve Çizelge 1.4'de verilmiştir (Manallack, 2007).



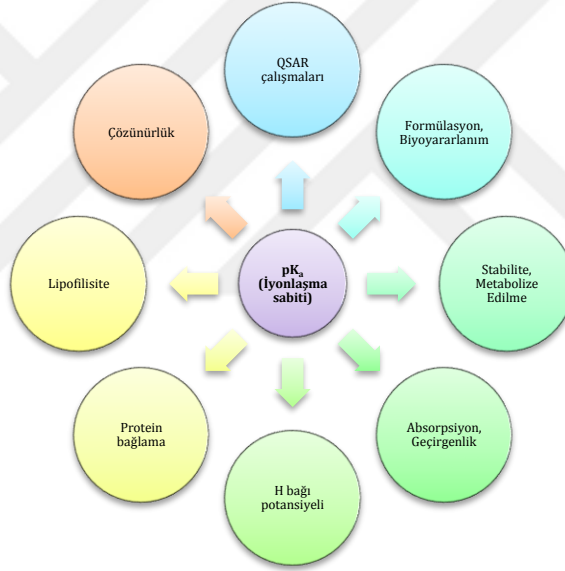
Şekil 1.53. İlaçların içerdikleri fonksiyonel gruba göre mevcut yüzdeleri

Çizelge 1.4. Williams ve Dünya ilaç endeksinin verilerine göre asit ve bazların yüzdesi (Manallack, D.T., 2007)

Veri seti	1 asit	1 baz	2 asit	2 baz	1 asit ve 1 baz	Diğerleri
Williams	%24,4	%45,4	%3,8	%10,5	&11,2	%4,8
Dünya İlaç İndeksi	%11,6	%42,9	%3,0	%24,6	%7,5	%10,4

Asit-baz iyonlaşma sabiti bileşiğin temel özelliğidir ve ilaç çözeltilerinde asit-baz dengelerinin araştırılması, ilaç moleküllerinin aktivitelerinin anlaşılmasında çok önemlidir (Jiménez-Lozano vd., 2002). İlaç moleküllerinin en önemli fizikokimyasal parametrelerinden biri olan iyonlaşma sabitinin ( $pK_a$ ) bilinmesi birçok uygulama ve araştırma alanında hayati öneme sahiptir (Taka'cs-Nova'k vd., 1997; Erdemgil vd., 2007). İncelenen ilaç molekülünün iyonlaşma sabiti ( $pK_a$ 'sı) ilacın lipofilite, çözünürlük gibi fizikokimyasal özelliklerini; biyolojik membranlar arasından ilaç molekülünün difüzyonunu, molekülün kan-beyin bariyerinden geçişini (Clark, 2003), hedef proteinlere bağlanmasını, kardiyak potasyum iyon kanalının bloke edilmesini etkiler. Bu özellikler ilaç molekülünün absorpsiyon, dağılma, metabolizma, atılım ve toksisite (ADMET) özelliklerini etkiler (Rupp vd., 2011; Sun ve Avdeef, 2011).

İyonlaşabilen maddelerin kromatografik alıkonması ve elektroforetik davranışları bileşiğin  $pK_a$  değerine ve mobil faz pH'ına bağlıdır (Taka'cs-Nova'k vd., 1997; Erdemgil vd., 2007). İlaç molekülleri çözeltide farklı mikroskopik formlarda bulunur. Bu moleküllerin  $pK_a$  değerlerini bilmek verilen pH'ta çözelti içinde hangi mikrotürün baskın olduğunu tanımlamaya yardımcı olur ve bu, ilaç çalışmalarında ve kataliz reaksiyonlarında yapı-aktivite ilişkileri için önemlidir (Ho, 2011; Seybold ve Shields, 2015). İlaç formülasyonlarında iyonlaşma sabiti, yardımcı maddeler ve karşıt iyonun doğru şekilde seçilmesinde önemlidir. Buna ek olarak  $pK_a$ , QSAR (quantitative structure activity relationship, kantitatif yapı-aktivite ilişkisi) çalışmaları ile ilgili tanımlayıcıdır (Wan ve Ulander, 2006) (Şekil 1.54). Bu faktörler incelendiğinde molekülün iyonlaşma sabitinin neden önemli olduğu anlaşılmaktadır (Cruciani vd., 2009).



Şekil 1.54.  $pK_a$ 'nın diğer fizikokimyasal özelliklere etkisi ve diğer parametrelerle ilişkisi (Wan ve Ulander, 2006)

### 1.11.2. Çözünürlük

Çözünürlük ilaç geliştirme çalışmalarında temel öneme sahiptir. İlaç molekülü hedefine ulaşabilmek için çözünür özellikte olmalıdır ve ilaç keşif ve geliştirme çalışmalarında ilaç adayı molekülün reddedilmesinin en önemli nedenlerinden biri zayıf çözünürlük olarak görülmektedir (Alsenz ve Kansy, 2007).

Sulu çözeltilerde iyonik moleküller nötral moleküllerden daha çok çözünürler. Çözünürlük, hem nötral molekülün hem de iyonlaşan molekülün tam çözünürlüğü (intrinsic solubility) ile belirlenir. Bu ilişki Henderson-Hasselbalch tarafından önerilen eşitlikle de anlatılmaktadır: (Di ve Kerns, 2016).

Asidik türler için,

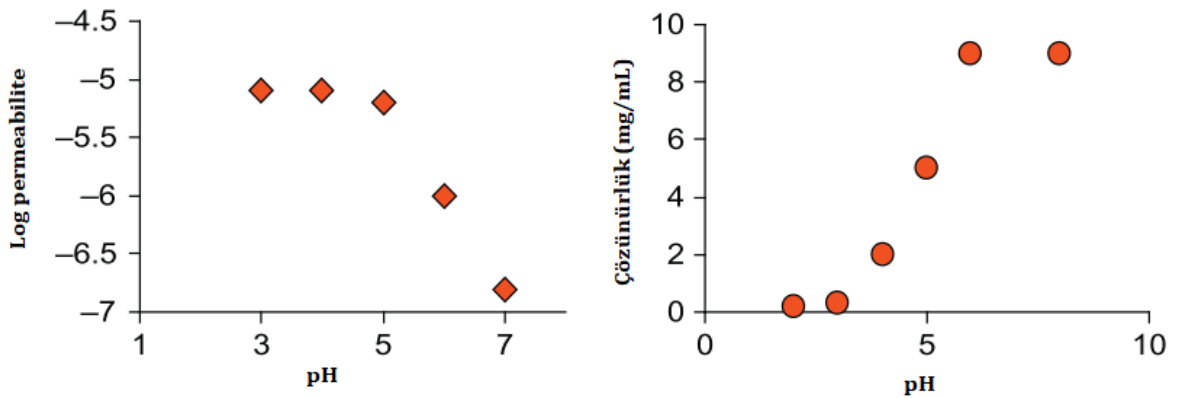
$$S = S_0(1 + 10^{(pH-pK_a)}) \quad (1.27)$$

Bazik türler için,

$$S = S_0(1 + 10^{pK_a-pH}) \quad (1.28)$$

$S_0$ , nötral bileşiğin çözünürlüğüdür. Eşitliklerde görüldüğü üzere çözünürlük pH ve  $pK_a$ 'ya bağımlı olarak değişmektedir (Şekil 1.55).

İyonik ve nötral moleküllerin permeabilitesine (hücre zarından geçişine) bakıldığında nötral moleküller hücre zarından daha kolay geçer. Çünkü nötral moleküller iyonik moleküllerden daha lipofiliktir ve geçiş pasif difüzyonla gerçekleşir (Şekil 1.55) (Di ve Kerns, 2016).



Şekil 1.55.  $pK_a$ 'sı 5 olan asidik bileşiğin permeabilite ve çözünürlüğünün gösterimi (Di ve Kerns, 2016)

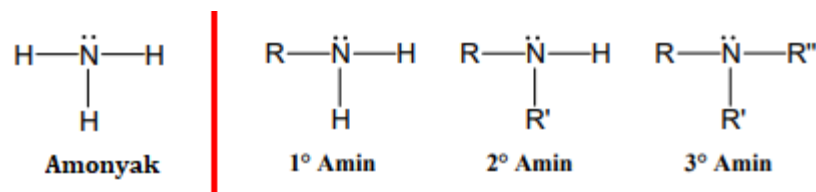
Permeabilite ve çözünürlük profillerinde iyonlaşma etkisinden dolayı çözünürlük artarken permeabilite azalmaktadır ya da tam tersi durum söz konusudur (Di ve Kerns, 2016).

### 1.11.3. Lipofilisite ( $\log P_{o/w}$ )

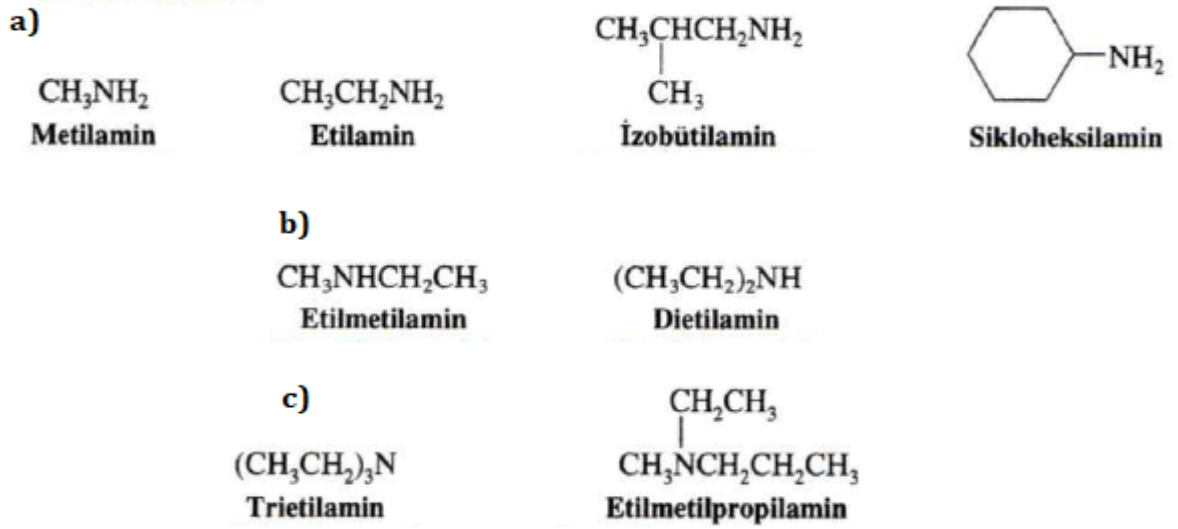
Su ve lipid ortam arasında bileşiğin dağılmasını tanımlayan lipofilisite ADME davranışını etkileyen diğer gerekli fizikokimyasal özelliktir. Bu özellik membran geçirgenliği, çözünürlük, protein bağlama ve metabolizmaya yaygın olarak katkıda bulunur (Henchoz vd., 2009).

### 1.14. Azot Atomu İçeren Bazı Heterosiklik Bileşikler ve $pK_a$ Değerleri

Azot (N), periyodik tabloda VA grubunda yer alan, bileşiklerinin çoğunda üç tane tekli bağ yapan ve bir tane ortaklaşmamış elektron çiftine sahip olan elementtir. Yapısında N atomu bulunduran aminler, amonyağın organik türevleridir ve amonyaktaki H bağlarının C gruplarıyla yer değiştirmesiyle elde edilir. Aminler N atomuna bağlı organik grupların sayısına göre primer ( $1^\circ$ ), sekonder ( $2^\circ$ ) ve tersiyer ( $3^\circ$ ) aminler olarak sınıflandırılır (Şekil 1.56-1.57), (Solomons ve Fryhle, 2002).

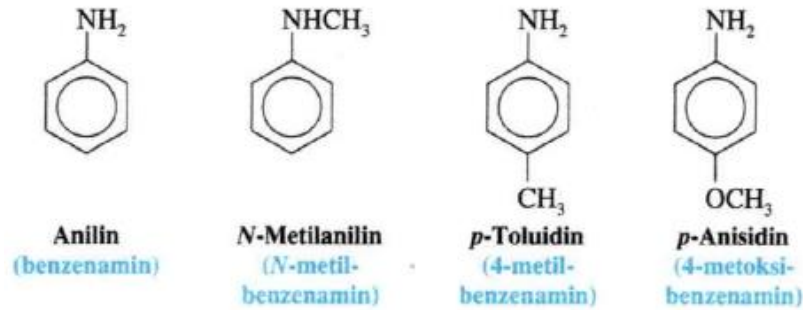


Şekil 1.56. Amonyak, primer, sekonder ve tersiyer aminlerin gösterimi (Angelo State University, 2016)



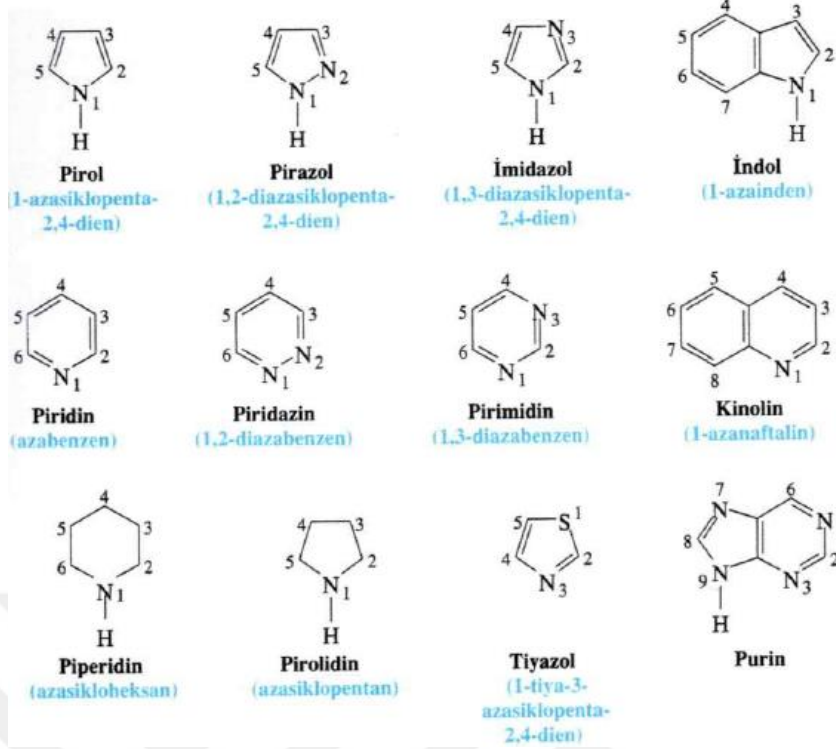
Şekil 1.57. Primer, sekonder ve tersiyer amin örnekleri (Solomons ve Fryhle, 2002)

Amonyanın bir ya da daha fazla hidrojen atomunun aromatik gruplarla yer değiştirdiği aril amin yapılarından yaygın olarak bilinen dört tanesi Şekil 1.58'de verilmiştir.



Şekil 1.58. Yaygın olarak bilinen dört arilaminin kimyasal yapısı (Solomons ve Fryhle, 2002)

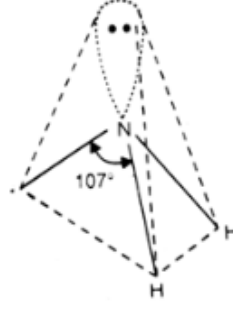
En az birtane heterosiklik halka içeren heterosiklik aminlerin kimyasal yapısı ise Şekil 1.59'da gösterilmiştir.



Şekil 1.59. Heterosiklik amin örnekleri (Solomons ve Fryhle, 2002)

Aminler orta polarlıkta bileşiklerdir. Kaynama noktaları benzer molekül ağırlığına sahip alkanlardan yüksek, alkollerden ise daha düşüktür. Primer ve sekonder aminlerin molekülleri birbirleriyle ve suyla güçlü Hidrojen (H) bağı yaparlar. Tersiyer aminlerin molekülleri birbirleriyle H bağı yapamazken, su ya da hidroksilli çözücülerin molekülleri ile H bağı yapabilme özelliğine sahiptirler. Bu yüzden tersiyer aminler benzer molekül ağırlığına sahip primer ve sekonder aminlerden daha düşük kaynama noktası değerine sahiptirler. Küçük molekül ağırlıklı bütün aminler suda çok çözünürler (Solomons ve Fryhle, 2002).

Pekçok aminin azot atomu, amonyaktaki gibi  $sp^3$  hibritleşmesi yapmıştır. 3 tane alkil grubu ya da H atomları bir düzgün dörtyüzlünün üç köşesine bağlanır, dördüncü  $sp^3$  orbitalinde ortaklaşmamış bir elektron çifti bulunur (Şekil 1.60).



Şekil 1.60.  $\text{NH}_3$ 'ün üçgen piramit şeklinin gösterimi (Zigya Technology Labs, 2018)

Aminlerin bazlığı incelendiğinde aminler nispeten zayıf bazlardır. Sudan daha güçlü bazdırlar fakat hidroksit, alkoksit ve karbanyonlardan çok daha zayıf bazık özellik gösterirler. Aminlerin bazlık kuvvetlerini karşılaştırmanın uygun yolu konjuge asitinin asitlik sabitlerini ( $\text{pK}_a$ ) karşılaştırmaktır.



$$K_a = \frac{[\text{RNH}_2][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{RNH}_3^+]} \quad (1.30)$$

Eğer amin kuvvetli bir baz ise onun konjuge asidi zayıf asidik özellik gösterir ve  $\text{pK}_a$  değeri büyük olur. Diğer taraftan amin zayıf bir baz ise onun konjuge aside kuvvetli asidik özellik gösterir ve  $\text{pK}_a$  değeri küçük olur. Primer, sekonder ve tersiyer aminlerin sudaki  $\text{pK}_a$  değerleri ve bazı fiziksel özellikleri Çizelge 1.5'de gösterilmiştir (Solomons ve Fryhle, 2002).

Çizelge 1.5. Aminlerin fiziksel özellikleri (Solomons ve Fryhle, 2002)

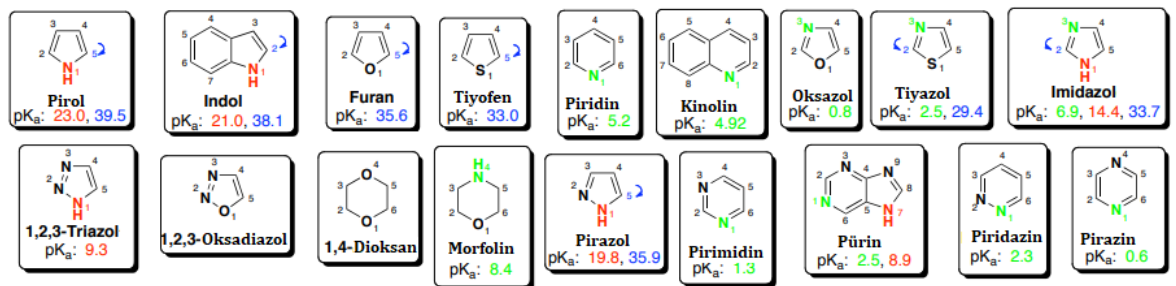
Adı	Kimyasal yapısı	E.N (°C)	K.N (°C)	$\text{pK}_a$
<b>Primer aminler</b>				
Metilamin	$\text{CH}_3\text{NH}_2$	-94	-6	10,64
Etilamin	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{NH}_2$	-81	17	10,75
Propilamin	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	-83	49	10,67
İzopropilamin	$(\text{CH}_3)_2\text{CHNH}_2$	-101	33	10,73
Bütülinamin	$\text{CH}_3(\text{CH}_2)_2\text{CH}_2\text{NH}_2$	-51	78	10,61
İzobütülinamin	$(\text{CH}_3)_2\text{CHCH}_2\text{NH}_2$	-86	68	10,49



Çizelge 1.5. Aminlerin fiziksel özellikleri (Solomons ve Fryhle, 2002) (Devam)

<i>sek</i> -Bütilamin	CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) NH <sub>2</sub>	-104	63	10,56
<i>ter</i> -Bütilamin	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> CNH <sub>2</sub>	-68	45	10,45
Sikloheksilamin	Siklo-C <sub>6</sub> H <sub>11</sub> NH <sub>2</sub>	-18	13	10,64
Benzilamin	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> CH <sub>2</sub> NH <sub>2</sub>	10	185	9,30
Anilin	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NH <sub>2</sub>	-6	184	4,58
<i>p</i> -toluidin	<i>p</i> -CH <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	44	200	5,08
<i>p</i> -anisidin	<i>p</i> -CH <sub>3</sub> OC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	57	244	5,30
<i>p</i> -kloroanilin	<i>p</i> -ClC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	73	232	4,00
<i>p</i> -nitroanilin	<i>p</i> -NO <sub>2</sub> C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> NH <sub>2</sub>	148	332	1,00
<b>Sekonder aminler</b>				
Dimetilamin	(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> NH	-92	7	10,72
Dietilamin	(CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH	-48	56	10,98
Dipropilamin	(CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> NH	-40	110	10,98
N-metilanelin	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> NHCH <sub>3</sub>	-57	196	4,70
Difenilamin	(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>2</sub> NH	53	302	0,80
<b>Tersiyer aminler</b>				
Trimetilamin	(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> N	-117	2,9	9,70
Trietilamin	(CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH	-115	90	10,76
Tripropilamin	(CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> NH	-93	156	10,64
N,N-dimetilanelin	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> N(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	3	194	5,06

Heterosiklik bileşiklerin suda elde edilen pK<sub>a</sub> değerleri Şekil 1.61'de gösterilmektedir.



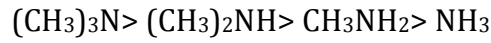
N-H'nin deprotonasyonu, C-H'nin deprotonasyonu, Konjuge asitin deprotonasyonu

Şekil 1.61. Bazı heterosiklik bileşiklerin sudaki pK<sub>a</sub> değerleri (Baran, 2009)

Amonyakın eşlenik asidinin (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) pK<sub>a</sub> değeri 9,26'dır. Metanaminin konjuge asidinin pK<sub>a</sub> değeri ise 10,64'tür. Asidik türlerde pK<sub>a</sub> değeri büyük olanın asitlik

gücü az olmaktadır. Metanaminin konjuge asidi daha zayıf asidik özellikte dolayısıyla konjuge bazı olan metanamin daha kuvvetli bazdır. Çizelge 1.5 incelendiğinde birçok alifatik amin amonyaktan daha kuvvetli bazik özellik göstermektedir. Bunun sebebi de alifatik aminlerin yapısında bulunan alkil gruplarının elektron verme özelliğidir.

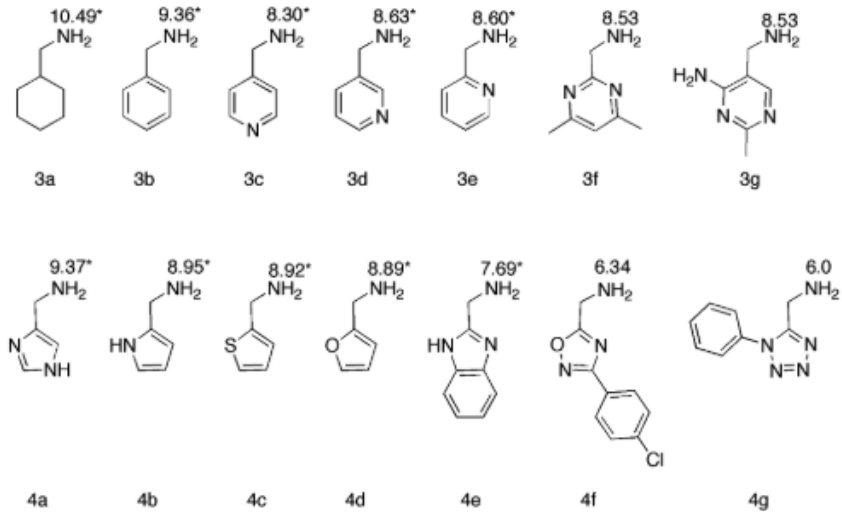
Aşağıdaki aminlerin gaz fazındaki bazlık kuvvetlerinin artması yapıdaki metil grubunun sayısının artmasıyla yakından ilişkilidir.



Aromatik aminlerin (anilin) amonyum tuzlarının  $\text{pK}_a$  değerleri, bunlara karşılık gelen alifatik aminlerin (sikloheksil amin) tuzlarının  $\text{pK}_a$  değerlerinden daha düşüktür. Dolayısıyla aromatik aminler alifatik aminlerden daha zayıf bazik özellik gösterir. Bunun nedeni aromatik aminlerin yapısında elektron çekici fenil grubunun bulunmasıdır.  $\text{sp}^2$  hibritleşmesine sahip olan fenil grubunun C atomları, alkil gruplarının  $\text{sp}^3$  hibritleşmiş C atomlarından daha elektronegatifler (Solomons ve Fryhle, 2002).

Şekil 1.62, 3a ve 3b'de görüldüğü üzere sikloheksan metil aminin (3a,  $\text{pK}_a$ : 10,49)  $\text{pK}_a$  değeri benzilaminden (3b,  $\text{pK}_a$ : 9,36) 1.1 birim daha fazladır. Bunun sebebi aromatik C atomlarının alifatik C  $\text{sp}^3$  atomlarından daha fazla elektron çekici olmasıdır. Aminometil piridinler (1.4-, 1.3-, 1.2- süstitüe) (3c-e) daha küçük  $\text{pK}_a$  değerine sahiptirler; fakat süstitüentin konumu bu  $\text{pK}_a$  değişimlerdeki en büyük belirleyici değildir. 3f ve 3g'de bileşikler aynı  $\text{pK}_a$  değerine sahiptir; ikinci N atomunun halkaya katılması  $\text{pK}_a$ 'daki azalmayı önemli derecede etkilemez. Bunun yanında elektron donör (metil ve amino) grupların kısmi etkisi de söz konusudur (Şekil 1.62) (Milletti vd., 2010).

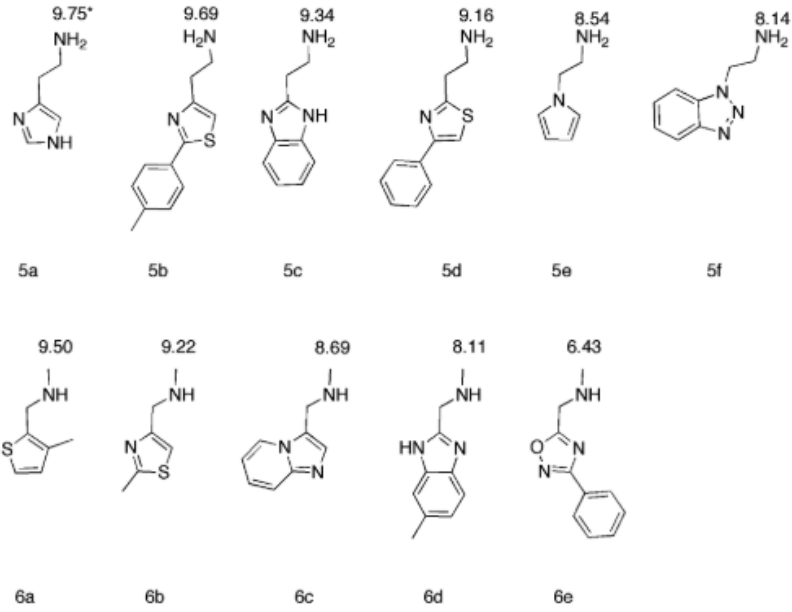
4a-e'de bileşik gruplarında metanamine, beş halkalı aromatik heterosiklik yapı bağlanmıştır. 4f ve 4g'de halkaya 3 ve 4 tane heteroatom bağlanmıştır. 4 heteroatom bağlı olan yapı daha az bazik özellik ( $\text{pK}_a$ : 6,0) gösterir (Şekil 1.62).



Şekil 1.62. Amin grubu taşıyan bileşiklerin pK<sub>a</sub> değerlerinin karşılaştırılması-1 (Milletti vd., 2010)

5a-f'deki yapılar incelendiğinde yapıda amin grubuna etilen bağlıdır. 4a ve 4b karşılaştırıldığında bir metil grubunun yapıya katılması pK<sub>a</sub>'da yaklaşık 0,4 birim artışa neden olmuştur. 5e ve 5f'de amin grubu bir halkaya N atomu aracılığıyla bağlandığında pK<sub>a</sub>'da önemli derecede azalma meydana gelmektedir (Şekil 1.63).

6a-e'de bulunan yapılardaki eğilim 4a-g için yapılan açıklamalarla aynı yöndedir (Şekil 1.63) (Milletti vd., 2010).



Şekil 1.63. Amin grubu taşıyan bileşiklerin pK<sub>a</sub> değerlerinin karşılaştırılması-2 (Milletti vd., 2010)

### 1.15. pK<sub>a</sub> Tayininde Kullanılan Metotlar

Moleküllerin pK<sub>a</sub> tahmininde kompütasyonel (bilgisayımsal) yaklaşımı (*in silico*) içeren metotlardan ve deneysel metotlardan faydalanılmaktadır (Di ve Kerns, 2016).

#### 1.15.1. pK<sub>a</sub> tayininde kullanılan kompütasyonel yaklaşımlar

pK<sub>a</sub> tayininde kullanılan *in silico* metotlarda, birçok enstitü ve yazılım şirketi tarafından bileşiğin yapısı göz önünde bulundurularak hesaplama yapılmaktadır (Çizelge 1.6) (Di ve Kerns, 2016).

Çizelge 1.6. pK<sub>a</sub> tahmininde kullanılan kompütasyonel yaklaşımlar

Yazılım programı	Websitesi
ADMET Predictor	<a href="http://www.simulations-plus.com">www.simulations-plus.com</a>
ALOGPS	<a href="http://www.vcclab.org">www.vcclab.org</a>
Epik, Jaguar	<a href="http://www.schrodinger.com">www.schrodinger.com</a>
JChemSuite™, Marvin™	<a href="http://www.chemaxon.com">www.chemaxon.com</a>

Çizelge 1.6. pK<sub>a</sub> tahmininde kullanılan kompütasyonel yaklaşımlar (Devam)

MedChem Database™	www.daylight.com
Masterfile/CQSAR™	www.biobyte.com
MoKa	www.moldiscovery.com
Percepta™	www.acdlabs.com
Pallas pKalc™	www.compudrug.com
Pipeline Pilot	www.accelrys.com
pK <sub>a</sub> Prospector	www.eyesopen.com
SPARC	<a href="http://archemcalc.com/sparc.html">archemcalc.com/sparc.html</a>

Türkiye’de açık erişime sahip olan yukarıdaki programlardan SPARC’dan tezde çalışılan bileşikler için elde edilen pK<sub>a</sub> değerleri Çizelge 1.7’de gösterilmektedir.

Çizelge 1.7. Tezde çalışılan bileşikler için SPARC’dan elde edilen pK<sub>a</sub> değerleri (Chemicalize, 2011)

Bileşik adı	<i>pK<sub>a1</sub></i>	<i>pK<sub>a2</sub></i>
Albendazol	4,27	9,51
Mebendazol	3,93	8,44
Astemizol	6,24	8,73
Tiyabendazol	4,08	10,28
Klotrimazol	6,26	-
Metimazol	10,41	-
Metronidazol	3,03	-

### 1.15.2. pK<sub>a</sub> tayininde kullanılan deneysel metotlar

Maddelerin iyonlaşma sabitleri farklı metotlarla belirlenebilir. Bu metotlar: potansiyometri, ve kondüktometri, UV-vis spektrofotometri, sıvı kromatografi (LC) ve kapiler elektroforez (CE)’dir (Demiralay vd., 2009; Demiralay vd., 2010; Canbay vd., 2011, Demiralay vd., 2012; Canseven vd., 2017). Bu metotların çoğunda analitin fiziksel özellikleri çözelti pH’ının fonksiyonu olarak ölçülür ve elde edilen veriler iyonlaşma sabitinin belirlenmesinde kullanılır (Jano ve

Hardcastle, 1999; Barbosa vd., 2001; Jiménez-Lozano vd., 2002; Beltrán vd., 2003).

İyonlaşma sabitinin tayininde kullanılan bu yöntemlerin hepsinin çeşitli avantajları ve dezavantajları mevcuttur (Fuguet vd., 2009).

Potansiyometrik titrasyonlarda çok kesin sonuçlar elde edilmekte ve diğer teknikler için bir öngörü olarak kullanılmaktadır. Bu yöntemde örnek çok saf ve tüm pH aralığında tamamen çözünebilir özellikte olmalıdır; analiz sırasında fazla miktarda örneğe ( $10^{-2}$ - $10^{-3}$  M) ihtiyaç duyulmaktadır ve hızlı bir teknik değildir. Spektrofotometrik titrasyonlar çok duyarlıdır ve çalışılacak bileşiğin yapısında mutlaka kromofor grup bulunmalıdır ve iyonik ve nötral formlar farklı spektral özelliklere sahip olmalıdır. Buna ek olarak yüksek saflıkta analite ihtiyaç vardır (Fuguet vd., 2009). Analitin safsızlıkları çalışılan bölgede UV-vis'i absorplamamalıdır. Bu etki safsızlıkları etkili şekilde ayırabilen CE'nin kullanılmasıyla giderilir. CE,  $10^{-4}$ - $10^{-5}$  M aralığında düşük analit derişimlerinde çalışmaya izin veren, elektroforetik bir ayırma tekniğidir (Jiménez-Lozano vd., 2002).

LC, farmasötik, biyomedikal, biyoteknoloji endüstrileri ve rutin analizler için vazgeçilmez bir yöntem haline gelmiştir. Analitik anlamda ters faz sıvı kromatografi çok sayıda bileşiğin tayini için uygun olmasından ötürü en yaygın tekniktir. Diğer HPLC tekniklerinden (iyon değişim, normal faz sıvı kromatografi) RPLC'nin en belirgin avantajı belli kimyasal karışımların analizi ve ayırmasını kolaylaştıran ve benzersiz seçicilik sağlayan çok sayıda durgun fazın mevcut olmasıdır (Herrero-Martinez vd., 2004). LC ile detaylı bilgi bölüm 1.3'te verilmiştir.

#### **1.16. Linear Solvasyon Enerji İlişkisi (Linear Solvation Energy Relationship, LSER)**

Ters faz sıvı kromatografi kimyasal karışımların ayrılmasında en yaygın kullanılan kromatografik metottur. Durgun faz tipindeki ve elüent bileşimindeki

değişimler ayırma koşullarının optimizasyonuna ihtiyaç duyar (Snyder, 2000). Farklı koşullar altında farklı çözünenlerin alıkonma davranışının tahmini, metot optimizasyonunda oldukça önemlidir. Bu alıkonmanın tahmini hem çözünen özellikleri hem de deneysel koşulların fonksiyonu olarak alıkonmanın tahmininde bir modele ihtiyaç duyar (Wang ve Carr, 2002).

Kromatografik alıkonma, durgun faz ve mobil faz arasında çözünenin dağılmasıyla ilişkili serbest enerji değişimlerinden kaynaklanır. Çözünen-faz etkileşimlerinin dispersif, dipolar ve H bağı etkileşimleri gibi birçok türü mevcuttur ve bunların tamamı alıkonmanın serbest enerjisine katkıda bulunur. Bu etkileşimlerden serbest enerji değişimlerine yapılan katkılar, sadece bu etkileşimlere katılan çözünenin yeteneğinden değil; aynı zamanda bu etkileşimlere fazın cevabından da kaynaklanır. Bu yüzden alıkonma doğası gereği çok değişkenlidir (Wang ve Carr, 2002).

Alıkonmanın bağlı olduğu değişkenleri birçok araştırmacı tanımlamıştır. Bileşiğin birden fazla tanımlayıcısının değerlendirilmesi ilk kez Hildebrand'ın çözünürlük parametresi teorisi ile başlamıştır (Hildebrand, 1949). Hansen tarafından geliştirilen çok bileşenli sistem oldukça kapsamlıdır (Hansen, 1967). Hansen bileşikleri kısmi çözünürlük parametreleri (dispersiyon çözünürlük parametresi ( $\delta_d$ ); polar çözünürlük parametresi ( $\delta_p$ ) ve H bağı çözünürlük parametresi ( $\delta_H$ ) açısından karakterize etmiştir. Hansen'in sistemi polimer kimyasında geniş uygulama alanına sahiptir.

Cramer, 6 fizikokimyasal özellik (hidratasyon enerjisi, oktanol: su dağılma katsayısı, kaynama noktası, molar kırılma, hacim ve buharlaşma entalpisi) aracılığıyla 500 bileşik için 6 karakteristik tanımlayıcı (B, C, D, E, F) belirlemiştir. Fakat Cramer tarafından seçilen fizikokimyasal özellikler ideal değildir. Çünkü hidratasyon enerjisi ve dağılma katsayısı bileşiğin tekli monomerik türlerini işaret ederken; kaynama noktası ve buharlaşma entalpisi yığın haldeki sıvıları işaret eder. Bunun yanında Cramer'in yaptığı çalışmalar fizikokimyasal özelliklerden bileşiğin tanımlayıcılarının türetilebileceğini göstermiştir (Cramer 1980a, b).

Yüksek performanslı sıvı kromatografiden elde edilen alıkonma verileri ile çözünen parametrelerinin oluşturulması ile ilgili çalışmalar oldukça azdır. Rosés ve Bosch (Rosés ve Bosch, 1993) tekli çözünen parametresi kullanarak ( $E_T^N$ ), bu parametre ile logk arasında sistem geliştirmiştir.

Çoklu çözünen parametrelerinin kullanımı ise Snyder vd., çalışmasında görülmektedir (Wilson vd., 2002). Bu çoklu çözünen parametrelerinin kullanıldığı çalışmalarda; Wilson vd., 10 farklı RP-HPLC durgun fazı üzerinde 67 çözünen için %50 ACN: H<sub>2</sub>O ortamında log k değerleri elde etmiştir. Bu çalışmalarda 5 tanımlayıcı kullanarak çözünen maddeler karakterize edilmiştir. Bunun yanında 5 farklı kolonla 86 çözüneni daha incelemiştir ve logk ile ilgili eşitlik türetmiştir (Abraham vd., 2004).

$$\log k = \log k_{ref} + H\eta' + S\sigma' + A\beta' + B\alpha' + C\kappa' \quad (1.31)$$

Bağımsız değişkenler  $\eta'$  (hidrofobisite),  $\sigma'$  (sterik parametre),  $\beta'$  (baziklik) ve  $\alpha'$  (asitlik) nötral formdaki çözünen molekülün tanımlayıcılarıdır.  $\kappa'$  (kasyon değişim parametresi) asidik ya da bazik olmayan nötral bileşiği ve protonlanmış formdaki bazik bileşiği tanımlayan iyon değişim parametresidir. H, S, A, B, C durgun fazla ilgili değerlerdir. Wilson'un türettiği eşitliği Abraham'ın türettiği eşitlik ile benzerdir.

Alıkonmanın bağlı olduğu değişkenleri birçok araştırmacı tanımlamıştır (Abraham ve Rosés 1994; Park vd., 1994; Tan, vd., 1996; Abraham vd., 1997a). Yapılan çalışmalarda, verilen kimyasal koşullar altında yapısal olarak farklı çözünenlerin alıkonmasını, lineer solvasyon enerji ilişkileri ile modellemiştir (Wang ve Carr, 2002).

### 1.16.1. Abraham solvasyon parametreleri modeli

Abraham'ın çalışmalarının başlangıç noktası Kamlet ve arkadaşları (Kamlet vd., 1976; Taft ve Kamlet., 1976; Yokoyama vd., 1976; Abraham vd., 1988a) tarafından geliştirilen solvatokromik çözücü parametreleri modelidir. Bu



yaklaşım ile çözünen üzerine çözücünün etkilerini incelemek için, çözücü parametreleri kullanılarak genel eşitlik (Taft vd., 1985) elde edilmiştir.

$$Y = Y_0 + d\delta + s\pi_1^* + a\alpha_1 + b\beta_1 + d(\delta_H)^2 \quad (1.32)$$

Çözücü serilerinde çözünenin özelliği Y ile sembolize edilmektedir.

$\delta, \pi_1^*, \alpha_1, \beta_1, (\delta_H)^2$  çözücü tanımlayan bağımsız değişkenlerdir.

$\delta$ , ampirik polarlanabilirlik doğrulama terimi,

$\pi_1^*$ , çözücünün polarlanabilirliği/dipolaritesi,

$\alpha_1$ , çözücü H bağı asitliği,

$\beta_1$ , çözücü H bağı bazlığı,

$(\delta_H)^2$ , çözücü Hildebrand kohesif enerji yoğunluğu'nu ifade eder.

Aynı çalışmacılar benzer eşitliği, verilen çözücüde çözünen serileri için kullanmışlardır. Çözünen tanımlayıcısı (solute property, SP) bağımsız değişken olarak (Kamlet vd., 1983),

$$SP = c + d\delta + s\pi^* + a\alpha + b\beta + vV \quad (1.33)$$

şeklinde ifade edilir.

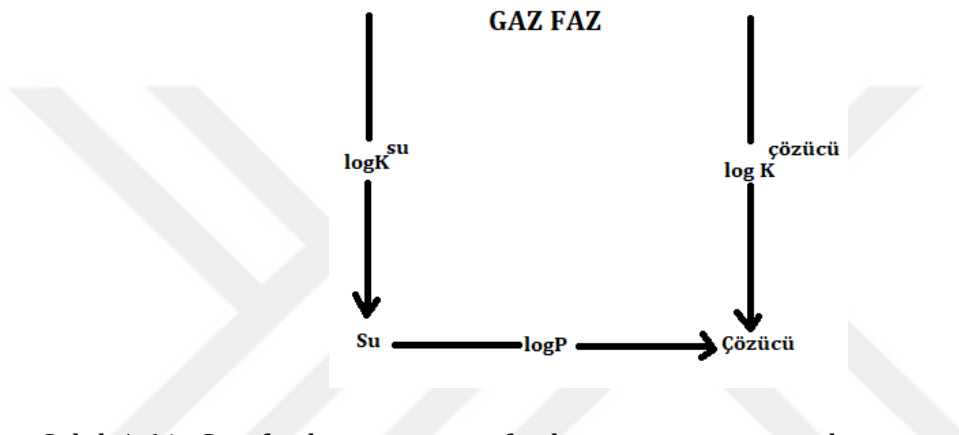
SP,  $\log P_{o/w}$  gibi çözünen özelliğidir; V ise çözünen hacmidir (Abraham vd., 2004).

Metodun en önemli dezavantajlarından biri elde edilemeyen çözünen parametreleri  $\pi^*$  ve  $\beta$  yerine çözücü parametrelerinin ( $\pi_1^*$  ve  $\beta_1$ ) kullanılmasıdır. Bunun yanında Kamlet ve Taft'ın çalışmaları, seçilen bileşiğin absorpsiyon spektrumu üzerine çözücü özelliklerinin etkisinin incelendiği solvatokromik ölçüme dayanır ve bu spektroskopik geçişler, serbest enerji ile ilişkili özellikler değildir. Dolayısıyla serbest enerji sürecinin karakterizasyonunda bu tanımlayıcıların kullanımı uygun değildir (Abraham, 1993a). Bu yüzden Abraham vd., Eşitlik 1.32'ye benzer şekilde serbest enerji ile

ilişkili yeni çözünen tanımlayıcı seti oluşturmuşlardır (Abraham vd., 1988b; Poole vd., 2013).

### 1.16.1.1. Abraham solvasyon parametreleri modelinin genel ilkeleri

Genellikle solvasyon parametreleri modeli olarak bilinen bu model çözeltilerin oyuk oluşumu (cavity) modelinin parametrelendirilmesine (Poole vd., 2013) ve nötral çözünen molekülün bir fazdan diğer faza transferine dayanır (Şekil 1.64).



Şekil 1.64. Gaz fazdan suya, gaz fazdan çözücüye ve sudan çözücüye çözünen molekülün transferi

Çözücü fazlar arasındaki dağılım, dağılım katsayısı  $P$  ile ifade edilir; gaz-çözücü fazlar arasındaki dağılım ise denge sabiti  $K$  ile tanımlanır.

Denge sabiti  $K$ ,

$$K = \frac{\text{Çözücüdeki çözünen maddenin derişimi}}{\text{Gaz fazdaki çözünen maddenin derişimi}} \quad (1.34)$$

şeklinde ifade edilir.

İki çözücü faz arasındaki dağılmayı etkileyen faktörler, gaz faz ve çözücü arasındaki dağılmayı etkileyen faktörler açısından

$$\log P = \log K^{\text{çözücü}} - \log K^{\text{su}} \quad (1.35)$$

ile ifade edilir.

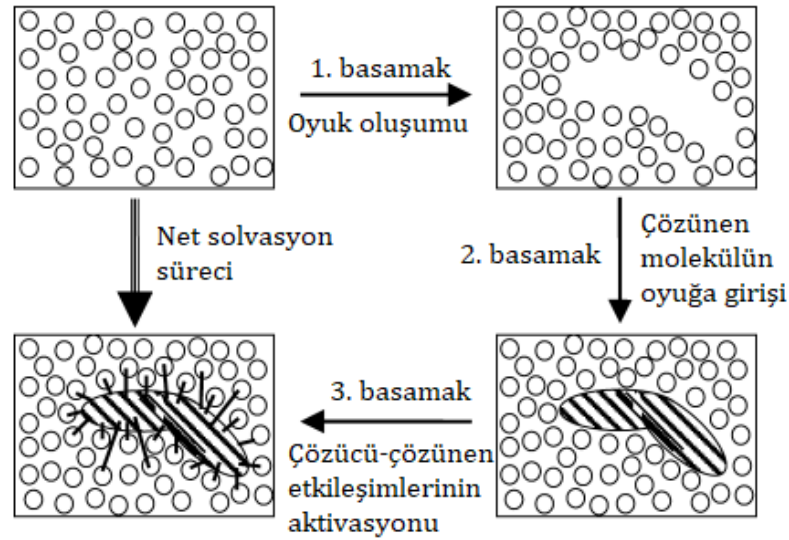
$K^{\text{çözücü}}$ , çözünen molekülün gaz fazdan-çözücüye dağılması için denge sabiti,  $K^{\text{su}}$ , çözünen molekülün gaz fazdan-suya dağılması için denge sabiti'dir.

İki çözücü faz arasındaki dağılmayı etkileyen faktörlere değinen çok sayıda metot mevcuttur ve bunlardan en popülerleri çözeltilerin oyuk oluşumu (cavity) teorisi (Abraham ve Liszi, 1978). Bu teoride, Şekil 1.65'de görüldüğü gibi gaz haldeki çözünenin oluşturduğu çözeltilerin 3 terimden meydana geldiği ifade edilmektedir:

a) Çözücü içinde çözünenin yerleşebileceği uygun boyutta oyuk oluşumu meydana gelir. Bu basamak çözücü-çözücü molekülleri arasındaki etkileşimlerinin sonlanmasını içerir. Buradaki basamak endotermiktir ve enerjilik olarak istenmemektedir (Vitha ve Carr, 2006). Burada oluşan oyukun boyutu çözünen molekülün boyutuyla orantılıdır.

b) Oyuğun etrafındaki çözücü molekülleri çözünen ile etkileşime girmek için denge durumunda tekrar düzenlenir. Tekrar düzenlenmenin Gibbs serbest enerjisi ihmal edilebilir. Buna rağmen tekrar düzenlenmenin entalpi ve entropisi büyük olabilir.

c) Çözünen molekül tekrar düzenlenmiş oyuk içine girer, farklı çözünen-çözücü etkileşimleri kurulur. Bu etkileşimler ekzotermiktir ve çözelti sürecine yardımcı olur (Şekil 1.65) (Abraham vd., 2004).



Şekil 1.65. Solvasyon süreci modeli (Vitha ve Carr, 2006)

Yapılan çalışmada çözücü fazı sabit ve sadece çözünen molekül değişiyorsa, süreç basitleştirilebilir. Çözünen özellikleri göz önünde bulundurulmak durumunda değildir ve sadece çözücüyle alakalı veya 'çözünen tanımlayıcıları'nın geliştirilmesi söz konusudur. Yukarıda bahsedilen a-b-c basamaklarından, a basamağında çözünen hacmi ya V ya da L tanımlayıcılarıdır ve çözünenin boyut parametresi olarak göz önünde bulundurulur. c basamağında çok sayıda çözücü-çözünen etkileşimleri mevcuttur ve bunların tamamı verilen çözünen özellikleri ile ilişkilidir. Çözünen özellikler veya tanımlayıcıları Çizelge 1.8'de gösterilmiştir.

Çizelge 1.8. Abraham çözünen tanımlayıcıları

Çözünen tanımlayıcısı	Sembolü	Birimi
Aşırı molar kırılma	E	$\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} / 10$
Dipolarite/polarlanabilirlik,	S	-
Tüm H bağı asitliği	A	-
Tüm H bağı bazlığı	B	-
McGowan hacmi	V	$\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1} / 100$
Gaz-hekzadekan dağılma katsayısı	L	-

Uygulamada özellikle dipol ve indüklenmiş dipol etkileşimlerinden kaynaklanan etkileşimleri birbirinden ayırmak mümkün değildir. Elde edilen çözünen tanımlayıcıları iki eşitlikte birleştirilmiştir (Abraham, 1993a; Abraham vd., 2004).

$$SP = c + eE + sS + aA + bB + IL \quad (1.36)$$

$$SP = c + eE + sS + aA + bB + vV \quad (1.37)$$

İlk oluşturulan Eşitlik (1.36) gaz fazdan yoğunlaşmış faza transferi, ikinci Eşitlik (1.37) ise bir yoğunlaşmış fazdan diğerine transferi içerir.

E: aşırı molar kırılma  $((\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1})/10)$ ,

S: dipolarite/polarlanabilirlik,

A ve B: tüm H bağı asitliği ve bazlığı,

V: McGowan'ın karakteristik hacmi,  $((\text{cm}^3 \cdot \text{mol}^{-1})/100)$

L: gaz-hekzadekan dağılıma katsayısı (Bradley vd., 2015)'dir.

Eşitlik 1.36'da bağımlı değişken (SP, çözünen özellikleri),  $\log K^{\text{çözücü}}$  olabilir (Şekil 1.64) gaz-sıvı kromatografi (GLC)'den elde edilen alıkonma verilerinden  $\log t_{(\text{rel})}$ ,  $\log V_g$  veya I olabilir.  $\log t_{(\text{rel})}$  bağıl alıkonma süresi;  $V_g$  alıkonma hacmi ve I Kovats'ın alıkonma indeksini ifade eder. Eşitlik 1.37'de SP,  $\log P$  veya  $\log k$  olabilir. (Abraham vd., 2004).

c, e, s, a, b, v veya I katsayıları çoklu lineer regresyonla (MLR) bulunur. Regresyon katsayıları fazın özelliklerini karakterize eder.

e: çözünen molekülün n ve  $\pi$  elektron çiftleri ile çevrenin etkileşim yeteneğidir.

s: çözünenin dipolarite/polarlanabilirlik teriminin ölçüsüdür.

a: H bağı bazlığıdır (asidik çözünen bazik faz ile etkileşime girer).

b: H bağı asitliğidir.

v: Hidrofobisitedir.

e, s, a, b, terimleri çözünen özelliğine pozitif katkıda bulunur; v terimi ise hidrofobik katkıdır (Torres-Lapasió vd., 2004).

Son yıllarda Abraham tarafından önerilen LSER eşitliği (Eşitlik 1.36 ve 1.37) alıkonma sürecinin tanımlanmasında ve farklı durgun fazların karakterizasyonunda iyi sonuçlar verdiği için yaygın şekilde kullanılmaktadır (Abraham ve Rosés, 1994; Park vd., 1994; Tan vd., 1996; Jackson vd., 1997; Abraham vd., 1997a; Zhao ve Carr, 1999).

Alıkonma süreci durgun faz ve mobil fazda meydana gelen farklı moleküler etkileşimlere tabidir. LSER'nin temeli durgun faz ve mobil faz ile çözünenin farklı etkileşimlerinin toplamı sonucu oluşmaktadır.

Farklı moleküler kuvvetlerin büyüklük ve oranı, durgun ve mobil fazlarda farklıdır. Alıkonma faktörü  $k$ , durgun ve mobil fazı etkileyen moleküler kuvvetler arasındaki farka bağlıdır. Kromatografik sistemin tüm bileşenleri moleküler etkileşimlerin derecesini ve türünü etkileyecektir. Durgun ve mobil fazın özelliklerine ek olarak çözünenin moleküler özellikleri de hesaba katılmalıdır, çünkü her moleküler tanımlayıcının oranı ve büyüklüğü alıkonma mekanizmasını etkileyecektir (Szepesy, 2002).

Alıkonma süreci ve alıkonma mekanizmasını en iyi şekilde tanımlayan modellerden birisi olan LSER'de, eşitlikteki regresyon katsayıları durgun ve mobil faz arasındaki çeşitli moleküler etkileşimler arasındaki farkları doğru şekilde yansıtır (Abraham, 1993a). Pozitif katsayılar sorumlu moleküler etkileşimlerin durgun fazda güçlü olduğunu ve alıkonmayı artırdığını gösterir. Negatif katsayılar sorumlu moleküler etkileşimlerin mobil fazda daha güçlü olduğunu gösterir ve bu alıkonmayı azaltır.  $\log k$ , LSER eşitliğindeki alıkonmayı artıran toplam pozitif terimlerden negatif terimlerin çıkartılmasıyla elde edilir (Szepesy, 2002).

### 1.16.1.2. Solvasyon parametreleri modelinde kullanılan çözünen tanımlayıcıları

Solvasyon parametreleri modelinde kullanılan 6 tanımlayıcının tayininde, her bir tanımlayıcının tek tek tayini için çok az sayıda deneysel metot mevcut olduğundan bu tayinler grup halinde gerçekleştirilir, V ve E tanımlayıcıları hesaplama yoluyla elde edilebilmektedir. Diğer dört tanımlayıcı yaygın şekilde kromatografik, sıvı-sıvı dağılıma veya çözünürlük ölçümleri gibi deneysel yollarla belirlenmektedir (Abraham 1993a; Abraham vd. 1999; Abraham vd., 2004; Vitha ve Carr, 2006; Poole vd., 2009; Poole vd., 2013).

#### 1.16.1.2.1. McGowan karakteristik hacmi

Solvasyonun doğrusal serbest enerji modellerinde, çözünen hacmi, hacim veya boyut terimi olarak yaygın şekilde kullanılır. Aynı bileşik için hesaplama yoluyla hacmin belirlenmesinde kullanılan birçok program, farklı atomik çaplar kullandığından ve farklı yaklaşımlardan dolayı farklı hacim değerleri üretir (Zhao vd., 2003).

Karakteristik hacim, moleküller hareketsiz haldeyken 1 mol sıvının hacmi olarak tanımlanır. McGowan parachoru göz önünde bulundurarak yaptığı hesaplamadan molekülün karakteristik hacmini öngörmüştür. Atomik değerlerin eklenmesiyle ve her bağ için sabit bir değer çıkarılması ile molekül hacmi kolaylıkla hesaplanmaktadır (McGowan, 1984).

Abraham herhangi bir yapı için karakteristik hacmin hesaplanmasına izin veren basit bir algoritma önermiştir (Abraham, 1993c).

$$V = \frac{\sum(\text{Tüm atomik katkılar}) - 6,56(N - 1 + R_g)}{100} \quad (1.38)$$

N: Toplam atom sayısı,

R<sub>g</sub>: Toplam halka sayısı'dır.

Diğer tanımlayıcılar ile aynı birime sahip olması için hacim terimi ((cm<sup>3</sup>.mol<sup>-1</sup>/100)), 100'e bölünür (Abraham, 1993c).

#### 1.16.1.2.2. Aşırı molar kırılma tanımlayıcısı (E)

Aşırı molar kırılma, özdeş karakteristik hacimli hipotetik n-alkanın molar kırılmasından daha az olan bileşiğin molar kırılması olarak tanımlanır. 20°C'de bileşiğin kırılma indisinden ve karakteristik hacminden aşağıdaki formül yardımıyla hesaplanır (Eşitlik 1.39) (Abraham vd., 2004).

$$MR_x = 10 \left[ \frac{\eta^2 - 1}{\eta^2 + 2} \right] V \quad (1.39)$$

$\eta$ : 20°C'de saf sıvı olarak bileşiğin refraktif indeksi (kırılma indisi)'dir.

V: McGowan hacmi, birimi (cm<sup>3</sup>.mol<sup>-1</sup>)/100'dür.

MR<sub>x</sub>: Molar kırılma indisi, birimi (cm<sup>3</sup>.mol<sup>-1</sup>)/10'dur (Abraham vd., 1990).

$$(MR_x)_{alkan} = 2,83195V - 0,52553 \quad (1.40)$$

E aşağıdaki şekilde hesaplanır:

$$E = (MR_x) - 2,832V + 0,526 \quad (1.41)$$

E'nin birimi MR<sub>x</sub>'inkiyle aynıdır: (cm<sup>3</sup>.mol<sup>-1</sup>)/10. E tanımlayıcısının diğer tanımlayıcılar ile aynı birime sahip olması için (cm<sup>3</sup> mol<sup>-1</sup>/10), 10'a bölünür (Abraham vd., 2004; Vitha ve Carr, 2006).

20°C'de kırılma indisi değerleri ve V'yi hesaplamak için halka sayısı ve çözünen molekülün molekül formülüne ihtiyaç vardır.

McGowan hacmi moleküldeki atomik fragmanlardan ve bağ sayısından basitçe hesaplanabilir. Bağların tek, çift ya da üçlü olması önemli değildir hepsi özdeş gibi alınır. Bağ sayısı (number of bonds, B<sub>n</sub>)

$$B_n = N_a - 1 + R_g \quad (1.42)$$

N<sub>a</sub>: toplam atom sayısı (total number of atoms)



R<sub>g</sub>: halka sayısı (number of rings) (Abraham vd., 2004).

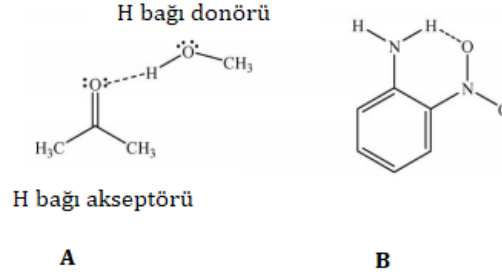
#### **1.16.1.2.3. Dipolarite/polarlanabilirlik tanımlayıcısı (S)**

Dipolarite/polarlanabilirlik tanımlayıcısı dipol tiplerinin etkileşimini (hem yönlendirme hem indükleme) karakterize etmek için oluşturulmuştur. S tanımlayıcısı bilinen E ve L tanımlayıcılarına sahip bileşikler için polar durgun faz üzerinde gaz kromatografi (GC) ile belirlenir. Durgun fazların büyük çoğunluğu H bağı asitliğine sahip değildir; ama genellikle güçlü H bağı bazlarıdır. Günümüzde S tanımlayıcısı GC alıkonma verileri ile sulu veya tamamen organik sıvı-sıvı dağılma sistemleri için dağılma katsayısının birleştirilmesiyle elde edilir (Abraham vd., 1990; Abraham vd., 1991, Poole vd., 2013).

#### **1.16.1.2.4. Hidrojen bağı asitliği ve bazlığı tanımlayıcıları**

London dağılma kuvvetleri, dipol kuvvetleri, dipol-indüklenmiş dipol kuvvetleri gibi spesifik olmayan van der Waals tipi etkileşimlerde, moleküllerin tamamı veya büyük çoğunluğu moleküller arası etkileşimlere katılırlar. Bu etkileşimlerin tersine H bağı etkileşimine katılan atomlar spesifik atomlar olduğundan bu etkileşim de spesifiktir. H atomu ile yakınındaki elektronegatif F, O, N elementlerinin ortaklaşmamış elektronları (bazı durumlarda aromatik halkanın  $\pi$  sistemi) arasında H bağı meydana gelir.

H bağı şüphesiz olarak normal faz ve ters faz sıvı kromatografide büyük öneme sahiptir. Karakteristik H bağı gücü  $<1\text{kJ/mol}-40\text{kJ/mol}$  arasındadır ve bu bağın gücünün hesaplanmasında genel bir teori yoktur. Bunlardan en ümit veren H bağı donör ya da akseptör olma yeteneğinde olan (Şekil 1.66) çözünenin alıkonmasının açıklanmasında kullanılan ampirik yaklaşıma sahip solvatokromik ölçümlerdir.



Şekil 1.66. a) İntermoleküler (moleküller arası) b) Intramoleküler (molekül içi) H bağı

Şekil 1.66a'da aseton H bağı akseptörü, MeOH ise H bağı donörüdür. Şekil 1.66a' da moleküller arası H bağı etkileşimi Şekil 1.66b'de *o*-nitroanilinde ise molekül içi H bağı etkileşimleri gösterilmektedir (Vitha ve Carr, 2006).

$$B_n = N_a - 1 + R_g \quad (1.43)$$

$N_a$ : Toplam atom sayısı (total number of atoms)

$R_g$ : Halka sayısı (number of rings)

Eşitlik 1.43, 100°C'de squalen, OV-101 gibi non-polar fazlar üzerinde çözünenin GLC alıkonma verilerinin korelasyonunda kullanılabilir. Eğer durgun faz polar ise Eşitlik 1.43, sadece alkanlar gibi apolar çözünenlere uygulanabilir. H bağı asitliği olmayan polar bileşikler için bir ek tanımlayıcıya ihtiyaç vardır (Abraham vd., 1991; Abraham vd., 1992; Abraham, 1993b); bu da çözünenin dipolarite/polarlanabilirliğini gösteren S tanımlayıcısıdır. Bu yüzden Abraham ve arkadaşları 90°C'de di-n-propil tetraklorofitalat üzerinde çözünenlerin bağıl alıkonma sürelerini,

$$\log t_{(rel)} = -3,433 + 1,640S + 0,618L \quad (1.44)$$

eşitliği ile ifade etmişlerdir (Abraham vd., 1992).

Dialkil fitalat gibi GLC fazları polar H bağı bazlarıdır. Bu fazlarda çalışılan çözünenler H bağı asidi değilse alıkonma sürelerinin korelasyonu E, S, L

değerleri ile sağlanabilir. Ama H bağı asidi içeriyorlarsa aşağıdaki gibi eşitliğe ihtiyaç vardır (Abraham vd., 1990).

$$SP = c + eE + sS + aA + IL \quad (1.45)$$

Bileşikler için A değerinin hesaplamada SP, E, S, L değerlerinin bilinmesi gerekir (Abraham vd., 1989). H bağı bazikliğinin hesaplanmasında ise, Abraham logP değeri olarak, su-çözücü dağılma katsayısını kullanarak H bağı bazikliği skalasını hazırlamıştır (Abraham, 1993a). Bu Eşitlik 1.38'de çözünen özelliği olarak (SP) logP'nin kullanılması anlamına gelir.

H bağı bazlığı ile ilgili olarak; belirli su-çözücü sistemlerinde belirli çözünenler için H bağı bazlığı sabit değildir. Leahy vd., S=0 ve P=0 içeren bazı çözünenlerde çeşitli baziklik değerinin bulunduğunu göstermiştir. Bu grupları içermeyen çözünenler de normalden farklı bir yaklaşımla hareket etmektedirler ve bu çözünenler Çizelge 1.9'da gösterilmiştir (Leahy vd., 1992).

Çizelge 1.9. Çeşitli bazikliğe sahip çözünenler için H bağı bazlığı (Abraham vd., 2004)

Çözünen	B	B <sup>0</sup>
Anilin	0,41	0,50
m-toluidin	0,45	0,55
N,N-dimetilanilin	0,41	0,47
m-kloroanilin	0,30	0,36
m-metoksianilin	0,59	0,70
Piridin	0,52	0,47
4-metilpiridin	0,64	0,43
Kinolin	0,54	0,51
İzokinolin	0,54	0,47
İndol	0,22	0,31
İmidazol	0,78	0,50

Çizelge 1.9. Çeşitli bazikliğe sahip çözünenler için H bağı bazlığı (Abraham vd., 2004) (Devam)

Pirazol	0,45	0,34
Pürin	1,08	0,78
Dimetilsülfoksit	0,97	0,76
Difenilsülfoksit	0,96	0,88
Trifenilfosfin oksit	1,50	1,32

Abraham çeşitli baziklik değerlerine sahip anilin, piridin gibi yapılarda alternatif H bağı bazlığı (B<sup>0</sup>) tanımlamıştır (Abraham vd., 2004).

### 1.16.1.3. Abraham solvasyon parametreleri modelinin kalitatif açıklanması

LSER modelindeki V terimi oyuk oluşum enerjisini açıklamak içindir. LSER modelindeki vV terimini anlamak için, çözünen molekülün iki sıvı arasında aktarımı düşünülür. Bu sıvılardan birinin su birinin hekzan olduğunu varsayılır. İki çözücü arasında oyuk (cavity) oluşturmak için hekzan molekülündeki etkileşimleri kırmak su molekülündeki etkileşimleri kırmaktan daha kolaydır. Dolayısıyla tüm şartlar eşit olsa bile çözünen molekül, hekzan molekülü içinde oyuk oluşturma eğilimindedir. Dolayısıyla v katsayısı iki çözücü arasındaki boşluk oluşumundaki kolaylığı yansıtır. Bu durumda büyük bir fark ve büyük bir v katsayısı beklenebilir.

Çözücü ve çözünen molekülleri arasındaki V etkileşimi tercih edilmeyen (endotermik) etkileşimdir, diğer tüm etkileşimler ise tercih edilen olumlu etkileşimleri gösterir (Şekil 1.67) (Vitha ve Carr, 2006).

$$SP = \underbrace{c}_{\text{Sistem sabiti}} + \underbrace{eE + sS + aA + bB}_{\text{Tercih edilen etkileşimler}} + \underbrace{vV}_{\text{Tercih edilmeyen etkileşimler}}$$

Şekil 1.67. Çözücü ve çözünen moleküller arasında tercih edilen ve edilmeyen etkileşimler (Vitha ve Carr, 2006)

#### 1.16.1.4. Abraham solvasyon parametreleri modelinde kullanılan hesaplamalar

Abraham solvasyon parametreleri modeli nötral çözünenlerin alıkonması için oluşturulmuş bir modeldir. Bu model modifiye edilmeden iyonik ya da kısmen iyonlaşmış çözünenler için uygulanamaz. Ters faz sıvı kromatografide iyonik çözünenler nötral çözünenlerden daha az kolonda tutunma eğilimi gösterirler. Nötral türler için oluşturulan tanımlayıcılar, iyonik türlerin çözücü çözünen etkileşimlerini tanımlamaz. Buna ek olarak iyonlaşabilen bileşiklerin alıkonması mobil faz pH'ı mobil faz bileşimi ve iyonik şiddet gibi iyonlaşmayı etkileyen faktörlere bağlıdır (Rosés vd., 1998).

İyonlaşabilen türler için, çözünenin iyonlaşma derecesi (D, degree of ionization)'nden türetilen D çözünen tanımlayıcısı belirlenmiştir. D çözünen tanımlayıcısı asitlerin pK<sub>a</sub> değerinden ve mobil faz pH'ından hesaplanır.

Zayıf asidik türün iyonlaşma dengesi,



Zayıf asidik türün iyonlaşma sabiti,

$$K_a = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]} \quad (1.47)$$

İyonlaşma derecesi,

$$D = \frac{[A^-]}{[HA]+[A^-]} = \frac{K_a}{[H_3O^+][K_a]} = \frac{10^{pH-pK_a}}{1+10^{pH-pK_a}} \quad (1.48)$$

RPLC'de zayıf asitlerin alıkonmasında, nötral ( $t_{R_{HA}}$ ) ve iyonik türlerin ( $t_{R_{A^-}}$ ) allkonma faktörlerinin ortalaması alınır. Her türün mobil fazda mevcut fraksiyonuna göre, bu alıkonmaya hem nötral türün hem iyonlaşan türün katkısını ifade etmek için,

$$t_R = (1 - D)t_{R_{HA}} + Dt_{R_{A^-}} \quad (1.49)$$

kullanılır.

Eşitlik 1.49 ters faz sıvı kromatografide zayıf asitlerde mobil faz pH'nın fonksiyonu olarak alıkonma grafiğe geçirildiğinde elde edilen sigmoidal ilişkiyi tanımlar.

Bileşiğin iyonik formu nötral formdan daha az alıkonmaya sahip olduğu için iyonlaşan türün alıkonması ihmal edilirse eşitlik 1.49 sadeleştirilerek eşitlik 1.50 elde edilir (Rosés vd., 1998).

$$\log t_R = \log t_{R_{HA}} + \log (1 - D) \quad (1.50)$$

Fakat daha gerçekçi olan yaklaşım nötral türün alıkonmasından daha az olan iyonlaşan türün alıkonmasını göz önünde bulundurmadır. Bu durumda her iki alıkonmayı da göz önünde bulunduran f parametresi tanımlanır.

İyonlaşan türün alıkonması ile nötral türün alıkonmasının oranını ifade eden f parametresi,

$$f = \frac{t_{R_{A^-}}}{t_{R_{HA}}} \quad (1.51)$$

RPLC'de mobil faz pH'nın fonksiyonu olarak zayıf asitlerin alıkonma davranışı,

$$\log t_R = \log t_{R_{HA}} + \log[1 - D(1 - f)] \quad (1.52)$$

şeklinde ifade edilir (Rosés vd., 1998).

Zayıf bazik bileşikler için,

Zayıf bazik türün iyonlaşma dengesi,



Zayıf bazik türün iyonlaşma derecesi,

$$D = \frac{10^{pK_a - pH}}{1 + 10^{pK_a - pH}} \quad (1.54)$$

RPLC'de alıkonmaya hem nötral türün hem iyonlaşan türün katkısını ifade etmek için,

$$t_R = (1 - D)t_{R_B} + Dt_{R_{BH^+}} \quad (1.55)$$

$$\log t_R = \log t_{R_B} + \log[1 - D(1 - f)] \quad (1.56)$$

İyonlaşan türün alıkonması ile nötral türün alıkonmasının oranını ifade eden  $f$  parametresi,

$$f = \frac{t_{R_{BH^+}}}{t_{R_B}} \quad (1.57)$$

RPLC'de mobil faz pH'nın fonksiyonu olarak zayıf bazik türlerin alıkonma davranışı,

$$\log t_R = \log t_{R_B} + \log[1 - D(1 - f)] \quad (1.58)$$

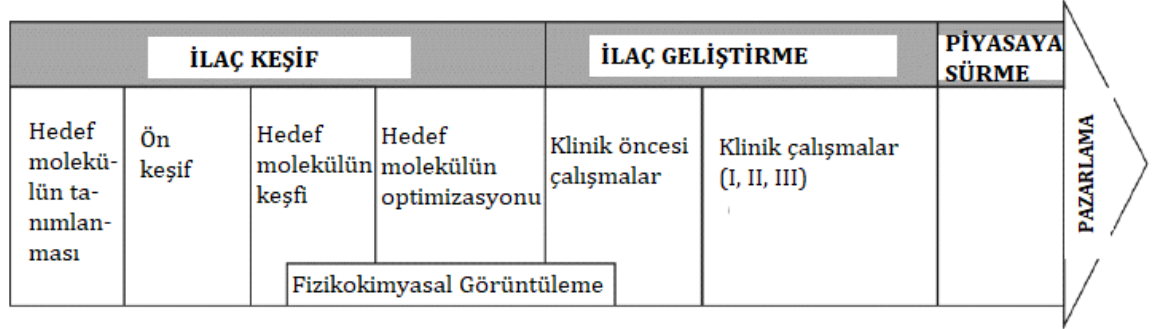
şeklinde ifade edilir (Rosés vd., 1998).

### 1.17. Çözünürlük

İnsan vücudunun en büyük bileşeni ağırlıkça %70 oranıyla sudur. Temel biyokimyasal fabrika olarak nitelendirilen karaciğerin %96'sı sudur (Fraczkiewicz, 2013). Su tüm canlı organizmaların fonksiyonunun ve yapısının ayrılmaz bir parçasıdır. Farmasötik endüstrisinde ilacın sudaki davranışı, HTS gibi ilaç geliştirme süreçlerinin erken aşamalarını olduğu kadar daha sonraki aşamaları da etkileyen birçok alım, taşınma ve atılım süreçlerini yönetir (Delaney, 2005).

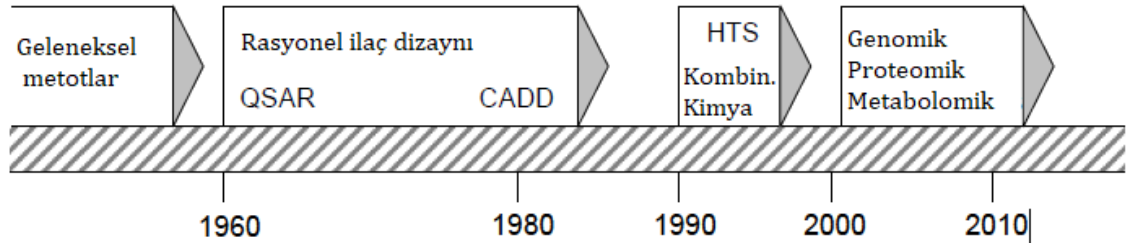
İlaç adayı moleküllerin sudaki çözünürlüğünün belirlenmesi ilaç keşfi ve geliştirme fazlarında (Şekil 1.68-1.69) oldukça önemlidir (Chen vd., 2006; van de Waterbeemd ve Testa, 2013). İlaç araştırmalarının erken basamaklarında bazı fizikokimyasal özellikler (lipofilite, iyonlaşma ve geçirgenlik) ile çözünürlüğün belirlenmesi, ilaç adayı molekülleri tanımak için kullanılır

(Lipinski vd., 2001; Baka vd., 2008). Erken aşamalarda yapılan bu fizikokimyasal parametrelerin belirlenmesi zamandan ve maliyetten tasarruf sağlar, çünkü uygun parametrelere sahip olmayan bileşiklerin çoğunluğu geliştirme aşamasına geçmeden elenmektedir. İlaç geliştirme fazında ise biyofarmasötik sınıflandırma, biyo eşdeğerlik çalışmaları, formülasyonun optimizasyonu ve tuz seçiminde (Völgyi vd., 2010) çözünürlük verilerine ihtiyaç duyulmaktadır (Baka vd., 2008).



Şekil 1.68. İlaç araştırma ve geliştirme süreçleri (Takács-Novák, 2012)

İlaç araştırmalarında çözünürlüğün belirlenmesinde yıllara göre gelişim incelendiğinde Şekil 1.69'daki gibi bir sınıflandırma elde edilmektedir (Takács-Novák, 2012).



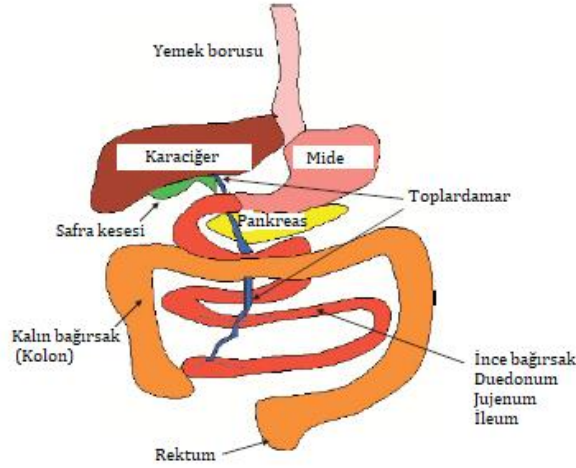
Şekil 1.69. İlaç araştırmalarındaki stratejiler (Takács-Novák, 2012)

Kantitatif yapı aktivite ilişkisi: (QSAR, quantitative structure activity relationship), Bilgisayar destekli ilaç tasarımı: (CADD, computer aided drug design), Kombin kimya: bütünleştirici kimya

Oral olarak alınan ilaçların gastrointestinal boşluktan (Şekil 1.70) absorpsiyonunu etkileyen en önemli moleküler özellik ilacın sudaki çözünürlüğüdür. Başarılmak istenilen sistemik seviye, oral dozaj formdaki aktif bileşenleri insan mide sıvısında ve/veya bağırsak sıvısında çözebilmek ve membranın lüminal duvarından geçmesini sağlamaktır. Çözünme bileşiğin temelde denge çözünürlüğü (S) ile belirlenir ama diğer moleküler özelliklerden



(parçacık boyutu, kristal yapı gibi) ve fizyolojik faktörlerden (geçiş zamanı, gastrik hareketlilik) de etkilenir. Membrandan geçişte lipofilite ( $\log P$ ) ve geçirgenlik ( $\log P_e$ ) özellikleri de etkilidir. Bu 3 moleküler özellik iyonlaşabilen moleküllerde pH'ya bağlıdır ve bileşiğin  $pK_a$  değerinden etkilenir (Avdeef, 2003; Takács-Novák, 2012). Bu yüzden fizikokimyasal parametrelerin belirlenmesi ilaç geliştirme çalışmalarında dikkat çekmektedir ve ilaç geliştirme sürecinde erken aşamalara kaydırılmıştır (Kerns ve Di, 2008; Di vd., 2009). Sudaki çözünürlüğün az olması absorpsiyonun sınırlandırılmasına neden olabilmekte, böylece zayıf farmakokinetik özellikteki bu ilaç, ilaç geliştirmenin erken aşamalarında elimine edilerek maliyetlerin azalmasına yol açmaktadır (Alsensz ve Kansy, 2007; Takács-Novák vd., 2013).



Şekil 1.70. Gastrointestinal boşluğun şematik gösterimi (Kerns ve Di, 2008).

Son on yılda bağırsakta ilaç geçirgenliğinin tahmini için bilgisayar modellerinin geliştirilmesine çok çaba harcanmıştır. H bağı kapasitesi (Karls vd., 1991), polar yüzey alanı (Palm vd., 1997; Stenberg vd., 2001), lipofilite ve boyuta (van de Waterbeemd, 1998) dayalı teorik modeller geliştirilmiş ve bağırsak mukozasından pasif difüzyonun tahminine yönelik olarak uygulanmıştır. Buna rağmen son 5 yılda yüksek hızda ilaç keşif programlarının geliştirilmesinde lipofilik bileşiklerin absorpsiyonunu sınırlandıran en önemli faktör olan çözünürlüğe artan bir ilgi söz konusudur (Lipinski, 2000; Bergström vd., 2004).

BCS sınıflandırma sistemine göre ilaç adayı moleküllerin %75'inden fazlası çok düşük çözünürlüğe sahiptirler. Bu moleküllerin %50'sinden fazlası Sınıf II'ye (düşük çözünürlük, yüksek geçirgenlik); %25'inden fazlası da Sınıf IV'e (düşük çözünürlük, düşük geçirgenliğe) dâhildir. Bu yüzden çözünürlük, ilaç geliştirme çalışmalarında temel sorundur. Düşük çözünürlük formülasyonun geliştirilmesini etkilediği kadar hayvan çalışmalarını ve klinik çalışmaları da önemli derecede etkilemektedir. Çözünmeyen bileşikler düşük oral biyoyararlanıma sahiptir; düşük maruziyetten ötürü ilacın etkinliği azalmaktadır (Di vd., 2009).

Düşük çözünürlüğe sahip bileşiklerin formülasyonu da problemlidir. Bu bileşikleri çözmek için yüksek miktarda organik çözücü kullanılmaktadır ve bu oldukça toksiktir (Merisko-Liversidge vd., 2003). Ön ilaç (pro-drug) kullanılarak çözünürlük probleminin üstesinden gelinmeye çalışılmaktadır ve bu zaman zaman zorlayıcıdır. Suda çözünürlüğü az olan bileşiklerin geliştirilmesi zaman alıcı ve masraflıdır (Di vd., 2009).

#### **1.17.1. Çözünürlük için kullanılan terimler**

Çözünürlük belirli bir sıcaklıkta doygun çözeltilde çözünen derişimi olarak tanımlanır. Sudaki çözünürlük molekülün polaritesine bağlıdır ve iyonlaşabilen moleküllerde pH ile değişir (Higuchi vd., 1979). Çözünürlük çeşitli terim ve semboller ile tanımlanır (Takács-Novák, 2012). İlaç ile ilgili farmasötik literatürlerde yaygın şekilde kullanılan çözünürlük terimleri:

#### **Kinetik çözünürlük**

Çözeltiye 10-20 µg/mL dimetilsülfoksit (DMSO) stok çözeltisi eklendiğinde, çökeleğin ilk görüldüğü andaki bileşiğin derişimidir (Baka vd., 2008; Takács-Novák, 2012).

## **Denge çözünürlüğü (Termodinamik çözünürlük)**

Çözelti ve çözünenin dengede olduğu, katının fazlasının bulunduğu doymuş çözeltideki çözünen maddenin derişimidir. Bu değer sabit basınç ve sıcaklıkta sabittir ve her bileşik için kendine özgüdür.

İyonlaşabilen bileşikler için intrinsic çözünürlük ( $S_0$ ) terimi kullanılır. İyonlaşabilen bileşiğin tamamen non-iyonize halde bulunduğu pH'taki serbest asit (HA) ya da serbest bazın (B) denge çözünürlüğüdür (Takács-Novák, 2012).

## **Intrinsic çözünürlük ( $S_0$ )**

İyonlaşmamış bileşiğin denge çözünürlüğüdür. İyonlaşabilen bileşiğin tamamen iyonlaşmamış halde bulunduğu pH'taki serbest asit (HA) ya da serbest bazın (B) denge çözünürlüğüdür (Takács-Novák, 2012). Bir asitin intrinsic çözünürlüğü asidik  $pK_a$ 'sının iki pH birimi altında ölçülebilir. Bazın ise bazik  $pK_a$ 'sının iki birim üzerinde belirlenebilir.

### **1.17.2. Çözünürlüğün belirlenmesinde kullanılan yöntemler**

Çözünürlüğün belirlenmesinde, kinetik çözünürlüğün ve denge çözünürlüğünün ölçülmesi için kullanılan yöntemler olarak ikiye ayrılır (Takács-Novák, 2012).

#### **Kinetik çözünürlüğün ölçülmesi için yöntemler**

Türbidimetri, partikülün bulunduğu süspansiyondan geçen ışığın ölçümüdür. Bulanıklık ölçümüne dayanan bir yöntemdir. Nefelometri, çözeltide süspansiyon halinde bulunan bir partikül tarafından saçılan ışığın ölçümünü esas alır. Türbidimetrik, nefelometrik metotlar, direkt UV ve ultrafiltrasyon-LC/MS yöntemleri kinetik çözünürlük ölçümleri için kullanılır.

Türbidimetrik metotta maksimum çözünürlüğe ulaşan çözeltide çökelek oluşuncaya kadar 1 dakika aralıklarla 0.5  $\mu$ L DMSO stok çözeltisi sulu tampona

eklenir. Çökelekten kaynaklanan türbidite (bulanıklık) UV dedektör ile 620-820 nm'de ölçülür. Nefelometrik metotta, direkt UV ve ultrafiltrasyon-LC/MS metotlarında farklı dedektörler kullanılarak türbidimetrik metottaki uygulamaya bu cihazlara da adapte edilmiştir (Takács-Novák, 2012).

Kinetik çözünürlük ölçümlerinde DMSO'nun varlığı sonuçları ciddi şekilde etkilemektedir ve bu yüzden DMSO'yu minimum seviyede (%0,5'ten az) tutmak önemlidir. Kinetik çözünürlük ölçümlerinin temel dezavantajı standardizasyonun eksikliği, tekrarlanabilirliğin zayıflığı ve sonuçları karşılaştırılmadaki zorluklardır (Takács-Novák, 2012).

## **Denge çözünürlüğünün ölçülmesi için yöntemler**

### **Çalkalama Yöntemi**

Denge çözünürlüğünü ölçmek için çok sayıda metot mevcuttur, bunlardan en klasik olanı çalkalama metodudur (EPA, 1998). Bu metot doymuş çözeltide, çalışılan bileşiğin derişiminin ölçümüne dayanır. Dengeye ulaşmak için karıştırma basamağında 72 saat veya daha fazla süreye ihtiyaç vardır ve bunu takip eden 24 saatlik dengeleme basamağı mevcuttur. Çözeltideki ilaç miktarı ölçülür ve ilacın bu derişimi çözünürlüğü verir (Shoghi vd., 2013). Deneydeki inkübasyon süresi kullanılan katı maddenin çözünme hızına, morfolojisine, kristallenme derecesine, parçacık boyutuna ve kullanılan katı miktarına bağlıdır. Yetersiz inkübasyon süresi literatürde verilen farklı çözünürlük verilerinin elde edilmesinin nedenlerinden biridir. Bazen de gerçek çözünürlük dengesine ulaşmak için günler ya da haftalar süren çok uzun inkübasyon sürelerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu da analiz edilen maddenin bozulması, tampon pH'ında değişme gibi çok çeşitli problemlere neden olabilmektedir (Takács-Novák, 2012; Takács-Novák, 2017).

## Potansiyometrik titrasyon

Potansiyometrik titrasyon, iyonlaşabilen bileşiklerin çözünürlük ölçümleri için çalkalama metoduna alternatiftir (Stuart ve Box, 2005; Box vd., 2006.). Çözünürlüklerin belirlenmesi için Sirius Analytical Ltd. tarafından geliştirilen potansiyometrik yöntem, genel potansiyometrik yöntemin özel bir örneğidir. (Avdeef, 1998; Avdeef vd., 2000). Bu metotta az miktarda standart asit veya bazın örneğe eklenmesiyle ilacın süpersatürasyon (aşırı doygunluk) ve subsatürasyonu (alt doygunluk) temel alınır. Subsatürasyonundan süpersatürasyona giderken sistem dengeye zorlanır ve dengeye ulaşılan bu noktalardan asıl çözünürlük belirlenir. Çözünürlük değerlerinin belirlenmesinde potansiyometrik metotta shake flask (S-F, çalkalama metodu) metodundan daha az süreye ihtiyaç vardır ve bu değerlerin belirlenmesi için daha basit denge eşitlikleri kullanılır (Shoghi vd., 2013).

## Yüksek verimli yöntemler (High throughput methods)

logS için orta ya da yüksek verimli yöntemlerde, minyatürize çalkalama metodu (MSF) bileşikten tasarruf sağlayan ve hızlı bir metottur; ilaç analizlerinde sıklıkla kullanılır. Bu metotta, inkübasyon süresi yeterince uzundur ve DMSO'nun etkileri elimine edilmiştir. Bu metot kinetik çözünürlük ölçümleri için geliştirilse de denge çözünürlük ölçümlerinde de kullanılmaktadır (Takács-Novák, 2012).

## Özel Uygulamalar

Potansiyometrik titrasyonun özel bir uygulaması olan CheqSol yaklaşımı, polimorfların çözünürlüğünün çalışılması için kullanılmaktadır (Völgyi vd., 2010). Bunun yanında ilaç keşif ve geliştirme çalışmalarında vücut ile bağlantılı çözünürlük değerlerine daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır. *In vitro-in vivo* ilişkiyi geliştirmek için, çözünürlüğün ölçülmesinde biomimetik ortamlar önerilmektedir. Bağırsakta safra asitlerinin ve yağ gibi diğer bileşenlerin varlığının lipofilik bileşiklerin gerçek çözünürlüğünü değiştirdiğine (genellikle

artırdığı) dair kanıtlar mevcuttur. Yapılan çalışmalarda geliştirilen 2 fizyolojik ortam kullanılmaktadır. Açlık halindeki simüle edilmiş bağırsak sıvısı ve tokluk halindeki simüle edilmiş bağırsak sıvısı sırasıyla pH 6,5 ve 5,0 değerlerine sahiptir ve farklı miktarda sodyum taurokolat, lesitin ve tuz içerirler. Yapılan çalışmalarda test edilen ilaçların çoğunluğunun saf tamponlardan daha çok bu ortamlarda yüksek çözünürlük değeri verdiği görülmüştür (Bard vd., 2008; Fagerberg vd., 2010).

### 1.17.3. Çözünürlük hesaplamalarında kullanılan eşitlikler

#### Henderson-Hasselbalch Eşitliği

Sulu çözeltide birçok ilaç molekülü en az bir tane asidik veya bazik fonksiyonel grup içerdiğinden iyonlaşabilmektedir. Bu moleküller çözeltinin pH'ına bağımlı olarak yüksüz ya da yüklü formda bulunabilirler. Yüklü formlar daha çözünürdür ve bu yüzden sudaki çözünürlükleri pH'ya bağımlıdır. Molekül sadece monomer halde bulunduğu zaman, pH'ya bağımlı denge çözünürlüğü Henderson-Hasselbalch (HH) eşitliği (Avdeef, 2007) ile tanımlanır. Monoprotik bazlar için HH eşitliği eşitlik 1.59 ile ifade edilmektedir (Völgyi, vd., 2010).

$$\log S = \log S_0 + \log(10^{pK_a - pH} + 1) \quad (1.59)$$

S: Belirli pH'taki denge (termodinamik) çözünürlüğü, iyonlaşmış ilacın çözünürlüğü

S<sub>0</sub>: Intrinsic çözünürlük, iyonlaşmamış ilacın çözünürlüğü

pK<sub>a</sub>: iyonlaşma/protonasyon sabiti'dir (Völgyi vd., 2010).

HH eşitliğinde monoprotik bileşikler için sadece iki deneysel sonuca ihtiyaç vardır. Bunlar bileşiğin pK<sub>a</sub> ve intrinsic çözünürlük (S<sub>0</sub>) değeridir. Poliprotik sistemlerde bileşiğe bağlı olarak daha ayrıntılı eşitliklere ihtiyaç vardır (Bergström vd., 2004; Shoghi vd., 2013).

Mono, di ve triprotik moleküller için kullanılan pH-çözünürlük eşitlikleri Çizelge 1.10'da verilmiştir.

Çizelge 1.10. Mono, di ve triprotik moleküller için kullanılan pH-çözünürlük eşitlikleri (Avdeef, 2007)

Tür	Denge eşitliği	Denge sabiti	Çözünürlük eşitlikleri
A <sub>1</sub>	$HA \leftrightarrow H^+ + A^-$ $HA_{(k)} \leftrightarrow HA$	$K_a$ $S_0$	$\log S = \log S_0 + \log(10^{pH-pK_a} + 1)$
A <sub>2</sub>	$H_2A \leftrightarrow H^+ + HA^-$ $HA^- \leftrightarrow H^+ + A^{2-}$ $H_2A_{(k)} \leftrightarrow H_2A$	$K_{a1}$ $K_{a2}$ $S_0$	$\log S = \log S_0 + \log(10^{-pK_{a2}-pK_{a1}+2pH} + 10^{-pK_{a1}+pH} + 1)$
A <sub>3</sub>	$H_3A \leftrightarrow H^+ + H_2A^-$ $H_2A^- \leftrightarrow H^+ + HA^{2-}$ $HA^{2-} \leftrightarrow H^+ + A^{3-}$ $H_3A_{(k)} \leftrightarrow H_3A$	$K_{a1}$ $K_{a2}$ $K_{a3}$ $S_0$	$\log S = \log S_0 + \log(10^{-pK_{a3}-pK_{a2}-pK_{a1}+3pH} + 10^{-pK_{a2}-pK_{a1}+2pH} + 10^{-pK_{a1}-pH} + 1)$
B <sub>1</sub>	$BH^+ \leftrightarrow H^+ + B$ $B_{(k)} \leftrightarrow B$	$K_a$ $S_0$	$\log S = \log S_0 + \log(10^{+pK_a-pH} + 1)$
B <sub>2</sub>	$BH_2^{2+} \leftrightarrow H^+ + BH^+$ $BH^+ \leftrightarrow H^+ + B$ $B_{(s)} \leftrightarrow B$	$K_{a1}$ $K_{a2}$ $S_0$	$\log S = \log S_0 + \log(10^{+pK_{a2}+pK_{a1}-2pH} + 10^{+pK_{a2}-pH} + 1)$
B <sub>3</sub>	$BH_3^{3+} \leftrightarrow H^+ + BH_2^{2+}$ $BH_2^{2+} \leftrightarrow H^+ + BH^+$ $BH^+ \leftrightarrow H^+ + B$ $B_{(k)} \leftrightarrow B$	$K_{a1}$ $K_{a2}$ $K_{a3}$ $S_0$	$\log S = \log S_0 + \log(10^{+pK_{a3}+pK_{a2}+pK_{a1}-3pH} + 10^{+pK_{a3}+pK_{a2}-2pH} + 10^{+pK_{a3}-pH} + 1)$
X <sub>1</sub>	$H_2X^+ \leftrightarrow H^+ + HX$ $HX \leftrightarrow H^+ + X^-$ $HX_{(k)} \leftrightarrow HX$	$K_{a1}$ $K_{a2}$ $S_0$	$\log S = \log S_0 + \log(10^{+pK_{a1}-pH} + 10^{-pK_{a2}+pH} + 1)$
X <sub>2</sub>	$H_3X^{2+} \leftrightarrow H^+ + H_2X^+$ $H_2X^+ \leftrightarrow H^+ + HX$ $HX \leftrightarrow H^+ + X^-$ $HX_{(k)} \leftrightarrow HX$	$K_{a1}$ $K_{a2}$ $K_{a3}$ $S_0$	$\log S = \log S_0 + \log(10^{+pK_{a2}+pK_{a1}-2pH} + 10^{+pK_{a2}-pH} + 1)$
X <sub>3</sub>	$H_3X^+ \leftrightarrow H^+ + H_2X$ $H_2X \leftrightarrow H^+ + HX^-$ $HX^- \leftrightarrow H^+ + X^{2-}$ $H_2X_{(k)} \leftrightarrow H_2X$	$K_{a1}$ $K_{a2}$ $K_{a3}$ $S_0$	$\log S = \log S_0 + \log(10^{-pK_{a3}-pK_{a2}+2pH} + 10^{-pK_{a2}+pH} + 10^{+pK_{a1}-pH} + 1)$

pH'a bağımlı sudaki çözünürlüğün tahmininde, bileşiğin pK<sub>a</sub> ve logS<sub>0</sub> değerleri bilindiğinde HH ilişkisi kullanılır. Fakat HH eşitliğinin uygulamasının da sınırlı olduğu belirtilmektedir (Bergström vd., 2004).

Alternatif olarak, suda kimyasal bileşiklerin çözünürlüğünün tahmininde kantitatif yapı-özellik ilişkisi (quantitative structure property relationship, QSPR) yaklaşımları kullanılmaktadır. QSPR modeli ilaç keşif çalışmalarının etkinliğini geliştirmede kullanılsada, çözünürlük tahmini zor olan bir fizikokimyasal parametredir (Shayanfar vd., 2010).

Moleküler yapıdan çözünürlük tahminine yönelik çok sayıda teorik model de mevcuttur (van de Waterbeemd, 1998). Bunlar 1D veya 2D tanımlayıcıları kullananlar ve 3D tanımlayıcıları kullanan modeller olarak ikiye ayrılır. 1D veya 2D tanımlayıcıları kullanan modeller basittir. Daha kesin sonuçlar veren 3D modeller ise:

- i) Yalkowsky'nin genel çözünürlük eşitliği (GSE, general solvation equation)
- ii) Abraham'ın lineer solvasyon enerji ilişkileri yaklaşımı (LSER)'dir.

GSE, erime noktası ve dağılma katsayısının logaritması ( $\log P$ )'nı içeren Eşitlik 1.60 ile ifade edilir (Shayanfar vd., 2010).

$$\log S_w = 0,5 - 0,01(\text{erime noktası} - 25) - \log P \quad (1.60)$$

$S_w$ : İlacın 25 °C'deki sudaki molar çözünürlüğüdür.

Katının erime noktası 25°C'den daha az ise (erime noktası-25) 0 kabul edilir (Ran vd., 2001).

LSER, Abraham tarafından çözünenin beş özelliğinin kullanıldığı diğer bir modeldir (Stovall vd., 2005). LSER kullanılarak bileşiğin çözünürlüğü hesaplamaları Eşitlik 1.61 ile yapılmaktadır (Jouyban ve Fakhree, 2012).

$$\log S_w = 0,395 - 0,955E + 0,320S + 1,155A + 3,255B - 0,785AB - 3,330V \quad (1.61)$$

E: Molar kırılma

S: dipolarite/polarlanabilirlik



A: H bağı asitliği

B: H bağı bazlığı

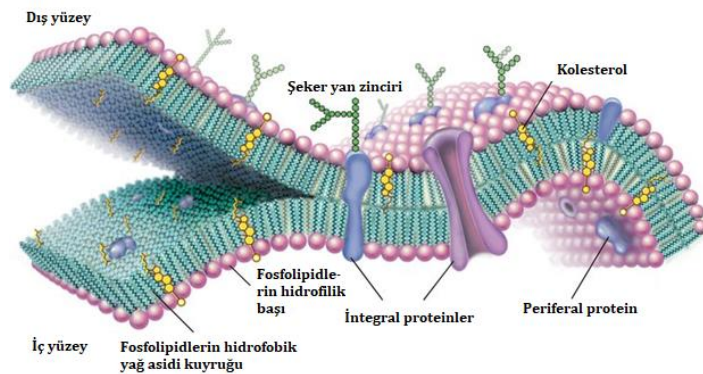
V: McGowan hacmini gösterir (Abraham vd., 2004)

3 parametre (S, A, B) bileşiğin sudaki ve diğer organik çözücülerdeki çözünürlük verilerinden hesaplanmaktadır. A.B terimi saf katı veya sıvı haldeki ilacın asidik veya bazik fonksiyonel grupları arasındaki hidrojen bağı etkileşimlerinin göstergesidir (Abraham ve Le, 1999).

Abraham çözünen parametreleri bazı ilaçlar için mevcut değildir. GSE ve LSER yaklaşımları sudaki çözünürlüğün tahmininde kullanılan popüler yaklaşımlardır; fakat bu modellerde ilaç molekülleri ve bazı moleküllerin çözünürlük tahminlerinde tahmin hataları oldukça yüksektir (Jouyban, 2009).

### 1.18. Lipofilisite

İlaç moleküllerinin uygulandığı bölgeden absorpsiyonu deri, kornea, intestinal mukoza, kan-beyin bariyeri ve plasenta gibi farklı biyomembranlardan taşınmasını gerektirir. Genellikle, bu biyomembranların tümü fosfolipid, kolesterol, integral protein içeren lipid tabakalardır (Şekil 1.71). Bu taşınma ve geçiş süreçlerinde lipofilik karakter belirleyici etkiye sahiptir; madde bu tabakaları geçebilecek kadar lipofillik aynı zamanda da sitoplazmaya girebilecek kadar da suda çözünür özellikte olmalıdır (Testa vd., 2000; Janicka vd., 2013).

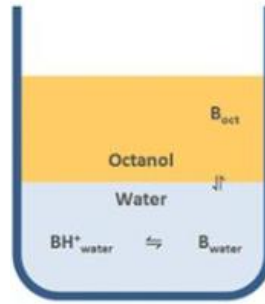


Şekil 1.71. Hücre zarının yapısı (Thoughtco, 2018)

İlacın vücuttaki farklı membranlara bağlanabilme yeteneğinin bilinmesi ilacın terapötik ve yan etkilerinin anlaşılmasında oldukça önemlidir (Seydel et al.,

1992). Yeni ilaç adayı moleküllerin toksikolojik ve farmakolojik etkilerinin değerlendirilmesinde de bu moleküllerin membranlara bağlanabilme yeteneği göz önünde bulundurulmalıdır. Yapılan çalışmalarda ilaç moleküllerinin membran geçirgenliğinin lipid-su dağılma katsayısı ile bağlantılı olduğu görülmektedir (Collander, 1954; Österberg vd., 2001).

Maddelerin biyolojik olarak dağılımı o maddenin lipofilitesinin ölçülmesiyle karakterize edilir. Lipofilite, oktanol-su dağılma katsayısı olarak tanımlanır (Hansch ve Fujita; 1964) ve logaritmik formda ( $\log P_{o/w}$ ) ifade edilir. Aynı zamanda bu parametre maddenin aynı türünün oktanol ve sulu faz arasında dağılımı olarakta tanımlanır (Şekil 1.72) (Leo vd., 1971). Maddenin lipofilik ortama ilgisi olarak ifade edilen dağılma katsayısında, bir sulu tampon ve su ile karışmayan çözücü kullanılır. Sıvı-sıvı (oktanol: suda dağılma) veya katı-sıvı (ters faz kromatografik kolonda alıkonma) bifazik sistemlerde molekülün dağılması gerçekleştirilir. Moleküler türde dağılma katsayısı için logP terimi; iyonlaşabilen bileşikler için ise logD terimi kullanılır (Barbato vd., 1986; Österberg vd., 2001). Dağılma katsayısı solvafobik teori olarakta adlandırılmaktadır (Horvath vd., 1976; Vailaya ve Horvath, 1997; Valkó, 2016). Bu parametreler eşitlik 1.62 ve 1.63 ile ifade edilir.



Şekil 1.72. Bazik yapıdaki ilaç molekülünün n-oktanol ve su arasındaki dağılımının gösterimi (Bienta, 2018)

$$\log P = \log \frac{\text{n-oktanol fazında çözünen nötral türlerin derişimi}}{\text{Sulu fazda çözünen nötral türlerin derişimi}} \quad (1.62)$$

$$\log P = \frac{[B_{\text{oktanol}}]}{[B_{\text{aq}}]} \quad (1.63)$$

Literatürde farklı lipofilik fazlar (zeytin yağı, benzen, sikloheksan, kloroform, oleil alkol) lipofilisitenin deneysel tayininde kullanılmıştır. Artık günümüzde 1-oktanol en çok kullanılan faz haline gelmiştir. (Pauletti ve Wunderli-Allenspach, 1994). Bu seçim biyomembranlar ile oktanolün fizikokimyasal özelliklerindeki benzerlik ile açıklanabilir (Hansch ve Leo, 1995; Ayouni vd., 2005).

Lipofilisite ilaç adayı moleküllerin toksikolojik özellikleri ile olduğu kadar farmakokinetik ve farmakodinamik özellikleri ile de bağlantılı olan, ilaç dizayn çalışmalarında hayati öneme sahip fizikokimyasal bir parametredir (Giaginis vd., 2018). Overton (Overton, 1901) ve Meyer (Meyer, 1899)'in bu parametre üzerine yaptıkları bilimsel çalışmalardan lipofilisite QSAR çalışmalarında çok kullanılan bir parametre haline gelmiştir (Mayer ve Waterbeemd, 1985; Ayouni vd., 2005). Yeni bir yaklaşım olan ilaç tasarımında veritabanı aramalarında (database searching in drug design) da lipofilisite yaygın şekilde kullanılmaktadır (Vrakas vd., 2003).

İlaç moleküllerinin oral absorpsiyonu ve çeşitli farmakokinetik özellikleri de molekülün lipofilisitesinden etkilenmektedir (Van de Waterbeemd vd., 2001). ADMET özelliklerine (Henchoz vd., 2009; Waring, 2010), kan beyin bariyerinden geçişe ve klirenese (Kerns ve Di, 2004) katkısından dolayı ilaç araştırmalarının erken fazlarında lipofilisitenin tayini önem arz etmektedir (Pallicer vd., 2014). Buna ek olarak topraktan emilim, akutik toksisite, biyobirikim, biyodegradasyon süreçleri kimyasalların lipofilisitesinin çevresel süreçlerde etkisini ortaya koymaktadır (Csizmadia vd., 1997).

İlaçlarla ilgili veri tabanlarının büyük kısmını bazik bileşikler oluşturur ve ilaç tasarımında bu bileşiklerin lipofilisitesinin değerlendirilmesi acil bir gereksinimdir. Literatürde logP/logD tayinlerinde farklı deneysel çalışmalar mevcuttur (Giaginis ve Tsantili-Kakoulidou, 2008). logP<sub>oct</sub> değerlerinin doğru ve hızlı bir şekilde tayini, ilaç keşif çalışmalarında fizikokimyasal özelliklerin belirlenmesi için deneysel yöntemlere katkı sağlamaktadır (Lombardo vd., 2000; Taillardat-Bertschinger vd., 2002).

Bu yöntemlerin içinde çalkalama metodu en eski ve en yaygın kullanılanıdır; katının su ve oktanol fazları arasında dağılmasını içerir. Dağılma işlemi gerçekleştikten sonra iki faz ayrılır ve her fazda çözünenin derişimi ölçülür. Bu yöntem basitliğine rağmen bazı kısıtlamalara sahiptir. Dağılma katsayısı ölçülmeden önce, iki fazın birbiriyle doyurulması gerekmektedir, bu da en az 24 saatlik bir süreçtir. Yöntemin pratikliği  $-2 < \log P < 4$  aralığıyla sınırlıdır (OECD, 1995; Shoshtari vd., 2008).

Çift faz potansiyometrik titrasyon iyonlaşabilen bileşiklerde lipofilisite tayini için uygundur fakat özel bir ekipmana ihtiyaç duyulduğundan analitik laboratuvarlarda her zaman mevcut olmayabilir (Avdeef, 1993; Giaginis ve Tsantili-Kakoulidou, 2008).

Yukarıdaki tekniklerle ilgili zorlukların üstesinden gelmek için  $\log P_{o/w}$  hesabında çeşitli indirekt yöntemler de kullanılmaktadır (Nasal ve Kaliszan, 2006). Ters faz sıvı kromatografi yöntemi oktanol:su dağılma katsayısının tayininde sıklıkla kullanılmaktadır ve lipofilisite için oldukça popüler bir alternatif haline gelmiştir. Bu yöntem oldukça hızlıdır, tekrarlanabilirliği iyidir, safsızlıklara ve degradasyon ürünlerine karşı duyarlı değildir, az miktarda örnekle analiz gerçekleştirilir ve çok sayıda numune ile çalışılabilir (Braumann, 1986; Dorsey ve Khaledi, 1993; Liu vd., 2005; Giaginis ve Tsantili-Kakoulidou, 2008).

Son zamanlarda, ilaç dizayn çalışmalarında bilgisayar teknolojilerinin hızlı gelişimi ile, ilaç adayı moleküllerin moleküler özelliklerinin belirlenmesi ve hızlı şekilde ölçülmesi bir gereklilik haline gelmiştir. Özellikle  $\log P_{o/w}$ 'nin tahmin edilmesi tıpta, farmakolojide, toksikolojide, çevre kimyası ve gıda kimyası alanlarındaki araştırmacılar tarafından dikkat çekmektedir.  $\log P_{o/w}$ 'nin çalkalama metodu ve ters faz sıvı kromatografi yöntemi yerine, bilgisayar programlarıyla ya da moleküler yapıdan tahmin edilmesi günümüzde oldukça yaygındır (Yamagami vd., 2002).

Lipofilisite hesabı için tahmin programları, yeni kimyasal maddelerin yapı tasarımında çok kullanılmaktadır (Mannhold vd., 2009; Pallicer vd., 2014).  $\log P_{o/w}$  tahmininde çeşitli tahmin metotları geliştirilmiştir; bunlar altyapıya ve özelliğe dayalı metotlar (substructure-based and property-based methods) olarak iki kategoriye ayrılabilir.

Altyapıya dayalı metotlar, bileşiğin iki boyutlu yapısının fragmanlara (fragmental yaklaşımı) veya tekli atomlara ayrılmasıyla (atom temelli yaklaşımlar) oluşturulur (Wang vd., 2000). Elde edilen logP değeri, terimlerin toplamına dayanır (Mannhold vd., 2009). Farklı fragmental metotlar arasındaki fark, hedef molekülde tanımlanacak parça kümesi, tanımlanan parçaların her birinin katkı sabiti ve parçanın çevresine bağlı olarak uygulanacak farklı düzeltme faktörleri ile meydana gelir. Özellik temelli yaklaşımlarda ise tüm molekül hesaba katılarak hesaplamalı tanımlayıcıların kullanılmasıyla logP değerleri hesaplanır. Bu tekniklerin birçoğu gerekli tanımlayıcıların hesaplanmasında bileşiğin 3D yapısına ihtiyaç duyar ve sonuçlardaki çeşitlilik konformasyonel belirsizlikten kaynaklanmaktadır. Altyapı temelli metotlar, hızları ve kolay uygulanabilirliği sayesinde ilaç analizlerinde en yaygın kullanılan metotlar olarak kullanılmaktadır (Pallicer vd., 2014).

Abraham çözünen tanımlayıcıları kullanılarak hesaplama yoluyla elde edilen log P değerleri için kullanılan eşitlik aşağıda verilmiştir (Lombardo vd., 2000)

$$\log P_{o/w} = 0,088 + 0,562E - 1,054S + 0,034A - 3,460B + 3,814V \quad (1.64)$$

Tezde çalışılan bileşiklerin Abraham çözünen tanımlayıcıları Çizelge 1.11'de gösterilmiştir.

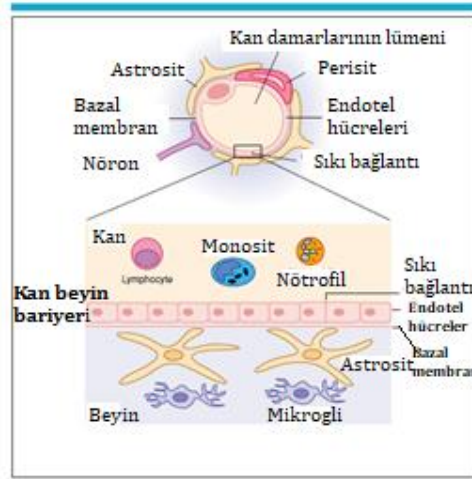
Çizelge 1.11. Tezde çalışılan bileşiklerin Abraham çözünen tanımlayıcıları

Bileşik	E	S	A	B	V	Ref.
Albendazol	2,01	1,96	0,71	1,12	1,95	Abraham vd., 2012.
Astemizol	3,10	2,70	0,13	1,64	3,56	Abraham vd., 2012.
Mebendazol	2,45	2,76	0,71	1,38	2,13	Abraham vd., 2012.
Tiyabendazol	1,93	1,88	0,41	0,87	1,40	Lombardo vd., 2000.
Klotrimazol	2,70	2,34	0,00	0,80	2,62	Lombardo vd., 2000.
Metimazol	1,10	1,31	0,22	1,03	0,84	Abraham vd., 2012
Metronidazol	1,12	1,75	0,31	0,86	1,19	Lombardo vd., 2000.

### 1.19. Kan Beyin Bariyeri

İnsanlarda ve diğer kompleks organizmalarda yaşamın kendisi homeostasiye (canlının vücudunda gerçekleşen her türlü değişikliğe karşı var olan dengenin korunmaya çalışılması) bağlıdır. Homeostasinin sağlanması vücutta beyin kadar hiç bir yerde önemli değildir. Vücudun beyin dışındaki diğer kısımlarında, hormonlar, amino asitler ve potasyum gibi iyonların hücre dışı konsantrasyonlarında özellikle yemeklerden veya egzersizden sonra küçük dalgalanmalar meydana gelir. Eğer beyin bu tür dalgalanmalara maruz kalsa, kontrolsüz sinir aktivitesi olabilir, çünkü bazı hormonlar ve amino asitler nörotransmitter olarak görev alır ve potasyum iyonları sinir hücreleri üzerinde etkilidir. Bu yüzden beyin, kanın bileşimindeki geçici değişikliklerden izole edilmek zorundadır (Goldstein ve Betz, 1986).

Kan beyin bariyeri (Şekil 1.73), sistemik kan dolaşımından beyni ayırarak merkezi sinir sisteminin homeostasini muhafaza eden (koruyan) kompleks hücresel sistemdir (de Vries vd., 1997). Bu bariyer, beyin kılcal damarlarını kaplayan beyin endotelinin sürekli tabakasıdır ve kandan merkezi sinir sistemine (CNS) madde girişini engelleyen ana bariyerdir (Feng, 2002; Hansen vd., 2002).



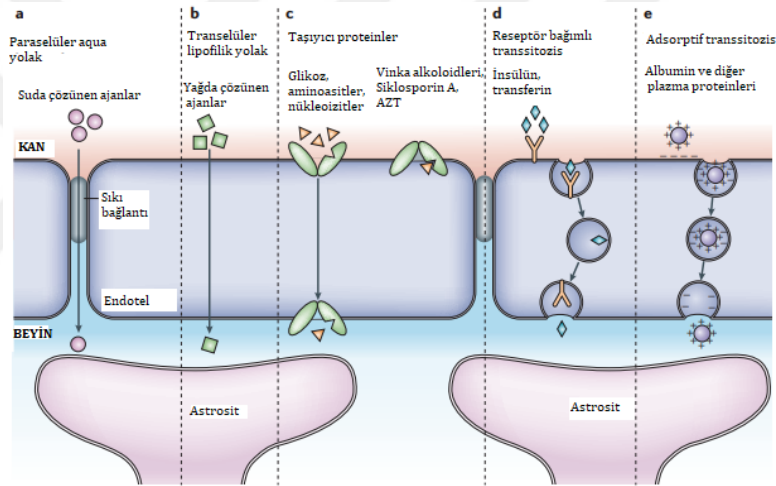
Şekil 1.73. Kan beyin bariyeri (Francis vd., 2003)

Kan beyin bariyeri (blood brain barrier, BBB), beyinde beyin kılcal damarlarının endotel hücrelerinin sıkıca bağlanmasıyla meydana gelen, kan dolaşımı ve beyin parankiması arasında bariyer oluşturan yapıdır. Lenfosit, monosit ve nötrofil gibi kan yollu bağışıklık hücreleri bu bariyeri geçemez. Lamin, fibronektin ve diğer proteinleri içeren ince bir bazal membran, endotel hücreleri çevreler ve mekanik destek sağlar. Böylelikle, BBB, patojenlerin infiltrasyonunu önlemek ve merkezi sinir sisteminde antikor aracılı immün tepkilerini kısıtlamak ve kırılğan sinir ağının düzensizleşmesini önlemek için çok önemlidir. Böylelikle, BBB, patojenlerin infiltrasyonunu önlemek ve merkezi sinir sisteminde antikor aracılı immün tepkilerini kısıtlamak ve kırılğan sinir ağının düzensizleşmesini önlemek için çok önemlidir (Francis vd., 2003).

Merkezi sinir sistemi aktif olanlar veya merkezi sinir sistemi inaktif olanlar olarak sınıflandırılan ilaç adayı moleküllerin (Lipinski, 2004); ilaç keşif çalışmalarında, kan beyin bariyerini geçip geçmediğini belirlemek gerekmektedir. Merkezi sinir sistemi aktif ilaçlar için kan beyin bariyerine nüfuz etmek önemli ve gerekliyken, diğer periferel bölgelere etki etme amacıyla olan merkezi sinir sistemi inaktif ilaçlar için kan beyin bariyerini geçmek, istenmeyen yan etkilere sebep olmaktadır (Pardridge, 2002).

Vücuttaki bariyerlerden geçiş için paraselüler ve transselüler olarak iki yol mevcuttur. Küçük hidrofilik bileşikler için ( $M_A < 200$  Da) (Lennernäs, 1995)

hücreler arasındaki gözeneklerden paraselüler yolla geçiş sağlanmaktadır ve bu yolda molekül ağırlığı sınırı 400-500 Da'dur. Beyin endotelinde paraselüler yol ihmal edilir. Hem intestinal epitelde hem de kan beyin bariyerinde trans-selüler yol, özellikle hücre membranları arasında pasif difüzyon, çok önemlidir. Transelüler yolda şeker, aminoasit, di ve tripeptit gibi besinlerin, nükleosidlerin ve yapısal olarak ilişkili ilaç bileşiklerin taşınması için spesifik taşıyıcılar görevlidir. Bazı taşıyıcılar, enerji tüketimi olmadan iş görürken, P-glikoprotein gibi aktif taşıyıcılar derişim gradyanına karşı iş yaparak enerji harcarlar. Endositoz ve ekzositoz diğer trans-selüler yol olarak işlev görür ve yüksek molekül ağırlıklı, hücre yüzeyinde spesifik reseptörlü peptid ve proteinlerin taşınmasında görev alır (Şekil 1.74) (Krämer, 1999; Abbott vd., 2006).



- Sıkı bağlantılar, polar ilaçlar dahil olmak üzere suda çözünebilir maddelerin geçişini ciddi şekilde kısıtlar
- Endotelin lipid membranlarının geniş yüzey alanı, lipid-çözünür maddeler için etkili bir difüzyon yolu sunar
- Endotel glikoz, amino asitler, pürin bazları, nükleosidler, kolin ve diğer maddeler için taşıyıcı proteinler içerir. Bazı taşıyıcılar enerjisi bağımlıdır (P-glikoprotein gibi), dışarıya taşıyıcı (efflux) olarak görev alırlar. AZT: azidotimidin.
- İnsülin, transferrin gibi bazı belirli proteinlerspesifik reseptör bağımlı endositoz ve transsitosis ile alınırlar
- Albümin gibi doğal plazma proteinleri zayıf şekilde taşınırlar, adsorptive bağımlı endositoz ve transsitosis ile taşınmaları artırılabilir. Beyin endotelinden ilaç taşınması yapılan b-e yollarının kullanımının bağımlıdır. CNS (central nervous system, merkezi sinir sistemi) ilaçlarının çoğunluğu b yolağı aracılığıyla beyne girer. Transsitosis:Hücre içinde işlenmeden maddenin doğrudan kana taşınmasıdır.

Şekil 1.74. Kan beyin bariyerindeki yollar (Abbott vd., 2006)

İlaç molekülünün kan beyin bariyerinden geçişinde kullanılan en yaygın ölçüm beyin ve kandaki derişim oranları cinsinden ifade edilir (Abraham, vd., 1997).

$$\log BBB = \log \frac{(\text{Maddenin beyindeki derişimi})}{(\text{Maddenin kandaki derişimi})} \quad (1.65)$$



Kan beyin dağılma oranının deneysel olarak belirlenmesi zor ve zaman alıcıdır çünkü deney hayvanlarının kanında ve beyinde ilaç derişiminin doğrudan ölçülmesini gerektirir ve bu durumda radyoaktif olarak işaretlenmiş bileşiklerin sentezine ihtiyaç duyulur (Young vd., 1988; Lombardo vd., 1996). Uygun olmayan ilaç adayı moleküllerin erken elenmesi için yeterli doğruluğa sahip hesaplama yöntemiyle logBB tahminine gereksinim duyulmaktadır (Clark, 1999).

İlaç keşif çalışmalarında kan beyin bariyerinden geçişin tahmininde *in vitro* metotlar ve hesaba dayalı modeller kullanılmaktadır. *in vitro* metotlar olarak log P/log D (Levin, 1980),  $\Delta \log P$  (Young vd., 1988), immobilize yapay membranlar (Reichel ve Begley, 1998), polar yüzey alanı (Clark, 1999), LSER (Gratton vd., 1997; Platts vd., 2001), yüzey gerilimi (Fischer vd., 1998) ve membran geçirgenliği kullanılmaktadır (Di vd., 2003).

Yapılan çalışmalarda kan beyin bariyerinden moleküllerin geçişi, farklı çözücü karışımları kullanılarak (oktanol-su; sikloheksan-su) dağılma katsayısından (P) deneysel olarak hesaplanmıştır. Fakat birçok durumda dağılma katsayısı ile kan beyin bariyerinden geçiş arasında iyi bir korelasyon elde edilememiştir (Basak vd., 1996).

Kan beyin bariyerinden geçiş için *in vitro* ve yapay-membran temelli metotlar geliştirilmesine rağmen, ilaç geliştirme çalışmalarının erken basamaklarında, uygun olmayan ilaç adayı moleküllerin elenmesi için hesaplamalı tahmin yöntemlerine ihtiyaç duyulmaktadır (Clark, 1999). Dipolarite/polarlanabilirlik; H bağı asitliği, bazlığı, moleköl hacmi gibi solvatokromik parametreler kullanılarak beyindeki vasküler endotelden molekölün geçişi hesaplanmıştır (Basak vd., 1996). Abraham'ın çözünen parametrelerinin kullanıldığı Eşitlik 1.66 yardımıyla logBB hızlı ve kolay şekilde hesaplanabilmektedir (Chadha ve Abraham, 1994; Abraham vd., 1997b).

$$\log BB = -0,038 + 0,198E - 0,687S - 0,715A - 0,698B + 0,995V \quad (1.66)$$

İlaç molekülünün logBB değeri 0,3'ten büyük olduğunda kan beyin bariyerini kolaylıkla geçer; bu değer -1,0'den küçük olduğunda ise madde beyinde zayıf şekilde dağılır (Abraham, vd., 1997).

### **1.20. Validasyon**

Analitik kimya, gıda analizleri, çevre analizi, farmasötik, biyomedikal analiz ve yaşam bilimleri gibi pek çok alanla ilişkili bir bilim dalıdır (Riley ve Rosanske, 1996; Özkan, 2018). Analitik ölçümlerin temel amacı tutarlı, güvenilir ve doğru veri elde etmektir. Bu bağlamda validasyonu yapılmış analitik metotlar bu amacın gerçekleştirilmesinde temel rol oynar. Analitik metot validasyonu ilaç endüstrisinde ilacın kalitesi, geliştirilmesi ve ruhsatlandırılmasında, son ürünün güvenliğinin ve niteliğinin sağlanmasında temel öneme sahiptir (Riley ve Rosanske, 1996). Yeni analitik yöntemlerin geliştirilmesinde, biyoeşdeğerlik ve biyoyararlanım çalışmalarında, ham madde olarak veya dozaj formlarında ilaç analizi ve çalışmaları için validasyona ihtiyaç duyulmaktadır (Özkan vd., 2015).

Metot validasyonu Amerika'da 1978'de düzenleyici gereksinim olarak uygulamaya konulmuş ve diğer ülkelerde ilaç dozaj formu için tescil başvurularının bir parçası haline gelmiştir. Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu, 1987'de metot validasyonu için kılavuz yayınlamıştır (Riley ve Rosanske, 1996). Bu belge Uluslararası Uyum Konferansı (ICH, International Conference on Harmonization) tarafından teknoloji ve insan kullanımı için ilaç kayıtlarına ilişkin teknik gereksinimleri yansıtacak şekilde güncellenmiş ve kabul edilmiştir (ICH, 2005). Bunlara ek olarak literatürde metot validasyonu için Mevcut İyi Üretim Uygulamaları (cGMP, Current Good Manufacturing Practice), Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (FDA), İlaç Denetim İşbirliği Programı ve Avrupa (Pharmaceutical Inspection Cooperation Scheme and Europe, PIC/S) Amerika Birleşik Devletleri Farmakopesi (United States Pharmacopeia Convention, USP), Uluslararası Standardizasyon Örgütü/ Uluslararası Elektroteknik Komisyonu 17025 (International Organization for Standardization/ International Electrotechnical Commission, ISO/IEC 17025) (Agilent, 2010), Ulusal İlaç Uygulamaları (National Drug Administration, NDA), Amerikan Halk Sağlığı

Birliği (The American Public Health Association, APHA) diğer faydalı protokollerdir (Özkan vd., 2015).

Aletli analizlerde yapılması gerekli validasyon türleri,







- 1) Cihazın kontrolü ve validasyonu, (tüm donanım ve yazılımlar için geçerlidir)
- 2) Geliştirilen yöntemin geçerliliğini kanıtlamak için veya geliştirilmiş olan bir yöntemdeki parametre değişikliklerinden sonra yapılan validasyon,
- 3) Sistem Uygunluk Testleri (SUT) olarak sınıflandırılır.

Cihaz validasyonu cihaz sağlayıcısı tarafından yapılmak zorundadır. İyi laboratuvar uygulamaları (GLP), iyi imalat teknikleri (GMP) ve/veya ISO 9000 vb. standartlara göre valide edilmiş bir ortamda cihazı geliştirmekle sorumludurlar (Sağırlı, 2016).

Yöntem validasyonu, bir laboratuvarın güvenilir analitik veri üretmesine izin vermek için uyguladığı ölçümlerin önemli bir bileşenidir (Özkan vd., 2015). Yöntemin kalibrasyonu, gravimetri ve kulometri hariç bütün analitik yöntemler için gereklidir. Yöntemin kalibrasyonu ölçülen analitik sinyal ile analit derişimi arasındaki ilişkinin belirlenmesidir. En çok kullanılan üç yöntem:

- a) Dış kalibrasyon yöntemi
- b) Standart ekleme yöntemi
- c) İç standart ekleme yöntemi'dir (Sağırlı, 2016).

Metodun geçerliliğinin sağlanmasında kullanılan karakteristik validasyon parametreleri aşığıdaki gibidir:

-  Doğruluk (Accuracy)
-  Kesinlik (Precision)
-  Doğrusallık (Linearity)
-  Özgünlük, Spesifiklik (Specificity)
-  Seçicilik (Selectivity)
-  Gerçeklik (Trueness)

- ✚ Geri kazanım (Recovery)
- ✚ Aralık (Range)
- ✚ Tayin alt sınırı (LOD)
- ✚ Kantitatif yorum sınırı (LOQ)
- ✚ Duyarlılık, Hassaslık (Sensitivity)
- ✚ Sağlamlık (Ruggedness/Robustness) (Thompson vd.,2002; Taverniers vd., 2004)

Validasyon parametrelerinin hangi protokollerde yer aldığı Çizelge 1.12’de verilmiştir (Agilent, 2010).

Çizelge 1.12. Validasyon parametreleri ve yer aldığı protokoller (Agilent, 2010)

Parametre	Parametrenin kabul gördüğü protokol
Spesifiklik	USP, ICH
Seçicilik	ISO 17025
Kesinlik	USP, ICH
-Tekrarlanabilirlik	ICH, ISO 17025
-Orta düzeyde kesinlik	ICH
-Tekrar üretilebilirlik	ICH USP ve ISO 17025’de sağlamlık (ruggedness) olarak tanımlanır.
Doğruluk	USP, ICH, ISO 17025
Doğrusallık	USP, ICH, ISO 17025
Aralık	USP, ICH
LOD	USP, ICH, ISO 17025
LOQ	USP, ICH, ISO 17025
Robustness	USP, ISO 17025, ICH’de metot geliştirme aktivitesi denilir.
Ruggedness	USP, ICH’de tekrar üretilebilirlik denilir.

Tutarlı, güvenilir ve doğru veri elde etmek için temel rol oynayan bu validasyon parametreleri aşağıda açıklanmaktadır.

### 1.20.1. Doğruluk (Accuracy)

Ölçümlerin gerçek ya da kabul edilen referans değere olan yakınlığını ifade eder. Bu parametre metottaki hata (bias) veya sistematik hataların bir göstergesidir (Gumustas vd., 2013).

Doğruluk, mutlak hata veya bağıl hata terimleri ile ifade edilir (Skoog vd., 2004).

Bir  $X_i$  büyüklüğünün ölçümündeki mutlak hata ve bağıl hata:

$$\text{Mutlak hata} = \bar{x}_i - \mu_T \quad (1.67)$$

$$\text{Bağıl hata (\%)} = \left( \frac{\bar{x}_i - \mu_T}{\mu_T} \right) \times 100 \quad (1.68)$$

eşitlikleriyle hesaplanır (Gündüz, 2010).

$\bar{x}_i$  tekrar deneylerinden elde edilen ortalama değer,  $\mu_T$  doğru kabul edilen değerdir (Skoog vd., 2004; Özkan vd., 2015).

Referans değere yakınlık, sistematik ve rastgele hataların toplamı ile yani toplam hatayla ilişkilidir. Bu aşağıdaki gibi matematiksel olarak ifade edilir.

$$\text{Toplam hata} = \% \text{Mutlak Hata} + 1.96 \times \% \text{CV} \quad (1.69)$$

CV varyasyon katsayısını ifade eder. 1.96 değeri %95 güven aralığında olası analitik hata sınırı için verilmiştir (Özkan vd., 2015).

### 1.20.2. Kesinlik (Precision)

Tamamen aynı yolla elde edilen sonuçların birbirine yakınlığını yani ölçümlerin tekrarlanabilirliğini gösterir (Gündüz, 2010).

🚦 Tekrarlanabilirlik,

🚦 Orta düzeyde kesinlik,

🚦 Tekrar üretilebilirlik,

kesinliğin 3 aşamasını gösterir.

Kesinliği tanımlamak için tekrarlanabilirlik ve tekrar üretilebilirlik, standart sapma ve bağıl standart sapma parametreleri ile verilir. Bu parametreler metottaki rastgele veya orta düzeydeki hataların göstergesidir (Gumustas vd., 2013).

Ölçümün kesinliği,

- ✚ Standart sapma,
- ✚ Varyans
- ✚ Varyasyon katsayısı ile ifade edilir.

Standart sapma analizle bulunan sonuçların ortalama değer etrafında dağılımını gösteren bir kesinlik parametresidir. Bir analizde hesaplanan standart sapma değeri ne kadar küçükse analizin kesinliği o kadar yüksektir (Gündüz, 2010).

Çeşitli standart sapmalardan söz edilmesine rağmen, bunlar arasında en çok kullanılanlar:

- a) Popülasyon standart sapması ( $\sigma$ )
- b) Numune standart sapması (s)

#### a) Popülasyon standart sapması

Sonsuz sayıda tekrar analizi sonucunda hesaplanan değerdir. Çok sayıda veri popülasyonunun kesinliğinin bir ölçüsü olan popülasyon standart sapması ( $\sigma$ ) aşığadaki eşitlikle gösterilir. 20 ve daha fazla analiz sayısı mevcut olduğunda bunların standart sapması popülasyon standart sapması cinsinden hesaplanır (Gündüz, 2010).

$$\sigma = \sqrt{\left( \sum_{i=1}^N (x_i - \mu)^2 \right) / N} \quad (1.70)$$

N popülasyonu oluşturan tekrarlanan verilerin sayısı (serbestlik derecesi)'dir.

$\sigma$ , popülasyon standart sapması

Az sayıda veri mevcut olduğunda yukarıdaki eşitlik aşağıdaki şekilde ifade edilir (Skoog vd., 2004).

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N}} \quad (1.71)$$

N: serbestlik derecesi

s= standart sapma

### **Bağıl standart sapma (RSD) ve Varyasyon katsayısı (CV)**

Bağıl standart sapma (RSD, relative standard deviation), standart sapma değerinin veri takımının ortalamasına bölünmesiyle bulunur.

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \quad (1.72)$$

Bağıl standart sapma 1000 ile çarpılarak ppt veya 100 ile çarpılarak yüzde bağıl standart sapma cinsinden ifade edilir.

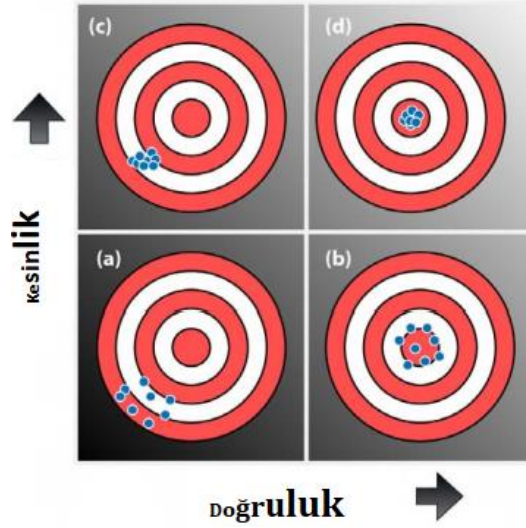
ppt olarak RSD

$$RSD = \frac{s}{\bar{x}} \times 1000 \quad (1.73)$$

100 ile çarpılan bağıl standart sapmaya varyasyon katsayısı (CV) denir (Skoog vd., 2004).

$$CV = \frac{s}{\bar{x}} \times 100 \quad (1.74)$$

Doğruluk ve kesinlik Şekil 1.75'de şematik olarak gösterilmiştir.



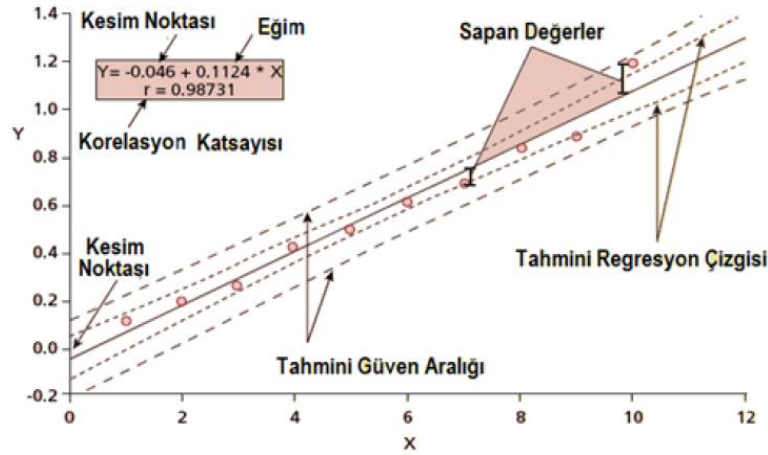
Şekil 1.75. Doğruluk ve kesinliğin şematik gösterimi (Sağırlı, 2016).

### 1.20.3. Doğrusallık (Linearity)

Analit derişime karşı dedektör cevabının doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafikte noktaların doğru üzerinde veya doğruya yakın olarak yer almasına doğrusallık denilir (Sağırlı, 2016). Analit derişiminin bir fonksiyonu olarak bir sinyal grafiğe geçirildiğinde elde edilen grafikte doğrusal bir ilişki mevcutsa veriler uygun istatistiksel metotla değerlendirilir. Derişim-sinyal grafiğinde doğrusal bir ilişki ele edilebileceği gibi sigmoidal, üstel (eksponansiyel) ilişki de söz konusu olabilir. Analitik yöntem herhangi bir sistematik ya da rastgele hata içermediğinde, elde edilecek doğru denklemi  $y=x$  şeklindedir. Fakat deneysel aşamaya gelindiğinde bu çoğu zaman mümkün değildir. Doğrunun eğiminin 1'e yakın olması kesim değerinin ise 0'a yakın olması istenir ve elde edilen doğru için korelasyon katsayısı (r) değeri de verilmelidir (Rozet vd., 2007; Özkan vd., 2015).

Sıvı kromatografide (LC) genellikle analit derişimine karşı pik alan değerleri grafiğe geçirilerek doğrusallık elde edilir. LC'de iç standart yöntemiyle analitin alanı iç standartın alanına oranlanarak analitin derişimine karşı grafiğe geçirilir. Bu özellik analit derişimi ile orantılı olmalıdır. Orantı katsayısının hesaplanması işlemine ise kalibrasyon denir ve analit derişimi ile analite ilişkin sinyal arasındaki ilişkiyi tanımlar (Şekil 1.76) (Ertaş, 2016).





Şekil 1.76. Kalibrasyon grafiğinin gösterimi

Doğrusallıkta, korelasyon katsayısı (r) veya tanımlayıcılık katsayısı (determination coefficient,  $r^2$ ) 0,99 ve üzerinde olduğunda birçok metotta kabul edilebilirdir (Gumustaş vd., 2013).

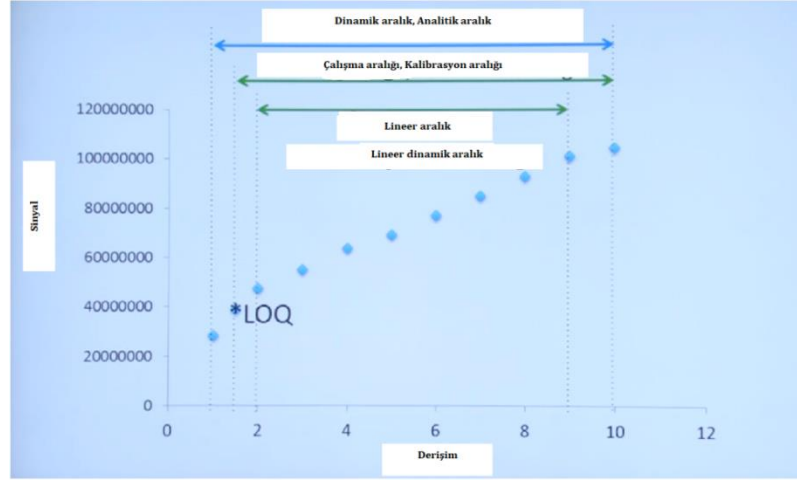
#### 1.20.4. Aralık (Range)

Gerçek örnek ortamında analitin kabul edilebilir kesinlik ve doğrulukla saptanabildiği en üst ve en alt derişim aralığıdır (Ertaş, 2016). Elde edilen kalibrasyon doğrusunda dinamik aralık, çalışma aralığı ve doğrusal aralıkta ifade edilmektedir (Şekil 1.77).

Dinamik aralık: Kalibrasyon doğrusunda cihaz sinyalinin analit derişimi ile değiştiği aralıktır. Bu aralıkta x ve y eksenleri arasındaki ilişki doğrusal olmayabilir.

Çalışma aralığı: Kalibrasyon doğrusunda tayin edilebilen en düşük derişimden (LOQ), doğrusallıktan sapma gösterdiği derişime kadar olan aralığı kapsar (Sağırlı, 2016).

Doğrusal aralık: Örnekteki analit derişimi ile cihaz sinyalinin doğrudan orantılı olduğu aralıktır (University of Tartu, 2016).



Şekil 1.77. Aralığın gösterimi (University of Tartu, 2016)

### 1.20.5. Gerçeklik (Trueness)

Analitik prosedürün sistematik hataları ile ilişkili terimdir. Gerçeklik, çok sayıda ölçümden elde edilen ortalama değerin ( $\bar{x}_i$ ) referans değere ( $\mu_T$ ) uzaklığı olarak ifade edilir. Gerçeklik, mutlak hata, bağıl hata ve geri kazanım ile ölçülür.

$$\text{Mutlak hata} = \bar{x}_i - \mu_T \quad (1.75)$$

$$\text{Bağıl hata (\%)} = \left( \frac{\bar{x}_i - \mu_T}{\mu_T} \right) \times 100 \quad (1.76)$$

$$\%100'de \text{ geri kazanım} = 100 \times \left( \frac{\bar{x}_i}{\mu_T} \right) = 100 - \text{Bağıl Hata (\%)} \quad (1.77)$$

$\bar{x}_i$  tekrar deneylerinden elde edilen ortalama değer

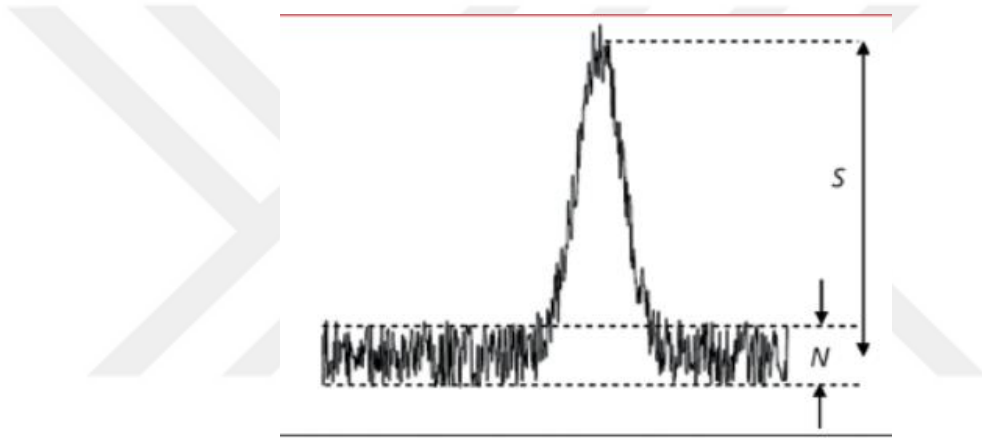
$\mu_T$  doğru kabul edilen değerdir (Rozet vd., 2007; Özkan vd., 2015).

### 1.20.6. Sağlamlık, dayanıklılık (Robustness/Ruggedness)

Bu validasyon parametresi analiz koşullarında pH, akış hızı, sıcaklık, reaktifin kararlılığı gibi parametrelerde bilerek yapılan küçük değişikliklerle analitik prosedürün değişmeden kalmasını ifade eder (Gumustaş vd., 2013; Ertaş, 2016). Bu validasyon parametresi metot parametrelerindeki değişikliklere göre analizin güvenilirliğini gösterir ve sonuçlar geri kazanım verilerindeki RSD ile ifade edilir (Gumustas vd., 2013).

### 1.20.7. Tayin sınırı, gözlenebilme sınırı (Limit of Detection, LOD)

Bir analitin belirli güven seviyesinde tayin edilebilen en düşük miktarıdır. LOD örnekteki analitin derişimi cinsinden M,  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , ppm, ppb olarak ifade edilir. Tayin sınırı kullanılan metoda göre değişir. Tayin sınırlarının büyük çoğunluğu maddenin verdiği analitik sinyale dayanır. Ancak aynı ortamda gürültü sinyalleri de mevcut olduğundan analitik sinyali tek başına elde etmek mümkün değildir. Düşük derişimlere inildikçe analitik sinyal küçülür ve gürültü sinyalleri arasında kaybolmaya başlar. Böyle bir durumda tayin sınırını belirlemek için istatistiki yaklaşımlara ihtiyaç vardır (Şekil 1.78) (Gündüz, 2007).



Şekil 1.78. HPLC'de sinyal ve gürültünün şematik gösterimi (LCGC, 2010)

LOD'yi belirlemede üç farklı yaklaşım vardır

1. Sinyal/gürültü (S/G) oranı: Analitik yöntemde zemin gürültüsü varsa S/G oranından yararlanır. Derişimi (düşük) bilinen numunelerden ölçülen değer, kör numunelerinki ile karşılaştırılır ve tayin edilebilecek en düşük derişim belirlenir.  $S/G = 3$  olduğu değer LOD değeri olarak kabul edilir. Ancak bu değer alet, matriks gibi değişkenlere göre farklılık gösterir.
2. Görsel değerlendirmeye dayanır: Bilinen derişimdeki analitten güvenilir bir şekilde en düşük derişimin saptanmasıdır.
3. Sinyalin standart sapması ile: Kalibrasyon doğrusunun eğiminden ve sinyalin standart sapmasından faydalanılır.

$$LOD = \frac{3s}{m} \quad (1.78)$$

s, kör değerinin standart sapması ve m kalibrasyon doğrusunun eğimidir (Currie,1995).

İlaç analizlerinde standart sapmanın önündeki katsayı 3,3 olarak kullanılır.

Diğer alternatif pratik yol,

$$LOD = \bar{x} + 3s \quad (1.79)$$

bağıntısıyla elde edilir.

$\bar{x}$ , kör değer ortalamasıdır; s standart sapmadır. Standart sapma analit içermeyen kör ölçümlerden elde edilir (Riley ve Rosanske, 1996; ICH, 2005; Özkan, 2015).

#### **1.20.8. Kantitatif yorum sınırı (Limit of Quantification, LOQ)**

Kabul edilebilir düzeyde tekrarlanabilirlik ve doğruluk ile saptanabilen örnekteki en düşük analit miktarıdır.

LOQ'yu saptamada üç farklı yaklaşım vardır:

1. Sinyal/gürültü (S/G) oranı: Zemin gürültüsü veren analitik bir yöntemde S/G oranı düşük derişimlerde hazırlanan analitin sinyalinin kör çözelti sinyaliyle karşılaştırılmasıyla bulunur. S/G oranının 10:1 olduğu değer LOQ değeri olarak kabul edilir (Riley ve Rosanske, 1996).

2. Görsel değerlendirmeye dayanır: Bilinen derişimdeki analitten doğru ve kesin bir şekilde en düşük derişimdeki miktarın bulunmasıdır.

3. Sinyalin standart sapması (s) ile: Sinyalin standart sapması (s) ve kalibrasyon doğrusunun eğimi (m) ile hesaplanır:  $LOQ = 10 s/m$  olarak bulunur (Özkan, 2017).

$$LOQ = \frac{10s}{m} \quad (1.80)$$

s, kör değerin standart sapmasıdır ve m kalibrasyon doğrusunun eğimidir.

Diğer alternatif pratik yol,

$$LOQ = \bar{x} + 10s \quad (1.81)$$

$\bar{x}$ , kör değerin ortalama derişimi, s standart sapmasıdır (Armbruster vd., 1992; Kuselman ve Sherman, 1999; Özkan vd., 2015).

#### **1.20.9. Seçicilik (Selectivity)**

Analizin daha önceden belirlenmiş koşullar altında bir örnek matrisi içinde diğer bileşenlerin varlığında ilgili analiti doğru bir şekilde tayin edebilme yeteneğidir. Bir analitik yöntemde yetersiz seçicilik durumu, gerçek analitin tayinini bozan girişimcilerle açıklanır (Ertaş, 2016).

#### **1.20.10. Duyarlılık (Sensitivity)**

Derişimdeki birim artışa karşılık gelen sinyalin büyüklüğüdür. Duyarlılık, kalibrasyon hassaslığı şeklinde de kullanılır. Kalibrasyon grafiğinin eğimine eşittir.

#### **Sistem uygunluk testleri**

Sistem uygunluk testi (SUT), analiz işlemine ya da gerçek numune çalışmasına başlamadan önce analiz sırasında analitik sistemin uygunluğundan emin olmak için sistemin referans standart madde ile kontrol edilmesidir. Sıvı

kromatografisinde önemli olan kapasite faktörü, ayırma gücü, kuyruklanma faktörü ve teorik plaka sayısı için olması gereken değerler Çizelge 1.13'de gösterildiği gibidir (Özkan, 2017)

Çizelge 1.13. Sistem uygunluk testi (SUT) için geçerli parametreler ve değerleri (FDA, 1994)

Parametre	Sınırlar
Kapasite faktörü (k)	$k > 2,0$
Ayırma gücü ( $R_s$ )	$R_s > 1,5$
Kuyruklanma faktörü ( $T_f$ )	$T_f < 2,0$
Kolonun etkinliği (N, Teorik Plaka Sayısı)	$N > 2000$

Kromatografik analizlerde sistem uygunluk testleri ile belirlenen kapasite faktörü, ayırma gücü, teorik plaka sayısı ve kuyruklanma faktörü için belirlenen değerlere uyulması gerekmektedir.

## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Tezde çalışılan benzimidazol grubu içeren bileşiklerden albendazol, astemizol, mebendazol ve tiyabendazol; imidazol grubu içeren bileşiklerden klotrimazol, metronidazol ve tiyamazol için literatürden elde edilen asit/baz iyonlaşma sabiti (pK<sub>a</sub>) değerleri, oktanol: su dağılma katsayısı (logP<sub>o/w</sub>) değerleri ve çözünürlük değerleri aşağıdaki çizelgelerde verilmiştir. Literatürden elde edilen validasyon çalışmaları, Bölüm 2.4’de bahsedilmiştir.

### 2.1. Literatürden Elde Edilen Asit/Baz İyonlaşma Sabiti (pK<sub>a</sub>) Değerleri

Tezde çalışılan bileşikler imidazol ve benzimidazol fonksiyonel grubu içerdiği için bu gruba ait literatürden elde edilen pK<sub>a</sub> değerleri, Çizelge 2.1 ve 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Benzimidazolün literatürden elde edilen pK<sub>a</sub> değerleri

pK <sub>a</sub>	Yöntem	Referanslar
5,50 (suda)	Potansiyometrik yöntem	Ruiz vd., 2005
pK <sub>a</sub>	<b>Yöntem</b>	<b>Referanslar</b>
6,93 (suda)	Potansiyometrik yöntem	Ruiz vd., 2005
≈4,00-7,00	Cambridge Structural Database’da hesaplanan değer	Cruz-Cabeza, 2012.
7,10 (25°C) 6,85 (37°C)	ACD Labs 6.00 C programı ile hesaplanan değerler	ACD Labs 6.00 C, 2011; Sun ve Avdeef, 2011.
7,17 (suda)	${}^s pK_a = a_w^w pK_a + b$ formülü ile hesaplanan değer	Garrido vd., 2007.
6,95 (suda)	Kapiler zone elektroforezi (CZE) yöntemi	Beckers vd., 2003.
-0,53-7,85 (*a)	Semiampirik molekül orbital metodu ile hesaplanan değer	Skolidis vd., 2012.

\*a) İmidazol ve benzimidazol pK<sub>a</sub> değerleri için verilen aralık

### 2.1.1. Benzimidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen asit/baz iyonlaşma sabiti (pK<sub>a</sub>) değerleri

Benzimidazol grubu içeren bileşiklerden albendazol, astemizol, mebendazol ve tiyabendazolün literatürden elde pK<sub>a</sub> değerleri, Çizelge 2.3’de verilmiştir.

Çizelge 2.2. Benzimidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen pK<sub>a</sub> değerleri

<b>ALBENDAZOL</b>		
pK <sub>a</sub>	Yöntem	Referanslar
4,21	Chemaxon ile hesaplanan değer	Rankovic, 2017.
pK <sub>a1</sub> :2,80 pK <sub>a2</sub> :10,26	Spektrofotometrik yöntem	Jungh vd., 1998.
pK <sub>a1</sub> :3,37 pK <sub>a2</sub> :9,93	Spektrofotometrik yöntem	Takacs-Novak vd., 1995.
pK <sub>a1</sub> :4,21 (suda) pK <sub>a2</sub> :10,43 (suda)	Potansiyometrik yöntem	Escher vd., 2008.
pK <sub>a1</sub> :5,54 (B) pK <sub>a2</sub> :13,11 (HA)	Pallas programı ile hesaplanan değerler	Pallas Software Version 3.0, 2007.
pK <sub>a1</sub> :5,54 pK <sub>a2</sub> :13,11	EPI suite v 4.1 programı ile hesaplanan değer	Santaladchaiyakit ve Srijaranai, 2012.
pK <sub>a1</sub> :5,60 (B) pK <sub>a2</sub> :11,40 (A)	SciFinder Scholar programından hesaplanan değerler	Bergstroöm vd., 2007.
pK <sub>a1</sub> :5,62 (B) pK <sub>a2</sub> :10,34 (A)	ACD Labs programı ile hesaplanan değerler	Box vd., 2003.
<b>ASTEMİZOL</b>		
pK <sub>a2</sub> :8,35	ACD Labs 6.00 programı ile hesaplanan değer	ACD Labs 6.00 C, 2011.
8,75	Chemaxon tahmin programı ile hesaplanan değer	Rankovic, 2017.
9,00	ACD Labs programı ile hesaplanan değer	Al Omari vd., 2008.
9,00(B)	SciFinder Scholar programından hesaplanan değer	Bergstroöm vd., 2007.
pK <sub>a1</sub> :4,85 (B) pK <sub>a2</sub> :8,69 (-)	Kapiler elektroforez kütle spektrofotometresi (CE-MS)	Wan vd., 2003.
pK <sub>a1</sub> :5,60 pK <sub>a2</sub> :8,50	(*b)	Fischer vd., 1998.



Çizelge 2.3. Benzimidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen pKa değerleri (Devam)

pK <sub>a1</sub> :6,80 pK <sub>a2</sub> :9,03	ACD Labs programı ile hesaplanan değerler	ACD Labs 6.00 C, 2011.
pK <sub>a1</sub> :5,28 (suda) (37°C) pK <sub>a2</sub> :8,34 (suda) (37°C)	Potansiyometrik yöntem	Sun ve Avdeef, 2011.
pK <sub>a1</sub> :5,30 pK <sub>a2</sub> :8,20	Spektrofotometrik yöntem	Al Omari vd., 2008.
pK <sub>a1</sub> :5,34±0,06 (B) (suda) (37°C) pK <sub>a2</sub> :8,29±0,04 (A) (suda) (37°C)	Potansiyometrik yöntem	Fagerberg vd., 2010.
pK <sub>a1</sub> :5,44 pK <sub>a2</sub> :6,71	ACD Labs 6.00 programı ile hesaplanan değerler	ACD Labs 6.00 C, 2011.
pK <sub>a1</sub> : 5,44 pK <sub>a2</sub> : 6,71	Potansiyometrik titrasyon	Laak vd., 1994.
pK <sub>a1</sub> : 5,73 (Bazik) pK <sub>a2</sub> : 8,48 (Bazik)	pH-metrik, pH-UV ve Fast D-PAS (*c)	Box ve Comer, 2008.
pK <sub>a1</sub> :5,99±0.06(Bazik) (25°C) pK <sub>a2</sub> :8,60±0.04(Asidik) (25°C) (%40-61 MeOH:H <sub>2</sub> O ikili karışımı)	Potansiyometrik titrasyon	Bendels vd., 2006.
pK <sub>a1</sub> :6,04 pK <sub>a2</sub> :8,31	Spektrofotometrik yöntem	Tsinman vd., 2015.
<b>MEBENDAZOL</b>		
3,42	Chemaxon tahmin programı ile hesaplanan değer	Rankovic, 2017.
pK <sub>a1</sub> :3,20 (suda) pK <sub>a2</sub> :9,64 (suda)	Kapiler elektroforez	Shalaeva vd., 2008.
pK <sub>a1</sub> :3,27 pK <sub>a2</sub> :9,56 (%30-60 MeOH:H <sub>2</sub> O ikili karışımı)		
pK <sub>a1</sub> :3,43 (B) pK <sub>a2</sub> :9,93 (HA)	CE/MS	Wan vd., 2003.

Çizelge 2.3. Benzimidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen pKa değerleri (Devam)

pK <sub>a1</sub> :5,02 (pK <sub>a1</sub> ) pK <sub>a2</sub> :8,52 (pK <sub>a2</sub> )	ACD Labs 6.00 programı ile hesaplanan değerler	ACD Labs 6.00 C, 2011.
pK <sub>a1</sub> :4,13 (B) pK <sub>a2</sub> :11,79 (HA)	Pallas programı ile hesaplanan değerler	Pallas Software Version 3.0, 2007.
	EPI suite v 4.1 programı ile hesaplanan değerler	Santaladchaiyakit ve Srijaranai, 2012.
pK <sub>a1</sub> :3,53±0.04 pK <sub>a2</sub> :9,88±0.06	Potansiyometrik titrasyon	Ràfols vd., 2017.
pK <sub>a1</sub> :3,59±0.16 pK <sub>a2</sub> :9,43±0.17	Çalkalama metodu	
<b>TİYABENDAZOL</b>		
3,40	ACD Labs programı ile hesaplanan değer	Müller vd., 2014.
4,08	Chemaxon tahmin programı ile hesaplanan değer	Rankovic, 2017
4,60	Spektrofotometrik yöntem	Koner vd., 2011.
pK <sub>a1</sub> :5,22 pK <sub>a2</sub> :12,83	Pallas programı ile hesaplanan değer	Pallas Software Version 3.0, 2007.
	EPI suite v 4.1 programı ile hesaplanan değerler	Santaladchaiyakit ve Srijaranai, 2012.

b) pK<sub>a</sub> 0.1 M NaOH kullanılarak, düşük pK<sub>a</sub> değerleri için sulu çözeltide, yüksek pK<sub>a</sub> değerleri için MeOH:su karışımında belirlenmiştir. %50, 60 and 70 (v/v) MeOH:su karışımındaki pK<sub>a</sub> değerleri suya ekstrapole edilmiştir.

\*c) Hibrid pH-metrik/UV tekniğidir. Az miktarda örnek çok bileşenli tampon çözeltide çözülür ve pH 2.0-12.0'de titre edilir.

### 2.1.2. İmidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen asit/baz iyonlaşma sabiti değerleri

İmidazol grubu içeren bileşiklerden klotrimazol, metimazol (tiyamazol) ve metronidazolün literatürden elde edilen pK<sub>a</sub> değerleri, Çizelge 2.4'de verilmiştir.

Çizelge 2.3. İmidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen pK<sub>a</sub> değerleri

<b>KLOTRİMAZOL</b>		
pK <sub>a</sub>	Yöntem	Referanslar
4,70	Potansiyometrik titrasyon	Prankerd, 2007.
5,21 (25°C)	Gradient RP-HPLC	Wiczling vd., 2004.

Çizelge 2.4. İmidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen pK<sub>a</sub> değerleri

6,26	EPI Suite 4.1 programı ile hesaplanan değer	Dallet, 2013.
6,02±0,05 (suda) (25°C)	Potansiyometrik titrasyon	Bendels vd., 2006.
5,83 (suda)	Kapiler elektroforez	Shalaeva vd., 2008.
5,99 (%30,40,50,60 (v/v) MeOH:su ortamında elde edilen değerlerin ortalaması)	Kapiler elektroforez	
6,12	Scifinder Scholar programından hesaplanan değer	Hamoudov'a vd., 2006.
6,62	Chemaxon tahmin programı ile hesaplanan değer	Rankovic, 2017.
<b>METİMAZOL (TİYAMAZOL)</b>		
1,00	Chemaxon tahmin programı ile hesaplanan değer	Rankovic, 2017
4,41 (B)	Pallas programı ile hesaplanan değer	Hollosi, 2005.
10,41	Marvin Sketch programı ile hesaplanan değer	Marvin Sketch, 2014.
11,45 (suda)	*d	Sköld vd., 2006.
<b>METRONİDAZOL</b>		
2,38	VAMCE(*e) yöntemi	Zhou vd., 2005.
2,43±0,03 (suda) (Çok bileşenli çözücü karışımı: su (eşit oranda MeOH, dioksan ve ACN kullanılarak elde edilen pK <sub>a</sub> değeri suya ekstrapole edilmiştir.)	Spektrofotometrik yöntem	Völgyi vd., 2007.
2,48±0,006	Spektrofotometrik yöntem	Llinàs vd., 2008.

Çizelge 2.4. İmidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen pK<sub>a</sub> değerleri (Devam)

2,50±0,04 (suda) (MeOH: su ikili karışımında elde edilen pK <sub>a</sub> değeri suya ekstrapole edilmiştir).	Spektrofotometrik yöntem	Völgyi vd., 2007.
2,49 (%30,40,50,60 (v/v) MeOH:su ortamında elde edilen değerlerin ortalaması)	Kapiler elektroforez	Shalaeva vd., 2008.
2,55	ACD Labs ile hesaplanan değer	ACD Labs, 2011.
2,62	$S = S_0[1 + \frac{K_a}{H^+}]$ formülü ile hesaplama	Cho vd., 1982.
2,71 (suda) 2,79 (Gradient elüsyon ile %5-%80 MeOH:su ortamı)	RP-HPLC-ESI-TOF-MS	Kubik vd., 2015.
3,09	Chemaxon tahmin programı ile hesaplanan değer	Rankovic, 2017.

\*d) Bileşikteki asidik/bazik gruplar geniş pH aralığında titre edilmiştir. Titrasyon eğrisinin şekline göre bileşiğin pK<sub>a</sub> değeri belirlenmiştir. Elde edilen değerler Yasuda-Shedlovsky eşitliği ile suya ekstrapole edilmiştir.

\*e) Vacuum-Assisted Multiplexed kapiler elektroforez

## 2.2. Literatürden Elde Edilen Oktanol/Su Dağılma Katsayısı (logP<sub>o/w</sub>) Değerleri

Tezde çalışılan bileşikler imidazol ve benzimidazol grubu içerdiği için imidazol ve benzimidazol için literatürden elde edilen oktanol/su dağılma katsayısı (logP<sub>o/w</sub>) değerleri, Çizelge 2.5 ve 2.6'da verilmiştir.

Çizelge 2.4. Benzimidazolün literatürden elde edilen  $\log P_{o/w}$  değerleri

$\log P_{o/w}$	Yöntem	Referanslar
1,74	$\log P = 0,121 + 0,600E - 0,495S - 2,246A - 3,879B + 3,574V - 2,271J^+ + 0,432J^-$ formülü ile hesaplanan değer	Abaham ve Acree, 2010a.
1,32	Çözünen tanımlayıcıları ile hesaplanan değer	Abaham ve Acree, 2010b.

Çizelge 2.5. İmidazolün literatürden elde edilen  $\log P_{o/w}$  değerleri

$\log P_{o/w}$	Yöntem	Referanslar
-0,25	$\log P = 0,121 + 0,600E - 0,495S - 2,246A - 3,879B + 3,574V - 2,271J^+ + 0,432J^-$ formülü ile hesaplanan değer	Abaham ve Acree, 2010a.
-0,08	Çözünen tanımlayıcıları ile hesaplanan değer	Abaham ve Acree, 2010b.

### 2.2.1. Benzimidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen $\log P_{o/w}$ değerleri

Benzimidazol grubu içeren bileşiklerden albendazol, astemizol, mebendazol ve tiyabendazolün literatürden elde edilen  $\log P_{o/w}$  değerleri, Çizelge 2.7'de verilmiştir.

Çizelge 2.6. Benzimidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen  $\log P_{o/w}$  değerleri

<b>ALBENDAZOL</b>		
$\log P_{o/w}$	Yöntem	Referanslar
2,20-2,92	EPI suite v 4.1 programı ile hesaplanan değerler	Santaladchaiyakit ve Srijaranai, 2012.
3,14	EPI Suite v. 3.20 programı ile hesaplanan değer	Sanderson ve Thomsen, 2009.
		Tomasz vd., 2010
3,46±0,12	Hesaplama ile	Rivera vd., 2007.

Çizelge 2.7. Benzimidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen  $\log P_{o/w}$  değerleri (Devam)

<b>ASTEMİZOL</b>		
3,56	Santrifüjlü dağılma katsayısı yöntemi ile	Laak vd., 1994.
5,14	$\log P = \log D_{7.4} + \log(1 + 10^{7.4A+BpK_a})$ formülü ile hesaplanan değer	Austin vd., 2002.
5,70	pH metrik yöntem	Box ve Comer, 2008.
<b>MEBENDAZOL</b>		
2,44-2,52	ChemDraw Ultra Software Version 6.0.1 programı ile hesaplanan değerler	ChemDraw Ultra Software Version 6.0.1, 2007.
	EPI suite v 4.1 programı ile hesaplanan değerler	Santaladchaiyakit ve Srijaranai, 2012.
2,50	3 farklı fragmentasyon yöntemiyle hesaplanan değer	Kasim vd., 2003.
<b>TİYABENDAZOL</b>		
1,58-1,76	ChemDraw Ultra Software Version 6.0.1 programı ile hesaplanan değerler	ChemDraw Ultra Software Version 6.0.1, 2007.
1,94	Çalkalama yöntemi	Chamberlain vd., 1996.

### 2.2.2. İmidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen $\log P_{o/w}$ değerleri

İmidazol grubu içeren bileşiklerden klotrimazol, metimazol (tiyamazol) ve metronidazolün literatürden elde edilen  $\log P_{o/w}$  değerleri, Çizelge 2.8'de verilmiştir.

Çizelge 2.7. İmidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen  $\log P_{o/w}$  değerleri

<b>KLOTİRMAZOL</b>		
$\log P_{o/w}$	Yöntem	Referanslar
5,20	Çalkalama yöntemi	Lombardo, vd., 2000.
5,39	QikProp programı ile hesaplanan değer	Brogi vd., 2015.

Çizelge 2.8. İmidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen logP<sub>o/w</sub> değerleri (Devam)

4,10	QSAR-DK:EPIWIN 3.02 programı ile hesaplanan değer	OSPAR Commission 2005 Update.
<b>METİMAZOL</b>		
-0,22	pH metric/RP-HPLC	Sköld vd., 2006.
0,75	Marvin Sketch programı ile hesaplanan değer	Marvin Sketch, 2014.
1,25	Pallas programı ile hesaplanan değer	Hollosi, 2005.
<b>METRONİDAZOL</b>		
-0,10	EPI Suite v. 3.20 programı ile hesaplanan değer	Sanderson ve Thomsen, 2009.
-0,02	Çalkalama yöntemi	Anderson ve Patel, 1979.

### 2.3. Literatürden Elde Edilen Çözünürlük Değerleri

#### 2.3.1. Benzimidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen çözünürlük değerleri

Benzimidazol grubu içeren bileşiklerden albendazol, astemizol, mebendazol ve tiyabendazolün literatürden elde edilen çözünürlük değerleri, Çizelge 2.9'da verilmiştir.

Çizelge 2.8. Benzimidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen çözünürlük değerleri

<b>ALBENDAZOL</b>		
Çözünürlük	Yöntem	Referanslar
8,30×10 <sup>-5</sup>	Spektrofotometrik yöntem	Stepniak vd., 2017.
0,40±0,02 mg/L (25°C±3°C)	µDISS Profiler (pION) (*f)	Escher vd., 2008.
1,50 µg/mL	Çalkalama yöntemi	Paulekuhn vd., 2013.
1,61 mg/L	EPI suite v 3.20 programı ile hesaplanan değer	Tomasz vd., 2010.

Çizelge 2.9. Benzimidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen çözünürlük değerleri (Devam)

46,39 mg/L	EPI suite v 4.1 programı ile hesaplanan değer	Santaladchaiyakit ve Srijaranai, 2012.
983,00±112,2	Çalkalama yöntemi	Bergstroöm vd., 2007.
<b>ASTEMİZOL</b>		
logS <sub>0</sub> : -5,93 mol/L	Cheq-sol ve pH metrik metotlar ile	Box ve Comer, 2008.
0,29±0,08	UV 96-well microtitre plaka denge çözünürlük yöntemi	Avdeef vd., 2007.
0,59 µg/mL	Spektrofotometrik yöntem	Tsinman vd., 2015.
66,80±21,1 nM	Çalkalama yöntemi	Bergstroöm vd., 2007.
<b>MEBENDAZOL</b>		
5×10 <sup>-4</sup> (mg/mL)	Çalkalama yöntemi	Nielsen vd., 1994.
1,70	EPI suite v 3.20 programı ile hesaplanan değer	Tomasz vd., 2010.
2,71	EPI suite EPIWEB 4.0	Horvat vd., 2012.
50,08 mg/L	EPI suite v 4.1 programı ile hesaplanan değer	Santaladchaiyakit ve Srijaranai, 2012.
<b>TİYABENDAZOL</b>		
-3,21	$\log S_w = 0,395 - 0,955E + 0,320S + 1,155A + 3,255B - 0,785AB - 3,330$ formülü ile hesaplanan değer	Jouyban ve Fakhree, 2012.
2,33	EPI suite v 3.20 programı ile hesaplanan değer	Tomasz vd., 2010.
335,2 mg/L	EPI suite v 4.1 programı ile hesaplanan değer	Santaladchaiyakit ve Srijaranai, 2012.

\*f) µDISS: miniaturized rotating disk dissolution instrument, minyatürize döner disk çözünme cihazı

### 2.3.2. İmidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen çözünürlük değerleri

İmidazol grubu içeren bileşiklerden klotrimazol ve metronidazolün literatürden elde edilen çözünürlük değerleri, Çizelge 2.10'da verilmiştir.



Çizelge 2.9. İmidazol grubu içeren bileşiklerin literatürden elde edilen çözünürlük değerleri

<b>KLOTRİMAZOL</b>		
Çözünürlük	Yöntem	Referanslar
-5,84 mol/dm <sup>3</sup>	QikProp programı ile hesaplanan değer	Brogi vd., 2015.
<0,01 mg/mL	Spektrofotometrik yöntem	Hoogerheide ve Wyka, 1982.
0,39±0,18	UV 96-well microtitre plaka denge çözünürlük yöntemi	Avdeef vd., 2007.
0,5/0,0101	Drugbank programından hesaplanan değerler	Huang vd., 2010.
<b>METRONİDAZOL</b>		
-1,14	$\log S_w = 0,395 - 0,955E + 0,320S + 1,155A + 3,255B - 0,785AB - 3,330$ formülü ile hesaplanan değer	Jouyban ve Fakhree, 2012.
0,94 (w/v%) (22 °C)	Çalkalama yöntemi	Lauwo, 1985.
1,41 (w/v%) (37 °C)		
7,00 g/L (sudaki çözünürlük)	ACD Labs programıyla hesaplanan değer	Falkman vd., 2011.
9,50 mg/mL (25°C)	Çalkalama yöntemi	Cho vd., 1982.
13,42 mg/mL	ADMET predictor programıyla hesaplanan değer	Duque vd., 2017.
64,80 mg/mL (pH 1,2; 22°C)	Çalkalama yöntemi, HPLC	Wu ve Fassihi, 1985.
92800±7900 µM (Kinetik çözünürlük)	Spektrofotometrik yöntem	Llinàs vd., 2008.
60000±1500 µM (Tam çözünürlük)		

#### 2.4. Literatürden Elde Edilen Validasyon Çalışmaları ile İlgili Veriler

Tezde seçilen bileşiklerin ilaç formülasyonlarında tayine yönelik çalışma bulunmamaktadır. Bunun dışındaki numunelerde yapılmış validasyon çalışmaları aşağıda verilmiştir.

Hájková vd., (2007) çalışmalarında, sprey formülasyonunda, klotrimazol ve iki degridasyon ürününün ((2-klorofenil) difenilmetanol ve imidazol) belirlenmesi için HPLC metodu geliştirmişler ve metod validasyonu yapılmıştır. Farklı ters faz sıvı kromatografi kolonları denenmiş, Purospher LichroCARD RP-18e kolonda 14 dakikalık analiz süresinde iyi sonuçlar elde edilmiştir. Fakat daha kısa sürede (6 dk) analiz sonucu elde edilen Zorbax SB-Phenyl kolonda (75mm×4,6 mm, 3,5 µm), validasyon çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin ayrımı %65:35 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında (pH 3,5) gerçekleştirilmiş ve akış hızı 0,5 mL/dakika olarak seçilmiştir. Validasyon çalışması için iç standart olarak ibuprofen belirlenmiş ve sistem uygunluk testleri ile elde edilen sonuçlar, Çizelge 2.11'de verilmiştir (Hájková vd., 2007).

Çizelge 2.10. Validasyon çalışması ve sistem uygunluk testleri ile elde edilen sonuçlar

<b>Sistem Uygunluk Verileri</b>			
Parametre	Klotrimazol	(2-klorofenil) difenilmetanol	İmidazol
Teorik plaka sayısı	1046	5641	1535
Asimetri	1,14	1,05	1,03
R <sub>s</sub>	2,34	3,68	2,14
Tekrarlanabilirlik-tr	0,04	0,33	0,47
Tekrarlanabilirlik-A	0,05	0,29	0,20
<b>Validasyon parametreleri</b>			
Parametre	Klotrimazol	(2-klorofenil) difenilmetanol	İmidazol
Keskinlik (%RSD)	0,59	0,28	0,47
Doğrusallık (Korelasyon Katsayısı)	0,999991	0,99968	0,999945
Doğruluk (%RSD)	1,13	0,28	0,48
Doğruluk (%Geri kazanım)	99,12	100,61	103,85
Seçicilik	Girişim yok	Girişim yok	Girişim yok
LOD (mg/ml)	-	8,60×10 <sup>-4</sup>	1,19×10 <sup>-3</sup>
LOQ (mg/ml)	-	2,86×10 <sup>-3</sup>	3,97×10 <sup>-3</sup>

Back vd.,'nin (2015) yaptığı çalışmada, astemizol ve astemizolün ana metaboliti desastemizolün av köpeği ve maymun plazmasında eş zamanlı tayini için yüksek

performanslı sıvı kromatografisi-tandem mass spektrometresi yöntemi geliştirilmiştir. ACN'de çözülmüş 0,025% TFA ve 20 mM amonyum asetat (96:4) içeren mobil fazda, 0,25 mL/dakika akış hızında, Atlantis HILIC kolonda (2,1 mm × 50 mm, 3 m; Waters, Milford, MA, USA) ayırmalar gerçekleştirilmiştir. Toplam analiz süresi 2,2 dakikadır. Difenhidramin iç standart olarak belirlenmiştir. Astemizol, desastemizol ve iç standartın alıkonma süreleri av köpeği plazması için sırasıyla 1,50, 1,55 ve 1,52 dakika; maymun plazması için sırasıyla 1,44, 1,47 ve 1,45 dakika olarak ölçülmüştür. Bu sonuçların daha önceki metotlardan iki kat daha hızlı olduğu belirtilmiştir. Kalibrasyon grafiği av köpeği plazmasında astemizol için 2,5-500 ng/mL aralığında, desastemizol için 7,5-500 ng/mL aralığında; maymun plazmasında astemizol için 2,5-80 ng/mL aralığında, desastemizol için 10-1600 ng/mL aralığında doğrusal olduğu belirlenmiştir. Av köpeği ve maymun plazmasında elde edilen gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri, Çizelge 2.12'de gösterilmiştir (Back vd., 2015).

Çizelge 2.11. Av köpeği ve maymun plazmasında gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

<b>Astemizol, Av köpeği plazması</b>				
	Nominal derişim (ng/ml)	Hesaplanan derişimin ortalaması (ng/ml)	%Varyasyon katsayısı	% Bağıl hata
<b>Gün içi/günler arası</b>	2,5 (LLOQ)	2,46/2,52	3,31/7,14	-1,60/0,80
	7,5 (Düşük)	7,49/7,42	4,54/5,61	-0,133/-1,06
	250 (Orta)	242/249	4,60/4,00	-3,23/-0,400
	500 (Yüksek)	505/503	2,34/11,0	1,00/0,600
<b>Astemizol, maymun plazması</b>				
<b>Gün içi/günler arası</b>	2,5 (LLOQ)	2,46/2,67	3,34/7,70	-1,60/6,80
	7,5 (Düşük)	8,40/8,22	12,8/10,1	12,0/9,60
	40 (Orta)	41,9/40,1	2,32/7,41	4,75/0,25
	80 (Yüksek)	84,5/81,0	2,30/7,44	5,63/1,25

Çizelge 2.12. Av köpeği ve maymun plazmasında gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri (Devam)

<b>Desmetilastemizol, Av köpeği plazması</b>				
<b>Gün içi/günler arası</b>	7,5 (LLOQ)	8,23/7,17	10,1/12,8	9,73/-4,40
	10 (Düşük)	11,3/9,82	7,84/6,43	13,0/-1,80
	250 (Orta)	254/262	4,10/5,91	1,50/4,73
	500 (Yüksek)	516/521	10,4/11,7	3,23/4,22
<b>Desmetilastemizol, maymun plazması</b>				
<b>Gün içi/günler arası</b>	10 (LLOQ)	10,0/10,3	2,74/8,72	0,20/2,50
	30 (Düşük)	26,5/28,8	7,43/10,4	-11,7/-4,00
	160 (Orta)	166/178	5,61/8,10	3,94/11,0
	1600 (Yüksek)	1542/1609	4,52/13,1	-3,64/0,563

Astemizol ve desmetilastemizolün doğruluğu (%Bağıl hata) ve kesinliği (%varyasyon katsayısı) sırasıyla %11,7- %13,0, %2,30- %13,1 aralığındadır. 50 µL köpek ve maymun plazması kullanıldığında kantitasyon için en düşük limit (lower limit of quantitation, LLOQ) astemizol için 2,5 ng/mL, desmetilastemizol için 7,5 ve 10 ng/mL olarak belirlenmiştir (Back vd., 2015).

Chen vd., (2004), insan plazmasında albendazol ve albendazolün aktif metaboliti albendazol sülfoksitin eş zamanlı tayini için sıvı kromatografi kütle spektrofotometre elektrospray iyonlaşma yöntemini kullanarak metot geliştirmişlerdir. Kromasil C<sub>8</sub> kolon (150mm×4,6 mm i.d., 5µm, Aote, Tianjin, China) ve SecurityGuard C<sub>18</sub> (4mm×3,0 mm i.d., Phenomenex, Torrance, CA, USA) guard kolon ile 20 °C'de analizler gerçekleştirilmiştir. MeOH-su-formik asit ((80:20:1 (v/v/v)) mobil fazı kullanılarak 0,5 mL/dakika akış hızında çalışılmıştır. Estazolam iç standart olarak seçilmiştir. İnsan plazmasından albendazol ve albendazol sülfoksit için elde edilen gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri Çizelge 2.13'te gösterilmiştir (Chen, vd., 2004).

Çizelge 2.12. Albendazol ve albendazol sülfoksit için elde edilen gün içi ve günler arası doğruluk ve kesinlik değerleri

Analit	Eklene derişim (ng/ml)	Bulunan derişim (ng/ml)	Gün içi bağıl standart sapma (%)	Günler arası bağıl standart sapma (%)	%Bağıl hata
Albendazol	1,00	0,99	6,7	7,1	-0,9
	20,0	20,2	5,5	5,2	0,8
	160,0	163,3	5,0	2,1	2,1
Albendazolsülfoksit	10,0	10,1	8,0	2,6	1,2
	200,0	204,4	6,9	9,4	2,2
	1600	1560	5,3	3,7	-2,5

Amelina vd. (2018) çalışmalarında farklı sınıflara ait 150 veteriner ilacının sütte UHPLC–high-resolution quadropole time-of-flight kütle spektrometresi ile analizini gerçekleştirmişlerdir. Mobil faz A suda %0,1 formik asit ve mobil faz B ACN’de %0,1 formik asit içerecek şekilde, gradient elüsyonla analizler gerçekleştirilmiştir. Akış hızı 0,4 ml/dakika, kolon sıcaklığı 50°C olarak ayarlanmıştır. Acclaim™ 120 C18 (150 × 2,1 mm; particle size 2,2 µm; Thermo Scientific, United States) kolonda çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada albendazol, mebendazol, metronidazol ve tiyabendazol için LOD değeri 0,5 ng/g; metimazol için 1,0 ng/g olarak belirlenmiştir (Amelina vd., 2018).

Akay vd (2002) yaptığı çalışmada, farmasötik dozaj formda metronidazol ve mikonazolün RPLC-UV’de eş zamanlı tayini gerçekleştirilmiştir. Kromatografik ayırma %40:60 MeOH-H<sub>2</sub>O ikili karışımında, 1 mL/dakika akış hızında yapılmıştır. Sülfametaksazol iç standart olarak seçilmiştir. Metronidazol ve mikanazol nitratın doğrusal regresyon analizi ile ilgili sonuçlar, Çizelge 2.14’te verilmiştir.

Çizelge 2.13. Metronidazol ve mikonazol nitratın doğrusal regresyon analizi ile ilgili sonuçlar

	Metronidazol	Mikanazol nitrat
Doğrusal aralık ( $\mu\text{g/mL}$ ) (*g)	10-70	1-20
Eğim	0,022	0,048
Kesim	0,018	0,002
Korelasyon katsayısı	0,999	0,999
Eğimin bağıl standart sapması	1,07	1,18
Kesimin bağıl standart sapması	0,26	0,41
LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,33	0,28
LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )	1,11	0,89

(\*g) Standart çözeltilerin 5 kez enjeksiyonuyla elde edilen değer

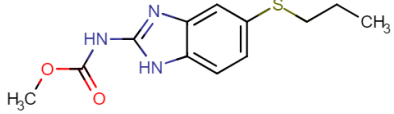
### 3. MATERYAL VE METOT

Tezde çalışılan benzimidazol grubunu içeren ilaçlardan albendazol, astemizol, mebendazol ve tiyabendazol; imidazol grubunu içeren ilaçlardan klotrimazol, metimazol (tiyamazol) ve metronidazol'ün ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında ters faz sıvı kromatografi yöntemi ile elde edilen iyonlaşma/protonasyon sabiti değerlerinin belirlenmesinde kullanılan cihazlar ve kimyasallar hakkında bilgi verilmiştir.

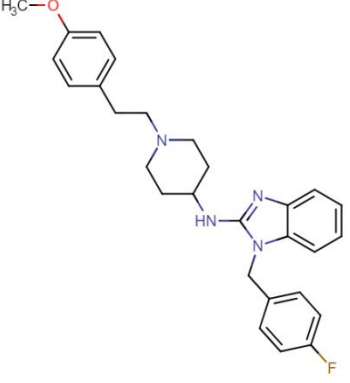
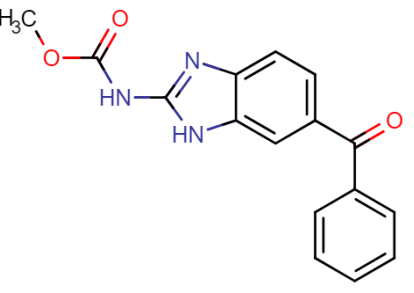
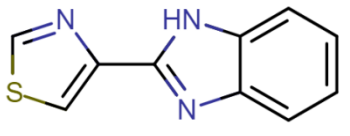
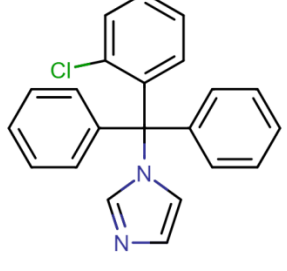
#### 3.1. Tezde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneysel aşamada kullanılan tüm kimyasallar analitik ya da HPLC saflıktadır. Bu tezde çalışılan yedi ilaç etken maddesine ait bazı özellikler, Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tezde çalışılan bileşikler ve bazı özellikleri

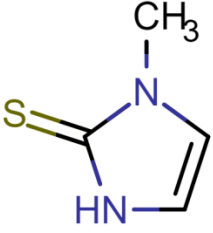
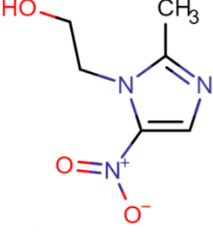
Bileşiğin Kimyasal Yapısı	Bileşiğin IUPAC adlandırılması ve kapalı formülü	Bileşiğin özellikleri
	<b>Albendazol</b>  (Metil N-(6-propilsülfanil-1H-benzimidazol-2-il) karbamat (C <sub>12</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S)	M <sub>A</sub> :265,33 g/mol CAS No: 54965-21-8 HPLC saflıkta>%98

Çizelge 3.1. Tezde çalışılan bileşikler ve bazı özellikleri (Devam)

	<p><b>Astemizol</b></p> <p>(1-[(4-florofenil)metil]-N-[1-[2-(4-metoksifenil)etil]piperidin-4-il]benzimidazol-2-amin)</p> <p>(C<sub>28</sub>H<sub>31</sub>FN<sub>4</sub>O)</p>	<p>M<sub>A</sub>:458,58 g/mol</p> <p>CAS No: 68844-77-9</p> <p>HPLC</p> <p>saflıkta&gt;%98</p>
	<p><b>Mebendazol</b></p> <p>(Metil N-(6-benzoil-1H-benzimidazol-2-il)karbamat)</p> <p>(C<sub>16</sub>H<sub>13</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>)</p>	<p>M<sub>A</sub>:295,30 g/mol</p> <p>CAS No: 31431-39-7</p> <p>HPLC</p> <p>saflıkta&gt;%98</p>
	<p><b>Tiyabendazol</b></p> <p>(4-(1H-benzimidazol-2-il)-1,3-tiyazol)</p> <p>(C<sub>10</sub>H<sub>7</sub>N<sub>3</sub>S)</p>	<p>M<sub>A</sub>:201,25 g/mol</p> <p>CAS No: 123242-33-1</p> <p>HPLC</p> <p>saflıkta&gt;%98</p>
	<p><b>Klotrimazol</b></p> <p>(1-[(2-klorofenil)-difenilmetil]imidazol)</p> <p>(C<sub>22</sub>H<sub>17</sub>ClN<sub>2</sub>)</p>	<p>M<sub>A</sub>:344,84 g/mol</p> <p>CAS No:117829-71-7</p> <p>HPLC</p> <p>saflıkta&gt;%98</p>



Çizelge 3.1. Tezde çalışılan bileşikler ve bazı özellikleri (Devam)

	<p><b>Metimazol</b> <b>(Tiyamazol)</b> (3-metil-1H-imidazol-2- tiyon) (C<sub>4</sub>H<sub>6</sub>N<sub>2</sub>S)</p>	<p>M<sub>A</sub>:114,17 g/mol CAS No: 60-56-0 HPLC safılıkta&gt;%98</p>
	<p><b>Metronidazol</b> (2-(2-metil-5- nitroimidazol-1- il)etanol) (C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>N<sub>3</sub>O<sub>3</sub>)</p>	<p>M<sub>A</sub>:171,15 g/mol CAS No:99616-64- 5 HPLC safılıkta&gt;%98</p>

Kromatografik çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve kullanım amaçları Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kromatografik çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve kullanım amaçları

<b>Kimyasal maddenin adı</b>	<b>Kullanım amacı</b>	<b>Tedarik edilen firma</b>
KHP	pH elektrodunun kalibrasyonu için referans standart madde	Merck, analitik safılıkta
o-fosforik asit (o-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> )	Mobil fazdaki tampon bileşeni	Merck, analitik safılıkta
Amonyum klorür (NH <sub>4</sub> Cl)	Mobil fazdaki tampon bileşeni	Merck, analitik safılıkta
Amonyak (NH <sub>3</sub> )	Mobil fazdaki tampon bileşeni	Merck, analitik safılıkta
Sodyum hidroksit (NaOH)	Mobil fazdaki tampon bileşeni	Merck, analitik safılıkta

Çizelge 3.2. Kromatografik çalışmada kullanılan kimyasal maddeler ve kullanım amaçları (Devam)

Asetonitril (ACN)	Mobil fazda kullanılan organik çözücü	Merck, HPLC saflıkta
Urasil	Kolonda tutunmayan türün alıkonma zamanını belirlemede kullanılan kimyasal madde	Sigma, HPLC saflıkta
Albendazol	İlaç etken maddesi	Sigma-Aldrich, analitik standart, ≥98%
Astemizol	İlaç etken maddesi	United States Pharmacopeia (USP) Referans Standard
Mebendazol	İlaç etken maddesi	Sigma-Aldrich, ≥98%
Tiyabendazol	İlaç etken maddesi	Sigma, ≥99%
Klotrimazol	İlaç etken maddesi	Sigma-Aldrich, analitik standart
Metimazol (Tiyamazol)	İlaç etken maddesi	European Pharmacopoeia (EP) Reference Standard
Metronidazol	İlaç etken maddesi	Sigma-Aldrich, analitik standart

### 3.2. Tezde Kullanılan Cihazlar ve Kolonlar

#### 3.2.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı

Çalışılan bileşiklerin sıvı kromatografik davranışının incelenmesinde ve pK<sub>a</sub> değerlerinin belirlenmesinde, Shimadzu LC-VP marka HPLC cihazı kullanılmıştır. HPLC sisteminde LC-20AD pompa, kolon fırını (CTO-10AS), gaz giderme ünitesi (DGU-20A<sub>3</sub>) ve UV-Vis dedektör (SPD-20A) bulunmaktadır.

### 3.2.2. Kolonlar

Bu tez çalışmasında, Kinetex Core-Shell C8 (Phenomenex, 150mm×2,6 µm, 4,6 mm) kolon albendazol, astemizol, mebendazol ve tiyabendazol, klotrimazol ve metronidazolün ters faz sıvı kromatografik davranışının incelenmesinde, Kinetex Core-Shell EVO C18 (Phenomenex, 250mm×4,6 mm, 5 µm) kolon ise metimazolün (tiyamazol) ters faz sıvı kromatografik davranışının incelenmesinde kullanılmıştır.

### 3.3. Bileşiklerin Kromatografik Davranışlarının Tayininde Kullanılan Çözeltiler

#### **%100 su ortamının mobil faz olarak hazırlanması**

100 mL saf su ortamında 25 mM NH<sub>4</sub>Cl (53,49 g/mol) olacak şekilde ilave edilmiştir. Derişik NH<sub>3</sub> (%32 (v/v); 35,04 g/mol; 0,88 g/cm<sup>3</sup>) ile mobil faz pH'ı istenilen pH değerlerine (pH 8,50; 9,00; 9,50; 10,0; 10,50; 11,00; 11,50) ayarlanmıştır.

#### **%15 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımının hazırlanması**

100 mL mobil fazın hazırlanmasında, 85 mL saf su alınarak üzerine 15 mL ACN eklenmiştir. Böylece ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Bu mobil faz ortamına 25 mM olacak şekilde o-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%85 (w/w); 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. İstenilen pH (2,50; 3,00; 3,50; 4,00; 4,50; 5,00; 5,50; 6,00; 6,50; 7,00) 1M NaOH ilavesi ile gerçekleştirilmiştir. Mobil fazlar ultrasonik banyoda degaze edildikten sonra kullanılmıştır. Çalışma boyunca metronidazol için mobil faz ortamında 75 mM olacak şekilde o-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%85 (w/w); 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu bileşik için çalışılacak pH değerleri (1,83; 2,00; 2,20; 2,40; 2,50; 2,75; 3,00; 3,25; 3,50; 3,75; 4,00; 4,50; 5,00) mobil faza 1M NaOH ilavesi ile gerçekleştirilmiştir.

### **%20 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımının hazırlanması**

100 mL mobil fazın hazırlanmasında, 80 mL saf su alınarak üzerine 20 mL ACN eklenmiştir. Böylece ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Bu mobil faz ortamına 25 mM olacak şekilde o-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%85 (w/w); 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilavesi yapılmıştır. İstenilen pH (2,50; 3,00; 3,50; 4,00; 4,50; 5,00; 5,50; 6,00; 6,50; 7,00), 1M NaOH ilavesi ile gerçekleştirilmiştir. Mobil fazlar ultrasonik banyoda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

### **%25 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımının hazırlanması**

100 mL mobil fazın hazırlanmasında, 75 mL saf su alınarak üzerine 25 mL ACN eklenmiştir. Böylece ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Bu mobil faz ortamına 25 mM olacak şekilde o-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%85 (w/w); 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilavesi yapılmıştır. İstenilen pH (2,50; 3,00; 3,50; 4,00; 4,50; 5,00; 5,50; 6,00; 6,50; 7,00), 1M NaOH ilavesi ile gerçekleştirilmiştir. Mobil fazlar ultrasonik banyoda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

### **%35 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımının hazırlanması**

100 mL mobil fazın hazırlanmasında, 65 mL saf su alınarak üzerine 35 mL ACN eklenmiştir. Böylece ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Bu mobil faz ortamına 25 mM olacak şekilde o-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%85 (w/w); 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilavesi yapılmıştır. İstenilen pH (2,50; 3,00; 3,50; 4,00; 4,50; 5,00; 5,50; 6,00; 6,50; 7,00; 7,50; 8,00), 1M NaOH ilavesi ile gerçekleştirilmiştir. Mobil fazlar ultrasonik banyoda degaze edildikten sonra kullanılmıştır. pH 8,5; 9,00 değerlerinde hazırlanacak olan mobil fazlarda 25 mM olacak şekilde katı NH<sub>4</sub>Cl (53,49 g/mol) ilave edilmiş, derişik NH<sub>3</sub> (%32 (v/v); 35,04 g/mol; 0,88 g/cm<sup>3</sup>) ile mobil faz pH'ı istenilen pH (pH 8,5; 9,0) 'a ayarlanmıştır.

### **%40 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımının hazırlanması**

100 mL mobil fazın hazırlanmasında, 60 mL saf su alınarak üzerine 40 mL ACN eklenmiştir. Böylece ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Bu mobil faz ortamına 25 mM olacak şekilde o-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%85 (w/w); 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilavesi yapılmıştır. İstenilen pH (2,50; 3,00; 3,50; 4,00; 4,50; 5,00; 5,50; 6,00; 6,50; 7,00; 7,50; 8,00), 1M NaOH ilavesi ile gerçekleştirilmiştir. Mobil fazlar ultrasonik banyoda degaze edildikten sonra kullanılmıştır. pH 8,5; 9,00 değerlerinde hazırlanacak olan mobil fazlarda 25 mM olacak şekilde katı NH<sub>4</sub>Cl (53,49 g/mol) ilave edilmiş, derişik NH<sub>3</sub> (%32 (v/v); 35,04 g/mol; 0,88 g/cm<sup>3</sup>) ile mobil faz pH'ı istenilen pH (pH 8,5; 9,0)'a ayarlanmıştır.

### **%45 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımının hazırlanması**

100 mL mobil fazın hazırlanmasında, 55 mL saf su alınarak üzerine 45 mL ACN eklenmiştir. Böylece ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Bu mobil faz ortamına 25 mM olacak şekilde o-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%85 (w/w); 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilavesi yapılmıştır. İstenilen pH (2,50; 3,00; 3,50; 4,00; 4,50; 5,00; 5,50; 6,00; 6,50; 7,00; 7,50; 8,00), 1M NaOH ilavesi ile gerçekleştirilmiştir. Mobil fazlar ultrasonik banyoda degaze edildikten sonra kullanılmıştır. pH 8,5; 9,00 değerlerinde hazırlanacak olan mobil fazlarda 25 mM olacak şekilde katı NH<sub>4</sub>Cl (53,49 g/mol) ilave edilmiş, derişik NH<sub>3</sub> (%32 (v/v); 35,04 g/mol; 0,88 g/cm<sup>3</sup>) ile mobil faz pH'ı istenilen pH (pH 8,5; 9,0)'a ayarlanmıştır.

### **Urasil çözeltilisinin hazırlanması**

İlaç etken maddelerinin çalışılan koşullarda kapasite faktörlerinin belirlenmesi için kolonda tutunmayan tür olarak urasil çözeltisi 100 ppm olacak şekilde hazırlanmıştır. Hazırlanan bu urasil çözeltisinden 20 µL enjekte edilerek kolonda tutunmayan türün alıkonma zamanı belirlenmiştir. Urasil için çalışılan dalga boyu 225 nm olarak belirlenmiştir.

### **KHP çözeltisinin hazırlanması**

Potasyum hidrojen fitalat (KHP) ((C<sub>6</sub>H<sub>4</sub>(COOK)(COOH)) çözeltisi primer standart pH referans çözeltisi olarak 0,05 m derişiminde kullanılmış ve pH elektrodu bu bileşik için gerekli değere kalibre edilmiştir. pH/iyon metrenin kalibrasyonu yapıldıktan sonra mobil fazların pH'ları istenilen değere ayarlanmıştır.

### **İlaç çözeltilerinin hazırlanması**

Kromatografik çalışmada analiz edilecek bileşiklerin herbirinden 100 ppm'lik stok çözeltiler hazırlanmıştır. Sıvı kromatografi cihazına her bir stok çözeltiden 20 µL enjekte edilmiştir. Her bir bileşik için en az 3 tane enjeksiyon yapılarak alıkonma zamanlarının ortalaması alınmıştır.

### **Kalibrasyon çözeltilerinin hazırlanması**

Yapılan çalışmada doğrusal aralığın belirlenmesi için kalibrasyon çözeltileri hazırlanarak kalibrasyon grafiğı çizilmiştir. Kalibrasyon grafiğı çizilirken iç standart yöntemi kullanılmıştır. Klotrimazol, mebendazol ve albendazolün 100 ppm (µg/mL) stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu bileşikler için 2-12 ppm aralığındaki kalibrasyon çözeltileri stok çözeltilerden seyreltilerek hazırlanmıştır. Albendazol için klotrimazol, mebendazol için albendazol, klotrimazol için dikloksasilin iç standart olarak belirlenmiştir. İç standart olarak seçilen klotrimazol, albendazol ve dikloksasilin çözeltilerinin herbirinden 1 ppm derişimde hazırlanmıştır. Kalibrasyon grafiğı için bileşiklerin en az 3 tekrarlı enjeksiyonu yapılmıştır.

### **Gün içi ve günler arası çalışma çözeltileri**

Tez çalışmasında metodun kesinliğinin belirlenmesi için gün içi ve günler arası çalışmalar yapılmıştır. Albendazol için 4-8 ppm; mebendazol ve klotrimazol için 4-10 ppm derişimlerinde hazırlanan çözeltiler gün içi ve günler arası çalışmaları

gerçekleştirmek amacıyla yüksek performanslı sıvı kromatografi sistemine en az beş tekrarlı olacak şekilde enjekte edilmiştir.

### **Tablet numune çözeltisi**

Miktar tayini yapabilmek amacıyla 10 g tablet ezilmiş ve bir tablete eşdeğer miktardaki tablet tozu, 100 mL'lik balon jöjeye alınmıştır. Üzerine mobil faz eklenerek ultrasonik banyoda 20 dakika çözünmesi için bekletilmiştir ve hacmi mobil fazla tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti mavi bant süzgeç kağıdından süzölmüş ve bileşimin kalibrasyon aralığındaki derişimde olacak şekilde süzöntü farklı seyreltme oranlarında hazırlanmıştır. İç standart madde (klotrimazol, albendazol) 1 µg/mL olacak şekilde sabit derişimde ilave edilmiştir.

### **Krem numune çözeltisi**

Çalışmada klotrimazolün krem formölasyonunda miktar tayininin yapılabilmesi amacıyla krem numunesi analize hazırlanmıştır. Klotrimazol içeren Canesten® krem numunesinden 1 g tartılarak 100 mL mobil fazda çözülmüştür. Derişimi 4 µg/mL olan krem numunesi içerisindeki etken maddenin belirlenebilmesi için hazırlanan kalibrasyon grafiğinin derişim aralığına girecek şekilde seyreltilmiştir. Elde edilen çözelti beyaz bant süzgeç kağıdı (640m, Ø125mm çap) kullanılarak süzölmüştür. Süzöntüye 1 µg/mL olacak şekilde iç standart dikloksasilin ilave edilmiştir ve sisteme enjekte edilmeden önce 0,45 µm Millipore filtreden geçirilmiştir.

### **3.4. Optimum Ayırma Koşulunun Belirlenmesi**

Ayırma ve metot validasyonunu gerçekleştirmek için optimum koşulların belirlenmesinde çalışılan koşullardaki her bir mobil faz için ayırma gücü, kapasite ve seçicilik faktörü değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler dikkate alınarak, mebendazol için en uygun ayırma koşulu %45 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımı (pH 5,0); albendazol için en uygun ayırma koşulu %45 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımı (pH 4,0); klotrimazol için

en uygun ayırma koşulu %45 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımı (pH 5,5) olarak belirlenmiştir.

### **3.5. Yöntem Geliştirme**

#### **3.5.1. Sıvı kromatografik yöntemle pK<sub>a</sub> tayini**

Ters faz sıvı kromatografi yöntemiyle pK<sub>a</sub> değerlerinin belirlenmesinde, metimazol (tiyamazol) bileşiği için %100 su ortamında, tiyabendazol ve metronidazol için %15 (v/v), %20 (v/v), %25 (v/v) asetonitril içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında, albendazol, astemizol, mebendazol ve klotrimazol için %35 (v/v), %40 (v/v), %45 (v/v), ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında deneysel çalışmalar gerçekleştirilmiştir. Çalışılan her bir ortam için 0,05 m derişimde KHP kalibrasyon çözeltisi hazırlanmıştır. Elektrot kalibrasyonundan sonra her bir koşula ait mobil faz istenilen pH değerine ayarlanarak hazırlanmıştır. Bu ayarlama işleminde tampon aralığı dikkate alınarak pH 8,0'e kadar hazırlanan çözeltiler için 25 mm o-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> kullanılmıştır. Çalışılmak istenen pH değerine 1M NaOH ilavesiyle ulaşılmıştır. pH 8,5-11,5 aralığında çalışılan mobil fazlara ise 25 mM NH<sub>4</sub>Cl eklenerek, çalışılmak istenen pH değerine derişik NH<sub>3</sub> eklenerek ulaşılmıştır.

Çalışılan bileşiklerin alıkonma zamanları en az üç enjeksiyonun ortalaması alınarak belirlenmiş ve mobil faz pH'nının bu alıkonma süreleri üzerine etkisi incelenmiştir.

#### **3.5.2. Hareketli fazın belirlenmesi**

Bileşiklerin pK<sub>a</sub> değerlerinin belirlenmesinde, en uygun asetonitril derişiminin saptanması amacıyla bileşiklerin çözünürlükleri incelenmiş ve hareketli fazın organik çözücü içeriği tiyabendazol ve metronidazol için %15 (v/v), %20 (v/v), %25 (v/v); albendazol, astemizol, mebendazol ve klotrimazol için %35 (v/v), %40 (v/v), %45 (v/v) olarak belirlenmiştir. Metimazol (tiyamazol) için %100 su ortamında çalışılmıştır. Hareketli fazın organik çözücü içeriğinin



belirlenmesinden sonra bileşiklerin pK<sub>a</sub> değerleri göz önünde bulundurularak mobil faz pH değerleri belirlenmiştir. Çalışılmaya karar verilen mobil faz pH değerleri bölüm 3.3'de anlatılmıştır.

### **3.5.3. Hareketli faz pH'ı ve kolon sıcaklığının belirlenmesi**

Mobil faz pH'ı bileşiğin alıkonma davranışının anlaşılmasında çok önemlidir. Mobil faz pH'ının değişmesi ile bileşiğin seçicilik, alıkonma özellikleri, pik genişliği ve pik simetrisi değişir. Bu yüzden pik simetrisi de kromatografik ayırmalarda dikkat edilmesi gereken bir unsurdur.

Kolon sıcaklığının belirlenmesinde 25°C'de ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında literatürde pK<sub>a</sub> verileri yetersiz olduğundan bu sıcaklık seçilmiştir. Aynı zamanda 37°C'deki pK<sub>a</sub> değerlerini hesaplamak için 25°C'deki deneysel pK<sub>a</sub> verilerine ihtiyaç duyulduğundan bu sıcaklıkta çalışılmıştır.

### **3.5.4. Dalga boyu seçimi**

Tezde çalışılan bileşiklerin ve urasilin dalga boyları Perkin-Elmer LAMBDA 25 spektrofotometre cihazıyla belirlenmiştir. Burada belirlenen dalga boyları albendazol için 210 nm, astemizol için 205 nm, mebendazol için 240 nm, tiyabendazol için 205 nm, klotrimazol için 195 nm, metimazol için 255 nm, metronidazol için 277 nm ve urasil için 225 nm'dir. Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazında bu dalga boyları kullanılarak analizler gerçekleştirilmiştir.

#### 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

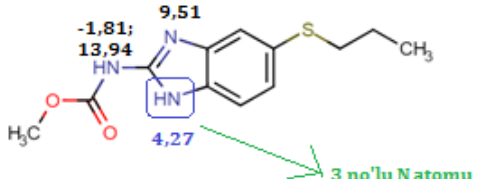
Yapısında N atomu bulunduran, anthelmintik ve antifungal özellik gösteren benzimidazol fonksiyonel grubu taşıyan albendazol, astemizol, mebendazol, tiyabendazol ve imidazol fonksiyonel grubu taşıyan, klotrimazol, metimazol ve metronidazole ait asetonitril su ikili karışımlarında pK<sub>a</sub> değerleri deneysel olarak belirlenmiş ve bu bileşiklere ait bazı fizikokimyasal parametreler (logS, logP) hesaplama yöntemiyle elde edilmiştir.

Bu tez çalışmasında; albendazol, astemizol, mebendazol ve klotrimazol için %35 (v/v), %40 (v/v), %45 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında; metronidazol ve tiyabendazol için %15 (v/v), %20 (v/v), %25 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında; metimazol (tiyamazol) için ise %100 H<sub>2</sub>O ortamında iyonlaşma/protonasyon sabiti (pK<sub>a</sub>) tayinleri gerçekleştirilmiştir. Tezde çalışılan altı bileşik için Kinetex Core-Shell C8 (Phenomenex, 150mm×2,6 µm, 4,6 mm) kolon; metimazolün tayini için Kinetex Core-Shell EVO C18 (Phenomenex, 250mm×4,6 mm, I.D. 5 µm) kolon kullanılmıştır.

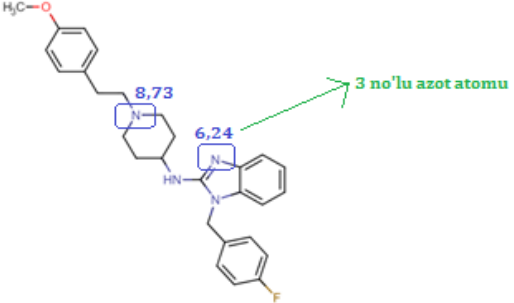
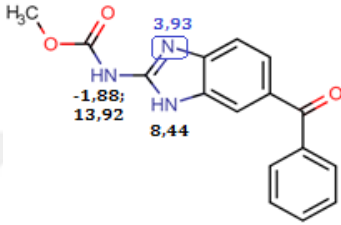
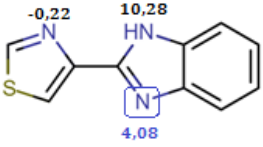
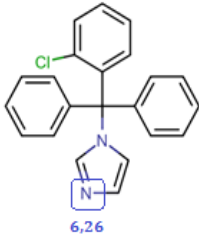

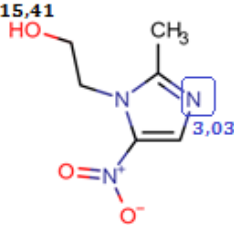
##### 4.1. Bileşiklerin Chemicalize Programı ile Hesaplanan İyonlaşma / Protonasyon Sabiti Değerleri

Bileşiklerin Chemicalize programından hesaplanan pK<sub>a</sub> değerleri Çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Bileşiklerin Chemicalize programı ile hesaplanan pK<sub>a</sub> Değerleri

Bileşiğin adı	Kimyasal yapısı ve programdan elde edilen pK <sub>a</sub> değerleri
Albendazol	 <p>The chemical structure of Albendazole is shown with four pK<sub>a</sub> values: -1.81, 13.94, 9.51, and 4.27. A green arrow points to the 3rd nitrogen atom, labeled '3 no'lu N atomu'.</p>

Çizelge 4.1. Bileşiklerin Chemicalize programı ile hesaplanan pKa değerleri (Devam)

<p><b>Astemizol</b></p>	
<p><b>Mebendazol</b></p>	
<p><b>Tiyabendazol</b></p>	
<p><b>Klotrimazol</b></p>	
<p><b>Metimazol (Tiyamazol)</b></p>	
<p><b>Metronidazol</b></p>	

## 4.2. İyonlaşma/Protonasyon Sabiti Hesaplanması için Yapılan Çalışmalar

### 4.2.1. Albendazol için elde edilen sıvı kromatografik veriler

Albendazol için %35, %40, %45 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında ters faz sıvı kromatografik yöntemle deneysel olarak 25°C'de elde edilen alıkonma değerleri ( $t_R$ ), Çizelge 4.2, Çizelge 4.3 ve Çizelge 4.4'de verilmiştir.

Çizelge 4.2. %35 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında albendazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Den. $t_R$	$\gamma$ aktiflik	Hes. $\log t_R$	Den. $\log t_R$	$\Delta(\text{Den-hes.})^2$
2,5	4,065	0,902	0,606	0,609	0,000010
3,0	4,892	0,867	0,694	0,689	0,000020
3,5	6,797	0,841	0,835	0,832	0,000075
4,0	9,360	0,829	0,963	0,971	0,000007
4,5	10,719	0,825	1,032	1,030	0,000002
5,0	11,347	0,823	1,059	1,055	0,000015
5,5	11,709	0,822	1,068	1,069	0,000000
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					<b>0,000131</b>

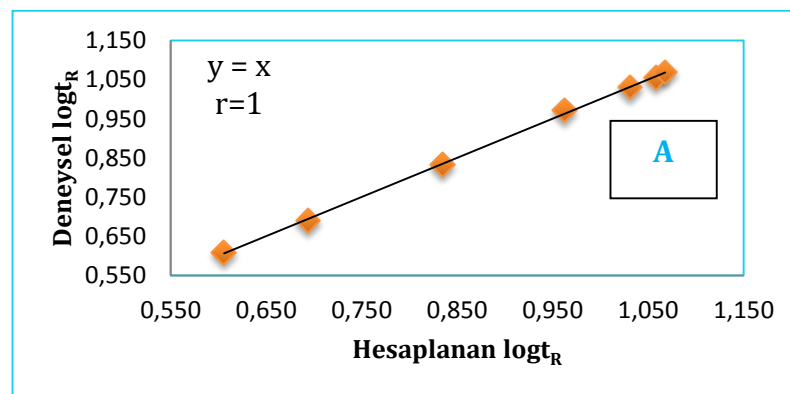
Çizelge 4.3. %40 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında albendazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Den. $t_R$	$\gamma$ aktiflik	Hes. $\log t_R$	Den. $\log t_R$	$\Delta(\text{Den-hes.})^2$
2,5	2,980	0,907	0,479	0,474	0,000025
3,0	3,602	0,869	0,546	0,557	0,000108
3,5	4,466	0,840	0,658	0,650	0,000059
4,0	5,779	0,825	0,762	0,762	0,000000
4,5	6,645	0,819	0,819	0,823	0,000016
5,0	6,952	0,817	0,841	0,842	0,000001
5,5	7,009	0,816	0,849	0,846	0,000009
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					<b>0,000218</b>

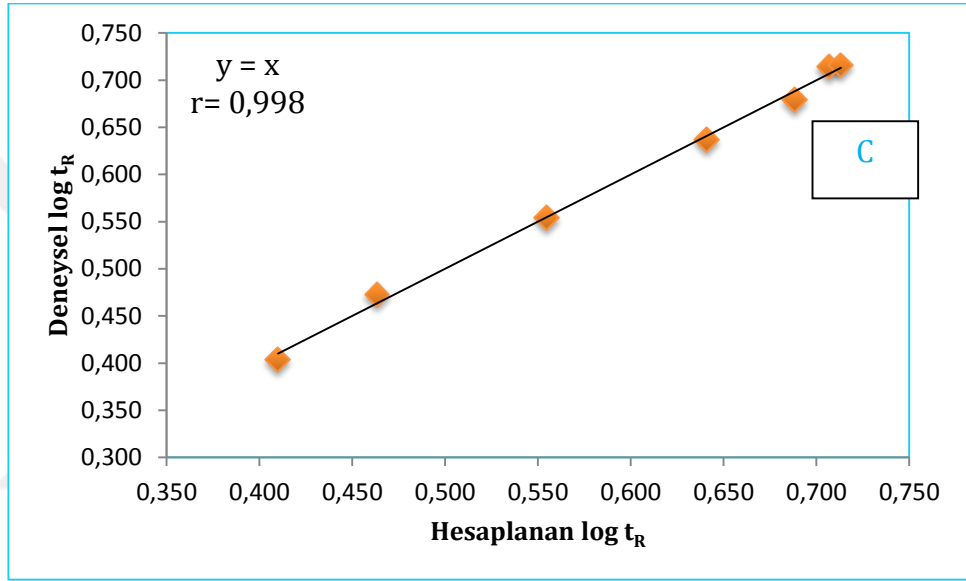
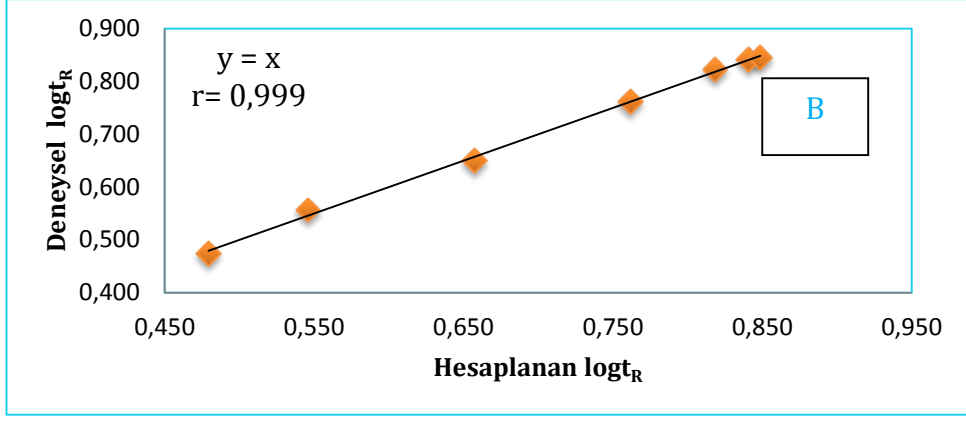
Çizelge 4.4. %45 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında albendazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Den. t <sub>R</sub>	γ aktiflik	Hes. log <sub>t<sub>R</sub></sub>	Den. log <sub>t<sub>R</sub></sub>	Δ(Den-hes.) <sup>2</sup>
2,5	2,535	0,913	0,410	0,404	0,000359
3,0	2,971	0,875	0,463	0,473	0,000089
3,5	3,581	0,843	0,555	0,554	0,000000
4,0	4,337	0,825	0,641	0,637	0,000014
5,0	4,776	0,818	0,688	0,679	0,000084
5,0	5,178	0,815	0,707	0,714	0,000053
5,5	5,200	0,814	0,713	0,716	0,000007
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					<b>0,000284</b>

%35, %40 ve %45 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında albendazolün alıkonma davranışı pH 2,50-5,50 arasında incelenmiştir. Çizelgeler incelendiğinde deneysel alıkonma değerlerinin logaritmasıyla hesaplanan alıkonma değerlerinin logaritmasının birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Bu uyum farkların karelerinin toplamının küçük olmasında da anlaşılmaktadır. Uyumu gösteren grafikler, Şekil 4.1’de verilmiştir. Çizelgelerde çalışılan ortam ve pH değerleri için hesaplanan γ aktiflik katsayısı da hesaplamaya dâhil edilmiş ve termodinamik pK<sub>a</sub> değerleri hesaplanmıştır.



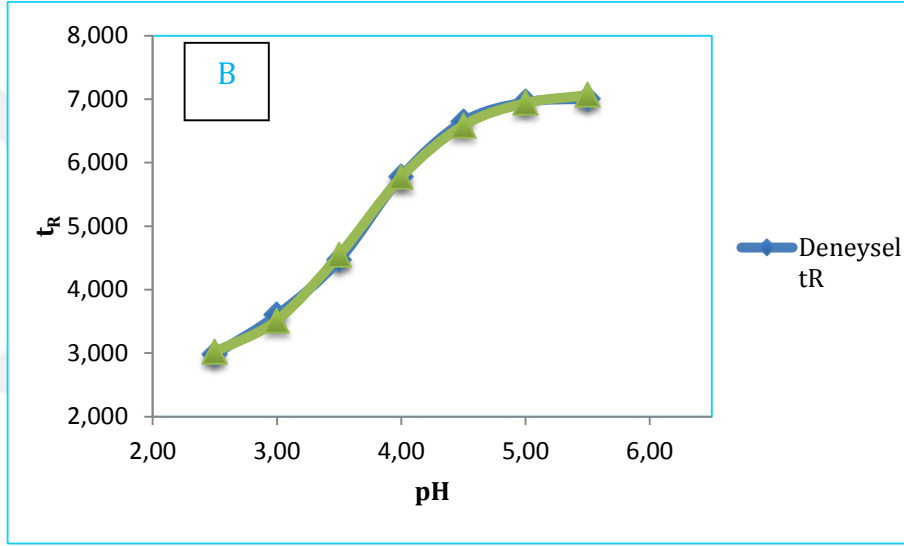
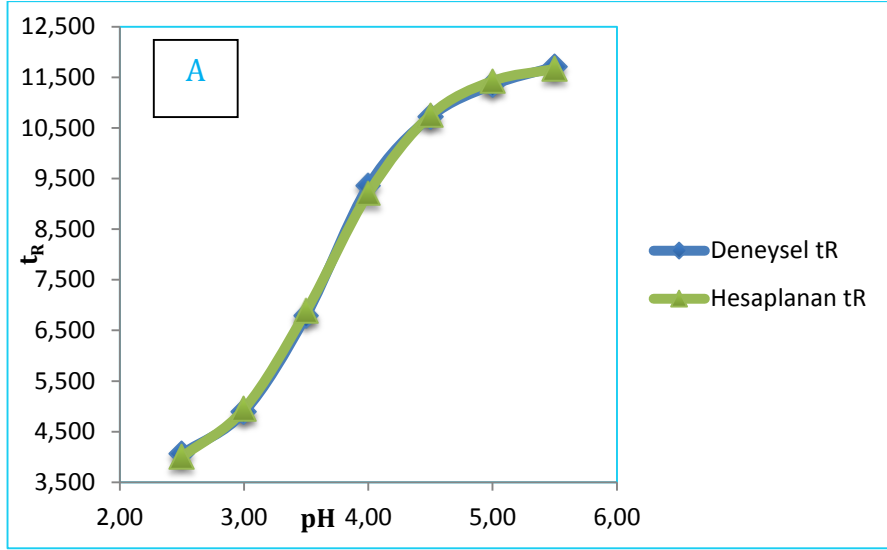
Şekil 4.1. A) %35 (v/v) B) %40 (v/v) C) %45 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında albendazolün deneysel ve hesaplanan log<sub>t<sub>R</sub></sub> ilişkisini gösteren grafikler



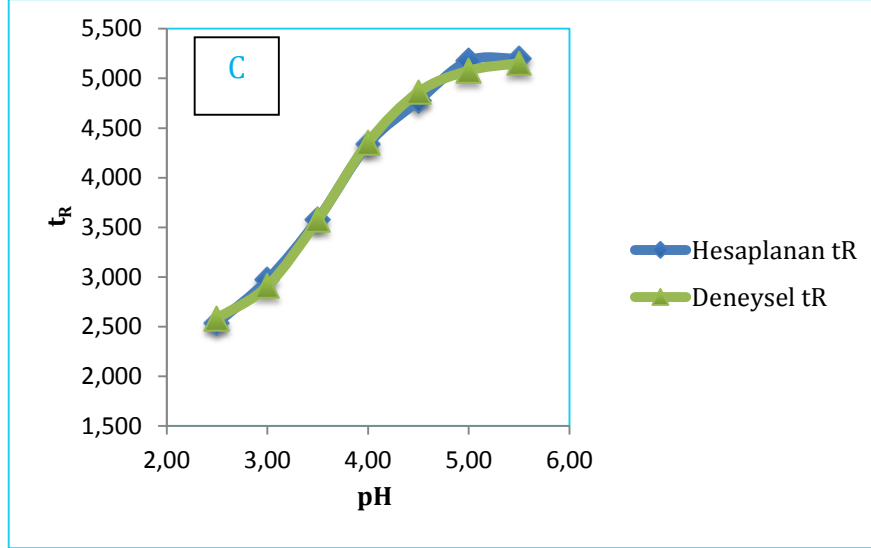
Şekil 4.1. A) %35 (v/v) B) %40 (v/v) C) %45 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında albendazolün deneysel ve hesaplanan log t<sub>R</sub> ilişkisini gösteren grafikler (Devam)

Hesaplanan log t<sub>R</sub> değerleri, deneysel log t<sub>R</sub> değerlerine karşılık grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim değerinin 1 ya da 1'e, kesim değerinin sıfıra yakın olması x ve y eksenlerindeki değerlerin birbiriyle uyumlu olduğunu ifade etmektedir. Korelasyon katsayısı (r) değeri de bu uyumu göstermektedir.

Excel'in Solver algoritmasının kullanıldığı yaklaşımda, bileşiğin pH değerine karşılık alıkonma zamanları grafiğe geçirildiğinde deneysel ve hesaplanan t<sub>R</sub> değerlerinin birbiriyle uyumlu olduğu anlaşılmış ve sigmoidal bir ilişki gözlemlenmiştir (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. A) %35 (v/v) B) %40 (v/v) C) %45 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında albendazolün pH-alkonma zamanı ilişkisi



Şekil 4.2. A) %35 (v/v) B) %40 (v/v) C) %45 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında albendazolün pH-alıkonma zamanı ilişkisi (Devam)

#### 4.2.2. Astemizol için elde edilen sıvı kromatografik veriler

Astemizol için %35, %40, %45 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında ters faz sıvı kromatografik yöntemle deneysel olarak 25°C'de elde edilen alıkonma değerleri ( $t_R$ ) Çizelge 4.5, Çizelge 4.6 ve Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. %35 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında astemizol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Den. $t_R$	$\gamma$ aktiflik	Hes. log $t_R$	Den. log $t_R$	$\Delta(\text{Den-hes.})^2$
2,5	3,158	0,906	0,507	0,499	0,000051
3,0	3,076	0,872	0,511	0,488	0,000539
3,5	3,305	0,847	0,526	0,519	0,000045
4,0	3,859	0,836	0,569	0,586	0,000318
5,0	5,003	0,831	0,674	0,699	0,000621
5,0	7,900	0,830	0,865	0,898	0,001044
5,5	10,849	0,829	1,085	1,035	0,002497
6,0	16,115	0,828	1,242	1,207	0,001195
6,5	23,056	0,826	1,316	1,363	0,002169
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					0,008479



Çizelge 4.5. %35 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında astemizol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri (Devam)

6,5	23,056	0,826	1,366	1,363	0,000008
7,0	36,411	0,820	1,504	1,561	0,003276
7,5	51,063	0,806	1,726	1,708	0,000334
8,0	80,900	0,785	1,950	1,908	0,001776
8,5	131,000	0,768	2,089	2,117	0,000811
9,0	141,179	0,759	2,148	2,150	0,000003
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					0,006208

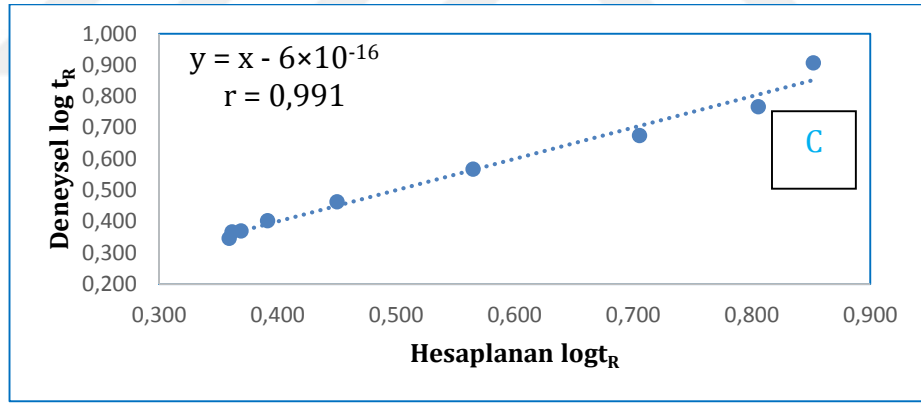
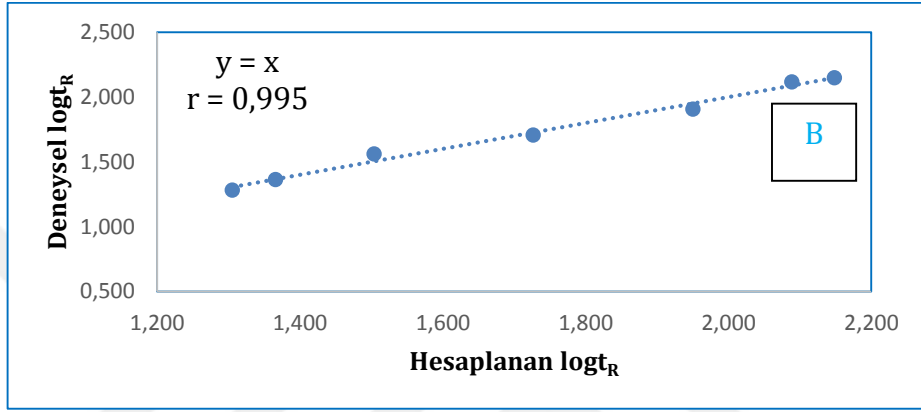
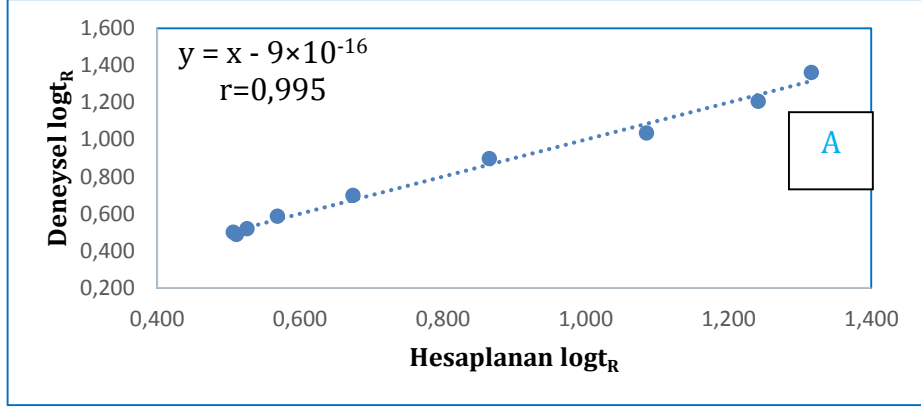
Çizelge 4.6. %40 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında astemizol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Den. tr	$\gamma$ aktiflik	Hes. log tr	Den. log <sub>tr</sub>	$\Delta(\text{Den-hes.})^2$
2,5	2,218	0,910	0,359	0,346	0,000171
3,0	2,325	0,874	0,361	0,366	0,000025
3,5	2,338	0,845	0,369	0,369	0,000000
4,0	2,526	0,830	0,391	0,402	0,000122
5,0	2,898	0,825	0,450	0,462	0,000144
5,0	3,688	0,823	0,565	0,567	0,000003
5,5	4,722	0,822	0,705	0,674	0,000978
6,0	5,836	0,821	0,806	0,766	0,001554
6,5	8,054	0,819	0,852	0,906	0,002908
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					0,005907
6,0	5,836	0,821	0,803	0,766	0,001393
6,5	8,054	0,819	0,873	0,906	0,001060
7,0	12,178	0,814	1,020	1,086	0,004246
7,5	15,000	0,801	1,228	1,176	0,002739
8,0	21,517	0,781	1,411	1,333	0,006119
8,5	30,887	0,761	1,512	1,490	0,000476
9,0	44,000	0,750	1,551	1,643	0,008460
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					0,024493

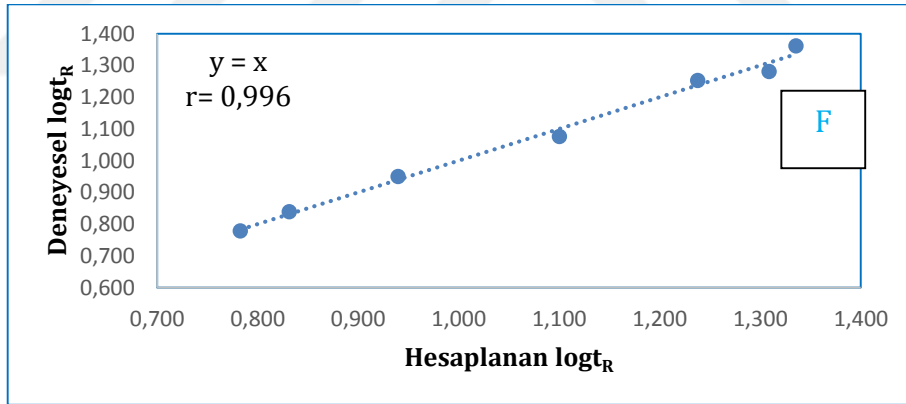
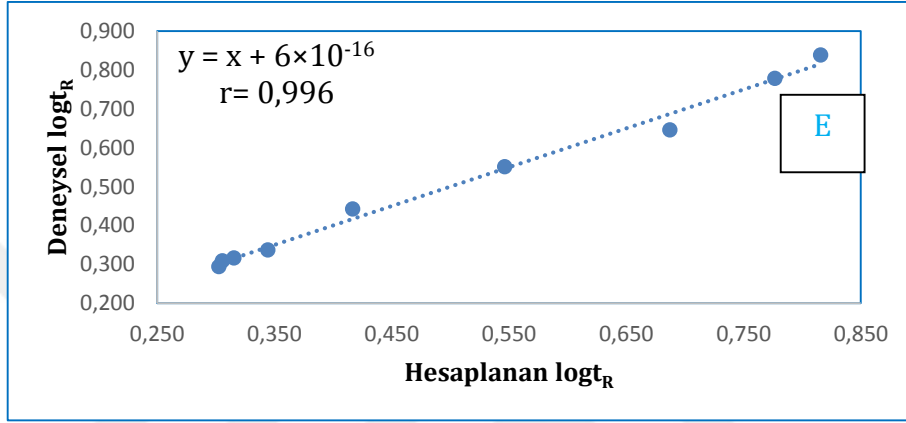
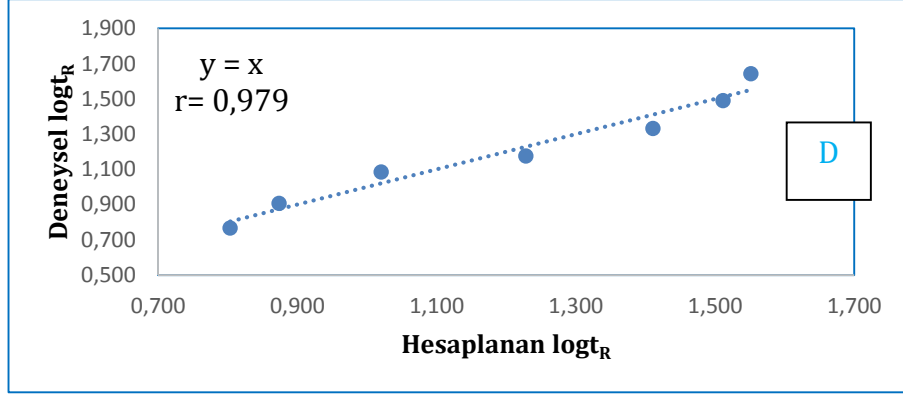
Çizelge 4.7. %45 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında astemizol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Den. t <sub>R</sub>	$\gamma$ aktiflik	Hes. log t <sub>R</sub>	Den. log t <sub>R</sub>	$\Delta(\text{Den-hes.})^2$
2,5	1,969	0,913	0,303	0,294	0,000072
3,0	2,036	0,875	0,306	0,309	0,000009
3,5	2,072	0,843	0,316	0,316	0,000001
4,0	2,173	0,825	0,345	0,337	0,000057
4,5	2,767	0,818	0,417	0,442	0,000631
5,0	3,558	0,815	0,547	0,551	0,000022
5,5	4,422	0,814	0,687	0,646	0,001727
6,0	6,000	0,813	0,777	0,778	0,000001
6,5	6,896	0,812	0,816	0,839	0,000518
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					0,003036
6,0	6,000	0,813	0,783	0,778	0,000022
6,5	6,896	0,812	0,831	0,839	0,00052
7,0	8,918	0,807	0,940	0,950	0,000111
7,5	11,896	0,795	1,100	1,075	0,000614
8,0	17,868	0,775	1,238	1,252	0,000201
8,5	19,091	0,754	1,309	1,281	0,000793
9,0	22,988	0,741	1,336	1,361	0,000662
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					0,002456

%35, %40 ve %45 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında astemizolün alıkonma davranışı pH 2,50-9,00 arasında incelenmiştir. Çizelgeler incelendiğinde deneysel alıkonma değerlerinin logaritmasıyla hesaplanan alıkonma değerlerinin logaritmasının birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Bu uyum farkların karelerinin toplamının küçük olmasında da anlaşılmaktadır. Uyumu gösteren grafikler Şekil 4.3'de verilmiştir. Çizelgelerde çalışılan ortam ve pH değerleri için hesaplanan  $\gamma$  aktiflik katsayısı da hesaplamaya dâhil edilmiş ve termodinamik pK<sub>a</sub> değerleri hesaplanmıştır.



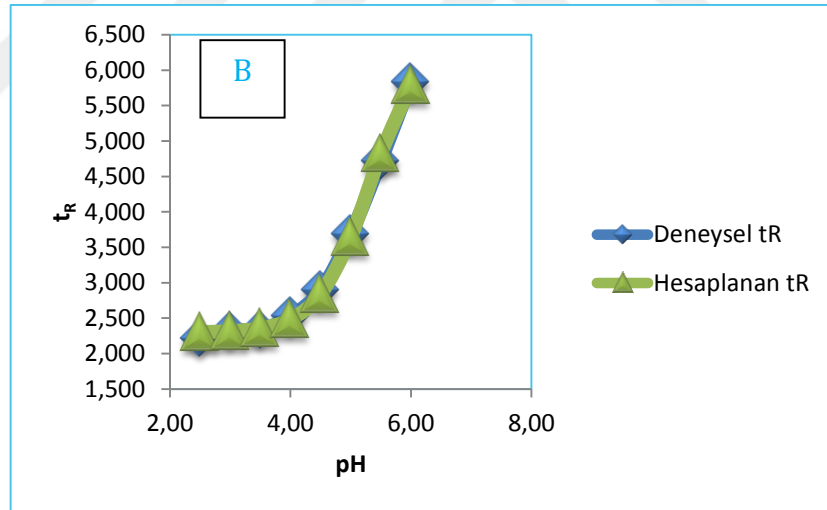
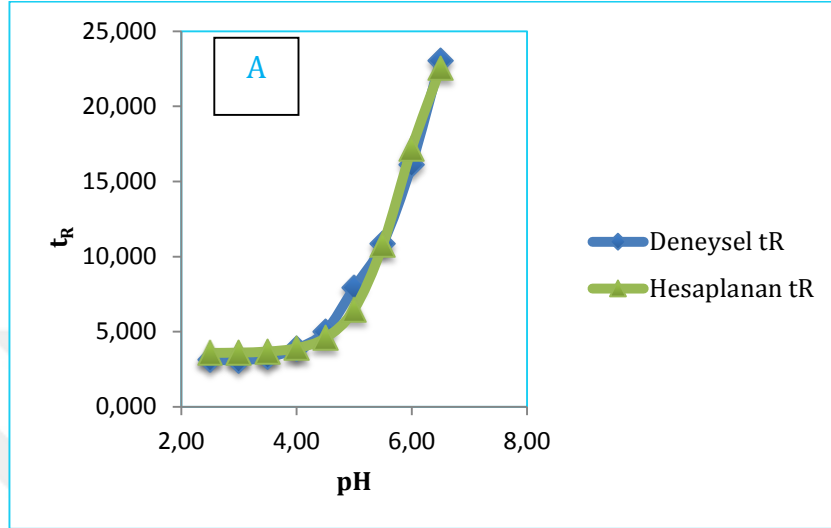
Şekil 4.3. A ve B%35 (v/v); C ve D %40 (v/v); E ve F %45 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında astemizolün deneysel ve hesaplanan  $\log t_R$  ilişkisini gösteren grafikler



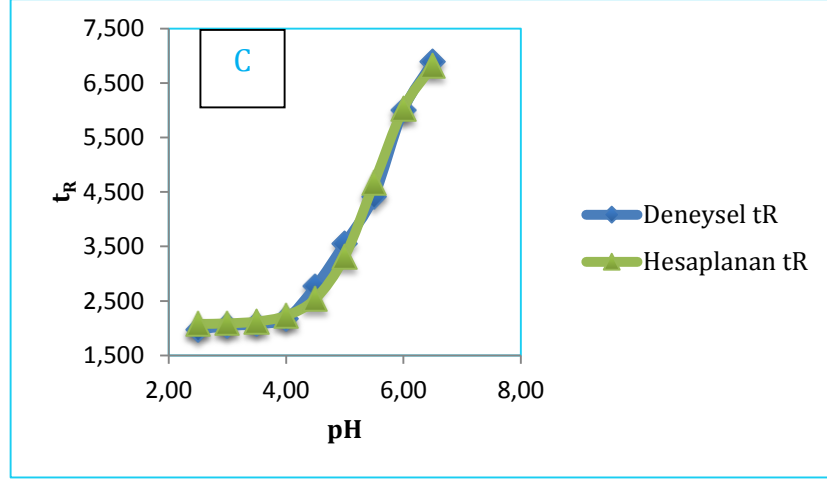
Şekil 4.3. A ve B%35 (v/v); C ve D %40 (v/v); E ve F %45 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında astemizolün deneysel ve hesaplanan  $\log t_R$  ilişkisini gösteren grafikler (Devam)

Hesaplanan  $\log t_R$  değerleri, deneysel  $\log t_R$  değerlerine karşılık grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim değerinin 1 ya da 1'e, kesim değerinin sıfıra yakın olması x ve y eksenlerindeki değerlerin birbiriyle uyumlu olduğunu ifade etmektedir. Korelasyon katsayısı (r) değeri de bu uyumu göstermektedir.

Excel'in Solver algoritmasının kullanıldığı yaklaşımda, bileşiğin pH değerine karşılık alıkonma zamanları grafiğe geçirildiğinde deneysel ve hesaplanan  $t_R$  değerlerinin birbiriyle uyumlu olduğu anlaşılmış ve sigmoidal bir ilişki gözlemlenmiştir (Şekil 4.4).



Şekil 4.4. A %35 (v/v); B %40 (v/v); C %45 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında astemizolün pH-alıkonma zamanı ilişkisi



Şekil 4.4. A %35 (v/v); B %40 (v/v); C %45 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında astemizolün pH-alıkonma zamanı ilişkisi (Devam)

#### 4.2.3. Mebendazol için elde edilen sıvı kromatografik veriler

Mebendazol için %35, %40, %45 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında ters faz sıvı kromatografik yöntemle deneysel olarak 25°C'de elde edilen alıkonma değerleri (t<sub>R</sub>) Çizelge 4.8, Çizelge 4.9 ve Çizelge 4.10'da verilmiştir.

Çizelge 4.8. %35 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında mebendazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Den. t <sub>R</sub>	$\gamma$ aktiflik	Hes. log t <sub>R</sub>	Den. log t <sub>R</sub>	$\Delta(\text{Den-hes.})^2$
2,5	4,019	0,906	0,604	0,604	0,000000
3,0	4,928	0,872	0,691	0,693	0,000002
3,5	5,872	0,847	0,774	0,769	0,000030
4,0	6,731	0,836	0,819	0,828	0,000078
4,5	6,877	0,831	0,837	0,837	0,000000
5,0	6,994	0,830	0,843	0,845	0,000004
5,5	6,760	0,829	0,845	0,830	0,000217
6,0	7,128	0,828	0,845	0,853	0,000059
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					<b>0,000390</b>

Çizelge 4.9. %40 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında mebendazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri

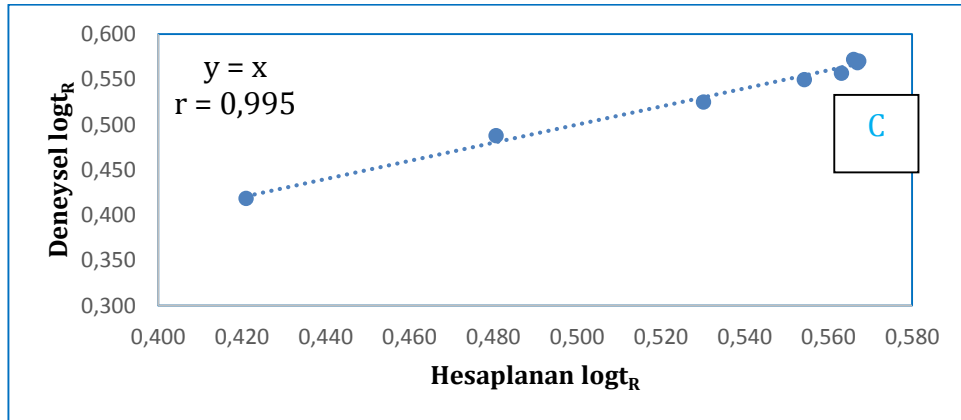
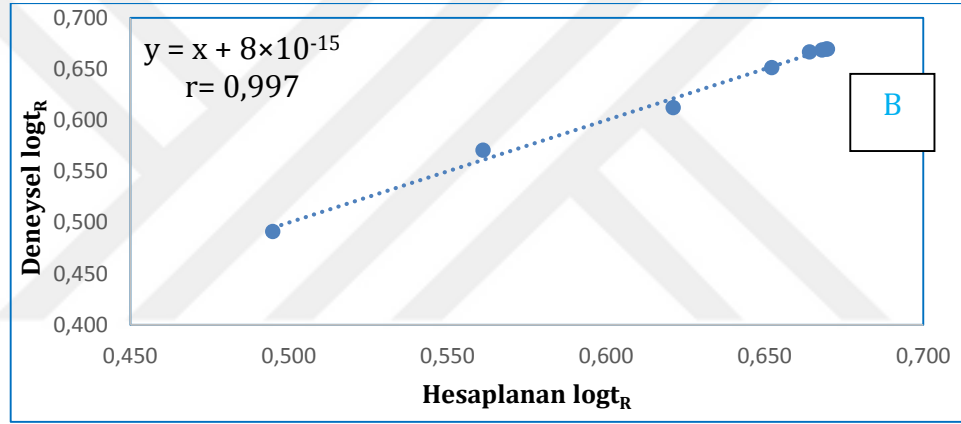
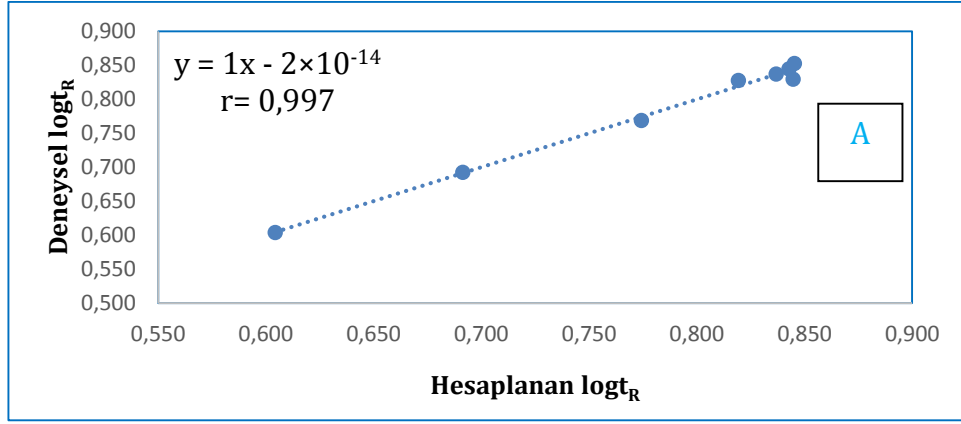
pH	Den. t <sub>R</sub>	γ aktiflik	Hes. log t <sub>R</sub>	Den. log t <sub>R</sub>	Δ(Den-hes.) <sup>2</sup>
2,5	3,100	0,910	0,495	0,491	0,000013
3,0	3,723	0,874	0,561	0,571	0,000093
3,5	4,098	0,845	0,621	0,613	0,000075
4,0	4,483	0,830	0,652	0,652	0,000001
4,5	4,645	0,825	0,664	0,667	0,000008
5,0	4,663	0,823	0,668	0,669	0,000000
5,5	4,674	0,822	0,669	0,670	0,000000
6,0	4,673	0,821	0,670	0,670	0,000000
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					0,000190

Çizelge 4.10. %45 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında mebendazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Den. t <sub>R</sub>	γ aktiflik	Hes. log t <sub>R</sub>	Den. log t <sub>R</sub>	Δ(Den-hes.) <sup>2</sup>
2,5	2,621	0,913	0,421	0,419	0,000006
3,0	3,075	0,875	0,481	0,488	0,000051
3,5	3,350	0,843	0,530	0,525	0,000026
4,0	3,547	0,825	0,554	0,550	0,000019
4,5	3,605	0,818	0,563	0,557	0,000038
5,0	3,733	0,815	0,566	0,572	0,000037
5,5	3,704	0,814	0,567	0,569	0,000003
6,0	3,718	0,813	0,567	0,570	0,000009
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					0,000189

%35, %40 ve %45 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında mebendazolün alıkonma davranışı pH 2,50-6,00 arasında incelenmiştir. Çizelgeler incelendiğinde deneysel alıkonma değerlerinin logaritmasıyla hesaplanan alıkonma değerlerinin logaritmasının birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Bu uyum farkların karelerinin toplamının küçük olmasında da anlaşılmaktadır. Uyumu gösteren grafikler, Şekil 4.5’de verilmiştir. Çizelgelerde

çalışılan ortam ve pH değerleri için hesaplanan  $\gamma$  aktiflik katsayısı da hesaplamaya dâhil edilmiş ve termodinamik  $pK_a$  değerleri hesaplanmıştır.

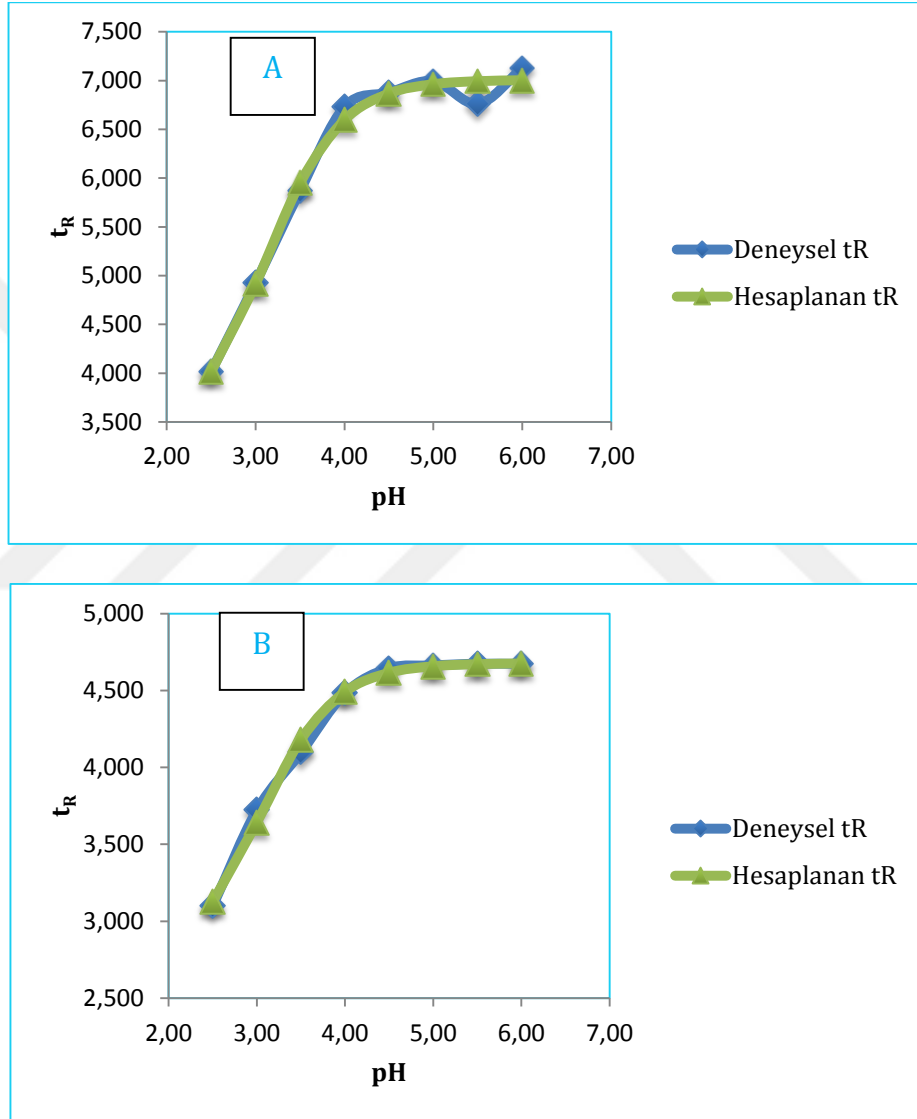


Şekil 4.5. A) %35 (v/v) B) %40 (v/v) C) %45 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında mebezazolün deneysel ve hesaplanan  $\log t_R$  ilişkisini gösteren grafikler

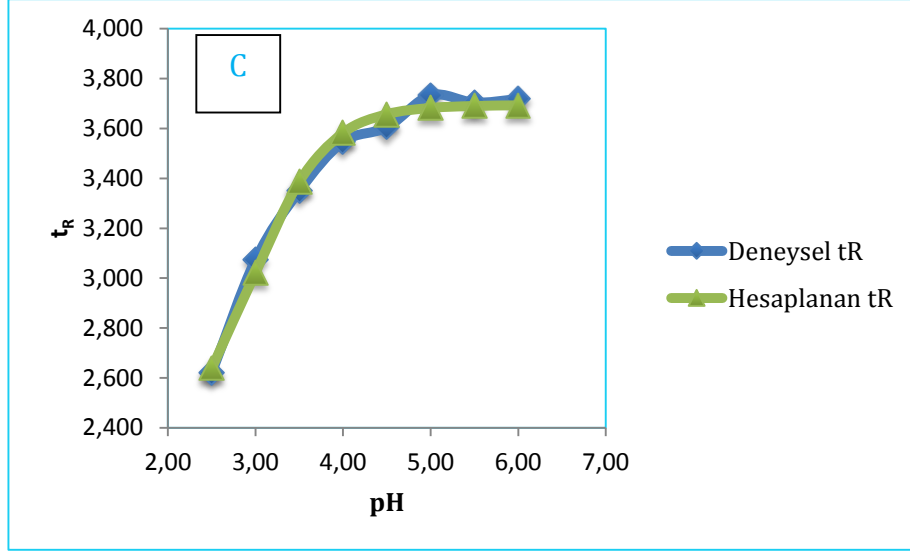
Hesaplanan  $\log t_R$  değerleri, deneysel  $\log t_R$  değerlerine karşılık grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim değerinin 1 ya da 1'e, kesim değerinin sıfıra



yakın olması x ve y eksenlerindeki değerlerin birbiriyle uyumlu olduğunu ifade etmektedir. Korelasyon katsayısı (r) değeri de bu uyumu göstermektedir. Excel'in Solver algoritmasının kullanıldığı yaklaşımda, bileşiğin pH değerine karşılık alıkonma zamanları grafiğe geçirildiğinde deneysel ve hesaplanan  $t_R$  değerlerinin birbiriyle uyumlu olduğu anlaşılmış ve sigmoidal bir ilişki gözlemlenmiştir (Şekil 4.6).



Şekil 4.6. A) %35 (v/v) B) %40 (v/v) C) %45 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında mebendazolün pH-alıkonma zamanı ilişkisi



Şekil 4.6. A) %35 (v/v) B) %40 (v/v) C) %45 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında mebendazolün pH-alıkonma zamanı ilişkisi (Devam)

#### 4.2.4. Tiyabendazol için elde edilen sıvı kromatografik veriler

Tiyabendazol için %15, %20, %25 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında ters faz sıvı kromatografik yöntemle deneysel olarak 25°C'de elde edilen alıkonma değerleri ( $t_R$ ), Çizelge 4.11, Çizelge 4.12 ve Çizelge 4.13'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. %15 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında tiyabendazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Den. $t_R$	$\gamma$ aktiflik	Hes. $\log t_R$	Den. $\log t_R$	$\Delta(\text{Den-hes.})^2$
2,5	6,390	0,886	0,805	0,806	0,000000
3,0	7,497	0,866	0,881	0,875	0,000035
3,5	11,418	0,856	1,045	1,058	0,000162
4,0	18,898	0,853	1,286	1,276	0,000101
4,5	32,546	0,852	1,509	1,512	0,000011
5,0	43,697	0,851	1,640	1,640	0,000000
5,5	49,117	0,850	1,695	1,691	0,000015
6,0	51,248	0,848	1,714	1,710	0,000023
6,5	52,981	0,842	1,721	1,724	0,000011
7,0	53,400	0,829	1,723	1,728	0,000022
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					<b>0,000380</b>

Çizelge 4.12. %20 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında tiyabendazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri

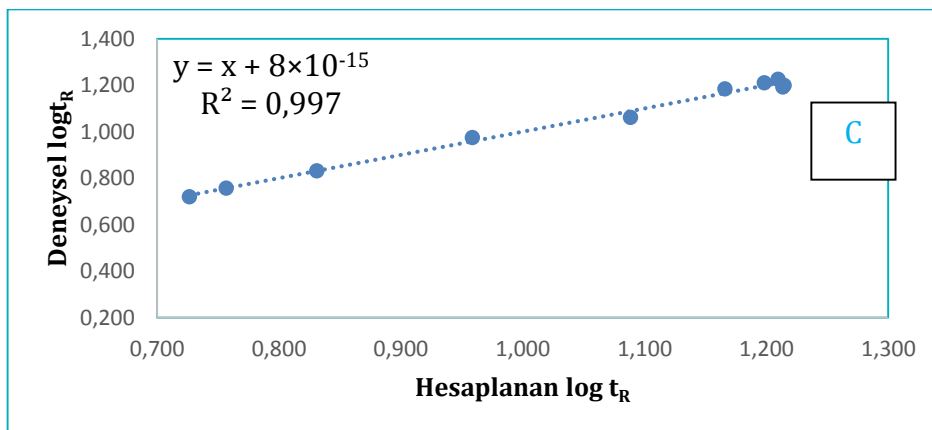
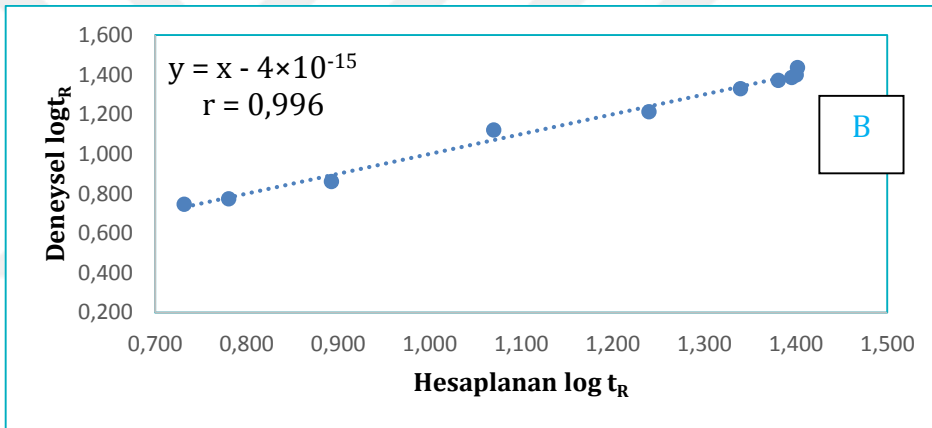
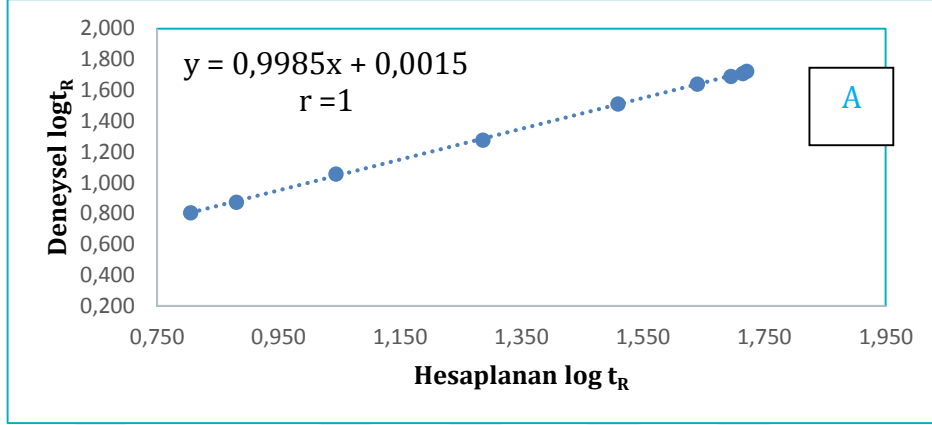
pH	Den. t <sub>R</sub>	γ aktiflik	Hes. log <sub>t<sub>R</sub></sub>	Den. log <sub>t<sub>R</sub></sub>	Δ(Den-hes.) <sup>2</sup>
2,5	5,563	0,889	0,732	0,745	0,000176
3,0	5,941	0,866	0,781	0,774	0,000045
3,5	7,259	0,854	0,893	0,861	0,001019
4,0	13,200	0,849	1,070	1,121	0,002541
5,0	16,340	0,847	1,240	1,213	0,000708
5,0	21,353	0,847	1,340	1,329	0,000102
5,5	23,528	0,846	1,381	1,372	0,000091
6,0	24,322	0,844	1,396	1,386	0,000093
6,5	25,000	0,840	1,400	1,398	0,000006
7,0	27,241	0,828	1,402	1,435	0,001108
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					<b>0,005888</b>

Çizelge 4.13. %25 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında tiyabendazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Den. t <sub>R</sub>	γ aktiflik	Hes. log <sub>t<sub>R</sub></sub>	Den. log <sub>t<sub>R</sub></sub>	Δ(Den-hes.) <sup>2</sup>
2,5	5,248	0,894	0,727	0,720	0,000044
3,0	5,731	0,867	0,757	0,758	0,000002
3,5	6,794	0,851	0,831	0,832	0,000001
4,0	9,439	0,845	0,959	0,975	0,000263
5,0	11,560	0,843	1,088	1,063	0,000651
5,0	15,290	0,842	1,166	1,184	0,000335
5,5	16,274	0,841	1,198	1,211	0,000171
6,0	16,864	0,840	1,210	1,227	0,000298
6,5	15,586	0,836	1,213	1,193	0,000426
7,0	15,841	0,827	1,215	1,200	0,000218
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					<b>0,002411</b>

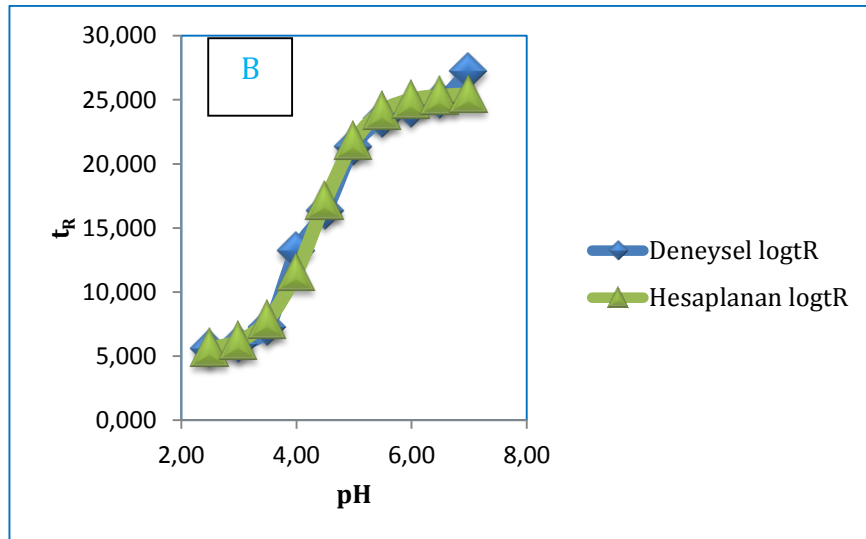
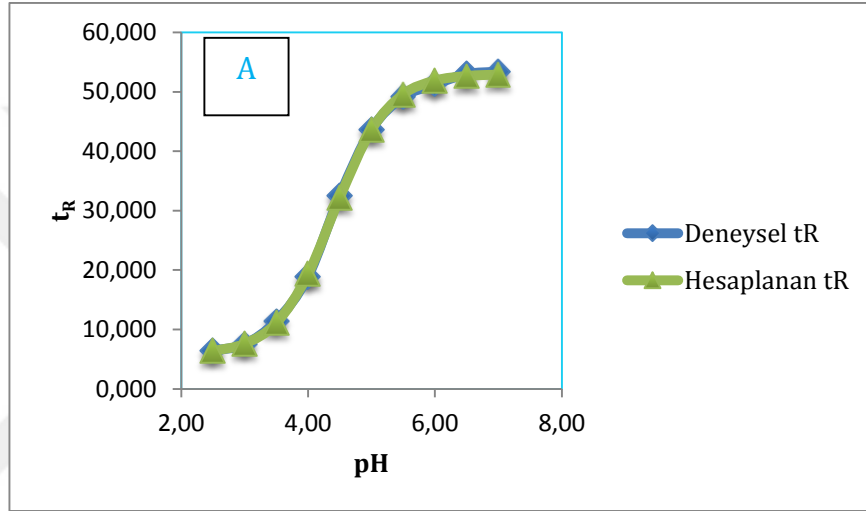
%15, %20 ve %25 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında tiyabendazolün alıkonma davranışı pH 2,50-7,00 arasında incelenmiştir. Çizelgeler incelendiğinde deneysel alıkonma değerlerinin logaritmasıyla hesaplanan alıkonma değerlerinin logaritmasının birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Bu uyum farkların karelerinin toplamının küçük olmasında da

anlaşılmaktadır. Uyumu gösteren grafikler, Şekil 4.7’de verilmiştir. Çizelgelerde çalışılan ortam ve pH değerleri için hesaplanan  $\gamma$  aktiflik katsayısı da hesaplamaya dâhil edilmiş ve termodinamik  $pK_a$  değerleri hesaplanmıştır.

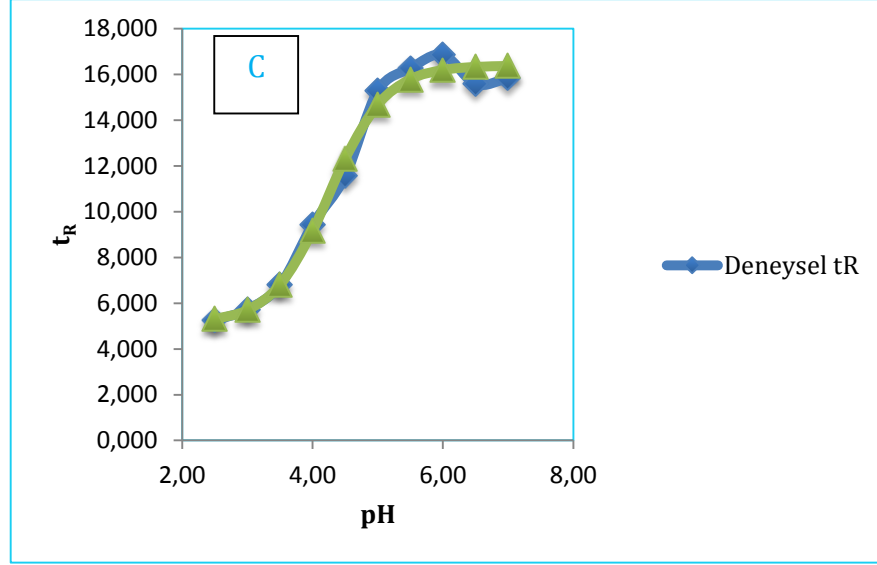


Şekil 4.7. A) %15 (v/v) B) %20 (v/v) C) %25 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında tiyabendazolün deneysel ve hesaplanan  $\log t_R$  ilişkisini gösteren grafikler

Hesaplanan  $\log t_R$  değerleri, deneysel  $\log t_R$  değerlerine karşılık grafiğe geğirildiğinde elde edilen eğim değerinin 1 ya da 1'e, kesim değerinin sıfıra yakın olması x ve y eksenlerindeki değerlerin birbiriyle uyumlu olduğunu ifade etmektedir. Korelasyon katsayısı (r) değeri de bu uyumu göstermektedir. Excel'in Solver algoritmasının kullanıldığı yaklaşımda, bileşiğin pH değerine karşılık alıkonma zamanları grafiğe geğirildiğinde deneysel ve hesaplanan  $t_R$  değerlerinin birbiriyle uyumlu olduğu anlaşılmış ve sigmoidal bir ilişki gözlemlenmiştir (şekil 4.8).



şekil 4.8. A) %15 (v/v) B) %20 (v/v) C) %25 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında tiyabendazolün pH-alıkonma zamanı ilişkisi



Şekil 4.8. A) %15 (v/v) B) %20 (v/v) C) %25 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında tiyabendazolün pH-alıkonma zamanı ilişkisi (Devam)

#### 4.2.5. Klotrimazol için elde edilen sıvı kromatografik veriler

Klotrimazol için %35, %40, %45 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında ters faz sıvı kromatografik yöntemle deneysel olarak 25°C'de elde edilen alıkonma değerleri (t<sub>R</sub>), Çizelge 4.14, Çizelge 4.15 ve Çizelge 4.16'da verilmiştir.

Çizelge 4.14. A) %15 (v/v) B) %20 (v/v) C) %25 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında klotrimazolün pH-alıkonma zamanı ilişkisi

pH	Den. t <sub>R</sub>	γ aktiflik	Hes. log t <sub>R</sub>	Den. log t <sub>R</sub>	Δ(Den-hes.) <sup>2</sup>
2,5	10,859	0,906	1,026	1,036	0,000087
3,0	10,950	0,872	1,042	1,039	0,000005
3,5	11,496	0,847	1,087	1,061	0,000696
4,0	16,514	0,836	1,200	1,218	0,000309
4,5	26,441	0,831	1,410	1,422	0,000162
5,0	45,983	0,830	1,663	1,663	0,000000
5,5	67115	0,829	1,857	1,827	0,000886
6,0	91,066	0,828	1,956	1,959	0,000015

Çizelge 4.14. A) %15 (v/v) B) %20 (v/v) C) %25 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında klotrimazolün pH-alıkonma zamanı ilişkisi (Devam)

6,5	97,757	0,826	1,994	1,990	0,000015
7,0	100,831	0,820	2,007	2,004	0,000012
7,5	108,037	0,806	2,011	2,034	0,000498
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					0,002684

Çizelge 4.15. %40 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında klotrimazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Den. t <sub>R</sub>	$\gamma$ aktiflik	Hes. log t <sub>R</sub>	Den. log t <sub>R</sub>	$\Delta(\text{Den-hes.})^2$
2,5	4,916	0,910	0,716	0,692	0,000605
3,0	5,532	0,874	0,730	0,743	0,000169
3,5	5,940	0,845	0,771	0,774	0,000010
4,0	7,702	0,830	0,874	0,887	0,000156
4,5	11,851	0,825	1,067	1,074	0,000047
5,0	19,326	0,823	1,299	1,286	0,000177
5,5	29,442	0,822	1,474	1,469	0,000029
6,0	36,239	0,821	1,562	1,559	0,000006
6,5	39,000	0,819	1,595	1,591	0,000015
7,0	41,391	0,814	1,606	1,617	0,000113
7,5	41,066	0,801	1,610	1,613	0,000013
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					0,001340

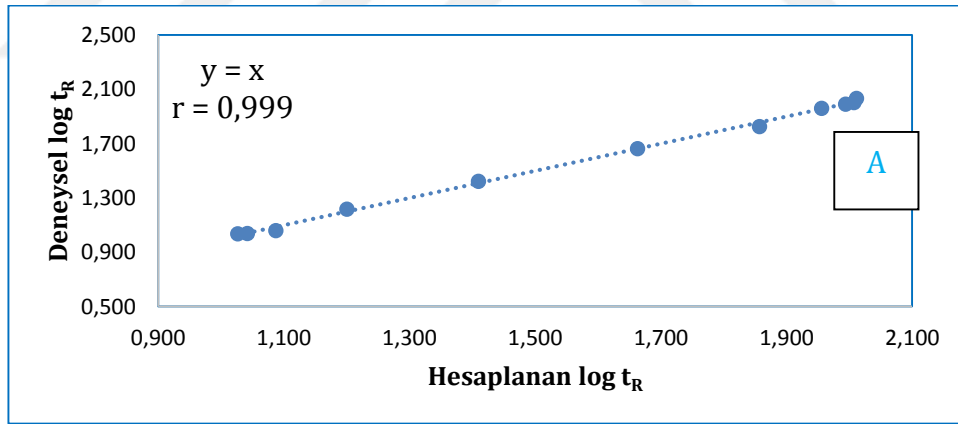
Çizelge 4.16. %45 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında klotrimazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Den. t <sub>R</sub>	$\gamma$ aktiflik	Hes. log t <sub>R</sub>	Den. log t <sub>R</sub>	$\Delta(\text{Den-hes.})^2$
2,5	3,688	0,913	0,585	0,567	0,000337
3,0	4,153	0,875	0,596	0,618	0,000499
3,5	4,255	0,843	0,629	0,629	0,000000
4,0	5,226	0,825	0,716	0,718	0,000006
4,5	7,353	0,818	0,883	0,866	0,000263
5,0	12,600	0,815	1,089	1,100	0,000127
5,5	17,765	0,814	1,244	1,250	0,000028

Çizelge 4.16. %45 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında klotrimazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri (Devam)

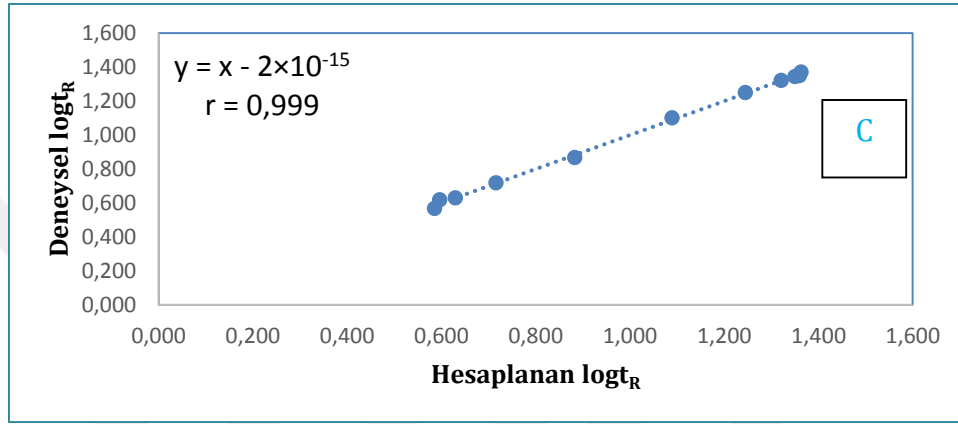
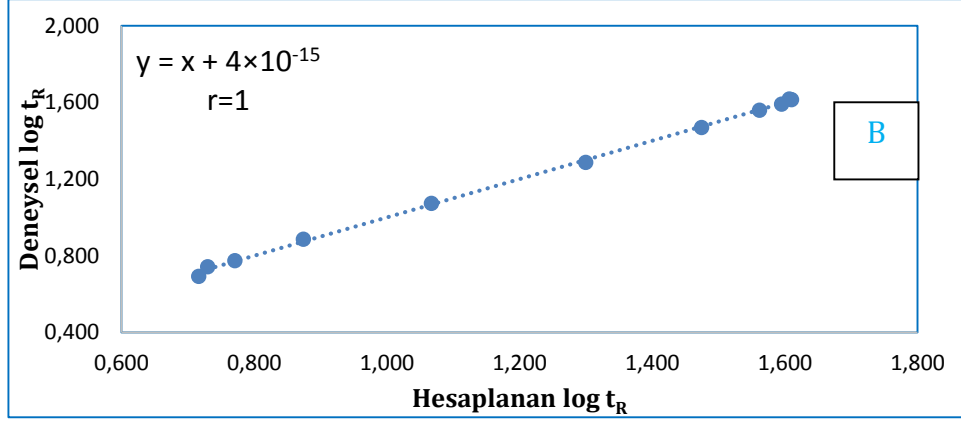
6,0	20,956	0,813	1,321	1,321	0,000000
6,5	22,073	0,812	1,350	1,344	0,000034
7,0	22,408	0,807	1,359	1,350	0,000082
7,5	23,466	0,795	1,363	1,370	0,000061
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					0,001437

%35, %40 ve %45 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında klotrimazolün alıkonma davranışı pH 2,50-7,50 arasında incelenmiştir. Çizelgeler incelendiğinde deneysel alıkonma değerlerinin logaritmasıyla hesaplanan alıkonma değerlerinin logaritmasının birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Bu uyum farkların karelerinin toplamının küçük olmasında da anlaşılmaktadır. Uyumu gösteren grafikler, Şekil 4.9'da verilmiştir. Çizelgelerde çalışılan ortam ve pH değerleri için hesaplanan  $\gamma$  aktiflik katsayısı da hesaplama dâhil edilmiş ve termodinamik pK<sub>a</sub> değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 4.9. A) %35 (v/v) B) %40 (v/v) C) %45 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında klotrimazolün deneysel ve hesaplanan log t<sub>R</sub> ilişkisini gösteren grafikler

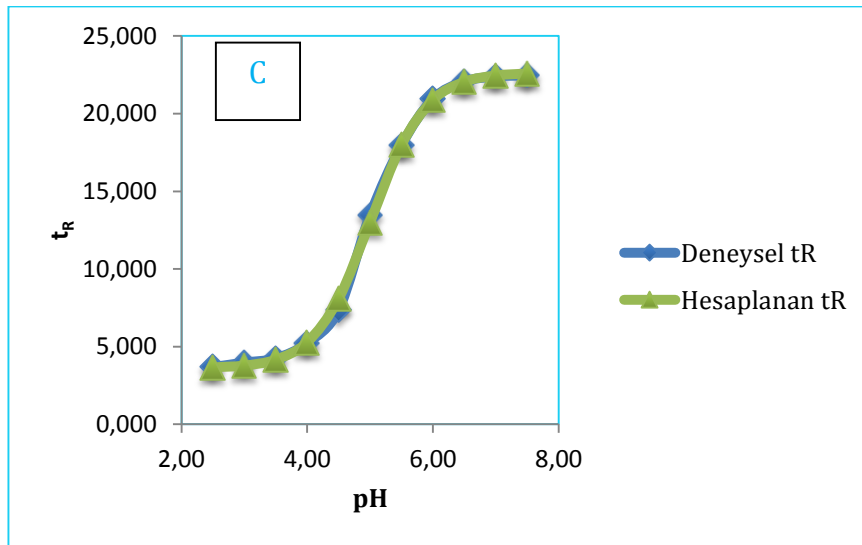
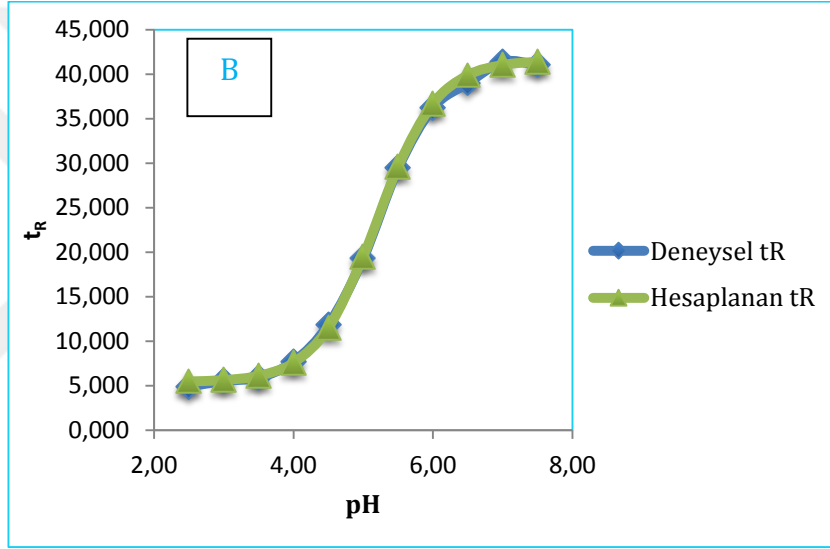
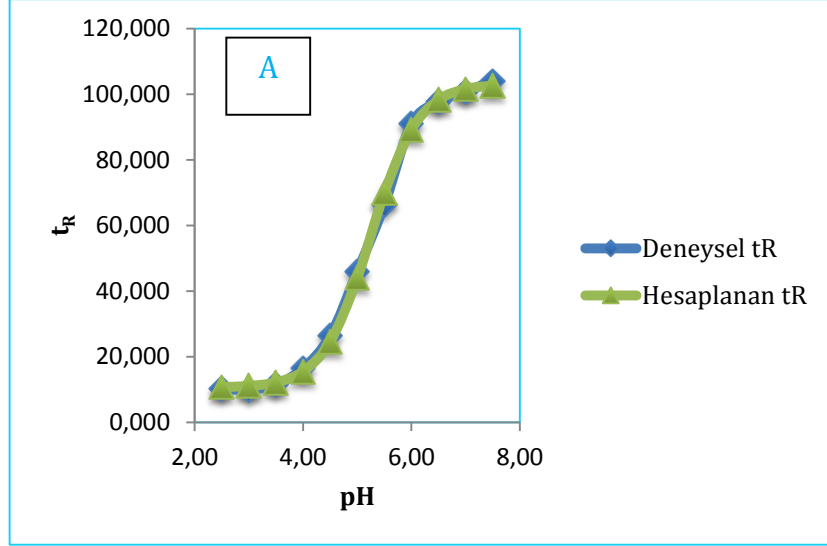




Şekil 4.9. A) %35 (v/v) B) %40 (v/v) C) %45 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında klotrimazolün deneysel ve hesaplanan  $\log t_R$  ilişkisini gösteren grafikler (Devam)

Hesaplanan  $\log t_R$  değerleri, deneysel  $\log t_R$  değerlerine karşılık grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim değerinin 1 ya da 1'e, kesim değerinin sıfıra yakın olması x ve y eksenlerindeki değerlerin birbiriyle uyumlu olduğunu ifade etmektedir. Korelasyon katsayısı (r) değeri de bu uyumu göstermektedir.

Excel'in Solver algoritmasının kullanıldığı yaklaşımda, bileşiğin pH değerine karşılık alıkonma zamanları grafiğe geçirildiğinde deneysel ve hesaplanan  $t_R$  değerlerinin birbiriyle uyumlu olduğu anlaşılmış ve sigmoidal bir ilişki gözlemlenmiştir (Şekil 4.10).



Şekil 4.10. A) %35 (v/v) B) %40 (v/v) C) %45 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında klotrimazolün pH-alıkonma zamanı ilişkisi

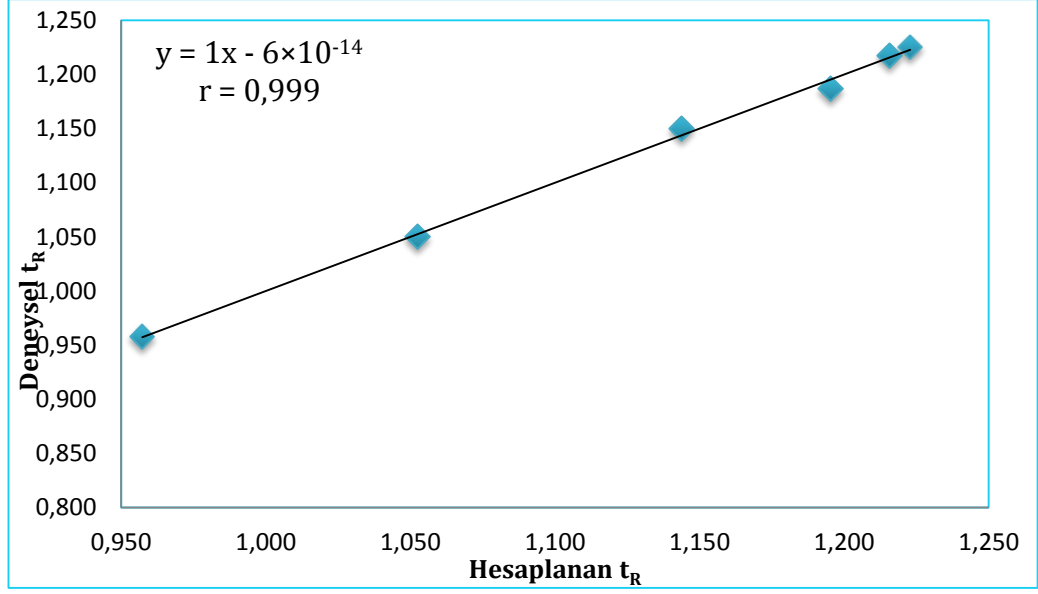
#### 4.2.6. Metimazol (Tiyamazol) için elde edilen sıvı kromatografik veriler

Metimazol için %100 su ortamında, ters faz sıvı kromatografik yöntemle deneysel olarak 25°C'de elde edilen alıkonma değerleri ( $t_R$ ), Çizelge 4.17'de verilmiştir.

Çizelge 4.17. %100 su ortamında metimazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri

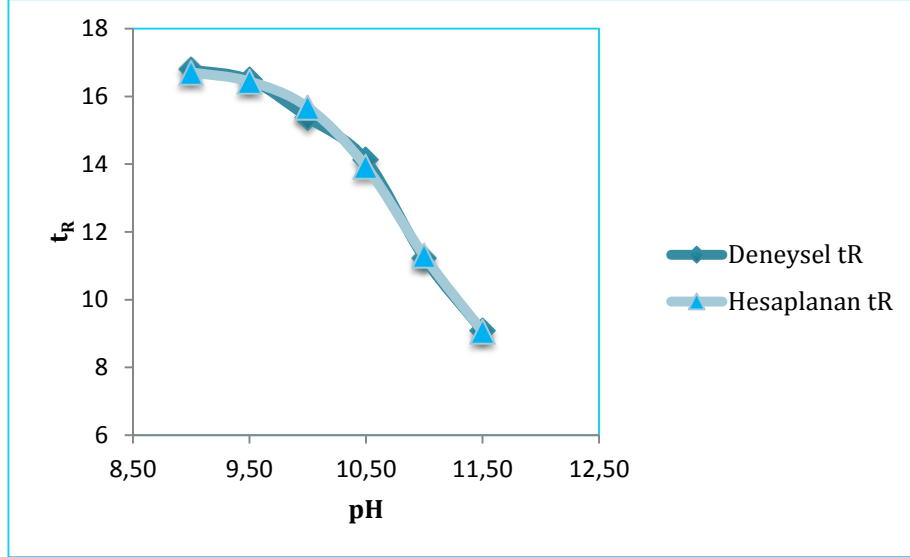
pH	Den. $t_R$	$\gamma$ aktiflik	Hes. $\log t_R$	Den. $\log t_R$	$\Delta(\text{Den-hes.})^2$
9,00	16,800	0,797	1,223	1,225	0,000006
9,50	16,497	0,796	1,216	1,217	0,000003
10,00	15,378	0,796	1,195	1,187	0,000070
10,50	14,133	0,795	1,144	1,150	0,000040
11,00	11,221	0,793	1,053	1,050	0,000006
11,50	9,076	0,787	0,957	0,958	0,000000
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					<b>0,000125</b>

%100 su ortamında metimazolün alıkonma davranışı pH 9,00-11,50 arasında incelenmiştir. Çizelgeler incelendiğinde deneysel alıkonma değerlerinin logaritmasıyla hesaplanan alıkonma değerlerinin logaritmasının birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Bu uyum farkların karelerinin toplamının küçük olmasında da anlaşılmaktadır. Uyumu gösteren grafikler, Şekil 4.11'de verilmiştir. Çizelgelerde çalışılan ortam ve pH değerleri için hesaplanan  $\gamma$  aktiflik katsayısı da hesaplama dâhil edilmiş ve termodinamik  $pK_a$  değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 4.11. %100 su ortamında metimazolün deneysel ve hesaplanan  $\log t_R$  ilişkisini gösteren grafikler

Hesaplanan  $\log t_R$  değerleri, deneysel  $\log t_R$  değerlerine karşılık grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim değerinin 1 ya da 1'e, kesim değerinin sıfıra yakın olması x ve y eksenlerindeki değerlerin birbiriyle uyumlu olduğunu ifade etmektedir. Korelasyon katsayısı (r) değeri de bu uyumu göstermektedir. Excel'in Solver algoritmasının kullanıldığı yaklaşımda, bileşiğin pH değerine karşılık alıkonma zamanları grafiğe geçirildiğinde deneysel ve hesaplanan  $t_R$  değerlerinin birbiriyle uyumlu olduğu anlaşılmış ve sigmoidal bir ilişki gözlemlenmiştir (Şekil 4.12).



Şekil 4.12. %100 su ortamında metimazolün deneysel ve hesaplanan  $\log t_R$  ilişkisini gösteren grafikler

#### 4.2.7. Metronidazol için elde edilen sıvı kromatografik veriler

Metronidazol için %15, %20, %25 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında ters faz sıvı kromatografik yöntemle deneysel olarak 25°C'de elde edilen alıkonma değerleri ( $t_R$ ), Çizelge 4.18, Çizelge 4.19 ve Çizelge 4.20'de verilmiştir.

Çizelge 4.18. %100 su ortamında metimazolün deneysel ve hesaplanan  $\log t_R$  ilişkisini gösteren grafikler

pH	Den. $t_R$	$\gamma$ aktiflik	Hes. $\log t_R$	Den. $\log t_R$	$\Delta(\text{Den-hes.})^2$
1,83	4,833	0,878	0,683	0,684	0,000001
2,00	4,883	0,863	0,693	0,689	0,000018
2,20	5,205	0,845	0,709	0,716	0,000059
2,40	5,371	0,829	0,730	0,730	0,000000
2,50	5,4	0,821	0,742	0,732	0,000092
2,75	6,011	0,806	0,776	0,779	0,000009
3,00	6,392	0,795	0,811	0,806	0,000024
3,25	7,184	0,787	0,840	0,856	0,000253
3,50	7,221	0,783	0,863	0,859	0,000019

Çizelge 4.18. %100 su ortamında metimazolün deneysel ve hesaplanan  $\log_{TR}$  ilişkisini gösteren grafikler (Devam)

3,75	7,566	0,780	0,878	0,879	0,000001
4,00	7,667	0,779	0,888	0,885	0,000010
4,50	7,689	0,777	0,897	0,886	0,000121
5,00	8,100	0,776	0,900	0,908	0,000074
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					<b>0,000679</b>

Çizelge 4.19. %20 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında metronidazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Den. tr	$\gamma$ aktiflik	Hes. $\log_{TR}$	Den. $\log_{TR}$	$\Delta(\text{Den-hes.})^2$
1,89	4,980	0,885	0,700	0,697	0,000005
1,94	5,093	0,880	0,701	0,707	0,000030
2,25	5,101	0,853	0,717	0,708	0,000082
2,50	5,476	0,831	0,735	0,738	0,000011
2,75	5,873	0,814	0,758	0,769	0,000115
3,00	6,026	0,801	0,782	0,780	0,000005
3,25	6,300	0,792	0,804	0,799	0,000019
3,50	6,524	0,786	0,820	0,815	0,000031
3,75	6,657	0,782	0,831	0,823	0,000065
4,00	6,900	0,780	0,838	0,839	0,000000
4,50	7,083	0,778	0,845	0,850	0,000024
5,00	7,152	0,777	0,848	0,854	0,000046
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					<b>0,000432</b>

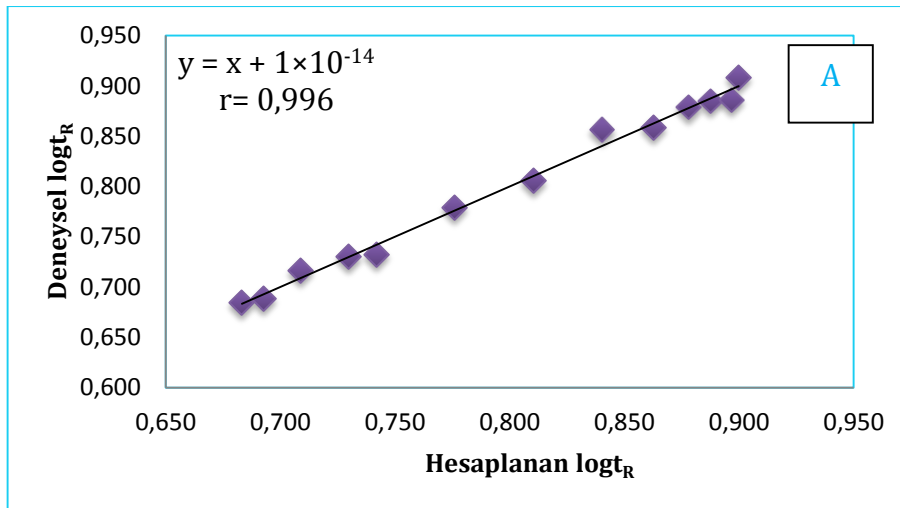
Çizelge 4.20. %25 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında metronidazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri

pH	Den. tr	$\gamma$ aktiflik	Hes. $\log_{TR}$	Den. $\log_{TR}$	$\Delta(\text{Den-hes.})^2$
1,89	4,570	0,894	0,653	0,660	0,000051
2,00	4,568	0,884	0,657	0,660	0,000008
2,25	4,666	0,861	0,670	0,669	0,000001
2,50	4,84	0,838	0,689	0,685	0,000015
2,75	5,154	0,818	0,712	0,712	0,000000
3,00	5,200	0,801	0,736	0,716	0,000413

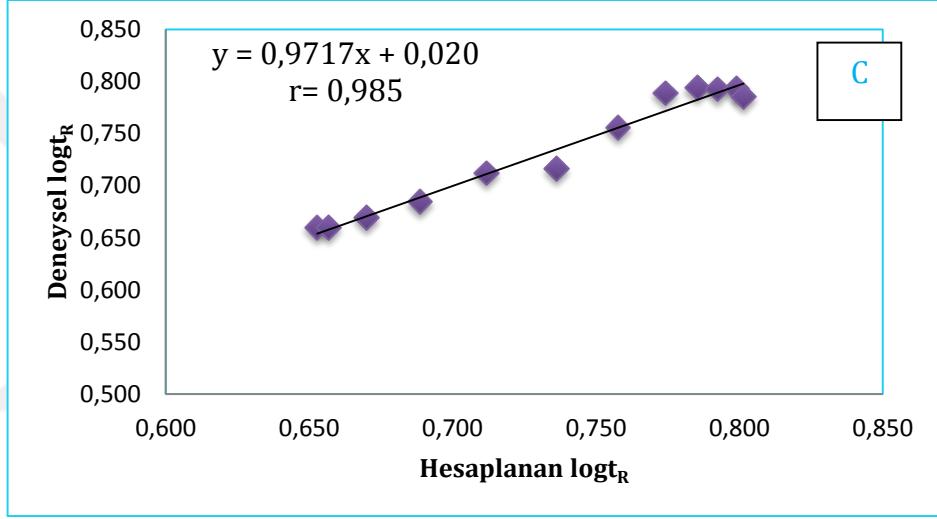
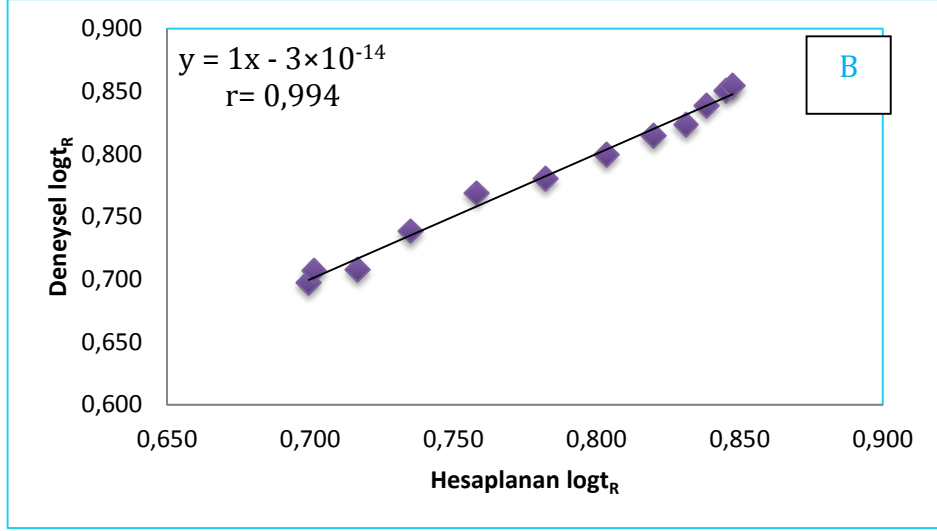
Çizelge 4.20. %25 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında metronidazol için deneysel olarak belirlenen ve hesaplanan alıkonma değerleri (Devam)

3,25	5,700	0,790	0,758	0,756	0,000004
3,50	6,150	0,782	0,774	0,789	0,000215
3,75	6,218	0,777	0,785	0,794	0,000068
4,00	6,202	0,774	0,792	0,793	0,000000
4,50	6,215	0,772	0,799	0,793	0,000033
5,00	6,100	0,771	0,801	0,785	0,000259
<b>Farkların Kareleri Toplamı</b>					<b>0,001067</b>

%15, %20 ve %25 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında metronidazolün alıkonma davranışı pH 1,83-5,00 arasında incelenmiştir. Çizelgeler incelendiğinde deneysel alıkonma değerlerinin logaritmasıyla hesaplanan alıkonma değerlerinin logaritmasının birbiri ile uyumlu olduğu görülmektedir. Bu uyum farkların karelerinin toplamının küçük olmasında da anlaşılmaktadır. Uyumu gösteren grafikler, Şekil 4.13'de verilmiştir. Çizelgelerde çalışılan ortam ve pH değerleri için hesaplanan  $\gamma$  aktiflik katsayısı da hesaplamaya dâhil edilmiş ve termodinamik pK<sub>a</sub> değerleri hesaplanmıştır.



Şekil 4.13. A) %15 (v/v) B) %20 (v/v) C) %25 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında metronidazolün deneysel ve hesaplanan logt<sub>R</sub> ilişkisini gösteren grafikler

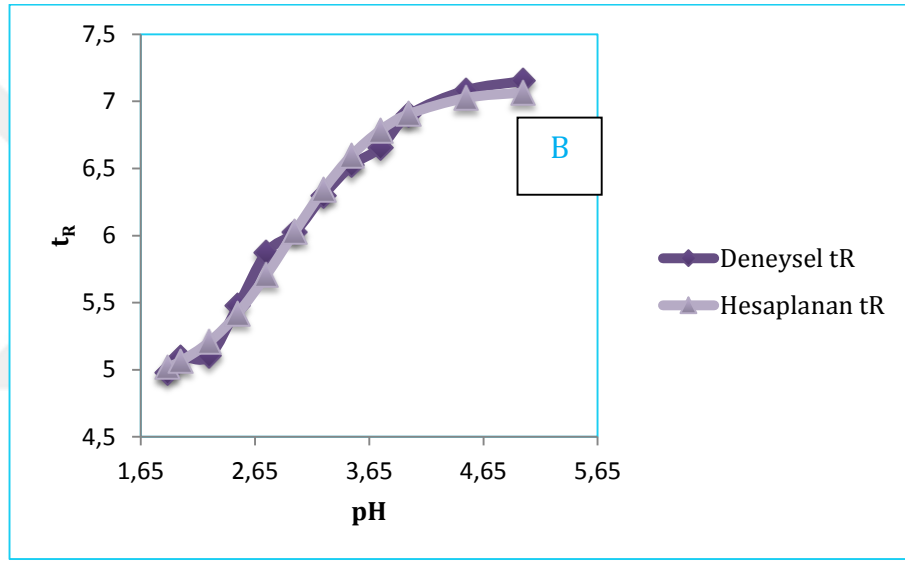
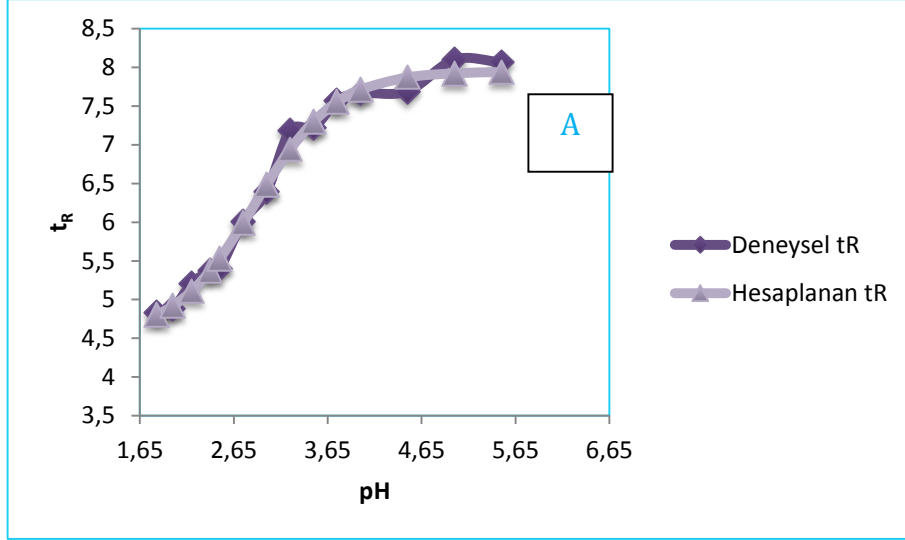


Şekil 4.13. A) %15 (v/v) B) %20 (v/v) C) %25 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında metronidazolün deneysel ve hesaplanan  $\log t_R$  ilişkisini gösteren grafikler (Devam)

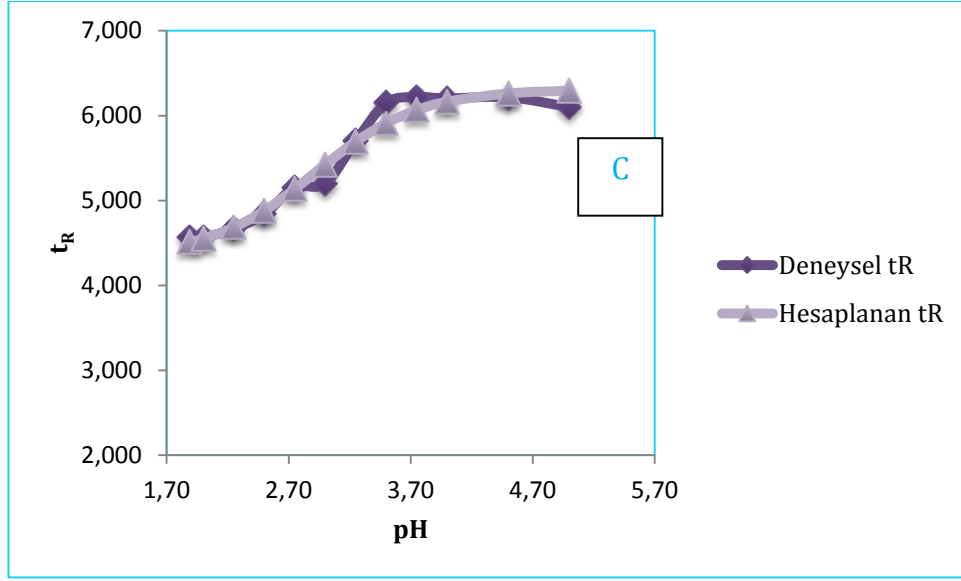
Hesaplanan  $\log t_R$  değerleri, deneysel  $\log t_R$  değerlerine karşılık grafiğe geçirildiğinde elde edilen eğim değerinin 1 ya da 1'e, kesim değerinin sıfıra yakın olması x ve y eksenlerindeki değerlerin birbiriyle uyumlu olduğunu ifade etmektedir. Korelasyon katsayısı (r) değeri de bu uyumu göstermektedir.

Excel'in Solver algoritmasının kullanıldığı yaklaşımda, bileşiğin pH değerine karşılık alıkonma zamanları grafiğe geçirildiğinde deneysel ve hesaplanan  $t_R$  değerlerinin birbiriyle uyumlu olduğu anlaşılmış ve sigmoidal bir ilişki gözlemlenmiştir (Şekil 4.14).





Şekil 4.14. A) %15 (v/v) B) %20 (v/v) C) %25 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında metronidazolün pH-alıkonma zamanı ilişkisi



Şekil 4.14. A) %15 (v/v) B) %20 (v/v) C) %25 (v/v) ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında metronidazolün pH-alıkonma zamanı ilişkisi (Devam)

### 4.3. Bileşiklerin Su Ortamındaki pK<sub>a</sub> Değerlerinin Hesaplanması

İyonlaşma reaksiyonlarında çözücünün dielektrik sabiti ( $\epsilon$ ) ve çözünen maddeyi çözme yeteneği çok önemlidir. Bu reaksiyonlarda su çoğu bileşik için yüksek çözme yeteneğine sahip (donör sayısı=33), dielektrik katsayısı 78 olan bir çözücüdür; saf su asiti iyonlarına ayırıştırıp oluşan anyonu ve hidrojen iyonunu kararlı halde tutabilme özelliğine sahiptir. Daha düşük donör sayısı (14) ve dielektrik sabitine (36) sahip olan asetonitrilin saf suya eklenip organik çözücü su karışımı elde edildiğinde; asitin anyonları ve proton ile etkileşim azalmakta ve asitin asit iyonlaşma sabiti düşmektedir (Ghasemi vd., 2003).

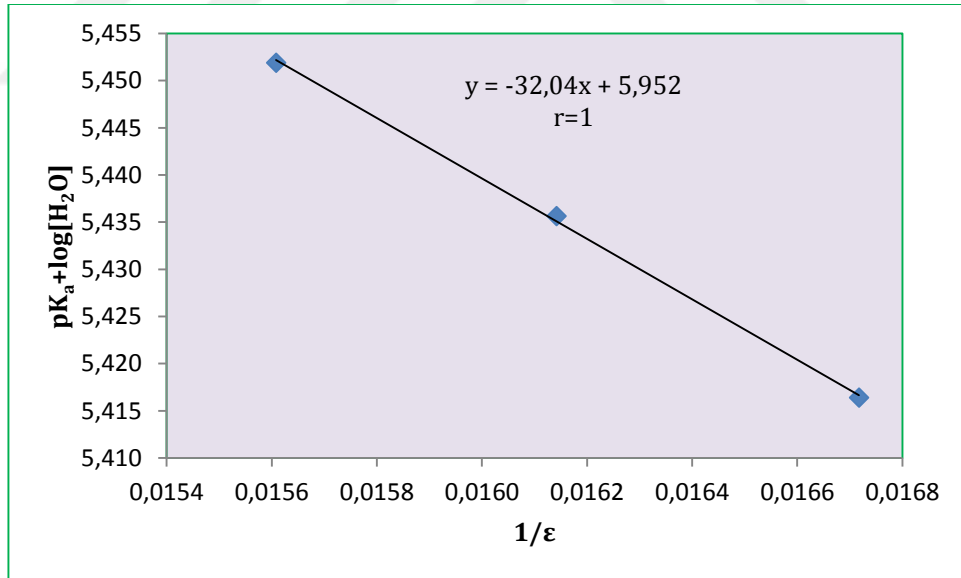
Rutin ilaç analizlerinde sudaki pK<sub>a</sub> değerinin bilinmesi önemli bir gereksinimdir. Fakat birçok ilaç suda çözünmez ve organik çözücü:su ikili karışımlarına ihtiyaç duyulur. Organik çözücü:su ikili karışımlarında deneysel olarak elde edilen pK<sub>a</sub> değerleri kullanılarak ekstrapolasyon yöntemiyle sudaki pK<sub>a</sub> değeri hesaplanır. Sudaki pK<sub>a</sub> ( ${}^w pK_a$ ) değerlerini hesaplamak için literatürde çok çeşitli ekstrapolasyon yöntemleri mevcuttur. Bu çalışmada Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemi ve mol kesri yöntemiyle sudaki pK<sub>a</sub> değerleri hesaplanmıştır (Ruiz vd., 2003).

#### 4.3.1. Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle sudaki pK<sub>a</sub> değerinin hesaplanması

Yasuda-Shedlovsky (YS) ekstrapolasyon yönteminde  $p_sK_a + \log[H_2O]$  değerleri  $1/\epsilon$ 'a karşı grafiğe geçirilerek doğrusal bir ilişki elde edilir (Takács-Novák vd., 1997).

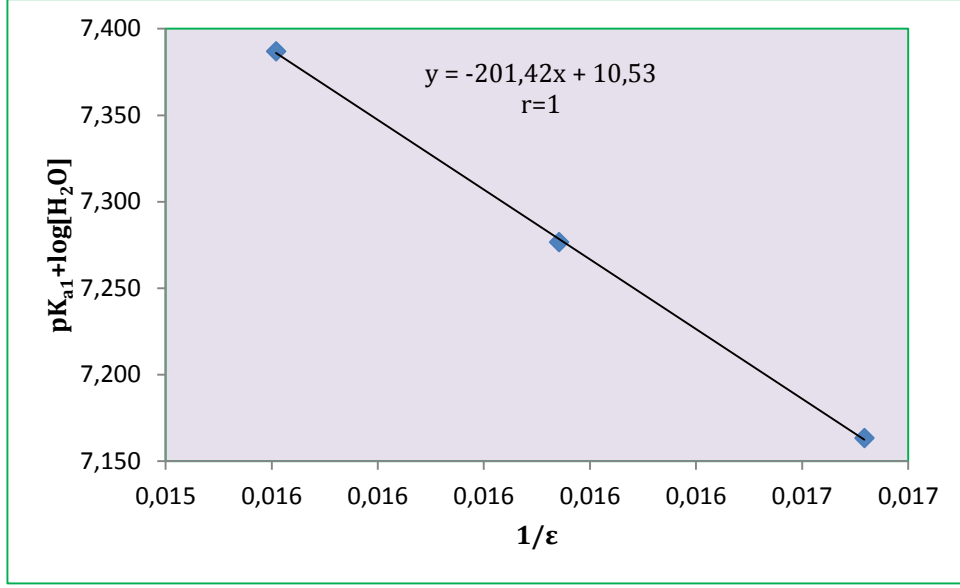
Tezde çalışılan altı bileşik ile Kinetex Coreshell C8 kolonda 25°C'de analiz gerçekleştirilmiştir. ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında elde edilen deneysel pK<sub>a</sub> değerleri kullanılarak Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemi ve mol kesri yöntemi ile sudaki pK<sub>a</sub> değerleri hesaplanmıştır.

Albendazol için üç farklı ACN-su ortamından elde edilen pK<sub>a</sub> değerleri kullanılarak Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen grafik, Şekil 4.15'de verilmiştir.

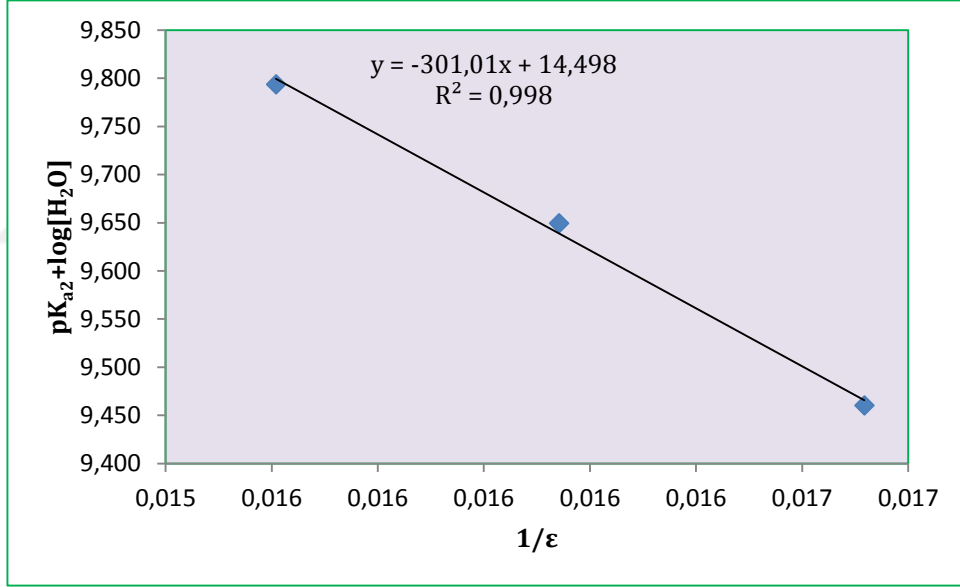


Şekil 4.15. Albendazol için YS ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen grafik

Astemizol için üç farklı ACN-su ortamından elde edilen pK<sub>a1</sub> değerleri kullanılarak Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen grafik, Şekil 4.16'da; pK<sub>a2</sub> değerleri kullanılarak elde edilen grafik, Şekil 4.17'de verilmiştir.

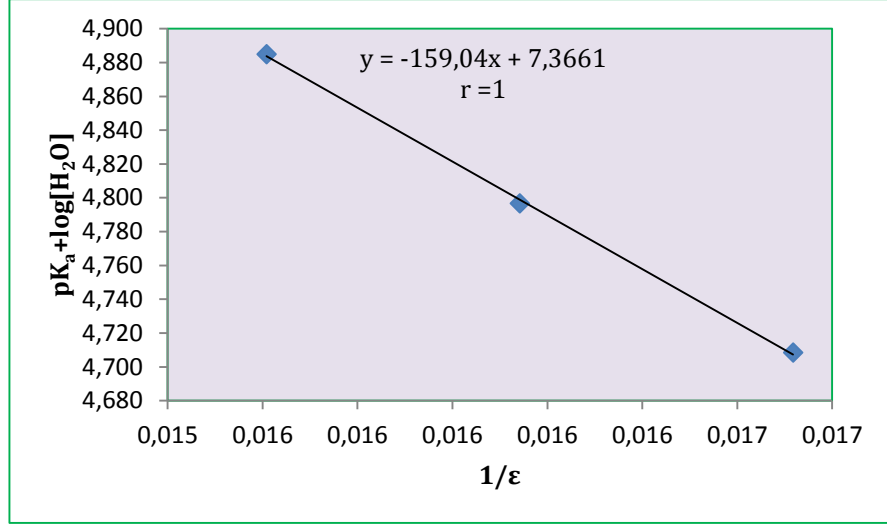


Şekil 4.16. Astemizolün  ${}^w pK_{asu1}$  değeri için YS ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen grafik

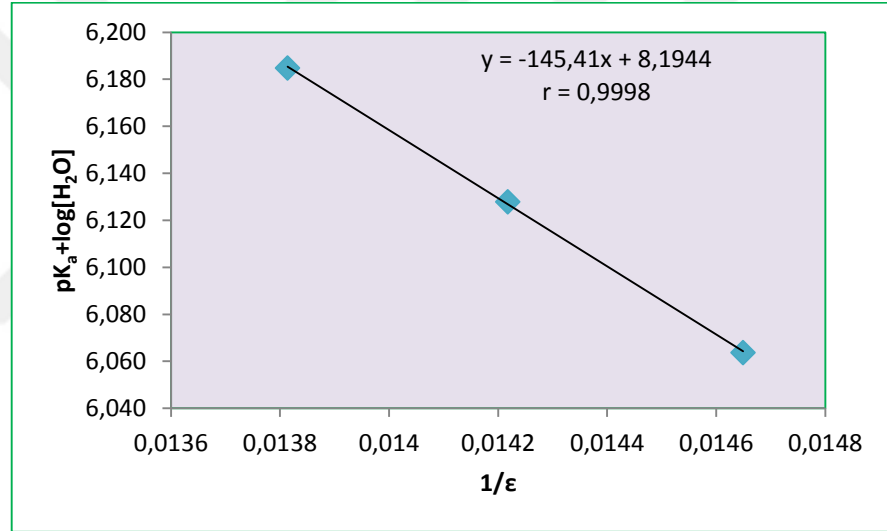


Şekil 4.17. Astemizolün  ${}^w pK_{asu2}$  değeri için YS ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen grafik

Mebendazol ve tiyabendazol için üç farklı ACN-su ortamından elde edilen  $pK_a$  değerleri kullanılarak Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen grafikler, sırasıyla Şekil 4.18 ve 4.19'da gösterilmiştir.

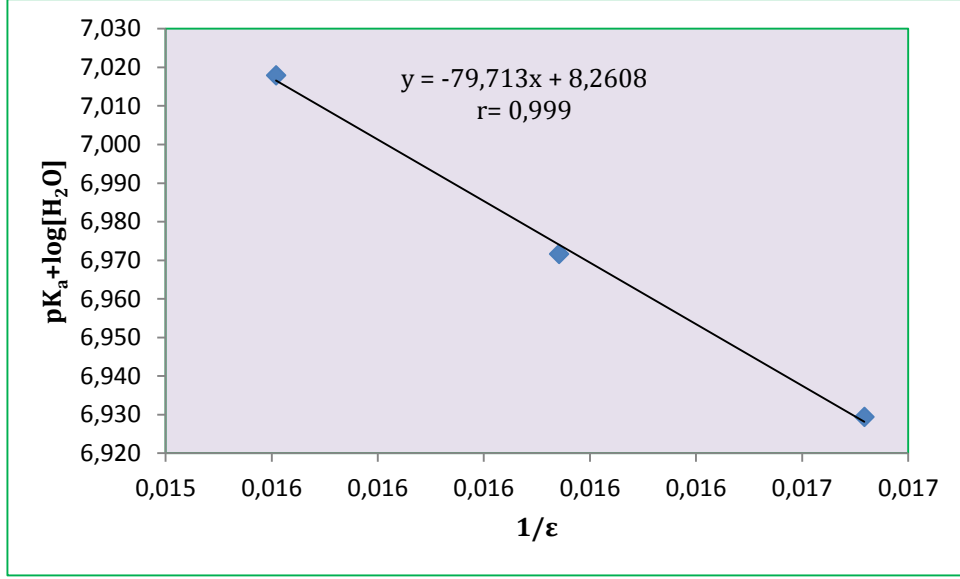


Şekil 4.18. Mebendazol için YS ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen grafik

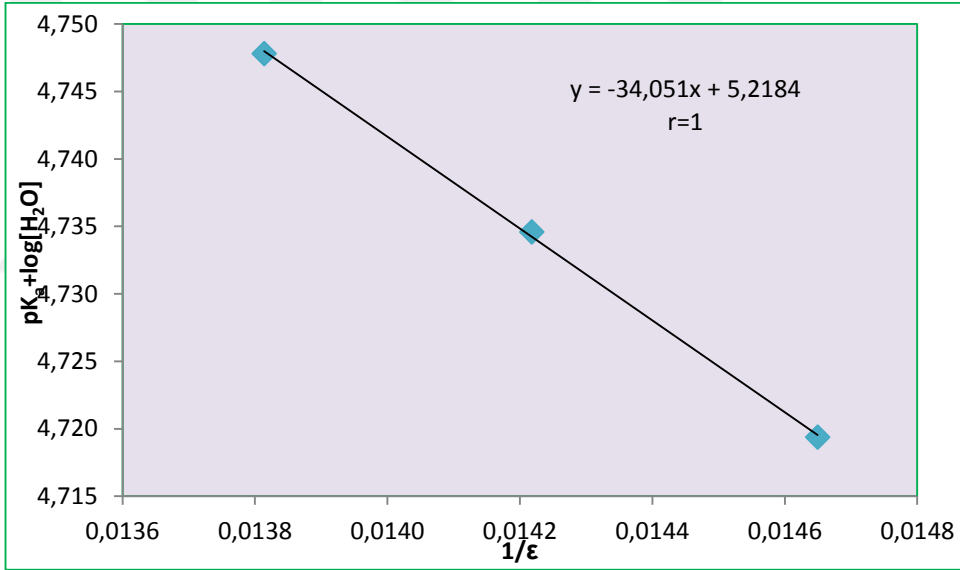


Şekil 4.19. Tiyabendazol için YS ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen grafik

Klotrimazol ve metronidazol için üç farklı ACN-su ortamından elde edilen  $pK_a$  değerleri kullanılarak Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen grafik, Şekil 4.20 ve 4.21'de gösterilmiştir.



Şekil 4.20. Klotrimazol için YS ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen grafik

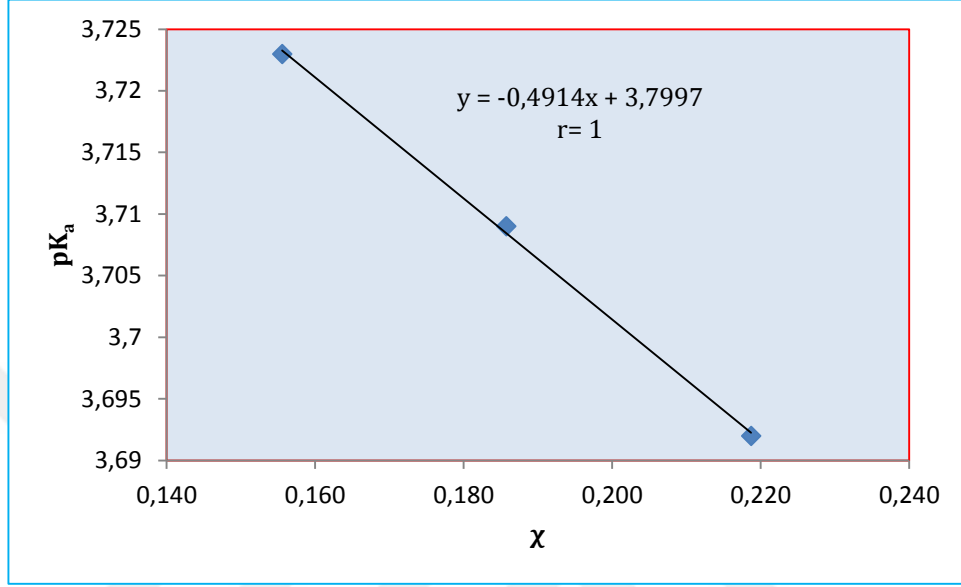


Şekil 4.21. Metronidazol için YS ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen grafik

#### 4.3.2. Mol kesri yöntemiyle sudaki pKa değerinin hesaplanması

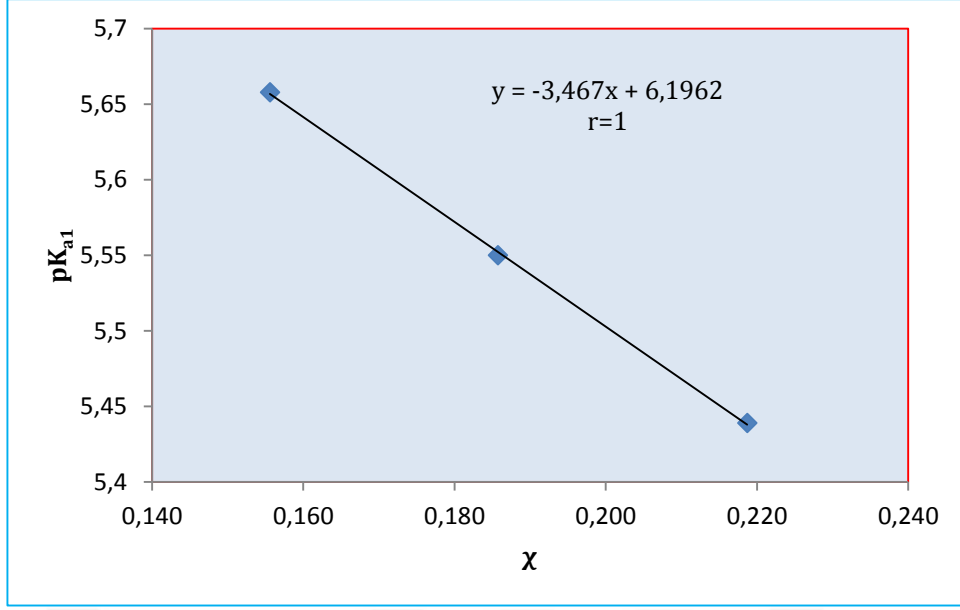
Metronidazol için çalışılan üç farklı ACN-su ortamından elde edilen pKa değerleri asetonitrilin mol kesrine karşı grafiğe geçirilerek mol kesri yöntemiyle sudaki pKa tayini yönteminde, elde edilen doğru denkleminde, doğrunun kesim noktası bileşiğin sudaki pKa değerini vermektedir.

Albendazol için çalışılan üç farklı ACN-su ortamından elde edilen  $pK_a$  değerleri asetonitrilin mol kesri değerine karşı grafiğe geçirilmiş ve elde edilen doğru denkleminde, doğrunun kesim noktası ile bileşiğin sudaki  $pK_a$  değeri hesaplanmıştır. Bu yöntemle elde edilen grafik aşağıda verilmiştir (Şekil 4.22).

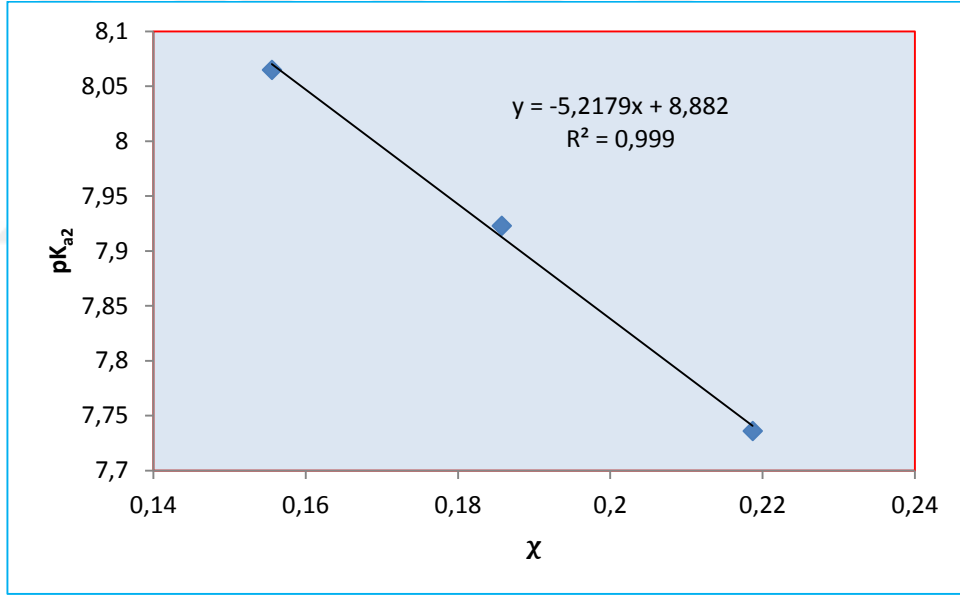


Şekil 4.22. Albendazol için  $\chi_{ACN}$ - $pK_a$  grafiği

Astemizol için çalışılan üç farklı ACN-su ortamından elde edilen  $pK_a$  değerleri asetonitrilin mol kesri değerlerine karşı grafiğe geçirilmiş ve elde edilen doğru denkleminde, doğrunun kesim noktası ile bileşiğin sudaki  $pK_{a1}$  ve  $pK_{a2}$  değerleri hesaplanmıştır. Bu yöntemle elde edilen grafikler aşağıda verilmiştir (Şekil 4.23, Şekil 4.24).



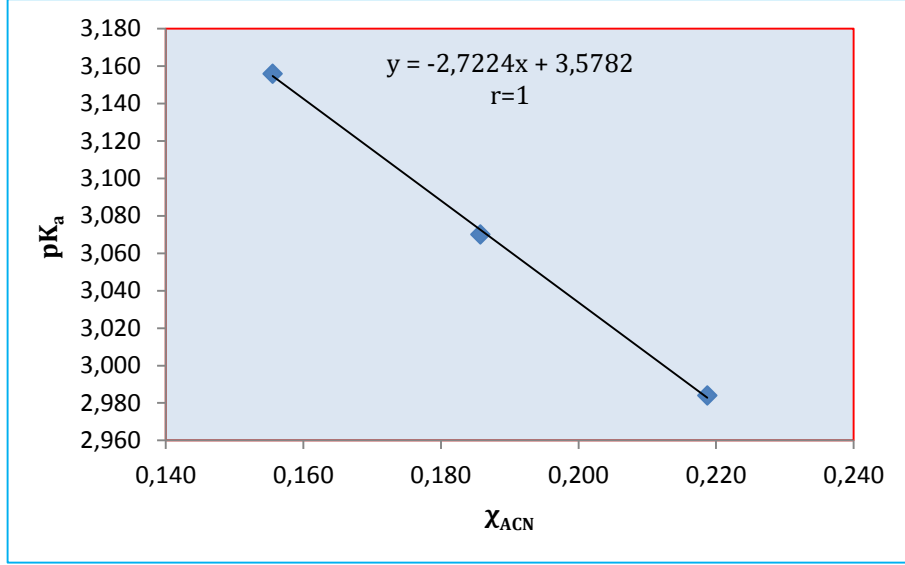
Şekil 4.23. Astemizolün su ortamındaki  $pK_{a1}$  değeri için  $\chi_{ACN}$ - $pK_a$  grafiği



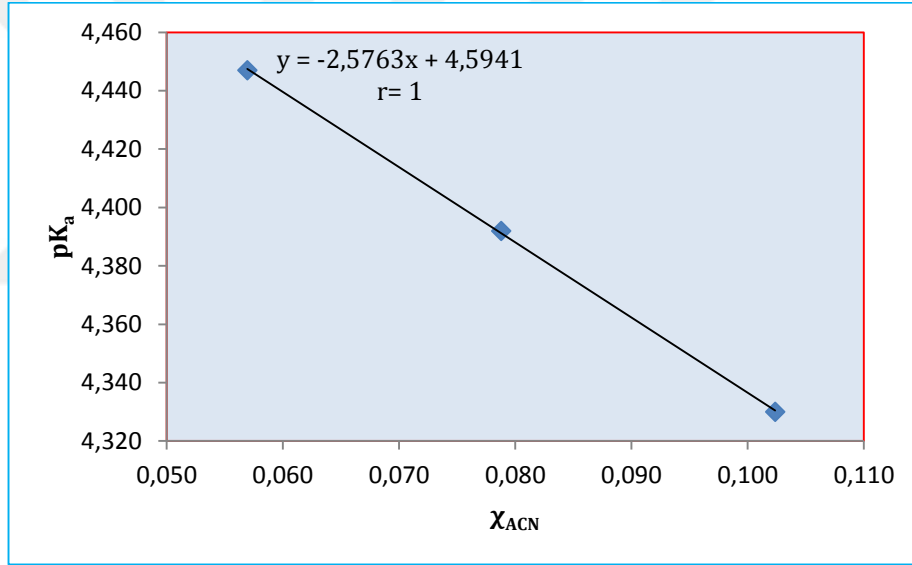
Şekil 4.24. Astemizolün ikinci  $pK_{a2}$  değeri için  $\chi_{ACN}$ - $pK_a$  grafiği

Mebendazol ve tiyabendazol için çalışılan üç farklı ACN-su ortamından elde edilen  $pK_a$  değerleri asetonitrilin mol kesri değerlerine karşı grafiğe geçirmiş ve elde edilen doğru denkleminde, doğrunun kesim noktası ile bileşiğin sudaki  $pK_a$  değeri hesaplanmıştır. Elde edilen grafikler sırasıyla, Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'da verilmiştir.



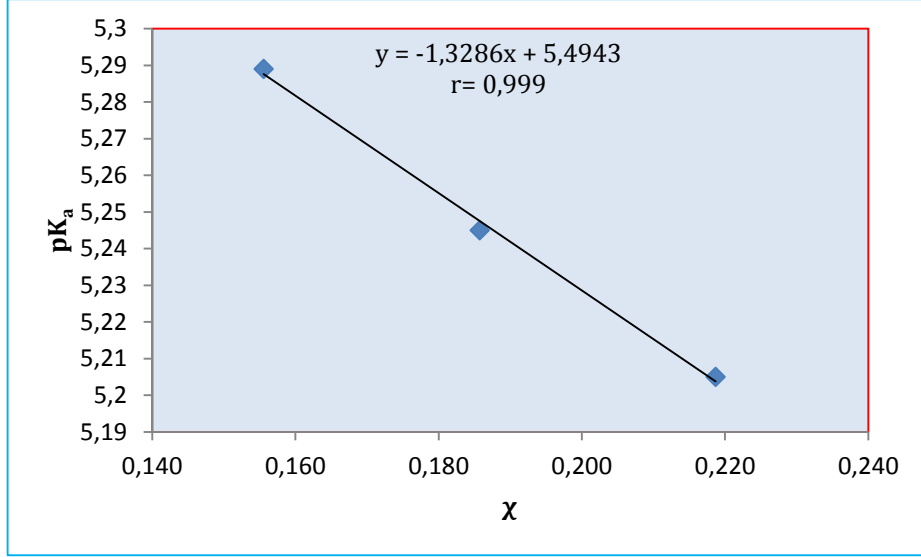


Şekil 4.25. Mebendazol için  $\chi_{ACN}$ - $pK_a$  grafiği

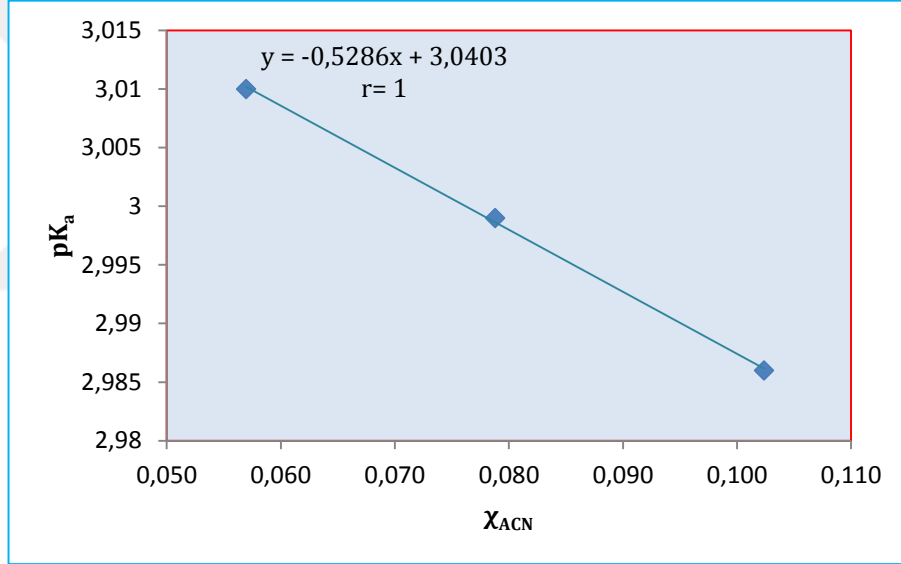


Şekil 4.26. Tiyabendazol için  $\chi_{ACN}$ - $pK_a$  grafiği

Klotrimazol ve metronidazol için çalışılan üç farklı ACN-su ortamından elde edilen  $pK_a$  değerleri asetonitrilin mol kesrine karşı grafiğe geçirilmiş ve elde edilen doğru denkleminde, doğrunun kesim noktası ile bileşiğin sudaki  $pK_a$  değeri hesaplanmıştır. Bu yöntemle elde edilen grafikler sırasıyla, Şekil 4.27 ve Şekil 4.28'de gösterilmiştir.



Şekil 4.27. Klotrimazol için  $\chi_{ACN}$ - $pK_a$  grafiği



Şekil 4.28. Metronidazol için  $\chi_{ACN}$ - $pK_a$  grafiği

#### 4.4. Çalışılan Bileşiklerin 37°C'deki $pK_a$ Değerlerinin Hesaplanması

Vücut sıcaklığı olan 37°C'de iyonlaşabilen ilaç moleküllerinin hücre zarından geçişini anlatmak için  $pK_a$  değerlerine ihtiyaç vardır. 25 °C'de deneysel olarak elde edilen  $pK_a$  değerleri ve Abraham çözünen tanımlayıcıları (Çizelge 4.21) kullanılarak, aşağıdaki iki eşitlik yardımıyla (4.1; 4.2) hesaplama yapılmıştır (Sun vd., 2011).

$$\Delta pK_a = k_0 pK_a^{25} + c_0 + c_1 \sum \alpha_2^H + c_2 \sum \beta_2^H + c_3 \pi_2 + c_4 R_2 + c_5 V_x \quad (4.1)$$

$$\Delta pK_a = pK_a^{37} - pK_a^{25} \quad (4.2)$$

Çizelge 4.21. Tezde çalışılan bileşiklerin Abraham çözünen tanımlayıcıları

Bileşik	E	S	A	B	V	Ref.
Albendazol	2,01	1,96	0,71	1,12	1,95	Abraham vd., 2012
Astemizol	3,10	2,70	0,13	1,64	3,56	Abraham vd., 2012
Mebendazol	2,45	2,76	0,71	1,38	2,13	Abraham vd., 2012
Tiyabendazol	1,93	1,88	0,41	0,87	1,40	Lombardo vd., 2000.
Klotrimazol	2,70	2,34	0,00	0,80	2,62	Lombardo vd., 2000.
Metimazol	1,10	1,31	0,22	1,03	0,84	Abraham vd., 2012-
Metronidazol	1,12	1,75	0,31	0,86	1,19	Lombardo vd., 2000.

#### 4.5. Çözünürlük (logS) değerlerinin hesaplanması

İlaç uygulamalarında herhangi bir ilacın emilebilmesi için öncelikle çözünmesi gereklidir. Tamamen çözünmemiş olan ilaç molekülleri mide-bağırsak kanalından tam olarak emilmediğinden gerekli etkiyi gösteremez (Baka vd., 2008). İlaç keşif çalışmalarında, çözünürlük diğer fizikokimyasal parametreler ile ilaç adayı moleküllerin uygunluğunu kontrol etmede; ilaç geliştirme fazlarında ise biyofarmasötik sınıflandırma ve biyoeşdeğerlik çalışmalarında kullanılan önemli bir fizikokimyasal parametredir (Henchoz vd., 2009).

Bu tez çalışmasında, önemli bir diğer fizikokimyasal özellik olan çözünürlük değerlerinin hesaplanmasında bileşiklerin Abraham çözünen parametreleri kullanılarak, Eşitlik 4.3 ile hesaplama yapılmıştır (Stovall vd., 2005).

$$\log S_w = 0,395 - 0,955E + 0,320S + 1,155A + 3,255B - 0,785AB - 3,330V \quad (4.3)$$

Bileşiklerin saf sudaki çözünürlükleri incelendikten sonra asetonitrildeki çözünürlükleri de Abraham çözünen parametreleri yardımıyla Eşitlik 4.4 ile değerlendirilmiştir.

$$\log S_{ACN} = 0,413 - 0,077E + 0,326S + 1,566A + 4,391B + 3,364 \quad (4.4)$$

#### 4.6. Lipofilisite (log P) değerlerinin hesaplanması

Molekülün lipofilik ortama afinitesini gösteren, genellikle n-oktanol ve su arasında bileşiğin dağılma katsayısının logaritması ( $\log P_{o/w}$ ) olarak tanımlanan, ilaç keşif ve geliştirme çalışmalarındaki temel fizikokimyasal parametrelerden biri olan lipofilisite (IUPAC, 1997), Abraham çözünen parametreleri yardımıyla Eşitlik 4.5 kullanılarak hesaplanmıştır (Lombardo vd., 2000).

$$\log P = 0,088 + 0,562E - 1,054S + 0,034A - 3,460B + 3,814V \quad (4.5)$$

#### 4.7. İlaç Moleküllerinin Kan Beyin Bariyerinden Geçişi

Merkezi sinir sistemi, homeostaziyi sağlamak için kan beyin bariyeri (KBB) tarafından korunmaktadır. KBB'den moleküllerin geçişi molekül büyüklüğü, yük, hidrojen bağı yapma potansiyeli ve lipofilisite gibi molekülün yapısal ve fizikokimyasal özelliklerine bağlıdır. Spesifik taşıyıcılar aracılığıyla taşınan moleküllerde de molekül ağırlığının 400 Da'dan daha küçük olması şartı aranmaktadır (Wohlfart vd., 2012).

Kan beyin bariyeri (KBB) kandan birçok ilacın beyne geçmesini engeller. Birçok ilaç molekülü büyük molekül ağırlığına sahip olduğundan KBB'yi geçemez. Küçük moleküllerin çoğunun KBB'yi kolaylıkla geçebileceği düşünülürken bunların da %98'nin KBB'yi geçemediği görülmektedir. Molekül ağırlığı 400 Da'dan daha küçük ve hidrojen bağı sayısı 8'den daha az olan küçük ilaç molekülleri lipit aracılı serbest difüzyon ile KBB'yi geçerler. Fakat bu kimyasal özellikleri, küçük ilaç moleküllerinin büyük çoğunluğu ve büyük ilaç moleküllerinin tamamı sağlayamamaktadır (Pardridge, W.M., 2012).

Kan ve beyin arasındaki dağılımın belirlenmesi, ilaç dizaynında oldukça önemlidir. *In vivo* metotla kan beyin arasındaki dağılımın ( $\log BB$ ) tayini zordur ve oldukça zaman alıcıdır. Bu sebeple  $\log BB$  değerlerinin belirlenmesi için

Abraham tarafından bir eşitlik önerilmiştir (Chadha ve Abraham, 1994; Abraham vd., 1997b). Eşitlik 4.6 yardımıyla ilaç moleküllerinin kan beyin bariyerinden geçişi hesaplanabilmektedir.

$$\log BB = -0,038 + 0,198E - 0,687S - 0,715A - 0,698B + 0,995V \quad (4.6)$$

#### 4.8. Metot Optimizasyonu

Bu tez çalışmasında geliştirilen kromatografik metotta bileşiklerin mümkün olan en kısa sürede analizini gerçekleştirmek ve bileşiklerin simetrik piklerini elde etmek amaçlanmıştır. Bunun için bu özelliklerin sağlandığı optimum ayırma koşulu belirlenmiştir. Çalışılan bileşiklere ait optimum ayırma koşullarının belirlenmesinde bazı önemli kriterler dikkate alınmıştır. Bunlar; kapasite faktörü ( $k$ ) değerlerinin 1'den büyük olması, seçicilik faktörünün ( $\alpha$ ) 1,15'ten büyük olması ve ayırma gücü ( $R_s$ ) değerlerinin 1,5'tan büyük olmasıdır (%98). Bu değerler dikkate alınarak, albendazol için en uygun ayırma koşulu %45 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımı (pH 4,0); mebendazol için en uygun ayırma koşulu %45 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımı (pH 5,0) ve klotrimazol için en uygun ayırma koşulu %45 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımı (pH 5,5) olarak belirlenmiştir. Kolon sıcaklığı 25°C'de sabit tutulmuş ve akış hızında dakikada 0,8 mL olacak şekilde ayarlanmıştır. Metot optimizasyonunda ve bileşiklerin kantitatif tayinlerinde iç standart yöntemi kullanılmıştır. Belirlenen optimum koşula ait hesaplanan  $k$ ,  $\alpha$  ve  $R_s$  değerleri, albendazol ve seçilen iç standart klotrimazol için Çizelge 4.22'de; mebendazol ve seçilen iç standart albendazol için, Çizelge 4.23'da; klotrimazol ve seçilen iç standart için Çizelge 4.24'de verilmiştir. Ayırmayı gösteren kromatogramlar, Şekil 4.29'da verilmiştir.

Çizelge 4.22. Albendazol ve klotrimazol için optimum ayırma koşuluna ait değerler

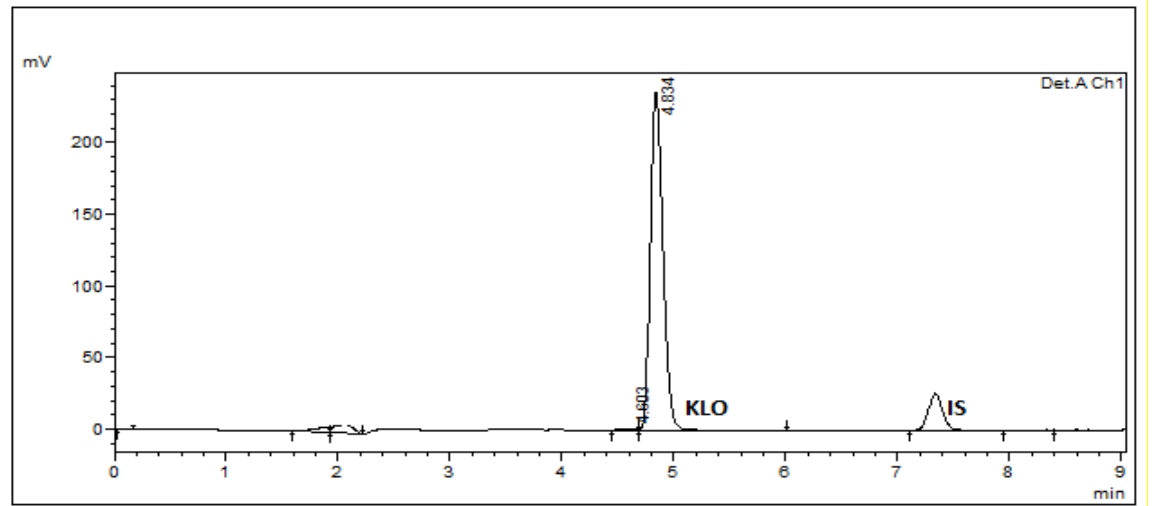
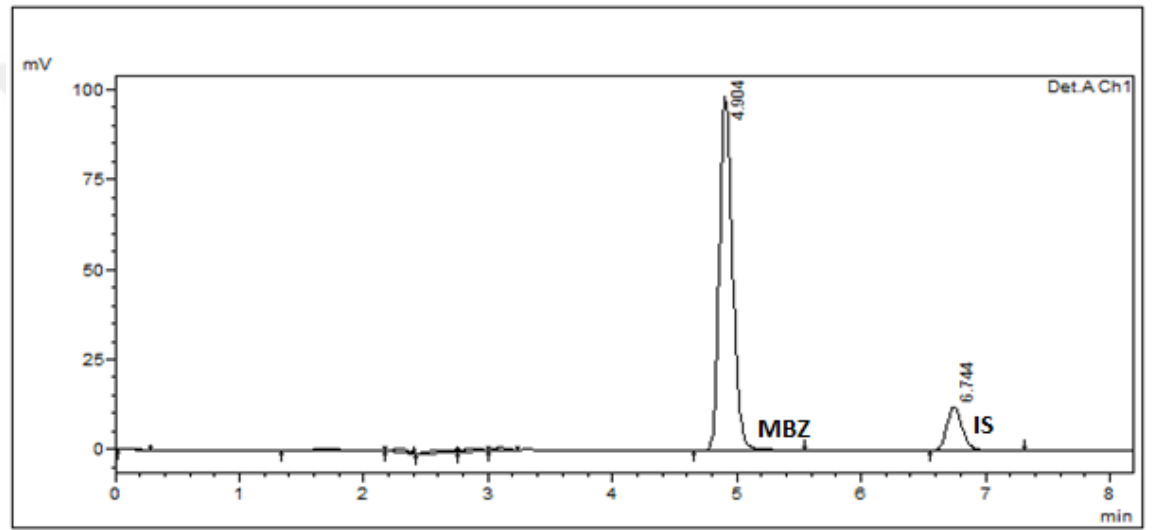
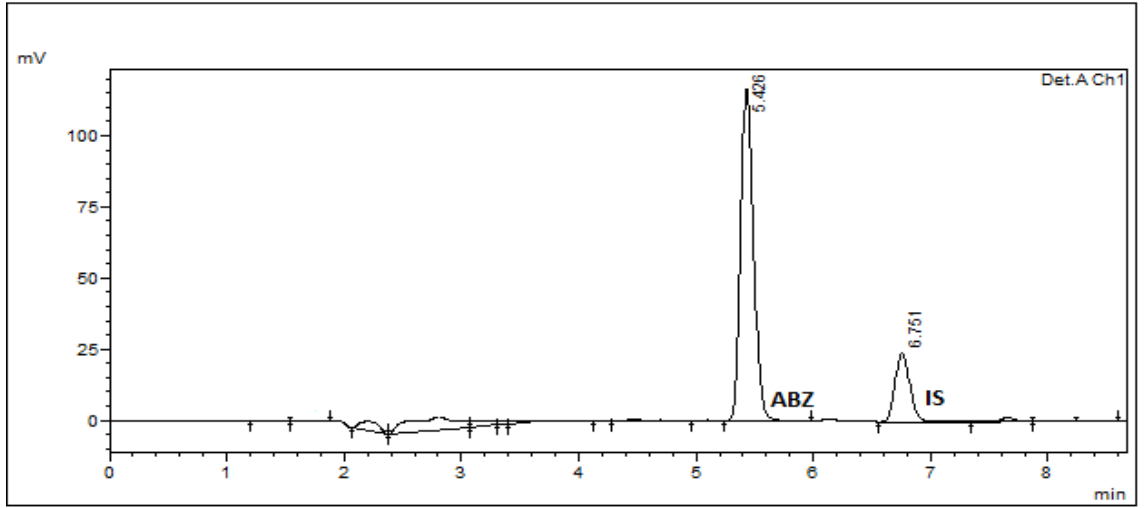
Bileşik	k	$\alpha$	$(\alpha - 1)/\alpha$	$k_2/1+k_2$	$\sqrt{N_2}/4$	$R_s$
Albendazol	1,376	-	-	-	-	-
Klotrimazol	1,948	1,416	0,294	0,661	27,880	5,412

Çizelge 4.23. Mebendazol ve albendazol için optimum ayırma koşuluna ait değerler

Bileşik	k	$\alpha$	$(\alpha - 1)/\alpha$	$k_2/1+k_2$	$\sqrt{N_2}/4$	$R_s$
Mebendazol	1,066	-	-	-	-	-
Albendazol	1,813	1,701	0,412	0,645	17,274	4,589

Çizelge 4.24. Klotrimazol ve dikloksasilin için optimum ayırma koşuluna ait değerler

Bileşik	k	$\alpha$	$(\alpha - 1)/\alpha$	$k_2/1+k_2$	$\sqrt{N_2}/4$	$R_s$
Klotrimazol	1,156	-	-	-	-	-
Dikloksasilin	2,269	1,963	0,491	0,694	30,658	10,448



Şekil 4.29. Optimum ayırma koşulunda elde edilen kromatogramlar  
(ABZ: Albendazol; MBZ: Mebendazol; KLO: Klotrimazol; IS: iç standart)

#### 4.9. Metot Validasyonu

Bu tez çalışmasında geliştirilen RPLC metodunun geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla metot validasyonu gerçekleştirilmiş ve ICH tarafından önerilen parametreler test edilerek metodun performansı ve güvenilirliği değerlendirilmiştir. Geliştirilen metot, doğrusalılık, duyarlılık, seçicilik, doğruluk, kesinlik ve geri kazanım parametreleri kullanılarak valide edilmiştir. Tüm bu parametrelere ait sonuçlar aşağıda verilmiştir.

##### 4.9.1. Kalibrasyon ve duyarlılık

Bileşikler için kalibrasyon grafiği çizilirken doğrusal aralığın belirlenmesi ve derişimlerinin saptanması amacıyla her bir bileşik için 100 ppm ( $\mu\text{g/mL}$ ) stok çözeltileri hazırlanmıştır. Bu stok çözeltiler kullanılarak altı farklı derişimde seyreltik çözeltiler hazırlanmıştır. Kalibrasyon doğrusunun oluşturulmasında iç standart yöntemi kullanılmış ve buna göre değerlendirme yapılmıştır. Kalibrasyon doğrusu bileşiğin her derişimine karşı o derişimde elde edilen pik alanının iç standardın pik alanına oranlanmasıyla çizilmiştir. Ayrıca yöntemin seçiciliğinin belirlenmesi amacıyla her bir bileşik için gözlenebilme sınırı (tayin alt sınırı, LOD) ve kantitatif yorum sınırı (LOQ) değerleri hesaplanmıştır. Çizelge 4.25’de kalibrasyon fonksiyonları, bileşiklerin doğrusal olduğu aralıklar, LOD ve LOQ değerleri verilmiştir. Bileşiklere ait kalibrasyon grafikleri ise, Şekil 4.30’da verilmiştir.

Çizelge 4.25. Bileşiklere ait kalibrasyon fonksiyonları, doğrusal aralıklar, LOD ve LOQ değerleri

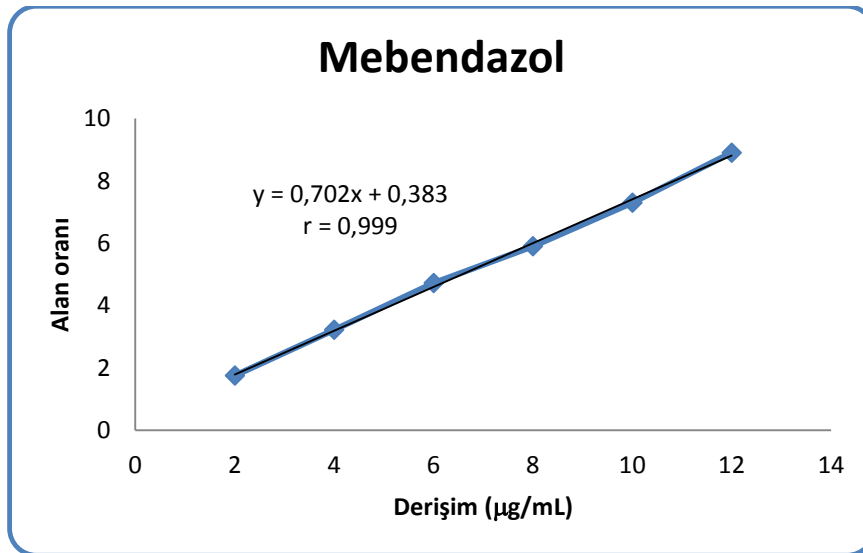
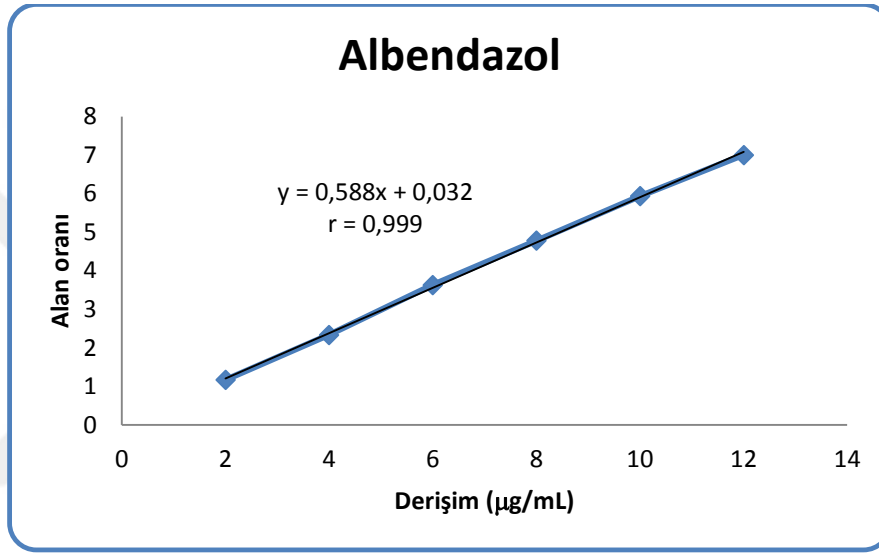
Bileşik	Kalibrasyon fonksiyonları	Doğrusal aralık ( $\mu\text{g/mL}$ )	SD	LOD ( $\mu\text{g/mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g/mL}$ )
Albendazol	$y=0,588 (0,008)$ $x^a+0,031 (0,064)^b$	2-12	0,139	0,351	1,172



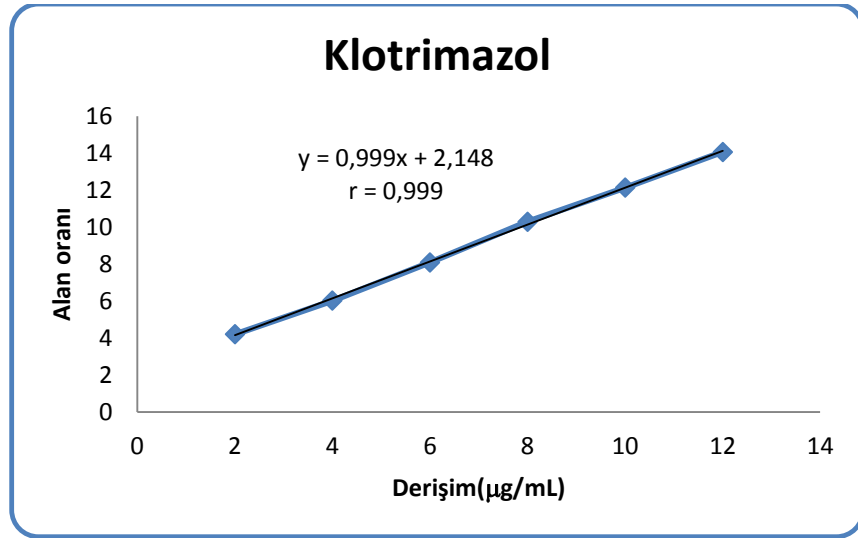
Çizelge 4.25. Bileşiklere ait kalibrasyon fonksiyonları, doğrusal aralıklar, LOD ve LOQ değerleri (Devam)

<b>Mebendazol</b>	$y=0,702x+0,383$ (0,013) $(0,102)^b$	2-12	0,110	0,468	1,560
<b>Klotrimazol</b>	$y=0,999x+2,148$ (0,013) $(0,103)^b$	2-12	0,049	0,166	0,544

a: eğimin standart sapması, b: kesimin standart sapması



Şekil 4.30. Albendazol, mebendazol ve klotrimazolün kalibrasyon grafikleri



Şekil 4.30. Albendazol, mebendazol ve klotrimazolün kalibrasyon grafikleri (Devam)

#### 4.9.2. Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmaları

Gerçekleştirilen validasyon çalışmasında metodun kesinliğinin belirlenebilmesi amacıyla gün içi ve günler arası çalışmalar yapılmıştır. Gün içi (Gİ) ve günler arası (GA) çalışmalar her bileşik için iki farklı derişimde gerçekleştirilmiştir. Gün içi çalışmalar aynı gün içinde günler arası çalışmalar üçüncü günün sonunda standart çözeltilerin HPLC'ye enjeksiyonuyla yapılmıştır. Gün içi ve günlerarası değerlendirme sonuçları, Çizelge 4.26'da verilmiştir.

Çizelge 4.26. Bileşiklere ait gün içi ve günlerarası değerlendirme sonuçları

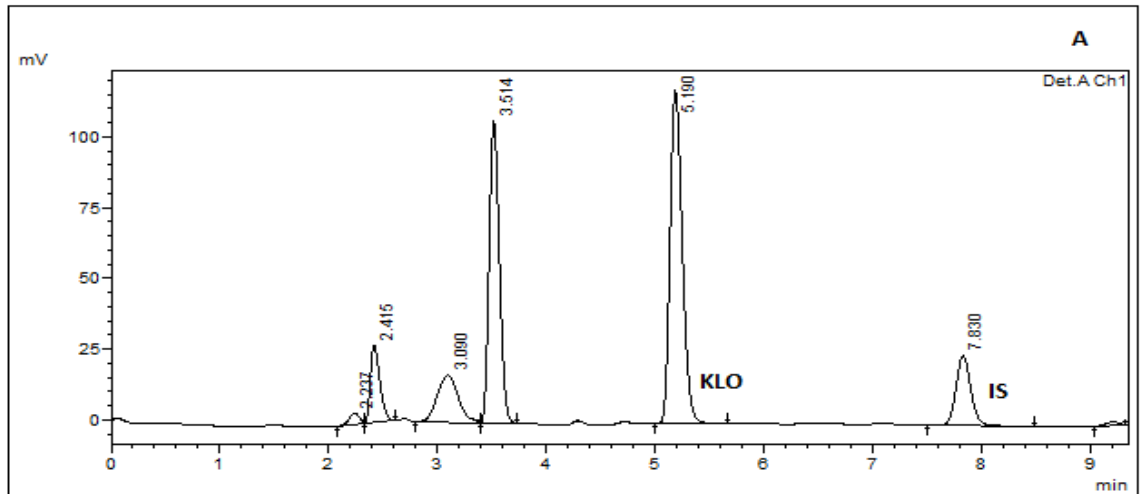
Bileşik	Derişim (µg/mL)	Gİ derişim ortalaması (µg/mL)	%RSD	GA derişim ortalaması (µg/mL)	%RSD
Albendazol	4	3,922	0,482	4,008	0,846
	8	8,103	0,627	8,186	1,374
Mebendazol	4	4,040	0,429	3,639	1,491
	10	9,845	0,601	9,055	1,738
Klotrimazol	4	4,028	0,207	4,116	0,558
	10	10,152	1,049	10,426	1,180

#### 4.9.3. Geri kazanım çalışmaları

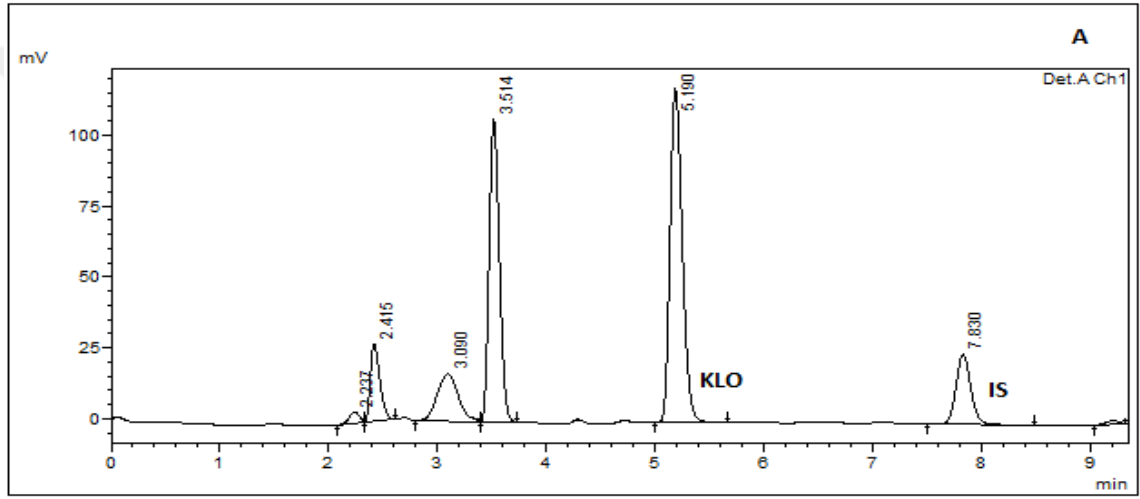
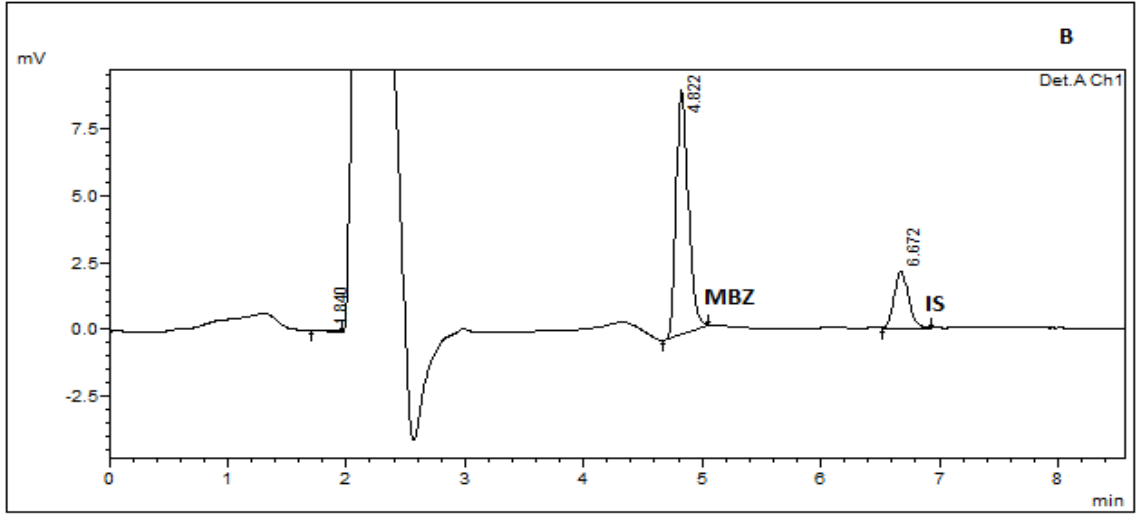
Yapılan çalışmada geliştirilen metodun doğruluğunu belirtmek için geri kazanım çalışması yapılmıştır. Bileşikler için geri kazanım deneyleri piyasadaki formülasyonlarda gerçekleştirilmiştir. Klotrimazol krem formülasyonunda; mebendazol ve albendazol tablet formülasyonlarında gerçekleştirilmiş ve preparatların içerdiği etken madde miktarları ve geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Bileşiklerin geri kazanım değerleri, Çizelge 4.27’de verilmiştir. Numune çalışmalarına ait kromatogramlar ise, Şekil 4.31’de gösterilmiştir.

Çizelge 4.27. İlaç formülasyonlarının içerdikleri etken madde miktarı ve geri kazanım sonuçları

Bileşik	Ürün	Bulunan etken madde miktarı (mg)	% Geri kazanım	% RSD
Albendazol	Andazol 400 mg	396	% 99	1,106
Mebendazol	Vermazol 100 mg	103	% 103	0,927
Klotrimazol	Canesten 10 mg	9,63	% 96,3	0,461



Şekil 4.31. A) Klotrimazol içeren Canesten krem analizine ait kromatogram 1- klotrimazol; 2-dikloksasilin (IS) B) Mebendazol içeren Vermazol tabletine ait kromatogram 1-mebendazol 2-albendazol (IS) C) Albendazol içeren Andazol tabletine ait kromatogram 1-albendazol 2- klotrimazol (IS)



Şekil 4.31. A) Klotrimazol içeren Canesten krem analizine ait kromatogram 1- klotrimazol; 2-dikloksasilin (IS) B) Mebendazol içeren Vermazol tabletine ait kromatogram 1-mebendazol 2-albendazol (IS) C) Albendazol içeren Andazol tabletine ait kromatogram 1-albendazol 2- klotrimazol (IS) (Devam)

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

### 5.1. Bileşiklerin Termodinamik pK<sub>a</sub> Değerlerinin Hesaplanması

Bu tez çalışmasında anthelmintik ve antifungal özellik taşıyan albendazol, astemizol, mebendazol ve klotrimazol için %35 (v/v), %40 (v/v), %45 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında; metronidazol ve tiyabendazol için %15 (v/v), %20 (v/v), %25 (v/v) oranında ACN içeren ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımında; metimazol (tiyamazol) için %100 H<sub>2</sub>O ortamında iyonlaşma/protonasyon sabiti (pK<sub>a</sub>) tayinleri gerçekleştirilmiştir.

Hesaplamalarda çözünen parametresi yaklaşımı kullanılarak alıkonma değerleri tahmin edilmiştir. Bu tahmini değerler Excel eklentisi olan Solver algoritması kullanılarak pK<sub>a</sub> değerleri hesaplanmıştır. Çalışılan her bir su-asetonitril ortamında hesaplanan aktiflik katsayıları da çözünen parametresi kullanılarak yapılan hesaplama dahil edildiğinden altı bileşiğin üç ortamda, 25°C'de pK<sub>a1</sub> değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 5.1). Astemizol için 25 °C sıcaklıkta termodinamik pK<sub>a1</sub> ve pK<sub>a2</sub> değerleri, Çizelge 5.2'de verilmiştir.

Çizelge 5.1. Albendazol, mebendazol, klotrimazol, metronidazol ve tiyabendazol için hesaplanmış, termodinamik pK<sub>a</sub> değerleri

Bileşikler	%ACN (v/v)		
	35	40	45
Albendazol	3,723	3,709	3,692
Mebendazol	3,156	3,070	2,984
Klotrimazol	5,289	5,245	5,205
	15	20	25
Tiyabendazol	4,447	4,392	4,330
Metronidazol	3,010	2,999	2,986

Çizelge 5.2. Astemizol için hesaplanmış, termodinamik  $pK_{a1}$  ve  $pK_{a2}$  değerleri

%ACN (v/v)	$pK_{a1}^{25^{\circ}C}$	$pK_{a2}^{25^{\circ}C}$
35	5,658	8,065
40	5,550	7,923
45	5,439	7,736

Çizelge 5.1 ve 5.2’de görüldüğü üzere albendazol, astemizol, mebendazol ve tiyabendazolün yapısında bulunan benzimidazol halka sistemindeki imidazol halkasının 3 no’lu azotuna ait protonasyon sabiti değeri hesaplanmıştır. Ayrıca astemizolün yapısında bulunan piperidin halkasındaki azota ait  $pK_a$  değeri de hesaplanmıştır. Klotrimazol ve metronidazolün yapısındaki imidazol halkasının 3 no’lu azotuna ait  $pK_a$  değerleri de yine RPLC yöntemi ile belirlenmiştir.

Metimazol (tiyamazol) tezde çalışılan diğer bileşiklerin analizi için kullanılan C8 kolonda tayin edilememiştir. Çünkü bu kolonun çalışma aralığı pH 1,5-10 arasındadır. Bu yüzden daha geniş pH aralığında çalışılabilen C18 ((Phenomenex, 250mm×4,6 mm, 5  $\mu$ m) kolon seçilmiştir. Kinetex Coreshell C18 kolon yeni jenerasyon kolonlardandır ve bu kolon ile %100 H<sub>2</sub>O ortamında çalışılabilmektedir. Metimazol (tiyamazol) bileşiği ile %100 H<sub>2</sub>O ortamında pH 9,0-11,50 aralığında 25 °C’de çalışılarak bileşiğin sudaki  $pK_a$  değeri elde edilmiştir (Çizelge 5.3).

Çizelge 5.3. Metimazol için su ortamındaki hesaplanmış  $pK_a$  değeri

%ACN (v/v)	$pK_a^{25^{\circ}C}$
0	10,987

Çalışmada kullanılan kolon su ortamına uyumlu olduğundan metimazolün analizi direkt olarak su ortamında gerçekleştirilmiştir.

Deneysel olarak bulunan bu termodinamik  $pK_a$  değerleri kullanılarak iki farklı yaklaşımla su ortamındaki termodinamik  $pK_a$  değerleri hesaplanmıştır. Birinci yaklaşımda, bileşiklerin asetonitril-su ikili karışımlarında hesaplanan  $pK_a$

değerleri kullanılarak Yasuda-Shedlovsky yöntemi ile sudaki pK<sub>a</sub> değerleri elde edilmiştir. İkinci yaklaşım ise mol kesri-pK<sub>a</sub> yaklaşımıdır. Bu ekstrapolasyon yöntemi kullanılarak, elde edilen doğrusal eşitliklerin kesim noktalarından su ortamındaki pK<sub>a</sub> değerleri hesaplanmıştır.

Yasuda-Shedlovsky yönteminde hesaplamada kullanılan su-asetonitril ikili karışımlarında asetonitrile ait dielektrik sabiti ( $\epsilon$ ) değerleri ve su ortamındaki pK<sub>a1</sub> değerleri, albendazol için Çizelge 5.4'te; mebendazol için, Çizelge 5.5'de; klotrimazol için Çizelge 5.6'da; tiyabendazol için, Çizelge 5.7'de metronidazol için, Çizelge 5.8'de; astemizol için pK<sub>a1</sub> ve pK<sub>a2</sub> değerleri, Çizelge 5.9 ve 5.10'da verilmiştir.

Çizelge 5.4. Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle albendazolün pK<sub>a</sub> değeri için elde edilen değerler

%ACN (v/v)	$\epsilon$	1/ $\epsilon$	[H <sub>2</sub> O]	log[H <sub>2</sub> O]	pK <sub>a</sub>	pK <sub>a</sub> +log[H <sub>2</sub> O]
35	64,070	0,0156	53,56647	1,729	3,723	5,452
40	61,951	0,0161	53,28893	1,727	3,709	5,436
45	59,818	0,0167	53,01138	1,724	3,692	5,416
0	78,330	0,0128	55,5093	1,744	<b>3,799</b>	5,543

Çizelge 5.5. Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle mebendazolün pK<sub>a</sub> değeri için elde edilen değerler

%ACN (v/v)	$\epsilon$	1/ $\epsilon$	[H <sub>2</sub> O]	log[H <sub>2</sub> O]	pK <sub>a</sub>	pK <sub>a</sub> +log[H <sub>2</sub> O]
35	64,070	0,016	53,566	1,729	3,156	4,885
40	61,951	0,016	53,289	1,727	3,070	4,797
45	59,818	0,017	53,011	1,724	2,984	4,708
0	78,330	0,013	55,509	1,744	<b>3,591</b>	5,336

Çizelge 5.6. Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle klotrimazolün pK<sub>a</sub> değeri için elde edilen değerler

%ACN (v/v)	$\epsilon$	1/ $\epsilon$	[H <sub>2</sub> O]	log[H <sub>2</sub> O]	pK <sub>a</sub>	pK <sub>a</sub> +log[H <sub>2</sub> O]
35	64,070	0,016	53,566	1,729	5,289	7,018
40	61,951	0,016	53,289	1,727	5,245	6,972
45	59,818	0,017	53,011	1,724	5,205	6,929
0	78,330	0,013	55,509	1,744	<b>5,499</b>	7,243

Çizelge 5.7. Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle tiyabendazolün pK<sub>a</sub> değeri için elde edilen değerler

%ACN (v/v)	$\epsilon$	1/ $\epsilon$	[H <sub>2</sub> O]	log[H <sub>2</sub> O]	pK <sub>a</sub>	pK <sub>a</sub> +log[H <sub>2</sub> O]
15	72,390	0,014	54,677	1,738	4,447	6,185
20	70,335	0,014	54,444	1,736	4,392	6,128
25	68,263	0,015	54,167	1,734	4,330	6,064
0	78,330	0,013	55,556	1,745	<b>4,593</b>	6,338

Çizelge 5.8. Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle metronidazolün pK<sub>a</sub> değeri için elde edilen değerler

%ACN:H <sub>2</sub> O (v/v)	$\epsilon$	1/ $\epsilon$	[H <sub>2</sub> O]	log[H <sub>2</sub> O]	pK <sub>a</sub>	pK <sub>a</sub> +log[H <sub>2</sub> O]
15	72,390	0,014	54,677	1,738	3,010	4,748
20	70,335	0,014	54,444	1,736	2,999	4,735
25	68,263	0,015	54,167	1,734	2,986	4,719
0	78,330	0,013	55,556	1,745	<b>3,040</b>	4,784

Çizelge 5.9. Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen astemizolün pK<sub>a1</sub> değerleri

%ACN (v/v)	$\epsilon$	1/ $\epsilon$	[H <sub>2</sub> O]	log[H <sub>2</sub> O]	pK <sub>a</sub>	pK <sub>a</sub> +log[H <sub>2</sub> O]
35	64,070	0,016	53,566	1,729	5,658	7,387
40	61,951	0,016	53,289	1,727	5,550	7,277
45	59,818	0,017	53,011	1,724	5,439	7,163
0	78,330	0,013	55,509	1,744	<b>6,214</b>	7,959



Çizelge 5.10. Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle elde edilen astemizolün pK<sub>a2</sub> değerleri

%ACN (v/v)	ε	1/ε	[H <sub>2</sub> O]	log[H <sub>2</sub> O]	pK <sub>a</sub>	pK <sub>a</sub> +log[H <sub>2</sub> O]
35	64,070	0,016	53,566	1,729	8,065	9,794
40	61,951	0,016	53,289	1,727	7,923	9,650
45	59,818	0,017	53,011	1,724	7,736	9,460
0	78,330	0,013	55,509	1,744	<b>8,911</b>	10,655

İkinci yaklaşımda mobil fazda organik çözücü olarak kullanılan asetonitrilin mol kesri ve su-asetonitril karışımlarındaki pK<sub>a</sub> değerleri kullanılarak su ortamındaki pK<sub>a</sub> değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 5.11 ve Çizelge 5.12).

Çizelge 5.11. Albendazol, astemizol, mebendazol ve klotrimazol için χ<sub>ACN</sub>-pK<sub>a</sub> değerleri

	Albendazol	Astemizol		Mebendazol	Klotrimazol
χ <sub>ACN</sub>	pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a2</sub>	pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a1</sub>
0,156	3,723	5,658	8,065	3,156	5,289
0,186	3,709	5,55	7,923	3,070	5,245
0,219	3,692	5,439	7,736	2,984	5,205
<b>Sudaki pK<sub>a</sub></b>	3,800	6,196	8,882	3,578	5,494

Çizelge 5.12. Tiyabendazol ve metronidazol için χ<sub>ACN</sub>-pK<sub>a</sub> değerleri

	Tiyabendazol	Metronidazol
χ <sub>ACN</sub>	pK <sub>a1</sub>	pK <sub>a1</sub>
0,057	4,447	3,010
0,079	4,392	2,999
0,102	4,330	2,986
<b>Sudaki pK<sub>a</sub></b>	4,594	3,040

Kaynak özetleri ve araştırma bulgularında verilen deneysel ve hesaplanmış pK<sub>a</sub> değerleri genel olarak çalışmada elde edilen deneysel pK<sub>a</sub> değerleri ile uyum göstermektedir.

Çalışılan bileşikler için çoklu lineer regresyon programından elde edilen katsayılar ( $k_0, c_0, c_1, c_2, c_3, c_4, c_5$ ), Abraham çözünen tanımlayıcıları ve 25°C'de deneysel olarak elde edilen  $pK_a$  değerleri kullanılarak Eşitlik 4.2 ve 4.3 yardımıyla albendazol, astemizol, klotrimazol ve mebendazol için %35 (v/v), %40 (v/v), %45 (v/v); metronidazol ve tiyabendazol için %15 (v/v), %20 (v/v), %25 (v/v) ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında ve su ortamında 37°C'deki  $pK_a$  değerleri hesaplanmıştır. Metimazol için %100 su ortamında çalışıldığından; 25°C'deki sudaki bu deneysel  $pK_a$  değeri kullanılarak 37°C'de sudaki  $pK_a$  değeri hesaplanmıştır (Çizelge 5.13).



Çizelge 5.13. 25°C'de deneysel olarak elde edilen pK<sub>a</sub> değerleri kullanılarak hesaplanan 37°C'de ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında ve sudaki pK<sub>a</sub> değerleri

%ACN (v/v)	k <sub>0</sub>	pK <sub>a</sub> <sup>25</sup>	c <sub>0</sub>	c <sub>1</sub>	A	c <sub>2</sub>	B	c <sub>3</sub>	S	c <sub>4</sub>	E	c <sub>5</sub>	V <sub>x</sub>	pK <sub>a</sub> <sup>37</sup>
Albendazol %35	-0,038	3,723	0,051	0,011	0,710	-0,103	1,120	0,060	1,960	0,002	2,010	0,075	1,950	3,793
Albendazol %40	-0,038	3,709	0,051	0,011	0,710	-0,103	1,120	0,060	1,960	0,002	2,010	0,075	1,950	3,779
Albendazol %45	-0,038	3,692	0,051	0,011	0,710	-0,103	1,120	0,060	1,960	0,002	2,010	0,075	1,950	3,763
Albendazol %0	-0,038	3,800	0,051	0,011	0,710	-0,103	1,120	0,060	1,960	0,002	2,010	0,075	1,950	3,867
Astemizol %35 (pK <sub>a1</sub> )	-0,026	5,658	-0,136	0,008	0,130	0,018	1,640	0,035	2,700	-0,032	3,100	0,020	3,560	5,472
Astemizol %40	-0,026	5,550	-0,136	0,008	0,130	0,018	1,640	0,035	2,700	-0,032	3,100	0,020	3,560	5,367
Astemizol %45 (pK <sub>a1</sub> )	-0,026	5,439	-0,136	0,008	0,130	0,018	1,640	0,035	2,700	-0,032	3,100	0,020	3,560	5,259
Astemizol %0 (pK <sub>a1</sub> )	-0,026	6,196	-0,136	0,008	0,130	0,018	1,640	0,035	2,700	-0,032	3,100	0,020	3,560	5,996
Astemizol %35 (pK <sub>a2</sub> )	-0,026	8,065	-0,136	0,008	0,130	0,018	1,640	0,035	2,700	-0,032	3,100	0,020	3,560	7,816

Çizelge 5.13. 25°C'de deneysel olarak elde edilen pK<sub>a</sub> değerleri kullanılarak hesaplanan 37°C'de ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında ve sudaki pK<sub>a</sub> değerleri (Devam)

%ACN (v/v)	k <sub>0</sub>	pK <sub>a</sub> <sup>25</sup>	c <sub>0</sub>	c <sub>1</sub>	A	c <sub>2</sub>	B	c <sub>3</sub>	S	c <sub>4</sub>	E	c <sub>5</sub>	V <sub>x</sub>	pK <sub>a</sub> <sup>37</sup>
Astemizol %40 (pK <sub>a2</sub> )	-0,026	7,923	-0,136	0,008	0,130	0,018	1,640	0,035	2,700	-0,032	3,100	0,020	3,560	7,678
Astemizol %45 (pK <sub>a2</sub> )	-0,026	7,736	-0,136	0,008	0,130	0,018	1,640	0,035	2,700	-0,032	3,100	0,020	3,560	7,496
Astemizol %0 (pK <sub>a2</sub> )	-0,026	8,882	-0,136	0,008	0,130	0,018	1,640	0,035	2,700	-0,032	3,100	0,020	3,560	8,612
Mebendazol %35	-0,038	3,156	0,051	0,011	0,710	-0,103	1,380	0,060	2,760	0,002	2,450	0,075	2,130	3,283
Mebendazol %40	-0,038	3,070	0,051	0,011	0,710	-0,103	1,380	0,060	2,760	0,002	2,450	0,075	2,130	3,200
Mebendazol %45	-0,038	2,984	0,051	0,011	0,710	-0,103	1,380	0,060	2,760	0,002	2,450	0,075	2,130	3,118
Mebendazol %0	-0,038	3,578	0,051	0,011	0,710	-0,103	1,380	0,060	2,760	0,002	2,450	0,075	2,130	3,689
Metronidazol %15	-0,026	3,010	-0,136	0,008	0,310	0,018	0,860	0,035	1,75	-0,032	1,120	0,020	1,190	2,863
Metronidazol %20	-0,026	2,999	-0,136	0,008	0,310	0,018	0,860	0,035	1,75	-0,032	1,120	0,020	1,190	2,852

Çizelge 5.13. 25°C'de deneysel olarak elde edilen pK<sub>a</sub> değerleri kullanılarak hesaplanan 37°C'de ACN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında ve sudaki pK<sub>a</sub> değerleri (Devam)

%ACN (v/v)	k <sub>0</sub>	pK <sub>a</sub> <sup>25</sup>	c <sub>0</sub>	c <sub>1</sub>	A	c <sub>2</sub>	B	c <sub>3</sub>	S	c <sub>4</sub>	E	c <sub>5</sub>	V <sub>x</sub>	pK <sub>a</sub> <sup>37</sup>
<b>Metronidazol</b> %25	-0,026	2,986	-0,136	0,008	0,310	0,018	0,860	0,035	1,75	-0,032	1,120	0,020	1,190	2,840
<b>Metronidazol</b> %0	-0,026	3,040	-0,136	0,008	0,310	0,018	0,860	0,035	1,75	-0,032	1,120	0,020	1,190	2,892
<b>Tiyabendazol</b> %15	-0,026	4,447	-0,136	0,008	0,411	0,018	0,868	0,035	1,875	-0,032	1,926	0,020	1,397	4,246
<b>Tiyabendazol</b> %20	-0,026	4,392	-0,136	0,008	0,411	0,018	0,868	0,035	1,875	-0,032	1,926	0,020	1,397	4,193
<b>Tiyabendazol</b> %25	-0,026	4,330	-0,136	0,008	0,411	0,018	0,868	0,035	1,875	-0,032	1,926	0,020	1,397	4,132
<b>Tiyabendazol</b> %0	-0,026	4,594	-0,136	0,008	0,411	0,018	0,868	0,035	1,875	-0,032	1,926	0,020	1,397	4,389
<b>Tiyamazol</b> %0	-0,026	10,987	-0,136	0,008	0,219	0,018	1,034	0,035	1,312	-0,032	1,100	0,020	0,841	10,613

Ayrıca Abraham çözünen tanımlayıcıları ile hesaplanmış 37 °C'deki pK<sub>a</sub> değerleri ilk defa bu çalışma ile literatüre kazandırılacaktır.

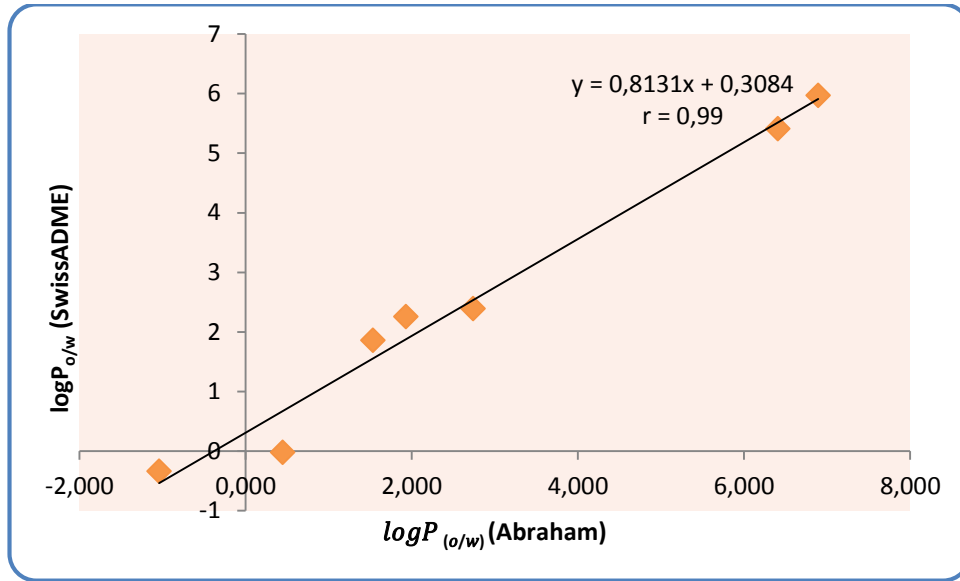
## 5.2. Abraham Çözünen Parametreleri ile Bileşiklerin logP<sub>o/w</sub>, logS ve logBB Değerlerinin Hesaplanması

İlaç adayı moleküllerin gerekli etkiyi gösterebilmesi için vücuttaki hedef noktaya yeterli derişimde ulaşması gerekir; ilacın beklenen biyolojik etkiyi göstermesi için de hedef dokuda biyoaktif formda yeterli süre kalması gerekir. İlaç geliştirme çalışmalarının erken basamaklarında ilacın absorpsiyon, dağılım, metabolize edilme ve atılımı (ADME) incelenmelidir; fakat bu evrede ilaç adayı moleküllerin sayısı çok fazla olmasına rağmen bu moleküllerin fizikokimyasal özellikleri sınırlıdır. Bu aşamada bilgisayar programları deneysel çalışmalara alternatif sağlamaktadır. Bu bağlamda bu tez çalışmasında serbest erişime sahip olan SwissADME internet temelli program yardımıyla bileşiklerin logP<sub>o/w</sub> değerleri hesaplanmıştır (Dana vd., 2017) (Çizelge 5.14).

Çizelge 5.14. Abraham çözünen tanımlayıcıları ve SwissADME programı kullanılarak hesaplanan logP<sub>o/w</sub> değerleri

Bileşik	logP <sub>o/w</sub> (Abraham)	log P (SwissADME)
Albendazol	2,738	2,390
Astemizol	6,892	5,970
Mebendazol	1,929	2,260
Tiyabendazol	1,533	1,860
Klotrimazol	6,406	5,410
Metronidazol	0,447	-0,020
Tiyamazol	-1,042	-0,340

Abraham çözünen parametreleri yardımıyla elde edilen logP<sub>o/w</sub> değerleri SwissADME programından elde edilen logP<sub>o/w</sub> değerlerine karşı grafiğe geçirilerek iki değer arasındaki uyum incelenmiştir (Şekil 5.1). Korelasyon katsayısı (r) değeri yardımıyla korelasyonun iyi olduğu belirlenmiştir.



Şekil 5.1. Abraham çözünen tanımlayıcıları ve SwissADME programından elde edilen  $\log P_{o/w}$  değerlerinin uyumu

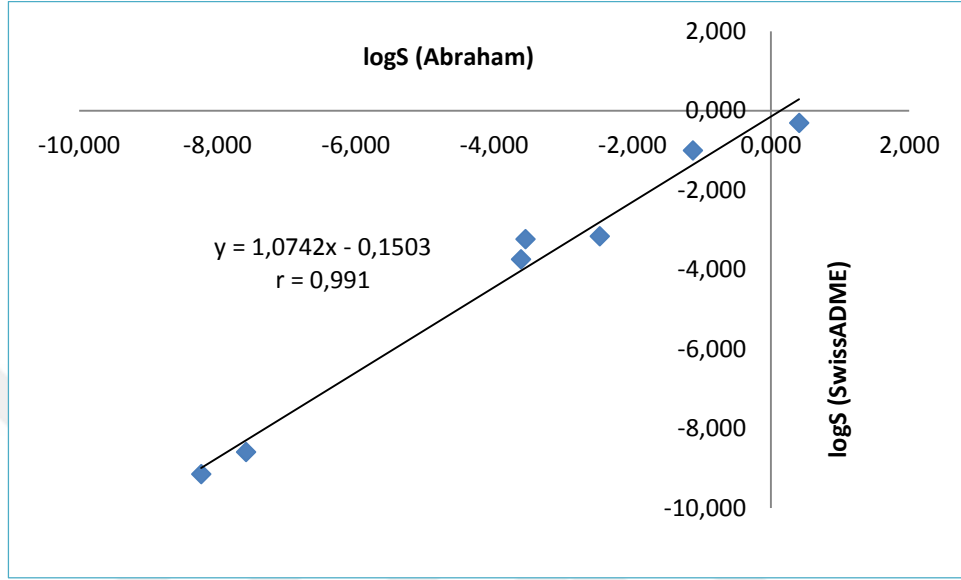
Abraham çözünen parametreleri kullanılarak Eşitlik 4.4 yardımı ile logS değerleri hesaplanmıştır. Aynı zamanda logS değerleri SwissADME programı ile de tahmin edilmiştir (Çizelge 5.15).

Çizelge 5.15. Abraham çözünen tanımlayıcıları ve SwissADME programı kullanılarak elde edilen bileşiklerin sudaki çözünürlük değerleri

Bileşik	Log $S_w$ (Abraham)	Log $S_w$ (SwissADME)	Suda Çözünürlük*
Albendazol	-3,549	-3,230	Çözünebilir
Astemizol	-8,235	-9,150	Zayıf Çözünürlük
Mebendazol	-3,612	-3,740	Çözünebilir
Tiyabendazol	-2,476	-3,160	Çözünebilir
Klotrimazol	-7,591	-8,590	Zayıf Çözünürlük
Metronidazol	-1,129	-1,000	Çözünürlüğü çok
Tiyamazol	0,407	-0,310	Çözünürlüğü çok

\*Çözünmez <-10<Zayıf<-6<Orta<-4<Çözünebilir<-2<Çok<0<Oldukça çok;  
skalası yardımıyla bileşiklerin sudaki çözünürlükleri değerlendirilmiştir.

Abraham çözünen parametreleri yardımıyla elde edilen logS değerleri, SwissADME programından elde edilen logS değerlerine karşı grafiğe geçirilerek iki değer arasındaki uyum incelenmiştir. Korelasyon katsayısı (r) değeri yardımıyla korelasyonun iyi olduğu belirlenmiştir (Şekil 5.2).



Şekil 5.2. Abraham çözünen tanımlayıcıları ve SwissADME programından elde edilen logS değerlerinin uyumu

Bileşiklerin asetonitrildeki çözünürlükleri de Abraham çözünen parametreleri yardımıyla Eşitlik 4.5 ile hesaplanmıştır (Çizelge 5.16). SwissADME programı ile bu bileşiklerin asetonitrildeki logS değerleri hesaplanamamaktadır.

Çizelge 5.16. Abraham çözünen tanımlayıcıları kullanılarak bileşiklerin asetonitrildeki hesaplanan çözünürlük değerleri

Bileşik	Log S <sub>ACN</sub>
Albendazol	-1,459
Astemizol	-2,509
Mebendazol	-2,306
Tiyabendazol	0,082
Klotrimazol	1,260
Metimazol	-0,595
Metronidazol	0,172



Kan ve beyin arasındaki dağılımın belirlenmesi, ilaç dizaynında oldukça önemlidir. *In vivo* metotla kan beyin arasındaki dağılımın ( $\log BB$ ) tayini zordur ve oldukça zaman alıcıdır. Abraham tarafından türetilen Eşitlik 4.6 kullanılarak  $\log BB$  değeri hesaplanmıştır (Çizelge 5.17).

Çizelge 5.17. Abraham çözünen tanımlayıcıları kullanılarak bileşiklerin hesaplanan  $\log BB$  değerleri

Bileşik	$\log BB$	KBB'den geçiş
Albendazol	-0,336	Zor
Astemizol	1,025	Kolay (Pasif difüzyon)
Mebendazol	-0,801	Zor
Tiyabendazol	-0,454	Zor
Klotrimazol	0,947	Kolay (Pasif difüzyon)
Metronidazol	-0,656	Zor
Tiyamazol	-0,763	Zor

Bileşiğin kan beyin bariyerinden geçişi değerlendirilirken  $\log BB > 0,3$  ise moleküller kan beyin bariyerinden pasif difüzyonla geçmektedir.  $\log BB < -1$  ise pasif difüzyon yoktur bileşik kan beyin bariyerinden zor geçmektedir. Bileşiklerin  $\log BB$  değerlerine bakılarak, ilacın kan beyin bariyerinden pasif difüzyonla geçebileceği ya da bu bariyerden ilacın geçişinin zor olacağı ile ilgili tahminler yapılabilmektedir (Jouyban ve Soltani, 2012).

Kaynak özetleri ve SwissADME programı ile hesaplanan veriler ile Abraham parametreleri ile hesaplanmış  $\log P_{o/w}$  ve  $\log S$  değerleri genel olarak uyum göstermektedir.  $\log BB$  değerlerine dair literatürde bir veri bulunmamaktadır.

### 5.3. Geliştirilen Metodun Validasyonu

Tezde deneysel çalışmalar sonucunda su-asetonitril oranlarında elde edilen alıkonma faktörü-pH ilişkisi incelenerek albendazol, mebendazol ve

klotrimazolün kantitatif tayini için optimum koşul belirlenmiş ve metot validasyonu çalışması yapılmıştır. Optimum koşulun belirlenmesinde, üç bileşikte ilaç formülasyonlarında tek başına bulunduğu üçü içinde farklı ayırma koşulları belirlenmiştir. Ayrıca bileşiklerin kapasite faktörü ( $k$ ) değerlerinin 1'den büyük olması, bileşiklerin ayrılmasında seçicilik faktörünün ( $\alpha$ ) 1,15'ten büyük olması ve ayırma gücü ( $R_s$ ) değerlerinin 2'den büyük olması gibi gerekli olan şartlar sağlanmış ve uygun koşul belirlenmiştir.

Kantitatif çalışmada validasyon işlemi için iç standart yöntemi kullanılmıştır. Validasyon işleminde öncelikle sistem uygunluk testleri yapılarak bütün analitler için uygun pik simetri faktörü, teorik tabaka sayısı, ayırma gücü, kapasite ve seçicilik faktörlerinin sağlandığı belirlenmiştir. Elde edilen parametrelerin referans değerlerle uygunluğu görülmüştür.

Doğrusallık çalışmasında her bir bileşik için elde edilen doğrusal fonksiyonun korelasyon katsayılarının ( $r$ ) 0,998 değerinden büyük olduğu belirlenmiştir. Dedeksiyon limiti (LOD) ve tayin limit (LOQ) değerleri doğrusallık verileri içerisinde değerlendirilmiş ve literatürde veri bulunmayan bu değerlerin uygun olduğu görülmüştür.

Kesinlik çalışmalarında gün içi ve günler arası tekrarlı analizler gerçekleştirilmiş ve hesaplanan bağıl standart sapma değerlerinin yorumlanmasıyla yöntemin kesinliği belirlenmiştir.

Doğruluk (geri kazanım) çalışmalarında ise üç bileşik için yöntemin doğrusal çalışma aralığını kapsayan derişim aralığında geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Hesaplanan bu geri kazanım yüzdelerinin %100'e yakın olduğu belirlenmiştir. Hesaplanan bu geri kazanım yüzdeleri tayini yapılan bileşiklerin geliştirilen uygun numune hazırlama teknikleri ile bozucu etkilerle girişim yapmadığını göstermektedir.

Deneysel ve istatistiksel veriler değerlendirildiğinde, geliştirilen metotların krem ve tablet numunelerinin dışındaki numuneler için de uygulanabileceği görülmüştür.



## KAYNAKLAR

- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., Hansson, E., 2006. Astrocyte–endothelial Interactions at the Blood–Brain Barrier. *Nature Reviews Neuroscience*, 7, 41–53.
- Abdel-Moety, E.M., Khattab, F.I., Kelani, K.M., AbouAl-Alamein, A.M., 2002. Chromatographic Determination of Clotrimazole, Ketoconazole and Fluconazole in Pharmaceutical Formulations. *II Farmaco* 57, 931-938.
- Abraham, M.H., Liszi, J., 1978. Calculations on Ionic Solvation. Part 1. Free Energies of Solvation of Gaseous Univalent Ions Using a One-Layer Continuum Model. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions*, 74, 1604-1614.
- Abraham, M.H., Grellier, P.L., Abboud, J-L. M., Doherty. R. M., Taft, R.W., 1988a. Solvent Effects in Organic Chemistry-Recent Developments. *Canadian Journal of Chemistry*, 66, 2673-2686.
- Abraham, M.H., Grellier, P.L., Hamerton, I., McGill, R.A., Prior, D.V., Whiting, G.S., 1988b. Solvation of Gaseous Non-Electrolytes. *Faraday Discussions of the Chemical Society*, 85, 107-115.
- Abraham, M.H., Grellier, P.L., Prior, D.V., Duce, P.P., Morris, J.J., Taylor, P. J., 1989. Hydrogen Bonding. Part 7. A Scale of Solute Hydrogen-Bond Acidity Based on Log K Values for Complexation in Tetrachloromethane. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 6, 699-711.
- Abraham, M.H., Whiting, G.S., Doherty, R.M., Shuely, W.J., 1990. Hydrogen Bonding. Part 13. A New Method for the Characterisation of GLC Stationary Phases-The Laffort Data Set. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, 8, 1451-1460.
- Abraham, M.H., Whiting, G.S., Doherty, R.M., Shuely, W.J., 1991. Hydrogen Bonding XVI. A New Solute Solvation Parameter,  $\pi_2^H$ , from Gas Chromatographic Data. *Journal of Chromatography A*, 587, 213-228.
- Abraham, M.H., Gary S. Whiting, G. S., 1992. Hydrogen Bonding XXI. Solvation Parameters for Alkylaromatic Hydrocarbons from Gas-Liquid Chromatographic Data. *Journal of Chromatography*, 594, 229-241.
- Abraham, M.H., 1993a. Scales of Solute Hydrogen-bonding: Their Construction and Application to Physicochemical and Biochemical Processes. *Chemical Society Reviews*, 22, 73-83.
- Abraham, M.H., 1993b. Hydrogen Bonding XXVII. Solvation Parameters for Functionally Substituted Aromatic Compounds and Heterocyclic Compounds, from Gas-Liquid Chromatographic Data. *Journal of Chromatography*, 644, 95-139.

- Abraham, M.H., 1993c. Hydrogen bonding. 31. Construction of a Scale of Basicity Solute Effective or Summation Hydrogen-Bond. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 6, 660-684.
- Abraham, M.H., Rosés, A., 1994. 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, 672-684.
- Abraham, M.H., Rosés, M., Poole, C.F., Poole, S.K., 1997a. Hydrogen Bonding. 42. Characterization of Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatographic C18 Stationary Phases. *Journal of Physical Organic Chemistry*, 10, 358-368.
- Abraham, M.H., Takaács-Novaák, K., Mitchell, R.C., 1997b. On the Partition of Ampholytes: Application to Blood-Brain Distribution. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86 (3), 310-315.
- Abraham M.H., Le, J., 1999. The Correlation and Prediction of the Solubility of Compounds in Water Using an Amended Solvation Energy Relationship. *Journal of Pharmaceutical Science*, 88, 868-880.
- Abraham, M.H., Poole, C.F., Poole, S.K., 1999. Classification of Stationary Phases and Other Materials by Gas Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 842, 1-2, 79-114.
- Abraham, M.H., Ibrahim, A., Andreas M. Zissimos, A.M., 2004. Determination of Sets of Solute Descriptors from Chromatographic Measurements. *Journal of Chromatography A*, 1037, 29-47.
- Abraham, M.H., Acree, Jr, W. E., 2010a. Equations for the Transfer of Neutral Molecules and Ionic Species from Water to Organic phases. *Journal of Organic Chemistry*, 75, 1006-1015.
- Abraham, M.H., Acree, Jr, W. E., 2010b. The Transfer of Neutral Molecules, Ions and Ionic Species from Water to Wet Octanol. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12, 13182-13188.
- Abraham, M.H., Rupert P. Austin, R.P., 2012. The Effect of Ionized Species on Microsomal Binding. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 47, 202-205.
- Abuín, S., Companyó, R., Centrich, F., Rúbies, A., Prat, M.D., 2008. Analysis of Thyreostatic Drugs in Thyroid Samples by Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry: Comparison of two Sample Treatment Strategies. *Journal of Chromatography A*, 1207, 17-23.

- ACD/Labs 6.00 C; ACD pK<sub>a</sub> DB Advanced Chemistry Development Inc., 90 Adelaide Street, West Toronto, Ontario, M5H3V9, Canada. ACD/Structure Elucidator, version 15.01, Advanced Chemistry Development, Inc., Toronto, ON, Canada, [www.acdlabs.com](http://www.acdlabs.com), 2015.
- Agilent, 2010. Validation of Analytical Methods. Erişim Tarihi: 22.11.2018. <https://www.scribd.com/document/59141497/Validation-of-Analytical-Methods-PRIMER>.
- Akay, C., Özkan, S.A., Sentürk, Z., Cevheroglu, Ş., 2002. Simultaneous determination of metronidazole and miconazole in pharmaceutical dosage forms by RP-HPLC. *II Farmaco*, 57 (11), 953-957.
- Al Omari, M.M., Zughul, M.B., Davies, J.E.D., Badwan, A.A., 2008. Astemizole/Cyclodextrin Inclusion Complexes: Phase Solubility, Physicochemical Characterization and Molecular Modeling Studies. *Journal of Solution Chemistry*, 37, 875–893.
- Ali, I., Lone, M.N., Aboul-Enein, H.Y., 2017. Imidazoles as Potential Anticancer Agents. *Medicinal Chemistry Communications*, 42(4), 234-241.
- Al-Kurdi, Z., Al-Jallad, T., Badwan, A., Jaber, A.M.Y., 1999. High performance Liquid Chromatography Method for Determination of Methyl-5-benzoyl-2-Benzimidazole Carbamate (Mebendazole) and its Main Degradation Product in Pharmaceutical Dosage Forms. *Talanta*, 50, 1089–1097.
- Allars, H., Coleman, M.D., Raymond S. Norton, R.S., 1985. <sup>1</sup>H Nuclear Magnetic Resonance Study of Metronidazole Metabolism by Perfused Rat Liver. *European Journal of Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 10(3), 253-260.
- Alsenz, J., Kansy, M., 2007. High Throughput Solubility Measurement in Drug Discovery and Development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59, 546–567.
- Alsenz, J., Kansy, M., 2007. High Throughput Solubility Measurement in Drug Discovery and Development. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59(7), 546-567.
- Amelina, V.G., Fedina, N.M., Podkolzin, I.V., Korotkov, A.I., 2018. Rapid Screening and Determination of Residual Veterinary Drugs in Milk by Ultrahigh Performance Liquid Chromatography–HighResolution Quadrupole Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Journal of Analytical Chemistry*, 73(6), 576–585.
- Anderson, R.F., Patel, K.B., 1979. Effect of Lipophilicity of Nitroimidazoles on Radiosensitization of Hypoxic Bacterial Cells in vitro. *British Journal of Cancer*, 39, 705-710.

- Angelo State University, 2016. Erişim tarihi: 12.01.2019.  
[https://www.angelo.edu/faculty/kboudrea/index\\_2353/Chapter\\_06\\_6S\\_PP.pdf](https://www.angelo.edu/faculty/kboudrea/index_2353/Chapter_06_6S_PP.pdf)
- Ardent Scientific, 2017. Erişim Tarihi 04.12.2018.  
<https://www.youtube.com/watch?v=7hLFAWf9CyA>.
- Ardıç, N., 2009. An Overview of Strongyloides Stercoralis and its Infections. Mikrobiyoloji Bülteni, 43, 169-177.
- Armbruster, D.A., Tillman, M.D., Hubbs, L.M., 1994. Limit of Detection (LOD)/Limit of Quantitation (LOQ): Comparison of the Empirical and the Statistical Methods Exemplified with GC-MS Assays of Abused Drugs. Clinical Chemistry, 40/7, 1233-1238.
- Austin, R.P., Barton, P., Cockroft, S.L., Wenlock, M.C., Riley, R.J., 2002. The Influence of Nonspecific Microsomal Binding on Apparent Intrinsic Clearance, and Its Prediction from Physicochemical Properties. Drug Metabolism and Disposition, 30:1497–1503.
- Avdeef, A., 1993. pH-metric logP. 2. Refinement of Partition Coefficients and Ionization Constants of Multiprotic Substances. Journal of Pharmaceutical Sciences, 82, 183–190.
- Avdeef, A., 1998. pH-metric Solubility. 1. Solubility–pH Profiles from Bjerrum Plots. Gibbs Buffer and pK<sub>a</sub> in the Solid State. Pharmacy and Pharmacology communications, 4, 165-178.
- Avdeef, A., Berger, C.M., Brownell, C., 2000. pH-metric Solubility. 2: Correlation Between the Acid-Base Titration and the Saturation Shake-Flask Solubility-pH Methods. Pharmaceutical Research, 17(1), 85-89.
- Avdeef, A., 2001. Physicochemical Profiling (Solubility, Permeability and Charge State). Current Topics in Medicinal Chemistry, 1(4), 277-351.
- Avdeef, A., 2003. Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, 287p, New Jersey.
- Avdeef, A., 2007. Solubility of Sparingly-Soluble Ionizable Drugs. Advanced Drug Delivery Reviews, 59, 7, 568-590.
- Avdeef, A., Bendels, S., Tsinman, O., Tsinman, K., Kansy, M., 2007. Solubility-Excipient Classification Gradient Maps. Pharmaceutical Research, 24(3), 530-545.
- Ayouni, L., G. Cazorla, G., Chaillou, D., Herbreteau, B., Rudaz, S., Lante'ri, P., Carrupt, P.-A., 2005. Fast Determination of Lipophilicity by HPLC. Chromatographia, 62, 5/6, 251-255.

- Back, H., Lee, J., Chae, J., Song, B., Seo, J., Yun, H., Kwon, K., 2015. A novel HPLC–MS/MS Method for the Simultaneous Determination of Astemizole and its Major Metabolite in Dog or Monkey Plasma and Application to Pharmacokinetics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 114, 121–126.
- Back, H-M., Lee, J-H., Jung-woo Chae, J-W., Song, B., Seo, J-W., Yun, H-Y., Kwang-il Kwon, K-İ., 2015. A Novel HPLC–MS/MS Method for the Simultaneous Determination of Astemizole and Its Major Metabolite in Dog or Monkey Plasma and Application to Pharmacokinetics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 114, 121–126.
- Bai, R.Y., Staedtke, V., Aprhys, C.M., Gallia, G.L., Riggins, G.J., 2011. Antiparasitic Mebendazole Shows Survival Benefit in 2 Preclinical Models of Glioblastoma Multiforme. *Neuro-Oncology*, 13, 974–982.
- Bai, R., Staedtke, V., Rudin, C.M., Bunz, F., Riggins, G.J., 2015a. Effective Treatment of Diverse Medulloblastoma Models with Mebendazole and its Impact on Tumor Angiogenesis. *Neuro-Oncology*, 17(4), 545–554.
- Bai, R., Staedtke, V., Wanjiku, T., Rudek, M.A., Joshi, A., Gallia, G.A., Riggins, G. J., 2015b. Brain Penetration and Efficacy of Different Mebendazole Polymorphs in a Mouse Brain Tumor Model. *Clinical Cancer Research*, 21(15), 3462-3470.
- Baka, E., Comer, J.E.A., Krisztina Tak'acs-Nov'ak, K., 2008. Study of Equilibrium Solubility Measurement by Saturation Shake-Flask Method Using Hydrochlorothiazide as Model Compound. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 46, 335–341.
- Bala, A., 2012. Erişim tarihi: 12.08.2018.  
[https://www.slideshare.net/anuguleria3/anu-ppt?qid=3f972252-9577-4717-80fe-534c4f6e016b&v=&b=&from\\_search=1](https://www.slideshare.net/anuguleria3/anu-ppt?qid=3f972252-9577-4717-80fe-534c4f6e016b&v=&b=&from_search=1).
- Baran, 2009. Erişim tarihi: 14.09.2018.  
<https://www.scripps.edu/baran/heterocycles/Essentials1-2009.pdf>
- Barbato, F., Caliendo, G., La Rotonda, M. I.; Silipo, C., Toraldo, G., Vittoria, A., 1986. Distribution Coefficients by Curve Fitting: Application to Ionogenic Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Quantitative Structure-Activity Relationships*, 5, 88-95.
- Barbosa, J., Barrón, D., Jiménez-Lozano, E., Sanz-Nebot, V., 2001. Comparison between capillary electrophoresis, liquid chromatography, potentiometric and spectrophotometric techniques for evaluation of pKa values of zwitterionic drugs in acetonitrile–water mixtures. *Analytica Chimica Acta*, 437, 309–321.



- Bard, B., Martel, S., Pierre-Alain Carrupt, P.A., 2008. High Throughput UV Method for the Estimation of Thermodynamic Solubility and the Determination of the Solubility in Biorelevant Media. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 33 (3), 230-240.
- Basak, S., Gute, B. Drewes, L., 1995. Predicting Blood-Brain Transport of Drugs: A Computational Approach. *Pharmaceutical Research*, 13 (5), 775-778.
- Basak, S.C., Gute, B.D., Drewes, L.R., 1996. Predicting Blood-Brain Transport of Drugs: A Computational Approach. *Pharmaceutical Research*, 13, 5, 775-778.
- Beale, J.M.Jr., Block, J.H., 2010. *Wilson and Gisvold's Textbook of Organic Medicinal and Pharmaceutical Chemistry*. The Point, 1010p, New Delhi.
- Beckers, J.L., Ackermans, M.T., Bocek, P., 2003. Capillary Zone Electrophoresis in Methanol: Migration behavior and Background Electrolytes. *Electrophoresis*, 24, 1544-1552.
- Beggs, W.H., Andrews, F.A., Sarosi, G.A., 1981. Action of Imidazole-Containing Antifungal Drugs. *Life Sciences*, 28, 111-118.
- Bekhti, A., Schaaps, J.P., Capron, M., Dessaint, J.P., Santoro, F., Capron, A., 1977. Treatment of Hepatic Hydatid Disease with Mebendazole: Preliminary Results in Four Cases. *British Medical Journal*, 2, 1047-1051.
- Beltrán, J.L., Sanli, N., Fonrodona, G., Barrón, D., Özkan, G., Barbosa, J., 2003. *Analytica Chimica Acta*, 484, 253-264. Spectrophotometric, Potentiometric and Chromatographic pK<sub>a</sub> Values of Polyphenolic Acids in Water and Acetonitrile-Water Media.
- Bendels, S., Tsinman, O., Björn, W., Lipp, D., Parrilla, I., Kansy, M., Avdeef, A., 2006. PAMPA-Excipient Classification Gradient Map. *Pharmaceutical Research*, 23(11), 2525-2535.
- Bergström, C.A.S., Luthman, K., Artursson, P., 2004. Accuracy of Calculated pH-Dependent Aqueous Drug Solubility. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 22 (5), 387-398.
- Bergström, C.A.S., Wassvik, C.M., Johansson, K., Hubatsch, I., 2007. Poorly Soluble Marketed Drugs Display Solvation Limited Solubility. *Journal of Medicinal Chemistry*, 50, 5858-5862.
- Beşergil, B., 2015. Erişim tarihi: 15.08.2018. [http://www.bayar.edu.tr/besergil/3\\_kromatografi\\_dedektorleri.pdf](http://www.bayar.edu.tr/besergil/3_kromatografi_dedektorleri.pdf).
- Bienta, 2018. Erişim tarihi: 30.05.2018. <http://bienta.net/logdlogp/>

- Biswas, N., Thomas, S., Sarkar, A., Mukherjee, T., Sudhir Kapoor, S., 2009. Adsorption of Methimazole on Silver Nanoparticles: FTIR, Raman, and Surface-Enhanced Raman Scattering Study Aided by Density Functional Theory. *Journal of Physical Chemistry C*, 113, 7091–7100.
- Bitesizebio, 2018. Erişim tarihi: 08.08.2018.  
<https://bitesizebio.com/29947/basics-chromatography-column/>
- Blagbrough, I.S., Metwally, A.A., Geall, A.J., 2011. Polyamines, Methods and Protocols. In Pegg, A.E., Casero, R.A. Jr., (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, (493-503). Humana Press, 523p, New York, ABD.
- Bloma, K., Senkowskia, W., Jarvius, M., Berglund, M., Rubin, J., Lenhammar, L., Parrowa, V., Andersson, C., Loskog, A., Fryknasa, M., Nygren, P., Larsson, R., 2017. The Anticancer Effect of Mebendazole may be due to M1 Monocyte/Macrophage Activation via ERK1/2 and TLR8-dependent iNflammasome Activation. *Immunopharmacology and Immunotoxicology*, 39 (4), 199–210.
- Bochem Instrumente GmbH, 2011. Erişim tarihi: 12.08.2018.  
<http://www.bochem.com/tr/%C4%B0pu%C3%A7lar%C4%B1/Viskozite.html>
- Box, K., Bevan, C., Comer, J., Hill, A., Allen, R., Reynolds, D., 2003. High-Throughput Measurement of pK<sub>a</sub> Values in a Mixed-Buffer Linear pH Gradient System. *Analytical Chemistry*, 75, 883-892.
- Box, K.J., Comer, J.E.A., 2008. Using Measured pK<sub>a</sub>, LogP and Solubility to Investigate Supersaturation and Predict BCS Class. *Current Drug Metabolism*, 9, 869-878.
- Box, K.J., Völgyi, G., Baka, E., Stuart, M., Takács-Novák, K., Comer, J.E.A., 2006. Equilibrium versus Kinetic Measurements of Aqueous Solubility, and the Ability of Compounds to Supersaturate in Solution—a Validation Study. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 95(6), 1298-1307.
- Bradley, J-C., Abraham, M.H., Acree, W.E. Jr., Lang, A.S., Beck, S.N., Bulger, D.A., A Clark, E.A., Condrón, L.N., Costa, S.T., Curtin, E.M., Kurtu, S.B., Mangir, M.I., McBride, M.J., 2015. Determination of Abraham model Solute Descriptors for the Monomeric and Dimeric Forms of Trans-Cinnamic Acid Using Measured Solubilities from the Open Notebook Science Challenge. *Chemistry Central Journal*, 9(1), 11.
- Braumann, T., 1986. Determination of Hydrophobic Parameters by Reversed-Phase Liquid Chromatography: Theory, Experimental Techniques, and Application in Studies on Quantitative Structure-Activity Relationships. *Journal of Chromatography A*, 373, 191–225.

- Brice, R.W., Zhang, X., Luis A. Colon, L.A., 2009. Fused-core, sub-2  $\mu\text{m}$  Packings, and Monolithic HPLC columns: A Comparative Evaluation. *Journal of Separation Science*, 32, 2723–2731.
- Brogi, S., Brindisi, M., Joshi, B.P., Coccone, S.S., Parapini, S., Basilio, N., Novellino, E., Campiani, G., Gemma, S., Butin, S., 2015. Exploring Clotrimazole-Based Pharmacophore: 3D-QSAR Studies and Synthesis of Novel Antiplasmodial Agents. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 25 (22), 5412-5418.
- Brown, H. D., Matzuk, A. R., Ilves, I. R., Peterson, L. H., Harris, S. A., Sarett, L. H., Egerton, J.R., Yakstis, J. J., Campbell, W. C., Cuckler, A. C., 1961. Antiparasitic Drugs. IV. 2-(4'-Thiazolyl)-Benzimidazole, a New Anthelmintic. *Journal of American Chemical Society*, 83 (7), 1764–1765.
- Brunton, L. L., Lazo, J.S., Parker, K.L., 2009. Goodman & Gilman Tedavinin Farmakolojik Temelleri. Çev. Süzer, Ö. Nobel Tıp Kitabevleri, 2018s, İstanbul
- Budavari, S., O'Neil, M.J., Smith, A., Heckelman, P.E. (Eds.), 1989. The Merck Index, Merck & Co, Rahway, 444.
- Bussemas, H.H., Ettre, L.S., 2004. Forerunners of Chromatography: Runge's Self-Grown Pictures. *LCGC North America*, 22, 3, 262-270.
- Calvo, N.L., Kaufman, T.S., Maggio, R.M., 2016. Mebendazole Crystal Forms in Tablet Formulations. An ATR-FTIR/Chemometrics Approach to Polymorph Assignment. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 122, 157–165.
- Canbay, H.S., Demiralay, E.C., Alsancak, G., Ozkan, S.A., 2011. Chromatographic Determination of pKa Values of Some Water-Insoluble Arylpropionic Acids and Arylacetic Acids in Acetonitrile–Water Media. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 56(5), 2071-2076.
- Canoira, L., Rodriguez', J.G., Subirats, J.B., Escario, J.A., Jimenez, I., Martinez-Fernandez, A.R., 1989. Synthesis, Structure and Anti - fungal Activity of 3-(2'-nitrovinyl) indoles. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 24, 39-42.
- Canseven, V., Çubuk-Demiralay, E., Üstün, Z., Daldal, Y.D., Sibel A. Özkan S.A., Alsancak, G., 2017. Measurements of Thermodynamic Acid Dissociation Constants for Three HMG-CoA Reductase Inhibitors by Using RPLC and Study of Validation in Pharmaceutical Tablets. *Current Pharmaceutical Analysis*, 13(1), 48-55, 2017.
- Carlsson, G., Patring, J., Ullerås, E., Oskarsson, A., 2011. Developmental Toxicity of Albendazole and its Three Main Metabolites in Zebrafish Embryos. *Reproductive Toxicology*, 32 (1), 129–137.

- Carson-DeWitt, R., Glaza, K., 2015. Metronidazole. In Fust, K. (Ed.), the Gale Encyclopedia of Prescription Drugs: A Comprehensive Guide to the Most Common Medications, Volume 2 (602-605). Cengage Learning, 1080 p, Farmington Hills, MI: Gale.
- Cavas, 2015. Erişim tarihi: 12.12.2018.  
[http://kisi.deu.edu.tr/lcavas/web/Sivilar Katilar Hafta6 7.pdf](http://kisi.deu.edu.tr/lcavas/web/Sivilar%20Katilar%20Hafta6%207.pdf).
- Chadha, H.S., Abraham, M.H., 1994. Physicochemical analysis of the Factors Governing Distribution of Solutes between Blood and Brain. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 4, 21, 2511-2516.
- Chamberlain, K., Evans, A.A., Bromilow, R.H., 1996. 1-Octanol/Water Partition Coefficient ( $K_{ow}$ ) and  $pK_a$  for Ionisable Measured Metric Method by a pH-Metric Method. *Pest Management Science*, 47, 265-271.
- ChemAxon, 2016. Erişim tarihi: 15.12. 2016. <http://www.chemaxon.com>.
- ChemDraw Ultra Software Version 6.0.1, 2007. CambridgeSoft, 100 Cambridge Park Drive, MA 02140, USA.
- Chemicalize, 2011. Erişim tarihi: 06.12.2018. <https://chemicalize.com/>
- Chemicalize, 2018. Erişim tarihi: 04.04.2018. <http://www.chemicalize.com>.
- Chemicalize, 2018. Erişim tarihi: 10.08.2018.  
<https://chemicalize.com/#/calculation>
- Chemistry Libretexts, 2016. Erişim tarihi: 03.09.2018.  
[https://chem.libretexts.org/Textbook Maps/Analytical Chemistry/Supplemental Modules \(Analytical Chemistry\)/Analytical Sciences Digital Library/IASDL/Courseware/Separation Science/02 Text/03 Broadening of Chromatographic Peaks/02 Eddy Diffusion \(Multipath\) Broadening in Chromatography](https://chem.libretexts.org/Textbook%20Maps/Analytical%20Chemistry/Supplemental%20Modules%20(A analytical%20Chemistry)/Analytical%20Sciences%20Digital%20Library/IASDL/Courseware/Separation%20Science/02%20Text/03%20Broadening%20of%20Chromatographic%20Peaks/02%20Eddy%20Diffusion%20(Multipath)%20Broadening%20in%20Chromatography).
- Chen, D., Tao, Y., Liu, Z., Liu, Z., Huang, L., Wang, Y., Pan, Y., Peng, D., Dai, M., Yuan, Z., 2010. *Journal of Chromatography B*, 878, 2928–2932. Development of a High-performance Liquid Chromatography Method to Monitor the Residues of Benzimidazoles in Bovine Milk.
- Chen, X., Antman, M., Gesenberg, C., Gudmundsson, O.S., 2006. *Discovery Pharmaceutics — Challenges and Opportunities*. *The AAPS Journal*, 8 (2), Article 46, E402-E408.
- Chen, X., Zhao, L., Xu, H., Zhong, D., 2004. Simultaneous Determination of Albendazole and Its Major Active Metabolite in Human Plasma Using a Sensitive and Specific Liquid Chromatographic–Tandem Mass Spectrometric Method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 35 (4), 829-836.

- Chikhale, E.G., Ng, K.Y., Burton, P.S., Borchardt, R.T., 1994. Hydrogen Bonding Potential as a Determinant of the *in vitro* and *in situ* Blood-Brain Barrier Permeability of Peptides. *Pharmaceutical Research*, 11(3):412-419.
- Cho, M.J., Kurtz, R.R., Lewis, C., Machkovech, S.M., Houser, D.J., 1982. Metronidazole Phosphate—A Water-Soluble Prodrug for Parenteral Solutions of Metronidazole. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 71(4), 410-414.
- Chong, C.R., Chen, X., Shi, L., Liu, J.O., Sullivan, D.J., 2006. A Clinical Drug Library Screen Identifies Astemizole as an Antimalarial Agent. *Nature Chemical Biology*, 8(2), 415-416.
- Chromacademy, 2011. Erişim Tarihi: 11.01.2017.  
<https://www.chromacademy.com/lms/sco5/Theory Of HPLC Reverse Phase Chromatography.pdf>
- Clark, D.E., 1999. Rapid Calculation of Polar Molecular Surface Area and Its Application to the Prediction of Transport Phenomena. 2. Prediction of Blood-Brain Barrier Penetration. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88 (8), 815-821.
- Clark, D.E., 2003. *In silico* Prediction of Blood-Brain Barrier Permeation. *Drug Discovery Today*, 8, 20, 927-933.
- Collander, R., 1954. The permeability of Nitella Cells to Non-Electrolytes. *Physiologia Plantarum*, 7, 420-445.
- Cook, G.C., 1990. Use of Benzimidazole Chemotherapy in Human Helminthiases: Indications and Efficacy. *Parasitology Today*, 6 (4), 133-136.
- Cooper, D.S., 2005. Antithyroid Drugs. *The New England Journal of Medicine*, 352, 905-917.
- Cramer, R.D., 1980a. BC(DEF) Parameters. 1. The Intrinsic Dimensionality of Intermolecular Interactions in the Liquid State. *Journal of the American Chemical Society*, 102, 1837-1849.
- Cramer, R.D., 1980b. BC(DEF) Parameters. 2. An Empirical Structure-Based Scheme for the Prediction of Some Physical Properties. *Journal of the American Chemical Society*, 102, 1849-1859.
- Crowley, P.D., Gallagher, H.C., 2014. Clotrimazole as a Pharmaceutical: Past, Present and Future. *Journal of Applied Microbiology* 117, 611-617.
- Cruciani, G., Millettia, F., Storchib, L., Sforzab, G., Goraccib, L., 2009. *In silico* pK<sub>a</sub> Prediction and ADME Profiling. *Chemistry and biodiversity*, 6 (11), 1812-1821.

- Cruz-Cabeza, A.J., 2012. Acid-Base Crystalline Complexes and the pK<sub>a</sub> Rule. *CrystEngComm*, 14, 6362-6365.
- Csizmadia, F., Tsantili-Kakoulidou, A., Pander, I., Darvas, F., 1997. Prediction of Distribution Coefficient from Structure. 1. Estimation Method. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 86, 7, 865-871.
- Cudmore, S.L., Delgaty, K.L., Hayward-McClelland, S.F., Petrin, D.P., Garber, G.E., 2004. Treatment of Infections Caused by Metronidazole-Resistant *Trichomonas vaginalis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 17(4), 783-793.
- Curatolo, W., 1998. Physical chemical properties of oral drug candidates in the discovery and exploratory development settings. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 1(9), 387-393.
- Currie, L.A., 1995. Nomenclature in Evaluation of Analytical Methods Including Detection and Quantification Capabilities. *Pure & Applied Chemistry*, 67(10), 1699-1723.
- Cvijanovic, D., Damjanović, V., Picek, I., Foretić, B., 2012. Spectroscopic Studies of Methimazole Reactivity toward the Aquapentacyanoferrate (II) Ion in Aqueous Solutions. *Spectroscopy: An International Journal*, 27, (5-6), 509-514.
- Daina, A., Michielin, O., Zoete, V., 2017. SwissADME: a Free Web Tool to Evaluate Pharmacokinetics, Druglikeness and Medicinal Chemistry Friendliness of Small Molecule. *Scientific Reports*, 7, 42717.
- Dallet, M., 2013. Background Document on Clotrimazole (2013 update). QSPAR Commission. Erişim tarihi: 20.03.2018. <https://www.ospar.org/documents?d=7317>.
- Danaher, M., Ruyck, H.D., Crooks, S.R.H., Dowling, G., O'Keeffe, M., 2007. Review of Methodology for the Determination of Benzimidazole Residues in Biological Matrices. *Journal of Chromatography B*, 845, 1-37.
- Davidse, L.C., Flach, W., 1978. Interaction of Thiabendazole with Fungal Tubulin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 543(1), 82-90.
- Dawson, M., Watson, T.R., 1985. The Effect of Dose Form on the Bioavailability of Mebendazole in Man. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 1985, 19(1), 87-90.
- Dayan, A.D., 2003. Albendazole, Mebendazole and Praziquantel. Review of Non-Clinical Toxicity and Pharmacokinetics. *Acta Tropica*, 86, 141-159.

- de Guadalupe Chávez-López, M., Hernández-Gallegos, E., Vázquez-Sánchez, A.Y., Gariglio, P., Javier, C., 2014. Antiproliferative and Proapoptotic Effects of Astemizole on Cervical Cancer Cells. *International Journal of Gynecological Cancer*, 24(5), 824-828.
- de Vries, H.E., Kuiper, J., De Boer, A.G., Van Berkel, T. J. C., Breimer, D. D., 1997. The Blood-Brain Barrier in Neuroinflammatory Diseases. *Pharmacological Reviews*, 49 (2), 143-156.
- Delaney, J.S., 2005. Predicting Aqueous Solubility from Structure. *Drug Discovery Today*, 10 (4), 289-295.
- Demiralay, E.C., Alsancak, G., Ozkan, S.A., 2009. Determination of pKa Values of Nonsteroidal Antiinflammatory Drug-Oxicams by RP-HPLC and Their Analysis in Pharmaceutical Dosage Forms. *Journal of Separation Science*, 32(17), 2928-2936.
- Demiralay, E.C., Cubuk, B., Alsancak, G., Ozkan, S.A., 2010. Combined Effect of Polarity and pH on the Chromatographic Behaviour of Some Angiotensin II Receptor Antagonists and Optimization of Their Determination in Pharmaceutical Dosage Forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53, 475-482.
- Demiralay, E.C., Koc, D., Daldal, Y.D., Cakır, C., 2012. Determination of chromatographic and Spectrophotometric Dissociation Constants of Some Beta Lactam Antibiotics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 71, 139-143.
- Deng, T-S., Marlow, F., 2012. Synthesis of Monodisperse Polystyrene@Vinyl-SiO<sub>2</sub> Core-Shell Particles and Hollow SiO<sub>2</sub> Spheres. *Chemistry of Materials*, 24(3), 536-542.
- Di, L., Kerns, E., 2016. *Drug-Like Properties, Concepts, Structure Design and Methods from ADME to Toxicity Optimization*, 2nd Edition. Academic Press, 580p, ABD.
- Di, L., Kerns, E.H., Carter, G.T., 2009. Drug-Like Property Concepts in Pharmaceutical Design. *Current Pharmaceutical Design*, 15, 2184-2194.
- Di, L., Kerns, E.H., Fan, K., McConnell, O.J., Carter, G.T., 2003. High Throughput Artificial Membrane Permeability Assay for Blood Brain Barrier. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38, 223-232.
- Dobrosotskaya, I.Y., Hammer, G.D., Schteingart, D.E., Maturen, K.E., Worden, F.P., 2011. Mebendazole Monotherapy and Long-term Disease Control in Metastatic Adrenocortical Carcinoma. *Endocrine Practice*, 17, e59-e62.

- Dolan, J., 2002. A Guide to HPLC and LC-MS Buffer Selection. Erişim tarihi: 15.08.2018.  
[https://www.hplc.eu/Downloads/ACE\\_Guide\\_BufferSelection.pdf](https://www.hplc.eu/Downloads/ACE_Guide_BufferSelection.pdf).
- Dominguez, L., Fagiolino, P., Gordon, S., Manta, E., 1995. Bioavailability Comparison between Albendazole and Albendazole Sulphoxide in Rats and Man. *II Farmaco*, 50(10), 697-702.
- Dorsey, J.G.; Khaledi, M.G. 1993. Hydrophobicity Estimations by Reversed-Phase Liquid Chromatography. Implications for Biological Partitioning Processes. *Journal of Chromatography A*, 656, 485-499.
- Doudican, N., Rodriguez, A., Osman, I., Orlow, S.J., 2008. Mebendazole Induces Apoptosis via Bcl-2 Inactivation in Chemoresistant Melanoma Cells. *Molecular Cancer Research*, 6(8), 1308-1315.
- Drugbank, 2010. Erişim tarihi: 01.01.2019.  
<https://www.drugbank.ca/drugs/DB00257>.
- Duque, M.D., Issa, M.G., Silva, D.A., Kakuda, B.A.S., Rodrigues, L.N.C., Löbenberg, R., Ferraz, H.G., 2017. Intrinsic dissolution simulation of highly and poorly soluble drugs for BCS solubility classification *Dissolution Technologies*, 24(4), 6-11.
- Eaton, D., Wilson, K., 1978. Reduction by Dithionite Ion of Adducts of Metmyoglobin with Imidazole, Pyridine, and Derivatives. *Journal of Biological Chemistry*, 253, 908-915.
- EPA, 1998. EPA Product Properties Test Guidelines, OPPTS 830.7840, Water Solubility: Column Elution Method; Shake Flask Method. OPPTS 830.7840.
- Erdemgil, F.Z., Sanli, S., Sanli, N., Ozkan, G., Barbosa, J., Guiteras J., Beltrán, J.L. 2007. Determination of pK<sub>a</sub> Values of Some Hydroxylated Benzoic Acids in Methanol-Water Binary Mixtures by LC Methodology and Potentiometry. *Talanta*, 72, 489-496.
- Ertuş, H., 2016. Analytical Method Validation in Cleaning and Personal Care Products. 3<sup>rd</sup> International Cleaning and Personal Care Products and Production Technologies Symposium and Exhibition, 3-5 November 2016, Tepekule, İzmir.
- Escher, B.I., Berger, C., Bramaz, N., Kwon, J-H., Richter, M., Tsinman, O., Avdeef, A., 2008. Membrane-Water Partitioning, Membrane Permeability, and Baseline Toxicity of the Parasiticides Ivermectin, Albendazole, and Morantel. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 27(4), 909-918.



- Espinosa, S., Bosch, E., Rosés, M., 2002. Retention of Ionizable Compounds on HPLC. 12. The Properties of Liquid Chromatography Buffers in Acetonitrile-Water Mobile Phases That Influence HPLC Retention. *Analytical Chemistry*, 74, 3809-3818.
- Ettre, L.S., Sakodynskii, K.I., 1993. M. S. Tswett and the Discovery of Chromatography I: Early Work (1899-1903). *Chromatographia*, 35, 3/4, 223-231.  
<http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/book.pdf>.
- Ettre, L.S., 2001. The Birth of Partition Chromatography. *LCGC North America*, 19, 5, 506-512.
- Ettre, L.S., 2003. M.S. Tswett and the Invention of Chromatography. *LCGC North America*, 21, 5, 458-467.
- Ettre, L.S., 2005. Jim Waters: The Development of GPC and the First HPLC Instruments. *LCGC North America*, 23, 8, 752-761.
- Ettre, L.S., Gehrke, C.W., 2006. The Development of the Amino Acid Analyzer. *LCGC North America*, 24, 4, 390-400.
- Ettre, L.S., 2007. The Rebirth of Chromatography 75 Years Ago. *LCGC North America*, 25, 7, 640-655.
- Fagerberg, J.H., Tsinman, O., Sun, N., Tsinman, K., Avdeef, A., Christel A. S. Bergström, C.A.S., 2010. Dissolution Rate and Apparent Solubility of Poorly Soluble Drugs in Biorelevant Dissolution Media. *Molecular Pharmaceutics*, 7(5), 1419-1430.
- Falkman, P., Åberg, C., Clemens, A., Sparr, E., 2011. Lyotropic Lipid Phases Confined in Cylindrical Pores: Structure and Permeability. *The Journal of Physical Chemistry B*, 115, 14450-14461.
- Faller, B., Wohnsland, F., 2001. Physicochemical Parameters as Tools in Drug Discovery and Lead Optimization. In Testa, B., van de Waterbeemd, H., Folkers, G., Guy, R., (Ed.), *Pharmacokinetic Optimization in Drug Research Biological Physicochemical and Computational Strategies* (257-274). Wiley-VHCA, Zurich. 642p, Zürich.
- FDA, 1994. Reviewer Guidance' Validation of Chromatographic Methods. Erişim tarihi: 02.12.2018.  
<https://www.fda.gov/downloads/drugs/guidances/ucm134409.pdf>.
- Fekete, S., Oláh, E., Jenő Fekete, J., 2012. Fast Liquid Chromatography: The Domination of Core-Shell and Very Fine Particles. *Journal of Chromatography A*, 1228, 57-71.

- Feng, M.R., 2002. Assessment of Blood-Brain Barrier Penetration: *In silico*, *in vitro* and *in vivo*. *Current Drug Metabolism*, 2002, 3, 647-657.
- Fischer, H., Gottschlich, R., Seelig, A., 1998. Blood-Brain Barrier Permeation: Molecular Parameters Governing Passive Diffusion. *The Journal of Membrane Biology*, 165 (3), 201-211.
- Fischer, M.J., Paulussen, J.J.C., Tollenaere, J.P., De Mol, N.J., Janssen, L.H., 1998. Structure-Activity Relationships of Astemizole Derivatives for Inhibition of Store Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Channels and Exocytosis. *European Journal of Pharmacology*, 350 (2-3), 353-361.
- Fraczkiewicz, R., 2013. In Silico Prediction of Ionization. In Testa, B., van de Waterbeemd, H., Reedijk, J. (Ed.), *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* (1-29), Waltham, MA.
- Francis, K., van Beek, J., Canova, C., Neal, J.W., Gasque, P., 2003. Innate Immunity and Brain Inflammation: The Key Role of Complement. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 5(15), 1-19.
- Fuguet, E., Ràfols, C., Bosch, E., Rosés, M., 2009. Fast High-throughput Method for the Determination of Acidity Constants by Capillary Electrophoresis I. Monoprotic Weak Acids and Bases. *Journal of Chromatography A*, 1216, 3646-3651.
- Furman, L., 2007. Reference Module in Biomedical Sciences, Methimazole, xPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference, 1-4.
- Gann, P.H., Neva, F.A., Gam, A.A., 1994. Randomized Trial of Single and Two-Dose Ivermectin versus Thiabendazole for Treatment of Strongyloidiasis. *The Journal of Infectious Diseases*, 169(5), 1076-1079.
- García-Ferreiro, R.E., Kerschensteiner, D., Major, F., Monje, F., Stühmer, W., Pardo, L.A., 2004. Mechanism of Block of hEag1  $\text{K}^+$  Channels by Imipramine and Astemizole. *Journal of General Physiology*, 124(4), 2004, 301-317.
- García-Quiroz, J., Camacho, J., 2011. Astemizole: an Old Anti-histamine as a New Promising Anti-Cancer Drug. *Anti Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 11(3), 307-314.
- García-Quiroz, J., García-Becerra, R., Santos-Martínez, N., Barrera, D., Ordaz-Rosado, D., Avila, E., Halhali, A., Villanueva, O., Ibarra-Sánchez, M.J., Esparza-López, J., Gamboa-Domínguez, A., Camacho, J., Larrea, F., Díaz, L., 2014. *In vivo* Dual Targeting of the Oncogenic *Ether-à-go-go-1* Potassium Channel by Calcitriol and Astemizole Results in Enhanced Antineoplastic Effects in Breast Tumors. *BMC Cancer*, 14, 745.

- Garrido, G., de Nogales, V., R'afols, C., Bosch, E., 2007. Acidity of Several Polyprotic Acids, Amiodarone and Quetiapine Hemifumarate in Pure Methanol. *Talanta*, 73, 115–120.
- Genovese, A., Spadaro, G., 1997. Highlights in Carditivasular Effects of Histamine and H<sub>1</sub>-receptor Antagonists. *Allergy*, 52(34 Suppl), 67-78.
- Ghasemi, J., Ahmadi, S., Mikael Kubista, M., Forootan, A., 2003. Determination of Acidity Constants of 4-(2-Pyridylazo) resorcinol in Binary Acetonitrile + Water Mixtures. *Journal of Chemical Engineering Data*, 48, 1178-1182.
- Ghosh, A.K., Brindisi, M., J., 2015. Organic Carbamates in Drug Design and Medicinal Chemistry. *Journal of Medicinal Chemistry*, 58, 2895-2940.
- Giaginis, C., Anna Tsantili-Kakoulidou, A., 2008. Current State of the Art in HPLC Methodology for Lipophilicity Assessment of Basic Drugs. A Review. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 31, 79–96.
- Goldstein, G.W., Betz, A.L., 1986. The Blood-Brain Barrier. *Scientific American*, 255, 74-83.
- Gratton, J.A., Abraham, M.H., Bradbury, M.W., Chadha, H.S., 1997. Drug Transfer across Barrier Molecular Factors Influencing the Blood-Brain Barrier. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 49, 1211-1216.
- Greenspan, F.S., Dong, B.J., 1998. Thyroid and Antithyroid Drugs. In Katzung, B.G. (Ed.), *Basic and Clinical Pharmacology* (619-634). Appleton & Lange, 1151p, Stanford.
- Grove, D.I., 1982. Treatment of Strongyloidiasis with Thiabendazole: Toxicity and Effectiveness. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 76(1), 114-118.
- Grove, D.I., 1996. Human Strongyloidiasis. *Advances in Parasitology*, 38, 251-309.
- Guiochona, G., Gritti, F., 2011. Shell Particles, Trials, Tribulations and Triumphs. *Journal of Chromatography A*, 1218, 1915–1938.
- Gumustas, M., Kurbanoglu, S., Uslu, B., Özkan, S.A., 2013. UPLC versus HPLC on Drug Analysis: Advantageous, Applications and Their Validation Parameters. *Chromatographia*, 76, 1365–1427.
- Gündüz, T., 2007. İnrümental Analiz. Gazi Kitabevi Tic. Ltd. Şti, 1357s, Ankara.
- Gündüz, T., 2010. Kimyacılar İçin İstatistik. Gazi Kitabevi, 292s, Ankara.

- Hájková, R., Sklenářová, H., Matysová, L., Švecová, P., Solich, P., 2007. Development and Validation of HPLC Method for Determination of Clotrimazole and Its Two Degradation Products in Spray Formulation. *Talanta*, 73, 483–489.
- Halliday, R.G., Drasdo, A.L., Lumley, C.E., Stuart R. Walker, S.R., 1997. The Allocation of Resources for R&D in the World's Leading Pharmaceutical Companies. *R&D Management*, 27(1), 63-77.
- Hamoudová, R., Pospíšilová, M., Kavalířová, A., Solich, P., Sícha, J., 2006. Separation and determination of Clotrimazole, Methylparaben and Propylparaben in Pharmaceutical Preparation by Micellar Electrokinetic Chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 40, 215–219.
- Hansch, C., Fujita, T., 1964.  $\rho$ - $\sigma$ - $\Pi$  Analysis. A Method for the Correlation of Biological Activity and Chemical Structure. *Journal of the American Chemical Society*, 86(8), 1616-1626.
- Hansch, C., Leo, A., 1995. *Exploring QSAR: Fundamentals and Applications in Chemistry and Biology*. Washington DC.
- Hansen, C.M., 1967. The three dimensional solubility parameter and solvent diffusion coefficient. Their importance in Surface Coating Formulation. Copenhagen Danish Technical Press, PhD, 106p, Copenhagen.
- Hansen, D.K., Scott, D.O., Otis, K.W., Lunte, S.M., 2002. Comparison of in vitro BBMEC Permeability and in vivo CNS Uptake by Microdialysis Sampling. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 27, 945–958.
- Harris, D.C., 2011. *Nicel Kimyasal Analiz*. Çev. Türker, A.R. Palme Yayıncılık, 719s, Ankara.
- Hayes, R., Ahmed, A., Edge, T., Zhang, Z., 2014. Core-shell particles: Preparation, Fundamentals and Applications in High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1357, 36–52.
- Heath, D.D., Chevis, R.A.F., 1974. Mebendazole and Hydatid Cysts. *The Lancet*, 304, 7874, 218-219.
- Hegyí, G., Kardos, J., Kovács, M., Málnási-Csizmadia, A., Nyitray, L., Pál, G., Radnai, L., Reményi, A., Venekei, I., 2013. *Introduction to Practical Biochemistry*. Erişim tarihi: 02.09.2018.
- Hegyí, G., Kovács, M., 2016. Chapter 6. Chromatographic Methods. Erişim tarihi: 03.09.2018. <http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/IntroductionToPracticalBiochemistry/ch06.html>.

- Henchoz, Y., Bard, B., Guillarme, D., Carrup, P-A., Veuthey, J-L., Martel, S., 2009. Analytical tools for the physicochemical profiling of drug candidates to predict absorption/distribution. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394, 707–729.
- Henchoz, Y., Bard, B., Guillarme, D., Carrupt, P-A., Veuthey, J-L., Martel, S., 2009. Analytical Tools for the Physicochemical Profiling of Drug Candidates to Predict Absorption/Distribution. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 394, 707–729.
- Henderson, L.J., 1908. The Theory of Neutrality Regulation in the Animal Organism. *American Journal of Physiology*, 21(4), 427–448.
- Herrero-Martínez, J.M., Méndez, A., Bosch, E., Rosés, M., 2004. Characterization of the Acidity of Residual Silanol Groups in Microparticulate and Monolithic Reversed-phase Columns. *Journal of Chromatography A*, 1060, 135–145.
- Higuchi, T., Shih, F.L., Kimura, T., Rytting, J.H., 1979. Solubility Determination of Barely Aqueous-Soluble Organic Solids. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 68 (10), 1267-1272.
- Hildebrand, J.H., 1949. A critique of the Theory of Solubility of Non-Electrolytes. *Chemical Reviews*, 44, 37-45.
- Hitchcock, C.A., Dickinson, K., Brown, S.B., Evans, E.G.V., Adams, D.J., 1990. Interaction of Azole Antifungal Antibiotics with Cytochrome P-450-Dependent 14 $\alpha$ -sterol Demethylase Purified from *Candida albicans*. *Biochemical Journal*, 266, 475-480.
- Ho, J., 2011. Predicting pK<sub>a</sub>: Theory and Applications. Australian National University, PhD Thesis, 711p, Australia.
- Hollosi, L., 2005. Development and Application of Analytical Methods for the Determination of Methimazole and its Metabolites and their Effects to Thyroid Homeostasis in Zebrafish (*D. rerio*). Technische Universität München, Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt, PhD Thesis, 206p, Germany.
- Hoogerheide, J.G., Wyka, B.E., 1982. Clotrimazole. *Analytical Profiles of Drug Substances*, 11, 225-255.
- Hoogerheide, J.G., Wyka, B.E., 1982. Clotrimazole. In Florey, K. (Ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances* (225-255). 665p, Academic Press, New York.
- Horton, R.J., 1990. Benzimidazoles in a Wormy World. *Parasitology Today*, 6(4), 106.

- Horton, J., 2000. Albendazole: A Review of Anthelmintic Efficacy and Safety in Humans. *Parasitology*, 121, S113–S132.
- Horvat, A.J.M., Petrović, M., Babić, S., Pavlović, D.M., As̃perger, D., Pelko, S., Mance, A.D., Kas̃telan-Macan, M., 2012. Analysis, Occurrence and Fate of Anthelmintics and Their Transformation Products in the Environment. *Trends in Analytical Chemistry*, 31, 61-84.
- Horvath, C., Melander, W., Molnar, I., 1976. Solvophobic Interactions in Liquid Chromatography with Nonpolar Stationary Phases. *Journal of Chromatography A*, 125, 1976, 129-156.
- Horvath, C., Melander, W.R., 1977. Liquid Chromatography with Hydrocarbonaceous Bonded Phase; Theory and Practice of Reversed Phase Chromatography, *Journal of chromatographic Science*, 15 (9), 393-404.
- Huang, Q., Yu, Y., Tang, C., Xianzhi Peng, X., 2010. Determination of Commonly Used Azole Antifungals in Various Waters and Sewage Sludge Using Ultra - High Performance Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1217, 3481–3488.
- Huang, Z., Raychowdhury, M.K., Waxman, D.J., 2000. Impact of Liver P450 Reductase Suppression on Cyclophosphamide Activation, Pharmacokinetics and Antitumoral Activity in a Cytochrome P450-Based Cancer Gene Therapy Model. *Cancer Gene Therapy*, 2000, 7(7), 1034-1042.
- ICH, 2005. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2(R1). Erişim Tarihi: 22.11.2018.  
[https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q2\\_R1/Step4/Q2\\_R1\\_Guideline.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q2_R1/Step4/Q2_R1_Guideline.pdf)
- Insin, N., Tracy, J.B., Lee, H., Zimmer, J.P., Westervelt, R.W., Bawendi, M.G., 2008. Incorporation of Iron Oxide Nanoparticles and Quantum Dots into Silica Microspheres. *ACS Nano*, 2 (2), 197–202.
- Izumi-Nakaseko, H., Nakamura, Y., Cao, X., Wada, T., Ando, K., Sugiyama, A., 2016. Possibility as an Anti-Cancer Drug of Astemizole: Evaluation of Arrhythmogenicity by the Chronic Atrioventricular Block Canine Model. *Journal of Pharmacological Sciences*, 131, 150-153.
- Jackson, P.T., Schure, M.R., Weber, T.P., Carr, P.W., 1997. Intermolecular Interactions Involved in Solute Retention on Carbon Media in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Analytical Chemistry*, 69, 416-425.

- Janicka, M., Sztanke, M., Sztanke, K., 2013. Reversed-Phase Liquid Chromatography with Octadecylsilyl, Immobilized Artificial Membrane and Cholesterol Columns in Correlation Studies with in Silico Biological Descriptors of Newly Synthesized Antiproliferative and Analgesic Active Compounds. *Journal of Chromatography A*, 1318, 92–101.
- Jano, I., Hardcastle, J.E., 1999. General equation for Determining the Dissociation Constants of Polyprotic Acids and Bases from Additive Properties. Part I. Theory. *Analytica Chimica Acta*, 390, 261-266.
- Jiménez-Lozano, E., Marqués, I. Barrón, D., Beltrán, J.L., Barbosa, J., 2002. Determination of pK<sub>a</sub> Values of Quinolones from Mobility and Spectroscopic Data Obtained by Capillary Electrophoresis and a Diode Array Detector. *Analytica Chimica Acta*, 464, 1, 37-45.
- Jiménez-Lozano, E., Marqués, I., Barrón, D., Beltrán, J.L., Barbosa, J., 2002. Determination of pK<sub>a</sub> Values of Quinolones from Mobility and Spectroscopic Data Obtained by Capillary Electrophoresis and a Diode Array Detector. *Analytica Chimica Acta*, 464(1), 37-45.
- Joffe, L.S., Schneider, R., Lopes, W., Azevedo, R., Staats, C.C., Kmetzsch, L., Augusto Schrank, A., Del Poeta, M., Vainstein, M.H., Rodrigues, M.L., 2017. The Anti-helminthic Compound Mebendazole Has Multiple Antifungal Effects against *Cryptococcus neoformans*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 535.
- Johnston, F.H., Morris, P.S., Speare, R., McCarthy, J., Currie, B., Ewald, D., Wendy Page, W., Dempsey, K., 2005. Strongyloidiasis: A Review of the Evidence for Australian Practitioners. *Australian Journal of Rural Health*, 13, 247–254.
- Jouyban A. 2009. *Handbook of Solubility Data for Pharmaceuticals*. CRC Press, Boca Raton, 2009.
- Jouyban, A., Soltani, S., 2012. Blood Brain Barrier Permeation. Acree, B., (Ed.) In *Toxicity and Drug Testing* (1-23). InTech Europe, 528p, Hrvatistan.
- Jouyban, A., Fakhree, M.A.A., 2012. Experimental and Computational Methods Pertaining to Drug Solubility. In Acree, B. (Ed.), *Toxicity and Drug Testing* (187-220). InTech Publishers, 528p, ABD.
- Jungh., M, Garcia, L., Fuentes, I., Moreno-Esparza, R., 1998. Absorption Studies of Albendazole and Some Physicochemical Properties of the Drug and its Metabolite Albendazole Sulphoxide. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50, 43-48.
- Kadilar, Ö., Bozkurt, B., Karakeçe, E., Kaya, T., Çiftçi, İ.H., Tamer, A., 2015. Rare Case of *Strongyloides stercoralis* with Vitamin B12 Deficiency. *Türkiye Parazitoloji Dergisi*, 39, 238-240.

- Kamlet, M.J., Taft, R.W., 1976. The Solvatochromic Comparison Method. I. The  $\beta$  Scale of Solvent Hydrogen-Bond Acceptor (HBA) Basicities. *Journal of American Chemical Society*, 98(2), 377–383.
- Kamlet, M.J., Abboud, J-L.M., Abraham, M.H., Taft, R.W., 1983. Linear Solvation Energy Relationships. 23. A Comprehensive Collection of the Solvatochromic Parameters,  $\pi^*$ ,  $\alpha$ , and  $\beta$ , and Some Methods for Simplifying the Generalized Solvatochromic Equation. *Journal of Organic Chemistry*, 48, 2877-2887.
- Kapoor, V.K., 1987. Thiabendazole. In Florey, K. (Ed.), *Analytical Profiles of Drug Substances* (611-639). Academic Press, 802 p, Amerika.
- Karch, K., Sebestian, I., Halász, I., Engelhardt, H., 1976. Optimization of Reversed-Phase Separations. *Journal of Chromatography A*, 122, 171-184.
- Karls, M.S., Rush, B.D., Wilkinson, K.F., Vidmar, T.J., Burton, P.S., Ruwart. M.J., 1991. Desolvation Energy: A Major Determinant of Absorption, but not Clearance, of Peptides in Rats. *Pharmaceutical Research*, 8(12), 1477-1481.
- Kasim, N.A., Whitehouse, M., Ramachandran, C., Bermejo, M., Lennernas, H., Hussain, A.S., Junginger, H.E., Stavchansky, S.A., Midha, K.K., Shah, V.P., Amidon, G.L., 2003. Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. *Molecular Pharmaceutics*, 1(1), 85-96.
- Kasper, L., Miramón P., Jablonowski, N., Wisgott, S., Wilson, D., Brunke, S., Hube, B., 2015. Antifungal Activity of Clotrimazole Against *Candida Albicans* Depends on Carbon Sources, Growth Phase and Morphology. *Journal of Medical Microbiology*, 64, 714–723.
- Kerns, E.H., 2001. High Throughput Physicochemical Profiling for Drug Discovery. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90, 11, 1838-1858.
- Kerns, E.H., Di, L., 2004. Physicochemical Profiling: Overview of the Screens. *Drug Discovery Today: Technologies*, 1 (4), 343-348.
- Kerns, E.H., Di, L., 2008. *Drug-like Properties: Concepts, Structure Design and Methods: From ADME to Toxicity Optimization*. Academic Press, 527p, ABD.
- Khalilzadeh, A., Wangoo, K.T., Morris, D.L., Pourgholami, M.H., 2007. Epothilone-Paclitaxel Resistant Leukemic Cells CEM/dEpoB300 are Sensitive to Albendazole: Involvement of Apoptotic Pathways. *Biochemical Pharmacology*, 74, 407–414.



- Kibbey, C.E., Poole, S.K., Robinson, B., Jackson, J.D., Durham, D., 2001. An Integrated Process for Measuring the Physicochemical Properties of Drug Candidates in a Preclinical Discovery Environment. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 90 (8),1164-1175.
- Kim, Y., Liemmawal, E.D., Pourgholami, M.H., Morris, D.L., Stenzel, M.H., 2012. Comparison of Shell-Cross-Linked Micelles with Soft and Glassy Difference in Performance? Cores as a Drug Delivery Vehicle for Albendazole: Is There a Difference in Performance. *Macromolecules*, 45, 5451–5462.
- Kirkland. J.J., 1992. Superficially Porous Silica Microspheres for the Fast High - Performance Liquid Chromatography of Macromolecules *Analytical Chemistry*, 64, 1239-1245.
- Koner, A.L., Ghosh, I., Saleh, N., Nau, W.M., 2011. Supramolecular encapsulation of benzimidazole-derived drugs by cucurbit [7] uril. *Canadian Journal of Chemistry*, 89, 139–147.
- Kong, D., Chi, Y., Chen, L., Dong, Y., Zhang, L., Chen, G., 2009. Determination of Thyreostatics in Animal Feeds by CE with Electrochemical Detector. *Electrophoresis*, 30(19), 3489-3495.
- Krämer, S.D., 1999. Absorption prediction from physicochemical parameters. *Pharmaceutical Science & Technology Today*, 2(9), 373-380.
- Kubik, L., Struck-Lewicka, W., Kaliszan, R., Wiczling, 2015. Simultaneous Determination of Hydrophobicity and Dissociation Constant for a Large Set of Compounds by Gradient Reverse Phase High Performance Liquid Chromatography–Mass Spectrometry Technique. *Journal of Chromatography A*, 1416, 31-37.
- Kulik, A., Bialecka, W., Podolska, M., Kwiatkowska-Puchniarz, B., and Mazurek, A., 2011. HPLC Method for Identification and Quantification of Benzimidazole Derivatives in Antiparasitic Drugs. *Acta Poloniae Pharmaceutica-Drug Research*, 68 (6), 823-829).
- Kümmerer, K., Al-Ahmad, A., Mersch-Sundermann, V., 2000. Biodegradability of Some Antibiotics, Elimination of the Genotoxicity and Affection of Wastewater Bacteria in a Simple Test. *Chemosphere*, 40, 701-710.
- Kuselman I, Sherman, F., 1999. Assessment of Limits of Detection and Quantitation Using Calculation of Uncertainty in a New Method for Water Determination. *Accreditation and Quality Assurance*, 4, 124-128.
- Kusmieriek, K., Bald, E., 2007. Determination of Methimazole in Urine by Liquid Chromatography. *Talanta*, 71, 2121–2125.

- Kwon-Chung, K.J., Fraser, J.A., Doering, T.L., Wang, Z.A., Janbon, G., Idnurm, A., Bahn, Y., 2014. *Cryptococcus neoformans and Cryptococcus gattii*, the Etiologic Agents of Cryptococcosis. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 4, a019760.
- Laak, T.A.M., Tsai, R.S., Donne-Op den Kelder, G.M., Carrupt, P.A., Testa, B., 1994. Lipophilicity and Hydrogen-Bonding Capacity of H<sub>1</sub>-Antihistaminic Agents in Relation to Their Central Sedative Side-Effects. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 2, 373-384.
- Lacey, E., 1988. The Role of the Cytoskeletal Protein, Tubulin, in the Mode of Action and Mechanism of Drug Resistance to Benzimidazoles. International Journal for Parasitology, 18(7), 885-936.
- Laduron, P.M., Janssen, P.F., Gommeren, W., Leysen, J.E., 1982. *In vitro* and *In vivo* Binding Characteristic of a New Long-acting Histamine H<sub>1</sub> Antagonist, Astemizole. Molecular Pharmacology, 21, 294-300.
- Lanusse, C. E., Nare, B., Gascon, L.H., Prichard, R.K., 1992. Metabolism of Albendazole and Albendazole Sulphoxide by Ruminal and Intestinal Fluids of Sheep and Cattle. Xenobiotica, 22, 4, 419-426.
- Larsen, A.R., Bai, R., Chung, J.H., Borodovsky, A., Rudin, C.M., Riggins, G.J., Bunz, F., 2015. Repurposing the Antihelmintic Mebendazole as a Hedgehog Inhibitor. Molecular Cancer Therapy, 14(1), 3-13.
- Lauwo, J.A.K., 1985. Effect of Particle Size and Excipients on the Dissolution Rate of Metronidazole from Solid Dosage Forms: I. Drug Development and Industrial Pharmacy, 11(8), 1565-1576.
- LCGC, 2010. Erişim tarihi: 02.12.2018.  
<http://www.chromatographyonline.com/enhancing-signal-noise>.
- LCresources, 2016. Erişim tarihi: 21.08.2018.  
<http://www.lcresources.com/resources/getstart/c.html>
- Leahy, D.E., Morris, J.J., Taylor, P.J., Wait, A.R., 1992. Model Solvent Systems for QSAR. Part 3. An LSER Analysis of the 'Critical Quartet.' New Light on Hydrogen Bond Strength and Directionality. Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2, 4, 705-722.
- Lee, Y-W., So, M.S., Lee, J.W., Chung, S.T., Row, K.H., 1996. Retention Models of Capacity Factor with Different Compositions of Organic Modifier in RP-HPLC. Korean Journal of Chemical Engineering, 1996, 13(6), 578-584.
- Lennernäs, H., 1995. Does Fluid Flow Across the Intestinal Mucosa Affect Quantitative Oral Drug Absorption? Is It Time for a Reevaluation? Pharmaceutical Research, 1995, 12, 11, 1573-1582.

- Leo, A., Hansch, C., Elkins, D., 1971. Partition Coefficients and Their Uses. *Chemical Reviews*, 71 (6), 525-616.
- Leuner, C., Dressman, J., 2000. Improving Drug Solubility for Oral Delivery Using Solid Dispersions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 50(1):47-60.
- Leurs, R., Church, M.K., Taglialatela, M., 2002. H1-antihistamines: Inverse Agonism, Anti-inflammatory Actions and Cardiac Effects. *Clinical and Experimental Allergy*, 32, 489-498.
- Levin, V.A., 1980. Relationship of Octanol/Water Partition Coefficient and Molecular Weight to Rat Brain Capillary Permeability. *Journal of Medicinal Chemistry*, 23 (6), 682-684.
- Lipinski, C.A., 2000. Drug-Like Properties and the Causes of Poor Solubility and Poor Permeability. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 44, 235-249.
- 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 Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23 (1-3), 3-25.
- 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 Settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 3-26.
- Lipinski, C.A., 2004. Lead and Drug-Like Compounds: The Rule-of-Five Revolution Drug Discovery Today: *Technologies*, 1, 4, 2004, Pages 337-341.
- 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, 51-59.
- Liu, J., Qiao, S. Z., Chen, J.S., Lou, X.W.D., Xing, X., Lu, G.Q.M., 2011. Yolk/Shell Nanoparticles: New Platforms for Nanoreactors, Drug Delivery and Lithium-Ion Batteries. *Chemical Communications*, 47, 12578-12591.
- Llinàs, A., Glen, R.C., Goodman, J.M., 2008. Solubility Challenge: Can You Predict Solubilities of 32 Molecules Using a Database of 100 Reliable Measurements? *Journal of Chemical Information and Modeling*, 48, 1289-1303.
- LoBrutto, R., 2000. Retention of Ionizable Compounds in HPLC. Seton Hall University, PhD thesis, 488p, New Jersey.

- Lombardo, F., Blake, J.F., Curatolo, W., 1996. Computation of Brain-Blood Partitioning of Organic Solutes via Free Energy Calculations. *Journal of Medicinal Chemistry*, 39, 4750-4755.
- Lombardo, F., Shalaeva, M.Y., Tupper, K.A., Gao, F., Abraham, M.H., 2000. ElogPoct: A Tool for Lipophilicity Determination in Drug Discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 43, 2922-2928.
- Ludwig, J., Terlau, H., Wunder, F., Bruggemann, Pardo, L.A., Marquardt, A., Stuhmer, W., Pongs, O., 1994. Functional Expression of a Rat Homologue of the Voltage Gated ether á go-go Potassium Channel Reveals Differences in Selectivity and Activation Kinetics between the Drosophila Channel and its Mammalian Counterpart. *The EMBO Journal*, 13(19), 4451-4458.
- Lupetti, A., Danesi, R., Campa, M., Del Tacca, M., Kelly, S., 2002. Molecular Basis of Resistance to Azole Antifungals. *Trends in Molecular Medicine* 8(2), 76-81.
- Maisonneuve, H., Rossignol, J.F., Addo, A., Mojon, M., 1985. Ovicidal Effects of Albendazole in Human Ascariasis, Ancylostomiasis and Trichuriasis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 79 (I), 79-82.
- Manallack, D.T., 2007. The pK<sub>a</sub> Distribution of Drugs: Application to Drug Discovery. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 1, 25-38.
- Manna, D., Roy, G., Mugesh, G., 2013. Antithyroid Drugs and Their Analogues: Synthesis, Structure, and Mechanism of Action. *Accounts of Chemical Research*, 46 (11), 2706-2715.
- Mannhold, R., Poda, G.I., Ostermann, C., Tetko, I.V., 2009. Calculation of Molecular Lipophilicity: State-of-the-Art and Comparison of LogP Methods on More than 96,000 Compounds. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 98, 861-893.
- Martarelli, D., Pompei, P., Baldi, C. Mazzoni, G., 2008. Mebendazole Inhibits Growth of Human Adrenocortical Carcinoma Cell Lines Implanted in Nude Mice. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 61, 809-817.
- Mayer, J.M., Van de Waterbeemd, H., 1985. Development of Quantitative Structure Pharmacokinetic Relationships. *Environmental Health Perspectives*, 61, 295-306.
- McCormick, R.M., ve Karger, B.L., 1980. Distribution Phenomena of Mobile-Phase Components and Determination of Dead Volume in Reversed-Phase Liquid Chromatography *Analytical Chemistry*, 52(14), 2249-2257.

- McGowan, J.C., 1984. The Estimation of Solubility Parameters and Related Properties of Liquids. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 34A, 38-42.
- Merisko-Liversidge, E., Liversidge, G.G., Cooper, E.R., 2003. Nanosizing: A Formulation Approach for Poorly-Water-Soluble Compounds. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 18 (2), 113-120.
- Meulemans, A. Manuel, C., Ferriere, C., Valpillat, M., 1980. Determination of Methimazole in Plasma by High Performance Liquid Chromatography. *Journal of Liquid Chromatography* 3(2), 287-298.
- Meyer, H., 1899. *Arct Experimental Pathology and Pharmacology*, 42, 109-118.
- Milletti, F., Storchi, L., Goracci, L., Bendels, S., Wagner, B., Kansy, M., Crucian, G., 2010. Extending pK<sub>a</sub> Prediction Accuracy: High-throughput pK<sub>a</sub> Measurements to Understand pK<sub>a</sub> Modulation of New Chemical Series. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 45, 4270-4279.
- Molina-Hernández, A., Néstor Fabián Díaz, N.F., Arias-Montaño, J.A., 2012. Histamine in Brain Development, *Journal of Neurochemistry*, 122, 872-882.
- Mukhopadhyay, T., Sasaki, J., Ramesh, R., Roth, J.A., 2002. Mebendazole Elicits a Potent Antitumor Effect on Human Cancer Cell Lines both *in vitro* and *in vivo*. *Clinical Cancer Research*, 8, 2963-2969.
- Müller, C., Leontin, D., Chis, V., Pînzaru, S.C., 2014. Detection of Thiabendazole Applied on Citrus Fruits and Bananas Using Surface Enhanced Raman Scattering. *Food Chemistry*, 145, 814-820.
- Mycek, M.J., Harvey, R.A., Champe, P.C., 2001. *Lippincott's Illustrated Reviews: Farmakoloji*. Çev. Zergeroğlu, S., Zergeroğlu, M. Güneş Kitabevi Ltd. Şti, 514s, Ankara.
- Nasal, A., Kaliszan, R., 2006. *Current Computer Aided Drug Design*, 2, (4), 327-340.
- Nielsen, L.S., Slök, H., Bundgaard, H., 1994. N-Alkoxy-carbonyl Prodrugs of Mebendazole with Increased Water Solubility. *International Journal of Pharmaceutics*, 102, 231-239.
- Niper Pharma Analysis, 2015. Erişim tarihi: 03.09.2018.  
<https://www.slideshare.net/patil17/hplc-by-niper-pharma-analysis>.
- Nygren, P., Larsson, R., 2014. Drug Repositioning from Bench to Bedside: Tumour Remission by the Antihelminthic Drug Mebendazole in Refractory Metastatic Colon Cancer. *Acta Oncologica*, 53(3), 427-428.

- OECD, OECD Guideline for the Testing of Chemicals. Partition Coefficient (n-octanol/water): Shake Flask Method. 1995. Erişim tarihi: 09.12.2018. <https://www.oecd-ilibrary.org/docserver/9789264069626-en.pdf?expires=1544345900&id=id&accname=oid016331&checksum=A29F200590066A6C077DE51694B88B8A>.
- OSPAR Commission (2005). Open background documentation on clotrimazole; publication no 2005/199.
- Österberg, T., Svensson, M., Lundahl, P., 2001. Chromatographic Retention of Drug Molecules on Immobilised Liposomes Prepared from Egg Phospholipids and from Chemically Pure Phospholipids. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 12, 427–439.
- Overton, E., 1901. Studien über die Narkose, zugleich ein Beitrag Zur Allgemeinen Pharmakologie. Fischer Verlag, Jena.
- Özkan, E., 2017. Down Sendromunun Tanısına Yönelik Seçilmiş Metabolitlerin Gaz Kromatografisi Kütle Spektrometrisi ile Tayini. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, YL Tezi, 120s, Ankara.
- Özkan, S., 2018. Analytical Method Validation: The Importance for Pharmaceutical Analysis. *Pharmaceutical Sciences*, 24, 1-2.
- Özkan, S.A., Kauffmann, J-M., Zuman, P., 2015. *Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences: Voltammetry, Amperometry, Biosensors, Applications (Monographs in Electrochemistry)*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 350p, Almanya.
- Pallas Software Version 3.0, 2007. CompuDrug International Inc., Grandview Drive, South San Francisco, CA 94080, USA.
- Pallicer, J.M., Rosés, M., Ràfols, C., Bosch, E., Pascual, R., Port, A., 2014. Evaluation of log  $P_{o/w}$  Values of Drugs from Some Molecular Structure Calculation Software. *ADMET & DMPK*, 2(2), 107-114.
- Palomares, F., Guadalupe Palencia, G., Ambrosio, J.R., Ortiz, A., Jung-Cook, H., 2006. Evaluation of the Efficacy of Albendazole Sulphoxide and Praziquantel in Combination on *Taenia Crassiceps* cysts: in Vitro Studies. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 57, 482–488.
- Pardridge, W.M., 2002. Drug and Gene Targeting to the Brain with Molecular Trojan Horses. *Nature Reviews Drug Discovery*, 1, 131–139.
- Pardridge, W.M., 2012. Drug transport across the blood–brain barrier. *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 32, 1959–1972.

- Park, J.H., Chae, J.H., Nah, T.H., Jang, M.D., 1994. Characterization of Some Silica-Based Reversed-Phase Liquid Chromatographic Columns Based on Linear Solvation Energy Relationships. *Journal of Chromatography A*, 664, 149-158.
- Pascoe, R.J., Masucci, J.A., Foley, J.P., 2006. Investigation of Vesicle Electrokinetic Chromatography as an *in vitro* Assay for the Estimation of Intestinal Permeability of Pharmaceutical Drug Candidates. *Electrophoresis*, 27, 793-804.
- Paulekuhn, G.S., Dressman, J. B., Saal, C., 2013. Salt Screening and Characterization for Poorly Soluble, Weak Basic Compounds: Case Study Albendazole. *Pharmazie*, 68, 555-564.
- Pauletti, G.M., Wunderli-Allenspach, H., 1994. Partition Coefficients *in vitro*: Artificial Membranes as a Standardized Distribution Model. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1, 273-282.
- Perrin, D. D., 1965. *Dissociation Constants of Organic Bases in Aqueous Solution*. Butterworth, Washington, D.C.
- Petrucci, R.H., Harwood, W.S., Herring, F.G., 2002. Genel Kimya, İlkeler ve Modern Uygulamalar 2. Çev. Uyar, T., Aksoy, S. Palme Yayıncılık, 1160s, Ankara.
- Pinto, L.C., Soares, B.M., Pinheiro, J.J., Riggins, G.J., Assumpção, P.P., Burbano, R.M., Montenegro, R.C., 2015. The Anthelmintic Drug Mebendazole Inhibits Growth, Migration and Invasion in Gastric Cancer Cell Model. *Toxicology in Vitro*, 29, 2038-2044.
- Platts, J.A., Abraham, M.H., Zhao, Y.H., Hersey, A., Ijaz, L., Butin, D., 2001. Correlation and Prediction of a Large Blood-Brain Distribution Data Set—an LFER Study. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 36, 719-730.
- Poole, C.F., Atapattu, S.N., Poole, S.K., Bell, A.K., 2009. Determination of Solute Descriptors by Chromatographic Methods. *Analytica Chimica Acta*, 652, 32-53.
- Poole, C.F., Ariyasena, T.C., Lenc, N., 2013. Estimation of the Environmental Properties of Compounds from Chromatographic Measurements and the Solvation Parameter Model. *Journal of Chromatography A*, 1317, 85- 104.
- Poulsen, L.L., Hyslop, R.M., Ziegler, D.M., 1979. S-Oxygenation of N-substituted Thioureas Catalyzed by the Pig Liver Microsomal FAD-Containing Monooxygenase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 198 (1), 78-88.

- Pourgholami, M.H., Akhter, J., Wang, L., Lu, Y., Morris, D.L., 2005. Antitumor Activity of Albendazole against the Human Colorectal Cancer Cell Line HT-29: *in vitro* and in a Xenograft Model of Peritoneal Carcinomatosis.
- Pourgholami, M.H., Cai, Z.Y., Lu, Y., Wang, L., Morris, D.L., 2006. Albendazole: a Potent Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor and Malignant Ascites Formation in OVCAR-3 Tumor-Bearing Nude Mice. *Clinical Cancer Research*, 12(6), 1928-1935.
- Pourgholami, M.H., Woon, L., Almajid, R., Akhter, J., Bowery, P., Morris, D.L., 2001. *In vitro* and *in vivo* Suppression of Growth of Hepatocellular Carcinoma Cells by Albendazole. *Cancer Letters* 165 (1), 43-49.
- Pranker, R.J. 2007. Critical compilation of  $pK_a$  Values for Pharmaceutical Substances. Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology. In Brittain, H.G. (Ed.), Profiles of Drug Substances, Excipients, and Related Methodology (1-725). Academic Press, ABD.
- Prochazkova, A., Chouki, M., Theurillat, R., Thormann, W., 2000. Therapeutic Drug Monitoring of Albendazole: Determination of Albendazole, Albendazole Sulfoxide, and Albendazole Sulfone in Human Plasma Using Nonaqueous Capillary Electrophoresis. *Electrophoresis*, 21, 729-736.
- Pubchem, 2018. Erişim tarihi: 11.01.2019. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/L-histidine#section=Top>
- Ràfols, C., Subirats, X., Rubio, X., Rosés, M., Bosch, E., 2017. Lipophilicity of Amphoteric and Zwitterionic Compounds: A Comparative Study of Determination Methods. *Talanta*, 162, 293-299.
- Rahmatinia, Z., Rahmatinia, M., 2018. Removal of the Metronidazole from Aqueous Solution by Heterogeneous Electro-Fenton Process Using Nano-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>. Data in Brief, In Press.
- Ran, Y., Jain, N., Yalkowsky, S.H., 2001. Prediction of Aqueous Solubility of Organic Compounds by the General Solubility Equation (GSE). *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2001, 41, 1208-1217.
- Rankovic, Z., 2017. CNS Physicochemical Property Space Shaped by a Diverse Set of Molecules with Experimentally Determined Exposure in the Mouse Brain. *Journal of Medicinal Chemistry*, 60, 5943-5954.
- Redfern, W.S., Carlsson, L., Davis, A.S., Lynch, W.G., MacKenzie, I., Palethorpe, S., Siegl, P.K.S., Strang, I., Sullivan, A.T., Wallis, R., Camm, A.J., Hammond, T.G., 2003. Relationships between Preclinical Cardiac Electrophysiology, Clinical QT Interval Prolongation and Torsade de Pointes for a Broad Range of Drugs: Evidence for a Provisional Safety Margin in Drug Development. *Cardiovascular Research*, 58, 32-45.



- Reichel, A., Begley, D.J., 1998. Potential of Immobilized Artificial Membranes for Predicting Drug Penetration across the Blood-Brain Barrier. *Pharmaceutical Research*, 15, 8, 1270-1274.
- Richardson, M.D., 2005. Changing Patterns and Trends in Systemic Fungal Infections. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 56, Suppl. S1, i5-i11.
- Riley, C.M., Rosanske, T.W., (Ed.), 1996. Development and Validation of Analytical Methods. *Progress in Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. Elsevier Science Inc., 352p, ABD.
- Rivera, J.C., Y'opez-Mulia, L., Hernandez-Campos, A., Moreno-Esparza, R., Castillo, R., Navarrete-Vazquez, 'G., Fuentes-Noriega', I., Jung-Cook, H., 2007. Biopharmaceutic evaluation of novel anthelmintic (1H-benzimidazol-5(6)-yl) carboxamide derivatives. *International Journal of Pharmaceutics*, 343, 159-165.
- Rivera-Utrilla, J., Prados-Joya, G., Sánchez-Polo, M.M.A., Ferro-García, M.A., Bautista-Toledo, I., 2009. Removal of Nitroimidazole Antibiotics from Aqueous Solution by Adsorption/Bioadsorption on Activated Carbon. *Journal of Hazardous Materials*, 170(1), 298-305.
- Rodriguez-Cabeiro, F., Criado-Fornelio, A., Jimenez-Gonzalez, A., Guzman, L., Igual, A., Perez, A., Pujol, M., 1987. Experimental Chemotherapy and Toxicity in Mice of Three mebendazole Polymorphi Forms. *Chemotheraphy*, 33, 266-271.
- Rosés, M., Bolliet, D., Poole, C.F., 1998. Comparison of Solute Descriptors for Predicting Retention of Ionic Compounds (Phenols) in Reversed-Phase Liquid Chromatography Using the Solvation Parameter Model. *Journal of Chromatography A*, 829, 29-40.
- Rosenthal, P.J., 2012. Clinical Pharmacology of the Antihelminthic Drugs. In Katzung, B. G. (Ed.), *Basic and Clinical Pharmacology*, (937-948). The McGraw-Hill, 1163p, Amerika.
- 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, 147-162.
- Rozet, E., Ceccato, A., Hubert ' C., Ziemons, E., Oprean, R., Rudaz, S., Boulanger, B., Hubert, P., 2007. Analysis of Recent Pharmaceutical Regulatory Documents on Analytical Method Validation. *Journal of Chromatography A*, 1158, 111-125.
- Ruiz, R., Ra`fols, C., Rosés, M., Bosch, E., 2003. A Potentially Simpler Approach to Measure Aqueous pK<sub>a</sub> of Insoluble Basic Drugs Containing Amino Groups. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(7), 1473-1481.

- Ruiz, R., Rosés, M., R`afols, C., Bosch, E., 2005. Critical Validation of a New Simpler Approach to Estimate Aqueous pK<sub>a</sub> of Drugs Sparingly Soluble in Water. *Analytica Chimica Acta*, 550, 210–221.
- Rupp, M., Körner, R., Tetko, I.V., 2011. Predicting the pK<sub>a</sub> of Small Molecules. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*, 14, 307-327.
- Sağırılı, O., 2016. Erişim Tarihi: 28.11.2018. Validasyon Ders Notu. <http://aves.istanbul.edu.tr/ImageOfByte.aspx?Resim=8&SSNO=17&USER=2562>
- Sağlıkocagım, 2015. Erişim tarihi: 09.08.2018. <https://www.saglikocagim.net/trikomonyaz-enfeksiyonu-nedir-trichomonas-vaginalis/>
- Sanderson, H., Thomsen, M., 2009. Comparative Analysis of Pharmaceuticals versus Industrial Chemicals Acute Aquatic Toxicity Classification According to the United Nations Classification System for Chemicals. Assessment of the (Q)SAR Predictability of Pharmaceuticals Acute Aquatic Toxicity and Their Predominant Acute Toxic Mode-of-Action. *Toxicology Letters*, 187, 84–93.
- Santaladchaiyakit, Y., Srijaranai, S., 2012. A Simplified Ultrasound-Assisted Cloud-Point Extraction Method Coupled with High Performance Liquid Chromatography for Residue Analysis of Benzimidazole Anthelmintics in Water and Milk Samples. *Analytical Methods*, 4, 3864-3873.
- Şatıroğlu, H., Aydınuraz, B., 2015. Vajinal Kandidiyazis. *İç Hastalıkları Dergisi* 2007; 14(3), 168-170.
- Scheiner, S., Manyin Yi, M., 1996. Proton Transfer Properties of Imidazole. *Journal of Physical Chemistry*, 100, 9235-9241.
- Scheiner, S., Yi, M., 1996. Proton Transfer Properties of Imidazole. *The Journal of Physical Chemistry*, 100(22), 9235–9241.
- SciFinder Scholar, Ed. Chemical Abstracts Service, American Chemical Society, Ohio, USA, 2004
- Scowden, E. B., Schaffner, W., Stone, W. J., (1978). Overwhelming Strongyloidiasis; an Unappreciated Opportunistic Infection. *Medicine*, 57(6), 527-544.
- Seybold, P.G., Shields, G.C., 2015. Computational Estimation of pK<sub>a</sub> Values. *WIREs Computational Molecular Science*, 5, 290-297.

- Seydel, J.K., Albores Velasco, M., Coats, E. A., Cordes, H. P., Kunz, B., Wiese, M., 1992. The Importance of Drug-Membrane Interaction in Drug Research and Development. *Quantitative Structure Activity Relationships*, 11, 205-210.
- Shaikh, B., Rummel, N., Reimschuessel, R., 2003. Determination of Albendazole and Its Major Metabolites in the Muscle Tissues of Atlantic Salmon, Tilapia, and Rainbow Trout by High Performance Liquid Chromatography with Fluorometric Detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (11), 3254-3259.
- Shakeel, F., Haq, N., Alanazi, F.K., Alsarra, I.A., 2014. Measurement, Correlation and Thermodynamics of Solubility of Metronidazole in 2-(2-ethoxyethoxy)Ethanol+Water Cosolvent Mixtures at (298.15 to 333.15)K. *Journal of Molecular Liquids*, 398-403.
- Shalaeva, M., Kenseth, J., Lombardo, F., Bastin, A., 2008. Measurement of Dissociation Constants ( $pK_a$  Values) of Organic Compounds by Multiplexed Capillary Electrophoresis Using Aqueous and Cosolvent Buffers. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 97(7), 2581-2606.
- Shayanfar, A., Fakhree, M.A.A., Jouyban, A., 2010. A Simple QSPR Model to Predict Aqueous Solubility of Drugs. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 20 (6), 467-476.
- Sheikhy, K., Abbasidezfouli, M., Kakhaki A. D., Saghebi, S.R., Malekzadegan, A., 2015. Different and Unpredictable Clinical Outcome of Ruptured Pulmonary Hydatid Cysts. *Tanaffos*, 14(3), 217-221.
- Shoghi, E., Fuguet, E., Bosch, E., Ràfols, C., 2013. Solubility-pH Profiles of Some Acidic, Basic and Amphoteric Drugs *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 48, 291-300.
- Shoshtari, S.Z., Wen, J., Alany, R.G., 2008. Octanol Water Partition Coefficient Determination for Model Steroids Using an HPLC Method. *Letters in Drug Design & Discovery*, 2008, 5, 394-400.
- Simons, F.E., Simons, K.J., 2011. Histamine and  $H_1$ -antihistamines: Celebrating a Century of Progress. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 128(6), 1139-1150.
- Singh, J. Daftary, A., 2008. Iodinated Contrast Media and Their Adverse Reactions. *Journal of Nuclear Medicine Technology*, 36, 269-274.
- Sköld, C., Winiwarter, S., Wernevik, J., Bergström, F., Engström, L., Allen, R., Box, K., Comer, J., Mole, J., Hallberg, A., Lennernas, H., Lundstedt, T., Ungell, A-L., Karlén, A., 2006. Presentation of a Structurally Diverse and Commercially Available Drug Data Set for Correlation and Benchmarking Studies. *Journal of Medicinal Chemistry*, 49, 6660-6671.

- Skolidis, G., Hansen, K., Sanguinetti, G., Rupp, M., 2012. Multi-Task Learning for pK<sub>a</sub> Prediction. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 26(7), 883-895.
- Skoog, D. A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R., 2004. *Analitik Kimya Temel İlkeler 1*. Cilt. Çev. Kılıç, E., Yılmaz, E. Bilim Yayıncılık, 706s, Ankara.
- Slideplayer, 2010. Erişim tarihi: 03.09.2018.  
<https://slideplayer.com/slide/10652000/>
- Slideplayer, 2016. Erişim Tarihi: 12 09 2018.  
<https://slideplayer.com/slide/231706/>
- Smith, C.M., Reynard, A.M., 1992. Antiparasitic Agents. In Wonsiewicz, M.J. (Ed.), *Textbook of Pharmacology* (913-938). An HBJ International Edition, 1213p, Amerika.
- Smith, D.A., Jones, B.C., Walker, D.K., 1996. Design of Drugs Involving the Concepts and Theories of Drug Metabolism and Pharmacokinetics. *Medicinal Research Reviews*, 16:243-266.
- Snyder, L.R., 2000. HPLC Past and Present. *Analytical Chemistry*, 72, 412A-420A.
- Snyder, L.R., Kirkland, J.J., Dolan, J.W., 2010. *Introduction to Modern Liquid Chromatography*, 3rd ed. John Wiley & Sons, 912p, Amerika.
- Solich, P., 2015. Trends in Development of Stationary Phases in Chromatography. *Separation Techniques*, 10-12 Ağustos, San Francisco, USA.
- Solich, P., Hájková, R., Pospisilova, M., Sicha, J., 2002. Determination of Methylparaben, Propylparaben, Clotrimazole and Its Degradation Products in Topical Cream by RP-HPLC. *Chromatographia Supplement*, 56, S181-S184.
- Solomons, G., Fryhle, C., 2002. *Organik Kimya*. Çev. Okay, G., Yıldırım, Y. Literatür Yayıncılık, Dağıtım, Pazarlama Sanayi ve Ticaret LTD. Şti., 1258s, İstanbul.
- Stenberg, P., Norinder, U., Luthman, K., Artursson, P., 2001. Experimental and Computational Screening Models for the Prediction of Intestinal Drug Absorption. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 1927-1937.
- Stepniak, A., Buczkowski, A., Zavodnik, L., S. Belica-Pacha, S., Palecz, B., 2017. *Journal of Molecular Liquids*, 248, 19-23. Study of the Interaction of  $\beta$ -Cyclodextrin with Albendazole in Aqueous Solutions.

- Stovall, D.M., Givens, C., Keown, S., Hoover, K.R., Barnes, R., Harris, C., Lozano, J., Nguyen, M., Rodriguez, Acree Jr Jr, E.W., Abraham, M.H., 2005. Solubility of Crystalline Nonelectrolyte Solutes in Organic Solvents: Mathematical Correlation of 4-Chloro-3-Nitrobenzoic Acid and 2-Chloro-5-Nitrobenzoic Acid Solubilities with the Abraham Solvation Parameter Model. *Physics and Chemistry of Liquids*, 43(4), 351–360.
- Stuart, M., Box, K., 2005. Chasing Equilibrium: Measuring the Intrinsic Solubility of Weak Acids and Bases. *Analytical Chemistry*, 77(4), 983-990
- Sun, N., Alex Avdeef, A., 2011. Biorelevant pK<sub>a</sub> (37°C) predicted from the 2D structure of the molecule and its pK<sub>a</sub> at 25 °C. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56, 173– 182.
- Sun, N., Avdeef, A., 2011. Biorelevant pK<sub>a</sub> (37°C) Predicted from the 2D Structure of the Molecule and its pK<sub>a</sub> at 25°C. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56, 173–182.
- Sun, N., Avdeef, A., 2011. Biorelevant pK<sub>a</sub> (37°C) Predicted from the 2D Structure of the Molecule and its pK<sub>a</sub> at 25°C. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 56, 173– 182.
- Szepesy, L., 2002. Phenomenological Approach to the Mechanism of Retention in RP HPLC. *Chromatographia Supplement*, 56, S31-S39.
- T.C. Sağlık Bakanlığı, 2015. Kist Hidatik. Erişim tarihi: 15.07.2018. <http://www.saglik.gov.tr/TR,4076/kist-hidatik-kistik-ekinokokkoz.html>.
- Taft, R. W., Kamlet, M.J., 1976. The Solvatochromic Comparison Method. 2. The Alpha-Scale of Solvent Hydrogen-Bond Donor (HBD) Acidities. *Journal of American Chemical Society*, 98(10), 2886-2894.
- Taft, R.W., Abraham, M.H., Doherty, R.M., Kamlet, M.J., 1985. Linear Solvation Energy Relationships. 29. Solution Properties of Some Tetraalkylammonium Halide Ion Pairs and Dissociated Ions. *Journal of American Chemical Society*, 107, 3105-3110.
- Taillardat-Bertschinger, A., Barbato, F., Quercia, M.T., Carrupt, P-A., Reist, M., La Rotonda, M.I., Testa, B., 2002. Structural Properties Governing Retention Mechanisms on Immobilized Artificial Membrane (IAM) HPLC Columns. *Helvetica Chimica Acta*, 85, 519-532.
- Taka'cs-Nova'k, K., Box, K.J., Avdeef, A., 1997. Potentiometric pK<sub>a</sub> Determination of Water-Insoluble Compounds: Validation Study in Methanol/Water Mixtures. *International Journal of Pharmaceutics*, 151, 235–248.
- Takács-Novák, K. 2012. Physicochemical Profiling in Drug Research and Development. In Mandić, Z. (Ed.), *Physico-Chemical Methods in Drug Discovery and Development (1-52)*, Zagreb, Croatia.

- Takacs-Novak, K., Jozan, M., Szasz, G., 1995. Lipophilicity of Amphoteric Molecules Expressed by the True Partition Coefficient. *International Journal of Pharmaceutics*, 113, 47-55.
- Takács-Novák, K., Urac M., Horváth, P.,Völgyi, G., Anderson, B.D., Avdeef, A., 2017. Equilibrium Solubility Measurement of Compounds with Low Dissolution Rate by Higuchi's Facilitated Dissolution Method. A Validation Study. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 106, 133-141.
- Takács-Novák, K., Vera Szőke, Völgyi, G., Horváth, P., Ambrus, R., Szabó-Révész, P., 2013. Biorelevant Solubility of Poorly Soluble Drugs: Rivaroxaban, Furosemide, Papaverine and Niflumic Acid. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 83, 279–285.
- Takayanagui, O.M., 2004. Therapy for Neurocysticercosis. *Expert Review of Neurotherapeutics*, 4, 129-139.
- Tally, F.P., Sullivan, C.E., 1981. Metronidazole: In Vitro Activity, Pharmacology and Efficacy in Anaerobic Bacterial Infections. *Pharmacotherapy*, 1(1), 28-38.
- Tan, L. C., Carr, P.W., Abraham, M.H., 1996. Study of Retention in Reversed-Phase Liquid Chromatography Using Linear Solvation Energy Relationships I. The Stationary Phase. *Journal of Chromatography A*, 752, 1-18.
- Taverniers, I., De Loose, M., Van Bockstaele, E., 2004. Trends in Quality in the Analytical Laboratory. II. Analytical Method Validation and Quality Assurance. *Trends in Analytical Chemistry*, 23(8), 535-552.
- 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, 179–211.
- Thompson, M., Ellison, S.L.R., Wood, R., 2002. Harmonized Guidelines for Single Laboratory Validation of Methods of Analysis (IUPAC Technical Report). *Pure and Applied Chemistry*, 74 (5), 835–855.
- Thoughtco, 2018. Erişim tarihi:12.01.2018. <https://www.thoughtco.com/cell-membrane-373364>.
- Tiffert, T., Ginsburg, H., Krugliak, M., Elford, B.C., Lew, V.L., 2000. Potent Antimalarial Activity of Clotrimazole in *in vitro* Cultures of *Plasmodium falciparum*. *PNAS*, 97(1), 331–336.
- Tomasz, G., Jan, J.J., Walerian, P., 2010. Correlations between no observed effect level and selected parameters of the Chemical Structure for Veterinary Drugs. *Toxicology in Vitro*, 24, 953–959.

- Torres-Lapasió, J.R., García-Alvarez-Coque, M.C., Rosés, M., Bosch, E., Zissimos, A.M., Abraham, M.H., 2004. Analysis of a Solute Polarity Parameter in Reversed-Phase Liquid Chromatography on a Linear Solvation Relationship Basis. *Analytica Chimica Acta*, 515, 209–227.
- Tsinman, K., Tsinman, O., Tam, K. Y., 2015. Simultaneous Determination of Intrinsic Solubility and pK<sub>a</sub> of Ionizable Pharmaceutical Compounds Using UV Titrations. AAPS Annual Meeting and Exposition. 25 – 29 October, Orlando, Florida.
- Türkiye Hidatidoloji Derneği, 1999. Kistik Ekinokokkozis Nedir? Erişim Tarihi: 31.07.2018. <http://www.hidatidoloji.org/kist-hidatik-nedir/kistik-ekinokokkozis-nedir?>
- Tutorvista, 2015. Erişim tarihi: 12.12.2018. <https://chemistry.tutorvista.com/inorganic-chemistry/ionic-bond-examples.html>
- Tway, P.C., Love, J.C., 1982. Effects of Excited-State Prototropic Equilibria on the Fluorescence Energies of Benzimidazole and Thiabendazole Homologues. *Journal of Physical Chemistry*, 1082, 86, 5227-5230.
- Tzimopoulos, N.D., Metcalfe, H.C., Williams, J.E., Castka, J.F., 1990. *Modern Chemistry*. Holt, Rinehart and Winston Inc., 854p, ABD.
- Unger, K.K., Skudas, R., Schulte, M.M., 2008. Particle Packed Columns and Monolithic Columns in High-Performance Liquid Chromatography-Comparison and Critical Appraisal. *Journal of Chromatography A*, 1184, 393–415.
- University of Tartu, 2016. LC-MS Method Validation. Erişim Tarihi: 29.11.2018. [https://sisu.ut.ee/lcms\\_method\\_validation/33-estimating-linear-range](https://sisu.ut.ee/lcms_method_validation/33-estimating-linear-range)
- Vailaya, A., Horvath, C., 1997. Solvophobic Theory and Normalized Free Energies of Nonpolar Substances in Reversed Phase Chromatography. *Journal of Physical Chemistry B*, 101, 5875-5888.
- Valkó, K.L., 2016. Lipophilicity and Biomimetic Properties Measured by HPLC to Support Drug Discovery. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 130, 35–54.
- Van de Waterbeemd, H., 1998. The Fundamental Variables of the Biopharmaceutics Classification System (BCS): A Commentary. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7, 1–3.
- van de Waterbeemd, H., Kansy, M., 1992. Hydrogen-Bonding Capacity and Brain Penetration. *Chimia* 46, 299-303.

- Van de Waterbeemd, H., Smith, D.A., Jones, B.C., 2001. Lipophilicity in PK Design: Methyl, Ethyl, Futile. *Journal of Computer-Aided Molecular Design*, 15: 273–286.
- Van de Waterbeemd, H., Testa, B., 2013. The Why and How of Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion and Toxicity Research. In Taylor, J.B., Triggler, D.J., (Ed.), *Reference Module in Chemistry, Molecular Sciences and Chemical Engineering* (1-9), Waltham, MA.
- Van Deemter, J.J., Zuiderweg, F.J., A. Klinkenberg, A., 1956. Longitudinal Diffusion and Resistance to Mass Transfer as Causes of Nonideality in Chromatography. *Chemical Engineering Science*, 6, 271-289.
- van Den Bossche, H., 1980. Peculiar Targets in Anthelmintic Chemotherapy. *Biochemical Pharmacology*, 29, 1981-1990.
- Van der Wal, S.J., 1985. Low Viscosity Organic Modifiers in Reversed-Phase HPLC. *Chromatographia*, 20 (5), 274-278.
- Vitha, M., Carr, P.W., 2006. The Chemical Interpretation and Practice of Linear Solvation Energy Relationships in Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1126 (2006) 143–194.
- Völgyi, G., Ruiz, R., Box, K., Comer, J., Bosch, E., Takács-Novák, K., 2007. Potentiometric and Spectrophotometric pK<sub>a</sub> Determination of Water-Insoluble Compounds: Validation Study in a New Cosolvent System. *Analytica Chimica Acta*, 583(2), 418-428.
- Völgyi, G., Baka, E., Box, K.J., Comer, J.E.A., Takács-Novák, K., 2010. Study of pH-Dependent Solubility of Organic Bases. Revisit of Henderson-Hasselbalch Relationship. *Analytica Chimica Acta*, 673, 40–46.
- Vrakas, D., Tsantili-Kakoulidou, A., Hadjipavlou-Litina, D., 2003. Exploring the Consistency of logP Estimation for Substituted Coumarins. *QSAR and Combinatorial Science*, 22, 622-629.
- Wan, H., Holme, A.G., Wang, Y., Lindberg, W., Englund, M., Nagard, M.B., Thompson, R.A., 2003. High-throughput Screening of pK<sub>a</sub> Values of Pharmaceuticals by Pressure-assisted Capillary Electrophoresis and Mass Spectrometry. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 17, 2639–2648.
- Wan, H., Ulander, J., 2006. High-throughput pK<sub>a</sub> Screening and Prediction Amenable for ADME Profiling. *Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*, 2(1), 139-155.



- Wang, A., Carr, P.W., 2002. Comparative Study of the Linear Solvation Energy Relationship, Linear Solvent Strength Theory, and Typical-Conditions Model for Retention Prediction in Reversed-Phase Liquid Chromatography. *Journal of Chromatography A*, 965, 3–23.
- Wang, R., Gao, Y., Lai, L., 2000. Calculating Partition Coefficient by Atom-Additive Method. *Perspectives in Drug Discovery and Design*, 19, 47–66.
- Waring, M.J., 2010. Lipophilicity in drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 5, 235-248
- Warmke, J.W., Ganetzky, B., 1994. A family of Potassium Channel Genes Related to Eag in *Drosophila* and Mammals. *PNAS*, 91(8), 3438-3442.
- Waters, 2011. Erişim tarihi: 02.09.2018  
[https://www.google.com.tr/search?q=hplc&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjWgrDap4jfAhUop4sKHRZpAJQQ\\_AUIDygc&biw=1093&bih=526#imgrc=Pa2ls4r4D2AchM:](https://www.google.com.tr/search?q=hplc&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ved=0ahUKEwjWgrDap4jfAhUop4sKHRZpAJQQ_AUIDygc&biw=1093&bih=526#imgrc=Pa2ls4r4D2AchM:)
- WHO Model List of Essential Medicines, 2017. Erişim Tarihi: 31.07.2018.  
[http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/20thEML2017\\_FINAL\\_amendedAug2017.pdf](http://www.who.int/medicines/publications/essentialmedicines/20thEML2017_FINAL_amendedAug2017.pdf).
- Wiczling, P., Kawczak, P., Nasal, A., Kaliszan, R., 2006. Simultaneous Determination of pK<sub>a</sub> and Lipophilicity by Gradient RP HPLC. *Analytical Chemistry*, 78, 239-249.
- Wilson, N.S., Nelson, M.D., Dolan, J.W., Snyder, L.R., Wolcott R.G., Carr, P.W., 2002. Column Selectivity in Reversed-Phase Liquid Chromatography: I. A General Quantitative Relationship. *Journal of Chromatography A*, 961(2), 171-193.
- Wohlfart, S., Gelperina, S., Kreuter, J., 2012. Transport of Drugs Across the Blood–Brain Barrier by Nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 161(2), 264-273.
- Wu, N., Clausen, A.M., 2007. Fundamental and Practical Aspects of Ultrahigh Pressure Liquid Chromatography for Fast Separations. *Journal of Separation Science*, 30, 1167–1182.
- Wu, Y., Fassihi, R., 1985. Stability of Metronidazole, Tetracycline HCl and Famotidine Alone and in Combination. *International Journal of Pharmaceutics*, 290, 1–13.
- Xiao, X., Zhao, Y., Zhou, Y., Wang, Z., 2017. Plasma Pharmacokinetics and Muscle Residue Dynamics of Mebendazole in *Carassius auratus*. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 40, 670–674.

- Yamagami, C., Kawase, K., Iwaki, K., 2002. Hydrophobicity Parameters Determined by Reversed-Phase Liquid Chromatography. XV: Optimal Conditions for Prediction of log  $P_{oct}$  by Using RP-HPLC Procedures. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 50(12), 1578-1583.
- Yanai, K., Yoshikawa, T., Yanai, A., Nakamura, T., Iida, T., Leurs, R., Tashiro, M., 2017. The Clinical Pharmacology of Non - sedating Antihistamines. *Pharmacology & Therapeutics*, 178, 148-156.
- Yasuda, M., 1959. Dissociation constants of Some Carboxylic Acids in Mixed Aqueous Solvents. *Bulletin of the Chemical Society of Japan*, 32(5), 429-432.
- Yokoyama, T., Taft R.W., Kamlet, M.J., 1976. The Solvatochromic Comparison Method. 3. Hydrogen Bonding by Some 2-Nitroaniline Derivatives. *Journal of American Chemical Society*, 98, 3233- 3237.
- Yoshida, F., Topliss, J.G., 2000. QSAR Model for Drug Human Oral Bioavailability. *Journal of Medicinal Chemistry*, 2000, 43, 2575-2585.
- Young, R.C., Mitchell, R.C., Brown, T.H., Ganellin, C.R., 234 Griffiths, R., Jones, M., Rana, K.K., Saunders, D., Smith, I.R., Sore, N.E., Wilks, T.J., 1988. Development of a New Physicochemical Model for Brain Penetration and its Application to the Design of Centrally Acting H<sub>2</sub> Receptor Histamine Antagonists. *Journal of Medicinal Chemistry*, 31 (3), 656-671.
- Zhang, R., Wen, Y., Wang, N., Wang, Y., Wang, Y., Zhang, Z., Yang, H., 2010. Insight in the Relationship between the Structure and Property of Methimazole Monolayers on a Silver Surface: Electrochemical and Raman Study. *J. Phys. Chem. B* 2010, 114, 2450-2456.
- Zhao, J., Carr, P.W., 1999. An Approach to the Concept of Resolution Optimization through Changes in the Effective Chromatographic Selectivity. *Analytical Chemistry*, 71(14), 2623-2632.
- Zhao, Y.H., Abraham, M.H., Zissimos, A.M., 2003. Determination of McGowan Volumes for Ions and Correlation with van der Waals Volumes. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 43, 1848-1854.
- Zhou, C., Jin, Y., Kenseth, J.R., Stella, M., Wehmeyer, K.R., Heineman, W.R., 2005. Rapid pK<sub>a</sub> Estimation Using Vacuum-Assisted Multiplexed Capillary Electrophoresis (VAMCE) with Ultraviolet Detection. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(3), 576-589.
- Zhou, Z., Vorperian, V.R., Gong, Q., Zhang, S., Craig, T., J., 1999. Block of HERG Potassium Channels by the Antihistamine Astemizole and its Metabolites Desmethylastemizole and Norastemizole. *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, 10(6), 836-843.

Zigya Technology Labs, 2018. Erişim tarihi 14.09.18.

[https://www.zigya.com/study/book?class=11&board=kseeb&subject=Chemistry&book=Chemistry+Part+I&chapter=Chemical+Bonding+and+Molecular+Structure&q\\_type=&q\\_topic=Valence+Bond+Theory+\(VBT\)&q\\_category=&question\\_id=CHEN11086597](https://www.zigya.com/study/book?class=11&board=kseeb&subject=Chemistry&book=Chemistry+Part+I&chapter=Chemical+Bonding+and+Molecular+Structure&q_type=&q_topic=Valence+Bond+Theory+(VBT)&q_category=&question_id=CHEN11086597).



## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Kader POTURCU

Doğum Yeri ve Yılı : Uşak, 1985

Medeni Hali : Bekâr

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : kaderpoturcu@sdu.edu.tr

## Eğitim Durumu

Lise : Banaz Ş.N.S. Anadolu Lisesi, 2004

Lisans : DEU, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü, 2010

Yüksek Lisans : SDÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Bölümü, 2013

## Mesleki Deneyim

SDÜ Fen Edebiyat Fakültesi Araştırma Görevlisi (ÖYP) 2011-  
halen

## Yayınlar

Pont, L., Poturcu, K., Benavente, F., Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., 2016. Comparison of capillary electrophoresis and capillary liquid chromatography coupled to mass spectrometry for the analysis of transthyretin in human serum. *Journal of Chromatography A*, 1444, 145-153.

Poturcu, K., Ozmen, I., Bıyık, H.H., 2017. Characterization of an Alkaline Thermostable Pectin Lyase from Newly Isolated *Aspergillus niger* \_WHAK1 and Its Application on Fruit Juice Clarification. *Arabian Journal for Science and Engineering*, 42(1), 19-29.

Yamancı, H., Poturcu, K., Ozmen, I., Bıyık, H.H., 2016. Pectinase Production with Waste Materials by Local Water Isolate of *Aspergillus fumigatus* Strain 2101 and Purification and Characterization of the Enzyme. *Hacettepe Journal of Biology and Chemistry*, 44(1), 65-75.

Poturcu K., Ozkorucuklu P.S., Ozmen I., 2012. Purification and Electrochemical Immobilization of Pectinolytic Enzymes Produced by *Aspergillus niger*. 3<sup>rd</sup> International Symposium on Sustainable Development, Green

Information Technologies and Strategies (ISSD), 31 May – 1 June 2012, Sarajevo, Bosnia & Herzegovina.

- Poturcu, K., Ozmen, I., 2013. Purification and Kinetic Studies of Pectinases from *Aspergillus niger* Isolated from Hot Water Sources. 3. Molecular Life Sciences, International Symposium of the German Society for Biochemistry and Molecular Biology (GBM), 3-6 October 2013, Frankfurt, Germany.
- Manav, T., Poturcu, K., Ozmen, I., 2013. Production and Purification of Pectin lyase Enzyme from Fruit Residues in Submerged Culture. 6. Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry (6BBCAC), 10-14 September 2013, Trabzon, Turkey
- Yamanci-Cesur, H., Ozmen, I., Poturcu, K., 2014. Effects of Submerged Culture Components on Pectin Lyase Production. 2<sup>nd</sup> International Conference on Environmental Science and Technology (The ICOEST), 14-17 May 2014, Side-Antalya, Turkey.
- Alsancak, A.G., Elgömüş, G., Poturcu, K., Çınar, N., Bahşi, O., Çubuk Demiralay, E., Özkan, A.S. Prediction of Retention Behaviour of Selected NSAIDs and Zofenopril; Their Dissociation Constants and Lipophilicity Parameters. 10th Aegean Analytical Chemistry Days (10th AACD), 29 September-2 October 2016, Çanakkale, Turkey.
- Poturcu, K., Sanli, S.K., Sanli, N., Alsancak, A.G., Ozmen, I., Calapoglu, M., 2016. Determination of Dissociation Constants of Azole Antifungal Agents by Reversed Phase HPLC Method. International Congress on Applied Biological Sciences (ICABS), 27-31 May 2016, Sarajevo, Bosnia.
- Poturcu, K., Alsancak, A.G., Çubuk Demiralay, E., 2017. Comparison of Liquid Chromatographic, Spectrophotometric and Potentiometric Methods for Determination of Dissociation Constant of Astemizole and Clotrimazole. International Congress of the New Approaches and Technologies for Sustainable Development (SKY), September 21-24, 2017 Isparta – Turkey.
- Poturcu, K., Alsancak, G., Çubuk Demiralay, E., 2017. Experimental pK<sub>a</sub>'s of Benzimidazole Anthelmintics by RPLC. HPLC 2017: 45th International Symposium on High Performance Liquid Phase Separations and Related Techniques. 18-22 June, Praque, Czech Republic.
- Poturcu, K., Ozmen, I. 2014. Production of pectin lyase with three different *Aspergillus niger* strains. XII International Conference on Biochemistry, Biophysics and Molecular Biology (XII. ICBBMB), 10-11 November 2014, Madrid, Spain.
- Poturcu, K., Ozmen İ., Alsancak, A.G. İsokonazol, Mikonazol ve Tiokonazolün Protonasyon Sabitlerinin Potansiyometrik Titrasyon Yöntemiyle Tayini.

8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 30 Mayıs-3 Haziran 2016, Isparta, Türkiye.

Sekmen, E., Poturcu, K., Alsancak, G., Çubuk Demiralay, E., 2017. Klorpromazin ve triflupromazinin protonasyon sabitlerinin spektroskopik yöntemle tayini. Uluslararası Katılımlı XV. Ulusal Spektroskopi Kongresi, 17-19 Mayıs 2017, Yalova, Türkiye.

