

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

**SÜLFONİLÜRE VE TİYAZOLİDİNDİON TİPİ ORAL  
ANTİDİYABETİKLERİN İYONLAŞMA SABİTLERİNİN  
POTANSİYOMETRİK YÖNTEM VE SIVI KROMATOĞRAFİK  
YÖNTEM İLE ÖLÇÜMÜ**

**Dilara BAŞAT**

**Danışman  
Prof. Dr. Güleren ALSANCAK**

**II. Danışman  
Doç. Dr. Nurullah ŞANLI**

**DOKTORA TEZİ  
KİMYA ANABİLİM DALI  
ISPARTA – 2013**

© 2013 [Dilara BAŞAT]

## TEZ ONAYI

Dilara Başat tarafından hazırlanan " Sulfonilüre ve Tiyazolidindion Tipi Oral Antidiyabetiklerin İyonlaşma Sabitlerinin Potansiyometrik Yöntem ve Sıvı Kromatografik Yöntem İle Ölçümü " adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **DOKTORA TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

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

Süleyman Demirel Üniversitesi

**II. Danışman** **Doç. Dr. Nurullah ŞANLI** .....

Uşak Üniversitesi

**Jüri Üyesi** **Prof. Dr. Mustafa TAŞTEKİN** .....

Ankara Üniversitesi

**Jüri Üyesi** **Prof. Dr. Atıf Can SEYDİM** .....

Süleyman Demirel Üniversitesi

**Jüri Üyesi** **Doç. Dr. Fethiye GÖDE** .....

Süleyman Demirel Üniversitesi

**Enstitü Müdürü** **Prof. Dr. Cengiz KAYACAN** .....

## **TAAHHÜTNAME**

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

**Dilara BAŞAT**

# İÇİNDEKİLER

## Sayfa

İÇİNDEKİLER .....	i
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	v
TEŞEKKÜR.....	vi
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ .....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ .....	xii
1. GİRİŞ .....	1
1.1. Diyabetin Tanımı ve Tanı Kriterleri.....	2
1.2. Diyabetin Sınıflandırılması .....	3
1.3. Diyabetin Tedavi Yöntemleri .....	4
1.4. Diyabette Kullanılan Oral İlaçların Sınıflandırılması .....	5
1.5. Sülfonilüre Grubu İlaçlar.....	5
1.5.1. Sülfonilürelerin kimyasal yapısı.....	6
1.5.2. Sülfonilürelerin etki mekanizması ve farmakolojisi .....	8
1.6 Tiyazolidindion Grubu İlaçlar .....	9
1.6.1. Tiyazolidindionların kimyasal yapısı .....	9
1.6.2. Tiyazolidindionların etki mekanizması.....	11
1.7. Sülfonilüre ve Tiyazolidindion Grubu İlaçların İyonlaşma Sabitleri.....	12
1.8. Su-Organik Çözücü İkili Karışımlarında İyonlaşma Sabitleri Tayininin Önemi .....	13
1.9. Potansiyometrik Yöntemle İyonlaşma Sabiti Tayini.....	14
1.10. Potansiyometrik Yöntemle İyonlaşma Sabiti Tayininde Kullanılan Bağıntılar .....	16
1.10.1. Kuvvetli monoproitik asitler için gran eşitlikleri .....	16
1.10.2. Zayıf monoproitik asitler için gran eşitlikleri.....	19
1.11. Grafikselleştirme Yöntemleri ile İyonlaşma Sabiti Tayini .....	21
1.12. Ekstrapolasyon Yöntemleri ile Sudaki pK <sub>a</sub> Tayini .....	23
1.13. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi .....	24
1.13.1. Kromatografide temel parametreler .....	27
1.13.1.1. Alıkonma zamanı ve kapasite faktörü .....	28
1.13.1.2. Seçicilik, $\alpha$ .....	28
1.13.1.3. Teorik tabaka sayısı, N .....	29
1.13.1.4. Ayırma gücü, R <sub>s</sub> .....	29
1.14. Analitik Yöntemin Geçerli Kılınması .....	30
1.14.1. Validasyon parametreleri .....	31
1.14.1.1. Doğruluk ve geri kazanım.....	32
1.14.1.2. Kesinlik .....	33
1.14.1.3. Seçicilik .....	33
1.14.1.4. Teşhis sınırı (LOD).....	33
1.14.1.5. Tayin sınırı (LOQ).....	34
1.14.1.6. Doğrusallık.....	34
1.14.1.7. Duyarlılık .....	35
1.14.1.8. Çalışma aralığı .....	35
1.14.1.9. Sağlamlık .....	35
1.14.1.10. Tutarlılık .....	35
1.14.1.11. Kararlılık.....	36

2. KAYNAK ÖZETLERİ .....	37
3. MATERYAL VE YÖNTEM .....	52
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler .....	52
3.2. Potansiyometrik Titrasyonlar .....	54
3.2.1. Kullanılan cihazlar .....	54
3.2.1.1. pH/ iyon metre .....	54
3.2.2. pK <sub>a</sub> tayininde kullanılan çözeltiler .....	54
3.2.2.1. %40 (v/v) Tetrahidrofuran -su ikili karışımı.....	54
3.2.2.2. %45 (v/v) Tetrahidrofuran -su ikili karışımı.....	54
3.2.2.3. %50 (v/v) Tetrahidrofuran -su ikili karışımı.....	55
3.2.2.4. %55 (v/v) Tetrahidrofuran -su ikili karışımı.....	55
3.2.2.5. %60 (v/v) Tetrahidrofuran -su ikili karışımı.....	55
3.2.2.6. İyonik şiddet ayarlayıcı.....	55
3.2.2.7. Asit çözeltisi .....	55
3.2.2.8. Baz çözeltisi .....	55
3.2.2.9. Bileşiklerin çözeltileri.....	55
3.3. Kromatografik Çalışmalar .....	56
3.3.1. Kullanılan cihazlar .....	56
3.3.1.1. Yüksek performans sıvı kromatografisi cihazı .....	56
3.3.1.2. Kolonlar .....	56
3.3.1.3. pH/ iyon metre .....	56
3.3.2. pK <sub>a</sub> tayininde kullanılan çözeltiler .....	56
3.3.2.1. % 40 (v/v) Tetrahidrofuran -su ikili karışımı.....	56
3.3.2.2. % 45 (v/v) Tetrahidrofuran -su ikili karışımı.....	57
3.3.2.3. % 50 (v/v) Tetrahidrofuran -su ikili karışımı.....	57
3.3.2.4. % 55 (v/v) Tetrahidrofuran -su ikili karışımı.....	57
3.3.2.5. Urasil çözeltisi .....	58
3.3.2.6. Potasyum hidrojen fitalat çözeltisi.....	58
3.3.2.7. Tezde çalışılan sülfonilüre ve tiyazolidindion bileşiklerinin çözeltileri .....	58
3.3.2.8. Sistem uygunluk çözeltisi .....	58
3.3.3. Numune çalışması .....	58
3.4. Yöntem .....	59
3.4.1. Potansiyometrik titrasyonlar .....	59
3.4.2. Sıvı kromatografik yöntemle çalışmalar .....	59
3.4.3. Çalışılan bileşiklerin ayrılmaları için optimum koşulun belirlenmesi .	60
4. ARAŞTIRMA BULGULARI .....	61
4.1. Sülfonilüre ve Tiyazolidindionların SPARC, ACDLab ve Marvin Programı ile Hesaplanan İyonlaşma Sabitleri .....	61
4.1.1. Glibenklamidin iyonlaşma sabitleri .....	61
4.1.2. Glimepiridin iyonlaşma sabitleri .....	62
4.1.3. Gliklazidin iyonlaşma sabitleri.....	62
4.1.4. Glipizidin iyonlaşma sabitleri .....	63
4.1.5. Rosiglitazonun iyonlaşma sabitleri .....	64
4.1.6. Pioglitazonun iyonlaşma sabitleri .....	65
4.2.1. Glibenklamidin % 40 (v/v) THF-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon grafikleri .....	66
4.2.2. Glimepiridin % 40 (v/v) THF-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon grafikleri .....	69

4.2.3. Gliklazidin % 40 (v/v) THF-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon grafikleri .....	71
4.2.4. Glipizidin % 40 (v/v) THF-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon grafikleri .....	74
4.3. Tiyazolidindionların Potansiyometrik Yöntemle İyonlaşma Sabiti Tayini....	77
4.3.1. Pioglitazon HCl % 40 (v/v) THF-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon grafikleri .....	77
4.3.2. Rosiglitazon Maleat % 40 (v/v) THF-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon grafikleri .....	80
4.4. Sülfonilürelerin Sıvı Kromatografi Yöntemiyle İyonlaşma Sabiti Tayini .....	84
4.4.1. Glibenklamidin sıvı kromatografi yöntemiyle iyonlaşma sabiti tayini	84
4.4.2. Glimepiridin sıvı kromatografi yöntemiyle iyonlaşma sabiti tayini ....	85
4.4.3. Gliklazidin sıvı kromatografi yöntemiyle iyonlaşma sabiti tayini .....	86
4.4.4. Glipizidin sıvı kromatografi yöntemiyle iyonlaşma sabiti tayini .....	88
4.5. Tiyazolidindionların Sıvı Kromatografi Yöntemiyle İyonlaşma Sabiti Tayini .....	89
4.5.1. Rosiglitazon Maleatın sıvı kromatografi yöntemiyle iyonlaşma sabiti tayini .....	89
4.5.2. Pioglitazon HCl'nin sıvı kromatografi yöntemiyle iyonlaşma sabiti tayini .....	91
4.6. Kromatografik Ayırmanın Optimizasyonu .....	93
4.7. Numune Çalışması .....	94
4.7.1. İç standartın belirlenmesi .....	94
4.7.2. Sistem uygunluk testi sonuçları.....	94
4.7.3. Glibenklamidin yüksek performans sıvı kromatografiyle analiz yönteminin validasyonu .....	95
4.7.4. Glipizidin yüksek performans sıvı kromatografiyle analiz yönteminin validasyonu.....	99
4.7.5. Pioglitazon HCl'nin yüksek performans sıvı kromatografiyle analiz yönteminin validasyonu .....	102
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR .....	106
5.1. Potansiyometrik Titrasyon Verilerinden Elde Edilen İyonlaşma Sabitleri ..	106
5.2. Sıvı Kromatografik Yöntem Verilerinden Elde Edilen İyonlaşma Sabitleri	108
5.3. Yasuda-Shedlovsky Eşitliği ve Extrapolasyon Yöntemi ile Sudaki pK <sub>a</sub> Tayini Sonuçları.....	110
5.4. Sonuç .....	111
KAYNAKLAR .....	117
ÖZGEÇMİŞ.....	127

## ÖZET

Doktora Tezi

### SÜLFONİLÜRE VE TİYAZOLİDİNDİON TİPİ ORAL ANTİDİYABETİKLERİN İYONLAŞMA SABİTLERİNİN POTANSİYOMETRİK YÖNTEM VE SIVI KROMATOĞRAFİK YÖNTEM İLE ÖLÇÜMÜ

Dilara BAŞAT

Süleyman Demirel Üniversitesi  
Fen Bilimleri Enstitüsü  
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. Güleren ALSANCAK

II. Danışman: Doç. Dr. Nurullah ŞANLI

Bu tez çalışmasında sülfonilüre grubu antidiyabetik ilaçlardan glibenklamid, glüklazid, glimepirid ve glipizidin; tiyazolidindion grubu antidiyabetik ilaçlardan da pioglitazon HCl ve rosiglitazon maleatın  $pK_a$  değerleri potansiyometri ve ters faz sıvı kromatografi yöntemleri (RPLC) kullanılarak su-THF karışımlarında tayin edilmiştir. İyonlaşma sabitleri potansiyometrik titrasyon yöntemiyle 5 farklı (%40-60) su-THF ortamında PKPOT programı ve grafiksel metotlar ile hesaplanmıştır. HPLC yöntemiyle 4 farklı (%40-55) su-THF ortamındaki iyonlaşma sabitleri NLREG programı ile hesaplanmıştır. Yasuda-Shedlovsky eşitliği ve ekstrapolasyon yöntemleriyle bileşiklerin sudaki  $pK_a$  değerleri hesaplanmıştır. Glipizid, glibenklamid, ve pioglitazon HCl'nin eş zamanlı tayini için HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Kolon olarak YMC J'Sphere ODS-H80 (4  $\mu$ m, 150 mm x 4,6 mm ID) kolonu kullanılmıştır. En iyi kromatografik ayırma % 40 THF (v/v) ortamında pH 4,5' ta yapılmıştır. Akış hızı 1 mL/dak, dalga boyu 230 nm, sıcaklık 30 °C ve enjeksiyon hacmi 20  $\mu$ L'dir. İç standart olarak tiyazolidindion grubundan rosiglitazon maleat seçilmiştir. Geliştirilen metodun tam validasyonu yapılmış ve piyasada bulunan ticari ilaç preparatlarına uygulanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Sülfonilüre, tiyazolidindion,  $pK_a$ , potansiyometrik titrasyon, HPLC, Yasuda –Shedlovsky eşitliği, metot validasyonu.

2013, 127 sayfa



## **ABSTRACT**

**Ph.D. Thesis**

### **MEASUREMENT OF IONIZATION CONSTANTS OF ORAL ANTIDIABETICS OF THE SULFONYLUREA-TYPE AND THIAZOLIDINEDION-TYPE BY POTENTIOMETRIC METHOD AND LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD**

**Dilara BAŞAT**

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

**Supervisor: Prof. Dr. Güleren ALSANCAK**

**Co-Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Nurullah ŞANLI**

In this thesis, the  $pK_a$  values of glibenclamide, gliclazide, glimepiride and glipizide are the antidiabetic drugs which belongs to sulfonylurea group and pioglitazone HCl and rosiglitazone maleate are the antidiabetic drugs which belongs to thiazolidinedion group, using potentiometric and reversed phase liquid chromatographic (RPLC) measurements were determined in THF–water mixtures. Ionization constants have been calculated with potentiometric titration method by PKPOT (Potentiometric  $pK_a$ ) programme and graphical methods in 5 different (40-60%) water-THF mixtures. With reversed phase liquid chromatographic method, ionization constants have been calculated by NLREG programme in 4 different (40-55%) water-THF mixtures. Aqueous  $pK_a$  values of compounds have been calculated with Yasuda-Shedlovsky equation and extrapolation method. In order to determine of glipizide, glibenclamide and pioglitazone HCl simultaneously, HPLC method developed and YMC J'sphere ODS-H80 (4  $\mu$ m, 150 mm x 4,6 mm ID) column was used for chromatographic separation. The best chromatographic separation was achieved by using THF-water at pH 4,5 in 40% v/v. The mobile phase was delivered at 1 mL/min and temperature was 30°C at 230 nm. Injection volume was 20  $\mu$ L. Rosiglitazone maleate which belongs to thiazolidinedion group was chosen as an internal standard. The developed method was successfully applied to both the simultaneous separation active compounds of these drugs and individual determination for their commercial pharmaceutical doses.

**Keywords:** Sulfonylurea, thiazolidinedione,  $pK_a$ , potentiometric titration, HPLC, Yasuda-Shedlovsky equation, pharmaceutical dosage forms, method validation.

**2013, 127 pages**

## TEŞEKKÜR

Doktora çalışması olarak sunduğum bu çalışmanın seçiminde, hazırlanmasında ve araştırmaların yürütülmesinde her türlü bilgi ve önerileriyle yol gösteren danışman hocam Prof. Dr. Güleren ALSANCAK'a ve eş danışmanım Doç. Dr. Nurullah ŞANLI'ya sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. HPLC deney çalışmalarım esnasında laboratuvar imkanlarını bana sağlayan Hitit Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Kimya Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Ahmet AKBAŞ'a teşekkürü bir borç bilirim. Tez İzleme Komitemdeki hocalarım Doç. Dr. Fethiye GÖDE ve Doç. Dr. Atıf Can SEYDİM'e ve gerekli standart maddelerin temin edilmesini sağlayan Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Öğretim Üyesi Prof. Dr. Sibel A. ÖZKAN'a çok teşekkür ederim. Tezim süresince çalışmalarımı yönlendiren ve bana destek olan Yrd. Doç. Dr. Senem ŞANLI ve Yrd. Doç. Dr. Ebru Çubuk DEMİRALAY'a teşekkür ederim.

2223-D-10 No'lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

Ayrıca beni sonsuz bir sevgiyle, sabırla ve dualarıyla destekleyen sevgili babam Ali İhsan BAŞAT'a, annem Özgen BAŞAT'a, kardeşlerime ve tüm aile fertlerime en derin duygularla teşekkür ederim. Bu yoğun çalışma sürecimde yanımda olan dostlarıma tüm kalbimle teşekkür ederim.

Dilara BAŞAT  
ISPARTA, 2013

## ŞEKİLLER DİZİNİ

### Sayfa

Şekil 1.1. Sülfonilürelerin genel yapısı .....	7
Şekil 1.2. Tiyazolidinon halkasının numaralandırılması .....	10
Şekil 1.3. 2,4-Tiyazolidindionların genel yapısı .....	10
Şekil 1.4. Sülfonilürelerin iyonlaşma davranışı .....	12
Şekil 1.5. 2,4-Tiyazolidindionların iyonlaşma davranışı .....	13
Şekil 1.6. Kombine cam pH elektrodu .....	16
Şekil 1.7. Kromatografik ayırımın şematik olarak gösterilmesi .....	25
Şekil 1.8. HPLC cihazının bölümleri .....	27
Şekil 1.9. Ayırıcılığın piklerin birbirinden ayrılmasına etkisi .....	30
Şekil 2.1. İyonlaşma şiddetine sıcaklığın ve iyonik şiddetin etkisi .....	38
Şekil 2.2. MECK yöntemine ait elektroferogramlar .....	42
Şekil 2.3. HPLC yöntemine ait kromatogramlar .....	42
Şekil 2.4. HPLC kromatogramları .....	44
Şekil 2.5. Altı antidiyabetik ilaç için organik modifiyer yüzdesinin değişiminin kapasite faktörüne olan etkisi .....	45
Şekil 2.6. Altı antidiyabetik ilacın karışım kromatogramı .....	46
Şekil 2.7. İnsan plazmasından elde edilen HPLC kromatogramı .....	48
Şekil 2.8. UV dedektörle elde edilen kromatogramlar .....	50
Şekil 4.1. Glibenklamidin iyonlaşma davranışı .....	62
Şekil 4.2. Glimepiridin iyonlaşma davranışı .....	62
Şekil 4.3. Gliklazidin iyonlaşma davranışı .....	63
Şekil 4.4. Glipizidin pK <sub>a1</sub> ile ilgili iyonlaşma davranışı .....	63
Şekil 4.5. Glipizidin pK <sub>a2</sub> ile ilgili iyonlaşma davranışı .....	63
Şekil 4.6. Rosiglitazonun pK <sub>a1</sub> ile ilgili iyonlaşma davranışı .....	64
Şekil 4.7. Rosiglitazonun pK <sub>a2</sub> ile ilgili iyonlaşma davranışı .....	64
Şekil 4.8. Pioglitazonun pK <sub>a1</sub> ile ilgili iyonlaşma davranışı .....	65
Şekil 4.9. Pioglitazonun pK <sub>a2</sub> ile ilgili iyonlaşma davranışı .....	65
Şekil 4.10. % 40 THF ortamında Glibenklamid için PKPOT grafiği .....	67
Şekil 4.11. % 40 THF ortamında Glibenklamid için Z*H <sup>+</sup> - Z grafiği .....	68
Şekil 4.12. Glibenklamid için % 40 THF-su ortamında Gran ve Φ-pH grafikleri .....	68
Şekil 4.13. % 40 THF ortamında Glimepirid için PKPOT grafiği .....	70
Şekil 4.14. % 40 THF ortamında Glimepirid için Z*H <sup>+</sup> - Z grafiği .....	71
Şekil 4.15. Glimepirid için %40 THF-su ortamında Gran ve Φ-pH grafikleri .....	71
Şekil 4.16. % 40 THF ortamında Gliklazid için PKPOT grafiği .....	73
Şekil 4.17. % 40 THF ortamında Gliklazid için Z*H <sup>+</sup> - Z grafiği .....	73
Şekil 4.18. Gliklazid için %40 THF-su ortamında Gran ve Φ-pH grafikleri .....	74
Şekil 4.19. % 40 THF ortamında Glipizid için PKPOT grafiği .....	76
Şekil 4.20. % 40 THF ortamında Glipizid için Z*H <sup>+</sup> - Z grafiği .....	76
Şekil 4.21. Glipizid için % 40 THF-su ortamında Gran ve Φ-pH grafikleri .....	77
Şekil 4.22. % 40 THF ortamında Pioglitazon HCl için PKPOT grafiği .....	79
Şekil 4.23. % 40 THF ortamında Pioglitazon HCl için pH-(2- $\bar{n}$ ) grafiği .....	80
Şekil 4.24. % 40 THF ortamında Rosiglitazon Maleat için PKPOT grafiği .....	83
Şekil 4.25. % 40 THF ortamında Rosiglitazon Maleat için pH-(3- $\bar{n}$ ) grafiği .....	83
Şekil 4.26. Glibenklamidin % 40, 45, 50ve 55 THF-su ortamındaki NLREG grafikleri .....	85
Şekil 4.27. Glimepiridin % 40, 45, 50 ve 55 THF-su ortamındaki NLREG grafikleri .....	86

Şekil 4.28. Gliklazidin % 40, 45, 50 ve 55 THF-su ortamındaki NLREG grafikleri .....	88
Şekil 4.29. Glipizidin % 40, 45, 50 ve 55 THF-su ortamındaki NLREG grafikleri ..	89
Şekil 4.30. Rosiglitazon Maleat % 40, 45, 50 ve 55 THF-su ortamındaki NLREG grafikleri .....	91
Şekil 4.31. Pioglitazon HCl % 40, 45, 50 ve 55 THF-su ortamındaki NLREG grafikleri .....	93
Şekil 4.32. Standart karışımın 230 nm’de alınan kromatogramı .....	95
Şekil 4.33. Glibenklamid’in analizine ait doğrusal grafik .....	96
Şekil 4.34. Glibenklamid içeren Gliben (5 mg) tabletlerin analiz yöntemine ait 230nm’de alınan kromatogram .....	98
Şekil 4.35. Glibenklamid içeren Gliben (5 mg) tabletlerin analiz yöntemine ait kromatogram .....	98
Şekil 4.36. Glipizid’in analizine ait doğrusal grafik .....	99
Şekil 4.37. Glipizid içeren Glucotrol (2,5 mg) tabletlerin analiz yöntemine ait 230nm’de alınan kromatogram .....	101
Şekil 4.38. 8 µg/mL derişiminde Glipizid standartı ilaveli tablet numunesine ait kromatogram .....	102
Şekil 4.39. Pioglitazon HCl’nin analizine ait doğrusal grafik.....	102
Şekil 4.40. Pioglitazon HCl içeren Dropia (15 mg) tabletlerin analiz yöntemine ait kromatogram.....	104
Şekil 4.41. 8 µg/mL derişiminde Pioglitazon HCl standartı ilaveli tablet numunesine ait kromatogram .....	105

## ÇİZELGELER DİZİNİ

	<b>Sayfa</b>
Çizelge 1.1. Yaygın kullanılan sülfonilürelerin kimyasal yapısı .....	7
Çizelge 1.2. Yaygın kullanılan tiyazolidindionların kimyasal yapısı .....	10
Çizelge 2.1. Farklı organik çözücü bileşimlerinde Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyonu ile hesaplanmış pK <sub>a</sub> değerleri.....	38
Çizelge 2.2. Sistem uygunluk parametreleri.....	45
Çizelge 3.1. Tezde çalışılan sülfonilüre ve tiyazolidindionların kimyasal yapısı ve özellikleri.....	52
Çizelge 3.2. Potansiyometrik çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	53
Çizelge 3.3. Kromatografik çalışmada kullanılan kimyasal maddeler.....	54
Çizelge 4.1. Glibenklamidin % 40 (v/v) THF-su ortamında titrasyon verileri.....	66
Çizelge 4.2. Glimepiridin % 40 (v/v) THF-su ortamında titrasyon verileri.....	69
Çizelge 4.3. Gliklazidin % 40 (v/v) THF-su ortamında titrasyon verileri.....	72
Çizelge 4.4. Glipizidin % 40 (v/v) THF-su ortamında titrasyon verileri.....	74
Çizelge 4.5. Pioglitazon HCl % 40 (v/v) THF-su ortamında titrasyon verileri.....	77
Çizelge 4.6. Rosiglitazon Maleat % 40 (v/v) THF-su ortamında titrasyon verileri.....	80
Çizelge 4.7. Glibenklamidin % 40; 45; 50; ve 55 (v/v) tetrahidrofuran-su ortamında kapasite faktörleri değerleri .....	84
Çizelge 4.8. Glimepiridin % 40; 45; 50; ve 55 (v/v) tetrahidrofuran-su ortamında kapasite faktörleri değerleri .....	85
Çizelge 4.9. Gliklazidin % 40; 45; 50; ve 55 (v/v) tetrahidrofuran-su ortamında kapasite faktörleri değerleri .....	87
Çizelge 4.10. Glipizidin % 40; 45; 50; ve 55 (v/v) tetrahidrofuran-su ortamında kapasite faktörleri değerleri .....	88
Çizelge 4.11. Rosiglitazon Maleatın % 40; 45; 50; ve 55 (v/v) tetrahidrofuran-su ortamında kapasite faktörleri değerleri .....	90
Çizelge 4.12. Pioglitazon HCl'nin % 40; 45; 50; ve 55 (v/v) tetrahidrofuran-su ortamında kapasite faktörleri değerleri .....	92
Çizelge 4.13. Sistem uygunluk parametreleri .....	95
Çizelge 4.14. Glibenklamid'in analizine ait doğrusal kalibrasyon fonksiyon verileri.....	96
Çizelge 4.15. Glibenklamidin analiz yöntemine ait gün içi ve günler arası analiz bulguları .....	97
Çizelge 4.16. Glibenklamid içeren Gliben (5 mg) tabletlerin analizine ait bulgular ..	97
Çizelge 4.17. Glipizidin analizine ait doğrusal kalibrasyon fonksiyon verileri.....	99
Çizelge 4.18. Glipizidin analiz yöntemine ait gün içi ve günler arası analiz bulguları .....	100
Çizelge 4.19. Glipizid içeren Glucotrol (2,5 mg) tabletlerin analizine ait bulgular ve % geri kazanım sonuçları.....	101
Çizelge 4.20. Pioglitazon HCl'nin analizine ait doğrusal kalibrasyon fonksiyon verileri .....	103
Çizelge 4.21. Pioglitazon HCl'nin analiz yöntemine ait gün içi ve günler arası analiz bulguları .....	103
Çizelge 4.22. Pioglitazon HCl'nin içeren Dropia (15 mg) tabletlerin analizine ait bulgular ve % geri kazanım sonuçları.....	104
Çizelge 5.1. Çalışılan sülfonilüre grubu bileşiklerin PKPOT ve grafiksel yöntem ile elde edilen pK <sub>a</sub> değerleri.....	107

Çizelge 5.2. Çalışılan sülfonilüre grubu bileşiklerin Gran metodu ve $\phi$ -pH grafiğinden elde edilen $pK_a$ değerleri.....	107
Çizelge 5.3. Çalışılan tiyazolidindion grubu bileşiklerin PKPOT ve grafiksel yöntem ile elde edilen $pK_a$ değerleri .....	108
Çizelge 5.4. Çalışılan sülfonilüre grubu bileşiklerin NLREG ile elde edilen $pK_a$ değerleri.....	109
Çizelge 5.5. Çalışılan tiyazolidindion grubu bileşiklerin NLREG ile elde edilen $pK_a$ değerleri.....	109
Çizelge 5.6. Çalışılan sülfonilürelerin extrapolasyon yöntemleriyle elde edilen sudaki $pK_a$ değerleri .....	110
Çizelge 5.7. Çalışılan tiyazolidindionların extrapolasyon yöntemleriyle elde edilen sudaki $pK_a$ değerleri .....	110
Çizelge 5.8. Çalışılan bileşiklerin SPARC, ACDLab, Marvin programlarından ve literatürlerden alınmış $pK_a$ değerleri. ....	111

## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

APCI–LC/MS	Atmosferik basınç kimyasal iyonlaşma sıvı kromatografi-kütle spektrometresi
APG	Açlık plazma glikoz ölçümü
ATP	Adenozin trifosfat
BGE	Back ground elektrolit
BSS	Bağlı Standart Sapma
CAD	Charged aerosol detection
DAD	Diyot array dedektör
ELSD	Evaporative light scattering detection
ESI-MS/MS	Electrospray ionization coupled with tandem mass spectrometry
FDA	Food Drug Administration
FDD	Foto diyot dizi
GDM	Gestasyonel diabetes mellitus
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi
ICH	Uluslararası harmonizasyon konferansı
IUPAC	Uluslararası kuramsal ve uygulamalı kimya birliği
LC-MS/MS	High-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry
LLOQ	Tayin alt sınırı
LOD	Teşhis sınırı
LOQ	Tayin sınırı
MECK	Miseller elektrokinetik
ODS	Oktadesilsilika
OGTT	Oral glikoz tolerans testi
PG	Plazma glikoz
$pK_a$	İyonizasyon sabitesinin ( $K_a$ 'nın) negatif logaritması
PKPOT	Potansiyometrik $pK_a$
PPAR- $\gamma$	Peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gama
$p_sK_a$	Su-organik çözücü karışımında görünen $pK_a$
RPLC	Ters faz sıvı kromatografisi
SPARC	Sparc performs automated reasoning in chemistry
SPE	Katı faz ekstraksiyonu
SUT	Sistem Uygunluk Testleri
T1DM	Tip 1 diabetes mellitus
T2DM	Tip 2 diabetes mellitus
THF	Tetrahidrofur
UKPDS	United kingdom prospective diabetes study
USP	Amerikan Farmakopesi
UV/GB	Ultraviyole görünür bölge
X	Mol kesri
A	Bağlı derişim
$\Phi$	Nötralizasyon kesri
$\bar{n}$	Oluşum derecesi
$\epsilon$	Dielektrik sabiti
K	Kapasite faktörü
$R_s$	Ayırma gücü

## 1. GİRİŞ

Diyabet, tıptaki adı ile Diabetes mellitus, ve onunla aynı risk faktörlerini paylaşan bulaşıcı olmayan, kronik hastalıklar günümüzde önemli bir sağlık sorunu oluşturmaktadır. Her yıl dünyada 8 ile 14 milyon insan diyabet ve kardiyovasküler hastalıklar, kanser ve kronik solunum yolu hastalıkları gibi diğer kronik karmaşık hastalıklar nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Yaşam tarzındaki hızlı değişim ile birlikte gelişmiş ve gelişmekte olan toplumların tümünde özellikle tip 2 diyabetin görülme sıklığı hızla yükselmektedir. 2009 sonu itibarı ile tüm dünyadaki diyabet nüfusu 285 milyon iken bu sayının 2030 yılında 438 milyona ulaşması beklenmektedir (Anonymous, 2009). Sekikawa ve LaPorte, (1997)'ye göre bunun başlıca nedenleri, nüfus artışı, yaşlanma ve kentleşmenin getirdiği yaşam tarzı değişimi sonucu obezite ve fiziksel aktivitenin azalmasıdır. Bu yüzden dünyanın her yerinde, diyabetin tanı ve etkin tedavisine her geçen gün daha fazla ihtiyaç duyulmaktadır.

Dünya Sağlık Örgütü, Uluslararası Diyabet Federasyonu ve diyabet ile ilgili diğer kuruluşlar, diyabet ve komplikasyonlarının önlenmesi, diyabetli insanlara daha iyi sağlık olanaklarının sunulması, yaşam kalitelerinin yükseltilmesi ve erken ölümlerin azaltılabilmesi için üye ülkeler ve sivil toplum örgütleri ile birlikte yoğun çaba harcamaktadırlar (Anonim, 2011).

Bu çalışmada tip 2 diyabet tedavisinde kullanılan sülfonilüre ve tiyazolidindion grubu ilaçların bazılarının iyonlaşma sabitleri, su-tetrahidrofuran ikili karışımlarında potansiyometrik yöntem ve sıvı kromatografik yöntemlerden yararlanılarak tayin edilmiştir. Çalışmada sülfonilüre grubundan glimepirid, gliklazid, glibenklamid, glipizid; tiyazolidindion grubundan ise, rosiglitazon maleat ve pioglitazon HCl seçilmiştir. İlaçların iyonlaşma sabitlerinin tayininde bu yöntemlerin seçilmesi, her iki yöntemin de su-organik çözücü ikili karışımlarında uygulanabilmesidir. Yöntemler organik çözücünün ilavesi ile suda çözünürlüğü az olan ilaç aktif maddelerinin yeterli çözünürlüğü sağlanarak uygulanabilmektedir. İyonlaşma sabitleri su-organik çözücü karışımında organik çözücü yüzdesi değiştirilerek farklı organik çözücü yüzdeleri için tayin edilebilmekte ve gerek çözücü özellikleri ve gerekse ekstrapolasyon yöntemleri kullanılarak bileşiklerin sudaki pK değerleri



hesaplanabilmektedir. Kromatografik yöntemde iyonlaşma sabiti tayininde pH'nın kapasite faktörü üzerinde etkisi incelenmektedir. Bu aşamada elde edilen verilerin yorumlanması ile iyonlaşma sabitleri tayin edilen bileşikler için sıvı kromatografik ayırmada optimize edilebilmektedir.

### **1.1. Diyabetin Tanımı ve Tanı Kriterleri**

Diyabet, pankreasın yeterli miktarda insülin hormonu üretmemesi veya ürettiği insülin hormonunun etkili bir şekilde kullanılamamasından kaynaklanan kronik ilerleyici bir hastalıktır. İnsülin, pankreas tarafından salgılanan ve glikozun kandan hücrelere geçişini düzenleyen en önemli hormondur. Pankreas yeterli insülin üretmediğinde ya da üretilen insülinin kullanılamaması durumunda besinlerle alınan glikoz ve diğer besin unsurları, ihtiyaç duyan hücrelere ulaşmaz. Hücrelerde glikoz eksikliği söz konusu iken, kanda glikoz normal değerlerin üstüne çıkarak “zehir” etkisi yaratır (hiperglisemi) ve vücudun hücrelerini tahrip eder.

Diyabetin komplikasyonlarından korunmak için erken tanı şarttır. Tanı için aşağıda verilen üç yöntemden biri kullanılabilir (Gavin vd.,1998; Anonymous, 1999; Genuth vd., 2003).

1. Açlık plazma glikoz ölçümü, (APG): En az 8 saatlik gece boyu açlığı takiben plazma glikoz (PG) düzeyinin ölçülmesi, halen en fazla kabul gören ve pahalı olmayan yaklaşımdır. APG düzeyi 126 mg/dL veya üzerinde ise, diyabet tanısı konulur. 45 yaşından itibaren 3 yılda bir APG düzeyi ölçülmelidir.

2. Rastgele PG: Alternatif olarak diyabet semptomları (poliüri, polidipsi) varlığında rastgele bir zamanda ölçülen PG düzeyinin 200 mg/dL veya üzerinde olması da diyabet tanısı koydurur.

3. Oral glikoz tolerans testi, (OGTT): Diyabet riski yüksek kişilerde OGTT yapılması gerekir. Bunun için 75 gram glikozlu sıvı içirildikten 2 saat sonra kan glikoz düzeyinin 200 mg/dL veya üzerinde olması tanı koydurur.

Hastalığın ortak sonucu olan kan şekeri yüksekliği (hiperglisemi) kontrol altına alınamazsa, zaman içinde diyabetin kronik komplikasyonları olarak kabul edilen körlük, böbrek yetmezliği, periferik ve otonom nöropati gibi mikrovasküler

düzeydeki problemlerden kaynaklanan sorunlara yol açar. Diyabetin varlığı, ayrıca diyabete özgü olmayan koroner kalp hastalıkları, serebrovasküler hastalıklar ve periferik damar hastalıkları gibi makrovasküler sorunların daha erken yaşlarda ortaya çıkmasına ve daha agresif seyretmesine de neden olabilir. Böylece diyabet, hastaların yaşam kalitesini düşürdüğü gibi yaşam süresini de beş ile on yıl arasında kısaltmaktadır (Anonymous, 2003).

## **1.2. Diyabetin Sınıflandırılması**

Diyabet, klinik bulgulara göre tip 1 diyabet, tip 2 diyabet, spesifik nedenlere bağlı diyabet ve gestasyonel diyabet olmak üzere başlıca dört tipte görülmektedir.

1- Tip 1 Diyabet: “Çocukluk çağında başlayan diyabet”, “juvenil diyabet”, veya “tip 1 Diabetes Mellitus (T1DM)” olarak adlandırılan bu hastalıkta, insülin yapımından sorumlu pankreas beta hücrelerinin çoğunlukla sinir merkezi kaynaklı harabiyetine bağlı olarak mutlak insülin eksikliği vardır. İnsülin yetersizliği söz konusu olduğundan hastalara insülin hormonu dışardan (enjeksiyon yoluyla) verilir. Bu nedenle tip 1 diyabet, “İnsüline Bağımlı Diyabet” olarak da isimlendirilmektedir. Diyabet hastalarının %5-10’u, tip 1 diyabetlidir (Anonymous, 1985; Gavin vd., 1998).

Tanı sırasında hastaların ağız kuruluğu, çok su içme, sık idrara çıkma, sürekli açlık hissi, kilo kaybı, bulanık görme, yorgunluk ve halsizlik gibi yakınmaları vardır. Bu yakınmalar çoğunlukla son birkaç gün ya da birkaç hafta içinde ortaya çıkar. Son yıllara dek diyabetin bu tipi yalnızca çocuklarda görülmekte iken günümüzde yetişkin yaşlarda da görülmeye başlamıştır. Tip 1 diyabet olgularının yarısı 15 yaşından sonra ortaya çıkmaktadır. Erişkin yaşta (genellikle 25 yaşından sonra) görülen tip 1 diyabet formu da bulunmaktadır (Anonim, 2011).

2- Tip 2 Diyabet: Tip 2 diyabette pankreas beta hücreleri, insülin üretir; ancak üretilen insülin hedef dokularda etkili olarak kullanılmaz. Tip 2 diyabet, “Tip 2 Diabetes Mellitus (T2DM)”, “İnsüline Bağımlı Olmayan Diyabet” veya “erişkin tipi” diyabet hastalığı olarak bilinir ve genellikle 40 yaşın üstünde görülür. Erişkin tipi diyabet hastalığı, tüm dünyada tanı konulan diyabet vakalarının % 90’dan fazlasını oluşturur (Anonymous, 1985; Gavin vd., 1998). Yakınmalar tip 1 diyabete benzemekle birlikte daha hafiftir. Bu sebeple hastalık gerçek başlangıcından yıllar

sonra (ortalama 5 yıl sonra) fark edilir. Son yıllarda obezitenin çocukluk çağında da artması ile birlikte çocuk ve ergenlik çağda da tip 2 diyabet görülmeye başlamıştır. Gelişmiş ülkelerde 15 yaş altında görülen diyabet vakalarının yarısına yakınının tip 2 diyabet olduğu bildirilmektedir.

3- Spesifik Nedenlere Bağlı Diyabet: Bunlar nadir diyabet formlarıdır (Anonymous, 1985). Diyabetlilerin %1'den azını oluştururlar. Aşağıda listelenen hastalıklar bu tip diyabete yol açar: Beta hücre fonksiyonlarının bozulmasına bağlı genetik defektler, insülin etkilerinde bozulmaya yol açan nadir genetik defektler, ekzokrin pankreas hastalıkları, endokrinopatiler, ilaç ve kimyasal ajanlara bağlı gelişen diyabetler, enfeksiyonlar, immun kaynaklı nadir diyabet formları ve diyabetle birlikte görülebilen bazı genetik sendromlar bu tip diyabete yol açar (Anonim, 2011).

4- Gestasyonel Diyabet: "Gestasyonel Diabetes Mellitus; GDM" olarak da bilinir ve ilk kez gebelik sırasında ortaya çıkan diyabet formudur. Gebeliklerin % 2-4'ünde GDM görülmektedir (Anonymous,1985; Gavin vd., 1998). Belirtileri genelde tip 2 diyabete benzer. Ancak gebelik sırasındaki rutin taramalar nedeniyle genellikle semptomlar fark edilmeden önce tanı konulur. GDM, doğumdan sonra genellikle düzelir; fakat sonraki gebeliklerde tekrarlama riski yüksektir (yaklaşık % 50). Ayrıca GDM öyküsü olan kadınların ileriki yaşamlarında tip 2 diyabetli olma riski, % 80'e kadar varmaktadır (Anonymous, 1994). Bu sebeple GDM tanısı almış kadınların doğum sonrasında prediyabetik olarak kabul edilip koruma programına alınmaları gereklidir (Anonim, 2011).

### **1.3. Diyabetin Tedavi Yöntemleri**

Diyabet tedavisinde kan glikoz düzeylerinin normale yakın düzeylere düşürülmesi esastır. Bunun yanı sıra kilo kontrolü ve kan basıncı, lipid düzeyleri gibi diğer bilinen risk faktörlerinin de kontrol edilmesi gereklidir. Ayrıca komplikasyonlardan korunmak için sigaranın bırakılması da sağlanmalıdır.

Diyabet, uzun süreli ilaç kullanımını gerektiren hastalıklardan biri olduğundan bu tür tedavide yararlanan ilaçların yan etkilerinin çok daha az olması zorunluluğu vardır (Menteşe, 2007).

Tip 1 diyabette kullanılabilir tek hipoglisemik ilaç, insüldür (Kayaalp, 2002). Tip 2 diyabetli bir hastanın tedavisine ise, öncelikle diyet ve egzersiz ile başlanır. Ancak buna rağmen kan şekeri yüksek ve düşmüyorsa, ilaç tedavisine başlanır. Tedavinin genellikle yaşam boyu sürmesi gerektiğinden bu ilaçların ağızdan alınması önemli bir avantajdır.

#### **1.4. Diyabette Kullanılan Oral İlaçların Sınıflandırılması**

Ağızdan alınan diyabet ilaçları pankreastan insülin salınımını artırarak kan şekerinin düşmesini sağlar. Bu nedenle tip 2 diyabette ilaç tedavisi günümüzde giderek önem kazanmaktadır. Bu amaçla kullanılan ilaçlar 5 sınıfta incelenir (Katzung vd., 2009).

##### **1-İnsülin Salgılatıcı İlaçlar**

###### **i-Sülfonilüreler:**

- tolbutamid, klorpropamid, tolazamid, asetoheksamid, glibornurid, glibenklamid, gliklazid, glimepid, glipizid

###### **ii-Glinidler (Meglitinidler):**

- repaglinid, nateglinid

##### **2- İnsülin Duyarlaştırıcı İlaçlar**

###### **i-Bi guanidler:**

- buformin, metformin, fenformin

###### **ii-Tiyazolidindionlar (Glitazon):**

- troglitazon, pioglitazon, rosiglitazon

##### **3-Alfa Glukozidaz İnhibitörleri:**

- akarboz, miglitol

##### **4- İnkretin Mimetik İlaçlar:**

- eksenatid, liraglutid, vildagliptin, sitagliptin, saksagliptin

##### **5- Amilin Analogları:**

- pramlintid

#### **1.5. Sülfonilüre Grubu İlaçlar**

Sülfonilüreler, kimyacı Marcel Janbon ve meslektaşları tarafından, 1942 yılında bir sülfonamid olan 2-(4-aminobenzen-sülfonamido)-5-izopropil tiyadiazol bileşiğinin tıfolu hastalarda kullanılması sırasında hem yapısal anlamda sülfonilürelerle birbirine benzemeleri nedeniyle hem de hipoglisemik etkisi nedeniyle fark edilmiştir (Janbon

vd., 1942). Orjinal bileşimin benzen halkasındaki amino grubunun uzaklaştırılması ve heterosiklik azot halkasının açılması ile hipoglisemik etkisi artırılabilmiş; yan etkileri azaltılabilmiştir. Bunlar birinci kuşak sülfonilürelerdir. Yıllar sonra moleküldeki bazı değişikliklerle, daha küçük dozlarda etkili olabilen, daha uzun etki süresine sahip ikinci kuşak sülfonilüreler elde edilmiştir (Marchetti ve Navalesi, 1989). Sülfonilüreler, ilk kez 1958 yılında tip 2 diyabet tedavisinde kullanılmaya başlanmıştır (Patlak, 2002).

Sülfonilüreler, etkinliklerine ve yan etkilerine göre birinci kuşak ajanlar ve ikinci kuşak ajanlar olmak üzere sınıflandırılırlar.

Birinci kuşak ajan sülfonilüreler:

- asetoheksamid
- klorpropamid
- tolbutamid
- tolazamid

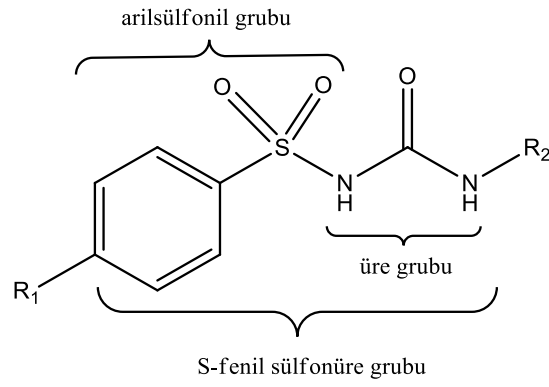
İkinci kuşak ajanlar sülfonilüreler:

- glimepirid
- glipizid
- gliklazid
- glibenklamid (gliburid)
- glikuidon

### **1.5.1. Sülfonilürelerin kimyasal yapısı**

Kimyasal olarak ürenin bir azotuna arilsülfonil grubu; diğer azot atomuna genellikle molekülün lipofilik özelliğini belirleyen alkil, alisiklik, heterosiklik vb. yapıların bağlanması ile oluşan üre türevleridir (Tyagi vd., 2010).

Bütün sülfonilüreler, *S*-fenil sülfon üre yapısını taşırlar. Fenil halkasının para konumundan (R1) ve uçtaki azot atomundan (R2) bağlanan farklı moleküller ile değişik sülfonilüre bileşikleri oluşturulur (Şekil 1.1).



Şekil 1.1. Sülfonilürelerin genel yapısı

Benzen halkasına para konumunda bağlı olan metil, amino, asetil, klor, brom, iyot, metiltiyo, triflormetil gruplarının (R1) hipoglisemik aktiviteyi geliştirdiği bilinmektedir. Çizelge 1.1’de yaygın olarak kullanılan sülfonilürelerin kimyasal yapısı verilmektedir.

Çizelge 1.1. Yaygın kullanılan sülfonilürelerin kimyasal yapısı

Bileşik Adı	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Glibenklamid		
Glimepirid		
Gliklazid	H <sub>3</sub> C—	
Glipizid		

p-( $\beta$ -arilkarboksamidoetil) substitüenti içeren ikinci kuşak ajanlar, birinci kuşak ajanlara göre daha etkilidirler. Bu türevlerin yüksek aktivite göstermesinin nedeninin substitüentin azot atomu ile sülfonamidin azot atomu arasındaki uzaklık olduğuna inanılmaktadır (Tyagi vd., 2010). Bu bileşiklerde substitüentin amit azotu ile sülfonamid azotunun mekansal ilişkisinin önemli olduğu düşünülür. Uçtaki üre azotuna bağlı grup belirli büyüklükte olmalıdır. N-etil türevleri, düşük düzeyde aktivite gösterirken; N-metil türevleri genellikle aktif değildir. 12 veya daha fazla karbon içeren N-substitüenti bulduran bileşiklerde bileşik aktivitesini kaybederken en uygun aktivitenin 3 ile 7 karbon atomu içeren N-substitüent bileşiklerinde bulunduğu görülmüştür. Bazı aktif bileşikler, uçtaki azot üzerinde 5,6 ya da 8 üyeli alisiklik halka içerirken diğerleri heterosiklik halka içerir (Tyagi vd., 2010).

### **1.5.2. Sülfonilürelerin etki mekanizması ve farmakolojisi**

Sülfonilüreler, uzun yıllar boyunca tip 2 diyabet tedavisinde kullanılmış en eski oral antidiyabetik ilaçlardır. Etkilerini pankreastaki  $\beta$ -hücreleri üzerindeki özel reseptörlere (ATP-bağımlı potasyum kanalları) bağlanarak pankreastan insülin salgılanmasını arttırarak gösterirler. Sülfonilüreler, insülin biyosentezi yapmazlar; sadece depolanmış olanın salınımını azaltırlar. Bu yüzden tüm sülfonilüreler, etkilerini gösterebilmek için insülin salgılama kapasitesi olan bir pankreasa ihtiyaç duyarlar ve tip 1 diyabet tedavisinde kullanılmazlar (Turfaner, 2007). Bu gruptaki ilaçların aşağı yukarı hepsi kan şekerinde 60–70 mg/dL'lik azalma sağlarlar. UKPDS (United Kingdom Prospective Diabetes Study) çalışmalarında bu ilaçların etkisinde zamanla bir azalma meydana geldiği (sekonder yanıtızsızlık) belirtilmiştir (Turner, 2007). En belirgin yan etkileri hipoglisemidir. Diğer sık görülen yan etki ise ortalama 2–5 kg civarında kilo alımıdır. Sülfonilüreler, proteinlere bağlandıklarından diğer ilaçlar ile etkileşim gösterebilirler. Sülfonilüreler, genellikle karaciğerde metabolize edilir. Birinci kuşaklar böbrekten; ikinci kuşaklar böbrek ve karaciğerden safra ile vücuttan dışarı atılır. Bu nedenle sülfonilüre tedavisi, karaciğer ve böbrek yetmezliğinde olumsuz sonuçlar oluşturur (Ayvaz ve Kan, 2010). Sülfonilüreler, tek başlarına kullanıldıklarında hastaların yaklaşık %10'unda kan şekerinin etkin bir biçimde kontrol edilmesi için yetersiz kalırlar. Sülfonilüreler ile yapılan tedaviye, metformin, tiyazolidindionlar ve hatta insülinin eklenmesi gerekebilir.

## 1.6 Tiyazolidindion Grubu İlaçlar

1982 yılında Takeda firması araştırmacıları, genetik olarak obez ve diyabetik hastalarda insülin direncini azaltıcı etki gösteren Ciglitazon maddesini sentezlemişlerdir. Ciglitazonun insülin-dirençli kobaylar üzerinde yapılan denemeler sonucunda kan glikozunu ve trigliserid basamaklarını düşürdüğü; fakat diyabetik olmayan kobaylarda hipoglisemik etki göstermediği saptanmıştır (Kirpi, 2007).

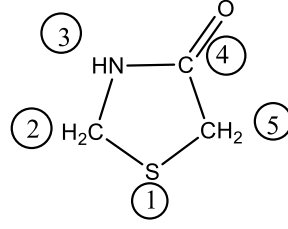
Daha sonra, 1997 yılında Japon ilaç şirketi Sankyo tarafından bu tür bileşiklerin bir başka örneği olan Troglitazon bileşiği sentezlenmiş; Amerika Birleşik Devletleri ve Japonya'da yaygın bir şekilde kullanılmaya başlanmıştır (Lesyk ve Zimenkovsky, 2004). Troglitazon, kullanımına başlandıktan sonra karaciğer toksisitesi nedeniyle 22 Mart 2000'de piyasadan çekilirken, Amerika Birleşik Devletlerinde Gıda ve İlaç Dairesi tarafından 1999 yılında Tip 2 DM tedavisi için onaylanan tiyazolidindion grubunun diğer üyeleri olan rosiglitazon ve pioglitazonun klinik kullanımına devam edilmiştir (Kendall, 2006). Ancak bu ilaçları kullanan bazı hastalarda göğüs ağrısı ve kalp krizi riskinin artmasına karşı 2006 yılında Gıda ve İlaç İdaresi uyarıda bulunmuştur. 24 Eylül 2010 tarihinde ise, Sağlık Bakanlığı tarafından "rosiglitazon" etken maddesini içeren ilaçların kalp krizi ve felç riskini artırdığı gerekçesiyle ilacın geri çekilmesi, ithalatının, üretiminin ve satışının durdurulması işlemi uygulanmıştır (İEGM, 2011).

2,4-Tiyazolidindion türevlerinin sentezlenmesi ve aktivitelerinin ölçülmesi üzerine yapılan çalışmalar incelendiğinde son yıllarda bu tür bileşiklerin antidiyabetik ilaçların üretiminde son derece etkin bir şekilde kullanıldığı görülmektedir (Lesyk ve Zimenkovsky, 2004).

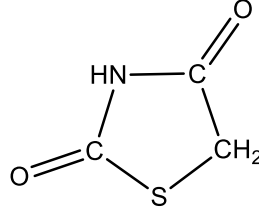
### 1.6.1. Tiyazolidindionların kimyasal yapısı

4-tiyazolidinonların (Şekil 1.2) 2-konumuna oksijen atomu bağlanmasıyla; 2,4-tiyazolidindion grubu (Şekil 1.3), oluşmuştur (Kirpi, 2007). Metwally vd. (2004), 2,4-tiyazolidindionların heterohalka yapısında kükürt atomu içermesiyle önemli biyolojik ve fizyolojik aktivite sahip olduğunu; bunun nedeninin karakteristik olarak N-C-S grubuna sahip olmalarından kaynaklandığı belirtmektedir (Kirpi, 2007).





Şekil 1.2. Tiyazolidinon halkasının numaralandırılması (Kirpi, 2007)



Şekil 1.3. 2,4-Tiyazolidindionların genel yapısı

Ana halka antidiyabetik etkiden sorumlu halkadır ve bu halka üzerinde yapılan substitüsyonlar antidiyabetik etkinlikten çok, ilacın farmakokinetik ve farmakodinamik özelliklerini değiştirmektedir (Şen, 2006). Yaygın olarak kullanılan tiyazolidindionların kimyasal yapısı Çizelge 1.2’de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Yaygın kullanılan tiyazolidindionların kimyasal yapısı

Bileşik Adı	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
Rosiglitazon		—H
Pioglitazon		—H

Lesyk ve Zimenkovsky (2004), 2,4-tiyazolidindionların ilaç hammaddesi olarak kullanılabilmesi nedeniyle 20. yüzyılın başlarından itibaren farmasötik kimyacılar tarafından üzerinde önemle durulan bir konu haline geldiğini ve biyolojik aktiviteye

sahip bileşiklerin modellenmesinde 4-tiyazolidinon yapı iskeletinin kullanılmasının büyük bir çeşitliliğe yol açtığını belirtmiştir (Kirpi, 2007).

Lesyk ve Zimenkovsky (2004), en basit ve temel tiyazolidinon türevlerinden birisi olan 2,4-tiyazolidindion bileşiğinin, radyo dalgalarından koruyucu reaktif olarak kullanıldığını ve bu bileşikte tiyazolidin halkası üzerinde gerçekleştirilen değişikliklerin farmakolojik aktivite çeşitliliğini önemli ölçüde arttırdığını belirtmiştir. Bu bileşiğin amid türevleri incelendiğinde antidiyabetik aktiviteye sahip olduğu saptanmıştır (Kirpi, 2007).

### **1.6.2. Tiyazolidindionların etki mekanizması**

Tiyazolidindionlar insülin salınımını etkilemeksizin kas, yağ dokusu ve karaciğerde insülin duyarlılığını artıran ilaçlardır. Bu etkilerini, adipogenezde önemli rol oynayan nükleer reseptör, peroksizom proliferatör aktive edici reseptör gama (PPAR- $\gamma$ )'nın selektif aktivasyonu ile yaparlar. PPAR- $\gamma$ , bir hücre reseptörüdür ve adipoz (yağ) doku, iskelet kası, karaciğerde bulunur. PPAR- $\gamma$ , insülinin aracılık ettiği glikoz alım mekanizmalarının düzenlenmesini sağlar. Tiyazolidindionlar, PPAR- $\gamma$ 'nın etkilerini aktive ederler. Bütün tiyazolidindionlar, karaciğerde metabolize olurlar. Tiyazolidindionlar başlıca safra yolundan dışkıyla atılırlar. Bu yüzden böbrek yetmezliği olan hastalarda doz ayarlamasına gerek yoktur (Riddle, 1999; Zinman, 2001; Mudaliar ve Henry, 2001; Nesto vd., 2003; Mentşe, 2007). Açlık plazma glukozunu, 25-55 mg/dL; A1c'yi % 0,5-1,4 düzeyinde düşürürler. Tiyazolidindionlar sıvı retansiyonuna ve ödeme neden olabilirler, bu nedenle kalp yetmezliği hastalarında kullanılmaları, özellikle de insülinle birlikte kullanılmaları önerilmemektedir. Diğer yan etkiler, arasında anemi, kilo alımı, hepatotoksitedir. Tiyazolidindionlar, New York Kalp Cemiyeti'nin kriterlerine göre evre I-IV konjestif kalp yetersizliği olan hastalarda, kronik ağır böbrek yetersizliğinde, gebelikte, T1DM'de, makula ödemi riski bulunan kişilerde kullanılmaması önermiştir. Yapılan bir meta analizde rosiglitazonun miyokard enfarktüsü riskini 1,43 kat; kardiyovasküler ölüm riskini ise 1,64 kat arttırdığı görülmüştür. Bu nedenle koroner arter hastalığı olan diyabetiklerde rosiglitazon kullanılmamalıdır (Ayvaz ve Kan, 2010).

## 1.7. Sülfonilüre ve Tiyazolidindion Grubu İlaçların İyonlaşma Sabitleri

İlaçların çoğu, kimyaca zayıf organik asit veya baz niteliğinde olan maddelerdir. Zayıf asit ve bazların sulu ortamda iyonize olma oranları, ortamın pH'sı ve ilacın  $pK_a$  değeri ile ilgilidir. Bu iki değer ile ilacın iyonize olma oranı arasındaki ilişki aşağıdaki Henderson-Hasselbach denklemi ile gösterilir.

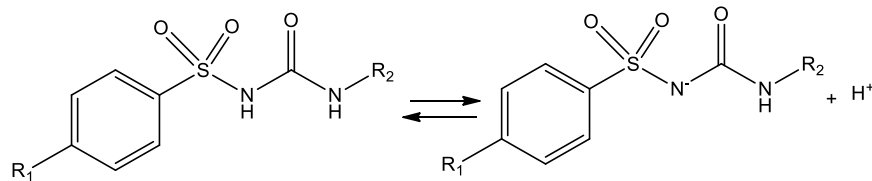
$$\text{Asitler için: } \log \frac{[\text{İyonize olmamış ilaç}]}{[\text{İyonize ilaç}]} = pK_a - \text{pH} \quad (1.1)$$

$$\text{Bazlar için: } \log \frac{[\text{İyonize olmamış ilaç}]}{[\text{İyonize ilaç}]} = \text{pH} - pK_a \quad (1.2)$$

$pK_a$ , belirli bir ilaç için sabit olan bir sayıdır. Asitler için iyonizasyon sabitesinin ( $K_a$ 'nın) negatif logaritması olarak tanımlanır ( $pK_a = -\log K_a$ ). Yukarıdaki formüllerden anlaşılacağı üzere,  $pK_a$ , ilaç moleküllerinin yüzde 50'sinin iyonize olduğu durumdaki pH değerine eşittir.

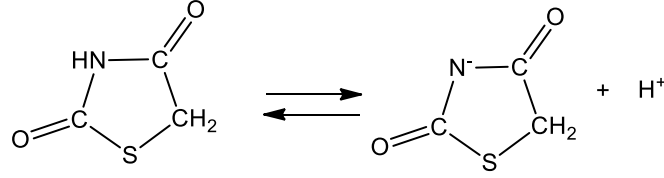
İlacın  $pK_a$  değeri, vücut sıvılarının pH'sine yakınsa, pH'deki ufak bir değişme ilacın iyonizasyon derecesinde büyük bir değişiklik yapar. O halde  $pK_a$  6 ile 9 arasında olan (özellikle 7 ile 8 arasında olan) ilaçların iyonizasyon derecesi, vücut sıvılarının çoğunun pH değeri 7,4 civarında olduğuna göre, bu değerdeki ufak değişmelerden fazla etkilenir (Kayaalp, 1984).

Sülfonilüreler, sülfonil grubu ile azottaki yalnız elektron çiftinin delokalizasyonu nedeniyle zayıf asit özelliği gösterirler.  $pK_a$  değerleri diğer zayıf asitler gibi yaklaşık 5,0'dir (Şekil 1.4). Joseph ve Hage (2010), sülfonilürelerin  $pK_a$  değerini 5,2–6,2 olarak vermiştir.



Şekil 1.4. Sülfonilürelerin iyonlaşma davranışı

2,4-Tiyazolidindionların asitliği, tiyazolidindion halkasında N üzerindeki hidrojen atomunun iyonlaşmasından kaynaklanır. Kozłowski vd. (2002), 2,4-tiyazolidindionların pK<sub>a</sub> değerini 6,59±0,03 olarak vermiştir. SPARC programı ile pK<sub>a</sub> değeri 2,4-tiyazolidindionun 6,42 olarak bulunmuştur (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. 2,4-Tiyazolidindionların iyonlaşma davranışı

### 1.8. Su-Organik Çözücü İkili Karışımlarında İyonlaşma Sabitleri Tayininin Önemi

İyonlaşma sabiti, bir molekülün iyonlaşma davranışını belirlememizi sağlayan temel parametredir. İyonlaşma sabitinin tayini için su ortamı, bileşiğin çözünürlüğünün yeterli gelmesi durumunda öncelikli ortamdır. İyonlaşma sabitlerinin su ortamındaki tayinleri, bileşiğin sudaki çözünürlüğünün az olması durumunda su-organik çözücü ikili karışımlarının kullanılmasını zorunlu kılar. Biyolojik ortamların susuz ortamlara benzemesi nedeniyle, susuz ve su-organik çözücü ortamlarında yapılan pK<sub>a</sub> tayinlerinin önemi günümüzde daha da artmaktadır.

Su-organik çözücü ikili karışımı, hem fiziksel (dielektrik sabiti, yoğunluk, viskozite) hem de kimyasal (asit-baz ve akseptör-donör özellikleri) olarak tamamen farklı çözücü özelliği göstermesi bakımından oldukça ilginçtir. Çözücünün önemli bir özelliği asit-baz özelliği ile ilgilidir. Çözücü yapısının asit baz kuvveti için önemlidir. Çözücünün polaritesi kadar afinitesi veya başka bir deyişle çözücünün proton donör ve proton akseptörlüğü özellikle önemlidir. Bunun yanında maddenin iyonlaşma derecesi çözücünün dielektrik sabitine bağlıdır. Ortamın dielektrik sabiti yüksekse kuvvetli iyonlaşma, dielektrik sabiti düşükse daha az iyonlaşma görülür. Ortamın dielektrik sabiti, farklı polaritedeki çözücülerin oranı ile değişebilir. Aynı zamanda çözünen asitlerin ve bazların kuvvetini değiştirebilir. Wrobel ve Chmurzynski (2000) çözme kapasitesinin artmasının, titrasyon esnasında indikatör renk değişiminin keskinliğinin artması ve daha uygun asit-baz titrasyon eğrisi vermesi nedeniyle su-organik çözücü karışımlarının tek çözücüden daha kullanışlı olduğunu belirtmiştir (Çolak, 2011). Gültepe (2004) çözücü etkisinin yorumlanmasında, çözücü

bileşiminin dielektrik sabitinin değişiminden kaynaklanan elektrostatik yük etkilerinin çok az önemli olduğunu ve çözünen-çözücü etkileşmelerinin daha önemli olduğu ileriye sürmektedir (Alkan, 2007). Bu nedenle, bu çalışmada bulunan iyonlaşma sabitlerinin değerlerinin su-organik çözücü bileşimi ile nasıl değiştiği de incelenmiştir.

İyonlaşma sabitlerini tayin etmek için çözeltideki denge durumunu bozmadan, dengedeki türlerin aktivitesini, derişimini veya çözeltinin herhangi bir özelliğini ölçen fiziksel yöntemler kullanılır. İyonlaşma sabitlerinin tayininde, potansiyometrik yöntemler, spektroskopik yöntemler, elektroforetik yöntemler ve sıvı kromatografik yöntemler kullanılmaktadır. Bu çalışmada iyonlaşma sabitlerinin tayininde potansiyometrik ve sıvı kromatografik yöntemler kullanılmıştır.

### **1.9. Potansiyometrik Yöntemle İyonlaşma Sabiti Tayini**

Akım geçmeyen elektrokimyasal bir hücrede indikatör elektrodun referans elektroda karşı gösterdiği potansiyelinin ölçülmesi, ölçülen potansiyelden yararlanılarak da içindeki maddenin konsantrasyonunun tayin edilmesi prensibi üzerine kurulmuş olan metotlar topluluğuna potansiyometri veya potansiyometrik analiz yöntemleri denir. 20. yüzyılın başından beri potansiyometrik teknikler, titrimetrik analiz yöntemlerinde dönüm noktasının belirlenmesinde kullanılmaktadır. Bu metot, renkli ve renksiz bütün maddelere uygulanabilmektedir (Skoog vd., 1998). İyonlaşma sabiti ölçümlerinde kullanılacak en kolay ve başarılı yöntemlerden biri olan potansiyometride kullanılan cihazlar, genelde basit ve ucuz cihazlardır. Başlıca 3 kısımdan oluşur;

- 1) Referans elektrot (sabit potansiyel)
- 2) İndikatör elektrot (değişken potansiyel)
- 3) Potansiyel ölçme cihazı (potansiyometre).

Analit çözeltilisine daldırılan indikatör elektrotta, mevcut iyon veya iyonların derişimine bağlı olarak bir potansiyel değişimi meydana gelir ve bu potansiyel değişimi ölçülerek iyonların derişimleri tayin edilebilir. Titrasyonlar sırasında denge sabitleri sıcaklığa bağlı olduğundan, sabit sıcaklıkta çalışılmalı ve inert atmosfer sağlamak için de azot akımı altında çalışılmalıdır (Alkan, 2007). Kullanılan elektrodun kararlı ve çalışılan ortama uygun olması gereklidir. Son zamanlarda

elektrot teknolojisindeki gelişmeler tekrarlanabilirlik ve duyarlılığı yeterli hale getirmiştir. Elektrot standardizasyonun yapılmaması durumunda elde edilen iyonlaşma sabitleri, yarı nötralleşme potansiyelleri olarak ifade edilir. Su ve su-organik çözücü ikili karışımlarda pH standardizasyonunun yapılması koşulunda mV değerleri pH değerlerine dönüştürülebilmekte ve mutlak  $pK_a$  değerleri verilebilmektedir.

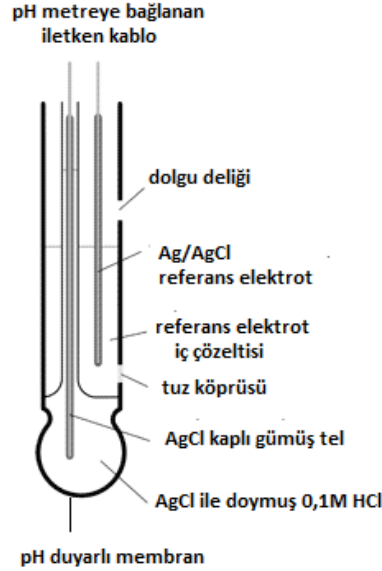
Farklı tepkimeler, çeşitli elektrotlar kullanılarak, potansiyometrik ölçümler ile izlenebilir. Çeşitli duyarlılıkları ya da seçicilikleri olan elektrotlar kullanılarak titrantın her bir ilavesinde çözeltinin potansiyeli ölçülerek nicel analiz yapılır. Potansiyometrik titrasyonda her titrant eklenmesinden sonra ölçülen gerilim değeri, eklenen titrant hacmine karşı grafiğe geçirilerek potansiyometrik titrasyon eğrisi oluşturulur. S şeklinde olan potansiyometrik titrasyon eğrisinde dönüm noktası, eğrinin eğiminin en büyük olduğu noktadır. Dönüm noktasının titrasyon hatasını en düşük düzeyde tutacak bir biçimde belirlenebilmesi için eşdeğerlik noktası civarında titrant eklenmesi çok küçük kısımlar halinde yapılmalıdır. Potansiyometrik titrasyon ile doğruluğu ve kesinliği yeterli sonuçlar elde edilir. Potansiyometrik titrasyon metodu, renkli, renksiz, denge veren veya tamamen dissosiyeye olan maddelerin çözeltilerine uygulanabilir.

Cam elektrot, hidrojen iyonu tayininde bilinen en iyi indikatör elektrottur. Genellikle Ag/AgCl referans elektrotuyla kullanılır ve ortamda bulunan yükseltgen, indirgen ve gazlardan etkilenmez. Cam elektrotlarla, viskoz ve hatta yarı akıcı numunelerin bir damladan daha az miktarlarını içeren çözeltilerinde bile pH tayin edilebilir (Gündüz, 2002). Cam elektrotta membran olarak ince bir cam zar kullanılır (Şekil 1.6).  $H^+$  iyonlarına karşı seçicilik gösteren cam elektrot,  $H^+$  iyonları derişimi  $1-10^{-13}$  M olduğu derişim aralığında Nernst eşitliğine uyar; ölçülen elektrot gerilim değeri ile pH arasında doğrusal bir ilişki vardır. Buradaki Nernst eşitliği, aşağıdaki gibi verilir.

$$E_{\text{hücre}} = K - 0,0592 \text{ pH} \quad (1.3)$$

Ölçüm yapılmadan önce, ölçülecek pH değeri aralığına uygun tampon çözeltilerle kalibre edilmesi gerekir. Bu elektrot, çok asidik çözeltilerde ölçümlerde asit hatası ve çok bazik çözeltilerde alkali hatası verir (Gündüz, 2002).

Asit-baz iyonlaşma sabitlerinin tayininde kullanılan iyon seçici elektrot, cam elektrottur. Bu titrasyonlarda eşdeğerlik noktasında pH değerinde sıçrama, asitin veya bazın kuvveti azaldıkça yani  $pK_a$  veya  $pK_b$  değerleri arttıkça azalır. Derişimin azalması durumunda da sıçrama aralığı azalmaktadır.



Şekil 1.6. Kombine cam pH elektrodu

## 1.10. Potansiyometrik Yöntemle İyonlaşma Sabiti Tayininde Kullanılan Bağlılar

### 1.10.1. Kuvvetli monoproitik asitler için gran eşitlikleri

$V_a$  hacminde derişimi  $C_a$  olan bir kuvvetli monoproitik asiti,  $C_b$  derişimindeki MOH kuvvetli bazı ile titre edelim. Titrasyon esnasında asit çözeltisine ilave edilen baz ile asitin bir kısmı tepkimeye girer ve aynı zamanda hacmin artışı nedeniyle geride kalan asit derişiminde seyrelme olur. Çözeltide eşdeğerlik öncesi bölgede  $[H^+]$ , aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır.

$$[H^+] = \frac{C_a V_a - C_b V_b}{V_a + V_b} \quad (1.4)$$

Eşdeğerlik noktasından ilerde ortamda baz fazlası vardır ve ortamda  $[OH^-]$ , aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır.

$$[OH^-] = \frac{C_b V_b - C_a V_a}{V_a + V_b} \quad (1.5)$$

Asitin bazla etkileşmesini ve anyonik tür ile kuvvetli baz katyonunun derişimlerini ifade edelim.



$$[\text{A}^-] = \frac{C_a V_a}{V_a + V_b} \quad (1.7)$$

$$[\text{M}^+] = \frac{C_b V_b}{V_a + V_b} \quad (1.8)$$

Burada  $C_a$  ve  $C_b$ , asit ve bazın başlangıç derişimlerini;  $V_a/(V_a + V_b)$  ile  $V_b/(V_a + V_b)$  gösterimleri, titrant ilavesi ile seyrelmeyi ifade eder. Yük dengesini ifade edelim.

$$[\text{H}^+] + [\text{M}^+] = [\text{A}^-] + [\text{OH}^-] \quad (1.9)$$

$[\text{M}^+]$  ve  $[\text{A}^-]$  nin gösterimlerini yük dengesinde yerine koyalım

$$[\text{H}^+] + \frac{C_b V_b}{V_a + V_b} = \frac{C_a V_a}{V_a + V_b} + [\text{OH}^-] \quad (1.10)$$

Bu ifadeyi

$$\Delta = [\text{H}^+] - [\text{OH}^-] \quad (1.11)$$

yi vermek üzere düzenleyelim. Bir titrasyonda nötralleşme kesri, aşağıdaki gibi ifade edilir.  $\phi$ , nötralleşen asitin kesrini gösteren mol oranıdır.

$$\phi_{ab} = \frac{C_b V_b}{C_a V_a} \quad (1.12)$$

$\phi_{ab}$ , titrasyonun başlangıcında 0; eşdeğerlik noktasında 1 dir. Titrasyon süresince  $V_b$  ile değişir.

Eşdeğerlik noktasında  $V_b = V_{eş}$  olduğunu dikkate alarak nötralleşme kesrini ifade edelim ve  $V_{eş}$  terimini çekelim.

$$\phi_{ab} = \frac{C_b V_{eş}}{C_a V_a} \quad (1.13)$$



$$V_{eş} = \frac{C_a V_a}{C_b} \quad (1.14)$$

Eşdeğerlik noktasını lineer bir ilişki ile belirlemek istediğimizde 1.11 nolu eşitliği  $\Delta$  cinsinden ifade ederiz.

$$\Delta = [H^+] - [OH^-] = \frac{C_a V_a - C_b V_b}{V_a + V_b} \quad (1.15)$$

Eşitlik 1.13'de  $C_a V_a$ ' yı  $V_{eş} C_b$  olarak ifade edelim.

$$\Delta = \frac{C_b V_{eş} - C_b V_b}{V_a + V_b} \quad (1.16)$$

$$\Delta(V_a + V_b) = C_b (V_{eş} - V_b) \quad (1.17)$$

Eşitliğin sol tarafında bilinenler mevcuttur. Bu bağıntıda değişken,  $V_b$ ' dir.

$$\Delta(V_a + V_b) = C_b V_{eş} - C_b V_b \quad (1.18)$$

$\Delta(V_a + V_b)$  ile  $V_b$  ilişkisi lineerdir. Eğim,  $-C_b$  ve x eksenini kestiği noktada  $V_b = V_{eş}$ ' dir.

Bu eşitlik, asidik bölgede  $\Delta = [H^+] - [OH^-] \approx [H^+]$  ve bazik bölgede  $\Delta = [H^+] - [OH^-] \approx [OH^-]$  yaklaşımı ile düşünülür. Asidik bölgede

$\Delta = [H^+] - [OH^-] \approx [H^+]$  olduğundan  $\Delta(V_a + V_b) = C_b (V_{eş} - V_b)$  gösterimi

$$[H^+](V_a + V_b) = C_b (V_{eş} - V_b) \quad (1.19)$$

şeklinde gösterilir. Bu bağıntı sıklıkla aşağıdaki şekilde verilir.

$$\phi = (V_0 + V_{KOH}) \cdot 10^{-pH} \quad (\text{asidik bölge}) \quad (1.20)$$

Eşdeğerlik ötesi bazik bölgede  $\Delta = [H^+] - [OH^-] \approx -[OH^-]$  olduğundan

$$\Delta(V_a + V_b) = C_b (V_{eş} - V_b) \text{ gösterimi} \quad (1.21)$$

$$-[OH^-](V_a + V_b) = C_b (V_{eş} - V_b) \text{ veya} \quad (1.22)$$

$$[\text{OH}^-](V_a + V_b) = C_b(V_b - V_{e\text{ş}}) \text{şeklinde gösterilir.} \quad (1.23)$$

Bu son bağıntıyı biraz daha düzenleyelim.

$$[\text{OH}^-](V_a + V_b) = C_b(V_b - V_{e\text{ş}}) \quad (1.24)$$

$$\frac{K_{\text{su}}}{[\text{H}^+]}(V_a + V_b) = C_b(V_b - V_{e\text{ş}}) \quad (1.25)$$

$$\frac{(V_a + V_b)}{[\text{H}^+]} = \frac{C_b}{K_{\text{su}}}(V_b - V_{e\text{ş}}) \quad (1.26)$$

Bu ifadeler ilk defa Gran tarafından kullanıldığı için Gran eşitliği olarak bilinir (Gran, 1952; Gran 1988).  $(V_a + V_b) / [\text{H}^+] - V_b$  ilişkisi lineerdir ve x eksenini kesim noktası  $V_b = V_{e\text{ş}}$  dir. Bu bağıntı sıklıkla aşağıdaki şekilde ifade edilir (Levie, 1997).

$$\phi = (V_0 + V_{\text{KOH}}) \cdot 10^{+\text{pH}} \quad (\text{bazık bölge}) \quad (1.27)$$

Bu bağıntılar, karbonat hatasının belirlenmesinde gerekli bağıntılardır.

### 1.10.2. Zayıf monoprotik asitler için gran eşitlikleri

Bir HA tek protonlu zayıf asitinin MOH kuvvetli bazı ile titre edildiğini düşünelim. Asitin iyonlaşma sabiti  $K_a$  olsun. Bu tip bir titrasyonda eğri, başlangıç, eşdeğerlik öncesi, eşdeğerlik ve eşdeğerlik sonrası bölgeler olarak düşünülür. Bilindiği gibi HA asitinin iyonlaşma dengesi,



dir. Bu dengeye ait asitlik sabiti

$$K_a = \frac{[\text{H}^+][\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \quad (1.29)$$

dir. Monoprotik HA asidinin titrasyonunda eşdeğerlik öncesinde HA'nın iyonlaşmamış halinin derişimi aşağıdaki gibi hesaplanır.

$$[\text{HA}] \cong \frac{C_a V_a - C_b V_b}{V_a + V_b} \quad (1.30)$$

Aynı şekilde  $[A^-]$  derişimi de aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır.

$$[A^-] \cong \frac{C_b V_b}{V_a + V_b} \quad (1.31)$$

Bu iki eşitliği kullanarak tampon bölgede hidronyum derişimini hesaplamak istediğimizde

$$[H^+] = \frac{K_a [HA]}{[A^-]} \cong \frac{\frac{K_a (C_a V_a - C_b V_b)}{(V_a + V_b)}}{\frac{C_b V_b}{(V_a + V_b)}} \quad (1.32)$$

bağıntısı elde edilir. Bu eşitliği,  $V_{eş}$  için gerekli bağıntımızı düşünerek yeniden düzenleyelim. Bağıntıda  $V_{eş}$  kullanarak hidronyum derişimi ifade edilir.

$$[H^+] = \frac{K_a [HA]}{[A^-]} \cong \frac{\frac{K_a (C_a V_a - C_b V_b)}{C_b}}{\frac{C_b V_b}{C_b}} \quad (1.33)$$

$$[H^+] = \frac{K_a (V_{eş} - V_b)}{V_b} \quad (1.34)$$

Görüldüğü gibi monoprotik zayıf asitlerin kuvvetli bazla titrasyonunda Gran eğrisinin eşdeğerlik öncesi bölgesi için kalibrasyon fonksiyonu budur. Bu bağıntıyı lineer fonksiyon olarak düşünelim.

$$[H^+] \cdot V_b = K_a V_{eş} - K_a V_b \quad (y = a - mx) \quad (1.35)$$

Burada değişken,  $V_b$  ile gösterilen baz hacmidir.  $V_b$  nin katsayısı eğimdir. –Eğim bize  $K_a$  yı verir.  $y = 0$  iken  $V_{eş} = V_b$  dir. Bu fonksiyon x ekseninde  $\phi_{ab}$  kullanılarak da hazırlanabilir. 1.31 no’lu bağıntıyı terimleri götüreceğ şekilde düzenlediğimizde,

$$[H^+] \cong \frac{K_a (C_a V_a - C_b V_b)}{C_b V_b} \quad (1.36)$$

$$[H^+] C_b V_b = K_a C_a V_a - K_a C_b V_b \quad (1.37)$$

olarak yazabiliriz.

Her iki tarafı asidin mmol sayısına ( $C_a V_a$ ) bölersek bu durumda eşitlik,

$$\frac{[H^+]C_b V_b}{C_a V_a} = \frac{K_a C_a V_a}{C_a V_a} - \frac{K_a C_b V_b}{C_a V_a} \quad (1.38)$$

$$\phi_{ab} = \frac{C_b V_b}{C_a V_a} \quad (1.39)$$

$$[H^+] \phi_{ab} = K_a - K_a \phi_{ab} \quad (1.40)$$

dir.  $\phi_{ab}$ ,  $V_b$  ile değişir ve eşdeğerlik noktasında 1'dir.  $\phi_{ab} = 0$  olduğunda titrasyon başlangıç noktasındadır. Bu fonksiyonda da eğim yine  $-K_a$ 'yı verir. Eşdeğerlik sonrası bölgede ise, ortamda kuvvetli baz hakimdir ve kuvvetli bazla ilgili Gran fonksiyonu bu amaçla kullanılır. Bu bağıntı protonlanmış zayıf monoprotik bazik türler ( $BH^+$ ) için de aynen uygulanır.

### 1.11. Grafikselle Yöntemlerle İyonlaşma Sabiti tayini

Yarı nötralizasyon metoduyla da asitlik sabiti hesaplanabilmektedir. Ancak yarı nötralizasyon noktasındaki pH, sadece aktiviteleri ihmal etmesinden dolayı değil aynı zamanda hassas bir ölçüm sağlamadığı için  $pK_a$ 'nın belirlenmesinde yeterli değildir. Asitlik sabiti titrasyon eğrisi üzerinde 7-10 nokta kullanılarak tercihen de %10-90 arası iyonlaşma aralığında ( $pK_a \pm 1$  birim) hesaplanmalıdır. Derişimi 0,01 M çözeltiler için  $pH=4-10$  aralığı dışında ya da 0,001M olan çözeltiler için  $pH=5-9$  aralığı dışında hidroliz etkileri için düzeltmeler yapılmalıdır. Tüm bu sorunları gidermek için Benet ve Goyan, logaritmik olmayan doğrusal bağıntıları içeren grafikselle bir metot geliştirmişlerdir (Cookson, 1974). Genel ifade ile öncelikle aşağıda verilen,

$$[H^+] = K_a [(C_a + Z)/(C_b - Z)] \quad (1.41)$$

denklemini geliştirmişlerdir. Burada Z, yük dengesinden hareketle önerilmiştir.

$$Z = [X] - [M] - [H^+] + [OH^-]$$

[X] = ilave edilen kuvvetli asidin konsantrasyonu,

[M] = ilave edilen kuvvetli bazın konsantrasyonu,

$C_a$  = zayıf asidin başlangıç konsantrasyonu,

$C_b$  = zayıf bazın başlangıç konsantrasyonu,

dur. Zayıf bazın kuvvetli asitle titrasyonunda  $C_a = 0$  olduğundan, bu bağıntı;

$$Z = C_b - K_a Z / [H^+] \quad (1.42)$$

şeklinde olur. Bu bağıntıya göre  $Z / [H^+]$ 'a karşı  $Z$  değerleri grafiğe alınır, doğrusal bir grafik elde edilir. Bu denklemde eğim bize  $-K_a$  değerini, kesim ise  $C_b$  değerini verir. Benzer şekilde zayıf asidin kuvvetli bazla titrasyonunda  $C_b = 0$  olduğundan, bu bağıntı;

$$Z = -C_a - Z[H^+] / K_a \quad (1.43)$$

şeklinde olur. Bu bağıntıya göre  $Z[H^+]$ 'a karşı  $Z$  değerleri grafiğe alınır, doğrusal bir grafik elde edilir. Bu denklemde eğim bize  $-1/K_a$  değerini, kesim ise  $-C_a$  değerini verir.

Her iki durumda da  $pK_a$ 'nın doğrusal grafikten kolayca elde edilebileceği görülmektedir. Metodun bir diğer avantajı da hatalı noktaların düz çizgi dışında kalması ve göz ardı edilebilir olmasıdır (Cookson, 1974).

Poliprotik asitlerin  $pK_a$  tayininde kullanılan bağıntılar monoprotik asitlerin  $pK_a$  tayininde kullanılan bağıntılardan farklıdır. Poliprotik asitlerde, oluşum derecesi ya da asidin anyonuna bağlı ortalama proton sayısı olarak da ifade edilen  $\bar{n}$ , aşağıdaki gibi formüllendirilebilir.

$$\bar{n} = ([HA^{2-}] + 2[H_2A^-] + 3[H_3A]) / C \quad (1.44)$$

Pay kısmında her bir türe bağlı protonların konsantrasyonları hesaplanmıştır. Payda ise, toplam analitik konsantrasyon vardır. Eşitlik 1.44 kullanılarak,  $\bar{n}$ , kesirli ifadedeki terimler  $\alpha$  cinsinden hesaplanabilir. Bu durumda;

$$\bar{n} = \alpha_1 + 2\alpha_2 + 3\alpha_3 \quad (1.45)$$

bağıntısı elde edilir.

$pH$ 'ya karşı çizilen  $\bar{n}$  grafiğindeki eğri oluşum eğrisi olarak bilinir. Oluşum eğrisi ilk kez 1915'te kromun tiyosiyanat kompleksleri üzerinde çalışan Niels Bjerrum tarafından geliştirilmiştir. Poliprotik asitler için yapılan matematiksel hesaplamalar mononükleer kompleksler için yapılanlarla aynı olacak şekilde çalışılırsa poliprotik asitlerin oluşum eğrisi buradan hesaplanabilir.

Ancak poliprotik asitlerin kuvvetli bazla titrasyonunda daha kullanışlı olan bir başka metot kullanılabilir. pH'ya karşı çizilen, ayrışma derecesi ya da asitin verdiği ortalama proton sayısını ifade eden  $3-\bar{n}$  (triprotikler için) ya da  $2-\bar{n}$  (diprotikler için) değerlerinden oluşan eğri ayrışma eğrisi olarak bilinir. Genel olarak poliprotik bir asitin verebileceği maksimum proton sayısı N olarak verilir ve ayrışma derecesi  $N-\bar{n}$  olarak ifade edilir.

Monoprotik bir asit için;  $\alpha_{HA}$ , oluşum derecesi ya da anyona bağlı ortalama proton sayısı olduğundan pH'ya karşı çizilen  $\alpha_{HA}$  grafiği oluşum eğrisini vermektedir. Benzer şekilde,  $\alpha_A = 1 - \alpha_{HA}$  'nın çizilmesi ile oluşturulan eğri ayrışma eğrisi olarak tanımlanır. Burada  $\alpha_A$ , ayrışma derecesi ya da HA molekülünün kaybettiği proton sayısıdır.

Ayrışma eğrileri, pH'ya karşı bilinen  $\alpha$  değerlerinin grafiğe geçirilmesi ile de kolayca çizilebilir. Örneğin triprotik asitler için kütle denkliği,

$$\alpha_0 + \alpha_1 + \alpha_2 + \alpha_3 = 1 \quad (1.46)$$

olarak ifade edilir. Eşitlik 1.46 ve 1.45 birleştirilirse,

$$3-\bar{n} = 3\alpha_0 + 2\alpha_1 + \alpha_2 \quad (1.47)$$

elde edilir. pH'ya karşı  $3-\bar{n}$  grafiği çizildiğinde y ekseninde 0,5; 1,5 ve 2,5 değerlerine karşılık gelen pH değerleri  $pK_{a1}$ ,  $pK_{a2}$  ve  $pK_{a3}$  değerlerini vermektedir. Benzer şekilde diprotik asitler içinde,

$$2-\bar{n} = 2\alpha_0 + \alpha_1 \quad (1.48)$$

Bağıntısı elde edilir. pH'ya karşı  $2-\bar{n}$  grafiği çizildiğinde y ekseninde 0,5 ve 1,5 değerlerine karşılık gelen pH değerleri  $pK_{a1}$  ve  $pK_{a2}$  değerlerini vermektedir.

### 1.12. Ekstrapolasyon Yöntemleri ile Sudaki $pK_a$ Tayini

Asit ayrışma sabitleri ( $pK_a$  değerleri) fonksiyonel grupların pH'ya karşı iyonlaşmasını açıkladığı ölçüde kullanışlı fizikokimyasal ölçümlerdir. Bileşikler su ile karışabilen organik çözücü içinde çözünebilirse, su-organik çözücü karışımında

görünen  $pK_a$  ( $p_sK_a$ ) değerlerini pH-metrik olarak belirlemek mümkündür (Avdeef, 1999).

Sudaki  $pK_a$  değerleri,  $p_sK_a$  değerlerinin sıfır organik çözücü içeriğine ekstrapolasyonu ile belirlenebilir (Avdeef, 1999). Farklı oranlarda çözücü-su karışımlarından elde edilen  $pK_a$  değerlerinin  $x$  (mol kesri) ya da  $1/\epsilon$  ile değişimini veren doğrusal fonksiyonlar ekstrapole edilerek sudaki  $pK_a$  değerlerine geçmek mümkündür (Narasimham, 2011). Saf sudaki  $pK_a$  değerine çok yakın  $pK_a$  değerleri veren ekstrapolasyon yöntemlerinden biri de Yasuda-Shedlovsky bağıntısıdır.

$$p_sK_a + \log[H_2O] = a/\epsilon + b \quad (1.49)$$

Burada;

$p_sK_a$ : Verilen çözücü karışımındaki  $pK_a$

$\log[H_2O]$  : Verilen çözücü karışımındaki suyun molar konsantrasyonu

$\epsilon$  : Verilen çözücü karışımının dielektrik sabiti

a: Eğim

b: Kesim

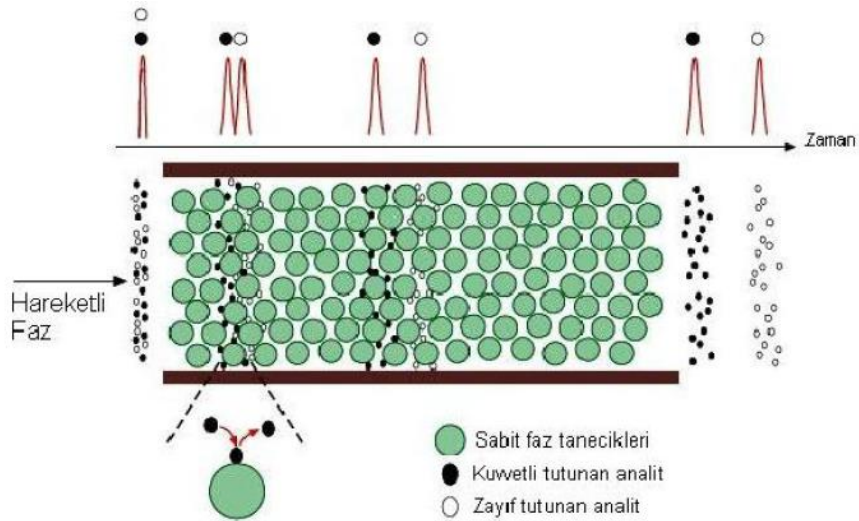
Bu eşitlik gereği  $1/\epsilon$  değerlerine karşı ( $p_sK_a + \log[H_2O]$ ) değerleri grafiğe geçirildiğinde bir doğru elde edilir. Bu doğrunun ekstrapolasyon değeri bileşiğin sudaki  $pK_a$  değerini vermektedir (Avdeef, 1999).

### 1.13. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi

Kromatografi kimyasal bir karışımı oluşturan farklı yapıdaki maddelerin birbiri ile karışmayan, hareket eden faz ile (gaz veya sıvı) sabit (duran) (katı veya sıvı) faz arasındaki partisyon (dağılım) dengelerine dayanarak ayrılmasını ve aynı zamanda bu maddelerin kalitatif ve kantitatif analizini sağlayarak geniş kullanım alanı bulan bir ayırma yöntemidir (Özden, 2011). Bu metodun temelinde, ayrılacak bileşenlerin bu iki farklı fazda gösterdikleri davranış farklılığı yer almaktadır. Hamilton (1982) ve Bidlingmeyer (1992)'e göre örnek içerisindeki bileşenler ile sabit faz arasında bazı fiziksel ve kimyasal etkileşimler olur. Analitin kolon boyunca hareket etmesi, sabit faz ve hareketli faz arasındaki kimyasal ve fiziksel dengelerin, dağılımına

bağlıdır. Bunlar çözünürlük, elektron çifti alıcı-verici etkileşimler, iyonik etkileşimler ve hidrojen bağı oluşumu gibi olaylardır (Özden, 2011).

Kolona çözücünün sürekli verilmesi, hareketli ve durgun faz arasında sürekli madde aktarımı yaparak, çözünen madde taneciklerini kolondan sürükler. Numune enjeksiyon sonrasında kolona gelir ve numunenin bileşenleri kolonun iki fazı arasında dağılır. Kolona katılan hareketli faz numune taneciklerini içeren çözücüyü kolonda ilerlemeye zorlar. Bir sıvıda çözülmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki sabit faz ile farklı etkileşimlere girerek, kolon içinde değişik hızlarda ilerler. Kolonu değişik zamanlarda terkederler ve böylece birbirlerinden ayrılırlar. Burada taşıyıcı faz olan sıvı, pompalarla kolona basıldığından yüksek akış hızındadır. Bu nedenle ayırmada kısa sürede ve tam olarak gerçekleşmektedir. Ayrılan bileşik, kolon çıkışına bağlanan uygun bir dedektörle tespit edilip miktarıyla orantılı olarak kaydedilir (Altunsoy, 2010). Bu şekilde sabit fazdan çıkan bileşenlerin derişimlerinin uygun bir biçimde ölçülüp, zamana karşı y-ekseninde işaretlenmesiyle oluşan grafiklere “kromatogram” denir. Bu grafikler hem kalitatif hemde kantitatif analiz için kullanılır (Şekil 1.7). Zaman eksenindeki piklerin yerleri, numune bileşenlerini tanımda kullanılabilir; pik alanları ise, her bir bileşenin miktarının kantitatif bir ölçüsüdür (Skoog vd., 1998).



Şekil 1.7. Kromatografik ayırımın şematik olarak gösterilmesi (Altunsoy, 2010)

Küçük dolgu maddeleri ile doldurulup yüksek basınç altında bir kolonda yapılan kromatografi türlerine yüksek performans sıvı kromatografisi denir. Hareketli fazın



sıvı olduğu, hareketli fazın sabit fazı içeren bir kolondan belirli bir basınç uygulanarak geçirildiği kromatografik sistemlerdir (Gündüz, 2002).

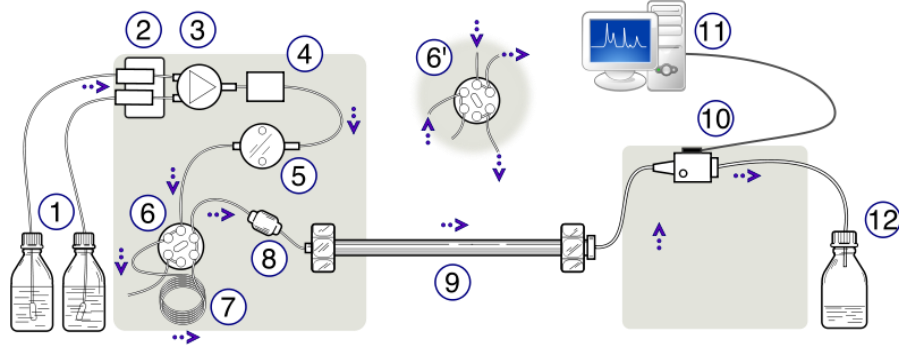
HPLC sisteminde kullanılacak hareketli fazın seçiminde, yüksek derecede saflık, dedektör ile uyumluluk, düşük viskozite, örneği çözebilme, kimyasal açıdan inert olması, uygun fiyat gibi özelliklere dikkat edilmelidir.

Hamilton (1982), White (1990), Bidlinmeyer (1992)'e göre sabit faz ile hareketli faz farklı polariteye sahip olduklarında örnek molekülleri de farklı çözünürlüklere sahip olabilmektedirler. Bu iki fazın polarite farklılığına göre dağılma kromatografisi iki kısımda incelenebilir; bunlar ters-faz sıvı kromatografisi ve normal-faz sıvı kromatografisidir (Özden, 2011).

Ters-faz sıvı kromatografisinde hareketli faz sabit faza göre daha fazla polardır. Sabit faz olarak genellikle organik grupların bağlanması ile kimyasal olarak modifiye edilmiş katı partikül yüzeyler kullanılır. Ters-faz sıvı kromatografisinde genellikle apolar maddelerin ayrımı gerçekleştirilir. Uzun zincirli sabit fazlar (C18) daha apolar maddelerin, kısa zincirli sabit fazlar (C8,C2) ise, daha polar maddelerin ayrılmasında kullanılır. Buna göre polar maddeler uzun alkil zincirli sabit fazlarda daha az tutunurken, apolar maddelerde kısa zincirli sabit fazlarda daha az tutunurlar (Hamilton, 1982; Sewel, 1987; Meyer, 1988; Bidlinmeyer, 1992).

Normal-faz sıvı kromatografisinde hareketli faz polaritesi sabit faz polaritesinden daha düşüktür. Polar sabit fazlar kullanılır. Hareketli faz içerisinde genelde metilenklorür, dietil eter, kloroform veya hekzan gibi polaritesi düşük çözücüler bulunmaktadır. En çok kullanılan sabit fazlar ise; silika ve alüminadır (Özden, 2011).

HPLC cihazının Şekil 1.8'de ayrıntılı olarak bölümleri verilmiştir. Kendine özgü işlevlere sahip olan pompa, örnek giriş sistemi (enjeksiyon bloğu), kolon, dedektör ve kaydedici (data sistemi) olmak üzere beş ana bölümden oluşan bir sistemdir.



Şekil 1.8. HPLC cihazının bölümleri

- 1) Çözücü hazneleri, 2) Çözücü degazör bölgesi, 3) Gradient valfleri (kapakları), 4) Mobil fazın dağıtımı için karıştırma kabı, 5) Yüksek basınçlı pompa, 6) Enjeksiyon konumu için kapak değişim kısmı, 6') Numune yüklemesi için kapak değişim kısmı, 7) Numune enjeksiyon döngüsü, 8) Ön-kolon (guard kolon), 9) Analitik kolon, 10) Dedektör, 11) Veri toplama, kaydedici, 12) Atık bölgesi.

Hareketli fazın sisteme verilmesi bir piston pompası aracılığıyla çözücü haznesinden sağlanır. Çözücü haznesinden seçilen çözücüler sistemin öncelikle degazör bölgesine girmelidir. Çünkü çözücüler içerisinde bulunabilecek muhtemel hava kabarcıkları ile istenmeyen partiküller bu bölümde elimine edilir. Bu sayede hem ayırım prosesinde istenmeyen etkileşimlerden kaçınılmış olup hem de dedektör sinyalindeki analiz kaynaklı gürültü minimuma indirilmiş olmaktadır (Bilber, 2010). Numunenin kolona verilmesi pompa ile kolon arasında yer alan enjeksiyon valfi yardımıyla olur. Numune, yükleme durumunda enjekte edilir. Sonra valf, enjeksiyon pozisyonuna çevrilir. Böylece numune hareketli faz yardımıyla kolona verilmiş olur. Numune bileşenleri kolonun ve hareketli fazın özelliklerine göre kolonda farklı hızlarda ilerler ve farklı zamanlarda kolonu terkederler. Kolondan ayrılan hareketli faz dedektöre gelir ve bir sinyal işlemci tarafından analitik sinyale dönüştürülür. Bu sinyal (pik) kromatogram halinde kaydedilir (Torul, 2009).

### 1.13.1. Kromatografide temel parametreler

Kromatografik yöntemlerde etkili bir ayırım gerçekleştirebilmek için numune bileşenlerinin kolonda tutunabilmesine, numune bileşenlerinin diğerlerinden ayrılabilmesine, numune bileşenlerinin bant genişliklerinin nispeten dar olmasına dikkat etmek gerekir. Bu koşullar sağlanmazsa, uygun bir ayırım gerçekleşmez.

Ayrımı iyileştirmek, uygun sabit faz ve hareketli faz seçimiyle doğrudan ilişkilidir. Koşulların uygunluğu ise, verilerin yani kromatogramların yorumlanmasıyla kontrol edilir. Kromatogram; kromatografik bir yöntemde numune bileşenlerinin kolona verilmesinden dedektöre gelene kadar aldığı yol veya zamana karşı, uygun bir dedektör tarafından elektronik olarak verilen sinyalle oluşturulan grafiktir. Zaman eksenindeki piklerin yeri, numune bileşenlerini tanımda kullanılır. Pik alanları her bir bileşenin miktarının kantitatif bir ölçüsüdür. Bir kromatogramı yorumlamak için gerekli parametreler;

Alıkonma zamanı,  $t_R$

Kapasite faktörü,  $k$

Seçicilik faktörü,  $\alpha$

Kolon ayırma gücü,  $R_s$

Kolon verimliliği,  $N$  ve  $L$  olarak verilmiştir.

#### **1.13.1.1. Alıkonma zamanı ve kapasite faktörü**

Alıkonma zamanı ( $t_R$ ), numunenin kolona verilmesinden sonra dedektöre ulaşması için geçen süredir. Alıkonma davranışı numune bileşenlerinin hareketli faz ile sabit faz arasındaki dağılımını gösterir. Kromatografide karşılaştırmalarda alıkonma zamanı yerine sıklıkla kapasite faktöründen,  $k$ , yararlanır. Kapasite faktörü, kolonda çözünen numune bileşenlerinin göç hızlarını açıklamak için kullanılan bir ifadedir. Alıkonma faktörü olarak da bilinen kapasite faktörü, aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1.50)$$

Burada  $t_R$  bileşene,  $t_0$ , kolonda tutunmayan türe ait alıkonma zamanlarıdır. İyi bir HPLC ayırması için  $k$ , 1–10 arasında olmalıdır.  $k$  değerlerinin bu aralıkta olması, mobil faz özellikleri ve durgun fazın değiştirilmesi ile sağlanır (Poole ve Poole, 1991).

#### **1.13.1.2. Seçicilik, $\alpha$**

Kromatografik sistemde iki bileşen arasında ayrımı sağlama yeteneği kolon seçiciliği olarak adlandırılır. Bu durumda bir kolondaki analitlerin seçicilik katsayısı; bir kolonun söz konusu maddeleri ne kadar iyi ayıracağına bir ölçüsüdür. Seçicilik, esas

olarak kullanılan sabit fazın özelliğine bağlı olarak değişiklik gösterse de hareketli faz bileşimi de, seçiciliği kısmen etkileyen faktörlerden biridir. Seçiciliğin matematiksel ifadesi Eşitlik 1.51' de gösterilmiştir.  $\alpha$ , 1,15 ise iki bileşiğin % 98 oranında birbirinden ayrıldığı kabul edilir.

$$\alpha = \frac{k_2}{k_1} = \frac{t_{R_2} - t_{R_0}}{t_{R_1} - t_{R_0}} \quad (1.51)$$

### 1.13.1.3. Teorik tabaka sayısı, N

Kromatografik analizlerde pik genişliği ölçülebilir ve bu kolon verimliliğine işaret eder. Kolon verimliliği kolona karakteristik olup kolonda pik dağılım derecesinin ölçümüdür. Tavsiye edilen değer  $N > 2000$  dir. Bir kromatografik ayırmada etkin tabaka sayısı, aşağıdaki bağıntı ile belirlenir:

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{W_{0,5}} \right)^2 \quad (1.52)$$

Burada;

N : Teorik tabaka sayısı

$t_R$  : Bileşene ait alıkonma zamanı

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

### 1.13.1.4. Ayırma gücü, $R_s$

Bir kolonun ayırma gücü,  $R_s$  değeri, kolonun iki analiti birbirinden ayırabilmesinin kantitatif bir ölçüsüdür. Ayırma gücünün hesaplanmasında, kapasite faktörü, tabaka sayısı ve seçicilik kullanılmaktadır. Birbirini takip eden iki pik için R değeri 1,5 iken tam ayırım olmakta,  $R= 1,325$  iken maddelerden biri diğeri içine % 0,3 oranında girmiş durumda,  $R=1$  iken, maddelerden biri diğeri içine % 4 oranında girmiş durumdadır  $R= 0,75$ 'de ayırım olmamaktadır (Skoog vd., 1998) (Şekil 1.9). Birbirini izleyen iki pik arasındaki ayırma gücü,  $R_s$ , için farklı hesaplama yöntemleri geliştirilmiştir. Aşağıdaki bağıntı kullanılarak hesaplama yapılabilir.

$$R_s = (1/4) \sqrt{N} [(\alpha-1)/ \alpha] [k/(1+k)] \quad (1.53)$$

Burada;

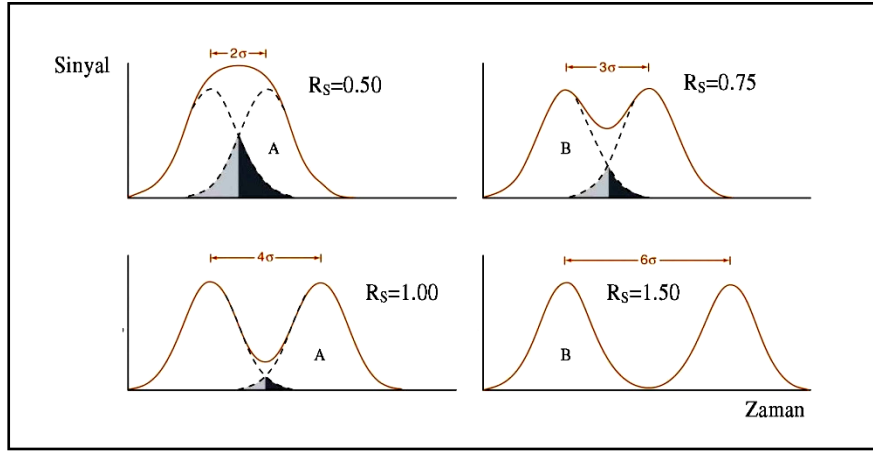
$R_s$  : Pik çifti için ayırma gücü,

$N$  : Etkin tabaka sayısı,

$\alpha$  : Seçicilik faktörü,

$k$  : Kapasite faktörüdür.

Bu bağıntı sıvı kromatografik ayırmalarda optimizasyon için esas alınan bağıntıdır. Bir kromatografik ayırmada en az ayrılan pikler, kritik pik çifti olarak adlandırılır. Pik çiftinin temel çizgide birbirinden ayrılabilmesi için ayırma faktörünün en az 1,5 olması istenir (Skoog vd., 1998).



Şekil 1.9. Ayırıcılığın piklerin birbirinden ayrılmasına etkisi

#### 1.14. Analitik Yöntemin Geçerli Kılınması

Analitik yöntemler, biyolojik numune analizlerinde, ilaç analizlerinde, biyoeşdeğerlik çalışmalarında, farmakokinetik bilgilerin değerlendirilmesi ve yorumlanmasında, ilaç etken maddelerinin nitel ve nicel analizlerinde, ilaç etken maddelerinin metabolitlerinin tayininde kullanılan yöntemlerdir. Bu işlemlerin yapılabilmesi için iyi karakterize edilmiş, güvenilir sonuçların elde edilebileceği tamamen geçerli analitik yöntemlerin kullanılması veya geliştirilmesi gereklidir. Her yeni geliştirilen yöntemin validasyon sonuçları birbirinden bağımsızdır (ICH 1994; Riley ve Rosanske, 1996; Lunte ve Radzik, 1996; Swartz ve Krull, 1997; Ahuya ve Scypinski, 2001).

Amerikan Farmakopesine (USP XXIII/NF) göre bir yöntemin geçerli kılınması, bir analiz yönteminin performans özelliklerini istenilen analitik uygulamada, belirlenen

gerekli koşullarda sağladığını göstermek için yapılan işlemlerin tümüdür. Yani bir yöntemin geçerli kılınması, analizi yapılacak madde için geliştirilen analiz yönteminin seçilen aralıkta uygunluğunu, duyarlılığını, doğruluğunu, sağlamlığını, tekrar edilebilirliğini belirtmektedir. Yöntemin geçerli kılınması için öncelikle cihaz kontrolü ve validasyonu (tüm donanım ve yazılımlar için) yapılmalıdır. Daha sonra seçilen ve geliştirilmesi düşünülen yöntemin geçerliliğini kanıtlamak için validasyon yapılır. Uygulanacak analitik işlemler için hangi tip validasyon parametrelerinin kullanılacağı belirlenmelidir. Geliştirilen bir yöntemin geçerli olabilmesi için gerekli validasyon testlerinin ve hesaplarının yapılmış olması gereklidir (ICH 1994; Riley ve Rosanske, 1996; Lunte ve Radzik, 1996; Braggio vd., 1996; Adamovics 1997; Swartz ve Krull, 1997; Mc Dowall 1999; Ahuya ve Scypinski, 2001; Ermer 2001; Shabir 2003; Papadoyannis ve Samanidou, 2004). Cihaz ve seçilen yöntemlerin validasyonları yapıldıktan sonra ayırma yöntemleri için Sistem Uygunluk Testleri yapılır. Bu testler USP tarafından önerilen ve sıvı kromatografisi ve diğer ayırma tekniklerinde yöntem geliştirmenin bir parçasını oluşturan testlerdir.

#### **1.14.1. Validasyon parametreleri**

Uluslararası Harmonizasyon Konferansı (ICH), insanlarda kullanılan ilaçların kaydı sırasında teknik ihtiyaçları karşılamak için, analitik işlemlerin geçerliliği üzerine ortak bir doküman geliştirmiştir. Bu doküman birtakım geçerlilik göstergesinin tanımını içerir. Analitik bir yöntemin validasyonu için gerekli parametreler, ulusların farklı kuruluşlarında, uluslararası komitelerde ve literatürlerde belirtilmiştir (Huber, 2007; Riley ve Rosanske,, 1996; Torul, 2009). Analitik yöntemin kabul edilebilirliğini göstermek için kullanılan analitik parametreler:

- Doğruluk (Accuracy; Geri Kazanım (Recovery))
- Kesinlik (Precision)
- Seçicilik (Selectivity)
- Teşhis Sınırı (LOD)
- Tayin Sınırı (LOQ)
- Doğrusallık (Linearity)
- Duyarlılık (Sensitivity)
- Çalışma Aralığı (Range)
- Sağlamlık (Robustness)

- Tutarlılık (Ruggedness)
- Kararlılık (Stability)

#### 1.14.1.1. Doğruluk ve geri kazanım

Analiz sonucu elde edilen değer gerçeğe yakınlığının ölçüsüdür. Sonuçlar ortalama % geri kazanım olarak verilir. Ortama ilave edilen analitin (analizi yapılacak madde) analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildiğini gösterir. Geri kazanım çalışmaları için 3 yol izlenebilir:

1) Referans standart ile karşılaştırmak:

Yöntemin sonuçlarını, referans yöntemlerden birinin sonuçları ile karşılaştırmaktır. Sonuçlar referans kabul edilen veya basılı olan başka bir yöntem sonuçları ile istatistiksel olarak karşılaştırılır. Bu karşılaştırma işlemi için student-t ve Fisher (F) testleri kullanılır. Hesapla bulunan t ve F değerleri çizelgelerde verilen teorik t ve F değerleri ile kıyaslanır. Hesapla bulunan değerlerin çizelgede yer alan değerlerden küçük oluşu geliştirilen yöntemin en az referans olarak kabul edilen yöntem kadar hassas olduğunu gösterir. Sonuçların ortalamaları, % bağıl standart sapma (% BSS) ve/veya % bağıl hata (BH) (% Bias) ile beraber verilir (Eşitlik 1.54, Eşitlik 1.55) (ICH 1994; Swartz ve Krull 1997).

$$\% BSS = \frac{SS}{X_{ort}} \times 100 \quad (1.54)$$

$$\% BH = \frac{GD - X_{ort}}{GD} \times 100 \quad (1.55)$$

Burada, GD: Gerçek Değer, SS: Standart Sapma ve  $X_{ort}$ : Ortalama Değeri ifade eder.

2) Matris ortamına analizi yapılan maddeyi ilave etmek:

Farmasötik dozaj formları gibi matris etkisi olan numunelerle çalışıldığı zaman kullanılan bir yöntemdir. Analizi yapılacak madde boş matrise değişik derişimlerde eklenir ve tayini yapılır. Sonuçlar % geri kazanım olarak ifade edilir ve % bağıl standart sapma ve/veya % bağıl hata ile beraber verilir. Bu doğruluk kontrolü numunenin hazırlanışının etkisini ve matris etkisini ölçer.

### 3) Standart ekleme yöntemi ile saf madde ilavesi:

Analizi yapılacak maddenin bilinen ve değişik miktarları matris içerisinde yer alan ve miktarı bilinmeyen veya daha önce tayin edilmiş aynı maddenin üzerine ilave edilir ve bu işleme Standart Ekleme Yöntemi adı verilir. Numunedeki etken madde derişimi hazırlanan bu çözeltilerin kalibrasyon eğrisi oluşturulmasıyla hesaplanır. Sonuçlar ilave edilen ve ölçülen madde miktarları verilerek ifade edilir. Bu teknik, katkı maddelerinin ve yardımcı maddelerin bilinmediği durumlarda kullanılır. Sonuçların ortalamaları, % bağıl standart sapma ve/veya % bağıl hata (% Bias) ile beraber verilir.

#### **1.14.1.2. Kesinlik**

Yöntemin kesinliği, herhangi bir değerin tekrarlanabilme kabiliyeti veya deney sonuçlarının birbirine yakınlığının bir derecesidir. Yani homojen bir karışımdan, kısa aralıklarla birden fazla numune alındığında elde edilen sonuçların birbiriyle uyumlu olmasıdır. Kesinlik için kullanılan sayısal ölçütler mutlak standart sapma, bağıl standart sapma, varyasyon katsayısı ve varyans olarak verilir.

#### **1.14.1.3. Seçicilik**

Analizi yapılacak maddenin, numunede bulunan girişim yapma ihtimali bulunan diğer yardımcı veya etken maddeler yanında miktarının tam ve doğru olarak tayin edilebileceğini gösteren bir parametredir. Bu kompleks numune karışımlarının analizinde girişim derecesinin de bir ölçüsüdür. Etken madde yanında safsızlıkların, parçalanma ürünlerinin, benzer kimyasal maddelerin bulunduğu numune ile bulunmadıkları numunede yapılan miktar tayini analizlerde etkin maddenin bulunan konsantrasyonları arasındaki fark olarak ifade edilir.

#### **1.14.1.4. Teşhis sınırı (LOD)**

Zemin gürültüsünden farklı olarak % 95 ya da % 99 güvenilirlik sınırı içinde tespit edilen belirlenen deney koşulları altında analitik yöntemle uygun doğruluk ve kesinlik ile analiz edilebildiği en düşük derişimdir. Bir sınır değeri olup, bu derişimin altındaki derişimlerde istenilen doğrulukta madde analiz edilemez. Teşhis sınırının hesaplanmasında, kör veya tanık çözeltilerinin analizi yapılarak sonuçların standart



sapması doğrunun eğimine bölünür. Bu değer 3,3 katının alınmasıyla gözlenebilme sınırı hesaplanır.

$$LOD = 3,3 \times SD/m \quad (1.56)$$

Bu eşitlikte SD= Tanık çözeltilerinde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçlarının veya ilgili kalibrasyon doğrusunun kesişim değerinin standart sapması, m= ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir.

#### **1.14.1.5. Tayin sınırı (LOQ)**

Bir maddenin % 95 güven sınırı içinde tayin edilebilen en düşük miktarı olarak tanımlanmıştır. Bir başka ifadeyle analitik bir yöntemde, uygun doğruluk ve kesinlikte, analitin miktarı saptanabilen en düşük derişimdir. Tayin sınırı sinyal/gürültü olarak belirlendiğinde bu oran 10 olarak alınır.

$$LOQ = 10 \times SD/ m \quad (1.57)$$

Bu eşitlikte SD, kör çözeltilerinde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçların veya y eksenindeki kesişim değerinin standart sapması; m, ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir.

#### **1.14.1.6. Doğrusallık**

Analitik bir işlemin doğrusallığı, örnek içindeki analitin derişimiyle doğrudan orantılı test sonuçlarının belli bir aralıkta elde edilebilmesi yeteneğidir. En düşük derişimden en yüksek derişime doğru bir seri standart çözeltiler hazırlanarak yöntemin doğrusal olduğu aralık belirlendikten sonra çözeltilerin derişimine karşı ölçüm yapılan cihazın verdiği cevap grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi türetilir. Kalibrasyon eğrisi derişime karşı cevabın doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafikte noktaların düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Eğim (m), kesişim (n) ve korelasyon katsayısı (r) doğrusallığı veren parametrelerdir. Bunlar analit derişiminin ölçülen değerlere karşı regresyon analizleri ile matematiksel olarak hesaplanır. Doğrusallık, korelasyon katsayısı  $r = 0,9990$  ve üzerinde ise ve cevap değerleri çizilen doğrunun üzerinde yer alıyorsa sağlanmış demektir. Doğrusallığın tam validasyonu için ayrıca eğim ve kesişim değerlerinin % BSS'ları veya standart hataları da hesaplanmalı ve raporda verilmelidir.

#### **1.14.1.7. Duyarlılık**

Analitik bir yntemde, kullanılan cihazın analit derisimindeki kk farkları ayırt edebilme yeteneğidir. Duyarlılığı sınırlayan iki faktör vardır. Birincisi; kalibrasyon eğrisinin eğimidir. İkincisi ise; ölüm aracının kesinliği ve tekrarlanabilirliğidir. Herhangi iki yntemin kesinliği eğit ise, kalibrasyon eğrisi daha dik olan yntem daha duyarlıdır. IUPAC tarafından kabul edilen duyarlılığın kantitatif tanımı kalibrasyon duyarlılığı olarak yapılır. Kalibrasyon duyarlılığı aynı zamanda eğimi ifade eder.

#### **1.14.1.8. Çalışma aralığı**

Analitik bir yntemin çalışma aralığı; kesinlik, doğruluk ve doğrusallık belirlenirken, tayin edilebilen en düşük derişimden (LOQ), kalibrasyon eğrisinin doğrusallıktan sapma gösterdiği derişime (LOL) kadar olan aralığı kapsar (Torul, 2009). Derişim aralığı genellikle seçilen yntemin tipine göre değişir. Bu aralık yntemin doğrusallığı bulunduktan sonra belirlenir. Ana maddenin analizinde standartların derişimleri genellikle hedeflenen seviyede veya ona yakın llr.

#### **1.14.1.9. Sağlamlık**

Sağlamlık testleri, analiz parametrelerinin analiz sonuçları üzerindeki etkilerini ölçer. Çeşitli şartlar altında yntemin analitik sonuçlarının kabul edilebilir doğruluk ve kesinliğini saptama kabiliyeti olarak da tanımlanabilir.

Sağlamlık, yntemin bir veya birden daha fazla parametresi değiştirildiğinde tekrar validasyona ihtiyacı olup olmadığına karar verilmesini sağlar. ICH dökümanları; gelişme fazı sırasında, bir yntemin sağlamlık gelişimini dikkate almayı tavsiye eder. Farklı oda sıcaklığı ve farklı labarotuvarlardaki nem, farklı tecrübeye sahip analizciler, farklı firmaların aletleri, farklı kaynaklardan belirteçler sağlamlığa etki eden faktörler arasındadır (Ertaş ve Kayalı, 2005; Torul, 2009).

#### **1.14.1.10. Tutarlılık**

Analitik bir yntemin tutarlılığı, aynı analiz numunesinin uzun zaman aralıklarında farklı koşullarda analizi yapıldığındaki tekrarlanabilirliğinin bir ls olarak tanımlanmıştır. Yani normal koşullarda farklı kişiler veya farklı labarotuvarda elde edilen sonuçların değerlendirilmesiyle hesaplanır. % bağıl standart sapma ile ifade

edilir. ICH, analitik bir yöntemin validasyonunda bu parametreyi zorunlu kılmamıştır (Skoog vd., 1998; Ertaş ve Kayalı, 2005; Torul, 2009).

#### **1.14.1.11. Kararlılık**

Zorunlu bir validasyon parametresi olmamakla beraber yapılması tavsiye edilir. Tekrar edilebilir ve güvenilir sonuçlar elde edebilmek için numunelerin, standart maddelerin ve kullanılan çözücülerin uygun bir süre (örneğin 1 gün, 1 hafta, 1 ay veya ne kadar süreye ihtiyaç duyuluyorsa o kadar süre) stabilitesini koruması gereklidir. Etken maddenin stabilitesi oda sıcaklığında ve en az 6 saat olarak değerlendirilmelidir. Saklama süresinin tamamlanmasından sonra stabilite taze hazırlanmış stok çözelti ile karşılaştırma yaparak tayin edilir.

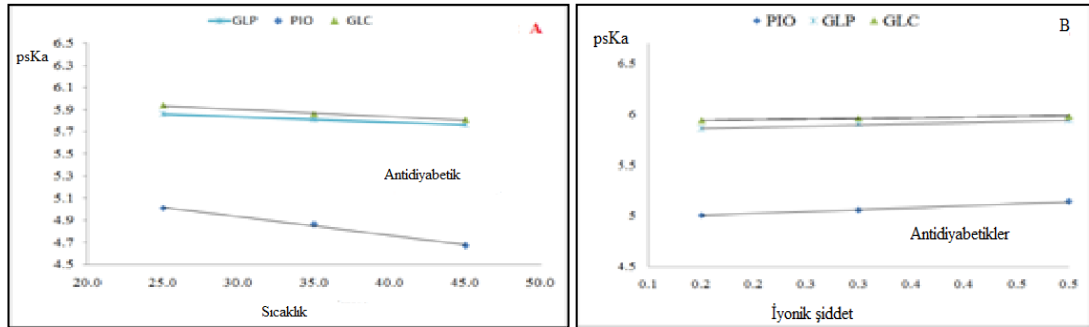
## 2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu tez çalışmasında sülfonilüre ve tiyazolidindion grubu bileşiklerin bazılarının iyonlaşma sabitlerinin tayini hem yüksek performans sıvı kromatografi yöntemiyle hem de potansiyometrik yöntemle yapılmıştır. Ayrıca bu gruptaki bileşikleri içeren diyabet ilaçları seçilerek, bileşikler yüksek performans sıvı kromatografi yöntemiyle kantitatif olarak tayin edilmiştir. Bu bölümde bu bileşiklere ait yapılan  $pK_a$  tayini ve metod validasyonu çalışmalarına değinilecektir.

Yapılan literatür taramasında sülfonilüre ve tiyazolidindion grubu bileşiklerin iyonlaşma sabitlerine ait çeşitli literatürlerde veriler bulunmaktadır. Fakat literatürlerde bu bileşiklerin iyonlaşma sabitlerinin nasıl belirlendiğine dair yöntem verilmemiştir. Bu bileşiklerin potansiyometrik titrasyon yöntemiyle  $pK_a$  tayinine ait yalnızca bir literatür bulunmaktadır. Narasimham ve Barhate (2011), gliklazid, glipizid, glibenklamid gibi antidiyabetik ilaçların ve pioglitazon gibi beta blokerlerin  $pK_a$  ve lipofilisite gibi fizikokimyasal parametrelerini potansiyometrik titrasyon ve spektrofotometrik yöntemlerle tayin etmişlerdir. Metanol, etanol, asetonitril ve dioksanın su ile ikili karışımlarının kullanıldığı bu yöntemle 25-45 °C arası sıcaklıklarda ve 0,15 ile 0,5 M arasında değişen iyonik şiddetinde çalışılmıştır. Sıcaklığın, iyonik şiddetin ve dielektrik sabitinin iyonlaşma sabiti üzerindeki etkisi karşılaştırılmıştır. Sudaki  $pK_a$  değerleri Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyonu ile hesaplanmıştır. Çizelge 2.1'de pioglitazon, gliklazid ve glipizid için farklı organik çözücü, farklı bileşimlerde ve farklı yöntemlerle elde edilen  $pK_a$  değerleri verilmiştir. Şekil 2.1'den görüldüğü gibi çalışılan tüm antidiyabetiklerin iyonlaşma sabiti artan sıcaklıkla azalmış ve artan iyonik şiddet ile azalmıştır. Bulunan verilerin literatür verileri ile uyumlu olduğu sonucuna ulaşmışlardır.  $pK_a$ 'daki standart sapmaları ortalama 0,2 birim olduğu için organik çözücü su karışımlarının suda çözünmeyen bileşikler için ve laboratuvarda ilaç araştırmalarında iyonlaşma sabiti tayininde kolayca uygulanabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Çizelge 2.1. Farklı organik çözücü bileşimlerinde Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyonu ile hesaplanmış pK<sub>a</sub> değerleri

Bileşikler	Organik çözücü-Su Karışımı	% W	pK <sub>a</sub> ±S.D	Metot
Pioglitazon	Metanol	37-59	5,37 ± 0,04	Potansiyometrik
	Etanol	34-56	5,56 ± 0,05	Potansiyometrik
	Asetonitril	31-52	5,38 ± 0,04	Potansiyometrik
	1,4-Dioksan	30-50	4,74 ± 0,06	Potansiyometrik
Gliklazid	Metanol	20-60	5,58 ± 0,01	Potansiyometrik
		10-53	5,63 ± 0,01	Spektrofotometrik
	Etanol	20-60	5,63 ± 0,01	Potansiyometrik
		10-53	5,70 ± 0,01	Spektrofotometrik
	Asetonitril	11-60	5,58 ± 0,06	Potansiyometrik
		21-53	5,64 ± 0,08	Spektrofotometrik
Glipizid	1,4-Dioksan	20-60	5,48 ± 0,05	Potansiyometrik
		10-52	5,58 ± 0,07	Spektrofotometrik
	Metanol	20-60	5,19 ± 0,01	Potansiyometrik
	Etanol	30-60	5,49 ± 0,05	Potansiyometrik
	Asetonitril	12-50	5,42 ± 0,03	Potansiyometrik
	1,4-Dioksan	27-50	4,89 ± 0,15	Potansiyometrik



Şekil 2.1. İyonlaşma şiddetine a) sıcaklığın etkisi b) iyonik şiddetin etkisi

Literatürlerde sülfonilüre ve tiyazolidindion grubu bileşiklerin gerek ilaç karışımlarından gerekse insan veya hayvan plazmasından eş zamanlı belirlenmesi ve tespiti için genel olarak HPLC yöntemi uygulanmıştır. Bu yöntemin dışında APCI–LC–MS (atmosferik basınç kimyasal iyonlaşma sıvı kromatografi-kütle spektrometresi), Miseller Elektrokinetik (MECK), LC-MS/MS, SPE (katı faz ekstraksiyonu), HPLC-ESI-MS/MS ve LC-APCI-MS/MS gibi metotlarla bileşiklerin nitel ve nicel analizleri üzerinde çalışmalar yapılmıştır.

Vasudevan vd. (2001), çok bileşenli dozaj formlarında metforminin gliklazid ve glipizid ile eş zamanlı tayini için basit, kesin ve doğru sonuçlar veren HPLC

metodunu geliştirmişlerdir. Inertsil C<sub>18</sub> kolonun kullanıldığı bu yöntemde akış hızı 1 mL/dakika olan (35:65) asetonitril-sülfonik asitin sulu çözeltisi (75 mM; 0,1 N NaOH ile pH 7'ye ayarlanmış) mobil faz olarak kullanılmıştır. İç standart olarak tolbutamidin kullanıldığı ayırmalarda 20 °C'da ve 225 nm'de çalışılmıştır. Bu çalışmada metformin-gliklazid karışımı ve metformin-glipizid karışımı 20 µL enjeksiyon hacminde 3'er kez enjeksiyon yapılmıştır. Alıkonma zamanları metformin için 2,14 dakika, tolbutamid için 5,89 dakika, gliklazid için 8,33 dakika, ve glipizid için 10,3 dakikadır. Sistemin yeterliliği için kolon etkinliği, Rs ve pik simetrisi gibi parametreler hesaplanmıştır. Geliştirilen bu metot kesin, doğruluğu yeterli ve hızlı olması nedeniyle ham maddelerin kalite kontrolü, formülasyonu için uygundur ve çözünme çalışmaları için uygulanabilir.

Maurer vd. (2002), sülfonilüre tipi oral antidiyabetiklerden glibenklamid, glibornurid, gliklazid, glimepirid, glipizid, glikuidon, glisoksepid, tolazamid ve tolbutamidi insan plazmasında atmosferik basınç kimyasal iyonlaşma sıvı kromatografi-kütle spektrometresi (APCI-LC-MS) yöntemi ile çalışmışlardır. Bu metot oral antidiyabetiklerin aşırı dozda alınımının neden olduğu Munchausen sendromunun teşhisinde spesifik bir yöntemdir. Bu yöntemde LiChroCART kolon (125mm x 2mm) kullanılmıştır. Gradient çalışmada mobil faz olarak 0,05 M amonyum format (formik asit ile pH 3'e ayarlanmış) ve asetonitril kullanılmıştır. Bu yöntemin farklı toksik bileşiklerin plazmada taranması, tanınması ve kantitasyonu için uygun bir prosedür olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Radhakrishna vd. (2002a), pioglitazon HCl'nin farmasotik formülasyonlarda tespiti için HPLC ve Miseller Elektrokinetik Kromatografi (MECK) metotlarını geliştirmişlerdir. Pioglitazon ve doymamış safsızlıkları 7 dakikadan daha az bir sürede MECK yöntemiyle ayırmışlardır.

Bunun için 43 cm x 50 µM boyutlarında silika bağı kapiler ile 30 °C'da ve 25 kV'da çalışılmıştır. BGE olarak pH 9,3'te 20 mM sodyum borat tamponu ve % 20 asetonitril (v/v) seçilmiştir. Tamponun pH'sı, tampon konsantrasyonu, modifiyerler, sıcaklık ve voltaj gibi parametrelerin ayırmaya olan etkileri incelenmiştir. HPLC metodunda ise C<sub>18</sub> (250 x 4,6 mm) kolonu ve mobil faz olarak 1 mL/dakika akış hızında asetonitril- 10 mM potasyum dihidrojen fosfat tamponu (50:50, v/v; pH 6,0) kullanılmıştır. 4-kloranilin iç standart olarak kullanılmıştır. Bu iki metodun sonuçları

Student's t-test ve F-test karşılaştırılmış ve birbirinden kesinlik ve doğruluk bakımından çok farklı olmadığı çalışmacılarca ileri sürülmüştür.

Radhakrishna vd. (2002b), toplu ilaç ve ilaç formülasyonunda rosiglitazon ve ilgili safsızlıklarının tespiti için HPLC metodunu geliştirmiş ve sonradan validasyonunu yapmışlardır. Ayırmalarda Symmetry C<sub>18</sub> kolonu kullanılmıştır. Mobil faz olarak sodyum fosfat tamponu (pH 6,2) – asetronitril (50:50, v/v) kullanılmıştır. UV dedektörle 245 nm'de çalışılmış ve indol iç standart olarak kullanılmıştır. Tüm ayırmalar 15 dakikadan daha az bir sürede tamamlanmıştır. Geliştirdikleri bu metodun hassas, seçici ve seçilen ilaçlar için kesin olduğunu belirterek, rutin ilaç kalite kontrol belirlemelerinde kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.

Kolte vd. (2003), insan plazmasında rosiglitazonun belirlenebilmesi için HPLC metodunu geliştirmişlerdir. Pioglitazon iç standart olarak kullanılmıştır. Pioglitazon ve rosiglitazon plazmadan sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle ekstrakte edilmiştir. İzokrotik ayırmada ters faz Zorbax SB C<sub>18</sub> kolon, metanol ve 10 mM monobazik sodyum fosfat ve dibazik sodyum fosfat içeren fosfat tamponu (30:70, v/v; pH 2,6) mobil faz olarak kullanılmıştır. UV dedektörle 245 nm'de çalışılmış ve alıkonma zamanları rosiglitazon için 8,3 dakika, pioglitazon için 18,0 dakika bulunmuştur. Mobil fazda kullanılan tamponun pH etkisinin pioglitazonda rosiglitazondan daha belirgin olduğunu ve pioglitazonun alıkonma zamanının tamponun pH etkisi ile arttığını bulmuşlardır.

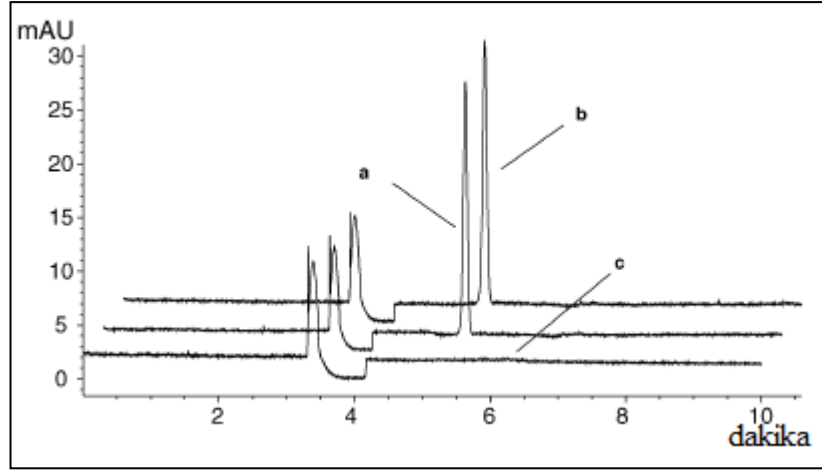
Lin vd. (2004), glipizid ve rosiglitazon ile protein arasındaki ilaç-ilaç protein bağı etkileşimini araştırmak için glipizid ve rosiglitazonun insan plazmasından ayrımı için diyaliz eşitliğini kullanarak LC-MS/MS metodunu geçerli yapan bir metot geliştirmişlerdir. Bunun için diyaliz sonrası insan plazması veya tampon örneklerinin 0,2 mL'si sıvı-sıvı ekstraksiyon prosedürü ile eksakte edilmiş ve yüksek performans sıvı kromatografi elektrosprey bağı kütle spektrometresi ile analiz edilmiştir. İzokrotik çalışmada Zorbax SB-fenil kolon kullanılmıştır. Atmosfer basınçlı elektrosprey iyon kaynağı ile iyonlaştırılma gerçekleştirilmiştir. Çoklu reaksiyon izleme ile pozitif iyon modunda analiz edilmiştir. İyon geçişleri, glipizid için m/z 446→321, rosiglitazon için m/z 358→135 ve internal standart olarak kullanılan tolbutamit için m/z 271→155 olarak görüntülenmiştir. Kromatografik olarak alıkonma zamanları glipizid için 2,3 dakika; rosiglitazon için 3,4 dakika ve

tolbutamid için 2,3 dakikadır. Her iki bileşik için LOQ 1,0 ng/mL'dir ve > %99 oranında proteine bağı oldukları belirlenmiştir. Glipizid ve rosiglitazon için 1000 ng/mL de insan plazmasında serbest kısmını sırasıyla % 0,678 ± 0,071 ve 0,389 ± 0,061 olduğu bulunmuştur. Bu geliştirilen metot tekrarlanabilirlik ve hassaslık sağlamasının yanı sıra klinik örneklerle uygulanabilirliği ile de rapor edilmiştir.

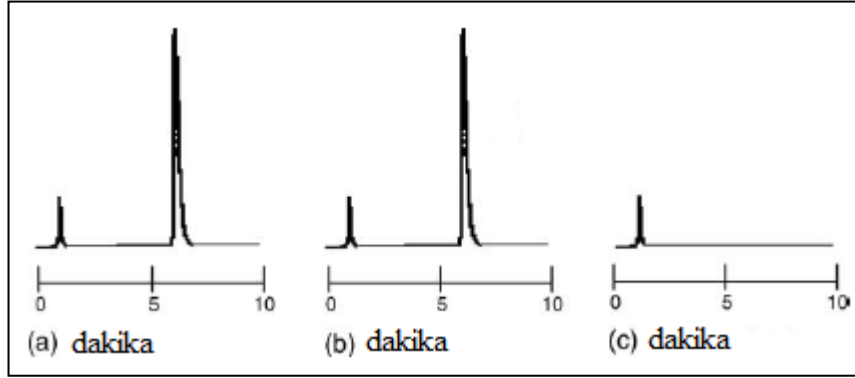
Ho vd. (2004), glipizid, glibenklamid, glimepirid, gliklazid, tolazamid, tolbutamid, nateglinid, repaglinid, rosiglitazon, ve pioglitazonun at plazmasında ve idrarda eş zamanlı olarak belirlenmesi ve ayrılması için uygun bir LC-MS/MS metodu geliştirmişlerdir. Bunun için bu antiyabetikler at plazmasından sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemiyle izole edilmiştir ve pozitif elektrosprey iyonlaşma moduyla LC-MS/MS metoduyla analiz edilmiştir. Bu 10 antidiyabetik ilacın ayırımında ters faz Supelcosil LC-8-DB kolonu (10 cm x 2,1 mm, 3 µM), pH 3'te 10 mM amonyum format tamponu su (çözücü A) ve metanol (çözücü B)'den oluşan mobil fazla 0,2 mL/dakika akış hızında gradient olarak çalışılmıştır. Sıcaklık 30 °C ve enjeksiyon hacmi 5 µL'dir. Bu metodun yarış atlarında antidiyabetik ilaçların kötüye kullanımını tespit etmek için de kullanılabileceğini belirtmişlerdir.

Gomes vd. (2004), antihyperglisemik ajan olan tablet halindeki rosiglitazonun belirlenmesi için MECK ve HPLC metodunu geliştirmişlerdir. Elektroforetik ayırmalarda 48 cm uzunluğunda silika kaplı kapiler ve BGE olarak 30 mM SDS (sodyum dodesil sülfat) içeren (pH 9,0) sodyum tetraborat tamponu kullanılmıştır. Ayırmalar 25 °C'de 20 kV voltajda ve 247 nm'de DAD dedektörle yapılmıştır (Şekil 2.2). HPLC metodunda ise RP-18 (125 x 4,0 mm) kolon ve 0,8 mL/dakika akış hızında 25 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> içeren asetonitril (55:45 v/v) tamponu (pH 6,2) kullanılmıştır. Şekil 2.3'de bu metoda ait kromatogram verilmiştir. Bu iki metot birbiriyle karşılaştırılmış ve istatistiksel analizlerde çok belirgin farklar gözlenmemiştir. Her iki metodunda farmasötik dozaj formlarında rosiglitazonun belirlenmesinde kullanılabileceğini ileri sürmüşlerdir.





Şekil 2.2. MECK yöntemine ait elektroferogramlar a) Rosiglitazon referans standart çözeltisi b) Rosiglitazon tablet c) Rosiglitazon içeren yardımcı maddeler



Şekil 2.3. HPLC yöntemine ait kromatogramlar a) Rosiglitazon referans standart çözeltisi b) Rosiglitazon tablet c) Rosiglitazon içeren yardımcı maddeler

AbuRuz vd. (2005), plazmada metformin, glipizid, gliklazid, glibenklamid ve glimepiridin eş zamanlı belirlenmesini ve validasyonlarını SPE (katı faz ekstraksiyonu) ve HPLC yöntemlerini geliştirerek belirlemişlerdir. Bu bileşiklerin eş zamanlı belirlenmesi kombine ilaç alan diyabet hastaları için ve kombine dozaj formların farmakokinetiklerinin çalışılmasında oldukça önemlidir. Geliştirilen metotların geri kazanımı %76,3 ve %101,9 arasında bulunmuştur. LOQ, 5 ve 22,5 ng/mL arasındadır. Varyasyon katsayısı ile hesaplanan günler içi ve günler arası kesinlik her zaman % 9'dan küçüktür. Denge analizleri bütün analitlerin -70 °C'de 3 ay muhafaza edilebileceğini göstermiştir. Bu çalışmada Discovery C<sub>18</sub>Supelco analitik kolon (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), ön kolon olarak da Supelco Discovery C<sub>18</sub> (20 mm x 4 mm, 5 µm) kullanılmıştır. 2 mM sodyum dodesil sülfat, asetonitril (% 37,5) ve potasyum dihidrojenfosfat (% 62,5)'tan oluşan mobil fazın akış hızı 1 mL/dakikadır. 225 nm dalga boyunda UV dedektör ile çalışılmıştır. Bu metodun

sülfonilüre ve metformin kombine ilaçları alan diyabet hastalarının klinik çalışmaları için kabul edilebilir olduğunu ileri sürmüşlerdir.

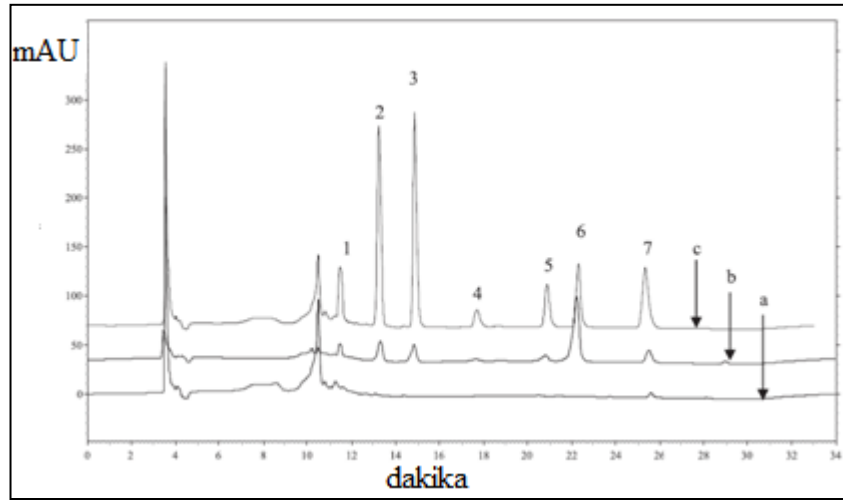
Kuo ve Wu (2005), çalışmalarında gliklazidin insan plazmasındaki analizi için hassas HPLC-elektrokimyasal tespit metodunu geliştirmişlerdir. 100 µL plazmanın asetoniril ile deprotonasyonundan sonra evaporasyon ve yeniden yapılanmasıyla gliklazid ayrılabilmiştir. Bu işlem için Apollo C<sub>18</sub> kolon (150 mm x 4,6 mm) kullanılmış, 70 mM disodyum tetraborat (pH 7,5) ve % 26,5 asetonitril mobil faz olarak kullanılmıştır ve 0,8 ml/dakika akış hızında çalışılmıştır. Çalışma elektrodu olarak 800 mV potansiyelde Ag/AgCl elektrodu kullanılmıştır. Regresyon eşitlikleri 50 nM-4 µM aralığında doğrusaldır. Günler içi, günler arası kesinlik için bağıl standart sapma ve bağıl hata sırasıyla 5,3 ve % 0,93'ten küçüktür. Gliklazidin plazma için LOD değeri 10 nM'dir. Yeni geliştirilen bu yöntem gliklazid tabletle sağlıklı bir gönüllüde uygulanmıştır.

Khan vd. (2005), glimepirid ve 4 yan ürününün ters faz sıvı kromatografi metoduyla nicel olarak belirlemişlerdir. Glimepiridin yan ürünlerinin tespisi ve karakterizasyonu için normal faz HPLC metodu kullanılmıştır. Nükleer Manyetik Rezonans, Fourier Transform Infrared Spektrometresi, UV ve Kütle Spektrometresi gibi spektroskopik verilere dayalı metotlar bu yan ürünlerin karakterizasyonu için kullanılmış ve standartlar için ters faz HPLC metodu kullanılmıştır. Kromatografik ayırmalarda kolon olarak Phenomenex Luna C8 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm), mobil faz olarak 1 mL/dakika akış hızında pH 7,0'de fosfat tamponu-asetonitril-THF (73:18:09, v/v/v) karışımı kullanılmıştır. Çalışmada 228 nm'de UV dedektörle, kolon sıcaklığı 35 °C'da olacak şekilde çalışılmıştır. Glimepiridin trans molekülünün aktif olduğu tespit edilmiştir. Bu metodun uluslararası kılavuzlara uygun metot validasyonu yapılmıştır. Yöntemin glimepiridin rutin kalite kontrol analizleri için kullanılabilir olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Yardımcı ve Özaltın (2005), farmosötik preparatlarda rosiglitazon ve metforminin eş zamanlı belirlenmesi için kapiler zon elektroforez metodunu geliştirmişlerdir. Bu analitler için optimum ayırma 9 dakikadan daha az bir sürede tamamlanmıştır. 25 °C'da 72 cm silika kaplı kapilerle 25 mM asetat çalışma tamponu (pH 4,0) ile 25 kV voltajla çalışılmıştır. Verapamil iç standart olarak kullanılmış ve UV dedektörle 203 nm'de çalışılmıştır. Sonuçlar, sıvı kromatografi metoduyla yapılan sonuçlarla

karşılaştırılmış ve önemli bir fark bulunmamıştır. Metodun hassaslık, doğrusallık, doğruluk, kesinlik ve sağlamlık bakımından iyi bir performans gösterdiğini ileri sürmüşlerdir.

Venkatesh vd. (2006), glibenklamid, glipizid, gliklazid, pioglitazon, repaglinid ve rosiglitazonun eş zamanlı belirlenmesi, ilaç tabletlerinden analizi ve insan plazmasına uygulanması için uygun bir HPLC metodu geliştirmişlerdir. Inertsil ODS 3V (4,6 x 250 mm x 5 µm) kolonuyla 1 mL/dakika akış hızında 25 °C’de 260 nm dalga boyunda asetonitril-metanol-su (pH 3’te 0,01 M formik asit) karışımının mobil faz olarak kullanıldığı sistemde gradient olarak çalışılmıştır. Rosiglitazon, pioglitazon, glipizid, glibenklamid, IS ve repaglinid için alıkonma zamanları sırasıyla 11,4; 13,3; 14,8; 17,6; 20,78; 22,1 ve 25,4 dakikadır (Şekil 2.4). Bu çalışma için sistem uygunluk parametreleri, Çizelge 2.2’de verilmiştir. Bu çalışmalarıyla tek bir dalga boyunda gradient metotla HPLC yöntemi validasyonu yapılmış ve 6 antidiyabetik ilaç eş zamanlı olarak tespit edilmiştir.

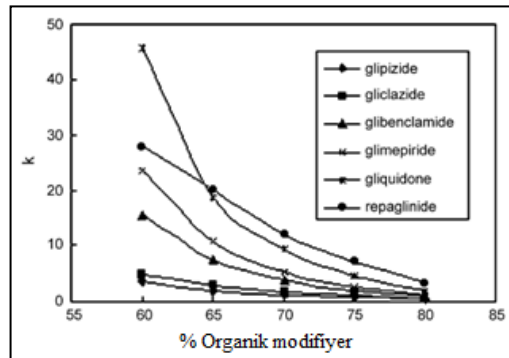


Şekil 2.4. HPLC kromatogramları a) Blank b) 0,5 µg/mL konsantrasyonunda glibenklamid, gliklazid, glipizid, pioglitazon, rapeglinid, rosiglitazon ve 20µg/mL iç standart içeren insan plazması c) 20µg/mL iç standart içeren sentetik ilaç karışımları tableti 1, rosiglitazon; 2, pioglitazon; 3, glipizid; 4, gliklazid; 5, glibenklamid; 6, iç standart; ve 7, rapeglinid.

Çizelge 2.2. Sistem uygunluk parametreleri

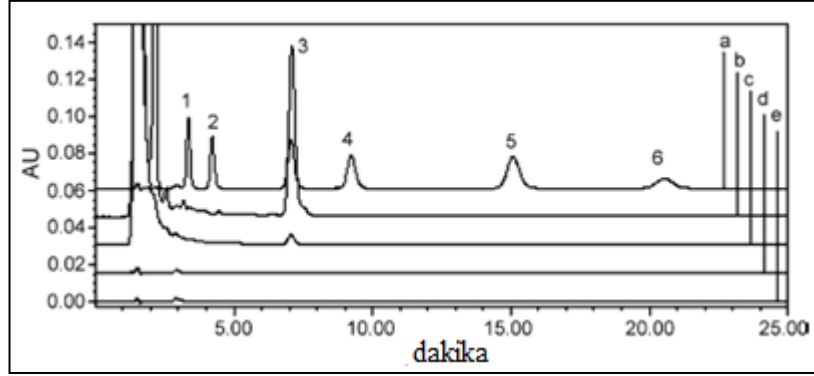
Numune No	Bileşik	$t_r$	$k'$	$R_s$	$T_t$	N
1	GLB	20,7	2,56	3,70	1,23	44523
2	GLC	17,6	2,32	3,11	1,14	26424
3	GLZ	14,8	3,11	2,18	1,16	43671
4	PGL	13,3	2,17	4,32	1,00	30818
5	RPG	25,4	3,90	2,07	1,07	51334
6	RGL	11,4	4,14	1,73	1,36	31912

İlaç sahteciliği, gelişmekte olan ülkelerde özellikle Çin’de önemli bir sorun haline gelmektedir. Yao vd. (2007), sahte ilaçları elemek ve hileli gıda takviyeli ürünlerin taranması için izokrotik ters faz sıvı kromatografi yöntemini geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu metotta 6 antidiyabetik ilaç için en uygun koşulun belirlenmesinde dalga boyu, mobil faz ve bunların oranları, tamponun optimum pH’sı ve konsantrasyonu için parametreler denenmiştir. Glipizid, gliklazid, glibenklamid, glimepirid, glikuidon, ve repaglinid için maksimum absorpsiyon dalga boyları sırasıyla 228, 229, 230, 230, 224, ve 244nm’dir. HPLC ile ölçüm için tüm bileşiklerin absorbansının güçlü olduğu 230 nm dalga boyu seçilmiştir. İlaçların  $pK_a$  değerleri dikkate alındığında simetrik piklerin gözlenildiği ve iyonlaşmanın olmadığı pH 3,0 seçilmiştir. pH 3,0’de bütün antidiyabetik ilaçlar ayrılmış ve bu pH’da fosfat tamponu ( $pK_{a1}=2,12$ ) kullanılmıştır. Tamponun konsantrasyonu 0,01 mol/L  $KH_2PO_4$  olarak belirlenmiştir. 6 antidiyabetik ilacın kapasite faktörü organik modifiyer yüzdesine karşı grafiğe geçirildiğinde optimum koşulun %70 organik faz olduğu kabul görülmüştür (Şekil 2.5). Altima C18 (150 mm x 4,6mm, 5 $\mu$ m) kolonu ile 1,0 ml/dakika akış hızında çalışılmıştır. Bu şartlar altında 6 antidiyabetik ilacın kromatogramları, Şekil 2.6’da verilmiştir.



Şekil 2.5. Altı antidiyabetik ilaç için organik modifiyer yüzdesinin değişiminin kapasite faktörüne olan etkisi

Geliştirilen bu metodun seçilen 6 antidiyabetik ilacın eş zamanlı belirlenmesinde ve ayrılmasında uygun olduğu gözlenmiş ve Çin piyasasında satılan bazı ilaçlar üzerinde denenmiştir. Gliklazid içerdiği belirtilen tablette ilaç aktif maddesinin olmadığını tespit etmişlerdir.



Şekil 2.6. Altı antidiyabetik ilaç için a) Karışımın kromatogramı: 1, glipizid; 2, gliklazid; 3, glibenklamid; 4, glimepirid; 5, glikuidon; 6, repaglinid b) Pingtangan kapsül c) Zhiwuyidaosu kapsül d) gliklazid içerdiği belirtilen tablet e) Kör tayin.

Oral antidiyabetiklerle tedavide tek ilaç tedavisinin yetersiz kalmasıyla kombine ilaç tedavisine ihtiyaç duyulmuştur. Kombine ilaç tedavilerinin yaygınlaşmasıyla birlikte oral antidiyabetik ilaçların eş zamanlı belirlenebilmesi ve ayrılması için çeşitli metotlar geliştirilmiştir. Bu amaçla Wang ve Miksa (2007), glipizid, gliburid, repaglinid, rosiglitazon, nateglinid ve pioglitazonu içeren kombine ilaçların kantitasyonunu biyolojik matriks olan maymun plazması üzerinde LC-MS/MS metodu ile çalışmışlardır. Gradient HPLC metodunda 10 mm amonyum format tamponu ve % 1 formik asit içeren asetonitril mobil faz olarak kullanılmıştır. MS/MS ile belirleme pozitif iyon çoklu reaksiyon izleme modu ile yapılmıştır. Bütün analitler için en düşük kantitasyon sınırı 1,0-5,0 ng/mL arasındadır. İlaç geri kazanımı, % 82,6 - % 94,2 aralığındadır.

Pathare vd. (2007), oral antidiyabetik ilaç olan glimepiridin cis-izomerinin hızlı ayrımı için ters faz sıvı kromatografi yöntemini geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırmalarda (75:25, v/v) tetrahidrofuran-su organik modifiyeri kullanılmış ve Waters Symmetry kolonla (50 mm x 4,6 mm, 3,5 µm) çalışılmıştır. Kolon sıcaklığı 30 °C olup bileşikler UV dedektörle 228 nm'de izlenmiştir. Cis-izomerin alıkonma zamanı 5,0; glimepiridin ise 5,6 dakikadır. Geliştirilen metodun doğruluğu ve sağlamlığı

kanıtlanmıştır. Cis-izomerin 10 µL enjeksiyon hacmi için LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 500 ve 1,500 ng/mL olarak tespit edilmiştir. Geri kazanımı 97,3-102,0 arasında değişmektedir. Bu metot cis-izomerin kantitatif belirlenmesi için uygun bulunmuştur.

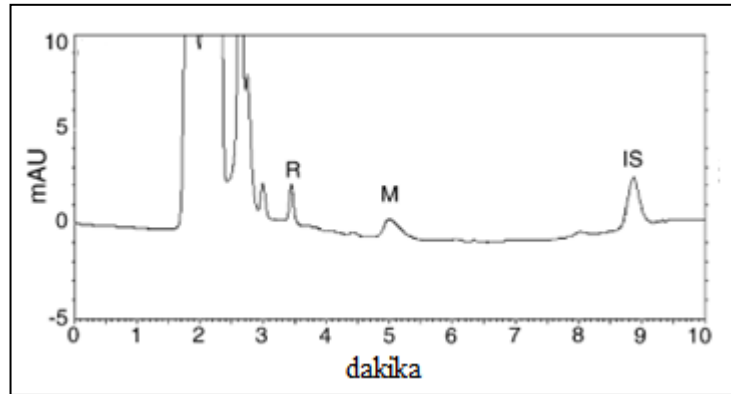
He vd. (2007), rosiglitazonun insan plazmasında tespiti için hassas ve seçici bir yöntem olan yüksek performans sıvı kromatografi-elektrosprey iyonlaştırma bağlı kütle spektrometresi (HPLC-ESI-MS-MS) yöntemini kullanmışlardır. Bileşikler pro C<sub>18</sub> kolonla amonyum asetat tamponu (0,02 M; pH 6,5) ile asetonitrilin (47:53, v/v) kullanıldığı mobil fazla ayrılmışlardır. Validasyondan sonra rosiglitazonun farmakokinetik profilini çalışmak için bu metot, 5 sağlıklı gönüllüye 4,0 mg'lık tek doz ilaç uygulamasından sonra uygulanmıştır. Önerilen bu metot değerlendirmelerinin kesin olması, rosiglitazonun farmakokinetik kantitasyonu için biyoyararlılığı ve ilaç-ilaç etkileşimleri çalışmaları için uygun bulunmuştur. Bu metodun rosiglitazon ve metabolitlerinin insan plazmasında eş zamanlı tespiti için de kullanılabilir olduğunu ileri sürmüşlerdir.

Albu vd. (2007), insan plazmasında glibenklamidin belirlenmesi için LC-APCI-MS-MS metodunu geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırmalarda Chromolith RP-18 (100 mm x 4,6 mm) kolonundan yararlanılmıştır. Akış hızı 1 mL/dk olan mobil fazda % 58 asetonitril - % 42 sulu % 0,1 (v/v) formik asit çözeltisi kullanılmıştır. Enjeksiyon hacmi 50 µL ve sıcaklık 40 °C'dir. İç standart olarak glikuidon kullanılmıştır. Bu metot glibenklamidin formülasyonlarının biyoeşdeğerlik çalışmalarında kullanılmış ve kabul edilebilir kesin ve doğru sonuçlar elde edilmiştir.

Giaginis vd. (2007), ciglitazon, troglitazon, netoglitazon ve amfolit olan pioglitazon ile rosiglitazonun lipofilik özelliklerinin PRAR-γ aktivitelere olan ilişkisini oktanol-su deneyleri ve ters faz HPLC metoduyla farklı şartlarda incelemişlerdir. Bunun için Hypersil BDS C-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) kolon, Supelcosil ABZ+ Plus kolon (150 mm x 4,6 mm, 5 µm) ve Supelcosil Aquasil (150 mm x 4,6 mm, 5µm) kolon kullanılmıştır. Mobil faz olarak % 35'den 80'e kadar değişen oranlarda metanol-su (20 mM MOPS, pH 7,4) karışımı kullanılmıştır. pK<sub>a</sub> değerlerini ACDLab programını kullanarak hesaplamışlar ve bu değerleri kullanarak Log P, Log D<sub>7,4</sub> ve Log D<sub>9,0</sub> değerlerini hesaplamışlardır. Pioglitazon ve Rosiglitazon için pK<sub>a</sub> değerlerini HPLC metoduyla hesaplayamamışlardır. Deneysel veriler AB/log D,

Prolog D ve C log P programları ile hesaplanan sonuçlarla karşılaştırılmış ve Prolog D verilerinin deneysel verilere daha yakın olduğu sonucuna varılmıştır.

Yardımcı vd. (2007), insan plazmasında rosiglitazon ve metforminin eş zamanlı tespiti için gradient sıvı kromatografi yöntemini geliştirmişlerdir. Bunun için Ace-5 fenil kolon (250 nm x 4,6 mm, 5 µm), mobil faz olarak asetonitril ve 5 mM asetat tamponu (75:25, v/v; pH 5,5) kullanılmıştır. UV dedektörle 245 nm’de çalışılmış ve iç standart olarak verapamil kullanılmıştır. İzokratik çalışmalarda rosiglitazon ve metformin pikleri insan plazmasındaki pikler arasında gözlenemediği için gradient çalışma tercih edilmiştir. Asetonitril yüzdesi arttıkça rosiglitazonun alıkonma zamanının azaldığını fakat metforminin alıkonma zamanının arttığını gözlemlemişlerdir (Şekil 2.7). Asetat tamponu metforminin alıkonma zamanını azalttığı için seçilmiştir. Yöntemin hassaslığı nedeniyle diyabetik hastaların plazmasında rosiglitazon ve metformin konsantrasyonlarının izlenmesinde yeterli bulunduğunu ileri sürmüşlerdir.



Şekil 2.7. İnsan plazmasından elde edilen HPLC kromatogramı

Mistri vd. (2007), glibenklamid ve metforminin insan plazmasında eş zamanlı tayini için LC-MS/MS metodunu geliştirmişlerdir. Glibenklamid ve metformin sıvı-sıvı ekstraksiyonu ile plazmadan ekstrakte edilmiştir. Kolon olarak Hypersil ters faz C<sub>18</sub> (50 mm x 4,6 mm, 5 µm) kullanılmıştır. Mobil faz olarak asetonitril – 5 mM amonyum asetat tamponu (70:30; pH 3,0) kullanılmıştır. Glimepirid iç standart olarak kullanılmış ve 25 °C’da toplam analiz süresi 3,5 dakikadır. Bu metodun en önemli avantajının 3,5 dk gibi kısa bir sürede analizin tamamlanması olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca bu metot, analitler ve iç standart için tekrarlanabilir geri kazanımlar vermiştir.

Kostarnoi vd. (2008), son 10-12 yıl içerisinde çok bileşenli farmasötik formülasyonların HPLC metodu ile analizine ait özet bir çalışma yapmışlardır. İlaç ürünlerinin HPLC metodu ile analizinde kullanılan kolonlar, mobil faz bileşenleri, akış hızları, sıcaklık, dedektör bilgilerinin yanı sıra türevlendirme prosedürü, elüsyon modu ve analiz zamanını azaltmak için metotlar hakkında da bilgi vermektedir. Bu çalışmada glimepirid ve pioglitazon için Cosmosil C<sub>18</sub> (150 mm x 4,6 mm) kolonu kullanılmış, mobil faz olarak (35:20:45) asetonitril-metanol-0,01 M amonyum sitrat sulu çözeltisi (H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>; pH 6,95) kullanıldığını ve 228 nm'de çalışıldığını belirtmişlerdir.

Yu vd. (2008), rosiglitazon maleat ve rosiglitazon HCl formülasyonlarının farmakokinetik özelliklerini ve biyoeşdeğerliklerini karşılaştırmak için HPLC metodundan yararlanmışlardır. Plazmaların analizinde kolon olarak Hypersil C18 kolonu (25,0 cm x 4,6 mm, 5 µm), ön kolon olarak da C<sub>18</sub> kolonu kullanmışlardır. Dedektör olarak floresans dedektörle 247 nm ve 367 nm'de çalışmışlardır. Mobil faz olarak 1,0 mL/dk akış hızında asetonitril-0,01 M amonyum asetat tamponu (42:58, v/v) kullanılmıştır.

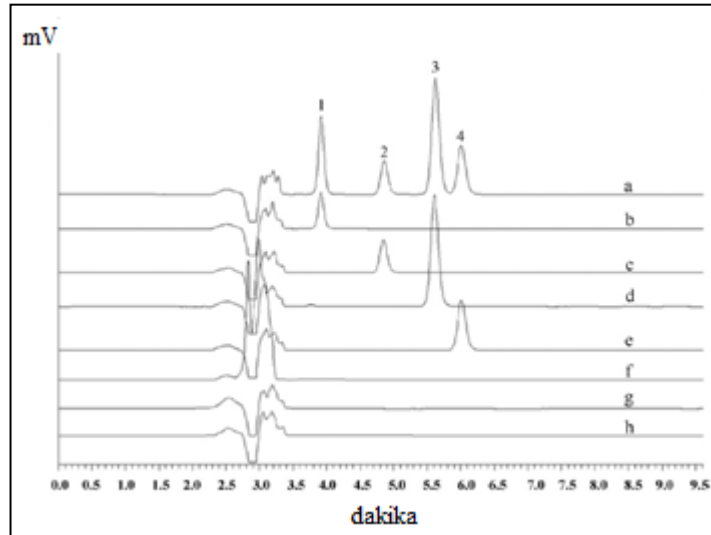
Gedeon vd. (2008), gestasyonel diyabetlilerin glibenklamid ile tedavi olanların plazmasında glibenklamidin tespiti için HPLC metodunu geliştirmişlerdir. Glibenklamid plazmadan sıvı sıvı ekstraksiyonuyla ekstrakte edilmiştir. Eclipse XDB-C<sub>8</sub> kolonla (4,6 x 250 mm, 5 µm), mobil faz olarak 1,5 mL/dakika akış hızında 50 mM NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> tamponu (pH 5,4) – asetonitril (45:55, v/v) kullanılmıştır. UV dedektörle 254 nm'de çalışılmış ve glibenklamidin alıkonma zamanı 5,7-5,9 dakika arasında tespit edilmiştir. Glibenklamidin daha önceki HPLC metoduyla tespitinde azalan pH ile alıkonma zamanının arttığı belirtilmiştir. Ancak bu çalışmada seçilen uygun pH, glibenklamidin pK<sub>a</sub>'sına eşit olan 5,35'dir. pK<sub>a</sub> değerinin 2 birim altı ve üstünde olması gerekirken pH farkını 0,04 birim olarak bulmuşlardır. Bunun sebebini ise glibenklamidin yapısında bulunan ve onu daha az çözünür ve lipofilik yapan büyük apolar gruplardan kaynaklandığını ileri sürmüşlerdir.

Önal (2009), antidiyabetik ilaçların ilaç tabletlerinde analizi için üç spektrofotometrik ve bir de HPLC olmak üzere toplam dört farklı metot geliştirmişlerdir. İlk iki spektrofotometrik yöntemle rosiglitazonu, 2,3-diklor-5,6-disiyano-1,4-benzokinon ile ve yeşil bromkresol ile çalışmışlardır. Üçüncü



spektrofotometrik yöntemde rosiglitazonu metformin ile çalışmışlardır. Rosiglitazon için 5,0-50 µg/mL ve metformin için 1,0-10,0 µg/mL konsantrasyon aralığında kalibrasyon fonksiyonu doğrusaldır. HPLC metodunda C18 kolonuyla 243 nm dalga boyunda, 1 mL/dakika akış hızında, (30:70, v/v) asetonitril-su mobil fazıyla çalışılmıştır. Doğrusal aralık, 0,25-2,5 µg/mL aralığında gözlenmiştir. Geliştirdikleri bu metotla başarılı tablet analizleri yapılmıştır.

Shaodong vd. (2010), antidiyabetik ilaç olan glipizid, gliklazid, glibenklamid ve glimepiridin eş zamanlı tespiti için HPLC metoduyla 3 farklı dedektörü kullanarak karşılaştırma yapmışlardır. Bunun için UV dedektör, CAD (charged aerosol detection) ve ELSD (evaporative light scattering detection) kullanmışlardır. Bütün dedektörlerle çalışma koşulları aynıdır. Kolon olarak RP-18 (250 mm x 4,6 mm, 5 µm) kolon, mobil faz olarak 1 mL/dakika akış hızında % 35 A (% 90 su + % 0,1 formik asit + % 10 asetonitril) ve % 65 B (% 90 asetonitril + % 10 su) kullanılmıştır. 25 °C'da ve 10 µL enjeksiyon hacminde çalışılmıştır (Şekil 2.8). Bu 4 antidiyabetik ilacın analizi için CAD, diğer iki dedektöre göre daha üstün bulunmuştur. Kolay kullanımı, nispeten daha ucuz olması nedeniyle ve özellikle net yanıtları nedeniyle antidiyabetik ilaçların belirlenmesinde uygun bir dedektör olduğunu ileri sürmüşlerdir.



Şekil 2.8. UV dedektörle elde edilen kromatogramlar a) standart karışım; 1, glipizid; 2, gliklazid; 3, glibenklamid; 4, glimepirid; b) glipizid tablet; c) gliklazid tablet; d) glibenklamid tablet; e) glimepirid tablet; f) ürün A; g) ürün B; h) ürün C.

Lakshmi ve Rajesh (2011), glipizid, rosiglitazon, pioglitazon, glibenklamid ve glimepiridin eş zamanlı tayini, ilaç formlarından ve insan plazmasından analizi için HPLC metodunu geliştirmişlerdir. Phenomenex C18 (150 x 4,6mm, i.d., 5 µm) kolonuyla 1 mL/dakika akış hızında % 0,05 trietilamin, asetonyitril ve metanol karışımı (55:15:30; pH 3,5) oranında mobil faz olarak kullanmıştır. İlaçlar 248 nm dalga boyunda 20 dakikadan daha az bir süre içinde ayrılmışlardır. Glipizid, rosiglitazon, pioglitazon, glibenklamid, ve glimepirid için alıkonma zamanları sırasıyla 4,51; 9,56; 11,3; 14,76 ve 17,78 dakikadır. Formülasyonlardan ve insan plazmasından elde edilen geri kazanım değerleri birbirine yakındır. Bu yüzden bu yöntemin farmasötik dozaj formlarının rutin kalite kontrolü için kolay kullanılabilir olduğunu ve aynı zamanda klinik çalışmalar için de uygulanabilir olduğunu ileri sürmüşlerdir.

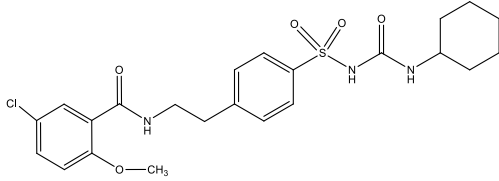
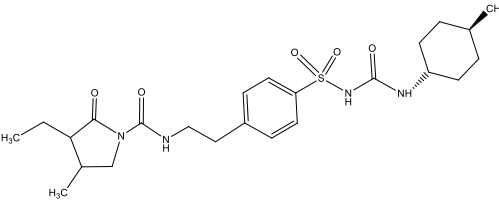
### 3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu bölümde glibenklamid, glipizid, glimepirid, glıklazid, pioglitazon HCl ve rosiglitazon maleat'ın iyonlaşma sabiti değerlerinin, su-tetrahidrofuran ikili karışımlarında potansiyometrik yöntemle ve kromatografik yöntemle tayininde kullanılan cihazlar ve kimyasallar hakkında bilgi verilmiştir.

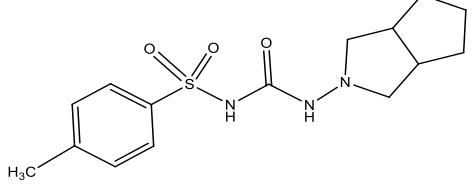
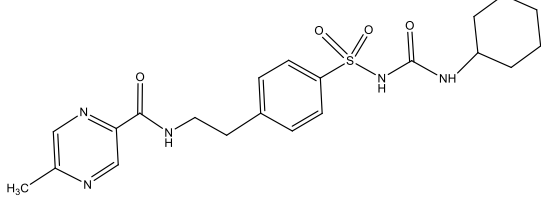
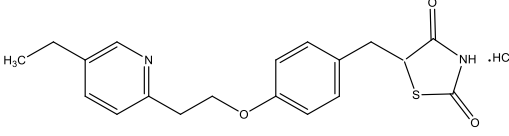
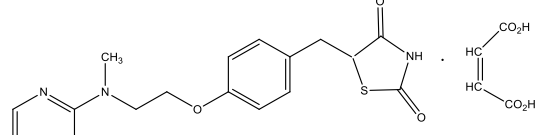
#### 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylede kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya HPLC saflıktadır. Bu çalışmada üzerinde durulan sülfonilüreler ve tiyazolidindionlar ile ilgili bilgiler, Çizelge 3.1'de; kromatografik ve potansiyometrik analizlerde gerekli diğer kimyasal maddeler, Çizelge 3.2'de ve Çizelge 3.3'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Tezde çalışılan sülfonilüre ve tiyazolidindionların kimyasal yapısı ve özellikleri

Bileşik	Kimyasal Yapısı	Özellikler
Glibenklamid (Gliburid)  $C_{23}H_{28}ClN_3O_5S$  494,004 g/mol	  5-klor-N-(4-[N-(sikloheksilkarbamoil)sulfamoil]fenil)-2- metoksibenzamit	 <b>E.N:</b> 173°C <b>CAS No:</b> 10238-21-8  Sigma HPLC saflıkta > %99,8
Glimepirid  $C_{24}H_{34}N_4O_5S$  490,617 g/mol	  3-etil-4-metil-N- [2 [4 - [(4-metilsikloheksil) karbamoil sülfamoil] fenil] etil] - 2-okso-5H- pirol-1-karboksamit	 <b>E.N:</b> 207°C <b>CAS No:</b> 93479-97-1  Sigma HPLC saflıkta > %99,8

Çizelge 3.1. Tezde çalışılan sülfonilüre ve tiyazolidindionların kimyasal yapısı ve özellikleri (Devam)

<p>Gliklazid</p> <p><math>C_{15}H_{21}N_3O_3S</math></p> <p>323,412 g/mol</p>	 <p>N-(4-(hekzahidrosiklopenta[c]pirol-2(1H)-ilkarbamoil)-4-metilbensensülfonamit</p>	<p><b>E.N:</b> 181-182°C</p> <p><b>CAS No:</b>21187-98-4</p> <p>Sigma</p> <p>HPLC saflıkta</p> <p>&gt; %99,8</p>
<p>Glipizid</p> <p><math>C_{21}H_{27}N_5O_4S</math></p> <p>445,536 g/mol</p>	 <p>N-(4-[N-(sikloheksilkarbamoil)sülfamoil]fenetil)-5-metilpirazin-2-karboksamit</p>	<p><b>E.N:</b> 208-209°C</p> <p><b>CAS No:</b> 29094-61-9</p> <p>Sigma</p> <p>HPLC saflıkta</p> <p>&gt; %99,8</p>
<p>Pioglitazon HCl</p> <p><math>C_{19}H_{20}N_2O_3S \cdot HCl</math></p> <p>392,90g/mol</p>	 <p>(±)-5-[[4-[2-(5-etil-2-piridinil)etoksi]fenil]metil]-2,4-tiyazolidindion monohidroklorit</p>	<p><b>E.N:</b>193-194°C</p> <p><b>CAS No:</b>112529-15-4</p> <p>Sigma</p> <p>HPLC saflıkta</p> <p>&gt; %99,8</p>
<p>Rosiglitazon Maleat</p> <p><math>C_{18}H_{19}N_3O_3S \cdot C_4H_4O_4</math></p> <p>473,52 g/mol</p>	 <p>(±)-5-[[4-[2-(metil-2-piridinilamino)etoksi]fenil]metil]-2,4-tiyazolidindion, (Z)-2-bütendioat</p>	<p><b>E.N:</b>122-123°C</p> <p><b>CAS No:</b>155141-29-0</p> <p>Sigma</p> <p>HPLC saflıkta</p> <p>&gt; %99,8</p>

Çizelge 3.2. Potansiyometrik çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Adı	Kullanım amacı	Açıklama
Hidroklorik asit	Hücre potansiyelinin belirlenmesi	Merck, ayarlı çözelti (Titrisol)
Potasyum hidroksit	Titrant	Merck, ayarlı çözelti (Titrisol)
Potasyum klorür	İyonik şiddet ayarlayıcı	Merck, analitik saflıkta
Potasyum hidrojen fitalat	Baz çözeltisinin ayarı	Merck (Referans Değer Standardı)

Çizelge 3.3. Kromatografik çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Adı	Kullanım amacı	Açıklama
Potasyum hidrojen fitalat	pH metre kalibrasyonu	Merck (Referans Değer Standardı)
Fosforik asit	Mobil faz pH' sınır ayarlanması	Merck, analitik saflıkta
Sodyum hidroksit	Mobil faz pH' sınır ayarlanması	Merck, analitik saflıkta
Tetrahidrofuran	Su-organik çözücü ikili karışımlarının hazırlanması	J-T Baker, HPLC saflıkta
Urasil	Kolonda tutunmayan türün kolonu terk etme zamanını belirlenmesi	Sigma, HPLC saflıkta

## 3.2. Potansiyometrik Titrasyonlar

### 3.2.1. Kullanılan cihazlar

#### 3.2.1.1. pH/ iyon metre

Potansiyometrik titrasyonlarda pH ölçümlerinde Metleer Toledo MA 235 pH/ İyon analiz cihazı kullanılmıştır. Metleer Toledo InLab 412 Ag/AgCl kombine cam elektrottan yararlanılmıştır. pH ölçümlerinde sabit sıcaklık banyosu (HETO CBN 8-30 ve HETO HMT 200 sıcaklık kontrol ünitesi) kullanılarak  $25 \text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,1 \text{ }^{\circ}\text{C}$  sıcaklıkta çalışılmıştır.

#### 3.2.2. pK<sub>a</sub> tayininde kullanılan çözeltiler

Potansiyometrik titrasyonlar THF'nin 5 farklı derişiminde gerçekleştirilmiştir.

##### 3.2.2.1. %40 (v/v) Tetrahidrofuran -su ikili karışımı

100 mL'lik stok ortam için 60 mL su alınmış ve üzerine 40 mL tetrahidrofuran ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak tetrahidrofuran - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir.

##### 3.2.2.2. %45 (v/v) Tetrahidrofuran -su ikili karışımı

100 mL'lik stok ortam için 55 mL su alınmış ve üzerine 45 mL tetrahidrofuran ilave edilmiştir.

### **3.2.2.3. %50 (v/v) Tetrahidrofurana -su ikili karışımı**

100 mL'lik stok ortam için 50 mL su alınmış ve üzerine 50 mL tetrahidrofurana ilave edilmiştir.

### **3.2.2.4. %55 (v/v) Tetrahidrofurana -su ikili karışımı**

100 mL'lik stok ortam için 45 mL su alınmış ve üzerine 55 mL tetrahidrofurana ilave edilmiştir.

### **3.2.2.5. %60 (v/v) Tetrahidrofurana -su ikili karışımı**

100 mL'lik stok ortam için 60 mL su alınmış ve üzerine 40 mL tetrahidrofurana ilave edilmiştir.

### **3.2.2.6. İyonik şiddet ayarlayıcı**

Her bir ortamda iyonik şiddeti ayarlamak üzere KCl kullanılmıştır. Bu amaçla yukarıda hazırlanışı belirtilen çözücü karışımlarına 0,1 M derişimi sağlanacak şekilde 1M KCl çözeltisi eklenmiş ve manyetik karıştırıcı kullanarak homojenleşme sağlanmıştır.

### **3.2.2.7. Asit çözeltisi**

1 M standart hidroklorik asit çözeltisi (titrisol), ortamın organik modifiyer yüzdesine uygun olarak 0,1 M derişimde hazırlanmıştır.

### **3.2.2.8. Baz çözeltisi**

1 M standart KOH çözeltisi (titrisol), çalışılan organik modifiyer-su ikili karışımında 0,03 M olacak şekilde seyreltilerek titrant olarak kullanılmıştır. Çözelti,  $2,0 \times 10^{-3}$  M KHP çözeltisi kullanılarak ayarlanmıştır.

### **3.2.2.9. Bileşiklerin çözeltileri**

Bileşiklerin standart çözeltileri,  $1,0 \times 10^{-3}$  M derişimde olacak şekilde tetrahidrofurana-su ikili karışımında 40 mL hazırlanmış ve çözelti çift cidarlı hücreye alınarak potansiyometrik yöntemle titre edilmiştir.

### **3.3. Kromatografik Çalışmalar**

#### **3.3.1. Kullanılan cihazlar**

##### **3.3.1.1. Yüksek performans sıvı kromatografisi cihazı**

Sülfonilüre ve tiyazolidindion grubu bileşiklerin sıvı kromatografik davranışlarının incelenmesinde, Shimadzu marka HPLC cihazı kullanılmıştır. Sistemde, sistem kontrol ünitesi (CBM 20A), pompa (LC20 AD), dedektör (SPDM 20A Foto Diyod Dizi), kolon fırını (CTO 20 AC) ve gaz giderme ünitesi (DGU 20 A) bulunmaktadır. Çalışmada kolon etüvü kullanılarak 25°C’da çalışılmıştır. Çalışma dalga boyu, tüm bileşikler için 230 nm’dir.

##### **3.3.1.2. Kolonlar**

Bu tez çalışmasında, bileşiklerin iyonlaşma sabitlerinin tayininde YMC J’Sphere ODS-H80 (4 µm, 150 mm x 4,6 mm ID) ters faz sıvı kromatografi kolonu kullanılmıştır. Bu kolon THF için önerilmektedir.

##### **3.3.1.3. pH/ iyon metre**

HPLC mobil fazının pH ölçümlerinde Metleer Toledo MA 235 pH/ İyon analiz cihazı kullanılmıştır. Mettler Toledo InLab 413 Ag/AgCl kombine cam elektrottan yararlanılmıştır. IUPAC’a göre tetrahidrofurana su ikili karışımlarında elektrot kalibrasyonu için potasyum hidrojen fitalat referans standart çözelti olarak seçilmiştir. Mobil faz pH’ının ayarlanması esnasında sıcaklık, 25 °C ± 0,1 °C’da sabit tutulmuştur.

#### **3.3.2. pK<sub>a</sub> tayininde kullanılan çözeltiler**

HPLC çalışmasında, THF’nin 4 farklı derişiminde çalışılmıştır.

##### **3.3.2.1. % 40 (v/v) Tetrahidrofurana -su ikili karışımı**

100 mL’lik stok ortam için 60 mL saf su alınmış ve üzerine 40 mL tetrahidrofurana ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak tetrahidrofurana - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Mobil faza 15 mM derişimde olacak şekilde H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (% 85 (a/a) ; 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde tetrahidrofurana bulunduran su- tetrahidrofurana karışımında hazırlanmış NaOH’den (1 M) ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek

istenen farklı pH değerleri ( 2,5; 3,0; 3,5; 3,75; 4,0; 4,25; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 6,75; 7,0; 7,25; 7,5; 7,75; 8,0; 8,25; 8,5 ve 8,75) olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Mobil fazlar, ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

### **3.3.2.2. % 45 (v/v) Tetrahidrofuran -su ikili karışımı**

100 mL'lik stok ortam için 55 mL saf su alınmış ve üzerine 45 mL tetrahidrofuran ilave edilmiştir. Mobil faza 15 mM derişimde olacak şekilde H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (% 85 (a/a) ; 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde tetrahidrofuran bulunduran su- tetrahidrofuran karışımında hazırlanmış NaOH'den (1 M) ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerleri ( 2,5; 3,0; 3,5; 3,75; 4,0; 4,25; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 6,75; 7,0; 7,25; 7,5; 7,75; 8,0; 8,25; 8,5 ve 8,75) olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Mobil fazlar, ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

### **3.3.2.3. % 50 (v/v) Tetrahidrofuran -su ikili karışımı**

100 mL'lik stok ortam için 50 mL saf su alınmış ve üzerine 50 mL tetrahidrofuran ilave edilmiştir. Mobil faza 15 mM derişimde olacak şekilde H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (% 85 (a/a) ; 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde tetrahidrofuran bulunduran su- tetrahidrofuran karışımında hazırlanmış NaOH'den (1 M) ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerleri ( 2,5; 3,0; 3,5; 3,75; 4,0; 4,25; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 6,75; 7,0; 7,25; 7,5; 7,75; 8,0; 8,25; 8,5 ve 8,75) olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Mobil fazlar, ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

### **3.3.2.4. % 55 (v/v) Tetrahidrofuran -su ikili karışımı**

100 mL'lik stok ortam için 45 mL saf su alınmış ve üzerine 55 mL tetrahidrofuran ilave edilmiştir. Mobil faza 15 mM derişimde olacak şekilde H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (% 85 (a/a) ; 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde tetrahidrofuran bulunduran su- tetrahidrofuran karışımında hazırlanmış NaOH'den (1 M) ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerleri ( 2,5; 3,0; 3,5; 3,75; 4,0; 4,25; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 6,75; 7,0; 7,25; 7,5; 7,75; 8,0; 8,25; 8,5 ve 8,75) olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Mobil fazlar, ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.



### **3.3.2.5. Urasil çözeltisi**

Çalışılan koşullarda kapasite faktörlerinin belirlenmesi için kullanılan urasil çözeltisi, derişimi % 0,01 (w/v) olacak şekilde suda hazırlanmıştır. Urasilin hazırlanan bu çözeltisinden 20 µL enjekte edilerek kolonda tutunmayan türe özgü  $t_r$  alıkonma zamanı belirlenmiştir. Çalışma dalga boyu 254 nm'dir.

### **3.3.2.6. Potasyum hidrojen fitalat çözeltisi**

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

### **3.3.2.7. Tezde çalışılan sülfonilüre ve tiyazolidindion bileşiklerinin çözeltileri**

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

### **3.3.2.8. Sistem uygunluk çözeltisi**

Glipizid, glibenklamid, pioglitazon HCl ve rosiglitazon maleat (iç standart) her birinden 0,0010 g tartılmış, 10 mL mobil fazda çözülerek 100 ppm' lik çözeltileri hazırlanmıştır.

### **3.3.3. Numune çalışması**

Miktar tayini yapabilmek amacıyla 10 tablet ezilmiş ve 1 tablete eşdeğer tablet tozu, 100 mL'lik balon jojeye alınmıştır. Üzerine tetrahidrofurana eklenerek ultrasonik banyoda 15 dakika çözünmesi için bekletilmiştir ve hacmine tetrahidrofurana tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti mavi bant süzgeç kağıdından süzülmüş ve bu süzüntüden derişimi 8 ppm olacak şekilde balonjojeye konulmuş, hacmine mobil faz ile tamamlanmıştır. Bu çözeltilerden 20 µL enjekte edilmiştir.

### 3.4. Yöntem

#### 3.4.1. Potansiyometrik titrasyonlar

Sülfonilüre ve tiyazolidindionların iyonlaşma sabitlerinin potansiyometrik yöntemle tayininde, % 40; 45; 50; 55 ve 60 (v/v) tetrahidrofuran – su ikili karışımında çalışılmıştır. Bu ortamda iyonik şiddeti ayarlamak üzere KCl kullanılmıştır. KCl derişimi 0,1 M olacak şekilde ayarlanmıştır.

Potansiyometrik çalışmalarda;

1- Titrant (KOH çözeltisi), 0,03 M derişimde hazırlanmış ve 40 mL 0,001 M potasyum asit fitalat çözeltisinin bu çözelti ile potansiyometrik titrasyonu ile ayarlanmıştır.

2- Asit, ayarlı baz ile titre edilerek ayarlanmış, karbonat hatasının olmadığı belirlenmiştir. Su-organik çözücü karışımında otoprotoliz sabiti, hücrenin  $E^0$  standart potansiyeli ve eğimi belirlenmiştir.

3- Sülfonilüre ve tiyazolidindionların  $1,0 \times 10^{-3}$  M'lık çözeltilerinden 40 mL, çift cidarlı hücrede karbonatı giderilmiş ayarlı baz çözeltisi ile titre edilmiştir. Titrasyonlar, 25 °C'da yapılmıştır. Her bir bileşik, her bir ortamda 2 kez titre edilmiştir. Titrasyon verileri, Gran,  $\phi$ -pH ve pH- $\bar{n}$  grafiklerinde değerlendirilmiştir.

4- Titrasyonla ilgili grafikler değerlendirilerek titrasyonun stokiyometrik davranışı belirlenmiş ve uygun yorumlarla  $pK_a$  değeri tahmin edilmiştir. PKPOT programı, pK hesaplamalarında kullanılmıştır (Barbosa vd., 1995).

#### 3.4.2. Sıvı kromatografik yöntemle çalışmalar

HPLC yöntemi ile iyonlaşma sabitlerinin tayini çalışmasında, % 40 (v/v), % 45 (v/v), % 50 (v/v), % 55 (v/v) tetrahidrofuran-su karışımlarında çalışılmıştır.

Kromatografik çalışmalarda;

1- pH metre, pH değerleri belirlenirken potasyum hidrojen fitalat çözeltisi ile ayarlanmıştır. pH metrenin kalibrasyonu, kombine pH elektrodu ile 298,15 °K referans alınarak yapılmıştır. Elektrot, okunan değerlerin kararlı olabilmesi için çalışılan su-organik çözücü karışımında bekletilmiştir. Her bir ortam için potasyum hidrojen fitalat çözeltisi 0,05 mol/kg derişimde hazırlanmış ve başlangıç potansiyel değeri belirlenmiştir. Her bir çözelti için 2 ölçüm yapılmıştır.

2- Hareketli fazda 15 mM fosforik asit kullanılmıştır. Bu asit ilavelerinden sonra mobil faza aynı derişimde tetrahidrofuran – su karışımında hazırlanmış olan 1 M NaOH ilave edilerek istenen pH değeri sağlanmıştır. pH etkisi incelenecek koşula ait hareketli fazın pH değeri, 2,5 – 8,75 aralığında olacak şekilde ayarlanmıştır.

3- Bilindiği gibi HPLC çalışmasında kapasite faktörleri,  $t_0$  dikkate alınarak hesaplanır. Sülfonilüre ve tiyazolidindionların kapasite faktörlerinin hesaplanmasında kullanılacak  $t_0$  değeri, urasilin sudaki % 0,01 (w/v) derişimindeki çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmada gerek urasil ve gerekse bileşiklerin alıkonma zamanları, ikişer enjeksiyonla ölçümlerin ortalaması alınarak belirlenmiştir.

4- Bileşiklerin kapasite faktörleri değerlerinin pH ile değişimi, sigmoidal davranış gösterir. Bu sigmoidalin orta noktasındaki pH değeri, o bileşğin çalışılan ortamdaki iyonlaşma sabitini verir. Kapasite faktörü – pH ilişkisi NLREG programı ile değerlendirilerek bileşiklerin  $pK_a$  değerleri hesaplanmıştır

### **3.4.3. Çalışılan bileşiklerin ayrılmaları için optimum koşulun belirlenmesi**

YMC J'Sphere ODS-H80 kolonla, % 40, 45, 50 ve 55 (v/v) THF ortamlarında yapılan çalışmalar sonucunda;

1- Bileşiklerin kapasite faktörü (k) değerleri ve bileşik çiftleri için seçicilik faktörü ( $\alpha$ ) ve ayırma gücü ( $R_s$ ) değerleri hesaplanmıştır.

2- Numune çalışması için % 40 THF (v/v), pH 4,5' ta kapasite faktörlerinin 1' den daha büyük olduğu ve bileşik çiftleri için  $\alpha$  değerlerinin 1,15' den büyük olduğu belirlenmiştir ve numune çalışması için uygun koşul olduğuna karar verilmiştir.

3- Rosiglitazon maleat; seçicilik, ayırma gücü ve analiz süresi göz önüne alınarak iç standart olarak seçilmiştir.

4- Food Drug Administration (FDA) ve United States Pharmacopeia (USP) tarafından önerilen ve sıvı kromatografisi ve diğer ayırma tekniklerinde yöntem geliştirmenin bir parçasını oluşturan sistem kararlılık testi uygulanmıştır.

5- Her bir bileşğin analizi için doğrusal kalibrasyon fonksiyonu, teşhis sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) değerleri, yöntem için gün içi ve günler arası analiz değerleri ve tabletlerin analizine ait bulgular hesaplanmıştır.

## 4. ARAŞTIRMA BULGULARI

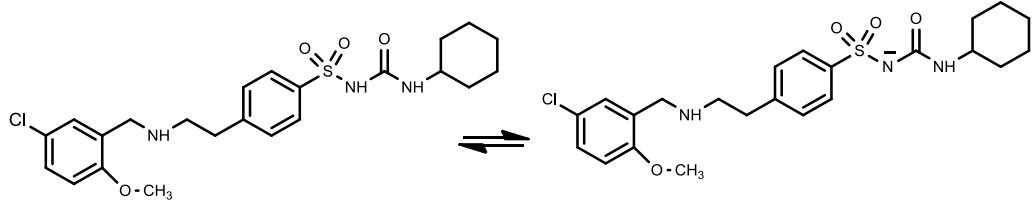
### 4.1. Sülfonilüre ve Tiyazolidindionların SPARC, ACDLab ve Marvin Programı ile Hesaplanan İyonlaşma Sabitleri

Günümüzde, iyonlaşma sabitlerinin hesaplanmasında değişik prensiplere dayanan çeşitli bilgisayar programları kullanılmaktadır. İyonlaşma sabitlerinin hesaplanması için PKAS, BEST, SUPERQUAD, SPARC, TITFIT, HYPERQUAD, LEGATROP, ACDLab ve Marvin bilgisayar programları son zamanlarda geliştirilen programlardandır (Alkan, 2007). Bu çalışmada SPARC, ACDLab ve Marvin bilgisayar programları ile çalışılan bileşiklerin iyonlaşma sabitleri hesaplanmıştır. SPARC (Sparc Performs Automated Reasoning in Chemistry) herhangi bir organik bileşğin yalnızca kimyasal yapısından makroskopik ve mikroskopik  $pK_a$  değerlerini tahmin eden bilgisayar programıdır. Bu hesap programı, substitue grupların etkisini de inceleyerek olası iyonlaşma formlarını ve bunların bağlı derişimlerini vermektedir. ACDLab ise birçok organik yapının asit-baz iyonlaşma sabitini ( $pK_a$  değerlerini) 25 °C için ve sıfır iyonik şiddetle su ortamında tahmin edebilen yazılım programıdır (Babić, 2007).

#### 4.1.1. Glibenklamidin iyonlaşma sabitleri

Glibenklamid, ikinci nesil sülfonilüre grubundan bir oral antidiyabetiktir. Glibenklamidin moleküler yapısının glipizidin yapısından farklı olması amit grubuna (karboksamit) bağlı olan sübstitüentin farklı olmasıdır. Glibenklamid yapısında 5-klor-2-metoksi-benzen yapısı varken glipizid yapısında 5-metil-pirazin sübstitüenti vardır (Remko, 2009). Glibenklamid yapısının sülfonilüre grubuna ait S=O...H-N protonu için aşağıdaki asit-baz dengesine ait iyonlaşma sabitinin ( $pK_a$ ) SPARC programı ile hesaplanan değer 5,57 olduğu görülmektedir (Şekil 4.1).

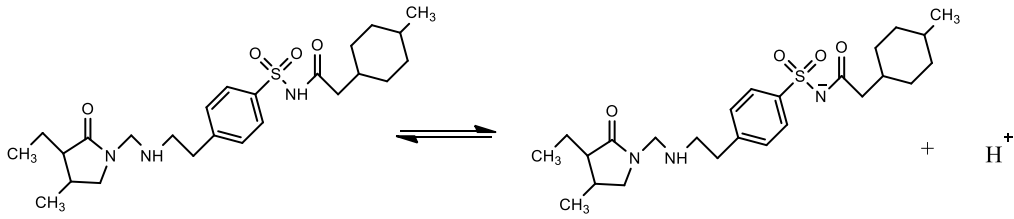
Marvin programı ile aynı fonksiyonel grubun  $pK_a$  değeri 4,320, ACDLab programı ile  $4,17 \pm 0,30$  olarak bulunmuştur. Glibenklamidin iyonlaşma sabiti literatürlerde Gögelein vd. (1999), tarafından 6,2; AbuRuz vd. (2005), tarafından 6,0; Lai ve Feng, (2006), tarafından 5,3; Mandić ve Gabelica (2006), tarafından 6,8; Remko (2009), tarafından 5,2 olarak verilmiştir.



Şekil 4.1. Glibenklamidin iyonlaşma davranışı

#### 4.1.2. Glimepiridin iyonlaşma sabitleri

Glimepirid, ikinci nesil sülfonilüre olup diğer ikinci nesil sülfonilürelere göre kan şekeri düşürücü etkisi daha güçlü olan bir oral antidiyabetiktir. Glimepirid yapısının sülfonilüre grubuna ait S=O...H-N protonu için iyonlaşma sabitinin ( $pK_a$ ) aşağıdaki asit–baz dengesine uygun olarak davranıldığında SPARC programı ile hesaplanan değeri 5,55 olduğu görülmektedir (Şekil 4.2).

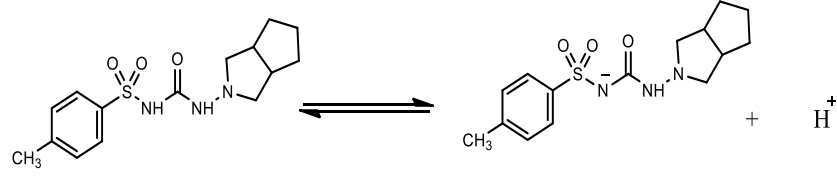


Şekil 4.2. Glimepiridin iyonlaşma davranışı

Marvin programı ile aynı fonksiyonel grubun  $pK_a$  değeri 4,320, ACDLab programı ile  $4,99 \pm 0,50$  olarak bulunmuştur. Glimepiridin iyonlaşma sabiti literatürlerde Remko (2009), tarafından 5,2; AbuRuz vd. (2005), ve Singh vd. (2009), tarafından 6,2 olarak verilmiştir.

#### 4.1.3. Gliklazidin iyonlaşma sabitleri

Gliklazid, ikinci nesil sülfonilüre grubundan bir oral antidiyabetiktir. Perhidrosiklopenta[c]pirol yapısının bazik azotu sülfonamidin –NH grubuna, N...H-N hidrojen bağı ile bağlıdır (Remko, 2009). Gliklazid yapısının sülfonilüre grubuna ait S=O...H-N protonu için iyonlaşma sabitinin ( $pK_a$ ) aşağıdaki asit–baz dengesine uygun olarak davranıldığında SPARC programı ile hesaplanan değerinin 5,32 olduğu görülmektedir (Şekil 4.3).

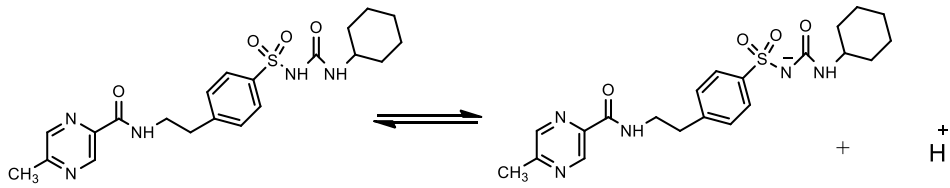


Şekil 4.3. Glipizidin iyonlaşma davranışı

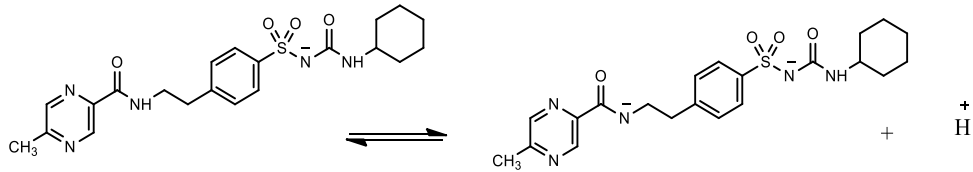
Marvin programı ile aynı fonksiyonel grubun  $pK_a$  değeri 4,070, ACDLab programı ile  $5,03 \pm 0,50$  olarak bulunmuştur. Glipizidin iyonlaşma sabiti literatürlerde Winters vd. (1994), Masereel vd. (1996), Alkhamis vd. (2003), AbuRuz vd. (2005), Park ve Choi (2006), tarafından 5,8; Kuo ve Wu (2005), tarafından 5,98; Remko (2009), tarafından 5,6 olarak verilmiştir.

#### 4.1.4. Glipizidin iyonlaşma sabitleri

Glipizid, ikinci nesil sülfonilüre grubundan bir oral antidiyabetiktir. Glipizid yapısında amit grubuna (karboksamit) bağlı 5-metil-pirazin süstitüenti ve sülfonilüre grubuna bağlı sikloheksan yapısı vardır (Remko, 2009). Glipizid yapısının sülfonilüre grubuna ait  $S=O \dots H-N$  protonu için iyonlaşma sabitinin ( $pK_{a1}$ ) aşağıdaki asit-baz dengesine uygun olarak davranıldığında SPARC programı ile hesaplanan değeri 5,56'dır (Şekil 4.4) glipizidin yapısındaki ikinci protonasyon sabitinin ( $pK_{a2}$ ) karboksamit protonun aşağıdaki tepkime şemasına uygun olarak davranıldığında 9,98 olduğu (Şekil 4.5) görülmektedir.



Şekil 4.4. Glipizidin  $pK_{a1}$  ile ilgili iyonlaşma davranışı

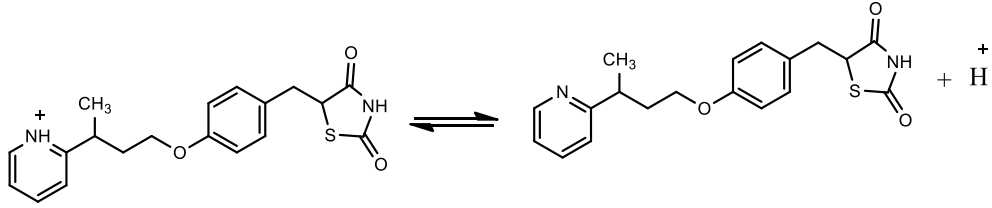


Şekil 4.5. Glipizidin  $pK_{a2}$  ile ilgili iyonlaşma davranışı

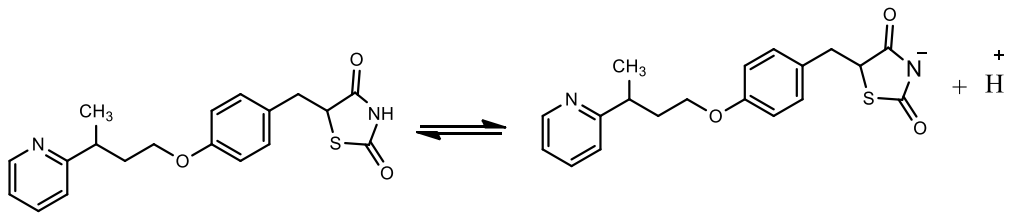
Marvin programı ile aynı fonksiyonel grubun  $pK_{a1}$  değeri 4,320,  $pK_{a2}$  değeri 13,870; ACDLab programı ile  $pK_{a1}$   $4,97 \pm 0,50$ ,  $pK_{a2}$  değeri  $13,04 \pm 0,46$  olarak bulunmuştur. Glipizidin iyonlaşma sabiti literatürlerde Thombre vd. (1999), AbuRuz vd. (2005), Verma ve Garg (2005), Jain vd. (2008), Nazır vd. (2009), tarafından 5,9; Remko (2009), tarafından 5,2 olarak verilmiştir.

#### 4.1.5. Rosiglitazonun iyonlaşma sabitleri

Rosiglitazon, diyet ve egzersizin yetersiz kaldığı tip 2 diyabetli hastalarda glisemik kontrolü düzeltmek için kullanılan tiyazolidindion grubu oral bir antidiyabetiktir. İlaçlarda, rosiglitazon maleat şeklinde kullanılır. Rosiglitazon yapısının piridin halkasına ait protonu için aşağıdaki asit–baz dengesine ait protonasyon sabitinin ( $pK_{a1}$ ) SPARC programı ile hesaplandığında 5,32 olduğu (Şekil 4.6) ve rosiglitazon yapısındaki tiyazolidindion protonuna ait iyonlaşma sabitinin ( $pK_{a2}$ ) aşağıdaki tepkime şemasına uygun olarak davranıldığında 6,38 olduğu görülmektedir (Şekil 4.7).



Şekil 4.6. Rosiglitazonun  $pK_{a1}$  ile ilgili iyonlaşma davranışı



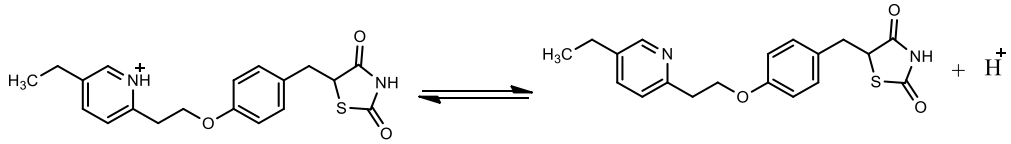
Şekil 4.7. Rosiglitazonun  $pK_{a2}$  ile ilgili iyonlaşma davranışı

Marvin programı ile  $pK_{a1}$  değeri 6,229,  $pK_{a2}$  değeri 6,844; ACDLab programı ile  $pK_{a1}$   $6,47 \pm 0,12$ ,  $pK_{a2}$  değeri  $6,35 \pm 0,50$  olarak bulunmuştur. SPARC programı piridin halkası için  $pK_a$  değerini 4,87; 2,4 tiyazolidindion grubu için 6,42 olarak bulmuştur. Rosiglitazonun iyonlaşma sabiti literatürlerde Yardımcı ve Özaltın

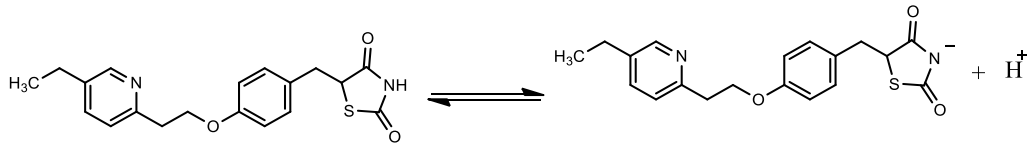
(2005), Kamila vd. (2009), tarafından 6,1 ve 6,8; Chou vd. (2005), tarafından 6-7 olarak verilmiştir.

#### 4.1.6. Pioglitazonun iyonlaşma sabitleri

Pioglitazon tiazolidindion grubu antidiyabetik bir ajandır ve pankreatik insülin salgılanmasında artışa neden olmadan, insüline karşı hedef hücrelerin cevabını artırarak kan glukoz seviyesini düşürür. İlaçlarda pioglitazon ya da pioglitazon HCl şeklinde kullanılır. Pioglitazon yapısının piridin halkasına ait protonu için aşağıdaki asit–baz dengesine ait protonasyon sabitinin ( $pK_{a1}$ ) SPARC programı ile hesaplandığında 4,17 olduğu (Şekil 4.8) ve pioglitazonun yapısındaki iyonlaşma sabitinin ( $pK_{a2}$ ) tiazolidindion protonunun aşağıdaki tepkime şemasına uygun olarak davranıldığında 6,35 olduğu görülmektedir (Şekil 4.9).



Şekil 4.8. Pioglitazonun  $pK_{a1}$  ile ilgili iyonlaşma davranışı



Şekil 4.9. Pioglitazonun  $pK_{a2}$  ile ilgili iyonlaşma davranışı

Marvin programı ile  $pK_{a1}$  değeri 5,598,  $pK_{a2}$  değeri 6,658; ACDLab programı ile  $pK_{a1}$   $5,53 \pm 0,22$ ,  $pK_{a2}$  değeri  $6,35 \pm 0,50$  olarak bulunmuştur. Pioglitazon HCl'nin iyonlaşma sabitini literatürde Henderson vd. (2006), tarafından 5,8 ve 6,4 olarak vermiştir.



## 4.2. Sülfonilürelerin Potansiyometrik Yöntemle İyonlaşma Sabiti Tayini

### 4.2.1. Glibenklamidin % 40 (v/v) THF-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon grafikleri

Bu bileşiğin  $1,0 \times 10^{-3}$  M'lık çözeltisinden 40 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı KOH (0,03 M) titrant derişimi ile titre edilmiştir. Veriler, Çizelge 4.1'de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi mV değerleri,  $E^0$  değeri kullanılarak pH olarak da ifade edilmiştir. Yine grafiksel yöntemle  $pK_a$  hesaplanmasında kullanılacak olan M ve Z değerleri de hesaplanmıştır.

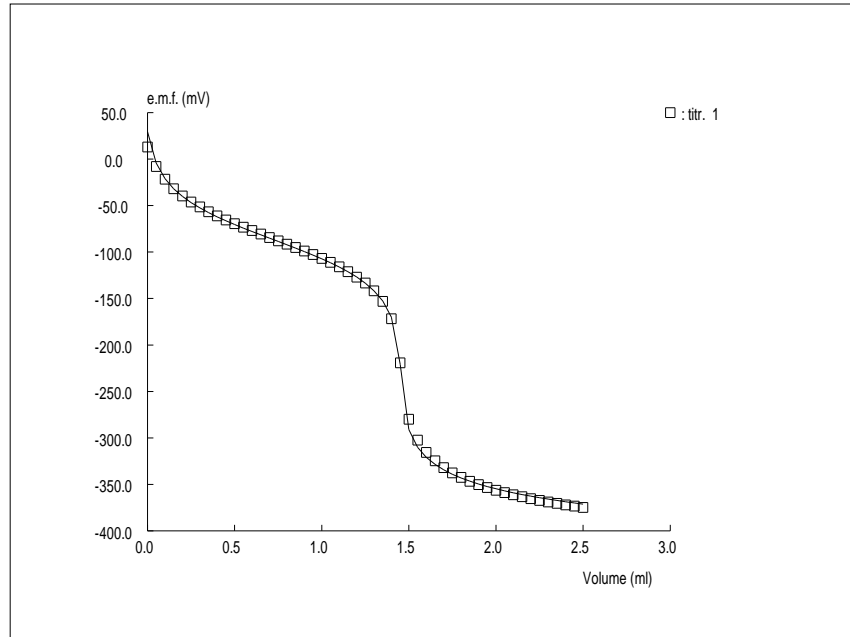
Çizelge 4.1. Glibenklamidin % 40 (v/v) THF-su ortamında titrasyon verileri

mL	mV	pH	M	Z	Z*H <sup>+</sup>
0	13,1	4,881	0,00E+00	-1,32E-05	-1,73E-10
0,05	-7,9	5,237	3,75E-05	-4,32E-05	-2,51E-10
0,1	-21,6	5,469	7,48E-05	-7,82E-05	-2,65E-10
0,15	-31,9	5,644	1,12E-04	-1,14E-04	-2,60E-10
0,2	-39,6	5,775	1,49E-04	-1,51E-04	-2,54E-10
0,25	-46,1	5,885	1,86E-04	-1,88E-04	-2,45E-10
0,3	-51,5	5,976	2,23E-04	-2,24E-04	-2,37E-10
0,35	-56,6	6,063	2,60E-04	-2,61E-04	-2,26E-10
0,4	-61	6,137	2,97E-04	-2,98E-04	-2,17E-10
0,45	-65,4	6,212	3,34E-04	-3,34E-04	-2,05E-10
0,5	-69,5	6,281	3,70E-04	-3,71E-04	-1,94E-10
0,55	-73,2	6,344	4,07E-04	-4,07E-04	-1,84E-10
0,6	-76,9	6,407	4,43E-04	-4,44E-04	-1,74E-10
0,65	-80,6	6,470	4,80E-04	-4,80E-04	-1,63E-10
0,7	-84,3	6,532	5,16E-04	-5,16E-04	-1,52E-10
0,75	-87,9	6,593	5,52E-04	-5,52E-04	-1,41E-10
0,8	-91,5	6,654	5,88E-04	-5,88E-04	-1,30E-10
0,85	-95,1	6,715	6,24E-04	-6,24E-04	-1,20E-10
0,9	-98,9	6,780	6,60E-04	-6,60E-04	-1,10E-10
0,95	-102,7	6,844	6,96E-04	-6,96E-04	-9,96E-11
1	-106,9	6,915	7,32E-04	-7,32E-04	-8,89E-11
1,05	-111,1	6,987	7,67E-04	-7,67E-04	-7,91E-11
1,1	-115,8	7,066	8,03E-04	-8,03E-04	-6,89E-11
1,15	-121,1	7,156	8,38E-04	-8,38E-04	-5,85E-11
1,2	-127,1	7,258	8,74E-04	-8,74E-04	-4,82E-11
1,25	-133,3	7,363	9,09E-04	-9,09E-04	-3,94E-11
1,3	-141,7	7,505	9,44E-04	-9,44E-04	-2,95E-11
1,35	-153	7,697	9,79E-04	-9,79E-04	-1,97E-11
1,4	-171,7	8,014	1,01E-03	-1,01E-03	-9,82E-12
1,45	-219,3	8,821	1,05E-03	-1,05E-03	-1,58E-12
1,5	-280	9,850	1,08E-03	-1,08E-03	-1,53E-13
1,55	-302,3	10,228			
1,6	-315,5	10,452			
1,65	-324,7	10,608			
1,7	-331,9	10,730			

Çizelge 4.1. Glibenklamidin % 40 (v/v) THF-su ortamında titrasyon verileri (Devam)

1,75	-337,6	10,827			
1,8	-342,4	10,908			
1,85	-346,6	10,979			
1,9	-350,2	11,040			
1,95	-353,4	11,095			
2	-356,3	11,144			
2,05	-358,8	11,186			
2,1	-361,2	11,227			
2,15	-363,3	11,262			
2,2	-365,3	11,296			
2,25	-367,2	11,328			
2,3	-368,9	11,357			
2,35	-370,5	11,384			
2,4	-372	11,410			
2,45	-373,4	11,434			
2,5	-374,9	11,459			

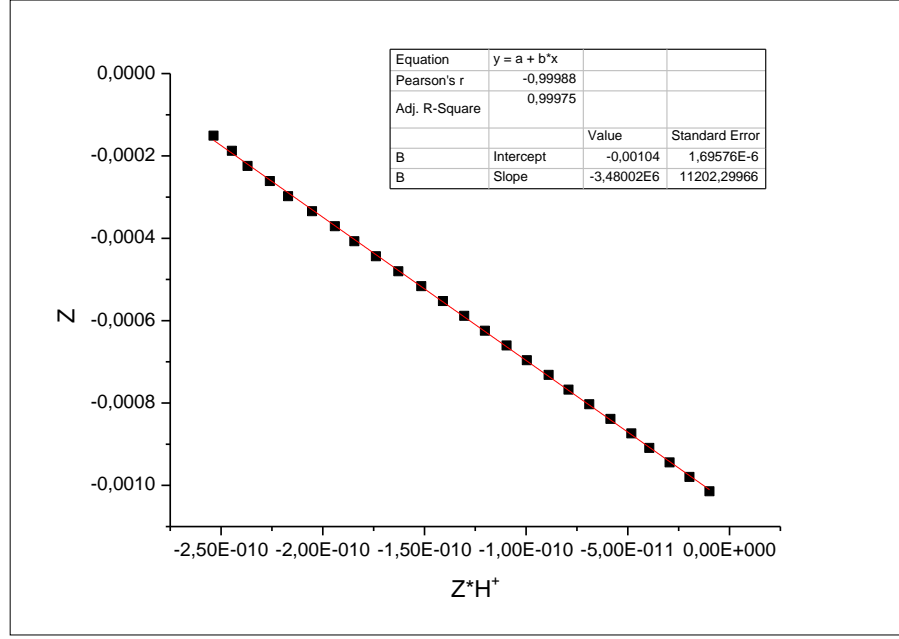
Bu bileşiğin titrasyonuna ait PKPOT grafiği, Şekil 4.10' da verilmiştir. Şekil 4.10' dan görüldüğü gibi bileşik tek dönüm noktalı titrasyon grafiği vermektedir. PKPOT programı ile hesaplanan  $pK_a$  değeri  $6,570 \pm 0,023$ ' dir.



Şekil 4.10. % 40 THF ortamında Glibenklamid için PKPOT grafiği

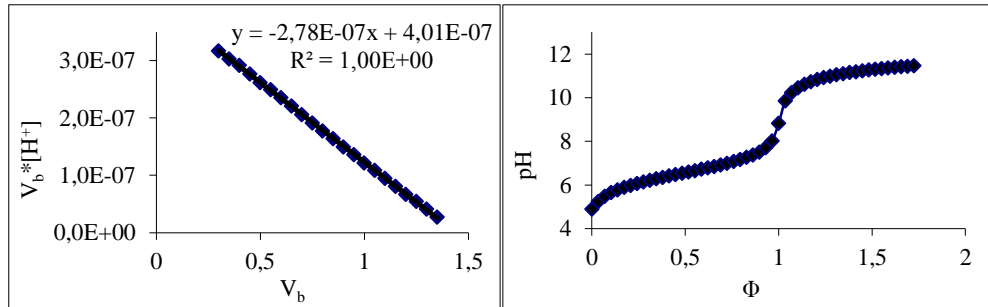
Glibenklamid için grafiksel metotla  $Z^*H^+$  değerlerine karşı  $Z$  değerleri grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.11'deki gibi bir doğru elde edilir. Bu doğrunun denkleminin kesiminin negatif değeri alınarak  $C_a$  derişimi  $1,04 \times 10^{-3}$  olarak bulunmuştur. Yine

denklemin eğim değerinden de  $K_a$  değerinin  $3,48 \times 10^6$  olduğu bulunmuştur. Buradan  $pK_a$  değeri 6,542 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.11. % 40 THF ortamında Glibenklamid için  $Z^*H^+$  - Z grafiği

Glibenklamid için  $pK_a$  tayininde  $\Phi$ -pH ve Gran fonksiyonlarından da yararlanılmıştır.  $\Phi$ -pH grafiğinde,  $\Phi$ 'nin 0,5 değerine karşılık gelen pH değeri, Gran grafiğinde ise, doğru denkleminin eğim değerinin negatif logaritması  $pK_a$  değerini verir. Buna göre  $\Phi$ -pH grafiğinden  $pK_a$  değeri 6,563, Gran grafiğinden ise 6,556 olarak hesaplanmıştır. Grafikler Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.12. Glibenklamid için % 40 THF-su ortamında Gran ve  $\Phi$ -pH grafikleri

Bu bileşiğin % 45, % 50, % 55 ve % 60 THF-su ortamında yapılan potansiyometrik titrasyon verileri, % 40 THF-su ortamında yapılanlara benzer şekilde hesaplanmıştır.

#### 4.2.2. Glimepiridin % 40 (v/v) THF-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon grafikleri

Bu bileşiğin  $1,0 \times 10^{-3}$  M'lık çözeltisinden 40 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı KOH (0,03 M) titrant derişimi ile titre edilmiştir. Veriler, Çizelge 4.2'de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi mV değerleri  $E^0$  değeri kullanılarak pH olarak da ifade edilmiştir. Yine grafiksel yöntemle  $pK_a$  hesaplanmasında kullanılacak olan M ve Z değerleri de hesaplanmıştır.

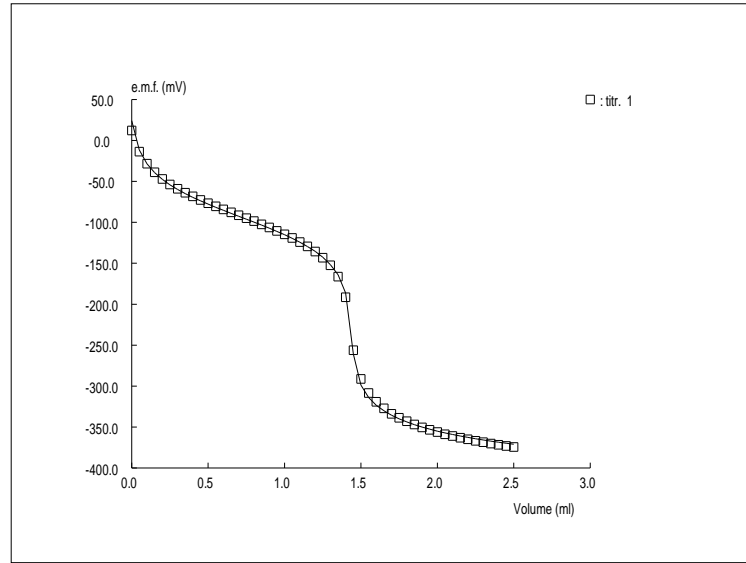
Çizelge 4.2. Glimepiridin % 40 (v/v) THF-su ortamında titrasyon verileri

mL	mV	pH	M	Z	Z*H <sup>+</sup>
0	12,3	4,895	0,00E+00	-1,27E-05	-1,62E-10
0,05	-13,7	5,335	3,75E-05	-4,21E-05	-1,94E-10
0,1	-28,3	5,583	7,48E-05	-7,74E-05	-2,02E-10
0,15	-38,8	5,761	1,12E-04	-1,14E-04	-1,97E-10
0,2	-47	5,900	1,49E-04	-1,51E-04	-1,89E-10
0,25	-53,7	6,014	1,86E-04	-1,87E-04	-1,82E-10
0,3	-59	6,103	2,23E-04	-2,24E-04	-1,77E-10
0,35	-63,9	6,186	2,60E-04	-2,61E-04	-1,70E-10
0,4	-68,3	6,261	2,97E-04	-2,98E-04	-1,63E-10
0,45	-72,6	6,334	3,34E-04	-3,34E-04	-1,55E-10
0,5	-76,6	6,402	3,70E-04	-3,71E-04	-1,47E-10
0,55	-80,5	6,468	4,07E-04	-4,07E-04	-1,39E-10
0,6	-84,2	6,531	4,43E-04	-4,44E-04	-1,31E-10
0,65	-87,8	6,592	4,80E-04	-4,80E-04	-1,23E-10
0,7	-91,3	6,651	5,16E-04	-5,16E-04	-1,15E-10
0,75	-94,9	6,712	5,52E-04	-5,52E-04	-1,07E-10
0,8	-98,5	6,773	5,88E-04	-5,88E-04	-9,92E-11
0,85	102,4	6,839	6,24E-04	-6,24E-04	-9,04E-11
0,9	-106,2	6,904	6,60E-04	-6,60E-04	-8,24E-11
0,95	-110,4	6,975	6,96E-04	-6,96E-04	-7,38E-11
1	-114,6	7,046	7,32E-04	-7,32E-04	-6,58E-11
1,05	-119,1	7,122	7,67E-04	-7,67E-04	-5,79E-11
1,1	-124	7,205	8,03E-04	-8,03E-04	-5,00E-11
1,15	-129,4	7,297	8,38E-04	-8,38E-04	-4,23E-11
1,2	-135,6	7,402	8,74E-04	-8,74E-04	-3,46E-11
1,25	-143,2	7,531	9,09E-04	-9,09E-04	-2,68E-11
1,3	-152,4	7,687	9,44E-04	-9,44E-04	-1,94E-11
1,35	-166,3	7,923	9,79E-04	-9,79E-04	-1,17E-11
1,4	-191,5	8,350	1,01E-03	-1,01E-03	-4,53E-12
1,45	-256,1	9,445	1,05E-03	-1,05E-03	-3,77E-13
1,5	-291,3	10,042	1,08E-03	-1,08E-03	-9,85E-14
1,55	-308,4	10,332	1,12E-03	-1,12E-03	-5,22E-14
1,6	-319,1	10,513	1,15E-03	-1,15E-03	-3,54E-14
1,65	-327,2	10,650	1,19E-03	-1,19E-03	-2,66E-14
1,7	-333,8	10,762			
1,75	-338,7	10,845			
1,8	-342,9	10,917			
1,85	-346,9	10,984			
1,9	-350,4	11,044			

Çizelge 4.2. Glimepiridin % 40 (v/v) THF-su ortamında titrasyon verileri (Devam)

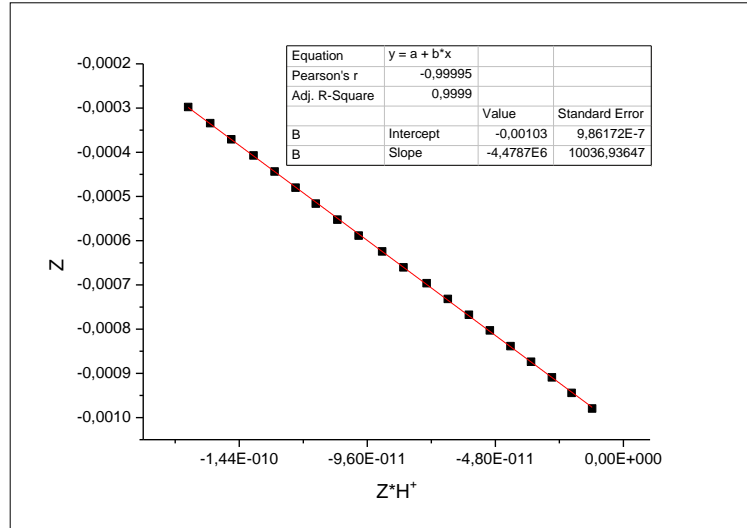
mL	mV	pH	M	Z	Z*H <sup>+</sup>
1,95	-353,5	11,096			
2	-356,2	11,142			
2,05	-358,8	11,186			
2,1	-361	11,223			
2,15	-363,1	11,259			
2,2	-365	11,291			
2,25	-366,8	11,322			
2,3	-368,5	11,351			
2,35	-370,1	11,378			
2,4	-371,6	11,403			
2,45	-373,1	11,428			
2,5	-374,5	11,452			

Bu bileşiğin titrasyonuna ait PKPOT grafiği, Şekil 4.13' te verilmiştir. Şekil 4.13' ten görüldüğü gibi bileşik tek dönüm noktalı titrasyon grafiği vermektedir. PKPOT programı ile hesaplanan pK<sub>a</sub> değeri 6,703 ± 0,023' dür.



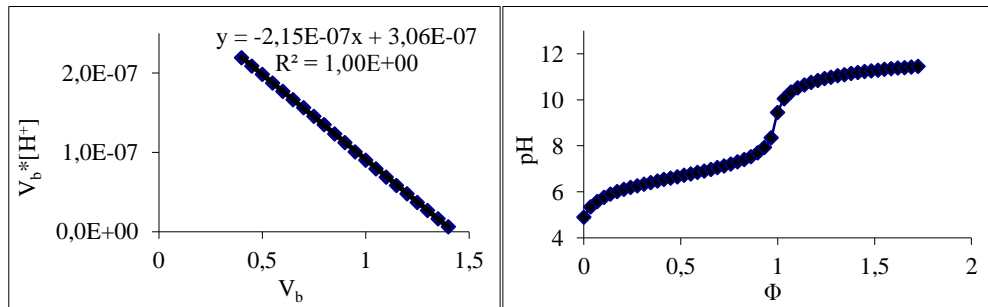
Şekil 4.13. % 40 THF ortamında Glimepirid için PKPOT grafiği

Glimepirid için grafiksel metotla Z\*H<sup>+</sup> değerlerine karşı Z değerleri grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.14'deki gibi bir doğru elde edilir. Bu doğrunun denkleminin kesiminin negatif değeri alınarak C<sub>a</sub> derişimi 1,03x10<sup>-3</sup> olarak bulunmuştur. Yine denklemin eğim değerinden de K<sub>a</sub> değerinin 4,478x10<sup>7</sup> olduğu bulunmuştur. Buradan pK<sub>a</sub> değeri 6,651 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.14. % 40 THF ortamında Glimepirid için  $Z^*H^+$  - Z grafiği

Glimepirid için  $pK_a$  tayininde  $\Phi$ -pH ve Gran fonksiyonlarından da yararlanılmıştır.  $\Phi$ -pH grafiğinde,  $\Phi$ 'nin 0,5 değerine karşılık gelen pH değeri, Gran grafiğinde ise doğru denkleminin eğim değerinin negatif logaritması  $pK_a$  değerini verir. Buna göre  $\Phi$ -pH grafiğinden  $pK_a$  değeri 6,682, Gran grafiğinden ise 6,668 olarak hesaplanmıştır. Grafikler Şekil 4.15'de verilmiştir.



Şekil 4.15. Glimepirid için %40 THF-su ortamında Gran ve  $\Phi$ -pH grafikleri

Bu bileşiğin % 45, % 50, % 55 ve % 60 THF-su ortamında yapılan potansiyometrik titrasyon verileri, % 40 THF-su ortamında yapılanlara benzer şekilde hesaplanmıştır.

#### 4.2.3. Gliklazidin % 40 (v/v) THF-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon grafikleri

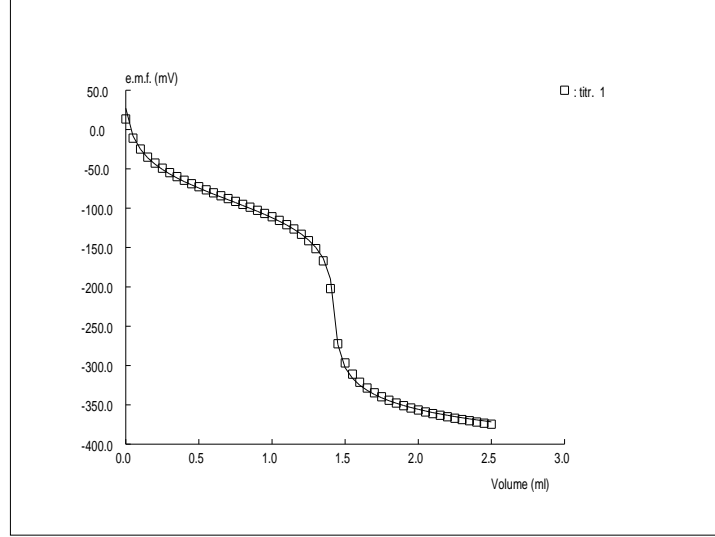
Bu bileşiğin  $1,0 \times 10^{-3}$  M'lık çözeltisinden 40 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı KOH (0,03 M) titrant derişimi ile titre edilmiştir. Veriler, Çizelge 4.3'de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi mV değerleri  $E^0$  değeri

kullanılarak pH olarak da ifade edilmiştir. Yine grafiksel yöntemle  $pK_a$  hesaplanmasında kullanılacak olan M ve Z değerleri de hesaplanmıştır.

Çizelge 4.3. Gliklazidin % 40 (v/v) THF-su ortamında titrasyon verileri

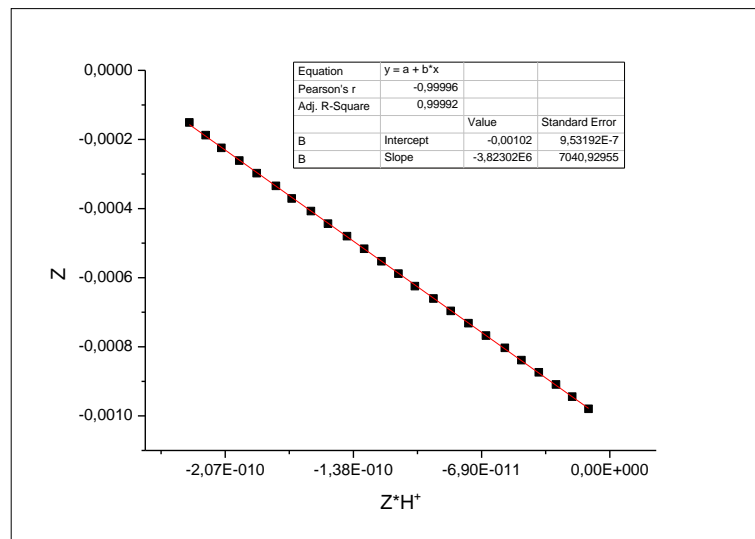
mL	mV	pH	M	Z	Z*H <sup>+</sup>
0	13,4	4,876	0,00E+00	-1,33E-05	-1,77E-10
0,05	-10,8	5,286	3,75E-05	-4,26E-05	-2,21E-10
0,1	-24,7	5,522	7,48E-05	-7,78E-05	-2,34E-10
0,15	-35,1	5,698	1,12E-04	-1,14E-04	-2,29E-10
0,2	-42,5	5,824	1,49E-04	-1,51E-04	-2,26E-10
0,25	-49,1	5,936	1,86E-04	-1,87E-04	-2,17E-10
0,3	-54,7	6,031	2,23E-04	-2,24E-04	-2,09E-10
0,35	-59,8	6,117	2,60E-04	-2,61E-04	-1,99E-10
0,4	-64,4	6,195	2,97E-04	-2,98E-04	-1,90E-10
0,45	-68,8	6,270	3,34E-04	-3,34E-04	-1,80E-10
0,5	-72,7	6,336	3,70E-04	-3,71E-04	-1,71E-10
0,55	-76,7	6,403	4,07E-04	-4,07E-04	-1,61E-10
0,6	-80,4	6,466	4,43E-04	-4,44E-04	-1,52E-10
0,65	-84,2	6,531	4,80E-04	-4,80E-04	-1,41E-10
0,7	-87,8	6,592	5,16E-04	-5,16E-04	-1,32E-10
0,75	-91,4	6,653	5,52E-04	-5,52E-04	-1,23E-10
0,8	-95	6,714	5,88E-04	-5,88E-04	-1,14E-10
0,85	-98,6	6,775	6,24E-04	-6,24E-04	-1,05E-10
0,9	-102,6	6,843	6,60E-04	-6,60E-04	-9,49E-11
0,95	-106,6	6,910	6,96E-04	-6,96E-04	-8,56E-11
1	-110,9	6,983	7,32E-04	-7,32E-04	-7,60E-11
1,05	-115,5	7,061	7,67E-04	-7,67E-04	-6,66E-11
1,1	-120,9	7,153	8,03E-04	-8,03E-04	-5,65E-11
1,15	-126,4	7,246	8,38E-04	-8,38E-04	-4,76E-11
1,2	-133,1	7,360	8,74E-04	-8,74E-04	-3,82E-11
1,25	-141,2	7,497	9,09E-04	-9,09E-04	-2,89E-11
1,3	-151,4	7,670	9,44E-04	-9,44E-04	-2,02E-11
1,35	-166,9	7,933	9,79E-04	-9,79E-04	-1,14E-11
1,4	-202,3	8,533	1,01E-03	-1,01E-03	-2,97E-12
1,45	-272,3	9,720	1,05E-03	-1,05E-03	-2,00E-13
1,5	-296,8	10,135			
1,55	-310,9	10,374			
1,6	-321,2	10,549			
1,65	-328,7	10,676			
1,7	-334,8	10,779			
1,75	-339,8	10,864			
1,8	-344,1	10,937			
1,85	-347,7	10,998			
1,9	-351	11,054			
1,95	-354,1	11,106			
2	-356,6	11,149			
2,05	-359	11,189			
2,1	-361,2	11,227			
2,15	-363,3	11,262			
2,2	-365,2	11,295			
2,25	-367,1	11,327			
2,3	-368,7	11,354			
2,35	-370,3	11,381			

Bu bileşğin titrasyonuna ait PKPOT grafiği, Şekil 4.16' da verilmiştir. Şekil 4.16' dan görüldüğü gibi bileşik tek dönüm noktalı titrasyon grafiği vermektedir. PKPOT programı ile hesaplanan  $pK_a$  değeri  $6,635 \pm 0,024$ 'dür.



Şekil 4.16. % 40 THF ortamında Gliklazid için PKPOT grafiği

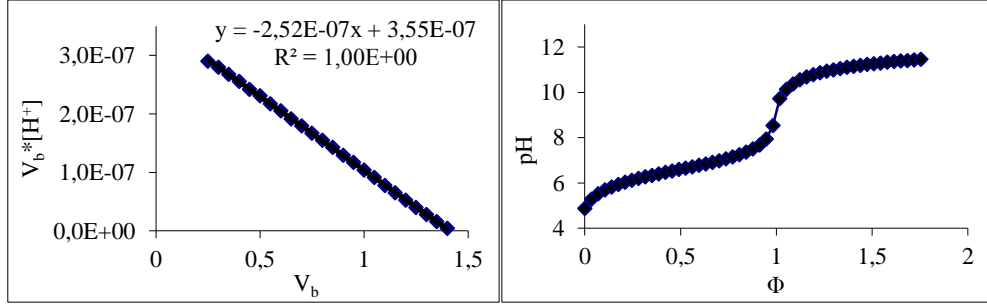
Gliklazid için grafiksel metotla  $Z^*H^+$  değerlerine karşı  $Z$  değerleri grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.17'deki gibi bir doğru elde edilir. Bu doğrunun denkleminin kesiminin negatif değeri alınarak  $C_a$  derişimi  $1,02 \times 10^{-3}$  olarak bulunmuştur. Yine denklemin eğim değerinden de  $K_a$  değerinin  $3,823 \times 10^6$  olduğu bulunmuştur. Buradan  $pK_a$  değeri 6,582 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.17. % 40 THF ortamında Gliklazid için  $Z^*H^+ - Z$  grafiği



Gliklazid için  $pK_a$  tayininde  $\Phi$ -pH ve Gran fonksiyonlarından da yararlanılmıştır.  $\Phi$ -pH grafiğinde,  $\Phi$ 'nin 0,5 değerine karşılık gelen pH değeri, Gran grafiğinde ise doğru denkleminin eğim değerinin negatif logaritması  $pK_a$  değerini verir. Buna göre  $\Phi$ -pH grafiğinden  $pK_a$  değeri 6,622, Gran grafiğinden ise 6,599 olarak hesaplanmıştır. Grafikler şekil 4.18'de verilmiştir.



Şekil 4.18. Gliklazid için %40 THF-su ortamında Gran ve  $\Phi$ -pH grafikleri

Bu bileşiğin % 45, % 50, % 55 ve % 60 THF-su ortamında yapılan potansiyometrik titrasyon verileri, % 40 THF-su ortamında yapılanlara benzer şekilde hesaplanmıştır.

#### 4.2.4. Glipizidin % 40 (v/v) THF-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon grafikleri

Bu bileşiğin  $1,0 \times 10^{-3}$  M'lık çözeltisinden 40 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı KOH (0,03 M) titrant derişimi ile titre edilmiştir. Veriler, Çizelge 4.4'de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi mV değerleri  $E^0$  değeri kullanılarak pH olarak da ifade edilmiştir.

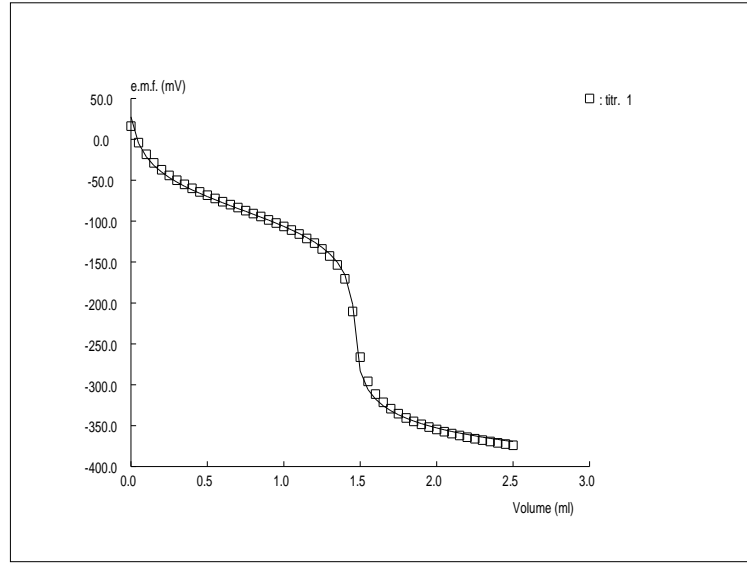
Çizelge 4.4. Glipizidin % 40 (v/v) THF-su ortamında titrasyon verileri

mL	mV	pH	M	Z	Z*H <sup>+</sup>
0	16,2	4,829	0,00E+00	-1,48E-05	-2,20E-10
0,05	-3,9	5,169	3,75E-05	-4,42E-05	-2,99E-10
0,1	-18,3	5,413	7,48E-05	-7,87E-05	-3,04E-10
0,15	-28,8	5,591	1,12E-04	-1,15E-04	-2,94E-10
0,2	-37,2	5,734	1,49E-04	-1,51E-04	-2,79E-10
0,25	-44	5,849	1,86E-04	-1,88E-04	-2,66E-10
0,3	-49,9	5,949	2,23E-04	-2,24E-04	-2,52E-10
0,35	-55	6,036	2,60E-04	-2,61E-04	-2,41E-10
0,4	-59,9	6,119	2,97E-04	-2,98E-04	-2,27E-10
0,45	-64,3	6,193	3,34E-04	-3,34E-04	-2,14E-10
0,5	-68,3	6,261	3,70E-04	-3,71E-04	-2,03E-10
0,55	-72,2	6,327	4,07E-04	-4,07E-04	-1,92E-10

Çizelge 4.4. Glipizidin % 40 (v/v) THF-su ortamında titrasyon verileri (Devam)

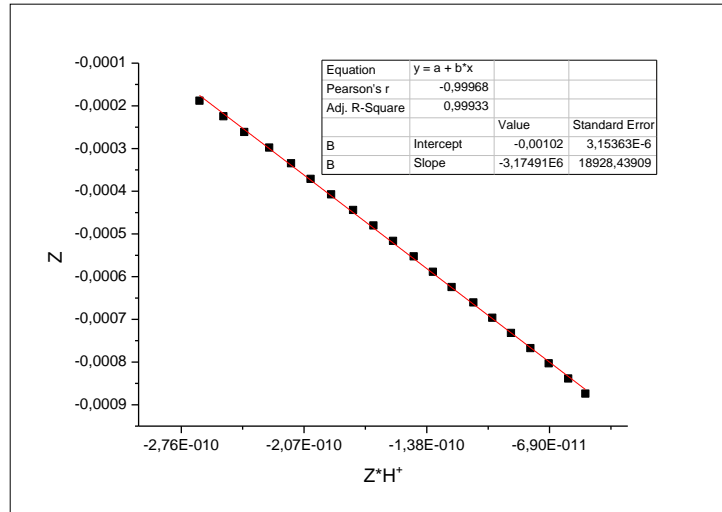
mL	mV	pH	M	Z	Z*H <sup>+</sup>
0,6	-76,1	6,393	4,43E-04	-4,44E-04	-1,79E-10
0,65	-79,8	6,456	4,80E-04	-4,80E-04	-1,68E-10
0,7	-83,4	6,517	5,16E-04	-5,16E-04	-1,57E-10
0,75	-87,1	6,580	5,52E-04	-5,52E-04	-1,45E-10
0,8	-90,7	6,641	5,88E-04	-5,88E-04	-1,35E-10
0,85	-94,3	6,702	6,24E-04	-6,24E-04	-1,24E-10
0,9	-98,4	6,771	6,60E-04	-6,60E-04	-1,12E-10
0,95	-102,3	6,838	6,96E-04	-6,96E-04	-1,01E-10
1	-106,4	6,907	7,32E-04	-7,32E-04	-9,07E-11
1,05	-110,9	6,983	7,67E-04	-7,67E-04	-7,98E-11
1,1	-115,6	7,063	8,03E-04	-8,03E-04	-6,95E-11
1,15	-121,1	7,156	8,38E-04	-8,38E-04	-5,85E-11
1,2	-126,8	7,253	8,74E-04	-8,74E-04	-4,88E-11
1,25	-134	7,375	9,09E-04	-9,09E-04	-3,83E-11
1,3	-142,6	7,521	9,44E-04	-9,44E-04	-2,85E-11
1,35	-153,4	7,704	9,79E-04	-9,79E-04	-1,94E-11
1,4	-170,4	7,992	1,01E-03	-1,01E-03	-1,03E-11
1,45	-210,3	8,668	1,05E-03	-1,05E-03	-2,25E-12
1,5	-266,3	9,618	1,08E-03	-1,08E-03	-2,61E-13
1,55	-295,9	10,120			
1,6	-311,4	10,382			
1,65	-321,4	10,552			
1,7	-329,3	10,686			
1,75	-335,4	10,789			
1,8	-340,5	10,876			
1,85	-344,7	10,947			
1,9	-348,4	11,010			
1,95	-351,8	11,067			
2	-354,7	11,117			
2,05	-357,4	11,162			
2,1	-359,8	11,203			
2,15	-362	11,240			
2,2	-364,1	11,276			
2,25	-366	11,308			
2,3	-367,7	11,337			
2,35	-369,4	11,366			
2,4	-371	11,393			
2,45	-372,5	11,418			
2,5	-373,9	11,442			

Bu bileşimin titrasyonuna ait PKPOT grafiği, Şekil 4.19' da verilmiştir. Şekil 4.19' dan görüldüğü gibi bileşik tek dönüm noktalı titrasyon grafiği vermektedir. PKPOT programı ile hesaplanan pK<sub>a</sub> değeri 6,599 ± 0,024'dür.



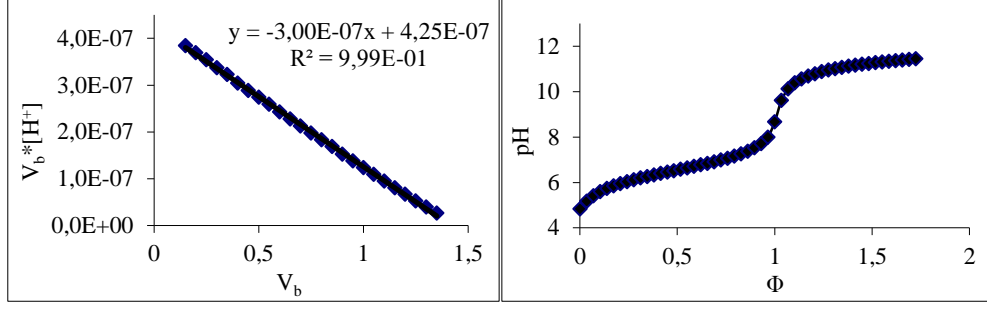
Şekil 4.19. % 40 THF ortamında Glipizid için PKPOT grafiği

Glipizid için grafiksel metotla  $Z^*H^+$  değerlerine karşı  $Z$  değerleri grafiğe geçirildiğinde Şekil 4.20'deki gibi bir doğru elde edilir. Bu doğrunun denkleminin kesiminin negatif değeri alınarak  $C_a$  derişimi  $1,02 \times 10^{-3}$  olarak bulunmuştur. Yine denklemin eğim değerinden de  $K_a$  değerinin  $3,15 \times 10^7$  olduğu bulunmuştur. Buradan  $pK_a$  değeri 6,502 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.20. % 40 THF ortamında Glipizid için  $Z^*H^+$  -  $Z$  grafiği

$\Phi$ -pH grafiğinden  $pK_a$  değeri 6,548; Gran grafiğinden de 6,523 olarak hesaplanmıştır.  $\Phi$ -pH grafiğinden ve Gran fonksiyonlarından da yararlanılarak elde edilen grafikler Şekil 4.21'de verilmiştir.



Şekil 4.21. Glipizid için % 40 THF-su ortamında Gran ve  $\Phi$ -pH grafikleri

Bu bileşiğin % 45, % 50, % 55 ve % 60 THF-su ortamında yapılan potansiyometrik titrasyon verileri, % 40 THF-su ortamında yapılanlara benzer şekilde hesaplanmıştır.

### 4.3. Tiyazolidindionların Potansiyometrik Yöntemle İyonlaşma Sabiti Tayini

#### 4.3.1. Pioglitazon HCl % 40 (v/v) THF-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon grafikleri

Bu bileşiğin  $1,0 \times 10^{-3}$  M'lık çözeltisinden 40 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı KOH (0,03 M) titrant derişimi ile titre edilmiştir. Veriler, Çizelge 4.5'de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi mV değerleri  $E^0$  değeri kullanılarak pH olarak da ifade edilmiştir. Grafikselleştirme için gerekli  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_0$  ve  $2 - \bar{n}$  değerleri de Çizelge 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.5. Pioglitazon HCl % 40 (v/v) THF-su ortamında titrasyon verileri

mL	mV	pH	$\alpha_2$	$\alpha_1$	$\alpha_0$	$2 - \bar{n}$
0	92,1	3,542	7,47E-01	2,53E-01	9,04E-05	0,253
0,05	90,2	3,574	7,33E-01	2,67E-01	1,03E-04	0,267
0,1	88,2	3,608	7,17E-01	2,83E-01	1,18E-04	0,283
0,15	86,3	3,640	7,02E-01	2,98E-01	1,34E-04	0,298
0,2	84,3	3,674	6,85E-01	3,15E-01	1,52E-04	0,315
0,25	82,3	3,708	6,68E-01	3,32E-01	1,74E-04	0,332
0,3	80,3	3,742	6,51E-01	3,49E-01	1,98E-04	0,350
0,35	78,1	3,779	6,31E-01	3,69E-01	2,28E-04	0,369
0,4	75,8	3,818	6,10E-01	3,90E-01	2,63E-04	0,391
0,45	73,4	3,859	5,87E-01	4,12E-01	3,06E-04	0,413
0,5	71,1	3,898	5,65E-01	4,34E-01	3,52E-04	0,435
0,55	68,7	3,938	5,42E-01	4,57E-01	4,08E-04	0,458
0,6	66,2	3,981	5,18E-01	4,82E-01	4,73E-04	0,483
0,65	63,6	4,025	4,92E-01	5,07E-01	5,51E-04	0,508
0,7	60,8	4,072	4,65E-01	5,34E-01	6,48E-04	0,536
0,75	57,8	4,123	4,36E-01	5,63E-01	7,68E-04	0,565
0,8	54,8	4,174	4,07E-01	5,92E-01	9,07E-04	0,593
0,85	51,7	4,227	3,79E-01	6,20E-01	1,07E-03	0,622

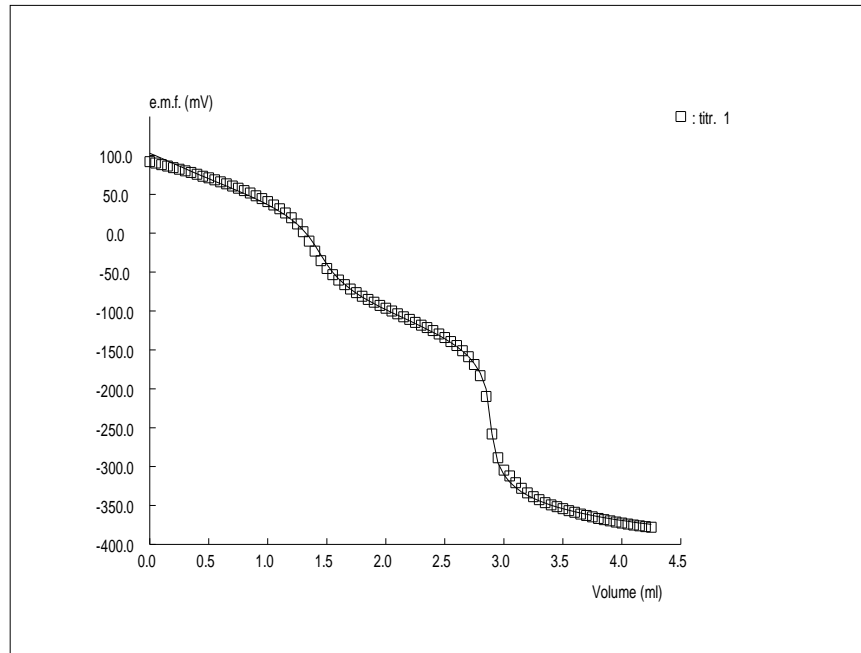
Çizelge 4.5. Pioglitazon HCl % 40 (v/v) THF-su ortamında titrasyon verileri (Devam)

mL	mV	pH	$\alpha_2$	$\alpha_1$	$\alpha_0$	$2 - \bar{n}$
0,9	48,2	4,286	3,47E-01	6,52E-01	1,29E-03	0,654
0,95	44,6	4,347	3,16E-01	6,83E-01	1,56E-03	0,686
1	40,6	4,415	2,83E-01	7,15E-01	1,91E-03	0,719
1,05	36,2	4,489	2,49E-01	7,48E-01	2,37E-03	0,753
1,1	31,4	4,571	2,16E-01	7,81E-01	2,99E-03	0,787
1,15	26,1	4,661	1,83E-01	8,13E-01	3,82E-03	0,821
1,2	19,9	4,766	1,49E-01	8,46E-01	5,06E-03	0,856
1,25	12	4,900	1,14E-01	8,79E-01	7,16E-03	0,893
1,3	2	5,069	7,97E-02	9,09E-01	1,10E-02	0,931
1,35	-10,1	5,274	5,09E-02	9,31E-01	1,80E-02	0,967
1,4	-23,1	5,495	3,09E-02	9,39E-01	3,01E-02	0,999
1,45	-35,3	5,702	1,91E-02	9,33E-01	4,82E-02	1,029
1,5	-45,2	5,869	1,27E-02	9,18E-01	6,98E-02	1,057
1,55	-53,3	6,007	9,09E-03	8,97E-01	9,36E-02	1,085
1,6	-60,1	6,122	6,79E-03	8,74E-01	1,19E-01	1,112
1,65	-66,2	6,225	5,19E-03	8,48E-01	1,46E-01	1,141
1,7	-71,7	6,319	4,05E-03	8,20E-01	1,75E-01	1,171
1,75	-76,4	6,398	3,26E-03	7,93E-01	2,04E-01	1,201
1,8	-81	6,476	2,62E-03	7,63E-01	2,35E-01	1,232
1,85	-85	6,544	2,16E-03	7,34E-01	2,64E-01	1,262
1,9	-88,8	6,609	1,78E-03	7,04E-01	2,94E-01	1,292
1,95	-92,7	6,675	1,46E-03	6,72E-01	3,26E-01	1,325
2	-96,3	6,736	1,21E-03	6,41E-01	3,58E-01	1,357
2,05	-100	6,799	9,93E-04	6,07E-01	3,92E-01	1,391
2,1	-103,5	6,858	8,19E-04	5,74E-01	4,25E-01	1,424
2,15	-107,3	6,922	6,61E-04	5,38E-01	4,62E-01	1,461
2,2	-110,8	6,982	5,40E-04	5,04E-01	4,96E-01	1,495
2,25	-114,7	7,048	4,29E-04	4,66E-01	5,34E-01	1,533
2,3	-118,3	7,109	3,45E-04	4,31E-01	5,69E-01	1,568
2,35	-121,3	7,160	2,87E-04	4,03E-01	5,97E-01	1,597
2,4	-125,2	7,226	2,24E-04	3,67E-01	6,33E-01	1,633
2,45	-129,5	7,299	1,70E-04	3,29E-01	6,71E-01	1,671
2,5	-134,2	7,378	1,25E-04	2,90E-01	7,10E-01	1,710
2,55	-139,3	7,465	8,83E-05	2,50E-01	7,50E-01	1,749
2,6	-144,4	7,551	6,21E-05	2,15E-01	7,85E-01	1,785
2,65	-151,1	7,665	3,87E-05	1,74E-01	8,26E-01	1,826
2,7	-158,7	7,794	2,24E-05	1,35E-01	8,65E-01	1,865
2,75	-168,8	7,965	1,06E-05	9,55E-02	9,04E-01	1,904
2,8	-183,1	8,207	3,64E-06	5,70E-02	9,43E-01	1,943
2,85	-209,7	8,658	4,73E-07	2,09E-02	9,79E-01	1,979
2,9	-258	9,477	1,11E-08	3,24E-03	9,97E-01	1,997
2,95	-288,7	9,998	1,01E-09	9,78E-04	9,99E-01	1,999
3	-304,5	10,265	2,95E-10	5,28E-04	9,99E-01	1,999
3,05	-312	10,393	1,64E-10	3,94E-04	1,00E+00	
3,1	-320,7	10,540	8,32E-11	2,81E-04	1,00E+00	
3,15	-327,9	10,662	4,74E-11	2,12E-04	1,00E+00	
3,2	-333,7	10,761	3,02E-11	1,69E-04	1,00E+00	
3,25	-338,6	10,844	2,06E-11	1,40E-04	1,00E+00	
3,3	-342,5	10,910	1,52E-11	1,20E-04	1,00E+00	
3,35	-346,3	10,974	1,13E-11	1,03E-04	1,00E+00	
3,4	-349,3	11,025	8,93E-12	9,19E-05	1,00E+00	
3,45	-351,6	11,064	7,46E-12	8,40E-05	1,00E+00	
3,5	-354,2	11,108	6,09E-12	7,59E-05	1,00E+00	

Çizelge 4.5. Pioglitazon HCl % 40 (v/v) THF-su ortamında titrasyon verileri (Devam)

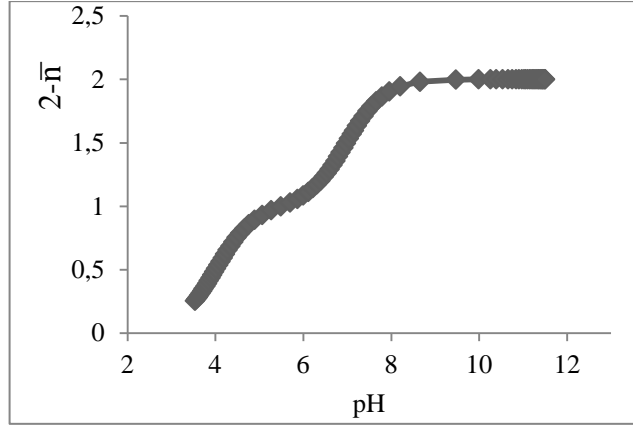
mL	mV	pH	$\alpha_2$	$\alpha_1$	$\alpha_0$	$2 - \bar{n}$
3,55	-356,6	11,149	5,05E-12	6,91E-05	1,00E+00	
3,6	-358,8	11,186	4,25E-12	6,34E-05	1,00E+00	
3,65	-361	11,223	3,58E-12	5,82E-05	1,00E+00	
3,7	-362,9	11,256	3,09E-12	5,41E-05	1,00E+00	
3,75	-364,7	11,286	2,68E-12	5,04E-05	1,00E+00	
3,8	-366,6	11,318	2,31E-12	4,68E-05	1,00E+00	
3,85	-368,2	11,345	2,04E-12	4,40E-05	1,00E+00	
3,9	-369,8	11,373	1,80E-12	4,13E-05	1,00E+00	
3,95	-371,2	11,396	1,61E-12	3,91E-05	1,00E+00	
4	-372,6	11,420	1,45E-12	3,70E-05	1,00E+00	
4,05	-373,9	11,442	1,31E-12	3,52E-05	1,00E+00	
4,1	-375	11,461	1,20E-12	3,37E-05	1,00E+00	
4,15	-376,2	11,481	1,09E-12	3,22E-05	1,00E+00	
4,2	-377,3	11,500	1,00E-12	3,08E-05	1,00E+00	
4,25	-378	11,512	9,50E-13	3,00E-05	1,00E+00	

Bu bileşiğin titrasyonuna ait PKPOT grafiği, Şekil 4.22’de verilmiştir. PKPOT programı ile hesaplanan  $pK_{a1}$  değeri  $4,012 \pm 0,042$ ;  $pK_{a2}$  değeri ise  $6,989 \pm 0,026$ ’dir.



Şekil 4.22. % 40 THF ortamında Pioglitazon HCl için PKPOT grafiği

Grafiksel metotla hesaplama yönteminde pH’ya karşı  $2 - \bar{n}$  grafiği çizildiğinde pH ekseninde 0,5 ve 1,5 değerlerine karşılık gelen pH değerleri  $pK_{a1}$  ve  $pK_{a2}$  değerlerini vermektedir (Şekil 4.23). Buna göre  $pK_{a1}$  değeri 4,025;  $pK_{a2}$  değeri ise 7,015 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.23. % 40 THF ortamında Pioglitazon HCl için pH-( $2-\bar{n}$ ) grafiği

Bu bileşiğin % 45, % 50, % 55 ve % 60 THF-su ortamında yapılan potansiyometrik titrasyon verileri, % 40 THF-su ortamında yapılanlara benzer şekilde hesaplanmıştır.

#### 4.3.2. Rosiglitazon Maleat % 40 (v/v) THF-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon grafikleri

Bu bileşiğin  $1,0 \times 10^{-3}$  M'lık çözeltisinden 40 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı KOH (0,03 M) titrant derişimi ile titre edilmiştir. Veriler, Çizelge 4.6'da verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi mV değerleri  $E^0$  değeri kullanılarak pH olarak da ifade edilmiştir. Grafiksel yöntemle hesaplama için gerekli  $\alpha_3$ ,  $\alpha_2$ ,  $\alpha_1$ ,  $\alpha_0$  ve  $3-\bar{n}$  değerleri de Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Rosiglitazon Maleat % 40 (v/v) THF-su ortamında titrasyon verileri

mL	mV	pH	$\alpha_3$	$\alpha_2$	$\alpha_1$	$\alpha_0$	$3-\bar{n}$
0	69,8	3,920	8,90E-01	1,10E-01	6,56E-04	1,56E-07	0,111
0,05	66,2	3,981	8,75E-01	1,24E-01	8,55E-04	2,34E-07	0,126
0,1	62	4,052	8,56E-01	1,43E-01	1,16E-03	3,75E-07	0,145
0,15	57,5	4,128	8,33E-01	1,66E-01	1,60E-03	6,18E-07	0,169
0,2	53,7	4,193	8,11E-01	1,87E-01	2,10E-03	9,39E-07	0,191
0,25	49,9	4,257	7,87E-01	2,11E-01	2,74E-03	1,42E-06	0,216
0,3	46,3	4,318	7,62E-01	2,35E-01	3,52E-03	2,10E-06	0,242
0,35	42,7	4,379	7,35E-01	2,61E-01	4,49E-03	3,09E-06	0,270
0,4	39,3	4,437	7,08E-01	2,87E-01	5,64E-03	4,42E-06	0,298
0,45	35,8	4,496	6,78E-01	3,15E-01	7,11E-03	6,39E-06	0,329
0,5	32,4	4,554	6,48E-01	3,43E-01	8,85E-03	9,08E-06	0,361
0,55	29,1	4,610	6,17E-01	3,72E-01	1,09E-02	1,27E-05	0,394
0,6	26,1	4,661	5,88E-01	3,99E-01	1,31E-02	1,73E-05	0,425
0,65	22,8	4,717	5,56E-01	4,28E-01	1,61E-02	2,40E-05	0,461
0,7	19,5	4,773	5,22E-01	4,58E-01	1,95E-02	3,32E-05	0,497
0,75	16,1	4,830	4,88E-01	4,88E-01	2,38E-02	4,61E-05	0,536
0,8	13	4,883	4,56E-01	5,16E-01	2,83E-02	6,20E-05	0,572
0,85	9,5	4,942	4,21E-01	5,45E-01	3,44E-02	8,62E-05	0,614

Çizelge 4.6. Rosiglitazon Maleat % 40 (v/v) THF-su ortamında titrasyon verileri (Devam)

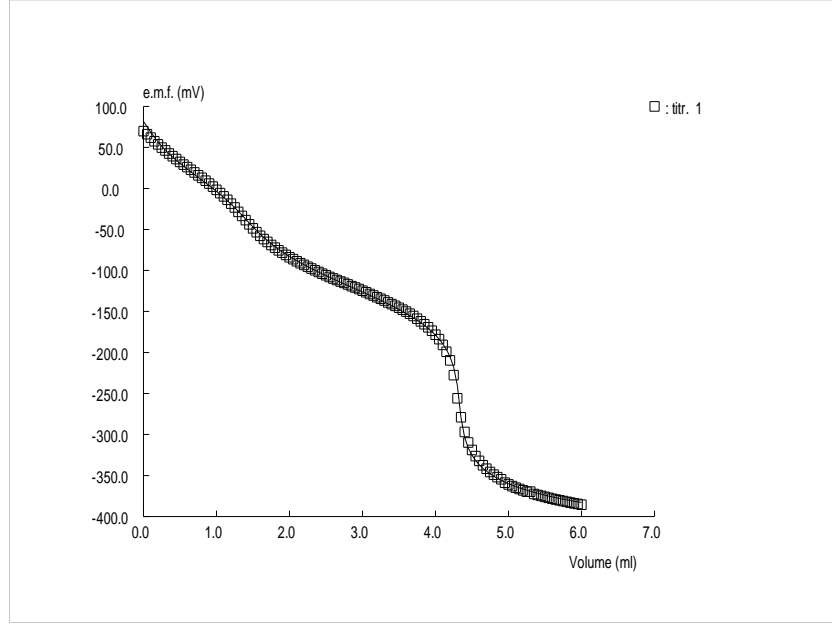
0,9	6	5,001	3,86E-01	5,73E-01	4,14E-02	1,19E-04	0,656
0,95	2,2	5,066	3,49E-01	6,01E-01	5,04E-02	1,68E-04	0,702
1	-1,7	5,132	3,12E-01	6,26E-01	6,11E-02	2,37E-04	0,749
1,05	-5,6	5,198	2,78E-01	6,48E-01	7,37E-02	3,33E-04	0,797
1,1	-9,6	5,266	2,44E-01	6,67E-01	8,86E-02	4,68E-04	0,845
1,15	-13,9	5,339	2,11E-01	6,81E-01	1,07E-01	6,70E-04	0,898
1,2	-18,6	5,418	1,78E-01	6,91E-01	1,30E-01	9,80E-04	0,954
1,25	-23,3	5,498	1,49E-01	6,93E-01	1,57E-01	1,42E-03	1,011
1,3	-28,6	5,588	1,20E-01	6,87E-01	1,92E-01	2,13E-03	1,076
1,35	-33,5	5,671	9,69E-02	6,73E-01	2,27E-01	3,05E-03	1,136
1,4	-38,5	5,756	7,71E-02	6,51E-01	2,67E-01	4,37E-03	1,199
1,45	-43,7	5,844	6,01E-02	6,21E-01	3,12E-01	6,25E-03	1,265
1,5	-48,6	5,927	4,69E-02	5,87E-01	3,57E-01	8,66E-03	1,328
1,55	-53,2	6,005	3,67E-02	5,50E-01	4,01E-01	1,16E-02	1,388
1,6	-57,7	6,081	2,86E-02	5,12E-01	4,44E-01	1,54E-02	1,446
1,65	-61,8	6,151	2,26E-02	4,74E-01	4,84E-01	1,96E-02	1,500
1,7	-65,3	6,210	1,84E-02	4,42E-01	5,16E-01	2,40E-02	1,546
1,75	-68,9	6,271	1,47E-02	4,08E-01	5,48E-01	2,93E-02	1,592
1,8	-72,3	6,329	1,19E-02	3,76E-01	5,77E-01	3,53E-02	1,636
1,85	-75,4	6,381	9,74E-03	3,47E-01	6,02E-01	4,15E-02	1,675
1,9	-78,3	6,431	8,04E-03	3,21E-01	6,23E-01	4,81E-02	1,711
1,95	-81,1	6,478	6,66E-03	2,96E-01	6,42E-01	5,53E-02	1,746
2	-83,8	6,524	5,53E-03	2,73E-01	6,58E-01	6,30E-02	1,779
2,05	-86,2	6,565	4,67E-03	2,54E-01	6,71E-01	7,06E-02	1,807
2,1	-88,7	6,607	3,91E-03	2,34E-01	6,83E-01	7,91E-02	1,837
2,15	-91	6,646	3,31E-03	2,17E-01	6,92E-01	8,78E-02	1,864
2,2	-93,3	6,685	2,80E-03	2,01E-01	7,00E-01	9,71E-02	1,891
2,25	-95,5	6,722	2,38E-03	1,86E-01	7,05E-01	1,07E-01	1,916
2,3	-97,6	6,758	2,03E-03	1,72E-01	7,09E-01	1,16E-01	1,940
2,35	-99,8	6,795	1,72E-03	1,59E-01	7,12E-01	1,27E-01	1,965
2,4	-101,9	6,831	1,46E-03	1,46E-01	7,14E-01	1,39E-01	1,989
2,45	-103,9	6,865	1,25E-03	1,35E-01	7,14E-01	1,50E-01	2,012
2,5	-105,8	6,897	1,07E-03	1,25E-01	7,12E-01	1,61E-01	2,033
2,55	-107,8	6,931	9,16E-04	1,16E-01	7,10E-01	1,73E-01	2,056
2,6	-109,7	6,963	7,86E-04	1,07E-01	7,06E-01	1,86E-01	2,078
2,65	-111,7	6,997	6,67E-04	9,81E-02	7,02E-01	2,00E-01	2,100
2,7	-113,4	7,026	5,80E-04	9,11E-02	6,96E-01	2,12E-01	2,119
2,75	-115,2	7,056	5,00E-04	8,42E-02	6,90E-01	2,25E-01	2,140
2,8	-117,1	7,088	4,26E-04	7,73E-02	6,82E-01	2,40E-01	2,162
2,85	-119	7,121	3,62E-04	7,09E-02	6,74E-01	2,55E-01	2,183
2,9	-120,8	7,151	3,11E-04	6,52E-02	6,65E-01	2,70E-01	2,204
2,95	-122,7	7,183	2,64E-04	5,95E-02	6,54E-01	2,86E-01	2,226
3	-124,6	7,216	2,23E-04	5,43E-02	6,43E-01	3,03E-01	2,248
3,05	-126,6	7,249	1,87E-04	4,92E-02	6,30E-01	3,21E-01	2,271
3,1	-128,6	7,283	1,57E-04	4,45E-02	6,16E-01	3,39E-01	2,294
3,15	-130,6	7,317	1,31E-04	4,02E-02	6,02E-01	3,58E-01	2,318
3,2	-132,6	7,351	1,09E-04	3,63E-02	5,86E-01	3,77E-01	2,341
3,25	-134,6	7,385	9,08E-05	3,26E-02	5,70E-01	3,97E-01	2,364
3,3	-136,7	7,421	7,47E-05	2,91E-02	5,53E-01	4,18E-01	2,388
3,35	-138,9	7,458	6,08E-05	2,58E-02	5,34E-01	4,40E-01	2,414
3,4	-141	7,494	4,98E-05	2,30E-02	5,16E-01	4,61E-01	2,438
3,45	-143,2	7,531	4,04E-05	2,03E-02	4,96E-01	4,83E-01	2,463
3,5	-145,5	7,570	3,23E-05	1,78E-02	4,76E-01	5,06E-01	2,489
3,55	-147,7	7,607	2,61E-05	1,56E-02	4,56E-01	5,29E-01	2,513



Çizelge 4.6. Rosiglitazon Maleat % 40 (v/v) THF-su ortamında titrasyon verileri (Devam)

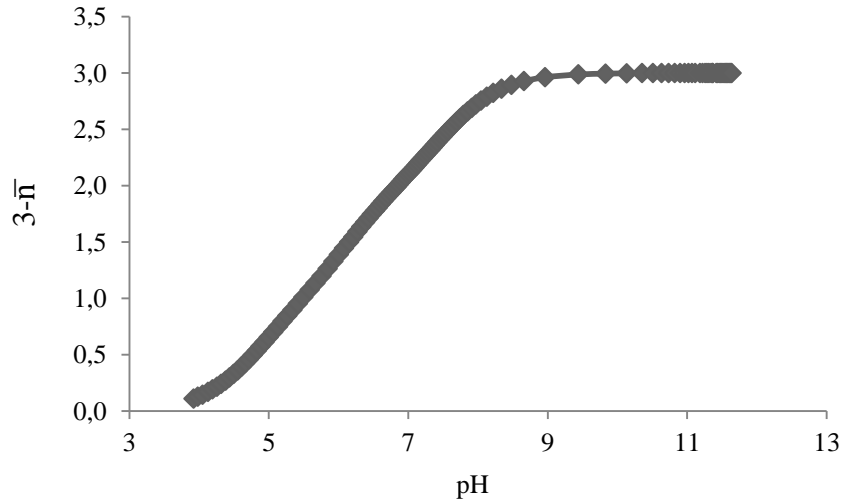
3,6	-150,2	7,650	2,04E-05	1,35E-02	4,33E-01	5,54E-01	2,540
3,65	-152,8	7,694	1,57E-05	1,15E-02	4,09E-01	5,79E-01	2,568
3,7	-155,5	7,739	1,20E-05	9,74E-03	3,85E-01	6,05E-01	2,596
3,75	-158,7	7,794	8,65E-06	7,96E-03	3,57E-01	6,35E-01	2,627
3,8	-162	7,850	6,15E-06	6,44E-03	3,28E-01	6,65E-01	2,659
3,85	-165,5	7,909	4,27E-06	5,12E-03	2,99E-01	6,96E-01	2,690
3,9	-169,2	7,972	2,89E-06	4,00E-03	2,70E-01	7,26E-01	2,722
3,95	-173,5	8,045	1,82E-06	2,99E-03	2,39E-01	7,58E-01	2,755
4	-178,4	8,128	1,07E-06	2,13E-03	2,06E-01	7,92E-01	2,790
4,05	-183,7	8,218	6,00E-07	1,47E-03	1,74E-01	8,24E-01	2,823
4,1	-190,7	8,336	2,76E-07	8,86E-04	1,38E-01	8,61E-01	2,860
4,15	-199,1	8,479	1,07E-07	4,79E-04	1,04E-01	8,96E-01	2,895
4,2	-209,7	8,658	3,22E-08	2,17E-04	7,12E-02	9,29E-01	2,928
4,25	-227,7	8,963	4,06E-09	5,52E-05	3,66E-02	9,63E-01	2,963
4,3	-255,8	9,440	1,55E-10	6,31E-06	1,25E-02	9,87E-01	2,987
4,35	-278,9	9,831	1,04E-11	1,05E-06	5,12E-03	9,95E-01	2,995
4,4	-296,8	10,135	1,28E-12	2,60E-07	2,55E-03	9,97E-01	2,997
4,45	-309,7	10,354	2,84E-13	9,49E-08	1,54E-03	9,98E-01	2,998
4,5	-318,9	10,510	9,67E-14	4,63E-08	1,08E-03	9,99E-01	2,999
4,55	-326,2	10,633	4,11E-14	2,62E-08	8,11E-04	9,99E-01	2,999
4,6	-332,2	10,735	2,04E-14	1,64E-08	6,42E-04	9,99E-01	2,999
4,65	-337,4	10,823	1,11E-14	1,09E-08	5,24E-04	9,99E-01	2,999
4,7	-341,8	10,898	6,62E-15	7,75E-09	4,41E-04	1,00E+00	3,000
4,75	-345,6	10,962	4,24E-15	5,76E-09	3,80E-04	1,00E+00	3,000
4,8	-348,9	11,018	2,88E-15	4,45E-09	3,34E-04	1,00E+00	3,000
4,85	-351,9	11,069	2,03E-15	3,52E-09	2,97E-04	1,00E+00	3,000
4,9	-354,6	11,115	1,48E-15	2,85E-09	2,68E-04	1,00E+00	3,000
4,95	-358,8	11,186	9,04E-16	2,06E-09	2,27E-04	1,00E+00	3,000
5	-360,9	11,222	7,07E-16	1,74E-09	2,09E-04	1,00E+00	3,000
5,05	-363	11,257	5,53E-16	1,48E-09	1,93E-04	1,00E+00	3,000
5,1	-364,7	11,286	4,53E-16	1,30E-09	1,81E-04	1,00E+00	3,000
5,15	-366,4	11,315	3,71E-16	1,14E-09	1,69E-04	1,00E+00	3,000
5,2	-368,1	11,344	3,04E-16	9,95E-10	1,58E-04	1,00E+00	3,000
5,25	-369,6	11,369	2,55E-16	8,85E-10	1,49E-04	1,00E+00	3,000
5,3	-369,6	11,369	2,55E-16	8,85E-10	1,49E-04	1,00E+00	3,000
5,35	-372,4	11,417	1,84E-16	7,11E-10	1,34E-04	1,00E+00	3,000
5,4	-373,7	11,439	1,58E-16	6,42E-10	1,27E-04	1,00E+00	3,000
5,45	-374,9	11,459	1,37E-16	5,85E-10	1,21E-04	1,00E+00	3,000
5,5	-376	11,478	1,21E-16	5,37E-10	1,16E-04	1,00E+00	3,000
5,55	-377,2	11,498	1,05E-16	4,89E-10	1,11E-04	1,00E+00	3,000
5,6	-378,3	11,517	9,22E-17	4,49E-10	1,06E-04	1,00E+00	3,000
5,65	-379,3	11,534	8,20E-17	4,15E-10	1,02E-04	1,00E+00	3,000

Bu bileşiğin titrasyonuna ait PKPOT grafiği, Şekil 4.24'te verilmiştir. PKPOT programı ile hesaplanan  $pK_{a1}$  değeri  $4,830 \pm 0,032$ ;  $pK_{a2}$  değeri  $6,143 \pm 0,051$ ;  $pK_{a3}$  değeri  $7,543 \pm 0,029$ 'dir.



Şekil 4.24. % 40 THF ortamında Rosiglitazon Maleat için PKPOT grafiği

Grafiksel metotla hesaplama yönteminde pH'ya karşı  $3-\bar{n}$  grafiği çizildiğinde pH ekseninde 0,5; 1,5 ve 2,5 değerlerine karşılık gelen pH değerleri  $pK_{a1}$ ;  $pK_{a2}$  ve  $pK_{a3}$  değerlerini vermektedir (Şekil 4.25). Buna göre  $pK_{a1}$  değeri 4,801;  $pK_{a2}$  değeri 6,151;  $pK_{a3}$  değeri ise 7,607 olarak hesaplanmıştır.



Şekil 4.25. % 40 THF ortamında Rosiglitazon Maleat için pH  $-(3-\bar{n})$  grafiği

Bu bileşiğin % 45, % 50, % 55 ve % 60 THF-su ortamında yapılan potansiyometrik titrasyon verileri, % 40 THF-su ortamında yapılanlara benzer şekilde hesaplanmıştır.

#### 4.4. Sülfonilürelerin Sıvı Kromatografi Yöntemiyle İyonlaşma Sabiti Tayini

##### 4.4.1. Glibenklamidin sıvı kromatografi yöntemiyle iyonlaşma sabiti tayini

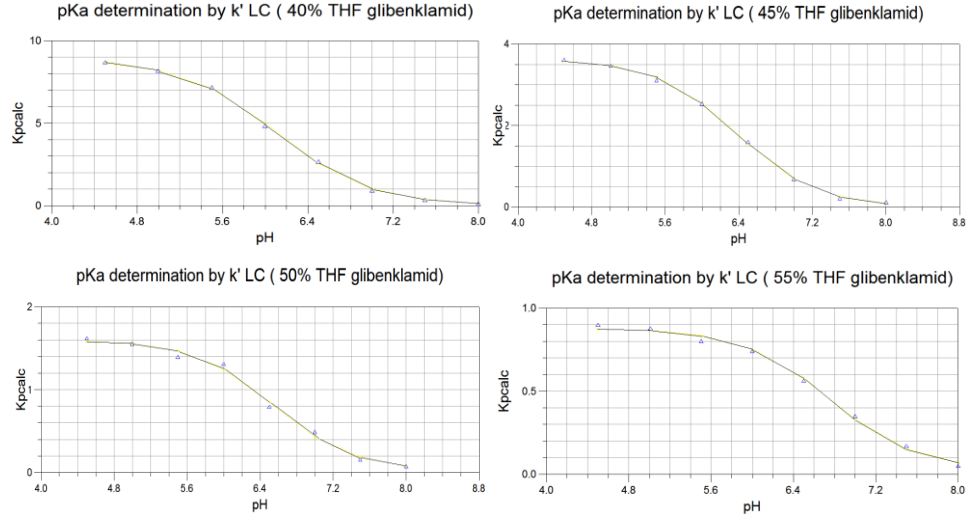
Bu tez çalışmasında glibenklamidin iyonlaşma sabitlerinin tayini, 15 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> içeren % 40; 45; 50; ve 55 (v/v) tetrahidrofuran-su ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Her bir tetrahidrofuran-su ikili karışımında farklı pH değerleri 2,5; 3,0; 3,5; 3,75; 4,0; 4,25; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 6,75; 7,0; 7,25; 7,5; 7,75; 8,0; 8,25; 8,5; 8,75 olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Bileşiğe ait pK<sub>a</sub> değerleri, kapasite faktörü ile pH arasındaki ilişki kullanılarak doğrusal olmayan modeli esas alan NLREG programıyla hesaplanmıştır. Her bir kapasite faktörünün hesaplanmasında kolonda tutunmayan türe özgü t<sub>0</sub> alıkonma zamanının belirlenmesi için urasil kullanılmıştır.

Glibenklamid için farklı pH' larda ve dört farklı koşulda elde edilen kapasite faktörleri, Çizelge 4.7'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Glibenklamidin % 40; 45; 50; ve 55 (v/v) tetrahidrofuran-su ortamında kapasite faktörleri değerleri

pH	% 40 THF	% 45 THF	% 50 THF	% 55 THF
	k	k	k	k
2,5	6,751	3,915	0,429	0,925
3	7,072	3,347	1,658	0,899
3,5	6,153	3,290	1,704	0,869
3,75	6,169	3,285	1,683	0,860
4	6,439	3,226	1,691	0,957
4,25	7,111	3,300	1,753	0,854
4,5	8,293	3,635	1,542	0,873
5	6,823	3,235	1,491	0,830
5,5	4,125	2,633	1,152	0,781
6	1,917	1,746	0,634	0,563
6,5	0,586	0,490	0,204	0,174
6,75	0,334	0,305	0,053	0,048
7	0,226	0,181	0,007	-0,005
7,25	0,180	0,240	-0,008	-0,035
7,5	0,179	0,047	-0,001	-0,048
7,75	0,211	0,063	0,032	-0,039
8	0,191	0,070	0,050	0,000
8,25	0,245	0,136	0,092	0,008
8,5	0,283	0,162	0,120	0,032
8,75	0,270	0,153	0,101	0,055

Glibenklamid için bu dört farklı koşulda pH –k ilişkisini gösteren grafikler non lineer regresyon (NLREG) programı kullanılarak çizilmiştir (Şekil 4.26). Şekillerde çizgi, teorik davranışı göstermektedir. Noktalar ise deneysel sonuçlara aittir.



Şekil 4.26. Glibenklamidin % 40, 45, 50 ve 55 THF-su ortamındaki NLREG grafikleri

#### 4.4.2. Glimepiridin sıvı kromatografi yöntemiyle iyonlaşma sabiti tayini

Bu tez çalışmasında glimepiridin iyonlaşma sabitlerinin tayini, 15 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> içeren % 40; 45; 50; ve 55 (v/v) tetrahidrofur-an-su ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Her bir tetrahidrofur-an-su ikili karışımında farklı pH değerleri 2,5; 3,0; 3,5; 3,75; 4,0; 4,25; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 6,75; 7,0; 7,25; 7,5; 7,75; 8,0; 8,25; 8,5; 8,75 olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Bileşiğe ait pK<sub>a</sub> değerleri, kapasite faktörü ile pH arasındaki ilişki kullanılarak doğrusal olmayan modeli esas alan NLREG programıyla hesaplanmıştır. Her bir kapasite faktörünün hesaplanmasında kolonda tutunmayan türe özgü t<sub>0</sub> alıkonma zamanının belirlenmesi için urasil kullanılmıştır.

Glimepiridin için farklı pH' larda ve dört farklı koşulda elde edilen kapasite faktörleri, Çizelge 4.8'de verilmiştir.

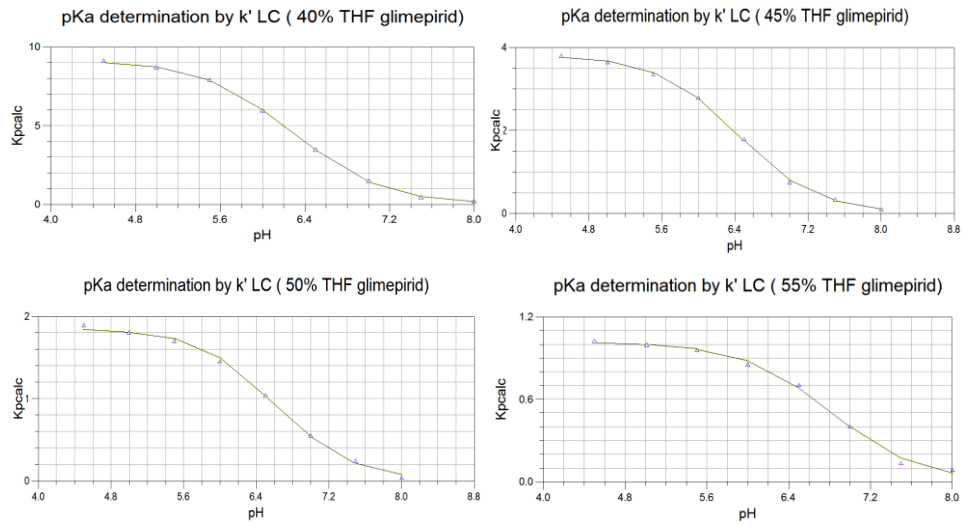
Çizelge 4.8. Glimepiridin % 40; 45; 50; ve 55 (v/v) tetrahidrofur-an-su ortamında kapasite faktörleri değerleri

pH	% 40 THF	% 45 THF	% 50 THF	% 55 THF
	k	k	k	k
2,5	7,246	4,280	0,497	1,054
3	7,587	3,633	1,851	1,030
3,5	6,627	3,585	1,899	0,986
3,75	6,619	3,586	1,883	0,983
4	6,986	3,519	1,891	1,092
4,25	7,897	3,605	1,973	0,983
4,5	9,100	3,968	1,738	0,997
5	7,647	3,605	1,716	0,968

Çizelge 4.8. Glibepridin % 40; 45; 50; ve 55 (v/v) tetrahidrofuran-su ortamında kapasite faktörleri değerleri (Devam)

pH	% 40 THF	% 45 THF	% 50 THF	% 55 THF
	k	k	k	k
5,5	4,917	3,084	1,411	0,932
6	2,527	2,197	0,885	0,737
6,5	0,774	0,692	0,334	0,293
6,75	0,428	0,434	0,115	0,116
7	0,259	0,240	0,043	0,033
7,25	0,179	0,266	0,000	-0,025
7,5	0,166	0,053	0,006	-0,039
7,75	0,193	0,063	0,047	-0,027
8	0,171	0,064	0,047	0,015
8,25	0,227	0,121	0,102	0,021
8,5	0,252	0,149	0,119	0,040
8,75	0,252	0,141	0,101	0,060

Glibenklamid için bu dört farklı koşulda pH –k ilişkisini gösteren grafikler non lineer regresyon (NLREG) programı kullanılarak çizilmiştir (Şekil 4.27). Şekillerde çizgi, teorik davranışı göstermektedir. Noktalar ise deneysel sonuçlara aittir.



Şekil 4.27. Glibepridin % 40, 45, 50 ve 55 THF-su ortamındaki NLREG grafikleri

#### 4.4.3. Gliklazidin sıvı kromatografi yöntemiyle iyonlaşma sabiti tayini

Bu tez çalışmasında gliklazidin iyonlaşma sabitlerinin tayini, 15 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> içeren % 40; 45; 50; ve 55 (v/v) tetrahidrofuran-su ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Her bir tetrahidrofuran-su ikili karışımında farklı pH değerleri 2,5; 3,0; 3,5; 3,75; 4,0; 4,25; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 6,75; 7,0; 7,25; 7,5; 7,75; 8,0; 8,25; 8,5; 8,75 olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Bileşiğe ait pK<sub>a</sub> değerleri, kapasite faktörü ile pH arasındaki ilişki kullanılarak doğrusal olmayan modeli esas alan NLREG programıyla hesaplanmıştır.

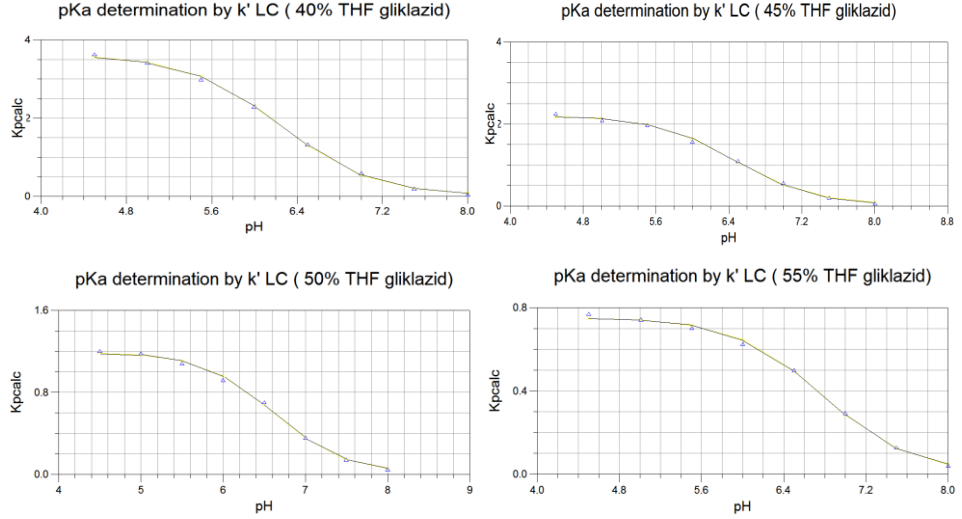
Her bir kapasite faktörünün hesaplanmasında kolonda tutunmayan türe özgü  $t_0$  alıkonma zamanının belirlenmesi için urasil kullanılmıştır.

Gliklazidin için farklı pH' larda ve dört farklı koşulda elde edilen kapasite faktörleri, Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Gliklazidin % 40; 45; 50; ve 55 (v/v) tetrahidrofuran-su ortamında kapasite faktörleri değerleri

pH	% 40 THF	% 45 THF	% 50 THF	% 55 THF
	k	k	k	k
2,5	3,288	2,261	0,432	0,778
3	3,411	2,014	1,207	0,765
3,5	3,117	2,004	1,241	0,743
3,75	3,120	2,009	1,239	0,741
4	3,225	1,971	1,245	0,813
4,25	3,393	2,019	1,285	0,752
4,5	3,778	2,163	1,161	0,744
5	3,229	1,965	1,133	0,734
5,5	2,164	1,684	0,923	0,681
6	1,076	1,171	0,555	0,529
6,5	0,294	0,313	0,181	0,190
6,75	0,135	0,177	0,038	0,064
7	0,076	0,062	-0,009	-0,003
7,25	0,025	0,038	-0,033	-0,045
7,5	0,029	-0,022	-0,025	-0,048
7,75	0,052	-0,005	0,007	-0,055
8	0,066	0,000	0,018	-0,017
8,25	0,071	0,049	0,056	0,009
8,5	0,115	0,077	0,082	0,022
8,75	0,118	0,074	0,065	0,037

Gliklazid için bu dört farklı koşulda pH –k ilişkisini gösteren grafikler non lineer regresyon (NLREG) programı kullanılarak çizilmiştir (Şekil 4.28). Şekillerde çizgi, teorik davranışı göstermektedir. Noktalar ise deneysel sonuçlara aittir.



Şekil 4.28. Gliklazidin % 40, 45, 50ve 55 THF-su ortamındaki NLREG grafikleri

#### 4.4.4. Glipizidin sıvı kromatografi yöntemiyle iyonlaşma sabiti tayini

Bu tez çalışmasında glipizidin iyonlaşma sabitlerinin tayini, 15 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> içeren % 40; 45; 50; ve 55 (v/v) tetrahidrofur-an-su ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Her bir tetrahidrofur-an-su ikili karışımında farklı pH değerleri 2,5; 3,0; 3,5; 3,75; 4,0; 4,25; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 6,75; 7,0; 7,25; 7,5; 7,75; 8,0; 8,25; 8,5; 8,75 olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Bileşiğe ait pK<sub>a</sub> değerleri, kapasite faktörü ile pH arasındaki ilişki kullanılarak doğrusal olmayan modeli esas alan NLREG programıyla hesaplanmıştır. Her bir kapasite faktörünün hesaplanmasında kolonda tutunmayan türe özgü t<sub>0</sub> alıkonma zamanının belirlenmesi için urasil kullanılmıştır.

Glipizidin için farklı pH' larda ve dört farklı koşulda elde edilen kapasite faktörleri, Çizelge 4.10'da verilmiştir.

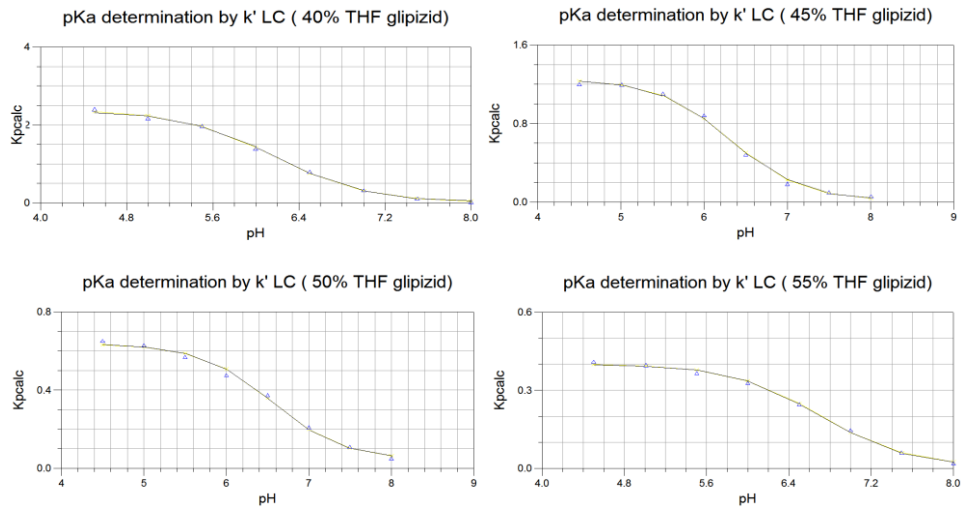
Çizelge 4.10. Glipizidin % 40; 45; 50; ve 55 (v/v) tetrahidrofur-an-su ortamında kapasite faktörleri değerleri

pH	% 40 THF	% 45 THF	% 50 THF	% 55 THF
	k	k	k	k
2,5	1,865	1,258	0,200	0,405
3	1,927	1,111	0,644	0,394
3,5	1,761	1,116	0,666	0,388
3,75	1,766	1,114	0,666	0,391
4	1,825	1,093	0,670	0,426
4,25	1,934	1,119	0,690	0,399
4,5	2,167	1,211	0,619	0,390
5	1,817	1,080	0,594	0,379

Çizelge 4.10. Glipizidin % 40; 45; 50; ve 55 (v/v) tetrahidrofuran-su ortamında kapasite faktörleri değerleri (Devam)

pH	% 40 THF	% 45 THF	% 50 THF	% 55 THF
	k	k	k	k
5,5	1,191	0,903	0,460	0,350
6	0,563	0,601	0,245	0,246
6,5	0,113	0,128	0,046	0,047
6,75	0,066	0,049	-0,028	-0,024
7	0,006	0,002	-0,053	-0,053
7,25	-0,016	-0,003	-0,060	-0,072
7,5	0,004	-0,052	-0,058	-0,078
7,75	0,020	-0,028	-0,014	-0,077
8	0,036	-0,023	0,006	-0,031
8,25	0,056	0,033	0,056	-0,018
8,5	0,103	0,068	0,071	0,005
8,75	0,108	0,064	0,060	0,028

Glipizid için bu dört farklı koşulda pH –k ilişkisini gösteren grafikler non lineer regresyon (NLREG) programı kullanılarak çizilmiştir (Şekil 4.29). Şekillerde çizgi, teorik davranışı göstermektedir. Noktalar ise deneysel sonuçlara aittir.



Şekil 4.29. Glipizidin % 40, 45, 50ve 55 THF-su ortamındaki NLREG grafikleri

## 4.5. Tiyazolidindionların Sıvı Kromatografi Yöntemiyle İyonlaşma Sabiti Tayini

### 4.5.1. Rosiglitazon Maleatın sıvı kromatografi yöntemiyle iyonlaşma sabiti tayini

Bu tez çalışmasında rosiglitazon maleatın iyonlaşma sabitlerinin tayini, 15 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> içeren % 40; 45; 50; ve 55 (v/v) tetrahidrofuran-su ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Her bir tetrahidrofuran-su ikili karışımında farklı pH değerleri 2,5; 3,0; 3,5; 3,75; 4,0; 4,25; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 6,75; 7,0; 7,25; 7,5; 7,75; 8,0;



8,25; 8,5; 8,75 olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Bileşiğe ait  $pK_a$  değerleri, kapasite faktörü ile pH arasındaki ilişki kullanılarak doğrusal olmayan modeli esas alan NLREG programıyla hesaplanmıştır. Her bir kapasite faktörünün hesaplanmasında kolonda tutunmayan türe özgü  $t_0$  alıkonma zamanının belirlenmesi için urasil kullanılmıştır.

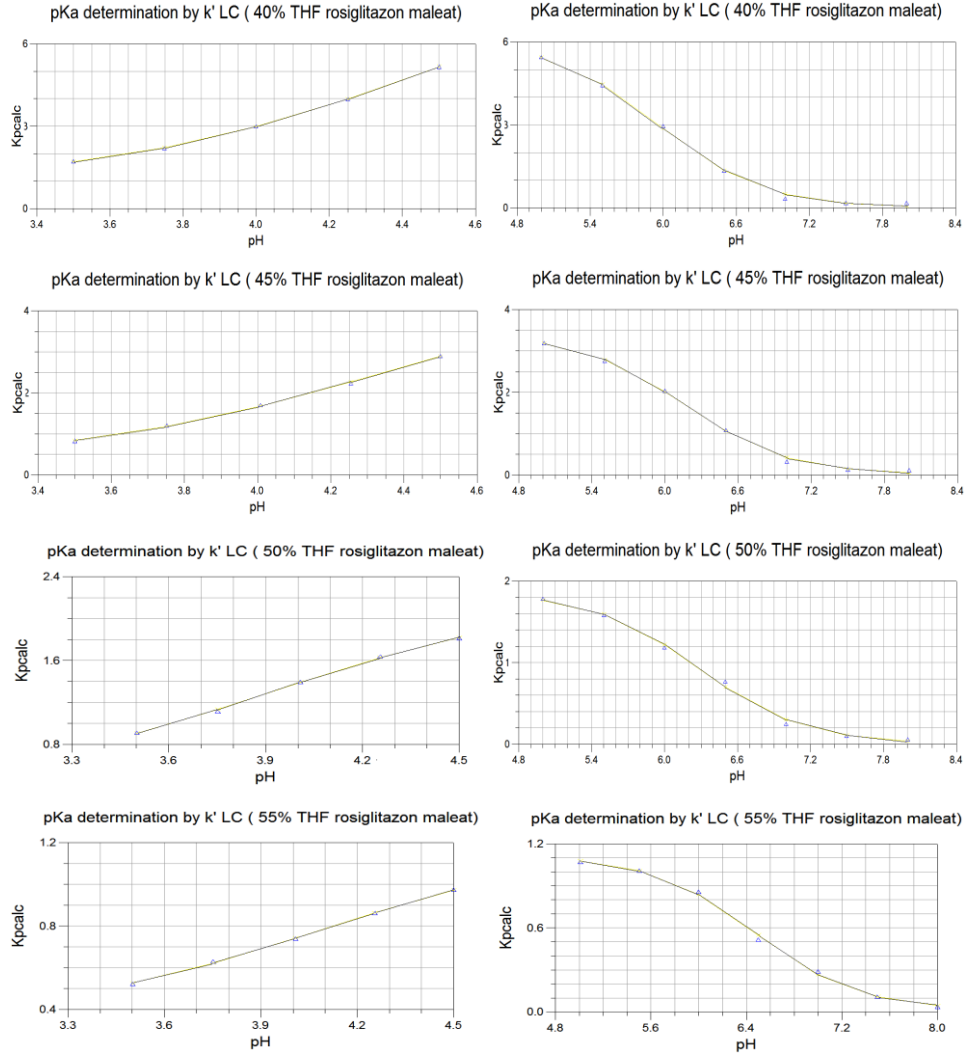
Rosiglitazon Maleat için farklı pH' larda ve dört farklı koşulda elde edilen kapasite faktörleri, Çizelge 4.11'de verilmiştir.

Çizelge 4.11. Rosiglitazon Maleatın % 40; 45; 50; ve 55 (v/v) tetrahidrofuran-su ortamında kapasite faktörleri değerleri

pH	% 40 THF	% 45 THF	% 50 THF	% 55 THF
	k	k	k	K
2,5	1,312	0,796	0,948	0,863
3	1,137	0,571	0,678	0,757
3,5	1,604	0,647	0,800	0,612
3,75	1,766	1,272	1,116	0,636
4	3,063	1,701	1,122	0,746
4,25	3,861	2,232	1,646	0,862
4,5	5,035	2,728	1,619	0,968
5	5,314	3,154	1,715	1,045
5,5	4,371	2,984	1,519	1,011
6	2,719	2,353	1,056	0,866
6,5	1,012	0,878	0,453	0,391
6,75	0,556	0,564	0,176	0,193
7	0,323	0,318	0,056	0,063
7,25	0,221	0,311	0,008	0,000
7,5	0,182	0,062	0,007	-0,031
7,75	0,199	0,061	0,047	-0,035
8	0,191	0,067	0,049	0,016
8,25	0,233	0,120	0,093	0,020
8,5	0,259	0,148	0,116	0,045
8,75	0,255	0,126	0,104	0,058

Rosiglitazon Maleat için bu dört farklı koşulda pH –k ilişkisini gösteren grafikler non lineer regresyon (NLREG) programı kullanılarak çizilmiştir (Şekil 4.30). Şekillerde çizgi, teorik davranışı göstermektedir. Noktalar ise deneysel sonuçlara aittir.

Rosiglitazon Maleat'ın 3. protonasyon sabiti ( $pK_{a3}$ ), çalışmada kullanılan kolonun pH aralığı yeterli olmadığı için tayin edilememiştir.



Şekil 4.30. Rosiglitazon Maleat % 40, 45, 50ve 55 THF-su ortamındaki NLREG grafikleri

#### 4.5.2. Pioglitazon HCl'nin sıvı kromatografi yöntemiyle iyonlaşma sabiti tayini

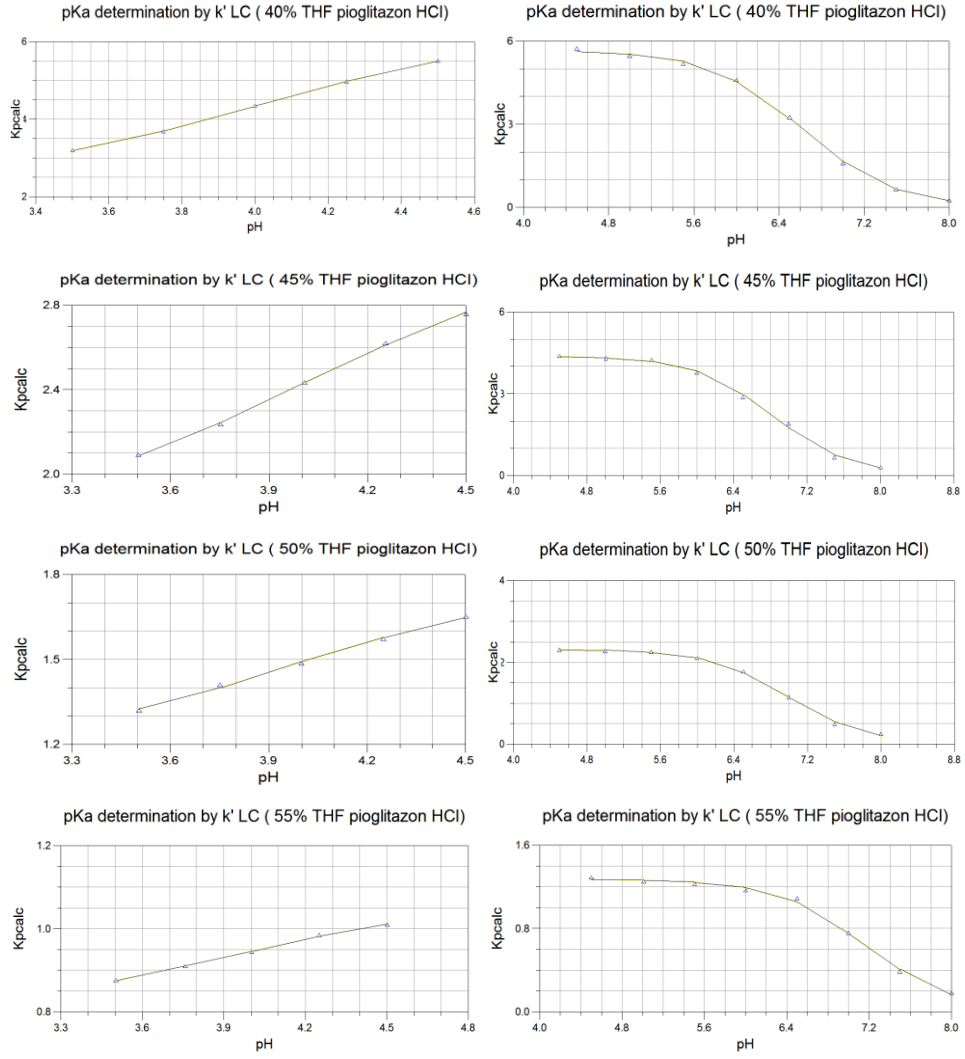
Bu tez çalışmasında pioglitazon HCl'nin iyonlaşma sabitlerinin tayini, 15 mM H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> içeren % 40; 45; 50; ve 55 (v/v) tetrahidrofuran-su ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Her bir tetrahidrofuran-su ikili karışımında farklı pH değerleri 2,5; 3,0; 3,5; 3,75; 4,0; 4,25; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 6,75; 7,0; 7,25; 7,5; 7,75; 8,0; 8,25; 8,5; 8,75 olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Bileşiğe ait pK<sub>a</sub> değerleri, kapasite faktörü ile pH arasındaki ilişki kullanılarak doğrusal olmayan modeli esas alan NLREG programıyla hesaplanmıştır. Her bir kapasite faktörünün hesaplanmasında kolonda tutunmayan türe özgü t<sub>0</sub> alıkonma zamanının belirlenmesi için urasil kullanılmıştır.

Pioglitazon HCl için farklı pH' larda ve dört farklı koşulda elde edilen kapasite faktörleri, Çizelge 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.12. Pioglitazon HCl'nin % 40; 45; 50; ve 55 (v/v) tetrahidrofurana ortamında kapasite faktörleri değerleri

pH	% 40 THF	% 45 THF	% 50 THF	% 55 THF
	k	k	k	k
2,5	1,921	1,116	0,979	1,045
3	2,245	1,064	1,075	0,934
3,5	3,228	1,506	1,304	0,816
3,75	3,785	2,242	1,483	0,830
4	4,351	2,430	1,490	0,855
4,25	4,776	2,661	1,648	0,895
4,5	5,662	2,958	1,504	0,914
5	5,062	2,822	1,517	0,912
5,5	3,840	2,566	1,297	0,876
6	2,342	1,991	0,892	0,730
6,5	0,836	0,731	0,381	0,339
6,75	0,458	0,476	0,132	0,149
7	0,263	0,253	0,043	0,044
7,25	0,166	0,256	-0,003	-0,020
7,5	0,144	0,048	0,000	-0,040
7,75	0,164	0,055	0,038	-0,027
8	0,166	0,064	0,040	0,013
8,25	0,203	0,109	0,090	0,018
8,5	0,228	0,138	0,109	0,036
8,75	0,233	0,117	0,088	0,058

Pioglitazon HCl için bu dört farklı koşulda pH –k ilişkisini gösteren grafikler non lineer regresyon (NLREG) programı kullanılarak çizilmiştir (Şekil 4.31).



Şekil 4.31. Pioglitazon HCl % 40, 45, 50 ve 55 THF-su ortamındaki NLREG grafikleri

#### 4.6. Kromatografik Ayırmanın Optimizasyonu

Bu çalışmada, sülfonilüre ve tiyazolidindion grubu bileşiklerin dört farklı koşulda  $pK_a$  tayinleri sıvı kromatografi yöntemiyle yapılmıştır. Bileşiklerin pik simetrisi ve alıkonma davranışları incelendiğinde YMC J'Sphere ODS-H80 (4  $\mu$ m, 150 mm x 4,6 mm ID), kolon tercih edilmiştir. Bu tez çalışmasında bileşiklerin alıkonma zamanları ve pik simetrisi göz önüne alınarak mobil faz organik modifiyeri olarak tetrahidrofuran tercih edilmiştir. Bileşiklerin  $pK_a$  tayinleri % 40, 45, 50 ve 55 (v/v) tetrahidrofuran ortamında tayin edilmiştir. Çalışılan mobil fazlara 15 mM fosforik asit olacak şekilde derişik fosforik asit ilave edilmiş ve NaOH ilavesi ile mobil faz pH'sı, 2,5- 8,75 arasında farklı değerlere ayarlanmıştır. Çalışmada enjeksiyon hacmi 20  $\mu$ L, akış hızı 1 mL/dakika ve kolon sıcaklığı 30  $^{\circ}$ C'dir.

Kromatografik ayırmada piklerin birbirinden ayrılabilmesi için  $\alpha$  değerinin 1,15 olması yanında  $R_s$  değerinin 2 ve daha büyük olması gerekmektedir. Bu tez çalışmasında % 40, % 45, % 50 ve % 55 olacak şekilde dört farklı koşulda 20 farklı pH değerlerindeki kapasite faktörü, seçicilik faktörü ve ayırma gücü değerleri incelendiğinde numune çalışması için % 40 THF (v/v), pH 4,5' ta kapasite faktörlerinin 1' den daha büyük olduğu ve bileşik çiftleri için  $\alpha$  değerlerinin 1,15' den büyük olduğu belirlenmiştir ve numune çalışması için uygun koşul olduğuna karar verilmiştir.

#### **4.7. Numune Çalışması**

Geliştirilen yöntemin validasyon çalışmalarında; yöntemin duyarlılığı, kesinliliği, doğruluğu incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır (ICH, 1994).

##### **4.7.1. İç standartın belirlenmesi**

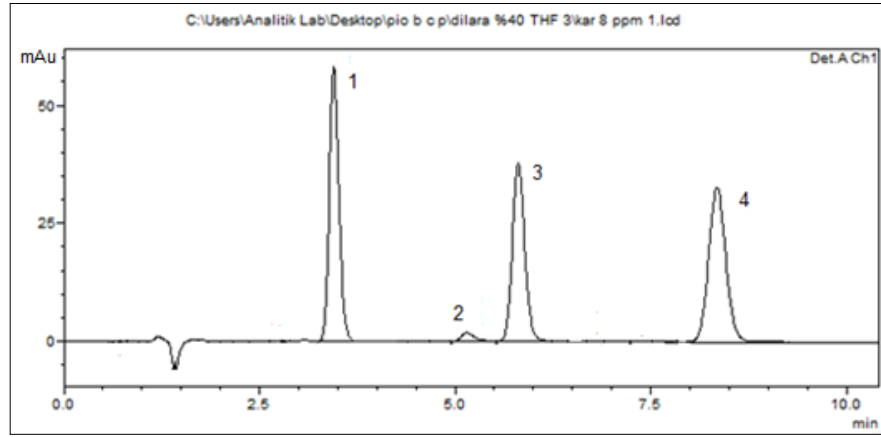
İç standart, analizde belirli miktarda numuneye, kalibrasyon standartlarına eklenen maddedir. Ayrıca kalibrasyon fonksiyonunun hazırlanmasında ve numune hazırlık işlemlerinde derişimi sabit tutulmaktadır. İç standart uygun seçilirse, hem sistematik hem de rastgele hatalar giderilebilir. Glibenklamid, glipizid, ve pioglitazon HCl analizi sırasında kullanılacak iç standart seçimi için seçicilik, ayırma gücü ve analiz süresi göz önüne alınarak iç standart olarak rosiglitazon maleat seçilmiştir. Rosiglitazon maleat çalışılan tiyazolidindion grubuna ait bir bileşiktir.

##### **4.7.2. Sistem uygunluk testi sonuçları**

Sistem Uygunluk Testleri (SUT), Food Drug Administration (FDA) ve United States Pharmacopeia (USP) tarafından önerilen ve sıvı kromatografisi ve diğer ayırma tekniklerinde yöntem geliştirmenin bir parçasını oluşturan testlerdir. Bu tez çalışmasında belirlenen optimum koşul için sistem uygunluk testleri gerçekleştirilmiştir. Bölüm 3.3.2.8' de belirtildiği gibi belirli derişimlerde hazırlanan çözeltilerin sisteme enjeksiyonundan sonra kromatografik parametreler hesaplanmıştır (Çizelge 4.13). Ayırmanın kromatogramı Şekil 4.32' de verilmiştir.

Çizelge 4.13. Sistem uygunluk parametreleri

Parametreler	Gözlenen Değerler				Önerilen Değerler
	Glipizid	Rosiglitazon Maleat (IS)	Pioglitazon HCl	Glibenklamid	
tr	3,475	5,154	5,829	8,507	
Asimetri Faktörü (A)	1,199	1,097	1,146	1,102	0,95-1,20
k	1,599	2,855	3,359	5,363	>1
R <sub>s</sub>		5,228	2,256	6,468	>2
Tabaka Sayısı	3364,378	4187,428	6103,968	6749,876	>2000
A		1,785	1,177	1,596	>1
RSD (tr)	0,035	0,043	0,061	0,083	≤1
RSD(alan)	0,788	0,546	0,784	0,983	≤1

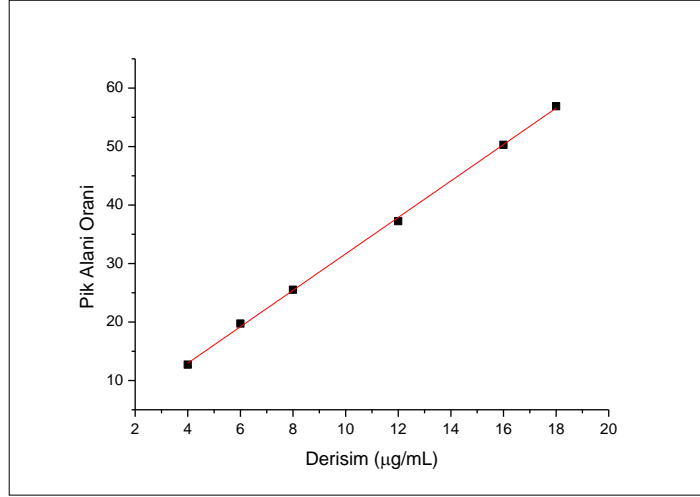


Şekil 4.32. Standart karışımın 230 nm’de alınan kromatogramı.1) Glipizid (8 µg/mL), 2) Rosiglitazon Maleat (0,3 µg/mL), 3) Pioglitazon HCl (8 µg/mL), 4) Glibenklamid (8 µg/mL)

#### 4.7.3. Glibenklamidin yüksek performans sıvı kromatografiyle analiz yönteminin validasyonu

Glibenklamid’in yüksek performans sıvı kromatografi yöntemiyle analizinde ve kalibrasyon fonksiyonunun doğrusal aralığının belirlenmesinde 18 µg/mL ile 4 µg/mL arasında farklı derişimlerde çözeltiler hazırlanmıştır. Kalibrasyon fonksiyonu, her bir derişim değeri için glibenklamidin pik alanının, rosiglitazon maleatın (iç standart) pik alanına oranının, glibenklamidin derişimine karşı işaretlenmesiyle oluşturulmuştur (Şekil 4.33). Grafik, glibenklamid için 18 µg/mL ile 4 µg/mL konsantrasyon aralıkları üzerinden altı noktali kalibrasyon eğrileri oluşturuldu ve doğrusal olduğu gözlemlendi. Lineer ve 2. derece kalibrasyonlarının artık standart

sapmaları karşılaştırılmış ve bu sonuç doğrulanmıştır. Glibenklamid'in analizi için doğrusal kalibrasyon fonksiyonu, teşhis sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) değerleri, Çizelge 4.14' de verilmiştir.



Şekil 4.33. Glibenklamid'in analizine ait doğrusal grafik

Çizelge 4.14. Glibenklamid'in analizine ait doğrusal kalibrasyon fonksiyon verileri (n=6)

Regresyon Denklemi	$y = 3,115x - 0,512$
Eğimin Standart Hatası	0,037
Kesimin Standart Hatası	0,441
Korelasyon Katsayısı (r)	0,999
Kalibrasyon Aralığı (µg/mL)	4 - 18
Standart Sapma (SD)	0,467
Teşhis Sınırı (LOD) (µg/mL)	0,495
Tayin Alt Sınırı (LOQ) (µg/mL)	1,501

Bir kalibrasyon fonksiyonunda kesim için alt ve üst güven sınırları Eşitlik 4.1 ile hesaplanmış ve güven sınırları sıfır değerini içine alıp almadığına bakılmıştır.

$$\text{Kesimin güven aralığı: } a \pm t_{(n-2)}s_a \quad (4.1)$$

Burada;

$t_{(n-2)}$ : % 95 güven seviyesinde serbestlik derecesi; a: kesim değeri;  $s_a$ : kesim değerinin standart sapmasıdır). Bu çalışmada  $s_a = 0,441$  dir. % 95 güven seviyesi için  $t_{(n-2)} = 4$  için 2,78 dir. Kesim için güven aralığı  $-0,512 \pm 0,441 \times 2,78 = -0,512 \pm 1,226$  olup kesimin güven aralığı (0,714)-(-1,738) 0 değerini içine almaktadır.

Glibenklamidin tayini için kesinlik çalışmaları, 4 µg/mL ve 18 µg/mL derişimlerinde gerçekleştirilmiştir. Gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları, Çizelge 4.15’de verilmiştir.

Gün içi çalışmalar iki farklı derişim düzeyinde ve beş bağımsız çözelti kullanılarak aynı gün içerisinde, günler arası çalışmalar ise iki farklı derişim düzeyinde beş bağımsız çözelti kullanılarak üç ayrı günde yapılmıştır.

Çizelge 4.15. Glibenklamidin analiz yöntemine ait gün içi ve günler arası analiz bulguları

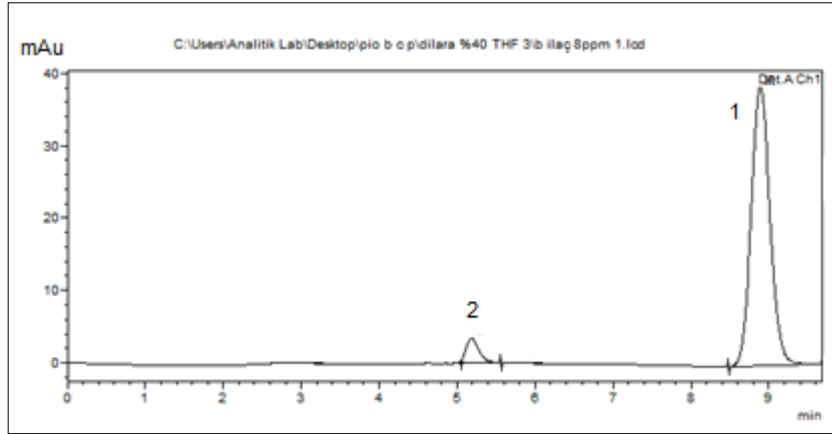
	Teorik derişim (µg/mL)	Gün içi derişim ortalaması	% BSS (µg/mL)	Günler arası derişim ortalaması	% BSS (µg/mL)
Glibenklamid	8	7,995	0,068	7,998	0,115
	16	16,011	0,137	15,990	0,245

Glibenklamid tayini için geliştirilen yöntem piyasa preparatlarına uygulanmıştır. Glibenklamid içeren tablettten (Gliben) miktar tayini yapabilmek amacı ile Bölüm 3.2.1’de anlatıldığı şekilde tablet çözeltileri hazırlanmıştır. Yapılan analiz sonucunda okunan pik alan değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde değerlendirilerek tabletlerin içerdiği glibenklamid miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemle yapılan ve geri kazanma dikkate alınarak düzeltilen sonuçlar, Çizelge 4.16’da, kromatogramı ise Şekil 4.34’de verilmiştir.

Çizelge 4.16. Glibenklamid içeren Gliben (5 mg) tabletlerin analizine ait bulgular

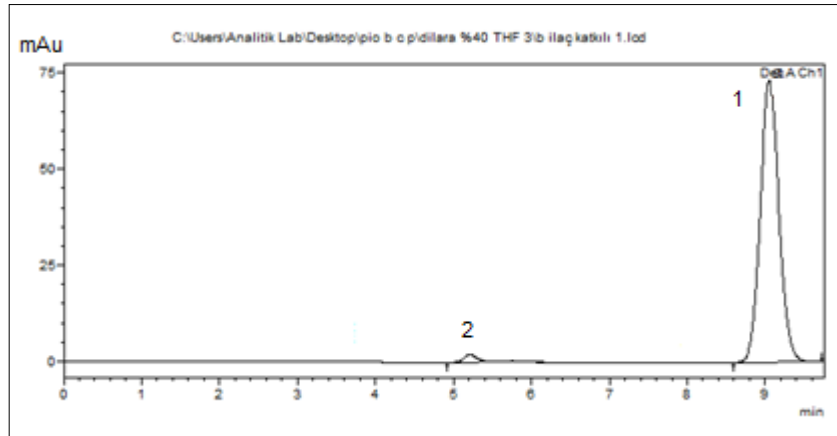
Numune No.	Tablette Bulunan Glibenklamid Miktarı (mg)	% Geri Kazanım
1	4,926	98,515
2	5,043	100,861
3	5,010	100,192
4	4,997	99,940
5	5,036	100,714
$X_{ort} \pm GS^*$	5,002 + 0,058	100,044
SS	0,047	0,934
%BSS	0,933	0,933
%Hata	-0,044	-0,044





Şekil 4.34. Glibenklamid içeren Gliben (5 mg) tabletlerin analiz yöntemine ait 230nm’de alınan kromatogram; 1) 8 µg/mL derişiminde glibenklamid ve 2) 0,3 µg/mL derişiminde rosiglitazon maleat (iç standart)

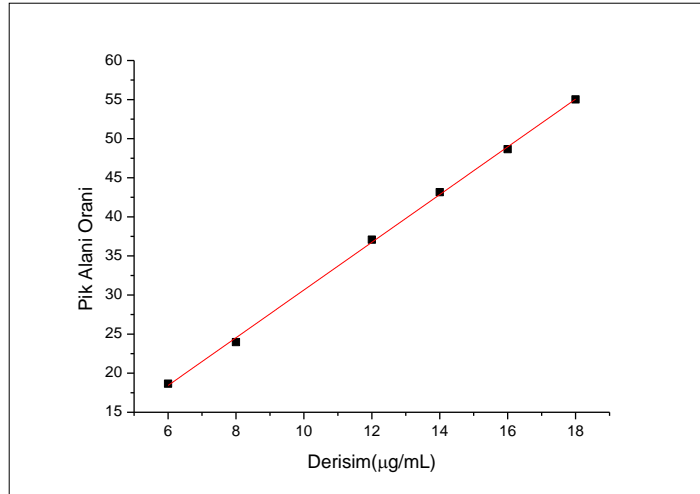
Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerin analiz yöntemi üzerindeki etkilerini inceleyebilmek için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Glibenklamid içeren tablet numunelerinin çözeltilerine 8 µg/mL derişiminde saf glibenklamid standartı ilave edilmiştir. Katkılı tablet numunesine ait kromatogram, Şekil 4.35’da verilmiştir. Hesaplamalar sonucunda geri kazanım bulunmuştur. Sonuçlar, Çizelge 4.16’da verilmiştir.



Şekil 4.35. Glibenklamid içeren Gliben (5 mg) tabletlerin analiz yöntemine ait kromatogram; (1) 16 µg/mL derişiminde glibenklamid ve (2) 0,3 µg/mL derişiminde rosiglitazon maleat (iç standart)

#### 4.7.4. Glipizidin yüksek performans sıvı kromatografiyle analiz yönteminin validasyonu

Glipizid'in yüksek performans sıvı kromatografi yöntemiyle analizinde ve kalibrasyon fonksiyonunun doğrusal aralığının belirlenmesinde 4 µg/mL ile 18 µg/mL arasında farklı derişimlerde çözeltiler hazırlanmıştır. Kalibrasyon fonksiyonu, her bir derişim değeri için glipizidin pik alanının, rosigitazon maleatın (iç standart) pik alanına oranının, glipizidin derişimine karşı işaretlenmesiyle oluşturulmuştur (Şekil 4.36). Grafik, glipizid için 6 µg/mL ile 18 µg/mL konsantrasyon aralıkları üzerinden altı noktalı kalibrasyon eğrileri oluşturuldu ve doğrusal olduğu gözlemlendi. Lineer ve 2. derece kalibrasyonlarının artık standart sapmaları karşılaştırılmış ve bu sonuç doğrulanmıştır. Glipizid'in analizi için doğrusal kalibrasyon fonksiyonu, teşhis sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) değerleri, Çizelge 4.17' de verilmiştir.



Şekil 4.36. Glipizid'in analizine ait doğrusal grafik

Çizelge 4.17. Glipizidin analizine ait doğrusal kalibrasyon fonksiyon verileri (n=6)

Regresyon Denklemi	$y = 3,052x - 0,116$
Eğimin Standart Hatası	0,039
Kesimin Standart Hatası	0,513
Korelasyon Katsayısı (r)	0,999
Kalibrasyon Aralığı (µg/mL)	6 - 18
Standart Sapma (SD)	0,408
Teşhis Sınırı LOD (µg/mL)	0,441
Tayin Alt Sınırı LOQ (µg/mL)	1,336

Kalibrasyon fonksiyonunun kesiminin güven aralığının ideal değer sıfırı içine alıp almadığı kontrol edilmiştir.

Bu çalışmada  $s_a = 0,513$  dir. % 95 güven seviyesi için  $t_{(n-2)} = 4$  için 2,78 dir.

Kesim için güven aralığı  $-0,116 \pm 0,513 \times 2,78 = -0,116 \pm 1,426$

Kesimin güven aralığı (1,310)-(-1,542) aralığını kapsıyor. Yani 0 değerini içine almaktadır.

Glipizidin tayini için kesinlik çalışmaları, 8 µg/mL ve 16 µg/mL derişimlerinde gerçekleştirilmiştir. Gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları, Çizelge 4.38'te verilmiştir.

Gün içi çalışmalar iki farklı derişim düzeyinde ve beş bağımsız çözelti kullanılarak aynı gün içerisinde, günler arası çalışmalar ise iki farklı derişim düzeyinde beş bağımsız çözelti kullanılarak üç ayrı günde yapılmıştır.

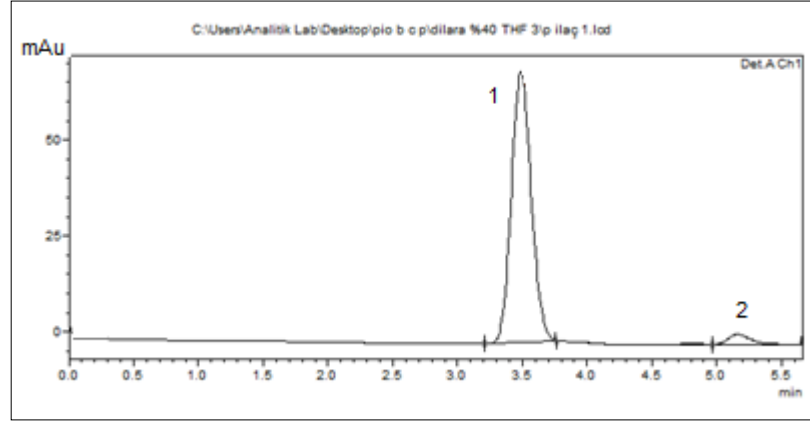
Çizelge 4.18. Glipizidin analiz yöntemine ait gün içi ve günler arası analiz bulguları

	Teorik derişim (µg/mL)	Gün içi derişim ortalaması	% BSS (µg/mL)	Günler arası derişim ortalaması	% BSS (µg/mL)
Glipizid	8	7,989	0,088	7,998	0,381
	16	16,026	0,549	15,997	0,810

Glipizidin tayini için geliştirilen yöntem piyasa preparatlarına uygulanmıştır. Glipizid içeren tabletten (Glucotrol, Pfizer) miktar tayini yapabilmek amacı ile yukarıda anlatıldığı şekilde tablet çözeltileri hazırlanmıştır. Yapılan analiz sonucunda okunan pik alan değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde değerlendirilerek tabletlerin içerdiği glipizidin miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemle yapılan ve geri kazanma dikkate alınarak düzeltilen sonuçlar, Çizelge 4.19'da, kromatogram ise Şekil 4.37'de verilmiştir.

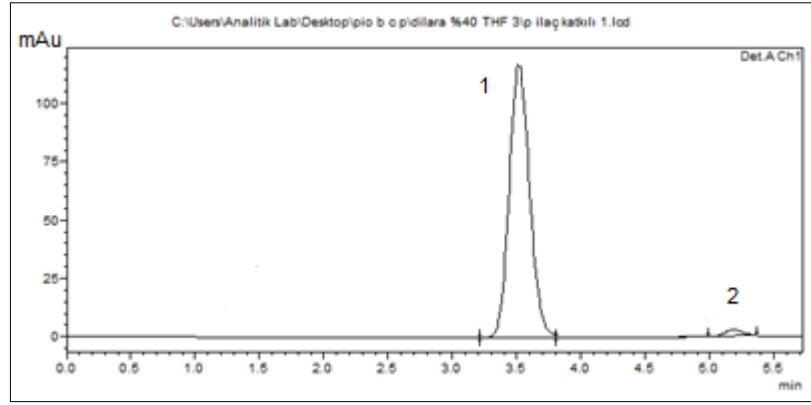
Çizelge 4.19. Glipizid içeren Glucotrol (2,5 mg) tabletlerin analizine ait bulgular ve % geri kazanım sonuçları

Numune No	Tablette Bulunan Glipizid Miktarı (mg)	% Geri Kazanım
1	2,510	100,383
2	2,502	100,080
3	2,486	99,421
4	2,501	100,020
5	2,525	101,019
$X_{ort} \pm GS^*$	$2,505 \pm 0,058$	100,185
SS	0,015	0,582
%BSS	0,581	0,581
%Hata	-0,185	-0,185



Şekil 4.37. Glipizid içeren Glucotrol (2,5 mg) tabletlerin analiz yöntemine ait 230 nm’de alınan kromatogram; 1) 8 µg/mL derişiminde Glipizid ve 2) 0,3 µg/mL derişiminde rosiglitazon maleat (iç standart)

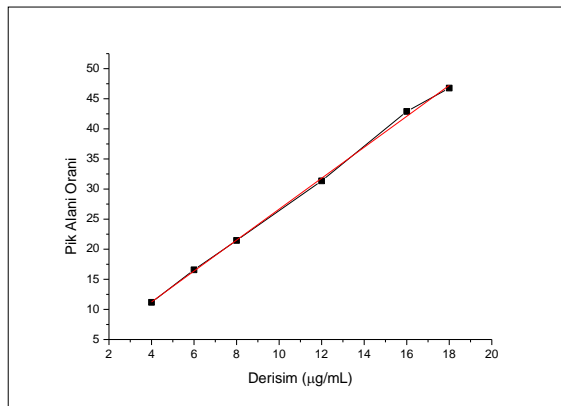
Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerin analiz yöntemi üzerindeki etkilerini inceleyebilmek için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Glipizid içeren tablet numunelerinin çözeltilerine 8 µg/mL derişiminde saf glipizid standartı ilave edilmiştir. Katkılı tablet numunesine ait kromatogram, Şekil 4.38’ de verilmiştir. Hesaplamalar sonucunda % geri kazanım bulunmuştur. Sonuçlar, Çizelge 4.19’da verilmiştir.



Şekil 4.38. 8 µg/mL derişiminde Glipizid standartı ilaveli tablet numunesine ait kromatogram; 1) 16 µg/mL derişiminde Glipizid ve 2) 0,3 µg/mL derişiminde rosiglitazon maleat (iç standart)

#### 4.7.5. Pioglitazon HCl'nin yüksek performans sıvı kromatografiyle analiz yönteminin validasyonu

Pioglitazon HCl'nin yüksek performans sıvı kromatografi yöntemiyle analizinde ve kalibrasyon fonksiyonunun doğrusal aralığının belirlenmesinde 4 µg/mL ile 18 µg/mL arasında farklı derişimlerde çözeltiler hazırlanmıştır. Kalibrasyon fonksiyonu, her bir derişim değeri için pioglitazon HCl'nin pik alanının, rosiglitazon maleatın (iç standart) pik alanına oranının, pioglitazon HCl'nin derişimine karşı işaretlenmesiyle oluşturulmuştur (Şekil 4.39). Grafik, Pioglitazon HCl için 4 µg/mL ile 18 µg/mL konsantrasyon aralıkları üzerinden altı noktalı kalibrasyon eğrileri oluşturuldu ve doğrusal olduğu gözlemlendi. Lineer ve 2. derece kalibrasyonlarının artık standart sapmaları karşılaştırılmış ve bu sonuç doğrulanmıştır. Pioglitazon HCl'nin analizi için doğrusal kalibrasyon fonksiyonu, teşhis sınırı (LOD) ve tayin alt sınırı (LOQ) değerleri, Çizelge 4.20' de verilmiştir.



Şekil 4.39. Pioglitazon HCl'nin analizine ait doğrusal grafik

Çizelge 4.20. Pioglitazon HCl'nin analizine ait doğrusal kalibrasyon fonksiyon verileri (n=6)

Regresyon Denklemi	$y = 2,571x - 0,954$
Eğimin Standart Hatası	0,042
Kesimin Standart Hatası	0,496
Korelasyon Katsayısı (r)	0,999
Kalibrasyon Aralığı ( $\mu\text{g/mL}$ )	4 - 18
Standart Sapma (SD)	0,525
Teşhis Sınırı ( $\mu\text{g/mL}$ )	0,674
Tayin Alt Sınırı ( $\mu\text{g/mL}$ )	2,044

Kalibrasyon fonksiyonunun kesiminin güven aralığının ideal değer sıfırı içine alıp almadığı kontrol edilmiştir.

Bu çalışmada  $s_a = 0,496$  dir. % 95 güven seviyesi için  $t_{(n-2)} = 4$  için 2,78 dir.

Kesim için güven aralığı  $-0,954 \pm 0,496 \times 2,78 = -0,954 \pm 1,379$

Kesimin güven aralığı (0,425)-(-2,333) aralığını kapsıyor. Yani 0 değerini içine almaktadır.

Pioglitazon HCl'nin tayini için kesinlik çalışmaları, 8  $\mu\text{g/mL}$  ve 16  $\mu\text{g/mL}$  derişimlerinde gerçekleştirilmiştir. Gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları, Çizelge 4.21'de verilmiştir.

Gün içi çalışmalar iki farklı derişim düzeyinde ve beş bağımsız çözelti kullanılarak aynı gün içerisinde, günler arası çalışmalar ise, iki farklı derişim düzeyinde beş bağımsız çözelti kullanılarak üç ayrı günde yapılmıştır.

Çizelge 4.21. Pioglitazon HCl'nin analiz yöntemine ait gün içi ve günler arası analiz bulguları

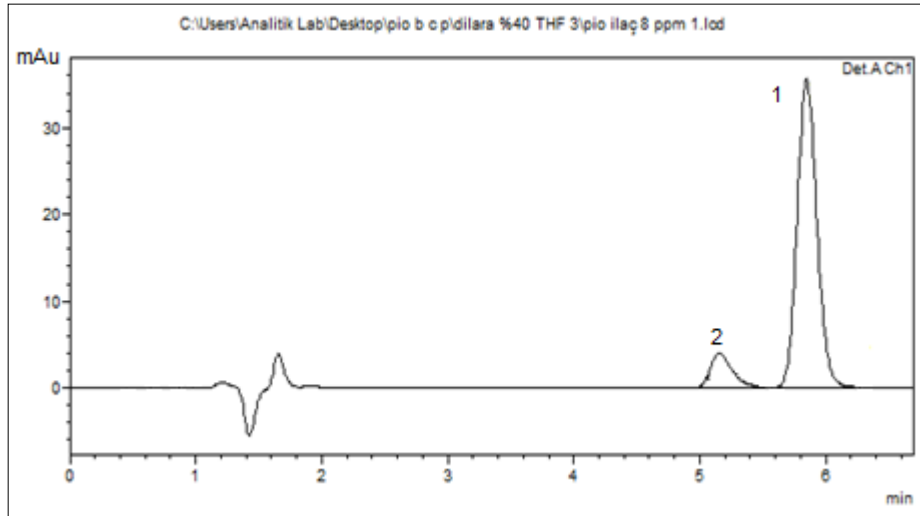
	Teorik derişim ( $\mu\text{g/mL}$ )	Gün içi derişim ortalaması	% BSS ( $\mu\text{g/mL}$ )	Günler arası derişim ortalaması	% BSS ( $\mu\text{g/mL}$ )
Pioglitazon	8	8,005	0,285	8,018	0,834
HCl	16	16,000	0,131	15,996	0,194

Pioglitazon HCl'nin tayini için geliştirilen yöntem piyasa preparatlarına uygulanmıştır. Pioglitazon HCl'nin çeren tabletten (Dropia, 15 mg) miktar tayini yapabilmek amacı ile Bölüm 3.2.1'de anlatıldığı gibi tablet çözeltileri hazırlanmıştır.

Yapılan analiz sonucunda okunan pik alan değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde değerlendirilerek tabletlerin içerdiği Pioglitazon HCl'nin miktarları hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntemle yapılan ve geri kazanım dikkate alınarak düzeltilen sonuçlar, Çizelge 4.22'de, kromatogram ise Şekil 4.40'da verilmiştir.

Çizelge 4.22. Pioglitazon HCl'nin içeren Dropia (15 mg) tabletlerin analizine ait bulgular ve % geri kazanım sonuçları

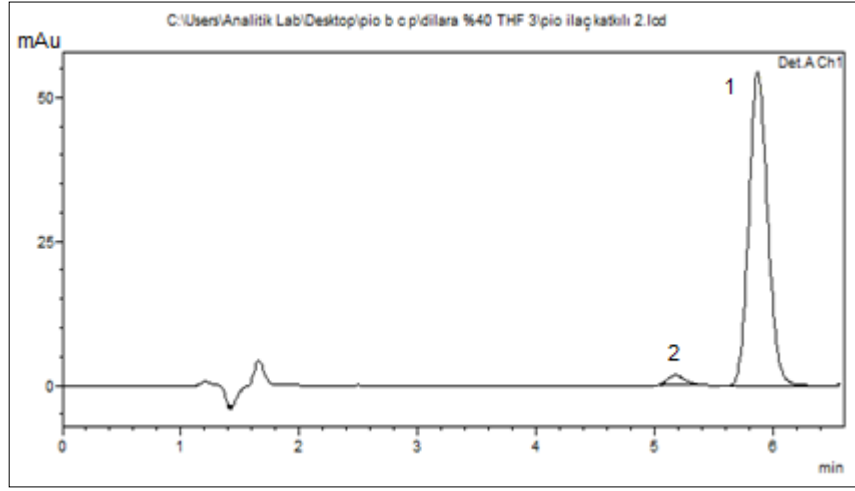
Numune No	Tablette Bulunan Pioglitazon HCl Miktarı (mg)	% Geri Kazanım
1	15,193	101,284
2	14,996	99,974
3	14,931	99,538
4	15,054	100,357
5	14,859	99,063
$X_{ort} \pm GS^*$	15,006 $\pm$ 0,158	100,043
SS	0,127	0,845
%BSS	0,845	0,845
%Hata	-0,043	-0,043



Şekil 4.40. Pioglitazon HCl içeren Dropia (15 mg) tabletlerin analiz yöntemine ait kromatogram; 1) 8 µg/mL derişiminde Pioglitazon HCl ve 2) 0,3 µg/mL derişiminde rosiglitazon maleat (iç standart)

Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerin analiz yöntemi üzerindeki etkilerini inceleyebilmek için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Pioglitazon HCl içeren tablet numunelerinin çözeltilerine 8 µg/mL derişiminde saf pioglitazon HCl standartı ilave edilmiştir. Katkılı tablet numunesine ait kromatogram, Şekil 4.41'de verilmiştir.

Hesaplamalar sonucunda % geri kazanım bulunmuştur. Sonuçlar, Çizelge 4.22’de verilmiştir.



Şekil 4.41. 8 µg/mL derişiminde Pioglitazon HCl standartı ilaveli tablet numunesine ait kromatogram; 1) 16 µg/mL derişiminde Pioglitazon HCl ve 2) 0,3 µg/mL derişiminde rosiglitazon maleat (iç standart)



## 5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada elektroanalitik yöntemlerden birisi olan potansiyometrik titrasyon yöntemi ve kromatografik yöntemlerden en çok tercih edilen ters faz sıvı kromatografi yöntemi kullanılarak sülfonilüre ve tiyazolidindion grubu ilaçlardan bazılarının  $pK_a$  sabiti tayini yapılmıştır. Yapılan literatür araştırmasında sülfonilüre ve tiyazolidindion grubu bileşiklerin  $pK_a$  tayini için yalnızca 1 literatür bulunmaktadır. Dolayısıyla bu önemli eksikliği gidermek için, bu çalışmada, bu bileşiklerin  $pK_a$  değerleri, hem potansiyometrik titrasyon yöntemiyle hem de ters faz sıvı kromatografik yöntemiyle su-tetrahidrofuran karışımlarında tayin edilmiştir.

### 5.1. Potansiyometrik Titrasyon Verilerinden Elde Edilen İyonlaşma Sabitleri

İyonlaşma sabitinin belirlenebilmesi için yapılan deneylerde öncelikle çözücü ortamı olarak metanol-su ortamı düşünülmüştür. Ancak bileşiklerin % 30 - % 60 arasında değişen metanol-su ortamında çözünürlük problemi nedeniyle asetonitril-su ortamına geçilmiştir. Ancak yine çözünürlükte sorun olması nedeniyle THF-su çözücü ortamına geçilmiştir. % 30 ve % 35 THF-su ortamında bazı bileşiklerin titrasyonunda çökme olduğu gözlenmiştir, o yüzden bütün bileşiklerin çözüldüğü ve titrasyon sırasında çökme gözlenmediği % 40 THF-su ortamından başlanarak % 45, % 50, % 55, % 60 THF-su ortamı olmak üzere 5 farklı ortamda çalışılmıştır. İyonlaşma sabitleri tayin edilmeden önce, kullanılan elektrokimyasal hücre, hidrojen iyonu derişimini ölçecek şekilde her bir ortam için kalibre edilmiştir. Bunun için 1 M standart KOH çözeltisi (titrisol), çalışılan THF-su ikili karışımında 0,03 M olacak şekilde seyreltilerek titrant olarak kullanılmıştır. Baz çözeltisi,  $2,0 \times 10^{-3}$  M KHP çözeltisi kullanılarak ayarlanmıştır. Tetrahidrofuran içeren sulu ortamlarda kullanılan cam elektrodun Nernst eğimi verecek şekilde davrandığı ve eğim değerlerinin yaklaşık 59 mV olduğu bulunmuştur. Böylece, bu elektrodun, söz konusu 5 ortam için iyonlaşma sabitlerinin tayininde kullanılabileceği sonucuna varılmıştır. Bileşiklerin standart çözeltileri,  $1,0 \times 10^{-3}$  M derişimde olacak şekilde tetrahidrofuran-su ikili karışımında 40 mL hazırlandı ve çözelti çift cidarlı hücreye alınarak  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$  sıcaklıkta potansiyometrik yöntemle titre edilmiştir.

Sülfonilüre grubuna ait S=O...H-N protonu için iyonlaşma sabitinin ( $pK_a$ ) değerlendirilmesinde PKPOT programı kullanılmıştır. PKPOT programı,  $pK_a$

hesaplamalarında kullanılan bilgisayar programıdır. Bu programda tahmini  $pK_a$  değerleri olarak literatürün su ortamı için verdiği değerler kullanılmıştır. Ayrıca bu programın yanında grafiksel yöntemlerden de yararlanılmıştır (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. Çalışılan sülfonilüre grubu bileşiklerin PKPOT ve grafiksel yöntem ile elde edilen  $pK_a$  değerleri

Bileşikler	% 40 THF		% 45 THF		% 50 THF		% 55 THF		% 60 THF	
	PKPOT	Grafiksel	PKPOT	Grafiksel	PKPOT	Grafiksel	PKPOT	Grafiksel	PKPOT	Grafiksel
Glibenklamid	6,570 ±0,023	6,542	6,874 ±0,057	6,684	7,046 ±0,031	6,923	7,288 ±0,034	7,079	7,462 ±0,035	7,293
Gliklazid	6,635 ±0,024	6,582	6,851 ±0,058	6,741	7,098 ±0,050	6,977	7,278 ±0,051	7,138	7,447 ±0,043	7,380
Glimepirid	6,703 ±0,023	6,651	6,873 ±0,057	6,785	7,116 ±0,041	7,060	7,316 ±0,049	7,223	7,522 ±0,044	7,429
Glipizid	6,599 ±0,024	6,502	6,785 ±0,056	6,711	7,060 ±0,043	6,943	7,213 ±0,051	7,092	7,432 ±0,038	7,309

Sadece bir iyonlaşma sabiti olan sülfonilüre grubu bileşiklerin iyonlaşma sabiti tayininde Gran fonksiyonundan ve  $\phi$ -pH grafiklerinden de yararlanılmıştır. Sonuçlar çizelge 5.2’de verilmiştir.

Çizelge 5.2. Çalışılan sülfonilüre grubu bileşiklerin Gran metodu ve  $\phi$ -pH grafiğinden elde edilen  $pK_a$  değerleri

Bileşikler	% 40 THF		% 45 THF		% 50 THF		% 55 THF		% 60 THF	
	Gran	$\phi$ - pH	Gran	$\phi$ - pH	Gran	$\phi$ - pH	Gran	$\phi$ - pH	Gran	$\phi$ - pH
Glibenklamid	6,556	6,563	6,714	6,702	6,932	6,977	7,103	7,128	7,304	7,368
Gliklazid	6,599	6,622	6,772	6,775	6,996	7,009	7,168	7,193	7,427	7,480
Glimepirid	6,668	6,682	6,812	6,812	7,080	7,131	7,254	7,253	7,440	7,483
Glipizid	6,523	6,548	6,742	6,731	6,959	6,974	7,112	7,147	7,326	7,379

Çizelge 1 ve 2’den de görüleceği üzere PKPOT programı, grafiksel yöntem, Gran fonksiyonu ve  $\phi$ -pH grafiklerinden elde edilen değerler birbirine yakındır.

Çizelge 5.3. Çalışılan tiyazolidindion grubu bileşiklerin PKPOT ve grafiksel yöntem ile elde edilen pK<sub>a</sub> değerleri

Bileşikler		% 40 THF		% 45 THF		% 50 THF		% 55 THF		% 60 THF	
		PKPOT	Grafiksel	PKPOT	Grafiksel	PKPOT	Grafiksel	PKPOT	Grafiksel	PKPOT	Grafiksel
Pirogliazon HCl	pK <sub>a1</sub>	4,012 ±0,042	4,025	3,984 ±0,099	4,010	3,955 ±0,013	3,955	3,860 ±0,068	3,870	3,785 ±0,081	3,785
	pK <sub>a2</sub>	6,989 ±0,026	7,015	7,207 ±0,062	7,208	7,423 ±0,051	7,423	7,560 ±0,063	7,580	7,781 ±0,052	7,792
Rosiglitazon Maleat	pK <sub>a1</sub>	4,830 ±0,032	4,801	4,727 ±0,098	4,715	4,672 ±0,088	4,665	4,578 ±0,109	4,568	4,469 ±0,070	4,458
	pK <sub>a2</sub>	6,143 ±0,051	6,151	6,343 ±0,070	6,330	6,602 ±0,067	6,554	6,819 ±0,084	6,771	7,138 ±0,065	7,059
	pK <sub>a3</sub>	7,543 ±0,029	7,607	7,759 ±0,076	7,816	7,955 ±0,060	8,006	8,089 ±0,082	8,151	8,224 ±0,060	8,305

## 5.2. Sıvı Kromatografik Yöntem Verilerinden Elde Edilen İyonlaşma Sabitleri

Çalışılan bileşiklerin sıvı kromatografik davranışlarının incelenmesinde ve iyonlaşma sabitlerinin tayininde, Shimadzu marka YPSK cihazı kullanılmıştır. Sistemde, sistem kontrol ünitesi (CBM 20A), pompa (LC20 AD), dedektör (SPDM 20A Foto Diyod Dizi), kolon fırını (CTO 20 AC) ve gaz giderme ünitesi (DGU 20 A) bulunmaktadır. Bileşiklerin pik simetrisi ve alıkonma davranışları incelendiğinde YMC J'sphere ODS-H80 (4 µm, 150 mm x 4,6 mm ID) kolon tercih edilmiştir. Çalışmada enjeksiyon hacmi 20 µL, dalga boyu (λ) 230 nm, akış hızı 1,0 mL/dakika ve sıcaklık 25 °C'dir. Bileşiklerin kapasite faktörlerinin hesaplanmasında kullanılacak t<sub>0</sub> değeri Urasil'in mobil fazdaki çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. Urasil için dalga boyu (λ) 254 nm olacak şekilde çalışılmıştır. Bu çalışmada mobil faz organik modifiyeri olan tetrahidrofuranın derişimi % 40, % 45, % 50, % 55 (v/v) olacak şekilde belirlenmiştir. Çalışılan mobil fazlara 15 mM fosforik asit olacak şekilde derişik fosforik asit ilave edilmiş ve NaOH ilavesi ile mobil fazın pH'sı 2,5; 3,0; 3,5; 3,75; 4,0; 4,25; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0; 6,5; 6,75; 7,0; 7,25; 7,5; 7,75; 8,0; 8,25; 8,5; 8,75 olacak şekilde ayarlanmıştır. Her bir bileşik ve urasil için iki tekrarlı enjeksiyonlarda elde edilen ortalama alıkonma zamanları ile kapasite faktörleri hesaplanmıştır. Kapasite faktörünün pH ile değişimi, sigmoidal davranış gösterir. Bu sigmoidalin orta

noktasındaki pH değeri, o bileşiğin çalışılan ortamdaki iyonlaşma sabitini verir. Kapasite faktörü – pH ilişkisi NLREG programı ile değerlendirilerek bileşiklerin  $pK_a$  değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 5.4 ve 5.5). Kullanılan kolonun THF-su ortamı için uygun olduğu gözlenmiştir. Ancak rosiglitazon maleatın  $pK_{a3}$  değeri, çalışılan kolonun pH aralığının yetersizliği nedeniyle tayin edilememiştir.

Çizelge 5.4. Çalışılan sülfonilüre grubu bileşiklerin NLREG ile elde edilen  $pK_a$  değerleri

	% 40 THF	% 45 THF	% 50 THF	% 55 THF
Bileşikler	NLREG	NLREG	NLREG	NLREG
Glibenklamid	6,200 ( $\pm 0,021$ )	6,481 ( $\pm 0,025$ )	6,662 ( $\pm 0,072$ )	6,894 ( $\pm 0,056$ )
Gliklazid	6,335 ( $\pm 0,029$ )	6,564 ( $\pm 0,049$ )	6,734 ( $\pm 0,046$ )	6,915 ( $\pm 0,041$ )
Glimepirid	6,369 ( $\pm 0,012$ )	6,537 ( $\pm 0,021$ )	6,720 ( $\pm 0,039$ )	6,942 ( $\pm 0,051$ )
Glipizid	6,257 ( $\pm 0,037$ )	6,425 ( $\pm 0,048$ )	6,674 ( $\pm 0,071$ )	6,839 ( $\pm 0,045$ )

Çizelge 5.5. Çalışılan tiyazolidindion grubu bileşiklerin NLREG ile elde edilen  $pK_a$  değerleri

		% 40 THF	% 45 THF	% 50 THF	% 55 THF
Bileşikler		NLREG	NLREG	NLREG	NLREG
Pioglitazon HCl	$pK_{a1}$	4,116 ( $\pm 0,037$ )	4,100 ( $\pm 0,050$ )	4,077 ( $\pm 0,097$ )	4,054 ( $\pm 0,077$ )
	$pK_{a2}$	6,709 ( $\pm 0,025$ )	6,929 ( $\pm 0,047$ )	7,106 ( $\pm 0,033$ )	7,307 ( $\pm 0,050$ )
Rosiglitazon Maleat	$pK_{a1}$	4,577 ( $\pm 0,033$ )	4,455 ( $\pm 0,071$ )	4,315 ( $\pm 0,049$ )	4,213 ( $\pm 0,053$ )
	$pK_{a2}$	6,055 ( $\pm 0,043$ )	6,261 ( $\pm 0,042$ )	6,403 ( $\pm 0,056$ )	6,612 ( $\pm 0,044$ )
	$pK_{a3}$	-	-	-	-

### 5.3. Yasuda-Shedlovsky Eşitliği ve Extrapolasyon Yöntemi ile Sudaki pK<sub>a</sub> Tayini Sonuçları

İlaçlar vücutta sulu ortamda emilmekte, dağılmakta ve atılmaktadır. Bu yüzden ilaç maddelerinin asitlik sabitlerinin belirlenmesinde, en uygun ortam su ortamıdır. Ancak ilaçların çoğu suda çözünürlüğü az olan bileşiklerdir ve dolayısıyla organik çözücü karışımlarına ihtiyaç duyulmaktadır. İlaç maddelerinin su-organik çözücü karışımlarında pK<sub>a</sub> tayininden elde edilen verilerden sudaki pK<sub>a</sub> değerlerine ulaşabilmek için Yasuda-Shedlovsky eşitliği ve extrapolasyon yöntemi kullanılmıştır. Sülfonilüre grubu bileşikler için potansiyometrik titrasyon ve ters faz sıvı kromatografik yöntemiyle elde edilen sonuçların sudaki pK<sub>a</sub> değerleri çizelge 5.6'da, tiyazolidindion grubu bileşikler için ise çizelge 5.7'de verilmiştir.

Çizelge 5.6. Çalışılan sülfonilürelerin extrapolasyon yöntemleriyle elde edilen sudaki pK<sub>a</sub> değerleri

Bileşikler	NLREG		PKPOT	
	1/ε-pK <sub>a</sub>	Yasuda-Shedlosky	1/ε-pK <sub>a</sub>	Yasuda-Shedlosky
Glibenklamid	5,499	5,489	6,013	6,002
Gliklazid	5,742	5,732	6,096	6,085
Glimepirid	5,743	5,733	6,117	6,106
Glipizid	5,611	5,601	6,027	6,016

Çizelge 5.7. Çalışılan tiyazolidindionların extrapolasyon yöntemleriyle elde edilen sudaki pK<sub>a</sub> değerleri

Bileşikler	NLREG		PKPOT	
	1/ε-pK <sub>a</sub>	Yasuda-Shedlosky	1/ε-pK <sub>a</sub>	Yasuda-Shedlosky
Pioglitazon HCl (Bazik Kısım)	4,187	4,177	4,201	4,190
Pioglitazon HCl (Asidik Kısım)	6,087	6,077	6,475	6,464
Rosiglitazon Maleat (Bazik Kısım)	4,967	4,958	5,070	5,059
Rosiglitazon Maleat (Asidik Kısım)	5,480	5,470	5,429	5,418
Rosiglitazon Maleat	-	-	7,121	7,110

Elde edilen pK<sub>a</sub> değerleri literatürlerde verilen değerlerle ve SPARC, ACDLab, Marvin programlarından elde edilen değerlerle karşılaştırılmış (Çizelge 5.8) ve birbirleri ile uyumu oldukları görülmüştür.

Çizelge 5.8. Çalışılan bileşiklerin SPARC, ACDLab, Marvin programlarından ve literatürlerden alınmış pK<sub>a</sub> değerleri.

Bileşikler	SPARC	ACDLab	Marvin	Literatür
Glibenklamid	5,57	4,17±0,30	4,320	6,2 <sup>a</sup> ; 6,0 <sup>b</sup> ; 5,3 <sup>c</sup> ; 6,8 <sup>d</sup> ; 5,2 <sup>e</sup>
Glimepirid	5,55	4,99±0,50	4,320	5,2 <sup>e</sup> ; 6,2 <sup>b,f</sup>
Gliklazid	5,32	5,03±0,50	4,070	5,8 <sup>b,g,h,i,j</sup> ; 5,98 <sup>e,k</sup> ; 5,58 <sup>u</sup> ; 5,64 <sup>u</sup> ; 5,48 <sup>u</sup>
Glipizid	5,56 9,98	4,97±0,50 13,04±0,46	4,320 13,870	5,9 <sup>b,l,m,n,o</sup> ; 5,2 <sup>e</sup> ; 5,19 <sup>u</sup> ; 5,49 <sup>u</sup> ; 4,89 <sup>u</sup>
Rosiglitazon Maleat	5,32 6,38	6,47±0,12 6,35±0,50	6,229 6,844	6,1-6,8 <sup>p,r</sup> ; 6-7 <sup>s</sup>
Pioglitazon HCl	4,17 6,35	5,53±0,22 6,35±0,50	5,598 6,658	5,8-6,4 <sup>t</sup> ; 5,37 <sup>u</sup> ; 5,56 <sup>u</sup> ; 4,74 <sup>u</sup>

a) Gögelein vd., (1999); b) AbuRuz vd., (2005); c) Lai ve Feng, (2006); d) Mandić ve Gabelica (2006); e) Remko (2009); f) Singh vd., (2009) g) Winters vd., (1994) h) Masereel vd., (1996) i) Alkhamis vd., (2003) j) Park ve Choi (2006) k) Kuo ve Wu (2005) l) Thombre vd., (1999); m) Verma ve Garg (2005); n) Jain vd., (2008); o) Nazır vd., (2009); p) Yardımcı ve Özaltın (2005); r) Kamila vd., (2009); s) Chou vd., (2005); t) Henderson vd., (2006); u) Narasimham ve Barhate., (2011).

#### 5.4. Sonuç

İlaçların özellikle asit-baz yapıları ve konsantrasyonları eczacılık ve klinik açıdan oldukça önemlidir. Asitlik sabitlerinin belirlenmesinde potansiyometrik metot, spektrofotometrik metot, kromatografik metotlar ve kapiller zone elektroforez metotları sıkça kullanılmaktadır. Bu metotların en güvenilir ve yaygın olarak kullanılanı potansiyometrik metottur.

Su ortamında çözünmeyen ve dolayısıyla titrasyonu mümkün olmayan ilaç aktif maddelerini susuz ortamlarda ya da su-organik çözücü ikili karışımlarında tayin etmek mümkün olabilmektedir. İki çözücü karışımı ya da su-organik çözücü karışımları hem fiziksel (dielektrik sabiti, yoğunluk, viskozite) hem de kimyasal (asit-baz ve akseptör-donör özellikleri) olarak tamamen farklı bir çözücü özelliği

gösterir. Bu yüzden uygun bir çözücü seçmek iyonlaşma sabiti tayininde oldukça önemli hale gelmektedir.

THF, iyonik ve nötral türleri, organik ve organometalik bileşikleri ve polimerik materyaller gibi çeşitli maddeleri yüksek oranda çözmeye eğimli olduğundan, organik sentezinde uygun çözücü olarak ve endüstriyel proseslerin uygulanmasında geniş bir kullanım alanına sahiptir. Tercihen su ile karıştırılır ve birçok analitik kimya tekniklerinde kullanılır. Bu kullanım alanları ve diğerleri, THF içinde çözünenlerin asit-baz özelliklerinin bilinmesi ve bu çözeltiler içinde iyon-iyon ve iyon-çözücü etkileşimlerinin aydınlatılması için çalışmaların THF üzerinde yoğunlaşmasına neden olmuştur (Garrido vd., 2008).

THF, dipol olan ve asit özelliği göstermeyen yani dipolar aprotik çözücüler arasındadır. Dipolar aprotik çözücülerin dengeleme etkileri olmadığından asit karışımları ve baz karışımları kademeli olarak titre edilebilir. Çünkü böyle çözücülerin geniş bir çalışma aralığı vardır. Örneğin amfiprotik bir çözücünde 2pK birimi kadar olan fark, THF gibi dipolar aprotik çözücülerde 5 pK birimine kadar çıkabilir. Çalışma potansiyel aralığı veya pH aralığı çok geniş olduğundan bu büyük fark titrasyon kolaylığı sağlamış olur. İyonlaşma derecesi çözücünün dielektrik sabitine bağlıdır. Dielektrik sabitinin büyük olması çözücünün iyi ayırma gücüne sahip olduğunu gösterir. Bu durumda çözücü, yüklü taneciklerin oluşmasına engel teşkil etmez ve yüksüz asitlerin iyonlaşmasını kolaylaştırır (Gündüz, 1988). Tüm bu özelliklerinden dolayı THF, potansiyometrik titrasyon yönteminde kullanılabilir.

Literatür çalışmaları incelendiğinde su-organik çözücü karışımlarında pK<sub>a</sub> tayininde genellikle metanol, asetonitril ve THF gibi organik çözücüler kullanılmıştır. Bu çalışmalarda, iyonlaşma sabitlerinin sayısal değerlerinin çözücünün bileşimi ile doğrudan ilişkili olduğunu göstermektedir. Garrido (2008)'ya göre bu çözücülerden suya en yakın pK<sub>a</sub> değerini veren organik çözücü metanoldür. Bu çözücülerdeki pK<sub>a</sub> değerleri aynı zamanda aprotik çözücülerdekenden daha düşüktür. Bunun sebebi suyun ve metanolün amfiprotik çözücü olması ve yüksek solvasyon kapasitesi göstermesidir. Bununla birlikte THF gibi aprotik çözücülerin kolayca hidrojen bağı kurabilecek bir hidrojen atomu yoktur. Sonuç olarak aprotik profobik çözücülerde kationik form nötral formdan daha çok tutunur ve pK<sub>a</sub> değerleri su-organik çözücü

ortamında daha fazla olur. Ayrıca THF'deki (protofilik çözücü)  $pK_a$  değerleri protobik çözücü olan asetonitrile, protofilik çözücü olan DMSO'dan daha benzer olduğuna dikkat edilmelidir. Bu durum asetonitril ve THF'nin benzer solvatokromik parametrelere sahip olmasından kaynaklanmaktadır (Garrido, 2008).

Diğer taraftan, aprotik çözücüler küçük autodisosiyasyon sabitleri nedeniyle amfiprotik çözücülerden daha iyi ayrıştırılırlar. THF'nin zayıf H-bağı verme kapasitesi,  $\alpha$ , çoğunlukla asit gücünün yüksek çözünürlüğünü belirler. Düşük polarite,  $\pi^*$ , ve düşük hidrojen bağı alma kapasiteside,  $\beta$ , belirli bir çözücü içinde çözünürlüğü artırır. Sonuç olarak THF'nin su ve metanol gibi amfiprotik çözücülerden çok farklı olmadığını, ancak aprotik protofilik çözücü olan asetonitril ve NM ile hidrojen bağı verme özellikleri nedeniyle çok farklı olduklarını bulmuştur (Garrido, 2008).

Solvasyon yeteneği ve dielektrik sabiti ayrışma reaksiyonlarında önemli bir rol oynar. Çözücüdeki asidin zıt yüklerini ayırmak için gereken enerji dielektrik sabiti ile ters orantılıdır. Bu enerji iyonların solvasyonu ile sağlanabilir. Buna ilaveten asitten çözücü molekülüne proton transferi de biraz enerji sağlar. Çünkü karışımın dielektrik sabiti ve solvasyon yeteneği azalır, THF %'si artar. ( $\epsilon_{H_2O}=78,36$  ve  $\epsilon_{THF}=7,6$ ). Yükleri ayırmak için gereken enerji yükselecektir ve bu yüzden ayrışma sabiti derecesi düşürülecektir. Bu her bir asidin  $pK_a$  değerinin çözücüdeki THF %'si arttıkça arttığını gösterir (Kamyabi, 2009).

Bu bilgiler ışığında hem potansiyometrik titrasyon hem de HPLC yöntemle yapılan  $pK_a$  tayininde, çözücüdeki THF %'si arttıkça zayıf asit özelliği gösteren sülfonilüre grubu bileşiklerden glibenklamid, glizid, glipizid ve glimepiridin iyonlaşma sabitinin düzenli olarak küçüldüğü yani  $pK_a$  değerlerinin arttığı gözlenmiştir. Fonksiyonel gruplara göre incelendiğinde, R fonksiyonel gruplarının asidik protona olan uzaklığı nedeniyle etkisi çok azdır. Tiyazolidindion grubu bileşiklerden pioglitazon HCl ve rosiglitazon maleatın, 2,4-tiyazolidindion grubunun zayıf asit özelliği göstermesi nedeniyle çözücüdeki THF %'si arttıkça  $pK_a$  değerleri düzenli olarak artmış, bazik özellik gösteren piridin halkasına ait  $pK_a$  değeri ise çözücüdeki THF %'si arttıkça azaldığı gözlenmiştir. Çolak (2011), yaptığı çalışmada metil ve etil piridinlerin, piridinden daha kuvvetli baz olduğunu göstermiştir. Pioglitazon HCl'nin yapısında bulunan piridin halkası rosiglitazon maleattan farklı olarak etil piridin



yapısı içerir. Dolayısıyla rosiglitazon maleattan daha bazik bir gruba sahiptir ve deneysel sonuçlarda da görüldüğü gibi daha düşük  $pK_a$  değerine sahiptir. Augustin vd. (2000), piridin ve türevlerinin asetonitril, metanol ve su ortamına ait  $pK_a$  tayinini yapmışlardır. Piridinin yapısı için metanol ortamında  $pK_a$  değeri 5,21; asetonitril ortamında 7,23; su ortamında ise 4,94-5,42 olarak hesaplamışlardır. 2,4-tiyazolidindion gruplarında bulunan piridin yapısı farklı substüentlerin etkisinde olduğu için bu değerler THF-su ortamında farklı hesaplanmıştır. Sonuç olarak, yapılarıdaki benzer grupların sıvı kromatografi yöntemi kullanılarak THF-su ortamında tayin edilen  $pK_a$  değerleriyle potansiyometrik yöntemle elde edilen  $pK_a$  değerlerinin uyumlu olduğu görülmektedir.

Narasimham ve Barhate (2011), glıklazid, glipizid ve pioglitazon gibi antidiyabetik ilaçların  $pK_a$  değerlerini potansiyometrik titrasyon yöntemiyle ve spektrofotometrik yöntemle metanol, etanol, asetonitril ve 1,4-Dioksan çözücülerini kullanarak tayin etmişlerdir. Yaptıkları çalışmada Yasuda Shedlovsky eşitliğini kullanarak sudaki  $pK_a$  değerlerini hesaplamışlar. Pioglitazon için sadece piridin grubuna ait  $pK_a$  değerini  $4,74 \pm 0,06$  ile  $5,56 \pm 0,05$  aralığında bulabilmişlerdir. Glipizid için sudaki  $pK_a$  değerleri  $4,89 \pm 0,15$  ile  $5,49 \pm 0,05$  arasında, glıklazid için  $5,48 \pm 0,05$  ile  $5,70 \pm 0,01$  aralığında hesaplamışlardır. Buna göre metanol, etanol, asetonitril ve 1,4-dioksan organik çözücü su karışımları kullanıldığında elde edilen sudaki  $pK_a$  değerleri, bu çalışmada THF-su çözücü kullanıldığında potansiyometrik titrasyon yöntemiyle elde edilen  $pK_a$  değerlerinden daha küçük olduğu gözlenmiştir.

Bu konu üzerinde yapılan başka literatür taraması sonucunda iyonlaşma sabiti tayinine rastlanmamıştır. Bu nedenle, bu çalışmamızda elde edilen sonuçlar, literatüre önemli katkı sağlayacaktır.

Kromatografi, karmaşık karışımlardaki kimyasal bileşimlerin ayrılması, tanınması ve tayininde çok yaygın olarak kullanılan bir yöntemler topluluğudur. Bu yöntemler topluluğundan HPLC, doğruluk, kesinlik, tekrarlanabilirlik, seçicilik, duyarlılık ve sonuçların hızlı elde edilmesi gibi diğer yöntemlere göre birçok üstün yanlara sahiptir. Ayrıca, HPLC ile nanogram seviyesinde bile miktar analizi yapılabilmektedir. Biyolojik sıvılarda farmakokinetik çalışmalarda düşük derişimlere inebilmek oldukça önemlidir. Bundan dolayı da ilaç endüstrisinde hem farmasötik preparatlarda hem de biyolojik sıvılarda ilaç analizlerinde HPLC oldukça yaygın bir

şekilde kullanılmaktadır. HPLC çalışmalarında, sabit fazın özellikleri ve hareketli fazın bileşimi, ayrılan maddenin kromatografik davranışına etki etmektedir. Bundan dolayı ayırımın iyileştirilmesi ve kabul edilebilir sonuçların alınabilmesi için kromatografik koşulların optimizasyonuna gerek duyulmaktadır.

Glipizid, glibenklamid, ve pioglitazon HCl'nin belirlenmesi için geliştirilen HPLC yönteminde kromatografik ayırım için THF ortamında kullanılabilen ters faz YMC J'Sphere ODS-H80 (4 µm, 150 mm x 4,6 mm ID) kolon kullanıldı. % 40, % 45, % 50 ve % 55 THF-su ortamında farklı pH'larda elde edilen kapasite faktörleri, seçicilik faktörü ve ayırma gücü değerleri de göz önüne alınarak, % 40 THF (v/v), pH 4,5' ta çalışıldı. Akış hızı 1 mL/dak, dalga boyu 230 nm, sıcaklık 30 °C ve enjeksiyon hacmi 20 µL olarak çalışma parametreleri belirlendi. Glibenklamid, glipizid, ve pioglitazon HCl analizi sırasında iç standart olarak seçicilik, ayırma gücü ve analiz süresi göz önüne alınarak tiyazolidindion grubundan rosiglitazon maleat seçilmiştir.

Kalibrasyon fonksiyonunun doğrusal aralığının belirlenmesinde glipizid, glibenklamid ve pioglitazon HCl çözeltilerinden 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16 ve 18 µg/mL derişimlerde çözeltileri hazırlanarak HPLC' de kromatogramları alındı ve her bir çözeltilinin derişimine karşı HPLC den elde edilen piklerin alanı grafiğe geçirilerek kalibrasyon eğrisi elde edilmiştir. Geliştirilen yöntemin sistem kararlılık parametreleri saptanmış ve elde edilen parametreler ışığında yöntemin uygulanabilir olduğu bulunmuştur. Bileşiklerin tayini için kesinlik çalışmaları, 8 µg/mL ve 16 µg/mL derişimlerinde gerçekleştirilmiştir. Grafik, glipizid için 6 µg/mL ile 18 µg/mL arasında doğrusaldır ve doğrunun denklemi  $y = 3,052x - 0,116$  (y: pik alanı, x: derişim), korelasyon katsayısı (r) ise 0,999 olarak belirlenmiştir. LOD, 0,441 µg/mL; LOQ ise 1,336 µg/mL olarak tespit edildi. Gün-içi ve günler-arası kesinlik değerlerinin bağıl standart sapması 8 µg/mL için günler içi değeri 0,088; günler arası BSS değeri 0,381'dir. 16 µg/mL için günler içi BSS değeri 0,549; günler arası BSS değeri 0,810'dur. Grafik, glibenklamid için 4 µg/mL ile 18 µg/mL arasında doğrusaldır ve doğrunun denklemi  $y = 3,115x - 0,512$  (y: pik alanı, x: derişim), korelasyon katsayısı (r) ise 0,999 olarak belirlendi. LOD, 0,495 µg/mL; LOQ ise 1,501 µg/mL olarak tespit edildi. Gün-içi ve günler-arası kesinlik değerlerinin bağıl standart sapması 8 µg/mL için günler içi değeri 0,068; günler arası BSS değeri

0,115'dir. 16 µg/mL için günler içi BSS değeri 0,137; günler arası BSS değeri 0,245'dur. Grafik, pioglitazon HCl için 4 µg/mL ile 18 µg/mL arasında doğrusaldır ve doğrunun denklemi  $y = 2,571x - 0,954$  (y: pik alanı, x: derişim), korelasyon katsayısı (r) ise 0,999 olarak belirlendi. LOD), 0,674 µg/mL; LOQ ise 2,044 µg/mL olarak tespit edildi. Gün-içi ve günler-arası kesinlik değerlerinin bağıl standart sapması 8 µg/mL için günler içi değeri 0,285; günler arası BSS değeri 0,834'dür. 16 µg/mL için günler içi BSS değeri 0,131; günler arası BSS değeri 0,194'dur.

Metodun seçiciliği farmasötik dozaj formunun test edilmesiyle tespit edilir. Geliştirilen ve yöntem geçerlilik hesaplamaları yapılmış olan yöntem glipizid, glibenklamid ve pioglitazon HCl etken maddelerini içeren farmasötik dozaj formuna uygulanmış ve her üç maddenin de aynı anda analizinde kullanılabileceği görülmüştür. Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerin analiz yöntemi üzerindeki etkilerini inceleyebilmek için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Farmasötik preparattan geri kazanım çalışmaları standart ekleme yöntemi ile yapıldı. Elde edilen sonuçlara göre tablet katkı maddelerinin analizi etkilemediği ve tablet içerikleri ile iyi uyuma içinde olduğu sonucuna varılmıştır.

Elde edilen veriler ışığında, glipizid, glibenklamid ve pioglitazon HCl'nin aynı anda analizi için hızlı, duyarlı, kesin, kolay, doğru ve herhangi bir ön ayırma işlemine gerek duyulmayan bir analiz yöntemi geliştirilmiş ve piyasa preparatlarında bu maddelerin aynı anda analizine başarılı bir şekilde uygulanabildiği istatistiksel olarak gösterilmiştir. Sonuç olarak, tez kapsamında bu bileşiklerin aynı anda tayini için geliştirilmiş olan HPLC yöntemi bu iki maddenin farmasötik dozaj formlarından aynı anda tayini için önerilmektedir.

## KAYNAKLAR

- AbuRuz, S., Millership, J., McElnay, J., 2005. The Development and Validation of Liquid Chromatography Method For The Simultaneous Determination of Metformin and Glipizide, Gliclazide, Glibenclamide or Glimperide in Plasma. *Journal of Chromatography B*, 817, 277–286.
- Adamovics, J.A., 1997. *Chromatographic Analysis of Pharmaceuticals*, Marcel Dekker, 508p, New York.
- Ahuya, S., Scypinski, S., 2001. *Handbook of Modern Pharmaceutical Analysis*, Academic Press, 566p, New York.
- Albu, F., Georgiță, C., David, V., Medvedovici, A., 2007. Determination of Glibenclamide in Human Plasma by Liquid Chromatography and Atmospheric Pressure Chemical Ionization/MS-MS Detection. *Journal of Chromatography B*, 846, 222–229.
- Alkan, S., 2007. Bazı Pirazol Karboksilik Asitlerin Etanol-Su Ortamında İyonlaşma Sabitlerinin Potansiyometrik Yöntemle Tayini. Dumlupınar Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 53s, Kütahya.
- Alkhamis, K.A., Allaboun, H., Al-Momani, W.Y., 2003. Study of the Solubilization of Gliclazide by Aqueous Micellar Solutions. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 92(4), 839-846.
- Altunsoy, S., 2010. Kinapril HCl Ve Hidroklorotiyazidi Birlikte İçeren Kombine Farmasötik Preparatlardan Bu Maddelerin Aynı Anda Analizi İçin Yeni Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Ankara.
- Anonim. 2011. Türkiye Diyabet Önleme ve Kontrol Programı Eylem Planı (2011-2014). T.C. Sağlık Bakanlığı Temel Sağlık Hizmetleri Genel Müdürlüğü, Sağlık Bakanlığı Yayın No: 816, 134s. Ankara.
- Anonymous. 1985. Diabetes mellitus. Report of a World Health Organization Study Group, Technical Report Series No:727, 113p. Geneva.
- Anonymous. 1994. Prevention of diabetes mellitus. Report of a World Health Organization Study Group, Technical Report Series No:844, 100p. Geneva.
- Anonymous. 1999. Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications. Report of a World Health Organization Study Group, 99(2), 59p. Geneva.
- Anonymous. 2003. Diabetes Atlas, 2nd. Edition. International Diabetes Federation, 304p. Brussels

- Anonymous. 2009. Diabetes Atlas, 4th Edition. International Diabetes Federation, 255p. Brussels.
- Augustin, D.N., Makowski, M., Chmurzynski, L., 2000. Acid–base equilibria in systems involving substituted pyridines in polar aprotic protophobic media and in the amphiprotic methanol. *Analytica Chimica Acta*, 418, 233–240.
- Avdeef, A., Box, K.J., Comer, J.E.A., Gilges, M., Hadley, M., Hibbert, C., Patterson, W., Tam, K.Y., 1999. pH Metric log P 11. pK<sub>a</sub> Determination of Water Soluble Drugs in Organic Solvent- Water Mixtures. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 20, 631 - 641.
- Ayvaz G., Kan E., 2010. Tip 2 Diabetes Mellitus Tedavisinde Oral Antidiyabetik İlaçlar Tip 2 Diabetes Mellitus Tedavisi. *Mised*, 23(24), 8-13.
- Babić, S., Horvat, A.J.M., Pavlović, D.M., Macan, M.K., 2007. Determination of pK<sub>a</sub> Values of Active Pharmaceutical Ingredients. *Trends in Analytical Chemistry*, 26(11), 1043-1061.
- Barbosa, J., Barron, D., Beltran, J.L., Sanz-Nebot, V., 1995. PKPOT, a program for the potentiometric study of ionic equilibria in aqueous and non- aqueous media. *Analytical Chimica Acta*, 317, 75-81.
- Bidlingmeyer, B.A., 1992. *Practical HPLC Methodology and Applications*. John Wiley & Sons, Inc., 452p, New York.
- Bilber, O., 2010. Bazı Gıdalarda Suda ve Yağda Çözünen Vitaminlerin Eşzamanlı Tayin Metodunun Optimizasyonu. Selçuk Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 95s, Konya.
- Braggio, S., Barnaby, R.J., Grossi, P., Cugola, M., 1996. A Strategy For Validation of Bioanalytical Methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 14, 375-388.
- Chou, C.C., Lee, M.R., Cheng, F.C., Yang, D.Y., 2005. Solid-phase Extraction Coupled with Liquid Chromatography–tandem Mass Spectrometry for Determination of Trace Rosiglitazone in Urine. *Journal of Chromatography A*, 1097, 74–83.
- Cookson, R.F., 1974. The Determination of Acidity Constants. *Chemical Reviews*, 74(1), 5-28.
- Çolak, E., 2011. Bazı Yeni 1,2,4-triazol Türevi Bileşiklerin pK<sub>a</sub> Değerlerinin Potansiyometrik Titrasyon Metodu İle Susuz Ortamda İncelenmesi. Rize Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 112s, Rize.
- Ermer, J., 2001. Validation in Pharmaceutical Analysis, Part 1: An Intergrated Approach. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24, 755-767.

- Ertaş, Ö.S., Kayalı, A., 2005. An Overview On Analytical Method Validation. *Journal Faculty of Pharmacy*, 34 (1), 41–57.
- Garrido, G., Rosés, M., Ràfols, C., Bosch, E., 2008. Acidity of Several Anilinium Derivatives in Pure Tetrahydrofuran. *Journal of Solution Chemistry*, 37, 689-700.
- Gavin, J.R., Alberti, K.G.M.M., Davidson, M.B., DeFronzo, R.A., Drash, A., Gabbe, S.G., Genuth, S., Harris, M.I., Kahn, R., Keen, H., Knowler, W.C., Lebovitz, H., Maclaren, N.K., Palmer, J.P., Raskin, P., Rizza, R.A., Stern, M.P., 1998. Report on the Expert Committee on The Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 21(1), 5-20.
- Gedeon, C., Kapur, B., Aleksa, K., Koren, G., 2008. A Simple and Rapid HPLC Method For The Detection of Glyburide in Plasma Original Research Communication (analytical). *Clinical Biochemistry*, 41, 167– 173.
- Genuth, S., Alberti, K.G.M.M., Bennett, P., Buse, J., DeFronzo, R., Kahn, R., Kitzmiller, J., Knowler, W.C., Lebovitz, H., Lernmark, A., Nathan, D., Palmer, J., Rizza, R., Saudek, C., Shaw, J., Steffes, M., Stern, M., Tuomilehto, J., Zimmet, P., 2003. Report of the Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care*, 26(11), 3160-3167.
- Giaginis, C., Theocharis, S., Tsantili-Kakoulidou, A., 2007. Investigation of the lipophilic behaviour of some thiazolidinediones Relationships with PPAR- $\gamma$  activity. *Journal of Chromatography B*, 857, 181–187.
- Gomes, P., Sippel, J., Jablonski, A., Stepe, M., 2004. Determination of Rosiglitazone in Coated Tablets by MEKC and HPLC Methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 36, 909–913.
- Gögelein, H., Hartung, J., Englert, H.C., 1999. Molecular Basis, Pharmacology and Physiological Role of Cardiac  $K_{ATP}$  Channels. *Cellular Physiology Biochemistry*, 9, 227-241.
- Gran G., 1952. Determination of the equivalence points in potentiometric titrations. Part II, *Analyst*, 77, 661-671.
- Gran G., 1988. Equivalence volumes in potentiometric titrations. *Analytica Chimica Acta*, 206, 111-123.
- Gündüz, T., 1988. *Susuz Ortam Reaksiyonları*. Gazi Büro Kitabevi, 168s, Ankara.
- Gündüz, T., 2002. *İnstrümental Analiz*. Gazi Kitabevi, 1357s, Ankara.
- Hamilton, R.J., Sewel, P.A., 1982. *Introduction To High Performance Liquid Chromatography*. Chapman and Hall, 248p, New York.

- He, J., Hu, Y.F., Duan, L.F., Tan, Z.R., Wang, L.S., Wang, D., Zhang, W., Li, Z., Liu, J., Tu, J.H., Yao, Y.M., Zhou, H.H., 2007. Sensitive and Selective Liquid Chromatography–mass Spectrometry Method For The Quantification of Rosiglitazone in Human Plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 580–585.
- Henderson, J.W., Long, W.J., Woodward, C., 2006. Value of Eclipse Plus C18 and pH Selectivity to Analyze Amine-Containing Drugs. Agilent Technologies, 6p, USA.
- Ho, E.N.M., Yiu, K.C.H., Wan, T.S.M., Stewart, B.D., Watkins, K.L., 2004. Detection of Antidiabetics in Equine Plasma and Urine by Liquid Chromatography–tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 811, 65–73.
- Huber, L., 2007. Validation and Qualification in Analytical Laboratories. 2 nd ed. Informa Health Care, 318p, NewYork.
- International Conference on Harmonization (ICH), 1994. Draft Guideline on Validation of Analytical Procedures for Pharmaceuticals; Availability, Fed.Reg. 59, 9750.
- Jain, A., Ghosh, B., Rajgor, N., Desai, B.G., 2008. Passive and Iontophoretic Permeation of Glipizide. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 69, 958–963.
- Janbon, M., Chaptal, J., Vedel, A., Schaap, J., 1942. Accidents Hypoglycémiques Graves par un Sulfamidothiodiazol. *Montpellier Medical School*, 441, 21–22.
- Joseph, K.S., Hage, D.S., 2010. Characterization of the Binding of Sulfonylurea Drugs to HSA by High Performance Affinity Chromatography. *Journal Chromatography*, 878(19), 1590–1598.
- Kamila, M.M., Mondal, N., Ghosh, L.K., Gupta, B.K., 2009. Multiunit Floating Drug Delivery System of Rosiglitazone Maleate: Development, Characterization, Statistical Optimization of Drug Release and In Vivo Evaluation. *American Association of Pharmaceutical Scientists*, 10(3), 887-899.
- Kamyabi, M.A., 2009. Potentiometric Determination of Acidity Constants of Some Schiff Bases in Tetrahydrofuran-Water Mixtures. *Journal of Analytical Chemistry*, 64(11), 1131–1135.
- Katzung, G.B., Masters, S.B., Trevor, J.A., 2009. Basic and Clinical Pharmacology, 11 th Edition. McGraw-Hill Medical Company, Norwalk, Conn./San Mateo, CA, 1232p. China.
- Kayaalp, S.O., 1984. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Cilt I. Ulucan Matbaası, 995s, Ankara.

- Kayaalp, S.O., 2002. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Pelikan Kitabevi. 1536s, Ankara.
- Kendall, D.M., 2006. Thiazolidinediones-The Case For Early Use. *Diabetes Care*, 29(1), 154-157.
- Khan, M.A., Sinha, S., Vartak, S., Bhartiya, A., Kumar, S., 2005. LC Determination of Glimepiride and Its Related Impurities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 39, 928–943.
- Kirpi, E., 2007. Heterohalkalı Makromoleküler Bileşik Sentezi. Yıldız Teknik Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 325s, İstanbul.
- Kolte, B.L., Raut, B.B., Deo, A.A., Bagool, M.A., Shinde, D.B., 2003. Liquid Chromatographic Method For The Determination of Rosiglitazone in Human Plasma. *Journal of Chromatography B*, 788, 37–44.
- Kostarnoi, A.V., Golubitskii, G.B., Basova, E.M., Budko, E.V., Ivanov, V.M., 2008. High Performance Liquid Chromatography in the Analysis of Multicomponent Pharmaceutical Preparations. *Journal of Analytical Chemistry*, 63(6), 516–529.
- Kozłowski, C.A., Ulewicz, M., Walkowiak, W., Girek, T., Jabłonska, J., 2002. The Effect of Tautomeric Rearrangement on The Separation of Zn(II) and Cd(II) in Ion Flotation Process with 4-thiazolidinone Derivatives. *Minerals Engineering*, 15, 677–682.
- Kuo, C.Y., Wu, S.M., 2005. High Performance Liquid Chromatography with Electrochemical Detection For Analysis of Gliclazide in Plasma. *Journal of Chromatography A*, 1088, 131–135.
- Lai, E.P.C., Feng, S.Y., 2006. Solid Phase Extraction Non-aqueous Capillary Electrophoresis For Determination of Metformin, Phenformin and Glyburide in Human Plasma. *Journal of Chromatography B*, 843, 94–99.
- Lakshmi, K.S., Rajesh, T., 2011. Development and Validation of RP-HPLC Method for Simultaneous Determination of Glipizide, Rosiglitazone, Pioglitazone, Glibenclamide and Glimepiride in Pharmaceutical Dosage Forms and Human Plasma. *Journal of the Iranian Chemical Society*, 8(1), 31-37.
- Lesyk, R.B., Zimenkovsky, B.S., 2004, 4-Thiazolidinones: Centenarian History, Current Status and Perspectives for Modern Organic and Medicinal Chemistry. *Current Organic Chemistry*, 8(16), 1547-1577.
- Levie, R., 1997. Principles of quantitative chemical analysis, 737p, Singapore.
- Lin, Z.J., Krieger, D.D., Shum, L., 2004. Simultaneous Determination of Glipizide and Rosiglitazone Unbound Drug Concentrations in Plasma by Equilibrium Dialysis and Liquid Chromatography–tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 801, 265–272.



- Lunte, S.M., Radzik, D.M., 1996. *Pharmaceutical and Biomedical Applications of Capillary Electrophoresis*, Elsevier Science Ltd, 511p, New York.
- Mandić, Z., Gabelica, V., 2006. Ionization, Lipophilicity and Solubility Properties of Repaglinide. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 866–871.
- Marchetti, P., Navalesi, R., 1989. Pharmacokinetic-pharmacodynamic Relationship of Oral Hypoglycemic Agent and Update. *Clinical Pharmacokinetics*, 16(2), 100-128.
- Masereel, B., Lebrun, P., Dogne, J.O., Tullio, P., Pirotte, B., Pochet, L., Diouf, O., Delarge, J., 1996. First Synthesis of 4-substituted benzenesulfonylcyano guanidines. *Tetrahedron Letters* 37, 7253-7254.
- Maurer, H.H., Kratzsch, C., Kraemer, T., Peters, F.T., Weber, A.A., 2002. Screening, Library-assisted Identification and Validated Quantification of Oral Antidiabetics of The Sulfonylurea-type in Plasma by Atmospheric Pressure Chemical Ionization Liquid Chromatography–mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 773, 63–73.
- McDowall, R.D., 1999. The Role of Laboratory Information Management Systems (LIMS) in Analytical Method Validation. *Analical Chimica Acta*, 391, 149-158.
- Menteşe, A., 2007. Antidiyabetik Etkili Yeni Bazı Kimyasal Bileşikler Üzerinde Araştırmalar. Ankara Üniversitesi, Yüksek Lisans Tezi, 144s, Ankara.
- Meyer, R.V., 1988. *Practical High Performance Liquid Chromatography*. JohnWiley & Sons, 324p, Toronto, Canada.
- Mistri, H.N., Jangid, A.G., Shrivastav, P.S., 2007. Liquid Chromatography Tandem Mass Spectrometry Method For Simultaneous Determination of Antidiabetic Drugs Metformin and Glyburide in Human Plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45, 97–106.
- Mudaliar, S., Henry, R.R., 2001. New Oral Therapies For Type 2 Diabetes Mellitus: the Glitazones or Insulin Sensitizers. *Annual Review of Medicine*, 52, 239–257.
- Narasimham, L., Barhate, V.D., 2011. Physico-chemical Characterization of Some Beta Blockers and Antidiabetic Drugs - Potentiometric And Spectrophotometric pK<sub>a</sub> Determination in Different Co-solvents. *European Journal of Chemistry*, 2(1), 36-46.
- Nazır, I., Rahman, N., Madni, A., 2009. Preparation And in Vitro Dissolution of Glipizide Sustained Release Tablets. *Turk Journal Pharmaceutical Science*, 6(1), 43-50.

- Nesto, R.W., Bell, D., Bonow, R.O., Fonseca, V., Grundy, S.M., Horton, E.S., Le Winter, M., Porte, D., Semenkovich, C.F., Smith, S., Young, L.H., Kahn, R., 2003. Thiazolidinedione Use, Fluid Retention, and Congestive Heart Failure: A Consensus Statement From the American Heart Association and American Diabetes Association. *Circulation*, 108, 2941–2948.
- NLREG Nonlinear Regression Analysis and Curve Fitting Program, Version 4.0. Erişim Tarihi : 16.02.2011 <http://www.nlreg.com>.
- Önal, A., 2009. Spectrophotometric and HPLC Determinations of Anti-diabetic Drugs, Rosiglitazone Maleate and Metformin Hydrochloride, in Pure Form and in Pharmaceutical Preparations. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 44, 4998-5005.
- Özden, T., 2011. Enalapril Maleat Ve Hidroklorotiazidi Birlikte İçeren Kombine Farmasötik Preparatlardan Bu Maddelerin Aynı Anda Analizi İçin Yeni Kromatografik Yöntem Geliştirilmesi. Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 173s, Ankara.
- Papadoyannis, I.N., Samanidou, V.F., 2004. Validation of Instrumentation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 27, 753-783.
- Park, S.H., Choi, H.K., 2006. The Effects of Surfactants on The Dissolution Profiles of Poorly Water-soluble Acidic Drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 321, 35–41.
- Pathare, D.B., Jadhav, A.S., Shingare, M.S., 2007. RP-LC Determination of the cis-Isomer of Glimepiride in a Bulk Drug Substance. *Chromatographia*, 66, 639–641.
- Patlak, M., 2002. New Weapons to Combat an Ancient Disease: Treating Diabetes. *Faseb Journal*, 16(14), 1853.
- Poole, C.F., Poole, S.K., 1991. *Chromatography Today*. Elsevier Science, 1026p, Amsterdam.
- Radhakrishna, T., Rao, D.S., Reddy, G.O., 2002a. Determination of Pioglitazone Hydrochloride in Bulk and Pharmaceutical Formulations by HPLC and MEKC Methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29, 593–607.
- Radhakrishna, T., Satyanarayana, J., Satyanarayana, A., 2002b. LC Determination of Rosiglitazone in Bulk and Pharmaceutical Formulation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 29, 873–880.
- Remko, M., 2009. Theoretical Study of Molecular Structure,  $pK_a$ , Lipophilicity, Solubility, Absorption, and Polar Surface Area of Some Hypoglycemic Agents. *Journal of Molecular Structure Theochem*, 897, 73–82.

- Riddle, M.C., 1999. Oral Pharmacologic Management of Type 2 Diabetes. *American Family Physician*, 60, 2613-2620.
- Riley, C.M., Rosanske, T.W., 1996. *Development and Validation of Methods*. Elsevier Science Ltd, 363p, New York.
- Sekikawa, A., LaPorte, R.E., 1997. Epidemiology of Insulin Dependent Diabetes Mellitus. *International Textbook of Diabetes Mellitus*, 1, 89-96.
- Sewell, P.A., Clarke, B., Kealey, D., 1987. *Chromatographic Separations*. John Wiley & Sons, 138p, London.
- Shabir, G.A., 2003. Validation High Performance Liquid Chromatography Methods for Pharmaceutical Analysis. Understanding the Differences and Similarities Between Validation Requirements of the US Food and Drug Administration, the US Pharmacopeia and the International Conference on Harmonization. *Journal of Chromatography A*, 987, 57-66.
- Shaodong, J., Lee, W.J., Ee, J.W., Park, J.H., Kwon, S.W., Lee, J., 2010. Comparison of Ultraviolet Detection, Evaporative Light Scattering Detection and Charged Aerosol Detection Methods For Liquid Chromatographic Determination of Anti-diabetic Drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51, 973-978.
- Singh, O.P.B., Biswal, S., Sahoo, J., Murthy, P.N., 2009. Physicochemical Properties of Glimepiride in Solid Dispersions with Polyethylene Glycol 20000. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Nanotechnology*, 2(2), 537-543.
- Skoog, D.A., Holler, F.J. Nieman T.A., 1998. *Enstrümantal Analiz İlkeleri*. Çev. Kılıç, E., Köseoğlu, F., Yılmaz, H. Bilim Yayıncılık, 849s. Ankara.
- SPARC, Erişim Tarihi: 03.01.2009. <http://ibmlc2.chem.uga.edu/sparc>
- Swartz, M.E., Krull, I.S., 1997. *Analytical Method Development and Validation*, Marcel Dekker, 96p, New York.
- Şen, M., 2006. *Tip 2 Diyabet Tedavisinde İnsülin Duyarlılık Artırıcı İlaçların Yeri*. Ankara Üniversitesi, Tezsiz Yüksek Lisans Dönem Projesi, 72s, Ankara.
- Thombre, A.G., DeNoto, A.R., Gibbes, D.C., 1999. Delivery of Glipizide From Asymmetric Membrane Capsules Using Encapsulated Excipients. *Journal of Controlled Release*, 60, 333-341.
- Torul, H., 2009. *Farmasötik Formlarda İlaç Etken Maddelerinin HPLC İle Enantiyomer Tayinleri*. Gazi Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 115s, Ankara.
- Turfaner N., 2007. Recent Advances in The Management of Type 2 Diabetes Mellitus. *Türk Aile Hekimleri Dergisi*, 11(1), 43-47.

- Türkiye İlaç ve Eczacılık Genel Müdürlüğü (İEGM), 2011. Rosiglitazon içeren ürünler hakkında önemli duyuru. Erişim Tarihi: 18.02.2011. <http://www.iegm.gov.tr/Showing.aspx?q=rosiglitazon&lang=tr-TR&process=search>
- Tyagi, S., Kumar, S., Kumar, A., Singla, M., 2010. Synthesis of Analouges of Sulphonylureas as Antidiabetic Drugs and Their Activity Studies. *International Journal of Pharma World Research*, 1(2), 1-16.
- Vasudevan, M., Ravi, J., Ravisankar, S., Suresh, B., 2001. Ion-pair Liquid Chromatography Technique For The Estimation of Metformin in Its Multicomponent Dosage Forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 25, 77–84.
- Venkatesh, P., Harisudhan, T., Choudhury, H., Mullangi, R., Srinivas, N.R., 2006. Simultaneous Estimation of Six Anti-diabetic Drugs-Glibenclamide, Gliclazide, Glipizide, Pioglitazone, Repaglinide and Rosiglitazone: Development of a Novel HPLC Method For Use in The Analysis of Pharmaceutical Formulations and Its Application to Human Plasma Assay. *Biomedical Chromatography*, 20, 1043–1048.
- Verma, R.K., Garg, S., 2005. Selection of Excipients For Extended Release Formulations of Glipizide Through Drug–Excipient Compatibility Testing. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 38, 633–644.
- Wang, M., Miksa, I.R., 2007. Multi-component Plasma Quantitation of Anti-hyperglycemic Pharmaceutical Compounds Using Liquid Chromatography–Tandem Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 856, 318–327.
- White, R., 1990. *Chromatography/ Fourier Transform Infrared Spectroscopy and Its Applications*. Marcel Dekker Inc, 328p, New York.
- Winters, C.S., Shields, Timmins, L., P., York, P., 1994. Solid-state Properties and Crystal Structure of Gliclazide. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83(3), 300-304.
- Yao, J., Shi, Y.Q., Li, Z.R., Jin, S.H., 2007. Development of a RP-HPLC Method For Screening Potentially Counterfeit Anti-diabetic Drugs. *Journal of Chromatography B*, 853, 254–259.
- Yardımcı, C., Özaltın, N., 2005. Method Development and Validation For The Simultaneous Determination of Rosiglitazone and Metformin in Pharmaceutical Preparations by Capillary Zone Electrophoresis. *Analytica Chimica Acta*, 549, 88–95.
- Yardımcı, C., Özaltın, N., Gürlek, A., 2007. Simultaneous Determination of Rosiglitazone and Metformin in Plasma by Gradient Liquid Chromatography with UV Detection. *Talanta*, 72, 1416–1422.

Yu, J., Ma, K., Qi, J., Jin G., Wang, V., Fang, S., Li, G., 2008. Bioequivalence And Comparison of Pharmacokinetic Properties Of 4-mg Tablet Formulations Of Rosiglitazone Hydrochloride And Rosiglitazone Maleate: A Single-Dose, Randomized, Open-Label, Two-Period Crossover Study in Healthy Adult Male Chinese Volunteers. *Clinical Therapeutics*, 30(12), 2272-2279.

Zinman, B., 2001. Actos (pioglitazone hydrochloride) Package Insert; Avandia (rosiglitazone maleate) Package Insert, *Diabetes Obesity Metabolism*, 3 (1), 34-43.

## ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Dilara BAŞAT  
Doğum Yeri ve Yılı : Isparta, 1981  
Medeni Hali : Bekar  
Yabancı Dili : İngilizce  
E-posta : dilarabasat@hotmail.com



## Eğitim Durumu

Lise : Isparta Şehit Ali İhsan Kalmaz Lisesi, 1999  
Lisans : SDÜ, Fen-Edebiyat Fakültesi Kimya Bölümü, 2003  
Tezli Yüksek Lisans : SDÜ, Fen Bilimleri Enstitüsü, Kimya Anabilim Dalı, 2006  
Tezsiz Yüksek Lisans : SDÜ, Burdur Eğitim Fakültesi, Ortaöğretim Fen ve Matematik Alanları Eğitimi Anabilim Dalı, 2007

## Mesleki Deneyim

Isparta Dershanesi, Kimya Öğretmeni 2003-2004  
Sınav Dergisi Dershanesi, Kimya Öğretmeni 2004-2005  
Birey Dershanesi, Kimya Öğretmeni 2005-2007  
Bitlis Eren Üniversitesi, Araştırma Görevlisi 2009-.....(halen)

## Yayımları

Demiralay, E.C., Basat, D., Canbay, H.S., Alsancak, G., Uslu, B., 2012.  
Determination of pK<sub>a</sub> Values of Opipramol in Acetonitrile-water Binary Mixtures by Using Chromatographic and Spectrophotometric Methods, Global Journal of Analytical Chemistry, 3(11), 1-9.