

T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KABERGOLİN VE TADALAFİL'İN ASİTLİK SABİTLERİNİN TAYİNİNDE  
SPEKTROFOTOMETRİ, POTANSİYOMETRİ VE YÜKSEK PERFORMANSLI  
SIVI KROMATOĞRAFİSİ**

**Kim. Merve Banu POLAT**

**Analitik Kimya Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ANKARA  
2016**



T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**KABERGOLİN VE TADALAFİL'İN ASİTLİK SABİTLERİNİN TAYİNİNDE  
SPEKTROFOTOMETRİ, POTANSİYOMETRİ VE YÜKSEK PERFORMANSLI  
SIVI KROMATOĞRAFİSİ**

Kim. Merve Banu POLAT

Analitik Kimya Programı  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. Nursabah E. Başcı

ANKARA  
2016

## ONAY SAYFASI

Anabilim Dalı : **Analitik Kimya**  
 Program : **Analitik Kimya**  
 Tez Başlığı : **Kabergolin ve Tadalafil'in Asitlik Sabitlerinin Tayininde Spektrofotometri, Potansiyometri ve Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi**  
 Öğrenci Adı-Soyadı : **Merve Banu Polat**  
 Savunma Sınavı Tarihi : **28.06.2016**

Bu çalışma jürimiz tarafından yüksek lisans/~~doğtora~~ tezi olarak kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:	<b>Prof. Dr. Sedef Kır</b> (Hacettepe Üniversitesi)	(İmza) 
Tez danışmanı:	<b>Prof. Dr. Nursabah E. Başcı</b> (Hacettepe Üniversitesi)	(İmza) 
Üye:	<b>Prof. Dr. Bengi Uslu</b> (Ankara Üniversitesi)	(İmza) 
Üye:	<b>Prof. Dr. Nuran Özaltın</b> (Hacettepe Üniversitesi)	(İmza) 
Üye:	<b>Doç. Dr. İncilay Süslü</b> (Hacettepe Üniversitesi)	(İmza) 

### ONAY

Bu tez Hacettepe Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri tarafından uygun görülmüş ve Sağlık Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

  
(İmza)

Prof. Dr. Diclehan ORHAN  
Müdür

## TEŞEKKÜR

Bilgi ve deneyimleriyle destek olan ve yol gösteren hocam Sayın Prof. Dr. Nursabah E. Başcı'ya,

Teorik ve pratik derslerde öğrettikleri değerli bilgiler için Analitik Kimya Anabilim Dalımızın saygıdeğer hocalarına,

Her daim yardımı, desteği ve samimiyeti ile yanımda olan sevgili Arş. Gör. Dr. Ayşegül Doğan'a,

Gösterdikleri samimiyet ve yardımları için sevgili laboratuvar arkadaşlarıma,

Her konuda destek olduğu ve hoşgörü gösterdiği için sevgili eşim Emrah Polat'a ve canım kardeşim Zeynep Elif Koç'a,

Bu günlere gelmemi sağladıkları için sevgili annem, babam, anneannem, dedem başta olmak üzere bütün aileme,

Hatırası ile daima yanımda olan merhum teyzem Aynur Şener'e de verdiği emek için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

## ÖZET

**Polat, M. B. Kabergolin ve Tadalafil'in asitlik sabitlerinin tayininde Spektrofotometri, potansiyometri ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Programı Yüksek Lisans Tezi, Ankara, 2016.** Asidik iyonlaşma sabiti ( $pK_a$ ) ilacın vücutta absorpsiyonu, dağılımı ve eliminasyonu mekanizmalarında önemli bir fizikokimyasal parametredir. İlaç etkin maddelerinin  $pK_a$  değerlerinin belirlenmesi için çeşitli analitik yöntemlerden yararlanır, bu amaçla potansiyometri, spektrofotometri ve HPLC yaygın kullanılır. Kabergolin, parkinson hastalığının tedavisinde kullanılan güçlü ve uzun süreli prolaktin düşürücü etkiye sahip bir dopaminerjik ergolin türevidir. Tadalafil ise, cinsel uyarı ile lokal nitrik oksit salınımı sırasında, Tadalafil'in PDE5 inhibisyonu ile korpus kavernozum cGMP seviyesinde artış meydana getirir. Bu tez çalışmasında, Kabergolin ve Tadalafil etkin maddelerinin  $pK_a$  değerlerinin potansiyometrik, spektrofotometrik veya HPLC yöntemleri ile saptanabilirliği incelenmiştir. Kabergolin'in  $pK_a$  değeri, potansiyometri, spektrofotometri ve HPLC yöntemleriyle sırasıyla 6.43, 6.05 ve 6.00 olarak bulunmuştur. Spektrofotometrik  $pK_a$  değeri diğer yöntemlerden anlamlı biçimde farklı bulunmuş ( $p>0.05$ ) ve Kabergolin'in  $pK_a$  tayini için potansiyometrik ve HPLC yöntemlerinin uygun olduğu belirlenmiştir. Tadalafil'in  $pK_a$  değeri ise potansiyometrik ve spektrofotometrik yöntemleri ile sırasıyla 3.52 ve 3.44 olarak hesaplanmıştır. Ancak, HPLC çalışmalarında Tadalafil için hareketli fazın pH'sındaki artışla kapasite faktöründe değişimi saptanamamıştır. Kabergolin ve Tadalafil'in  $pK_a$  tayini için geliştirilen yöntemler yüksek tekrarlanabilirlik ( $BSS<1\%$ ) göstermektedir. Bu çalışmada, Kabergolin ve Tadalafil için geliştirilen yöntemlerle deneysel olarak elde edilen  $pK_a$  değerleri ile yaygın kullanılan yazılım programları ile hesaplanan  $pK_a$  değerleri karşılaştırıldığında, büyük oranda tutarsızlık gözlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Kabergolin, Tadalafil,  $pK_a$ , spektrofotometri, potansiyometri, HPLC

## ABSTRACT

**Polat, M. B. Spectrophotometry, potentiometry and HPLC in Determination of Acidity Constant for Cabergoline and Tadalafil, Hacettepe University Graduate School of Health Sciences, Analytical Chemistry Master Degree, Ankara, 2016.**

Acidic dissociation constant ( $pK_a$ ) is an important physicochemical parameter in absorption, dissociation and elimination mechanisms of drugs in body. Various analytical methods are utilized for the determination of  $pK_a$  values of pharmaceutical active ingredients, and potentiometry, spectrophotometry and HPLC are the most common methods. Cabergoline is dopaminergic ergoline derivative having a powerful and long term prolactin reducing effect which is used for the treatment of parkinson disease. Tadalafil leads an increase in the level of Corpus cavernosum cGMP during emission of nitric oxide in consequence of sexual arousal. In this thesis, the detection of  $pK_a$  values for Cabergoline and Tadalafil by using potentiometry, spectrophotometry or HPLC were investigated. The  $pK_a$  value for Cabergoline was found to be 6.43, 6.05 and 6.00 by spectrophotometry, potentiometry and HPLC. Spectrophotometric  $pK_a$  value was significantly different ( $p > 0.05$ ) from others, and potentiometry and spectrophotometry were found to be appropriate for  $pK_a$  value determination of Cabergoline.  $pK_a$  value for Tadalafil by potentiometry and spectrophotometry was found to be 3.5 and 3.44, respectively. But, in HPLC, no change was observed in retention times of Tadalafil by increasing pH value of mobile phase. Developed methods for determination of  $pK_a$  values for Cabergoline and Tadalafil demonstrated high repeatabilities ( $RSD < 1\%$ ). In this study, experimental  $pK_a$  values for Cabergoline and Tadalafil from developed methods were compared with the values calculated by the common softwares, a large level divergence was observed.

**Key Words:** Cabergoline, Tadalafil,  $pK_a$ , Spectrophotometry, Potentiometry, HPLC

## İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER ve KISALTMALAR	x
ŞEKİLLER	xi
TABLolar	xiii
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1. Asidik İyonlaşma Sabiti	2
2.2. Suda Az Çözünen Bileşikler için pK <sub>a</sub> Tayini	4
2.3. Potansiyometrik Yöntem	4
2.3.1. Potansiyel Ölçümleri için Cam Elektrot	4
2.3.2. Potansiyometrik Titrasyonlar	5
2.3.3. Potansiyometrik Titrasyonlar ile pK <sub>a</sub> Tayini	6
2.4. UV-GB Absorpsiyon Spektrofotometrisi	15
2.4.1. Beer Yasası	17
2.4.2. Beer Yasasından Sapmalar	18
2.4.3. UV-GB Spektrofotometreleri	18
2.4.4. UV-GB Spektrofotometrisi ile pK <sub>a</sub> Tayini	20
2.5. HPLC Yöntemi	25
2.5.1. Kromatografi	25
2.6. pK <sub>a</sub> Tayini Çalışmaları	33
2.7. Kabergolin (KAB)	35
2.7.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	35
2.7.2. Etki Mekanizmaları	35
2.7.3. Farmakodinamik Özellikleri	36



2.7.4. Farmakokinetik Özellikleri	36
2.7.5. Endikasyonları	36
2.7.6. Yan Etkileri	37
2.7.7. İlaç ve Diğer Etkileşimler	37
2.7.8. Uyarılar ve Önlemler	37
2.8. Tadalafil (TAD)	39
2.8.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri	39
2.8.2. Etki Mekanizması	39
2.8.3. Farmakodinamik Özellikleri	39
2.8.4. Farmakokinetik Özellikleri	40
2.8.5. Endikasyonları	40
2.8.6. Kontrendikasyonları	40
2.8.7. Yan Etkileri	40
2.8.8. TAD Analiz Yöntemleri	40
3. GEREÇ ve YÖNTEM	42
3.1. Cihazlar	42
3.2. Kimyasal Maddeler	42
3.3. Cam ve Sarf Malzemeler	43
3.4. Deneyler İçin Gerekli Hazırlıklar	44
3.4.1. Çözeltilerin Hazırlanması	44
3.5. pK <sub>a</sub> Analizi Yöntemleri	49
3.5.1. Potansiyometrik Yöntem ile pK <sub>a</sub> Analizi	49
3.5.2. Spektrofotometrik Yöntem ile pK <sub>a</sub> Analizi	51
3.5.3. HPLC Yöntemi ile pK <sub>a</sub> Analizi	52
4. BULGULAR	53
4.1. Potansiyometrik Yöntem	53
4.1.1. KAB için Potansiyometrik Yöntem ile pK <sub>a</sub> Tayini	53
4.1.2. TAD için Potansiyometrik Yöntem ile pK <sub>a</sub> Tayini	57
4.2. Spektrofotometrik Yöntem	59
4.2.1. KAB için Spektrofotometrik Yöntem ile pK <sub>a</sub> Tayini	59

4.2.2. TAD için Spektrofotometrik Yöntem ile pK <sub>a</sub> Tayini	60
4.3. HPLC Yöntemi	62
4.3.1. KAB için HPLC Yöntemi ile pK <sub>a</sub> Tayini	62
4.4. pK <sub>a</sub> Tayin Yöntemleri için Tekrarlanabilirlik Çalışmaları	66
4.4.1. Spektrofotometrik Yöntem için Tekrarlanabilirlik	66
4.4.2. HPLC Yöntemi için Tekrarlanabilirlik	68
5. TARTIŞMA	71
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	80
KAYNAKLAR	82
EKLER	
Ek 1. Potansiyometrik Titrasyon ile pK <sub>a</sub> Tayininde Elektrot Kalibrasyonu	
Ek 2. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması	
Ek 3. Mann-Whitney U testi	
Ek 4. Kruskal Wallis Varyans Testi	
EK 5. İyonik Şiddet	
ÖZGEÇMİŞ	

## SİMGELER ve KISALTMALAR

$\mu\text{L}$	Mikrolitre
ACN	Asetonitril
DAD	Dizi diyot dedektör
dk	Dakika
H	Teorik tabaka yüksekliği
$\text{H}_3\text{PO}_4$	Ortofosforikasit
HPLC	Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
$k'$	Kapasite faktörü
M	Molarite
MeOH	Metanol
mg	Miligram
mL	Mililitre
mM	Milimolar
N	Teorik tabaka sayısı
$\text{NaH}_2\text{PO}_4$	Sodyumdihidrojen fosfat
NaOH	Sodyum hidroksit
ppm	Milyonda bir birim
R	Ayırıcılık
$R^2$	Tanımlayıcılık katsayısı
TEA	Trietilamin
$t_m$	Ölü zaman
$t_R$	Analitin alıkonma zamanı
UV	Ultraviyole (Morötesi)
UV/GB	Ultraviyole/Görünür Bölge
$\alpha$	Seçicilik

## ŞEKİLLER

Şekil	Sayfa No	
2.1.	$pK_a = 8$ olan bir asidin yüzde iyonlaşmasını gösteren grafik (5)	2
2.2.	Potansiyometrik ölçümlerde kullanılan cam elektrot (1)	5
2.3.	Potansiyometrik titrasyon eğrisi (1)	6
2.4.	Gran fonksiyonu ile dönüştürülmüş bir titrasyon eğrisi	8
2.5.	Düzlemsel polarlanmış dalga	16
2.6.	Işının madde tarafından absorplanması	16
2.7.	Tek ışın yollu spektrofotometre	19
2.8.	Çift ışın yollu spektrofotometre	19
2.9.	HPLC cihazının temel bileşenleri (1)	27
2.10.	Alikonma süresi ve ölü hacim süresi (1)	29
2.11.	Asimetri faktörü	31
4.1.	KAB'ın MeOH:su (50:50, h/h) ortamında KOH ile potansiyometrik titrasyonu eğrisi	53
4.2.	KAB için MeOH:su (50:50, h/h) ortamında titrant hacmi ile $\phi$ değerinin değişimi grafiği	54
4.3.	KAB için MeOH:su (50:50, h/h) ortamında titrant hacmine karşılık $\phi$ değeri grafiğinin doğrusal olduğu kısım	54
4.4.	KAB'ın MeOH:su (40:60, h/h) ortamında KOH ile potansiyometrik titrasyonu eğrisi	55
4.5.	KAB için MeOH:su (40:60, h/h) ortamında titrant hacmi ile $\phi$ değerinin değişimi grafiği	56
4.6.	KAB için MeOH:su (40:60, h/h) ortamında titrant hacmine karşılık $\phi$ değeri grafiğinin doğrusal olduğu kısım	56
4.7.	TAD'ın MeOH:su (60:40, h/h) ortamında KOH ile potansiyometrik titrasyonu eğrisi	57
4.8.	TAD için MeOH:su (60:40, h/h) ortamında titrant hacmi ile $\phi$ değerinin değişimi grafiği	58

4.9.	TAD için MeOH:su (40:60, h/h) ortamında titrant hacmine karşılık $\phi$ değeri grafiğinin doğrusal olduğu kısım	58
4.10.	KAB için farklı pH değerlerindeki ve 0.01 M NaOH (a) ve 0.01 M HCl (b) çözeltilerindeki UV spektrumları	59
4.11.	TAD için farklı pH değerlerindeki ve 0.01 N NaOH (a) ve 0.01 N HCl (b) çözeltilerindeki UV spektrumları	61
4.12.	KAB için C18 kolonunda ACN yüzdelerine göre kapasite faktörü ( $k'$ ) değişimi	63
4.13.	KAB için C18 kolonunda ACN yüzdelerine göre pik asimetri oranı değişimi	64
4.14.	HPLC ile KAB 'e ait pH'a karşılık kapasite faktörü grafiği	65
4.15.	KAB'ın HPLC ile analizinde elde edilen $\text{pH}-d^2k/d\text{pH}^2$ eğrisi	65
4.16.	Örnek kromatogramlar: (a) hareketli faz ve (b) standart KAB ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ )	66
5.1.	KAB için ACE & JChem program ile $\text{pK}_a$ hesaplanması sonucu KAB molekülüne ait atomların numaralandırılması	74
5.2.	ACD/Labs programı ile KAB molekülü için öngörülen aktif bölgeler	75
5.3.	KAB molekülünün protonlanmış hali	75
5.4.	İlk protonu verdikten sonra öngörülen KAB molekülü	76
5.5.	İkinci iyonlaşmadan sonraki öngörülen KAB molekülü	76
5.6.	pH 13.6 değerinde gerçekleşmesi öngörülen iyonlaşmanın ardından KAB molekülü	77
5.7.	ACE & JChem programında TAD molekülüne ait numaralandırma	77
5.8.	ACD/Labs programı ile TAD molekülü için öngörülen aktif bölgeler	78

## TABLOLAR

Tablo	Sayfa No
2.1. $pK_a$ tayininde kullanılan yöntemler ve özellikleri	33
2.2. KAB'ın yapısı ve özellikleri	35
2.3. KAB analiz yöntemleri	38
2.4. TAD'ın fiziksel ve kimyasal özellikleri	39
2.5. TAD analiz yöntemleri	41
3.1. Potansiyometrik yöntemde kullanılan stok çözeltiler ve hazırlanması	44
3.2. KAB için potansiyometrik yöntemde kullanılan stok çözeltiden MeOH:su (50:50, h/h) ortamında hazırlanan çözeltiler	45
3.3. KAB için potansiyometrik yöntemde kullanılan stok çözeltiden MeOH:su (40:60, h/h) ortamında hazırlanan çözeltiler	45
3.4. TAD için potansiyometrik yöntemde kullanılan stok çözeltiden MeOH:su (60:40, h/h) ortamında hazırlanan çözeltiler	46
3.5. Spektrofotometrik yöntemde kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	47
3.6. HPLC yönteminde kullanılan çözeltiler ve hazırlanması	48
3.7. KAB'ın MeOH:su (50:50, h/h) ortamındaki potansiyometrik analiz koşulları	50
3.8. KAB'ın MeOH:su (40:60, h/h) ortamındaki potansiyometrik analiz koşulları	50
3.9. TAD'ın MeOH:su (60:40, h/h) ortamındaki potansiyometrik analiz koşulları	50
3.10. KAB'ın HPLC ile analizindeki koşullar	52
4.1. Değişen pH'lardaki absorban değerlerinden $pK_a$ hesaplanması	60
4.2. Değişen pH'lardaki absorban değerlerinden $pK_a$ hesaplanması	61
4.3. KAB'ın HPLC yöntemi ile $pK_a$ tayini için kolon türü ve hareketli faz bileşiminin kapasite faktörüne etkisi	62
4.4. KAB'ın HPLC yöntemi ile $pK_a$ tayini için C18 kolonda hareketli faz bileşiminin alıkonma ve pik simetrisine etkisi	63

4.5.	Farklı pH değerlerindeki KAB ve URA'e ait alıkonma zamanları ile KAB'e ait kapasite faktörleri	64
4.6.	KAB etkin maddesinin spektrofotometrik yöntem ile pK <sub>a</sub> tayini için cihaz ve yöntem tekrarlanabilirliği bulguları	67
4.7.	TAD etkin maddesinin spektrofotometrik yöntem ile pK <sub>a</sub> tayini için cihaz ve yöntem tekrarlanabilirliği bulguları	68
4.8.	KAB etkin maddesinin HPLC yöntemi ile pK <sub>a</sub> tayini için enjeksiyon ve yöntem tekrarlanabilirliği bulguları	69
4.9.	KAB ve TAD maddeleri için spektrofotometri, potansiyometri ve HPLC yöntemleri ile deneysel olarak hesaplanan pK <sub>a</sub> değerleri*	70
5.1.	KAB molekülüne ait ACE & JChem veACD/Labs programları ile hesaplanmış pK <sub>a</sub> değerleri	79

## 1. GİRİŞ

Asidik iyonlaşma sabiti ( $pK_a$ ) endüstride ilaç tasarımı ve ilacın vücutta absorpsiyonu, dağılımı ve eliminasyonu mekanizmalarında önemli rol oynayan bir fizikokimyasal parametredir. Henderson-Hasselbalch (1) denklemine göre belirlenebilen iyonize ve noniyonize formlar; ilacın hücre içine geçişleri, plazma proteinlerine bağlanmaları ve dokuda penetrasyonunda anahtar rol oynar. İlaçların farklı pH değerlerindeki iyonlaşma dereceleri vücutta biyolojik membranlardan geçişlerini, dolayısıyla; farmakodinamik/farmakokinetik özelliklerini ve ilacın uygulanma yolunu belirleyen en önemli unsurlardandır. Bu nedenle, yeni/aday ilaç moleküllerinin geliştirilmesinde ya da kullanımdaki ilaçların biyofarmasötik sınıflandırılmasındaki (BCS) yerinin belirlenmesinde, ilacın çözünürlüğünü ve membranlardan geçişini doğrudan etkilediği için  $pK_a$  değeri belirlenmesi gereken bir parametredir (2). İlaç etkin maddelerinin  $pK_a$  değerlerinin belirlenmesinde potansiyometrik, spektrofotometrik ve kromatografik yöntemler gibi birçok farklı yöntemden yararlanılmaktadır.

Kabergolin, güçlü ve uzun süreli prolaktin düşürücü etkiye sahip bir dopaminerjik ergolin türevidir. Hipofiz laktotrofları üstündeki D2-dopamin reseptörlerini doğrudan uyarıp prolaktin sekresyonunu inhibe ederek etkisini gösterir. Kabergolin, serum prolaktin düzeylerini düşüren dozdan daha yüksek oral dozlarda, D2 reseptörünü uyarma yolu ile santral dopaminerjik etki de sergiler. Bu özelliği nedeniyle Kabergolin parkinson hastalığının tedavisinde kullanılır (3,4).

Tadalafil, siklik guanozin monofosfat'a (cGMP) spesifik fosfodiesteraz tip 5'in (PDE5) geri dönüşümlü ve seçici inhibitörüdür. PDE5 inhibisyonu, korpus kavernozum cGMP seviyesini artırır ve düz kasları gevşeterek penil dokuya kan dolmasına neden olur.

Bu tez çalışmasında, Kabergolin ve Tadalafil etkin maddelerinin  $pK_a$  değeri potansiyometrik, spektrofotometrik ve HPLC yöntemleri ile deneysel olarak saptanacaktır.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Asidik İyonlaşma Sabiti

Zayıf asitler suda çözüldüğünde, kısmi iyonlaşma meydana gelir. İyonlaşan asidin kuvveti iyonlaşma sabiti ile tanımlanır.

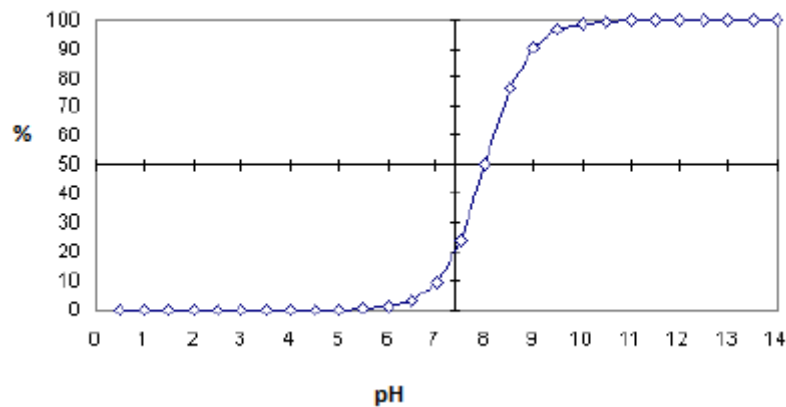


$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad (2.2)$$

İyonlaşma sabiti ( $pK_a$ ), bir asidin veya bazın gücünü belirleyen bir parametredir.  $pK_a$ , verilen herhangi bir pH değerinde bir molekülün üzerindeki yükü belirlemeye izin verir.  $pK_a$ , bir bileşiğin noniyonize ve iyonize formlarının denge sabitlerinin negatif logaritması ile tanımlanır. Bu değer, bir molekülün herhangi bir pH değerinde iyonize ve noniyonize türlerin oranını ve bileşiğin asidik veya bazik özelliğe sahip olduğunu gösterir.

$$pK_a = -\log K_a \quad (2.3)$$

Artan pH değeri, ortamdaki molekülün iyonlaşma yüzdesini değiştirir (Şekil 2.1).



Şekil 2.1.  $pK_a = 8$  olan bir asidin yüzde iyonlaşmasını gösteren grafik (5)

Çözelti ortamının asit veya baz eklenmesi veya seyreltilmesi durumunda pH değerinin değişmesine direnç gösteren çözeltilere *tampon çözelti* denir. Tampon çözeltiler, konjuge asit-baz çiftlerinden hazırlanır. Tampon çözeltiler, başta insan vücudu olmak üzere birçok biyolojik ve kimyasal durumda karşımıza çıkmaktadır.  $pK_a$  değeri, ilacın membranlardan geçişi ile vücutta absorpsiyon, dağılma ve eliminasyon mekanizmalarının anlaşılmasında çok önemlidir (6).

Tampon çözeltilerin pH değerinin hesaplanması biyokimyasal süreçler için hayati önem arz etmektedir. Bu nedenle Eşitlik 2.2'den türetilen Henderson-Hasselbalch eşitliği kullanılmaktadır.

$$pH = pK_a + \log \frac{c_{NaA}}{c_{HA}} \quad (2.4)$$

Burada  $c_{HA}$  noniyonize türün,  $c_{NaA}$  ise iyonize türün derişimini ifade etmektedir.

Henderson-Hasselbalch eşitliği, eczacılıkta bir ilacın vücut içindeki davranışını anlamak için kullanılan en önemli eşitliklerden biridir. Dolayısıyla  $pK_a$ , ilaç molekülünün davranışını anlamada kullanışlı bir parametredir. Bir molekülün farklı iyonik türlerinin fizikokimyasal ve biyolojik özellikleri farklılık gösterir. Bu durum aktif bölgeye sahip molekülün iyonize formunu saptamada önemlidir (5).

$pK_a$ , ilaç molekülünün değişik pH değerlerindeki iyonlaşma miktarını etkileyen önemli bir fizikokimyasal parametredir.  $pK_a$  bilinmesi, ilaç keşfi ve geliştirilmesi çalışmalarında büyük öneme sahiptir. İlaç sanayinde, biyoaktif moleküllerin asidik iyonlaşma sabiti ( $pK_a$ ) en önemli fizikokimyasal parametrelerden biridir. Birçok molekülün sahip olduğu asidik veya bazik özellikleri, yapıları ile dissosiyasyon katsayıları arasındaki ilişkileri ve maddelerin biyofarmasötik özelliklerini açıklamada ve ilaç geliştirme çalışmalarında kullanılmaktadır.

$pK_a$  hesaplanabilmesi için bileşiğin öncelikle çözünmesi gerekir. Çözünebilen moleküllerin iyonlaşması hakkında fikir yürütülebilir.

## 2.2. Suda Az Çözünen Bileşikler için $pK_a$ Tayini

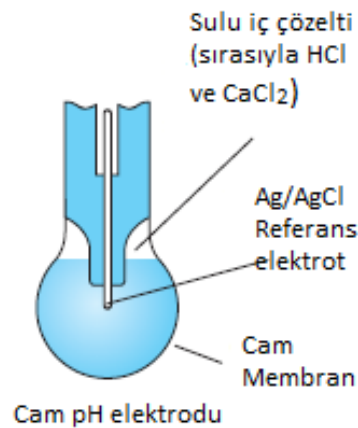
$pK_a$  tayini için kullanılan başlıca ortam sudur. Ancak bazı ilaçlar suda çok az çözünür ve bundan ötürü  $pK_a$  değerlerinin tayini için organik çözücülerin kullanıldığı farklı yöntemler geliştirilmiştir. Su-organik çözücü karışımları kullanılarak  $pK_a$  hesaplanabilmektedir.  $pK_a$  tayini için spektrofotometrik, potansiyometrik, kromatografik ve elektroforetik birçok yöntem geliştirilmiştir (7-9). Deneysel yolların dışında matematiksel algoritmalar yardımıyla bileşiğin temel kimyasal yapısından yola çıkarak reaktifliğin ve fizikokimyasal parametrelerin tahmin edildiği bilgisayar programları mevcuttur. Bu programlar yardımıyla birçok ilaç molekülünün deneysel olmayan  $pK_a$  değeri matematiksel modellemeler esas alınarak tahmin edilmiştir (10).

## 2.3. Potansiyometrik Yöntem

Bu yöntem elektrokimyasal hücrelerde farkedilir bir akım geçmiyor iken yapılan potansiyel ölçümlerine dayanır. Önceleri bu yöntem titrimetrik analiz yöntemleri olarak dönüm noktası belirlemede, daha sonra ise iyon seçici membran elektrotların varlığıyla iyon derişimi saptamada kullanılmıştır. Bir referans, bir çalışma elektrodu ve bir de potansiyel ölçüm cihazı içeren bu düzenekler ucuz ve pratiktir.

### 2.3.1. Potansiyel Ölçümleri için Cam Elektrot

Potansiyel ölçümü için en bilinen iyon seçici elektrot cam elektrottur. pH ölçümü için kullanılacak hücre, analiz edilecek çözeltiliye daldırılmış cam indikatör elektrot ve bir referans elektrottan (gümüş-gümüş klorür veya doygun kalomel elektrot) oluşur (Şekil 2.2).



**Şekil 2.2.** Potansiyometrik ölçümlerde kullanılan cam elektrot (1)

Cam indikatör elektrot, pH duyarlı cam bir membran içeren cam veya plastik tüptür. Tüpün içerisinde seyreltik HCl çözeltisi bulunmaktadır (veya klorür içeren bir tampon). Cam membranın bileşimi, proton ve diğer katyonlara karşı duyarlılığını etkiler. Değişik oranlarda  $\text{Na}_2\text{O}$ ,  $\text{CaO}$  ve  $\text{SiO}_2$  içeren bu membranlar, protona karşı yüksek seçiciliğe sahiptir. Ölçüm yapılmadan önce düşük, orta ve yüksek pH değerlerinde olmak üzere en az 3 noktada kalibre edilmesi gerekir. Cam elektrot çok yüksek ve çok düşük pH değerlerinin ölçümlerinde kullanılmaz; çünkü asit ve alkali hataları ölçümün doğruluğunu etkiler.

### 2.3.2. Potansiyometrik Titrasyonlar

Titrationların eşdeğerlik noktasının tayini nicel analizde büyük önem taşır. Uygun bir indikatör elektrodun kullanıldığı titrasyon yöntemine *potansiyometrik titrasyon* denir. Bu yöntemde indikatör elektrodun ölçülen potansiyeli ile eşdeğerlik noktası tayin edilir.

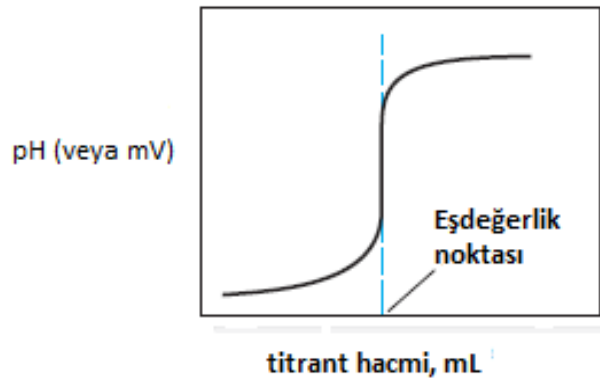
Potansiyometrik titrasyon, renk indikatörü kullanılarak yapılan titrasyona göre daha doğru veri elde etmemizi sağlar. Bu nedenle, potansiyometrik titrasyon çok yaygın kullanılmaktadır.

### 2.3.3. Potansiyometrik Titrasyonlar ile $pK_a$ Tayini

$pK_a$  tayininde bilinen ilk yöntem potansiyometrik titrasyonlardır.  $pK_a$  değeri 11'den küçük olan maddelerin  $pK_a$  değerlerinin hesaplanması için çok uygun bir yöntemdir. Ucuz ve basit oluşu potansiyometrik titrasyonu, en çok kullanılan  $pK_a$  tayin yöntemi yapmaktadır. Kullanılan elektrodun kararlı, duyarlılığı yüksek ve tekrarlanabilirliğe uygun olması gerekmektedir. Potansiyometrik titrasyon ile asit-baz tepkimeleri için cam elektrot kullanılmaktadır.

Suda çözünmeyen ilaç moleküllerinde değişik oranlarda organik çözücü-su karışımları kullanılıp ekstrapole edilerek  $pK_a$  hesaplanır (11).

Potansiyometrik titrasyon hacmi ve derişimi bilinen bir titrantın belli küçük miktarlarda analit çözeltisine eklenmesi ile yapılır. Her titrant eklenmesinden sonra değişen potansiyel (E), pH elektrodu yardımıyla düzenli olarak ölçülür. Hacme karşı ölçülen potansiyel grafiğe geçirilir ve elde edilen sigmoidal eğrideki potansiyel sıçraması denge potansiyelini verir. Bu potansiyel, pH'ları bilinen standartlar kullanılarak pH'a ondan da  $pK_a$ 'ya dönüştürülür. Geleneksel potansiyometrik titrasyonlar için kullanılan en düşük derişim limiti  $10^{-4} M$ 'dir (Şekil 2.3) (12).



Şekil 2.3. Potansiyometrik titrasyon eğrisi (1)

Bu tür su-çözücü karışımlarında "orijinal dilinde açık adı" (IUPAC) titrant olarak KOH'i önermektedir. Titrant ayarlı ve karbonat hatasını engelleyecek şekilde olmalıdır. Tüm titrasyon koşulları dikkate alınmalıdır, böylelikle su-organik çözücü karışımlarının özellikleri bilinir ve  $pK_a$  değerleri yorumlanabilir (13,14).

Analizi yapılan asit-baz ne kadar kuvvetli ise (yani  $pK_a$  değeri ne kadar fazlaysa) eşdeğerlik noktasına karşı gelen eğrinin keskinliği o kadar artar. Aynı şekilde  $pK_a$  değeri ne kadar küçükse, eğri daha da yayvanlaşır.

Asıl karmaşık olan suda az çözünen bileşiklerin  $pK_a$  değerlerinin hesaplanmasıdır. Bu tür bileşiklerin  $pK_a$  tayini için de potansiyometrik titrasyon yapılmaktadır. Potansiyometrik titrasyonlarda elde edilen sigmoidal eğrinin dönüm noktası değerini doğru olarak saptamak için en çok kullanılan yöntemler:

- Türev Yöntemi
- Yasuda-Shedlovsky Ekstrapolasyon Yöntemi
- Gran Fonksiyonu Yöntemi

**Türev Yöntemi:** Türev yöntemi ile potansiyometrik titrasyondaki dönüm noktasının belirlenmesinde daha kesin sonuçlar elde edilir. Türev yönteminde titrasyon eğrisinin birinci ve ikinci türevi alınır. Birinci türev eğrisi, eklenen titrant hacmine karşılık potansiyel değişiminin hacimdeki değişime oranı ( $\Delta E/\Delta V$ ) grafiğidir. Elde edilen eğrinin pik noktası, titrasyonun dönüm noktasını vermektedir.

İkinci türev eğrisi ise, eklenen titrant hacmine karşılık birinci türevin eğimi grafiğe geçirilerek elde edilir. İkinci türev eğrisinde eğrinin x-eksenini kestiği nokta titrasyonun dönüm noktasını vermektedir.

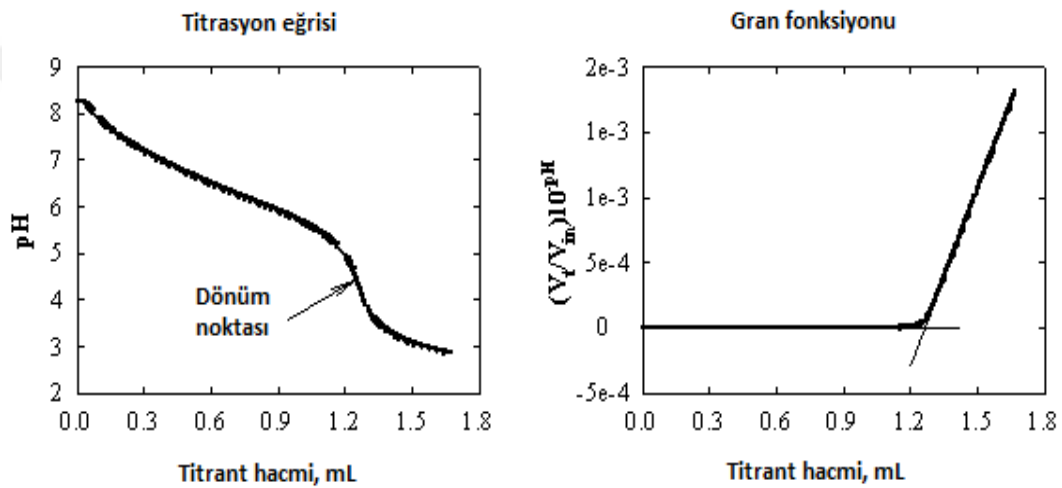
**Yasuda – Shedlovsky Ekstrapolasyon Yöntemi:** Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemi ile suda az çözünen bileşiklerin metanol, etanol, propanol, dimetilsülfoksit gibi çözücülerde  $pK_a$  değeri hesaplanabilmektedir. Yasuda-Shedlovsky eşitliği, hidroorganik çözücü karışımındaki  $pK_a$  değeri ( ${}_s pK_a$ ) ile dielektrik sabitinin tersinin ( $1/\epsilon$ ) doğrusal ilişkisine dayanmaktadır. Bu yöntemde ağırlıkça organik çözücü yüzdesine karşılık  $pK_a$  değerleri grafiğe geçirilir (15).

$${}_s pK_a + \log[H_2O] = \frac{A}{\epsilon} + B \quad (2.5)$$

Bu eşitlikte, A doğrusal denklemin eğimi; B ise ekseni kestiği nokta olup  $pK_a$  değerini %100 sulu ortam değerine yaklaştırmak için kullanılmaktadır.  $[H_2O]$  ise verilen çözücü karışımındaki suyun molar derişimini ifade etmektedir (16).

Bu eşitliğin kullanılabilmesi için en az 3 farklı organik çözücü yüzdelerinde  $pK_a$  tayini yapılmalıdır. Grafiğe geçirilen değerler yardımıyla  $pK_a$  hesaplamalarında ortamın organik çözücü yüzdesinin % 60'dan fazla olması durumunda bu eşitlik kullanılamamaktadır (17).

**Gran Fonksiyonu Yöntemi:** Potansiyometrik titrasyonun dönüm noktası, titrasyon eğrisinin büküm noktasıdır. Gran yaklaşımında, titrasyon eğrisi değerlerinin manipülasyonu ile doğrusal bir grafiğe dönüştürülmektedir (18) (Şekil 2.4).



$V_t/V_{in}$ : Seyrelme faktörü,  $V_t$ : t zamanındaki analit çözeltisinin hacmi,  
 $V_{in}$ : Başlangıç hacmi

**Şekil 2.4.** Gran fonksiyonu ile dönüştürülmüş bir titrasyon eğrisi

### Gran Eşitlikleri

#### Kuvvetli Monoprotik Asitler için

$C_a$  derişimi ve  $V_a$  hacmine sahip bir asidin,  $C_b$  derişimindeki MOH kuvvetli bazı ile titrasyonunu incelersek, ilave edilen kuvvetli baz ile analit çözeltisindeki asit tepkimeye girer, hem tepkimeye giren asit miktarı hem de eklenen baz ile artan hacim nedeniyle asit derişimi seyrelir. Eşdeğerlik öncesindeki  $[H^+]$  şu şekilde hesaplanır:

$$[H^+] = \frac{C_a V_a - C_b V_b}{V_a + V_b} \quad (2.6)$$

Eşdeğerlik noktasından sonra ise ortamda bazın fazlası bulunur. Ortamdaki  $[OH^-]$ ,

$$[OH^-] = \frac{C_b V_b - C_a V_a}{V_a + V_b} \quad (2.7)$$

şeklinde hesaplanır.

Asitle bazın etkileşmesi ise



$$[A^-] = \frac{C_a V_a}{V_a + V_b} \quad (2.9)$$

$$[M^+] = \frac{C_b V_b}{V_a + V_b} \quad (2.10)$$

$C_a$ , asidin;  $C_b$ , bazın başlangıç derişimini;  $\frac{V_a}{V_a + V_b}$  ve  $\frac{V_b}{V_a + V_b}$  ifadeleri ise; eklenen titrant ile seyrelme faktörlerini göstermektedir.

Eşitlik 2.8 için yük dengesi;

$$[H^+] + [M^+] = [A^-] + [OH^-] \quad (2.11)$$

$$[H^+] + \frac{C_b V_b}{V_a + V_b} = \frac{C_a V_a}{V_a + V_b} + [OH^-] \quad (2.12)$$

$$\Delta = [H^+] - [OH^-] \quad (2.13)$$

olduğunda,



$\emptyset$ , titrasyon sırasında nötralize edilen asidin mol oranıdır:

$$\emptyset_{ab} = \frac{C_b V_b}{C_a V_a} \quad (2.14)$$

$\emptyset_{ab}$  değeri, titrasyonun başında 0; eşdeğerlik noktasında ise 1'dir. Değişen  $V_b$  değeri ile değişir.

Eşdeğerlik noktasında doğrusal bir bağıntı elde etmek için;

$$\Delta = [H^+] - [OH^-] = \frac{C_a V_a - C_b V_b}{V_a + V_b} \quad (2.15)$$

denklemden yola çıkarak ve  $\emptyset_{ab} = 1$  olduğunda, eşdeğerlik noktasındaki titrant hacmi yerine  $V_{eş} = \frac{C_a V_a}{C_b}$  ifadesi konulduğunda;

$$\emptyset_{ab} = \frac{C_b V_{eş}}{C_a V_a} \quad (2.16)$$

ve

$$\Delta = [H^+] - [OH^-] = \frac{C_a V_a - C_b V_b}{V_a + V_b} \quad (2.17)$$

elde edilir. Bu eşitlikte  $C_a V_a = C_b V_{eş}$  denirse;

$$\Delta = \frac{C_b V_{eş} - C_b V_b}{V_a + V_b} \quad (2.18)$$

$$\Delta (V_a + V_b) = C_b (V_{eş} - V_b) \quad (2.19)$$

olacaktır. Bu eşitliğe göre,  $\Delta (V_a + V_b)$  ile  $V_b$  doğrusal bir ilişkiye sahiptir. Eşitliğin eğimi  $-C_b$ , y-ekseni kestirim noktası ise  $V_b = V_{eş}$ 'dir.

Asidik bölgede bu eşitlikte,

$$\Delta = [H^+] - [OH^-] \approx [H^+] \quad (2.20)$$

yaklaşımı yapıldığından;

$$[H^+] (V_a + V_b) = C_b (V_{e\check{s}} - V_b) \quad (2.21)$$

şeklinde ifade edilebilir.

Bu durumda asidik bölge için;

$$\emptyset = (V_0 + V_{MOH}) \cdot 10^{-pH} \quad (2.22)$$

elde edilir.

Bazik bölgede ise

$$\Delta = [H^+] - [OH^-] \approx -[OH^-] \quad (2.23)$$

yaklaşımı yapılır.

Buna göre,

$\Delta (V_a + V_b) = C_b (V_{e\check{s}} - V_b)$  ifadesi

$$-[OH^-] (V_a + V_b) = C_b (V_{e\check{s}} - V_b) \quad (2.24)$$

şeklinde gösterilebilir. İfade yeniden düzenlenince,

$$[OH^-] (V_a + V_b) = C_b (V_b - V_{e\check{s}})$$

$$\frac{K_{su}}{[H^+]} (V_a + V_b) = C_b (V_b - V_{e\check{s}})$$

$$\frac{(V_a + V_b)}{[H^+]} = \frac{C_b}{K_{su}} (V_b - V_{eş})$$

Bu eşitlikte,  $\frac{(V_a + V_b)}{[H^+]}$  ve  $V_b$ ' nin doğrusal bir ilişkisi vardır ve y-ekseni kestirim noktasında  $V_b = V_{eş}$ 'dir.

Bazık bölge için bu eşitlik,

$$\emptyset = (V_0 + V_{MOH}) \cdot 10^{+pH} \quad (2.25)$$

olarak tanımlanmaktadır. Bu eşitlik Gran eşitliği olarak bilinir.

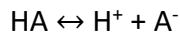
#### Zayıf Monoprotik Asitler için

HA monoprotik zayıf asitini, MOH kuvvetli bazı ile titre edelim ve HA zayıf asidinin asit iyonlaşma sabiti  $K_a$  olsun.

Zayıf asitlerin kuvvetli bazlarla titrasyonu için eğri dört kısımda incelenir:

- Başlangıç
- Eşdeğerlik öncesi
- Eşdeğerlik
- Eşdeğerlik sonrası

HA zayıf asidi,



şeklinde iyonlaşır. HA zayıf asidinin iyonlaşma sabiti,

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad (2.26)$$

şeklindedir.

Eşdeğerlik öncesi için HA' nın iyonlaşmamış halinin derişimi,

$$[HA] \cong \frac{C_a V_a - C_b V_b}{V_a + V_b} \quad (2.27)$$

bu durumda,

$$[A^-] \cong \frac{C_b V_b}{V_a + V_b} \quad (2.28)$$

Bu eşitliklerden  $K_a'$  yı hesapladığımızda,

$$[H^+] = \frac{K_a [HA]}{[A^-]} \cong \frac{K_a (C_a V_a - C_b V_b)}{\frac{C_b V_b}{V_a + V_b}} \quad (2.29)$$

elde ederiz.  $V_{eş} = \frac{C_a V_a}{C_b}$  eşitliğini yukarıdaki bağıntıya koyarsak,

$$[H^+] = \frac{K_a [HA]}{[A^-]} \cong \frac{K_a (C_a V_a - C_b V_b)}{\frac{C_b V_b}{C_b}} \quad (2.30)$$

$$[H^+] = \frac{K_a (V_{eş} - V_b)}{V_b} \quad (2.31)$$

Gran eşitliğinin eşdeğerlik öncesi için kalibrasyon fonksiyonu Eşitlik 2.31 şeklindedir. Bu eşitlik doğrusal bir denklem olarak yazılırsa,

$$[H^+] V_b = K_a V_{eş} - K_a V_b \quad (2.32)$$

elde edilir. Bu denklemde değişken  $V_b$  olup -eğim =  $K_a$  değerine eşittir. Eşitliğin x eksenini kestiği nokta ise eşdeğerlik noktasıdır ve  $V_b = V_{eş}'dir.$

Eşdeğerlik noktasından sonra ortamda kuvvetli baz vardır. Eşitlik 2.32'i düzenlediğimizde,

$$[H^+] = \frac{K_a (C_a V_a - C_b V_b)}{C_b V_b} \quad (2.33)$$

$$[H^+] C_b V_b = K_a C_a V_a - K_a C_b V_b \quad (2.34)$$

elde edilir. Eşitliği, asidin mol sayısına bölerek sadeleştirdiğimizde;

$$\frac{[H^+] C_b V_b}{C_a V_a} = \frac{K_a C_a V_a}{C_a V_a} - \frac{K_a C_b V_b}{C_a V_a} \quad (2.35)$$

$$[H^+] \frac{C_b V_b}{C_a V_a} = K_a - K_a \frac{C_b V_b}{C_a V_a} \quad (2.36)$$

elde edilir. Bu eşitlikte,

$$\phi_{ab} = \frac{C_b V_b}{C_a V_a} \quad (2.37)$$

yerine konulduğunda,

$$[H^+] \phi_{ab} = K_a - K_a \phi_{ab} \quad (2.38)$$

eşitliği elde edilir. Eşdeğerlik noktasında  $\phi_{ab}$  değeri 1'e eşittir ve  $V_b$  değişimi ile değişir ve eğim  $-K_a$ 'yı verir (14).

Gran fonksiyonunu kullanılarak titrasyonun dönüm noktasının belirlenmesinin klasik yöntemlere göre avantajları,

- a) Uygulama kolaylığı,
- b) Hesaplama kolaylığı,
- c) Uyumluluk ve kesinliktir.

Ayrıca Gran fonksiyonu kullanılarak yapılan hesaplamalarda, titrasyon eğrilerine nazaran titrasyon hatalarının ve dönüm noktası belirsizliğinin azaldığı görülmektedir (13,14). Gran yönteminde dönüm noktası civarında potansiyel değerlerine ihtiyaç yoktur. Bu sebeple daha kesin ve doğru sonuçlar elde edilmektedir. Dönüm noktası, Gran fonksiyonu ile çizilmiş doğru grafiğinin ekstrapolasyonu ile belirlenmektedir. Bu doğrunun çizilmesinde sadece dönüm noktasından önceki potansiyel verileri kullanılmaktadır (19).

#### 2.4. UV-GB Absorpsiyon Spektrofotometrisi

UV-GB, 180-780 nm dalga boyu aralığındadır. Ultraviyole ve görünür bölge absorpsiyon spektrofotometrisinde, belirtilen dalga boyundaki ışın ile madde arasındaki etkileşim incelenir. Doğruluk derecesi ve yöntemin seçiciliği sayesinde analitik açıdan yaygın olarak kullanılmaktadır.

Spektrofotometride, ışın-madde etkileşiminden yararlanır. Işının enerjisi ile uyarılan numune, temel halden (en düşük enerjili hal) uyarılmış hale geçirilir. Uyarılmış hal, temel halde bulunan analit elektronlarının absorplanan enerji ile daha yüksek enerji düzeyine geçişi ile sağlanır. Analitin temel halden uyarılmış hale geçerken absorpladığı ışınlar ölçülür ve analit hakkında bilgi edinmemizi sağlar. Her atom veya molekülün ışınla etkileşimi kendine özgüdür.

Işın, elektromanyetik bir dalgadır (Şekil 2.5). Frekansı  $\nu$ , dalgaboyu ise  $\lambda$  ile tanımlanır.

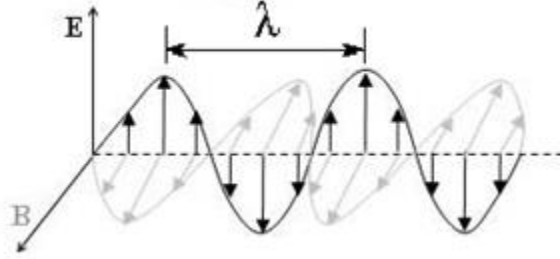
$$c = \nu \lambda \quad (2.39)$$

$c$ , ışının yayılma hızıdır ve boşlukta en yüksek değerinde olup frekanstan bağımsızdır.

Işının enerjisi ise;

$$E = h \nu = h \frac{c}{\lambda} \quad (2.40)$$

olarak hesaplanır. Denklemdaki,  $h$  (Planck sabiti) =  $6.62 \times 10^{-27}$  erg s ;  $c_{\text{boşlukta}} = 3 \times 10^{10}$  cm s<sup>-1</sup>

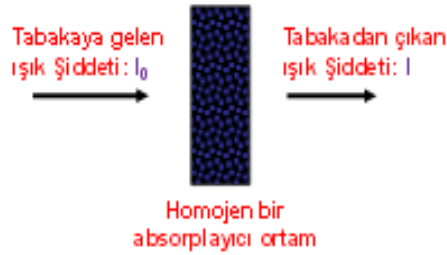


**Şekil 2.5.** Düzlemsel polarlanmış dalga

Ultraviyole ve görünür ışın, yalnızca bağ elektronlarının veya en dış katmandaki elektronların geçişlerini sağlayacak yeterlilikte enerjiye sahiptir.

Uyarılma sonucu meydana gelen spektrumlar, atomlar ve moleküllerde farklılık gösterir. Atomik spektrum, tek bir tür atom söz konusu olduğu için hat şeklindedir. Buna *çizgi spektrum* denir. Molekülde ise ortamda birden fazla türde atom olduğu için çizgiler bir araya gelerek *sürekli spektrum* oluştururlar.

Spektrofotometreler, bu ışın absorpsiyonunu ölçmek için tasarlanmış cihazlardır.



**Şekil 2.6.** Işının madde tarafından absorplanması

$I_0$  = Gelen ışının şiddeti;  $I$  = Çıkan ışının şiddeti

$I_0$  ışın şiddetiyle numuneye gönderilen ışın, numuneden  $I$  şiddetiyle çıkar (Şekil 2.6). Aradaki fark analitin absorbladığı ışın miktarıdır. Dolayısıyla,  $b$  cm kalınlığında bir ışın yoluna sahip  $C$  derişiminde bir analitin olduğu ortamdan geçirilen paralel ışın demeti için geçirgenlik;

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.41)$$

dir. Geçirgenlik, yüzde olarak ifade edilir;

$$\%T = \frac{I}{I_0} \times \%100 \quad (2.42)$$

Bir ortamın absorptansı ise;

$$A = -\log T = \log \frac{I_0}{I} \quad (2.43)$$

şeklinde ifade edilir.

#### 2.4.1. Beer Yasası

Monokromatik bir ışın için, ışın yolunun  $b$  ve absorptayan türün derişiminin  $C$  olduğu göz önüne alındığında absorptans, ışın yolu ve derişim ile doğru orantılıdır. Derişim ( $C$ ) birimi litrede gram olduğunda;

$$A = abC \quad (2.44)$$

Burada  $a$ , *absorptivite* adı verilen bir orantı sabiti olup birimi  $L g^{-1}cm^{-1}$ 'dir. Derişim birimi litrede mol ise, absorptivite, *molar absorptivite*'ye dönüşür ve simgesi  $\epsilon$  olur:

$$A = \epsilon bC \quad (2.45)$$

$\epsilon$  'nin birimi  $L mol^{-1}cm^{-1}$  şeklindedir.

Bu yasa hem atomik hem de moleküler absorpsiyonun temelini oluşturmaktadır.



### 2.4.2. Beer Yasasından Sapmalar

Beer yasasının uygulamasında bazı sınırlamalar mevcuttur. Beer yasası, genellikle 0,01 M'dan düşük derişimlerle sınırlıdır. Çünkü derişim arttıkça çözücü ve çözünen etkileşimleri ve/veya hidrojen bağlarında değişiklik meydana gelebildiği için analitin absorptivitesi etkilenir. Bu etki seyreltme ile giderilir.

Analit ayrıştığında, çözücü veya çeşitli türlerle reaksiyon verdiğinde oluşan ürünün farklı bir absorpsiyon spektrumu olabilir. Bu durum Beer yasasından belirgin sapmalar gösterebilir.

Beer yasasına sadece monokromatik ışın kaynağı kullanıldığında uyum gösterilmektedir. Ölçümlerde analitin maksimum absorbans gösterdiği dalga boyu kullanılır. Bu aralıkta analit absorptivitesinin dalga boyu ile değişimi çok azdır.

Bir monokromatörden çıkan ışınlar az miktarda kaçak ve saçılan ışınlarla kirlenebilir. Bu ışınlar *kaçak ışın* olarak adlandırılır ve seçilen dalga boyu bandı dışında cihazdan kaynaklanır. Bu tür cihazdan kaynaklanan sapmalar absorbansta negatif hataya sebebiyet vermektedir.

Beer yasasından bir sapma da optik hücrelerin uyumsuzluğundan meydana gelmektedir. Analit ve kör çözeltilinin konulduğu hücreler optik özellikleri ve yol uzunlukları açısından özdeş olmalıdır.

### 2.4.3. UV-GB Spektrofotometreleri

Elektromanyetik spektrumda UV-GB ışın bölgesi 180-780 nm arasındır. Bu bölgede pek çok organik, inorganik ve biyolojik türler absorbans göstermektedir. Bir türün bu bölgede absorbans göstermesi için kromofor gruba sahip olması gerekmektedir.

Atomik veya moleküler bir tür olan M'nin, UV-GB ışını absorblaması iki basamaktan oluşur: öncelikle türün elektronik olarak uyarılması gerekmektedir:



M\*, uyarılmış türü göstermektedir.

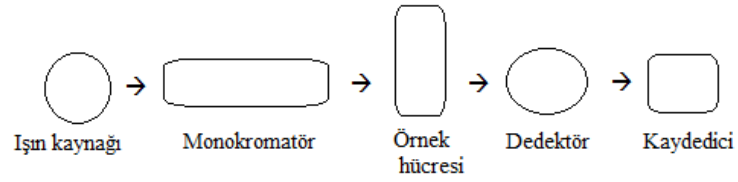
Bu uyarılmış türün varlığı çok kısa sürelidir ( $10^{-8} - 10^{-9}$  s) ve çeşitli durulma süreçleriyle temel hale döner.



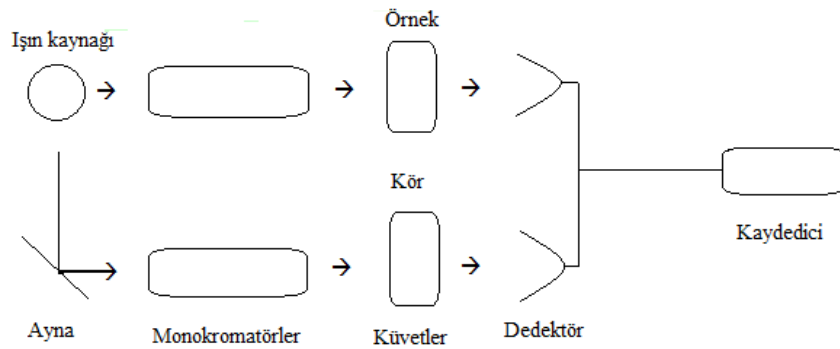
UV veya görünür bölge absorpsiyonu, genellikle bağ elektronlarının uyarılmasıyla meydana gelir. Dolayısıyla absorpsiyon pikleri ve dalga boyları analizi yapılan türdeki bağların tipleriyle ilişkilidir.

UV-GB spektrofotometresi, Beer yasasını temel alarak çalışır. Bu tür cihazlar en basit şekliyle ışın kaynakları, dalga boyu seçiciler, numune kapları, dedektörler, sinyal işleyici ve göstergelerden oluşur.

Temel olarak tek ışın yollu (Şekil 2.7) ve çift ışın yollu (Şekil 2.8) olmak üzere ikiye ayrılırlar:



**Şekil 2.7.** Tek ışın yollu spektrofotometre



**Şekil 2.8.** Çift ışın yollu spektrofotometre

UV-GB spektrofotometrenin en yaygın kullanım alanlarından birisi nicel analizdir. Ayrıca, kinetik analiz yöntemleri ile fotometrik ve spektrofotometrik titrasyonlarda da kullanılmaktadır. Bu yöntemin önemli özellikleri; hem organik hem de inorganik türlerin analizinde kullanılabilmesi,  $10^{-4} - 10^{-5}$  M'a kadar değişen duyarlılık, orta derecede seçicilik, yüksek doğruluk ve kolaylıktır.

#### 2.4.4. UV-GB Spektrofotometrisi ile pK<sub>a</sub> Tayini

Sulu çözeltilerde düşük çözünürlüğe ve düşük asitlik sabitine sahip moleküllerin asitlik sabitinin hesaplanmasında bazı kısıtlamalar mevcuttur. Bazı ilaçlar suda çok az çözünür ve bundan ötürü pK<sub>a</sub> değerlerinin tayini için organik çözücülerin kullanıldığı farklı yöntemler geliştirilmiştir.

Asidik dissosiyasyon sabitinin (pK<sub>a</sub>) hesaplanmasında potansiyometrik, spektrofotometrik, kromatografik ve elektroforetik gibi birçok yöntem kullanılmaktadır. Bu tekniklerden potansiyometrik ve spektrofotometrik yöntemler, uygulama kolaylığı, ucuzluğu ve bunun gibi birçok özelliği ile daha fazla tercih edilen yöntemlerdir (20).

Suda az çözünen ilaçlar bizi, spektrofotometrik tekniklere yönlendirir (21). Spektrofotometrik yöntem, bir maddenin absorpsiyon yapmayan tampon çözelti içindeki noniyonik türünün iyonik türüne oranının doğrudan hesaplanmasına bağlıdır. Spektrofotometrik yöntem, iyonlaşan grubu pH'a bağlı olarak UV kayma gerçekleştiren ilaçların pK<sub>a</sub> değerinin hesaplanması için mükemmel bir yöntemdir. Analiz dalgaboyu, gözlenen iki türün absorpsansları arasındaki farkın en fazla olduğu dalgaboyu olarak seçilir. Absorpsans değerleri ölçülecek pH değerlerinin seçilmesi için yaklaşık pK<sub>a</sub> değerinin bilinmesi gerekir. Buna göre pH, pK<sub>a</sub> ± 1 aralığında seçilir (22).

Albert-Serjeant yöntemi, pK<sub>a</sub> değerinin tayin edilmesinde kullanılan bir yöntemdir. Albert-Serjeant yönteminde tek bir ölçümle birçok hesaplamaların yapılabilmesi yöntemin en önemli avantajıdır (21).

Asit-baz dengesi aşağıdaki tepkimeyle ifade edilir.



HA asidine ait asidik iyonlaşma sabiti  $K_a$ , çözelti yeterince seyreltikse denge sabiti olarak tanımlanır.

$$K_a = \frac{[A^-][H^+]}{[HA]} \quad (2.49)$$

Logaritmaları alınıp düzenlendiği zaman Henderson-Hasselbalch eşitliği elde edilir.

$$pK_a = pH - \log\left(\frac{[A^-]}{[HA]}\right)$$

$$[HA] + [A^-] = T \quad (2.50)$$

denilebilir; buradaki T sabit ve pH'dan bağımsızdır.

$$pH = I \text{ iken } [HA] = \chi \text{ ise,}$$

$$[A^-] = T - \chi \quad (2.51)$$

elde edilir.

$$R = (T - \chi)/\chi \quad (2.52)$$

olarak tanımlanıp Eşitlik 2.52 yeniden düzenlendiğinde,

$$I = pK_a + \log R \quad (2.53)$$

elde edilir.

İyonlaşma gerçekleşen kısım bileşikteki kromofor grup ile konjuge haldeyse, bileşiğin absorpsiyon spektrumu pH'ın bir fonksiyonu olarak değişecektir. Diğer bir deyişle; eğer deney şartları Beer yasasına uyuyorsa  $pK_a$  civarındaki sistemin spektrumu HA ve A<sup>-</sup>'nin toplamı olacaktır. İsobestik nokta dışında uygun bir dalgaboyunda 3 farklı  $l$ ,  $l+a$  ve  $l+b$  ( $a \neq b \neq 0$  olmak üzere) pH değeri için absorptans değerleri ölçülür;  $A_1$ ,  $A_2$  ve  $A_3$ . HA ve A<sup>-</sup> türlerinin seçilen dalgaboyundaki absorpsiyon katsayılarına sırasıyla  $\epsilon_1$  ve  $\epsilon_2$  ve ışık yoluna  $d$  dersek,

Çözeltinin pH =  $l$  değerindeki etkin absorptansı,

$$A_1 = \chi\epsilon_1 d + \chi R\epsilon_2 d \quad (2.54)$$

pH =  $l+a$  iken HA'nın derişimindeki değişim  $C_a$  dersek absorptans,

$$A_2 = (\chi - C_a)\epsilon_1 d + (\chi R + C_a)\epsilon_2 d \quad (2.55)$$

Yukarıdaki eşitliği Handerson-Hasselbalch eşitliğinde yerine koyarsak,

$$pK_a = l + a - \log(\chi R + C_a)/(\chi - C_a) \quad (2.56)$$

Aynı şekilde pH= $l+b$  iken HA derişimindeki değişime  $C_b$  dersek sistemin absorptansı ve  $pK_a$  değeri,

$$A_3 = (\chi - C_b)\epsilon_1 d + (\chi R + C_b)\epsilon_2 d \quad (2.57)$$

$$pK_a = l + b - \log(\chi R + C_b)/(\chi - C_b) \quad (2.58)$$

olacaktır. Eşitlik 2.53 ve 2.56' nin birbirinden çıkarılmasıyla

$$\frac{\{(\chi R + C_a)\chi\}}{\{(\chi - C_a)(T - \chi)\}} = 10^a \quad (2.59)$$

elde edilmiştir. Buradan  $C_a$  çekilerek,

$$C_a = \frac{\{(10^a - 1)\chi R\}}{10^a R + 1} \quad (2.60)$$

elde edilir.  $C_a$  değeri eşitlik 2.55'de yerine konulursa,

$$T\varepsilon_1 d + 10^a TR\varepsilon_2 d = (10^a R + 1)A_2 \quad (2.61)$$

eşitliği ortaya çıkar. Eşitlik 2.53 ve 2.58 birbirinden çıkarılırsa,

$$\frac{\{\chi R + C_b\}\chi}{\{\chi - C_b\}(T - \chi)} = 10^b \quad (2.62)$$

elde edilir. Bu eşitlikten  $C_b$  değeri çekilip düzenlenirse,

$$C_b = \frac{\{(10^b - 1)\chi R\}}{10^b R + 1} \quad (2.63)$$

eşitliği elde edilir. Bu eşitlik, eşitlik 2.57'te yerine konulursa,

$$T\varepsilon_1 d + 10^b TR\varepsilon_2 d = (10^b R + 1)A_3 \quad (2.64)$$

eşitliği bulunur. Eşitlik 2.61 ve 2.64 toplanırsa  $\varepsilon_1 d$  ve  $\varepsilon_2 d$  değerleri hesaplanabilir:

$$\varepsilon_1 d = \frac{(10^{a+b} R + 10^a)A_3 - (10^{a+b} R + 10^b)A_2}{T(10^a - 10^b)} \quad (2.65)$$

$$\varepsilon_2 d = \frac{(10^a R + 1)A_2 - (10^b R + 1)A_3}{TR(10^a - 10^b)} \quad (2.66)$$

Bu eşitliklerden  $R$  değeri çekildiğinde;

$$R = \frac{(10^b - 10^a)A_1 + (1 - 10^b)A_2 + (10^a - 1)A_3}{(10^a - 10^b)A_1 + (10^{a+b} - 10^a)A_2 + (10^b - 10^{a+b})A_3} \quad (2.67)$$

Bu eşitliği Eşitlik 2.53 denklemde yerine koyduğumuzda ise

$$pK_a = I - \log \frac{(10^b - 10^a)A_1 + (1 - 10^b)A_2 + (10^a - 1)A_3}{(10^a - 10^b)A_1 + (10^{a+b} - 10^a)A_2 + (10^b - 10^{a+b})A_3} \quad (2.68)$$

elde edilir. Bu eşitlik bize  $pK_a$  değerinin derişimden ve absorpsiyon katsayısından bağımsız olduğunu göstermektedir.

$A_M$  ve  $A_I$  sırasıyla nötral ve iyonik türün absorbansları dersek, asitler için  $pK_a$

$A_I > A_M$  ise,

$$pK_a = pH + \log \frac{A_I - A}{A - A_M} \quad (2.69)$$

$A_M > A_I$  ise

$$pK_a = pH + \log \frac{A - A_I}{A_M - A} \quad (2.70)$$

şeklinde hesaplanır.

Spektrofotometrik teknikler kullanılırken çok düşük miktarda analite ihtiyaç vardır. Ama bu tür yöntem kullanılırken çalışılan madde saf olmalı ve türlerden en az biri (asit veya baz) ışık-absorplayan gruba sahip olmalıdır (23).

Spektrofotometrik tekniğin diğer bir avantajı ise daha kesin sonuçlar vermesidir. Bu teknik için iyonik ve noniyonik türlerin spektumlarının farklı olması gerekmektedir (24).

Spektrofotometri yöntemi, yüksek molar absortivite katsayısına sahip türler için alternatif bir  $pK_a$  tayin yöntemi olup  $10^{-6}$  M derişime kadar analiz

yapılabilmektedir. Suda çözülmeyen ya da az çözünen bileşiklerin çözünürlüğünü arttırmak için çözücü karışımları kullanılır (25).

## 2.5. HPLC Yöntemi

### 2.5.1. Kromatografi

Kromatografi, kompleks karışımlardaki birbirine yakın özelliklere sahip bileşenleri ayırmaya, tayin ve teşhis etmeye yarayan birçok farklı yöntemler grubunu kapsar. Bütün bu yöntemlerde, numune sıvı, gaz veya süper kritik akışkan olabilen bir hareketli fazda çözülür. Bu hareketli faz, bir kolondan veya katı bir yüzeye sabitleştirilmiş kendisi ile etkileşmeyen bir sabit faz içinden geçirilir. Numune bileşenlerinin bu iki faz arasındaki dağılma oranları farklı olacak şekilde seçilir. Bileşenler, sabit fazla etkileşim sürelerine göre ayrılırlar. Böylelikle nitel ve/veya nicel olarak analiz edilebilen bantlar elde edilir.

Uygulama biçimine göre kromatografi ikiye ayrılır:

- Düzlemsel kromatografi
  - Kağıt kromatografisi
  - İnce tabaka Kromatografisi (TLC)
- Kolon kromatografisi
  - Gaz Kromatografisi (GC)
  - Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)

Sıvı kromatografisi ayırma mekanizmasına göre aşağıdaki şekilde sınıflandırılır:

- Dağılma kromatografisi
- Adsorpsiyon kromatografisi
- İyon değiştirme kromatografisi
- Jel filtrasyon kromatografisi
- İyon çifti kromatografisi
- Affinite kromatografisi



Dağılma kromatografisi, HPLC yönteminin en yaygın kullanılan mekanizma türüdür ve birbiriyle karışmayan sabit faz ve hareketli fazdan oluşur. Bu tür kromatografide ayrılma, karışımın hareketli ve sabit faz arasındaki dağılımına göre gerçekleşir. Sabit faz sıvıdır ve yüzey alanı geniş gözenekli bir katı destek materyaline tutturulmuştur. Analizi yapılacak maddenin sabit faz ve hareketli fazdaki çözünürlük farkı sayesinde ayırım gerçekleşir. Hareketli fazda daha fazla çözünenler kolonu erken terk ederken, sabit fazda daha fazla çözünenler kolonda daha geç çıkar (26).

Dağılma kromatografisi, hareketli faz ve sabit faz polaritelerine göre normal faz ve ters faz sıvı kromatografisi olarak ikiye ayrılır. Normal faz kromatografisinde, sabit faz polar, hareketli faz daha apolar veya düşük polaritededir. Ters faz sıvı kromatografisinde ise sabit faz apolar, hareketli faz daha polardır.

Ters faz kromatografisi normal faz kromatografisine göre daha avantajlıdır. Bunun başlıca nedeni, hareketli faz olarak suyun kullanılabilmesidir. Su, toksik olmayan, UV-geçirgenliğe sahip, biyolojik türlere uygun ve ucuz bir sıvıdır. Apolar sabit fazlarda kütle aktarımının kolay olması ve karışım halindeki hareketli fazlarda gradient elüsyondan sonraki çözücü dengesinin hızlı kurulması ters faz kromatografisinin avantajlarındandır.

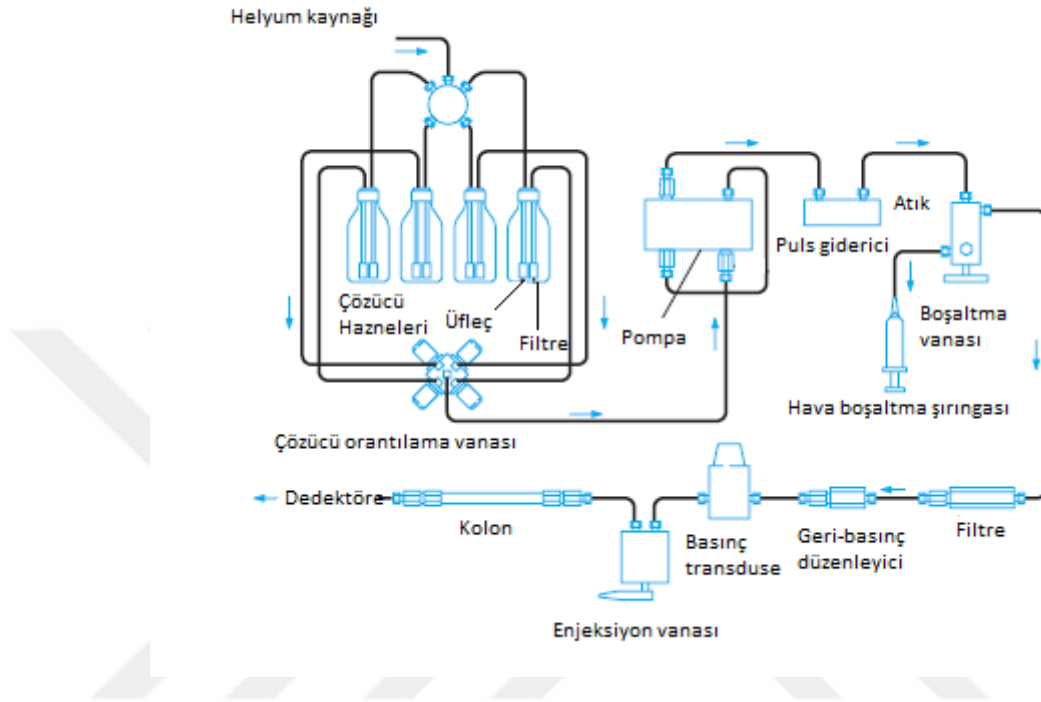
### **Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi (HPLC)**

Sıvı kromatografisinin kolon etkinliğini ve analiz hızını artırmak için geliştirilen bu yöntemde kolon dolgu maddelerinin çapları küçültülmüştür. Böylelikle sabit fazın yüzey alanı ve dolayısıyla kolonun etkinliği artırılmıştır. Diğer bir fark ise hareketli fazın kolondan geçebilmesi için uygulanan yüksek basınçtır. Kolon küçük boyutlu tanecikler içerdiği için hareketli faz akışını sağlayabilmek ve akış hızını sabit tutmak için yüksek basınç pompası kullanılmaktadır.

HPLC yöntemi, analitik ayırmada en çok kullanılan yöntemdir. Bunun nedeni, yöntemin genellikle, duyarlılığının yüksek, analiz süresinin kısa oluşu, nicel analizlere kolay uyarlanabilmesi, sıcaklıkla bozunabilen ve uçucu olmayan bileşenlerin analiz edilebilmesi gibi avantajlarıdır. Bu yöntemle amino asitler, pestisitler ve ilaçlar gibi

birçok organik tür analiz edilebilmektedir. Ayrıca HPLC kolonu defalarca kullanılabilir. HPLC cihazı temel olarak birkaç kısımdan oluşmaktadır (Şekil 2.9).

HPLC cihazı temel olarak birkaç kısımdan oluşmaktadır (Şekil 2.9).



**Şekil 2.9.** HPLC cihazının temel bileşenleri (1)

Bunlardan en temel olanlarından bahsetmek gerekirse; öncelikle hareketli fazın veya hareketli fazı oluşturan çözücülerin bulunduğu cam hazneler bulunmaktadır. Bu haznelerinin içerisinde hava kabarcığı ve tozları gidermek için çeşitli önlemler alınmıştır. Çünkü bunlar kolon verimini düşürür, bant genişlemesine neden olabilir. Hareketli faz içerisindeki tozlar kolonu tıkayabilir ve kolonu kirletebilir, bu da kolonun ömrünü azaltır.

HPLC pompaları, 400 atm'e kadar basınç üretebilen, vuruntusuz çıkış sağlayan, 0.1 ile 10 mL/dk aralığında akış hızı sağlayabilen ve çözücü korozyonlarına karşı dayanıklı olmalıdır.

Numune enjeksiyonu HPLC için son derece önemlidir. Tekrarlanabilir olması yöntemin kesinliği açısından önemlidir. Enjekte edilen numune çok küçük hacimde

( $\approx 5-10 \mu\text{L}$ ) olmalıdır. Ayrıca, numune enjeksiyonu sistemin basıncını düşürmeden yapılmalıdır.

HPLC kolonları bu cihazın en önemli parçasıdır. Kromatografik ayırmanın yapıldığı sabit faz bu kolonun içerisinde bulunmaktadır. Bu kolonların iç çapı homojendir ve paslanmaz çelik boru şeklindedir. Boyutları ve iç çapı değişik birçok hazır kolon mevcuttur. Ayırmanın yapıldığı kolona *analitik kolon* denir. Bunların iç çapı genelde 3-5 mm'dir. Dolgu taneciklerinin çapı ise genelde 3-5  $\mu\text{m}$ 'dir. Analitik kolonların temiz kullanılması ve yıpranmamış olması ayırmayı etkiler. Analitik kolonu korumak ve ömrünü uzatmak için genellikle ön kolon denilen analitik kolondan daha kısa bir *kolon* kullanılır. Ön kolon, analitik kolonun önüne takılarak tanecik halindeki çözünmemiş maddeler ve çözücüdeki safsızlıklar tutulur ve numunedeki sabit faza bağlanıp sabit fazı bozabilecek bileşenler uzaklaştırılır.

Kolonda ayrılan bileşenler dedektör yardımıyla dedektörün özelliğine göre nitel ve/veya nicel olarak saptanır. HPLC için ideal bir dedektör; duyarlılığı yüksek, kararlı, doğrusal çalışma aralığı geniş, cevap verme süresi kısa (akış hızından bağımsız), kullanımı kolay ve yüksek güvenilirliğe sahip olmalıdır. HPLC'de en yaygın kullanılan detektörlerden birisi dizi diyot detektördür. Bu tip dedektörde elüentler UV-GB ışın absorbanlarına göre değerlendirilmektedir.

### **Temel Parametreler**

Hareketli faz ile taşınan numunenin kolondan geçirilmesi sonucu ayrılan elüentlerdeki çözünen bileşenlere dedektör cevap verir ve dedektör sinyali kullanılan hareketli faz hacmine veya zamana karşı kaydedilirse *kromatogram* adı verilen bir dizi pik elde edilir.

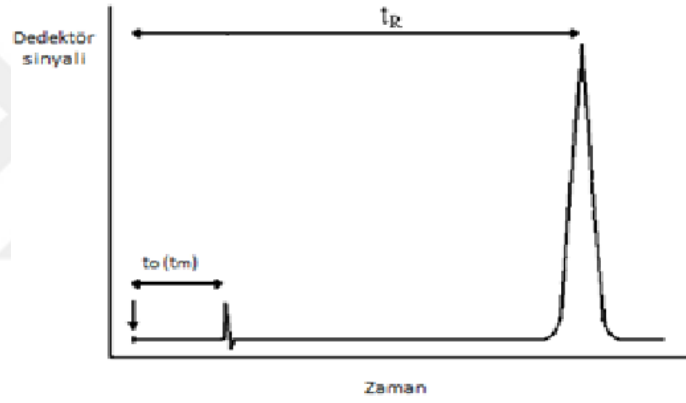
### **Alıkonma Süresi ve Alıkonma Hacmi**

Kromatografide ayırma, analitin hareketli ve sabit faz arasındaki dağılım oranına göre belirlenir.

A hareketli faz  $\leftrightarrow$  A sabit faz

$$K_c = \frac{(a_A)_s}{(a_A)_m} \quad (2.71)$$

Buradaki  $K_c$  *dağılma sabitini*,  $(a_A)_s$  A bileşeninin sabit fazdaki aktivitesi,  $(a_A)_m$  ise A bileşeninin hareketli fazdaki aktivitesini göstermektedir. Dağılma sabiti, kolay ölçülebilen bir nicelik olmadığı için onun yerine *alikonma süresi* kullanılmaktadır. *Alikonma süresi* ( $t_R$ ), numunenin uygulanma anından dedektöre ulaşmasına kadar geçen süreye denir. *Ölü hacim alikonma süresi* ( $t_m$ ) ise numunede veya hareketli fazda alikonmayan türün dedektöre ulaşma süresidir (Şekil 2.10).



Şekil 2.10. Alikonma süresi ve ölü hacim süresi (1)

### Alikonma Faktörü ( $k'$ )

*Alikonma faktörü* ( $k'$ ), analitlerin kolondaki alikonmalarını karşılaştıran önemli bir büyüklüktür.

$$k' = \frac{t_R - t_m}{t_m} \quad (2.72)$$

İdeal ayırma,  $1 < k' < 10$  aralığında iken gerçekleştirilir.

### Kolon Etkinliği

Kolon etkinliğini nicel olarak iki parametre ile belirleyebiliriz: *Tabaka yüksekliği (H)* ve *teorik tabaka sayısı (N)*. Aralarındaki bağıntı;

$$N = \frac{L}{H} \quad (2.73)$$

Buradaki  $L$ , kolon dolgu uzunluğudur. Tabaka yüksekliği ne kadar azalırse teorik tabaka sayısı o kadar artar dolayısıyla kolonun etkinliğini artırır. Kolon etkinliğinin deneysel olarak bulunuşu ise;

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (2.74)$$

Denklemdaki  $W$ , pik tabanının genişliğini;  $W_{1/2}$  ise pik taban genişliğinin yarısını ifade etmektedir.

$$N = 5.55 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (2.75)$$

### Seçicilik ( $\alpha$ )

Numunedeki iki bileşenin birbirlerine göre ayrılmasını gösteren parametredir. Bir kromatogramdaki iki pike ait alıkonma faktörlerinin oranı, seçiciliği verir.

$$\alpha = \frac{k_A}{k_B} = \frac{t_{R_A} - t_m}{t_{R_B} - t_m} \quad (2.76)$$

*Seçicilik*, sabit faza bağlı bir özelliktir, fakat hareketli fazdan da etkilenir.

### Ayırıcılık (R)

*Ayırıcılık (R)*, iki pik arasındaki uzaklığın ölçüsüdür. Kolonun iki analiti ayırabilme yeteneğinin nicel ölçüsüdür. Birbirini takip eden iki pik için,

$$R = \frac{2 [t_{RB} - t_{RA}]}{W_A + W_B} \quad (2.77)$$

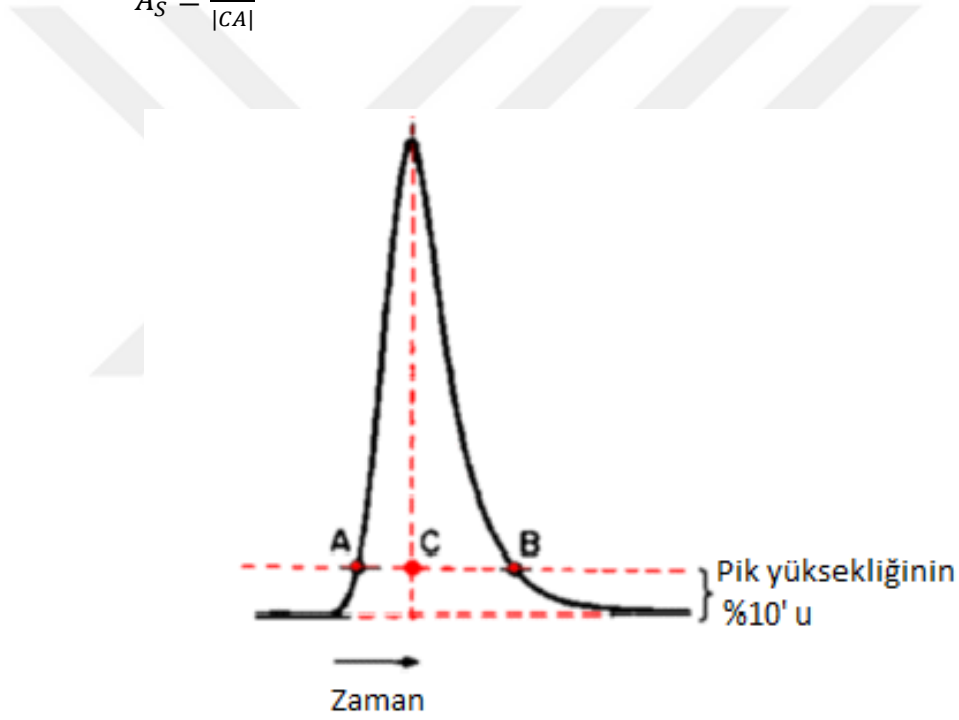
$$R = \left( \frac{k'}{1+k'} \right) \cdot \left( \frac{\alpha-1}{\alpha} \right) \cdot \frac{\sqrt{N}}{4} \quad (2.78)$$

olarak tanımlanır.

### Asimetri Faktör (As)

Asimetri faktörü, pik kuyruklanmasının bir ölçümüdür (Şekil 2.11). Aşağıdaki biçimde hesaplanır.

$$A_S = \frac{|BC|}{|CA|} \quad (2.79)$$



Şekil 2.11. Asimetri faktörü

### HPLC ile pK<sub>a</sub> Tayini

İyonlaşabilen bileşiklerin çözücü karışımlarında pK<sub>a</sub> değeri hesaplanmasında grubun iyonlaşma derecesi, alıkonmayı etkiler (20). Bu yöntemin avantajı analitin çok az miktarının bu tayin için yeterli olmasıdır (27).

Sıvı kromatografisi ile pK<sub>a</sub> tayini, kapasite faktörleri (k') ve hareketli fazın pH değeri arasındaki ilişkiye bağlıdır. Noniyonize ve iyonize tür arasındaki dengeye

( $H_2A^+ \leftrightarrow HA$ ,  $HA \leftrightarrow A^-$  ya da  $B^- \leftrightarrow HB^+$ ) karşılık gelen  $pK_a$  için çalışılan optimum koşullar ise kromatografik ayırmalar ile optimize edilmiştir (28).

HPLC yöntemi ile  $pK_a$  tayininde,  $pK_a$  değeri tayin edilecek bileşiğin farklı pH değerlerinde kolonda sabit faz ile etkileşimi incelenmektedir. Bileşiğin farklı pH değerlerindeki davranışına göre (iyonik/noniyonik) sabit fazla etkileşimi değişir. Kolonda alıkonması değişen molekülün alıkonma zamanı da değişir.  $pK_a$  değeri analiz edilen molekülün alıkonma zamanının değişmesi kapasite faktörünü ( $k'$ ) etkiler. Alıkonma zamanı arttıkça artan kapasite faktörü pH değerlerine karşı grafiğe geçirildiğinde sigmoidal bir eğri elde edilir. Bu eğrinin döndüğü nokta analiz edilen molekülün  $pK_a$  değerine karşılık gelir (28).

Sigmoidal eğrilerin dönüm noktalarının tayin edilmesinde en çok kullanılan yöntem türev yöntemidir. Birinci türev grafiği x eksenindeki birim değişime karşı y eksenindeki değişimin grafiğe geçirilmesiyle çizilir. İkinci türev grafiği ise birinci türev grafiğinin çizildiği değerlerden x eksenindeki birim değişime karşılık y eksenindeki değişimi gösterir. Birinci ve ikinci türev grafikleri, sigmoidal eğrinin dönüm noktasını doğru olarak belirlemede kullanılmaktadır.

$pK_a$  tayini için kullanılan her yöntemin farklı avantajları ya da kısıtlamaları bulunmaktadır (Tablo 2.1).

**Tablo 2.1.** pK<sub>a</sub> tayininde kullanılan yöntemler ve özellikleri

Yöntem	Avantaj	Kısıtlamalar	Analiz için gerekli analit derişimi
Potansiyometri	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ucuz ve kolaydır.</li> <li>• Kararlıdır.</li> <li>• Duyarlılığı yüksektir.</li> <li>• Tekrarlanabilir.</li> <li>• Hem suda çözünen hem de suda çözünmeyen maddeler için uygundur.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Çok yüksek ve çok düşük pH değerleri için uygundur.</li> </ul>	> 10 <sup>-4</sup> M
Spektrofotometri	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sudaki çözünürlüğü düşük maddelerin pK<sub>a</sub> tayini için uygundur.</li> <li>• Az miktarda analit ile çalışabilmek mümkündür.</li> <li>• Kesinliği yüksektir</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Her madde için uygun değildir. Analit molekülünün iyonlaşan kısmına yakın kromofor grup içermelidir.</li> <li>• Nötral ve iyonik türün absorpsanları arasında absorpsan farkı olmalıdır.</li> <li>• Çalışılan madde saf olmalıdır.</li> </ul>	> 10 <sup>-6</sup> M
HPLC	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Çok az miktarda analit bu yöntem için yeterlidir.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Molekülün iyonik ve noniyonik türlerinin polaritesi farklı olmalıdır.</li> </ul>	> 2.5x10 <sup>-3</sup> M

### Yazılım Programları ile pK<sub>a</sub> Tayini

İnorganik ve organik bileşiklerin fizikokimyasal parametreleri bilgisayar programında algoritmalar yardımıyla hesaplanabilmektedir. Program, bileşik aktivitesini tahmin edip bu matematiksel verilere göre pK<sub>a</sub>, çözünürlük gibi fizikokimyasal değerleri tahmin etmektedir. Bu amaçla yaygın kullanılan programlar ACE & JChem ve ACD/Labs yazılımlarıdır.

### 2.6. pK<sub>a</sub> Tayini Çalışmaları

pK<sub>a</sub> değerleri spektrofotometrik, potansiyometrik veya HPLC olmak üzere farklı yöntem(ler)le tayin edilen maddelere ilişkin yayınlar bildirilmiştir. Seok ve arkadaşlarının (8) çalışmalarında UV-GB Spektrofotometre kullanarak bromofenol mavisi, bromotimol mavisi, 4-aminobenzoik asit, itankonik asit, pürivik asit ve L-



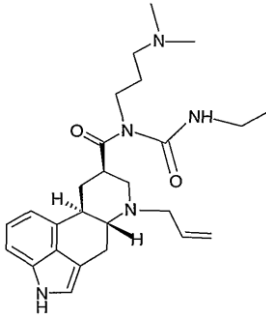
askorbik asitin  $pK_a$  değerlerini su ortamında deneysel olarak tayin etmişlerdir. Şanlı ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilen bir çalışmada (29) ise, folinik asit, 5-fluorouracil ve irinotekan maddelerinin ACN-su karışımında pH-absorbans ilişkisi incelenmiş ve  $pK_a$  tayini yapılmıştır. Ayrıca, karışımdaki ACN mol fraksiyonunu ve asitlik sabiti arasında doğrusal bir ilişki olduğu da gözlenmiştir. Felodipin'in  $pK_a$  değeri, Pandey ve arkadaşları tarafından UV-GB spektrofotometri yöntemini kullanarak Albert-Serjeant yöntemiyle hesaplanmıştır (30). Takacs-Novak ve arkadaşları (31) araştırmalarında, suda çözünmeyen 25 molekülün  $pK_a$  değerlerini MeOH-su ortamında gerçekleştirdikleri potansiyometrik titrasyon ile deneysel olarak hesaplamışlardır. Hesaplamalar için Yasuda-Shedlovsky eşitlikleri kullanılmıştır. Qiang ve arkadaşlarının çalışmasında ise, sülfonamidler, makrolitler gibi antibiyotik türlerinin  $pK_a$  değerleri potansiyometrik yöntem ile deneysel olarak hesaplanmıştır (32). İslamoğlu ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada (33) potansiyometrik ve spektrofotometrik yöntemler kullanılarak 12 yeni triazol türevinin MeOH, dioksan ve EtOH içeren çözücü karışımlarında  $pK_a$  değerleri tayin edilmiştir. Spektrofotometrik yöntemde triazol türevlerinin 200-400 nm arası spektrumları taranmış ve seçilen dalga boylarında  $pK_a$  analizi yapılmıştır. Potansiyometrik yöntemle analizde ise elektrot kalibrasyonu Gran eşitlikleri ile yapılmıştır. Elde edilen veriler Henderson-Hasselbalch eşitliği ile doğrusallaştırıp  $pK_a$  değerleri elde edilmiştir. Potansiyometrik yöntem kullanılarak piroksikam ve tenoksikamın  $pK_a$  değerlerinin Yasuda-Shedlovsky eşitlikleri kullanılarak hesaplanması Demiralay ve arkadaşları tarafından gerçekleştirilmiş, çalışma farklı yüzdelerde ACN-su karışımları ile yapılmıştır (34). Benzoik asit ve 2-aminopiridinin  $pK_a$  değerleri HPLC-DAD kullanılarak Ando ve Heimbach tarafından hesaplanmıştır (35). Chiang ve arkadaşları çalışmalarında bir grup ilaç ve kimyasal bileşiğin  $pK_a$  değerlerini çözücü karışımlarında HPLC-DAD ile tayin etmişlerdir (36).

## 2.7. Kabergolin (KAB)

### 2.7.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

KAB, beyaz renkli, kokusuz toz halindedir. Suda çözünmez fakat metanol, N,N-dimetil formamid ve kloroform iyi çözünür. Molekül formülü  $C_{26}H_{37}N_5O_2$  olup molekül ağırlığı  $451.60 \text{ g mol}^{-1}$  dir (37). KAB'ın, kimyasal adlandırması, (8 $\beta$ )-N-[3-(Dimetil-amino)propil]-N-[(etilamino)karbonil]-6-(2-propenil)-ergolin-8-karboksamid şeklindedir (Tablo 2.2).

**Tablo 2.2.** KAB'ın yapısı ve özellikleri

KAB	Molekül Formülü	Molekül Ağırlığı
	$C_{26}H_{37}N_5O_2$	$451.60 \text{ g mol}^{-1}$

### 2.7.2. Etki Mekanizmaları

#### *Parkinson Hastalığında;*

KAB uzun süreli ve güçlü dopamin  $D_2$  reseptör agonistidir. Beynin striatum bölgesindeki dopamin reseptörlerini uyararak dopamin benzeri etki gösterir (38) .

#### *Hiperprolaktinemde;*

KAB prolaktin salgılanmasını durdurduğu için hiperprolaktinemi tedavisinde kullanılır.

### 2.7.3. Farmakodinamik Özellikleri

KAB'ın, *in vivo* ve *in vitro* ortamda en az 72 saat süresince reseptöre bağlandığı görülmüştür (39). Sıçan beyin dokularındaki radyoligant reseptör bağlanma çalışmaları, KAB'ın dopamin D<sub>2</sub> ve D<sub>3</sub> reseptörlerine yüksek ilgisi olduğu gözlenmiştir. Ayrıca, KAB'ın adrenerjik ve serotonerjik reseptörlere de ihmal edilebilir düzeyde afinite gösterdiği görülmüştür.

Başlangıç klinik çalışmalar, KAB'ın etkinliğinin parkinson hastalarında kullanılan levodopa ile benzer olduğunu göstermiştir. Daha büyük çaptaki çalışmalarda, KAB kullanan hasta grubunun levodopa kullananlardan farklı bir klinik gelişme göstermediği gözlenmiştir (40). Ayrıca KAB'ın antioksidan özellikleri de mevcuttur.

### 2.7.4. Farmakokinetik Özellikleri

KAB, uygulamanın ardından 1-2 saat sonra pik plazma derişimine ulaşır (41,42) ve beyin dokusu da dahil olmak üzere vücut dokularında geniş bir yayılma gösterir. Plazma proteinlerine, derişimden bağımsız yaklaşık olarak % 40 oranında bağlanır.

KAB'ın 65 ile 110 saat arası gibi çok uzun eliminasyon yarılanma süresine sahiptir. Başlıca metabolizmaya katılma şekli hidroliz ile gerçekleşir ve büyük ölçüde metabolizmaya katılıp safra ve gaita ile dışarı atılır. Günde 3-7 mg doz aralığında KAB'ın farmakokinetik profili doğrusaldır (43). Yaş, hepatik fonksiyon veya böbrek yetmezliğinden ve alınan besinlerden etkilenmez. Ayrıca birlikte uygulanmasında levodopanin farmakokinetiğini etkilemez (44).

### 2.7.5. Endikasyonları

Hastalığın semptomlarının tedavisinde kullanılır. Yeni teşhis edilen hastalarda tek başına veya levodopa/karbidopa ile birlikte ek tedavi olarak kullanılabilir.

### 2.7.6. Yan Etkileri

KAB'ın en yaygın yan etkileri (% 51) sinir sistemi ile bağlantılı olan hiperkinezi, halusinasyon, konfüzyon ve diskinezidir. Ayrıca gastrit, bulantı ve kusma gibi gastrointestinal sistemle ilgili yan etkiler de görülmüştür. Kardiyovasküler sisteme bağlı hipotansiyon ve baş dönmesi ve solunum sistemi ile ilgili yan etkiler de nispeten az da olsa gözlenmiştir. Laktasyonun baskılanması amacıyla günde 0.50 mg KAB kullanan emziren kadınlarda en sık rastlanan yan etkiler ise karın ağrısı, mide bulantısı, baş ağrısı, baş dönmesi ve uyku halidir (45,46).

### 2.7.7. İlaç ve Diğer Etkileşimler

Klinik çalışmalarda KAB'ın parkinson hastalarında kullanılan selegilin ve levodopa ile farmakokinetik etkileşim göstermediği görülmüştür. Dopamin agonisti olmayan diğer ilaçlarla kullanıldığında etkinliğinin değişmediği saptanmıştır. Dopamin agonisti diğer ilaçlar ile (fenotiazin, tioksanten gibi) kullanıldığında iyileştirici etkisini azaltabileceğinden ötürü birlikte kullanılmamalıdır.

Yan etkide artış olabileceği için makrolit grubu antibiyotikler ile kullanımı uygun değildir (47).

### 2.7.8. Uyarılar ve Önlemler

KAB'a ait farmakokinetik parametreler böbrek yetmezliği olan hastalarda değişmezken, karaciğer yetmezliği olan hastalarında negatif etki ettiği gözlemlendiği için karaciğer yetmezliği olan hastalarda doz ayarlaması yapılması gerekmektedir.

Raynud sendromu, gastrointestinal kanaması veya peptik ülseri, ciddi kardiyovasküler hastalığı olan ya da psikotik bozukluğa sahip hastalarda dikkatli kullanılması gerekmektedir.

Alkolün ilaç ile etkisi bilinmemekte olup ergot alkaloidlerine veya içeriğinde bulunan diğer maddelere aşırı duyarlılık durumlarında kullanılmamalıdır.

Emzirme dönemlerinde ilaç kullanılmamalı veya emzirmeyi kestikten sonra tedaviye başlanmalıdır. Gebelikten en az bir ay önce ilaç kesilmelidir. Gebelik tedavi sırasında öğrenildiğinde ise ilaç derhal bırakılmalıdır.

KAB hipotansiyon yapabileceğinden kan basıncını düşüren diğer ilaçlarla birlikte alınmamalıdır veya dikkatli alınmalıdır (46).

### KAB Analiz Yöntemleri

KAB ile farklı yöntemler kullanılarak yapılmış birçok çalışma bulunmakta, ve bu çalışmalar KAB'ın nitel ve nicel analizlerini kapsamaktadır (Tablo 2.3). KAB'a ait  $pK_a$  sabitinin saptanması amacıyla yapılmış herhangi bir çalışma bulunmamaktadır.

**Tablo 2.3.** KAB analiz yöntemleri

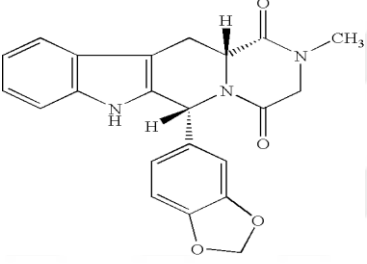
Yazar	Yıl	Matriks	Cihaz	Analiz Şartları	Kaynak No
Pianezzola	1992	Plazma, idrar	HPLC-ECD	C18 (250 ×4.6 mm, 5 µm) kolonunda ACN: 75 mM fosfat tamponu (20:80, h/h); akış hızı 0.6 mL/dak	(48)
Allievi	1998	Serum	LC-MS	C18 (150 ×3.9 mm, 10 µm) kolonunda ACN: 10 mM amonyum format (30:70, h/h, pH: 3); akış hızı 0.5 mL/dak	(49)
Igarashi	2003	Plazma	LC-MS-MS	COSMOSIL 5C8-MS kolonda (2 mm I.D.×150 mm, 5-µm); ACN: 20 mM amonyum format (20:80, h/h) gradient; akış hızı 0.2 mL/dak	(50)
Önal	2007	Farmasötik preparat	HPLC	CN kolonda (250 ×4.6 mm, 5 µm); ACN: 10 mM fosforik asit (35:65, h/h); akış hızı 1.0 mL/dak	(51)
Önal	2007	Farmasötik preparat	UV-GB	410-424 nm (KAB ile organik boya komplekslerinin ölçümü için)	(52)
Doğan	2011	Farmasötik preparat	CE	Elektrolit çözeltisi olarak; ACN: 110 mM fosfat tamponu (30:70, h/h); 50cm etkin uzunluk, 5 µm çap silika; 30 °C	(53)
Piroozi	2014	Plazma, idrar	HPLC	C18 (150 ×3.9 mm, 10 µm) kolonunda ACN: fosfat tamponu (75:25, h/h); akış hızı 1.0 mL/dak	(54)

## 2.8. Tadalafil (TAD)

### 2.8.1. Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri

Molekül ağırlığı  $389.41 \text{ g mol}^{-1}$  olan TAD'ın (pirazino [1', 2':1, 6] pirido [3, 4 - b] indol - 1, 4 - dione, 6 - (1, 3 - benzodioxol - 5 -il) 2, 3, 6, 7, 12, 12a - heksahidro - 2 - metil - (6R, 12 aR)) kapalı formülü  $\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$ 'dir (Tablo 2.4). Apolardır, suda çözünmez, asetonitrilde çözünürken metanolde az çözünür (55).

**Tablo 2.4.** TAD'ın fiziksel ve kimyasal özellikleri

TAD	Molekül Formülü	Molekül Ağırlığı
	$\text{C}_{22}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_4$	$389,41 \text{ g mol}^{-1}$

### 2.8.2. Etki Mekanizması

Fosfodiesteraz tip 5'in (PDE5) geri dönüşümlü ve seçici inhibitörü olan TAD, siklik guanozin monofosfat'a (cGMP) spesifiktir. Cinsel uyarı ile lokal nitrik oksit salınımı sırasında, TAD'ın PDE5 inhibisyonu ile korpus kavernozum cGMP seviyesinde artış meydana gelir. Bu artış sonucu düz kaslar gevşer, penil dokuya kan dolar ve ereksiyon olur(56).

### 2.8.3. Farmakodinamik Özellikleri

TAD, PDE5'in etkili, seçici ve geri dönüşümlü inhibitörüdür (57). PDE5 düz ve çizgili kaslarda, beyincikte, akciğerde, böbrek ve trombositlerde var olan bir enzimdir. PDE5'in farmakolojik inhibisyonu, siklik guanozin monofosfat seviyesini yükseltir dolayısıyla düz kas hücreleri gevşer ve damar genişlemesi meydana gelir

(58). TAD'ın PDE5 üzerindeki etkisi diğer fosfodiesterazlara oranla yaklaşık 10,000 kat daha fazladır (59).

#### **2.8.4. Farmakokinetik Özellikleri**

TAD, oral uygulama ile alınır ve hızla emilir. Alındıktan 2 saat sonra gözlenen maksimum plazma derişimine ulaşır. TAD'ın emilim miktarı ve hızı, yiyeceklerden etkilenmez. TAD'ın protein bağlaması, terapötik derişimlerde % 90'ın üzerindedir (60). TAD, büyük ölçüde, sitokrom P450(CYP) 3A4 tarafından metabolize edilir ve dolaşıma giren temel metaboliti metilkatekol glukuronittir. Bu metabolit, PDE5 üzerinde TAD kadar aktif değildir. TAD'ın ortalama yarı ömrü 17.5 saattir ve inaktif metabolitler halinde ve % 61'i feces % 36'sı idrar yoluyla atılmaktadır.

#### **2.8.5. Endikasyonları**

TAD, erektil disfonksiyonun tedavisinde kullanılır. Kadınlarda endike değildir.

#### **2.8.6. Kontrendikasyonları**

Klinik çalışmalarda, TAD'ın nitrat gruplarının hipotansif etki göstermiştir. Kardiyovasküler hastalık tanısı konmuş kişilerde kullanımında dikkatli olunmalıdır. İlacın etkin ve yardımcı maddelerine duyarlılık durumunda kontrendikedir (61).

#### **2.8.7. Yan Etkileri**

Çok yaygın olarak başağrısı, yaygın olarak da sırt ağrısı, baş dönmesi, nazal konjesyon ve miyalji görülmüştür. Ender olarak da göz kapaklarında şişme, konjunktival hiperemi görülmüştür. Seyrek olarak da ereksiyonda uzama ve priapizm görülmüştür.

#### **2.8.8. TAD Analiz Yöntemleri**

TAD'ın nitel veya nicel analizi için spektrofotometrik yöntemle tayini literatürde bildirilmiş olmasına karşın potansiyometrik analizi bulunmamaktadır. Literatürde HPLC-UV (62-66) ve HPLC-DAD (67,68) ile yapılmış TAD çalışmaları

bulunmaktadır. TAD'ın HPLC ile gerçekleştirilmiş analiz yöntemleri de mevcuttur (Tablo 2.5).

**Tablo 2.5.** TAD analiz yöntemleri

Yazar	Yıl	Matriks	Cihaz	Analiz Şartları	Kaynak No
Desai	2014	Standart	UV-GB / RPHPLC	C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm); MeOH:ACN:amonyum asetat tamponu (pH 6.0); akış hızı 1.0 mL/dak; 264 nm	(62)
Aboul-Enein	2005	Tablet	HPLC-UV	C18 (100 × 4.6 mm), Chromolith; ACN: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (100 mM, pH 3.0)(35:30:35, h/h/h); 230 nm	(63)
Pettit	2012	Standart	HPLC-UV	C18 (150 × 4.6mm, 5µm); ACN: KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (50 mM, pH: 3) (40:60, h/h); 230 nm	(64)
Reddy	2010	Standart	HPLC-UV	C18 (150 x 4.6 mm, 5 µm); ACN:KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7.0) (60: 40 h/h); 262 nm	(65)
Sonawane	2013	Bulk Tablet	HPLC-UV	C18 (150 × 4.6 mm, 5 µm); ACN : KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (10 mM, pH to 3.2) (50:50, h/h); 295 nm	(66)
Bojanapu	2015	Bulk Tablet	HPLC-DAD	C18 (150 × 4.6 mm, 5 µm); ACN:KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH: 6 ) (50:50 h/h); 285 nm	(67)
Patel	2014	Tablet	HPLC-DAD	C18 (150 × 4.6 mm, 5 µm); ACN: MeOH: Su (20:40:40, h/h/h); 260 nm	(68)
Giri	2012	Bulk Tablet	HPLC-UV	C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm); ACN: Su (0.1% trietilamin, pH: 4.00) (80:20, h/h); 229 nm	(69)
Rao	2008	Bulk Tablet	HPLC-UV	C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm); ACN :Çözelti A (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ve C <sub>16</sub> H <sub>37</sub> NO, pH: 2.5) (20:80, h/h) Çözelti B: ACN :Su (80:20, h/h) Gradient; 220 nm	(70)
Park	2012	Sahte ilaç	HPLC-UV	C18 (250 x 4.6 mm, 5µm); ACN: % 0.1 fosforik asit (% 0.1 heksansulfonik asitli) (30:70 h/h); 285 nm	(71)
Barot	2010	Tablet	HPLC-DAD	C18 (150 x 4.6 mm, 3.5 µm); ACN : tampon (pH:7.00 trietilamin) (30:70, h/h); 225 nm	(72)
Chandran	2012	Tablet	HPLC-DAD	C18 (150 × 4.6 mm, 5 µm); ACN: NH <sub>4</sub> CH <sub>3</sub> CO <sub>2</sub> (pH 7.0) 70:30 (h/h); 241 nm	(73)
Kannappan	2010	Standart	HPLC-DAD	C18 (150 x 4.6mm, 5 µm); NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (10 mM, pH: 3.0 ); 220 nm	(74)



### 3. GEREÇ ve YÖNTEM

#### 3.1. Cihazlar

HPLC sistemi	
Pompa	Thermo P2000
Oto örnekleyici	Thermo AS3000
UV dedektör	Thermo UV6000LP
Data analizörü	ChromQuest Thermo Finnigan
UV-GB Spektrofotometresi	Agilent 8453
pH metre	MettlerToledo MA 235
Otomatik mikropipet	Eppendorf (10-100/100-1000µL)
Hassas terazi	MettlerToledo AG 285
Ultrasonik banyo	Bandelin, Sonorex, RK514 BH
Vorteks karıştırıcı	IDL RS2
Saf su sistemi	BarnsteadNanoPureDiamond
Buzdolabı	Bosch
Manyetik karıştırıcı	Nüve NM 110

#### 3.2. Kimyasal Maddeler

Kabergolin (KAB)	$C_{26}H_{37}N_5O_2$ (Pharmacia Sağlık Ürünleri San. ve Tic. Ltd. Şti.)
Tadalafil (TAD)	$C_{22}H_{18}N_3O_4.HCl$ (Zentiva Sağlık Ürünleri San. ve Tic. A.Ş.)
Urasil (URA)	$C_4H_4N_2O_2$ (Sigma)
Metanol (MeOH)	$CH_3OH$ (Chromasolv®, Sigma-Aldrich)
Asetonitril (ACN)	$C_2H_3N$ (Chromasolv®, Sigma-Aldrich)
Potasyumdihidrojen fosfat	$KH_2PO_4.2H_2O$ (Merck)
Sodyum hidroksit	NaOH (Merck)
Potasyum hidroksit	KOH (Merck)

Ortofosforik asit	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> (J.T. Baker)
Potasyum Hidrojen Ftalat (KHP)	C <sub>8</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> K (Sigma)
Trietilamin (TEA)	(C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>3</sub> N (J.T. Baker)

### 3.3. Cam ve Sarf Malzemeler

Kolonlar	HiChromNucleosil C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm)
Otomatik pipet ucu	100 ve 1000 µL
Vial	Cam, 1 mL
Küvet	1x1x3 cm, kuvars
Balon joje	5, 10, 25, 100 ve 1000 mL'lik, Pyreks
Spatül	Metal
Tartım kabı	Cam
Mezür	50, 100 ve 1000 mL'lik
Beher	100, 50 ve 250 mL'lik

### 3.4. Deneyler İçin Gerekli Hazırlıklar

#### 3.4.1. Çözeltilerin Hazırlanması

##### Potansiyometrik Yöntem

**Tablo 3.1.** Potansiyometrik yöntemde kullanılan stok çözeltiler ve hazırlanması

<b>KAB stok çözeltisi (4000 µg mL<sup>-1</sup>)</b>	20.0 mg standart KAB tartıldı, 5 mL'lik balon jöjeye alındı ve 1-2 mL MeOH eklenip ultrasonik banyoda tamamen çözündükten sonra MeOH ile 5 mL'ye tamamlandı.
<b>TAD stok çözeltisi (4000 µg mL<sup>-1</sup>)</b>	20.0 mg standart TAD tartıldı, 5 mL'lik balon jöjeye alındı ve 1-2 mL MeOH eklenip ultrasonik banyoda tamamen çözündükten sonra MeOH ile 5 mL'ye tamamlandı.
<b>KOH özeltisi (1.0 M)</b>	2.80 g KOH tartılıp ultra saf su ile çözüldü ve balon jöjede 50 mL'ye tamamlandı.
<b>HCl özeltisi (1.0 M)</b>	840 µL derişik HCl alındı, içine bir miktar su eklenip 10 mL'lik balon jöjeye konuldu, ultra saf su ile sınır çizgisine tamamlandı.
<b>KCl özeltisi (1.0 M)</b>	1.79 g KCl tartıldı, 25 mL'lik balon jöjede ultra saf su ile özölüp sınır çizgisine kadar saf su ile tamamlandı.

**Tablo 3.2.** KAB için potansiyometrik yöntemde kullanılan stok çözeltiden MeOH:su (50:50, h/h) ortamında hazırlanan çözeltiler

<b>KHP çözeltisi (2.94 M) MeOH:su (50:50, h/h)</b>	30.0 mg KHP tartıldı, 50 mL'lik balon jöjeye alındı, 1.0 mL 1.0 M KCl ve 25.0 mL MeOH eklendi. Saf su ile 50.0 mL'ye tamamlandı.
<b>HCl çözeltisi (0.03 M) MeOH:su (50:50, h/h)</b>	1.0 M HCl'den 150 µL 50 mL'lik balon jöjeye alındı, 1.0 mL 1.0 M KCl ve 25.0 mL MeOH eklendi. Saf su ile 50.0 mL'ye tamamlandı.
<b>KOH çözeltisi (0.01 M) MeOH:su (50:50, h/h)</b>	1.0 M KOH çözeltisinden 250 µL alınıp 25 mL'lik balon jöjeye aktarıldı. Üzerine 12.5 mL MeOH eklenip saf su ile 25.0 mL'ye tamamlandı.
<b>KAB çözeltisi (2.2 mM) MeOH:su (50:50, h/h)</b>	4000 µg mL <sup>-1</sup> KAB stok çözeltisinden 3.0 mL ve 1.0 M KCl çözeltisinden 1.0 mL alınıp 10 mL'lik balon jöjeye aktarıldı ve 100 µL 1.0M HCl çözeltisi ile protonlandı. Üzerine 2.0 mL MeOH eklenip saf su ile 10.0 mL'ye tamamlandı.

**Tablo 3.3.** KAB için potansiyometrik yöntemde kullanılan stok çözeltiden MeOH:su (40:60, h/h) ortamında hazırlanan çözeltiler

<b>KHP çözeltisi (2.94 M) MeOH:su (40:60, h/h)</b>	30.0 mg KHP tartıldı, 50 mL'lik balon jöjeye alındı, 1.0 mL 1.0 M KCl ve 20.0 mL MeOH eklendi. Saf su ile 50.0 mL'ye tamamlandı.
<b>HCl çözeltisi (0.03 N) MeOH:su (40:60, h/h)</b>	1.0 M HCl'den 150 µL 50 mL'lik balon jöjeye alınıp 1.0 mL 1.0 M KCl ve 20.0 mL MeOH eklendi. Saf su ile 50.0 mL'ye tamamlandı.
<b>KOH çözeltisi (0.01 M) MeOH:su (40:60, h/h)</b>	1.0 M KOH çözeltisinden 250 µL alınıp 25 mL'lik balon jöjeye aktarıldı. Üzerine 10.0 mL MeOH eklenip saf su ile 25.0 mL'ye tamamlandı.
<b>KAB çözeltisi (2.2 mM) MeOH:su (40:60, h/h)</b>	4000 µg mL <sup>-1</sup> KAB stok çözeltisinden 3.0 mL 1.0 M KCl çözeltisinden 1.0 mL alınıp 10 mL'lik balon jöjeye aktarıldı ve 100 µL 1M HCl çözeltisi ile protonlandı. Üzerine 1.0 mL MeOH eklenip saf su ile 10.0 mL'ye tamamlandı.

**Tablo 3.4.** TAD için potansiyometrik yöntemde kullanılan stok çözeltiden MeOH:su (60:40, h/h) ortamında hazırlanan çözeltiler

<b>KHP çözeltisi (2.94 M) MeOH:su (60:40, h/h)</b>	30.0 mg KHP tartıldı, 50 mL'lik balon jöjeye alınıp 1.0 mL 1.0 M KCl ve 30.0 mL MeOH eklendi. Saf su ile 50.0 mL'ye tamamlandı.
<b>HCl çözeltisi (0.03 N) MeOH:su (60:40, h/h)</b>	1.0 M HCl'den 150 µL 50 mL'lik balon jöjeye alınıp 1.0 mL 1.0 M KCl ve 30.0 mL MeOH eklendi. Saf su ile 50.0 mL'ye tamamlandı.
<b>KOH çözeltisi (0.01 M) MeOH:su (60:40, h/h)</b>	1.0 M KOH çözeltisinden 250 µL alınıp 25 mL'lik balon jöjeye aktarıldı. Üzerine 15.0 mL MeOH eklenip saf su ile 25.0 mL'ye tamamlandı.
<b>TAD çözeltisi (2.2 mM) MeOH:su (60:40, h/h)</b>	4000 µg mL <sup>-1</sup> TAD stok çözeltisinden 3.0 mL 1.0 M KCl çözeltisinden 1.0 mL alınıp 10 mL'lik balon jöjeye aktarıldı ve 100 µL 1M HCl çözeltisi ile protonlandı. Üzerine 3.0 mL MeOH eklenip saf su ile 10.0 mL'ye tamamlandı.

## Spektrofotometrik Yöntem

**Tablo 3.5.** Spektrofotometrik yöntemde kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

<b>KAB stok çözeltisi (1000 µg mL<sup>-1</sup>)</b>	10.0 mg standart KAB tartıldı ve 10 mL'lik balon jöjeye alındı. 5 mL MeOH eklenip ultrasonik banyoda tamamen çözüldükten sonra MeOH ile 10 mL'ye tamamlandı.
<b>TAD stok çözeltisi (1000 µg mL<sup>-1</sup>)</b>	10.0 mg standart TAD tartıldı ve 10 mL'lik balon jöjeye alındı. Yaklaşık 5 mL MeOH eklenip ultrasonik banyoda tamamen çözüldükten sonra MeOH ile 10 mL'ye tamamlandı.
<b>Fosfat tamponu (10 mM)</b>	0.136 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ve 1.49 g KCl tartıldı, 100 mL'lik balon jöjeye aktarıldı ve su ile çözünenek hacmi 100 mL'ye tamamlandı.
<b>KAB çalışma standardı (20 µg mL<sup>-1</sup>)</b>	1000 µg mL <sup>-1</sup> KAB stok çözeltisinden 100 µL alınıp 5 mL'lik balon jöjeye aktarıldı ve istenen pH değerine ayarlanmış tampon ile 5 mL'ye tamamlandı.
<b>TAD çalışma standardı (20 µg mL<sup>-1</sup>)</b>	1000 µg mL <sup>-1</sup> TAD stok çözeltisinden 100 µL alınıp 5 mL'lik balon jöjeye aktarıldı ve istenen pH değerine ayarlanmış tampon ile 5 mL'ye tamamlandı.
<b>NaOH çözeltisi (5.0 M)</b>	20.0 g NaOH tartılarak yaklaşık 50 mL su ile çözüldükten sonra saf su ile 100 mL'ye seyreltildi.

## HPLC Yöntemi

**Tablo 3.6.** HPLC yönteminde kullanılan çözeltiler ve hazırlanması

<b>Fosfat tamponu (10.0 mM)</b>	200 mL ultra saf su 1 L'lik balon jöjeye aktarıldıktan sonra üzerine 674 µL o-fosforik asit eklenip ultrasonik banyoya konuldu. Saf suyla 1 L'ye tamamlandı. Vakum filtreden süzöldü.
<b>Hareketli faz çözeltisi [ACN:Fosfat tamponu (30:70, h/h) ]</b>	Tampon çözeltinin her 100 mL'si için 40 µL trietilamin eklendi. 1.0 L'lik hareketli faz çözeltisinin 700.0 mL trietilamin eklenmiş fosfat tamponu üzerine 300.0 mL ACN eklendi. Hareketli fazın pH'ı 5.0 N NaOH çözeltisi ile ayarlandı.
<b>KAB çözeltisi (20.0 µg mL<sup>-1</sup>)</b>	1000 µg mL <sup>-1</sup> KAB stok çözeltiden 20 µL alınıp hareketli faz ile 1 mL'ye tamamlandı.
<b>URA çözeltisi (10.0 µg mL<sup>-1</sup>)</b>	1000 µg mL <sup>-1</sup> URA stok çözeltiden 10 µL alınıp hareketli faz ile 1 mL'ye tamamlandı.

### 3.5. pK<sub>a</sub> Analizi Yöntemleri

#### 3.5.1. Potansiyometrik Yöntem ile pK<sub>a</sub> Analizi

##### KAB için Potansiyometrik Yöntem Uygulanışı

KAB için potansiyometrik yöntem ile pK<sub>a</sub> tayini, MeOH:su 40:60 (h/h) ve 50:50 (h/h) ortamında gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak Gran fonksiyonu ile elektrot kalibrasyonu yapılmıştır. Birinci basamak kalibrasyonda, 1.0 M KOH çözeltisinden MeOH:su (40:60, h/h) içerecek şekilde 0.1 M KOH titrant çözeltisi hazırlanmıştır. Bu titrant kullanılarak, hacimce 40:60 oranında MeOH:su içinde 0.1 M KCl ile iyonik şiddeti ayarlanmış 2.94 M KHP titre edilmiştir. İkinci basamak kalibrasyonda ise, aynı titrant kullanılarak 40:60 (h/h) MeOH:su çözeltisi içinde 0.1 M KCl ile iyonik şiddeti ayarlanan 0.03 M HCl titre edilmiştir. Kalibrasyon deneylerinden elde edilen verilerle elektrodun kalibrasyon katsayıları hesaplanmıştır (Tablo 3.8).

KCl ile iyonik şiddeti 0.01 olarak ayarlanmış KAB çözeltisi (2.2 mM), aynı oranda MeOH içeren 0.01 M KOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Eklenen titrant hacmine karşılık ölçülen mV değerleri grafiğe geçirilerek titrasyon eğrisi oluşturulmuştur. KAB için hesaplanan  $\phi$  değerleri titrant hacmine karşı işaretlenerek elde edilen eğriden pK<sub>a</sub> değeri bulunmuştur.

MeOH:su (50:50, h/h) ortamında da pK<sub>a</sub> tayini için aynı işlemler tekrar edilmiştir (Tablo 3.7).



**Tablo 3.7.** KAB'in MeOH:su (50:50, h/h) ortamındaki potansiyometrik analiz koşulları

	<b>Analit</b>	<b>Titrant</b>
<b>Kalibrasyon 1.Basamak</b>	2.94 M KHP (0.1 M KCl içeren 50:50, MeOH:su, h/h)	0.1 M KOH (50:50, MeOH:su, h/h)
<b>Kalibrasyon 2. Basamak</b>	0.03 M HCl (0.1 M KCl içeren 50:50, MeOH:su, h/h)	0.1 M KOH (50:50, MeOH:su, h/h)
<b>pK<sub>a</sub> tayini</b>	2.2 mM KAB (0.1 M KCl içeren 50:50, MeOH:su, h/h)	0.01 M KOH (50:50, MeOH:su, h/h)

**Tablo 3.8.** KAB'in MeOH:su (40:60, h/h) ortamındaki potansiyometrik analiz koşulları

	<b>Analit</b>	<b>Titrant</b>
<b>Kalibrasyon 1.Basamak</b>	2.94 M KHP (0.1 M KCl içeren 40:60, MeOH:su, h/h)	0.1 M KOH (40:60, MeOH:su, h/h)
<b>Kalibrasyon 2. Basamak</b>	0.03 M HCl (0.1 M KCl içeren 40:60, MeOH:su, h/h)	0.1 M KOH (40:60, MeOH:su, h/h)
<b>pK<sub>a</sub> tayini</b>	2.2 mM KAB (0.1 M KCl içeren 40:60, MeOH:su, h/h)	0.01 M KOH (40:60, MeOH:su, h/h)

**Tablo 3.9.** TAD'in MeOH:su (60:40, h/h) ortamındaki potansiyometrik analiz koşulları

	<b>Analit</b>	<b>Titrant</b>
<b>Kalibrasyon 1.Basamak</b>	2.94 M KHP (0.1 M KCl içeren 60:40, MeOH:su, h/h)	0.1 M KOH (60:40, MeOH:su, h/h)
<b>Kalibrasyon 2. Basamak</b>	0.03 M HCl (0.1 M KCl içeren 60:40, MeOH:su, h/h)	0.1 M KOH (60:40, MeOH:su, h/h)
<b>pK<sub>a</sub> tayini</b>	2.2 mM TAD (0.1 M KCl içeren 60:40, MeOH:su, h/h)	0.01 M KOH (60:40, MeOH:su, h/h)

### **TAD için Potansiyometrik Yöntem Uygulanışı**

TAD için potansiyometrik yöntem ile  $pK_a$  tayini hacimce 60:40 MeOH:su ortamında gerçekleştirilmiştir.

İlk olarak Gran fonksiyonu ile elektrot kalibrasyonu yapılmıştır. Birinci basamak kalibrasyonda, 1.0 M KOH çözeltisinden MeOH:su (60:40, h/h) içerecek şekilde 0.1 M KOH titrant çözeltisi hazırlanmıştır. Bu titrant kullanılarak, hacimce 60:40 oranında MeOH:su içinde 0.1 M KCl ile iyonik şiddeti ayarlanmış 2.94 M KHP titre edilmiştir. İkinci basamak kalibrasyonda ise, aynı titrat kullanılarak 60:40 MeOH:su çözeltisi içinde 0.1 M KCl ile iyonik şiddeti ayarlanan 0.03 M HCl titre edilmiştir. Kalibrasyon deneylerinden elde edilen verilerle elektrotun kalibrasyon katsayıları hesaplanmıştır (Tablo 3.9).

Stok çözeltisinden MeOH:su (60:40, h/h) ile seyreltilerek hazırlanan 0.1 M KCl ile iyonik şiddeti ayarlanmış TAD çözeltisi (2.2 mM), aynı oranda MeOH içeren 0.01 M KOH çözeltisi ile titre edilmiştir. Eklenen titrant hacmine karşılık ölçülen mV değerleri grafiğe geçirilerek titrasyon eğrisi oluşturulmuştur. TAD için hesaplanan  $\phi$  değerleri titrant hacmine karşı işaretlenerek elde edilen eğriden  $pK_a$  değeri bulunmuştur.

### **3.5.2. Spektrofotometrik Yöntem ile $pK_a$ Analizi**

#### **KAB için Spektrofotometrik Yöntem Uygulanışı**

KAB molekülünün iyonik ve noniyonik hallerinin UV-GB spektrumları sırasıyla 0.01 M HCl ve 0.01 M NaOH çözeltileri içinde hazırlanan çözeltileri ile elde edilmiştir.  $pK_a$  tayini için değişen pH değerlerindeki fosfat tamponunda  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişiminde hazırlanan KAB çözeltileri kullanılmış ve absorbans değerleri 225 nm'de ölçülmüştür. KAB çözeltilerinin pH değerlerine karşılık gelen bu absorbans değerleri Handerson-Hasselbalch eşitliğinde kullanılarak KAB'ın  $pK_a$  değeri hesaplanmıştır.

#### **TAD için Spektrofotometrik Yöntem Uygulanışı**

TAD molekülünün iyonik ve noniyonik hallerinin UV-GB spektrumları sırasıyla 0.01 M HCl ve 0.01 M NaOH çözeltileri içinde hazırlanan çözeltileri ile elde edilmiştir.

$pK_a$  tayini için değişen pH değerlerindeki fosfat tamponunda  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  derişiminde hazırlanan TAD çözeltileri kullanılmış ve absorbens değerleri 285 nm de ölçülmüştür. TAD çözeltilerinin pH değerlerine karşılık gelen bu absorbens değerleri Handerson-Hasselbalch eşitliğinde kullanılarak TAD'in  $pK_a$  değeri hesaplanmıştır.

### 3.5.3. HPLC Yöntemi ile $pK_a$ Analizi

#### KAB için HPLC Yöntemi Uygulanışı:

HPLC yöntemi ile  $pK_a$  tayininde, hareketli faz pH'sı ile etkin maddeye ait pikin alıkonma zamanı arasındaki ilişki incelenmiştir. KAB etkin maddesinin  $pK_a$  tayini, C18 (250  $\times$  4.6 mm, 5  $\mu\text{m}$ ) kolonunda, ACN: Fosfat tamponu (10 mM, % 0.04 TEA içeren, 30:70, h/h) hareketli fazı ile yapılmıştır. Hazırlanan ACN:Fosfat tamponu (30:70, h/h) hareketli faz çözeltisinin her bir pH değeri için, kolon analizden önce 1 mL/dk akış hızında hareketli faz geçirerek analize hazır hale getirilmiştir. Her bir pH değeri için önce  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$  URA standart çözeltisinden 20  $\mu\text{L}$  çözelti kolona enjekte edilmiştir. Bu analizin ardından  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$  KAB standart çözeltisinden 20  $\mu\text{L}$  alınarak aynı şekilde kolona gönderilmiştir. Analizler 1 mL/dk akış hızında gerçekleştirilmiştir.

**Tablo 3.10.** KAB'ın HPLC ile analizindeki koşullar

Kolon	Hareketli faz bileşimi	Akış Hızı
C18 (250 $\times$ 4.6 mm, 5 $\mu\text{m}$ )	ACN: Fosfat tamponu (% 0.04 TEA içeren) (10 mM, 30:70, h/h)	1 mL dk <sup>-1</sup>

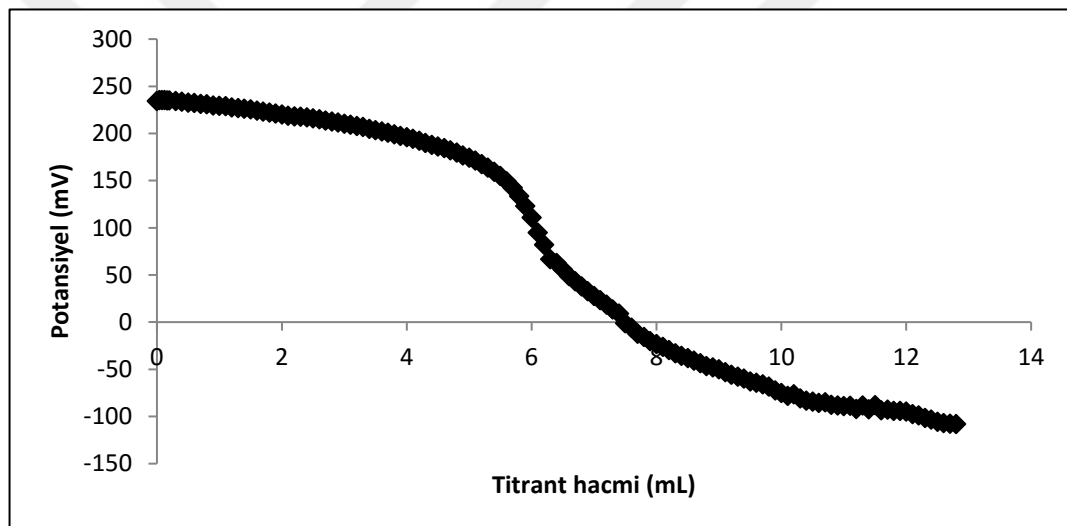
## 4. BULGULAR

### 4.1. Potansiyometrik Yöntem

#### 4.1.1. KAB için Potansiyometrik Yöntem ile $pK_a$ Tayini

##### KAB'ın MeOH:su (50:50, h/h) Ortamında $pK_a$ Tayini

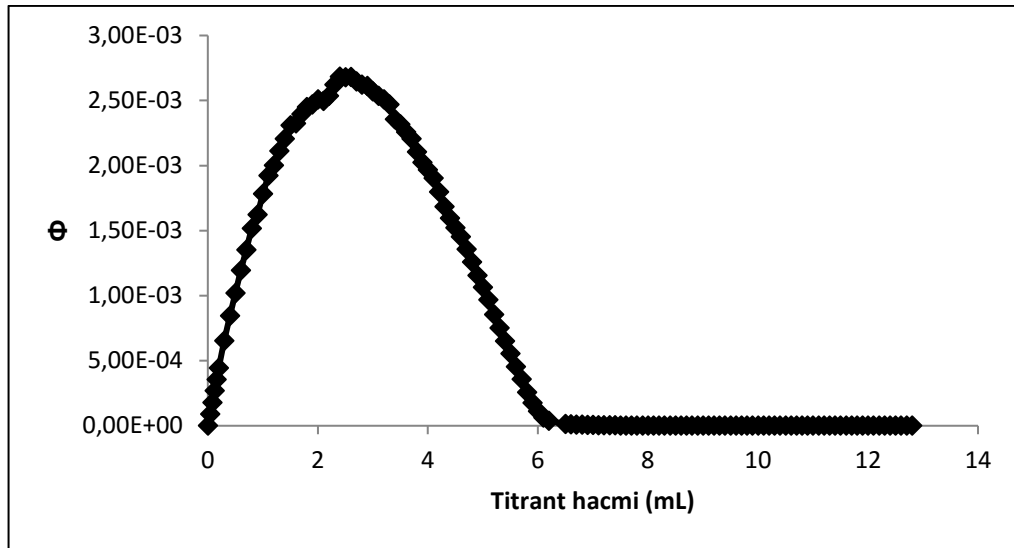
KAB'ın MeOH:su (50:50, h/h) ortamında  $pK_a$  tayini, Gran fonksiyonu kullanılarak kalibre edilmiş elektrotla yapılmıştır (bkz Bölüm 3.5.1). KAB'ın MeOH:su (50:50, h/h) ortamında 0.01 M KOH ile potansiyometrik titrasyonunda elde edilen potansiyel değerleri (mV) eklenen titrant hacmine karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.1).



**Şekil 4.1.** KAB'ın MeOH:su (50:50, h/h) ortamında KOH ile potansiyometrik titrasyonu eğrisi

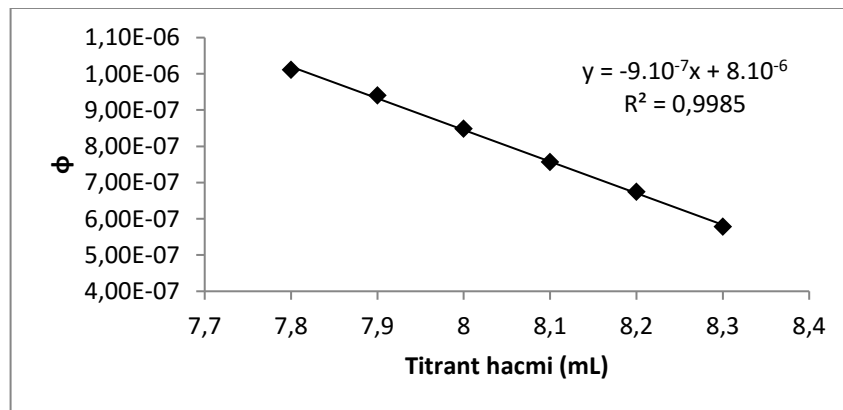
Elektrot kalibrasyonundan elde edilen katsayılarla KAB'ın MeOH:su (50:50, h/h) ortamındaki titrasyonundan elde edilen potansiyel değerleri Gran eşitliğiyle (Eşitlik 2.21) birlikte hesaplanarak pH değerleri elde edilmiştir (bkz Ek 1).

Bulunan pH değerleri kullanılarak, zayıf asit-kuvvetli baz titrasyonları için kullanılan Gran eşitliği ile  $\phi$  değeri hesaplanmıştır (bkz Ek 1). Bu değerler titrant hacmine karşılık grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.2).



**Şekil 4.2.** KAB için MeOH:su (50:50, h/h) ortamında titrant hacmi ile  $\phi$  değerinin değişimi grafiği

$\phi$  değerinin eklenen titrant hacmi ile değişiminde dönüm noktası, doğrusallığın başladığı nokta olarak belirlenmiştir. Şekil 4.2'deki grafiğin dönüm noktasını ifade eden doğrusal kısmı ayrılmış ve doğru denklemi hesaplanmıştır (Şekil 4.3).

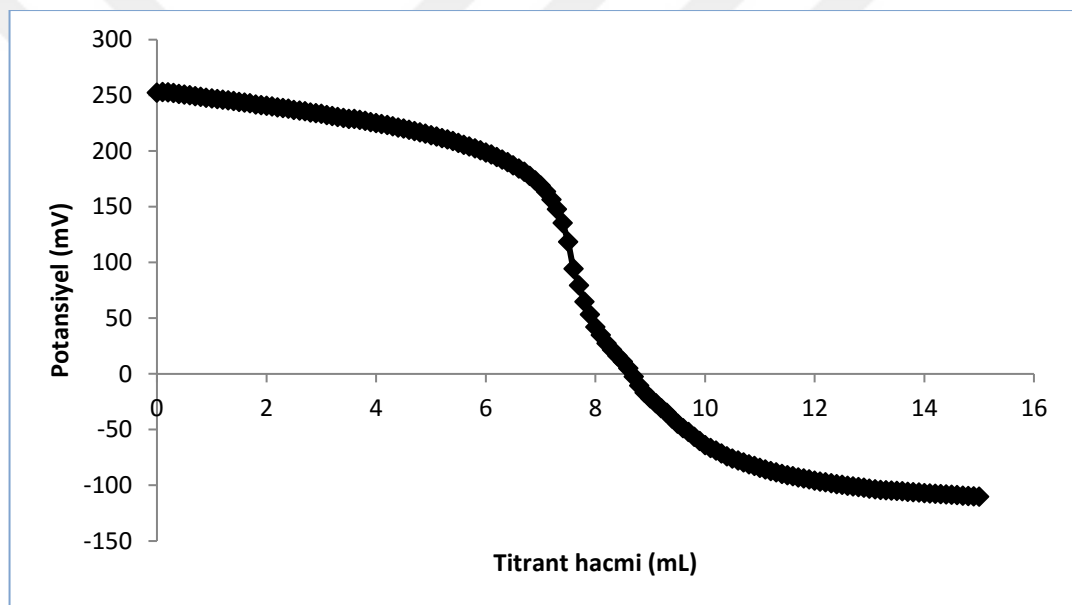


**Şekil 4.3.** KAB için MeOH:su (50:50, h/h) ortamında titrant hacmine karşılık  $\phi$  değerinin doğrusal olduğu kısım

Grafiğin doğrusal kısmına ait doğru denklemi  $y = -9.10^{-7}x + 8.10^{-6}$  olarak bulunmuştur. Denkleme ait eğim  $-K_a$ 'ya eşit olduğundan,  $K_a$  değeri  $9.10^{-7}$  ve  $pK_a$  değeri 6.05 olarak hesaplanmıştır.

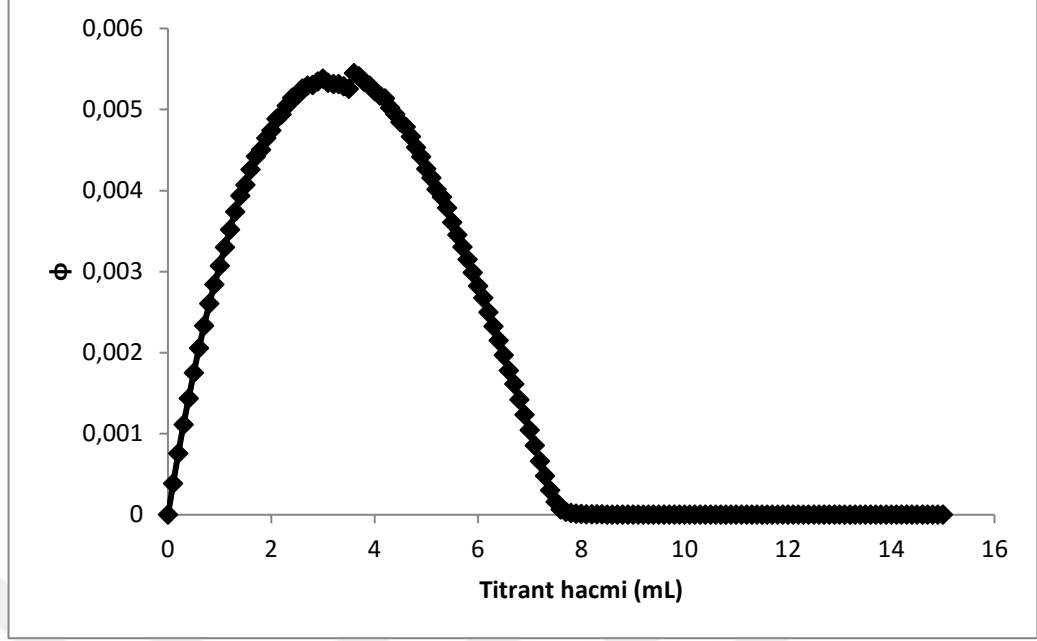
#### KAB'ın MeOH:su (40:60, h/h) Ortamında $pK_a$ Tayini

KAB'ın MeOH:su (40:60, h/h) ortamında  $pK_a$  tayini zayıf asit-kuvvetli baz titrasyonları için kullanılan Gran fonksiyonu (bkz Ek 1) kullanılarak kalibre edilmiş elektrotla yapılmıştır (bkz Bölüm 3.5.1). KAB'ın MeOH:su (40:60, h/h) ortamında 0.01 M KOH ile potansiyometrik titrasyonunda elde edilen potansiyel değerleri (mV) eklenen titrant hacmine karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.4).



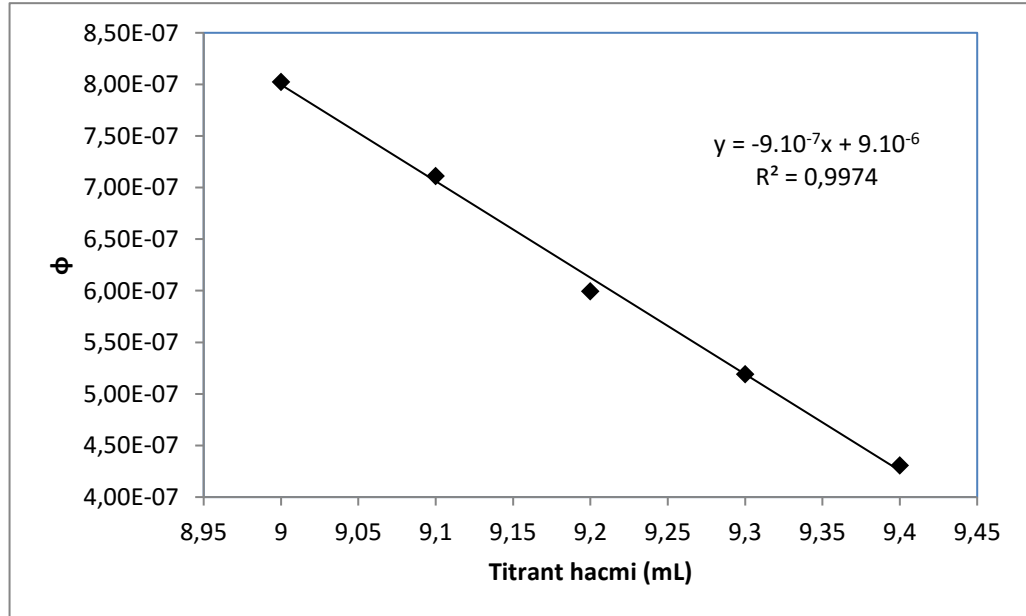
**Şekil 4.4.** KAB'ın MeOH:su (40:60, h/h) ortamında KOH ile potansiyometrik titrasyonu eğrisi

Elektrot kalibrasyonundan elde edilen katsayılarla KAB'ın MeOH:su (40:60, h/h) ortamındaki titrasyonundan elde edilen potansiyel değerleri zayıf asit-kuvvetli baz titrasyonları için kullanılan Gran eşitliğiyle (Eşitlik 2.21) birlikte hesaplanarak pH değerleri elde edilmiştir. Bulunan pH değerleriyle hesaplanmış  $\phi$  değeri titrant hacmine karşılık grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.5).



**Şekil 4.5.** KAB için MeOH:su (40:60, h/h) ortamında titrant hacmi ile  $\phi$  değerinin değişimi grafiği

$\phi$  değerinin eklenen titrant hacmi ile değişimini gösteren grafiğin doğrusal olduğu kısım ayrılmış ve doğru denklemi hesaplanmıştır (Şekil 4.6).



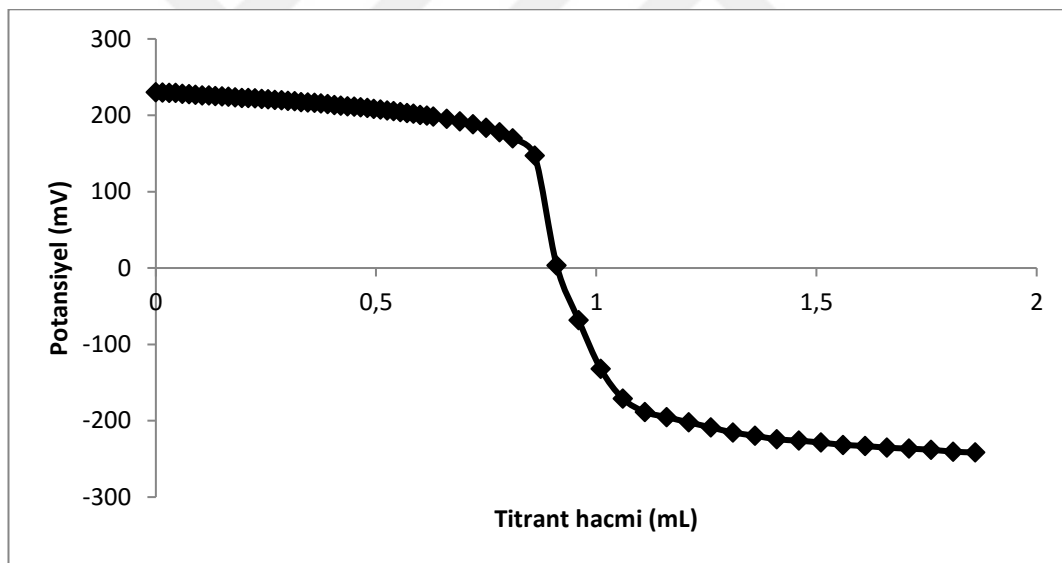
**Şekil 4.6.** KAB için MeOH:su (40:60, h/h) ortamında titrant hacmine karşılık  $\phi$  değerinin doğrusal olduğu kısım

Bu grafiğe ait doğru denklemi  $y = -9.10^{-7}x + 9.10^{-6}$  olarak bulunmuştur. Buradan  $K_a$  değeri  $9.10^{-7}$ ,  $pK_a$  değeri ise 6.05 olarak hesaplanmıştır.

#### 4.1.2. TAD için Potansiyometrik Yöntem ile $pK_a$ Tayini

##### TAD'in MeOH:su (60:40, h/h) Ortamında $pK_a$ tayini

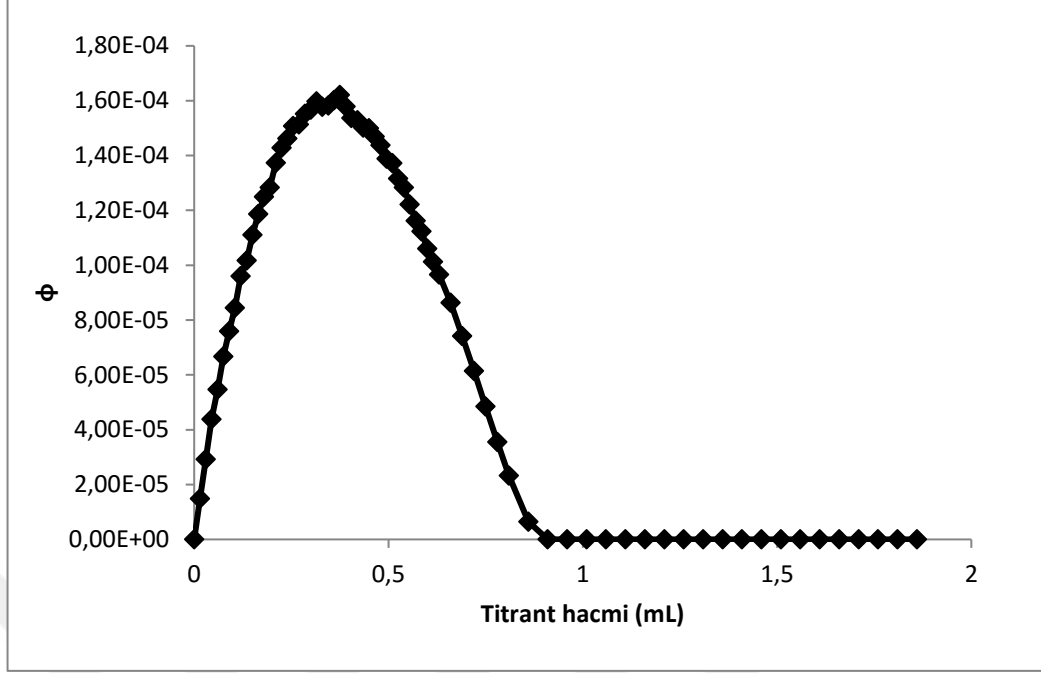
TAD etkin maddesi, % 60'tan daha az MeOH içeren ortamlarda çöktüğü için MeOH:su (60:40, h/h) içeren ortamda  $pK_a$  tayini yapılmıştır. TAD'in MeOH:su (60:40, h/h) ortamında  $pK_a$  tayini zayıf asit-kuvvetli baz titrasyonları için kullanılan Gran fonksiyonu kullanılarak kalibre edilmiş (bkz Ek 1) elektrotla yapılmıştır (bkz Bölüm 3.5.1). TAD'in MeOH:su (60:40, h/h) ortamında 0.01 M KOH ile potansiyometrik titrasyonunda elde edilen potansiyel değerleri (mV) eklenen titrant hacmine karşı grafiğe geçirilmiştir (Şekil 4.7).



**Şekil 4.7.** TAD'in MeOH:su (60:40, h/h) ortamında KOH ile potansiyometrik titrasyonu eğrisi

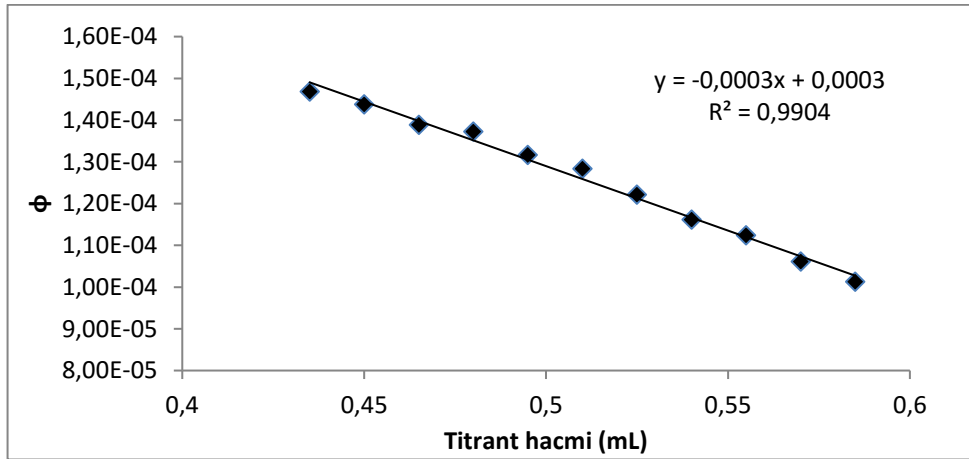
Elektrot kalibrasyonu ile elde edilen katsayılarla hesaplanan  $\phi$  değerleriyle çizilen grafiğin doğrusal kısmı alınıp doğru denklemi hesaplanmıştır (Şekil 4.8).





**Şekil 4.8.** TAD için MeOH:su (60:40, h/h) ortamında titrant hacmi ile  $\phi$  değerinin değişimi grafiği

$\phi$  değerinin eklenen titrant hacmi ile değişiminde dönüm noktasını ifade eden doğrusal kısmı ayrılmış ve doğru denklemi hesaplanmıştır (Şekil 4.9).



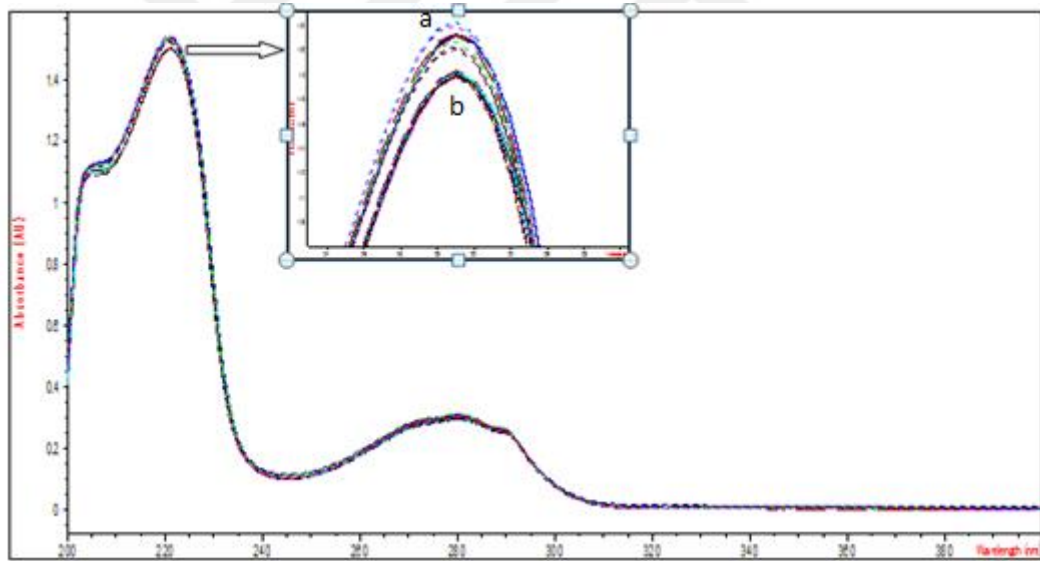
**Şekil 4.9.** TAD için MeOH:su (40:60, h/h) ortamında titrant hacmine karşılık  $\phi$  değerinin doğrusal olduğu kısmın grafiğinin doğrusal olduğu kısım

Bu grafiğe ait doğru denklemi  $y = -3.10^{-4}x + 3.10^{-4}$  olarak bulunmuştur. Buradan,  $K_a$  değeri  $3.10^{-4}$  ve  $pK_a$  değeri 3.52 olarak hesaplanmıştır.

## 4.2. Spektrofotometrik Yöntem

### 4.2.1. KAB için Spektrofotometrik Yöntem ile $pK_a$ Tayini

Spektrofotometrik  $pK_a$  tayini için, 5.0 M NaOH çözeltisi ile farklı pH değerlerine ayarlanmış fosfat tamponu ile hazırlanan  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  KAB çözeltilerinin 200-400 nm arası spektrumları alınmış ve açılmanın görüldüğü 225 nm dalgaboyundaki absorbans değerleri kaydedilmiştir (Şekil 4.10). Ayrıca, KAB'ın iyonik ve noniyonik formları için 0.01 M HCl ve 0.01 M NaOH içindeki KAB çözeltilerinin de spektrumu alınmıştır.



**Şekil 4.10.** KAB için farklı pH değerlerindeki ve 0.01 M NaOH (a) ve 0.01 M HCl (b) çözeltilerindeki UV spektrumları

Her bir pH değeri için ölçülen absorbans değerleri kullanılarak Albert-Serjeant yöntemiyle Handerson-Hasselbalch eşitliğinde yerine konarak  $pK_a$  değeri hesaplanmıştır (Tablo 4.1). Elde edilen  $pK_a$  değerlerinin ortalaması alınarak KAB için  $pK_a$  değeri  $6.43 \pm 0.29$  olarak hesaplanmıştır.

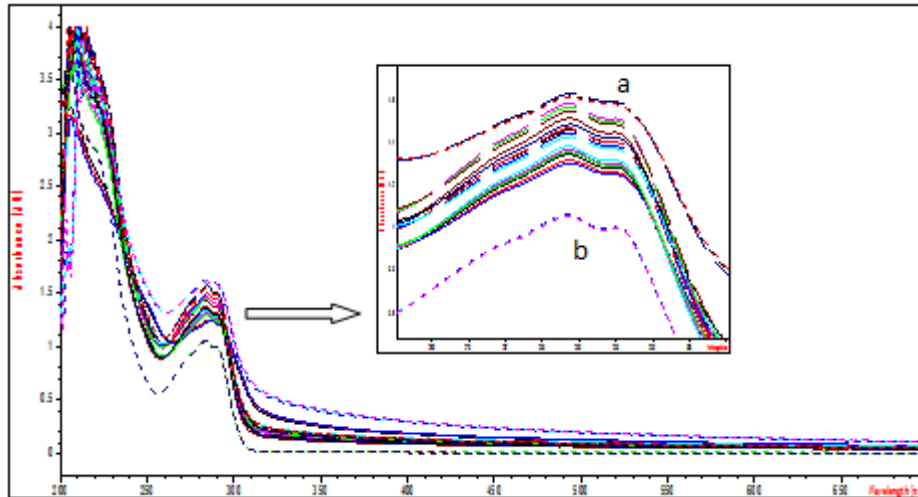
**Tablo 4.1.** Değişen pH'lardaki absorbans değerlerinden  $pK_a$  hesaplanması

pH	Absorbans (A)	$pK_a = pH + \log(A_I - A/A - A_M)$
3.43	1.3753	4.29
3.79	1.3913	4.37
4.77	1.3532	7.56
5.58	1.3854	6.26
6.17	1.3693	7.19
6.29	1.3684	7.34
6.49	1.3738	7.39
6.57	1.4044	6.99
<b><math>pK_a</math> (ort <math>\pm</math> SS)</b>		<b>6.43 <math>\pm</math> 0.29</b>

$A_m = 1.3529$  (0.01 M HCl'de),  $A_i = 1.5405$  (0.01 M NaOH'da)

#### 4.2.2. TAD için Spektrofotometrik Yöntem ile $pK_a$ Tayini

TAD'ın  $pK_a$  değerinin tayini için, 5.0 M NaOH ile ayarlanmış farklı pH değerlerindeki fosfat tamponu içinde hazırlanan çözeltilerin 200-400 nm arası spektrumları alınmıştır. Spektral açılmanın görüldüğü 285 nm dalgaboyundaki absorbans değerleri kaydedilmiştir (Şekil 4.11). Ayrıca, TAD'ın iyonik ve iyonik olmayan formlarının absorbanlarının belirlenmesi için sırasıyla 0.01 M HCl ve 0.01 M NaOH içindeki çözeltilerinin 200-400 nm arası spektrumları alınmıştır.



**Şekil 4.11.** TAD için farklı pH değerlerindeki ve 0.01 N NaOH (a) ve 0.01 N HCl (b) çözeltilerindeki UV spektrumları

Her bir pH değeri için ölçülen absorban değerleri kullanılarak Albert-Serjeant yöntemiyle Handerson-Hasselbalch eşitliğinde yerine konarak  $pK_a$  değeri hesaplanmıştır (Tablo 4.2). Her bir pH değeri için elde edilen  $pK_a$  değerlerinin ortalaması alınmış ve TAD için  $pK_a$  değeri  $3.44 \pm 0.15$  bulunmuştur.

**Tablo 4.2.** Değişen pH'lardaki absorban değerlerinden  $pK_a$  hesaplanması

pH	Absorbans (A)	$pK_a = pH + \log(A - A_I/A_M - A)$
2.90	1.2412	3.17
3.14	1.3103	3.19
3.39	1.3539	3.31
3.64	1.4742	3.15
4.14	1.4347	3.80
4.93	1.5525	4.01
<b><math>pK_a</math> (ort <math>\pm</math> SS)</b>		<b><math>3.44 \pm 0.15</math></b>

$A_m = 1.040$  (0.01 M HCl'de),  $A_i = 1.6135$  (0.01 M NaOH'da)

### 4.3. HPLC Yöntemi

#### 4.3.1. KAB için HPLC Yöntemi ile pK<sub>a</sub> Tayini

KAB'ın pK<sub>a</sub> değerinin HPLC yöntemi ile analizi için en önemli basamaklardan birisi HPLC yönteminin optimizasyonudur. pK<sub>a</sub> tayininde kullanılacak sabit faz ile hareketli faz bileşiminin belirlenmesi için optimizasyon çalışması yapılmıştır. Bu çalışmada, standart KAB çözeltisi (20 mg mL<sup>-1</sup>) üç farklı ters faz sıvı kromatografisi kolonu (250 × 4.6 mm, 5 µm) ve farklı bileşimlerdeki hareketli faz çözeltileri kullanılmıştır (Tablo 4.3).

**Tablo 4.3.** KAB'ın HPLC yöntemi ile pK<sub>a</sub> tayini için kolon türü ve hareketli faz bileşiminin kapasite faktörüne etkisi

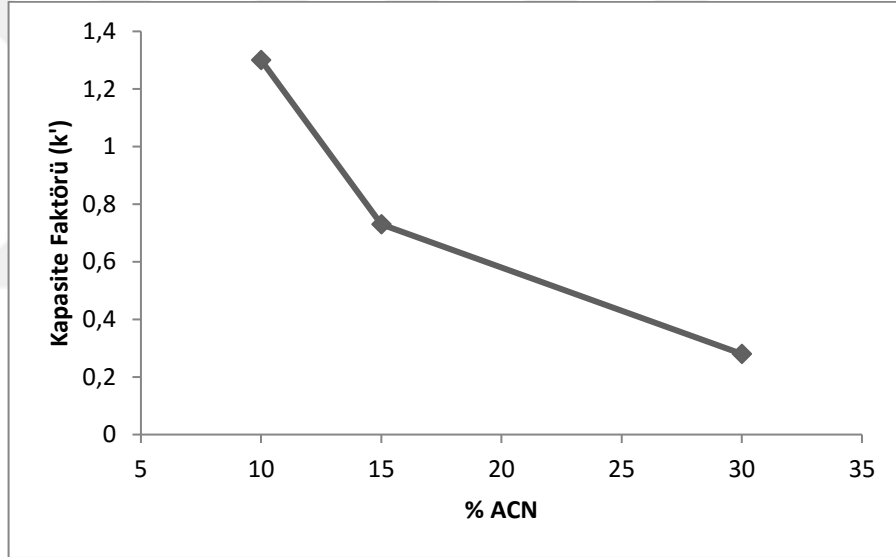
Sabit Faz	ACN: Fosfat Tamponu (h/h, 10 mM, pH 2.5)	t <sub>0</sub> (URA)	t <sub>R</sub> (KAB)	k'
C18	10:90	3.00	6.90	1.30
	15:85	2.75	4.77	0.73
	30:70	2.34	3.00	0.28
C8	15:85	3.18	9.16	1.88
	20:80	3.09	5.14	0.66
	30:70	3.59	2.66	-
CN	10:90	3.57	11.16	2.12
	15:85	3.45	7.08	1.05
	20:80	3.35	5.09	0.52

Sabit faz optimizasyon için test edilen C18, C8 ve CN fonksiyonel grup taşıyan kolonlardan, C18 fonksiyonel grubu taşıyan sabit faz ile doldurulmuş analitik kolon (250 × 4.6 mm, 5 µm) kromatografik ayırım için seçilmiştir. Seçilen C18 kolonda üç farklı bileşimdeki hareketli kullanılarak enjeksiyon yapılmıştır. C18 içeren kolonda elde edilen veriler hareketli faz bileşimi açısından değerlendirildiğinde, hareketli

fazdaki organik düzenleyici ACN miktarının artmasıyla kapasite faktörünün diğer bir deyişle alıkonma zamanının azaldığı saptanmıştır (Tablo 4.4, Şekil 4.12).

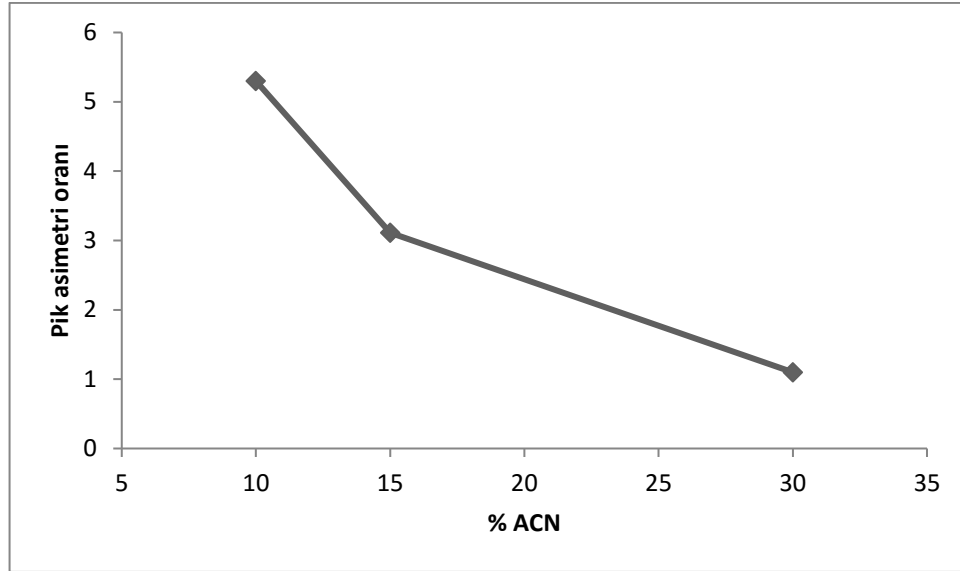
**Tablo 4.4.** KAB'ın HPLC yöntemi ile  $pK_a$  tayini için C18 kolonda hareketli faz bileşiminin alıkonma ve pik simetrisine etkisi

ACN/Tampon (h/h)	Alıkonma zamanı (dk)	Kapasite Faktörü	Pik Asimetri Oranı
10:90	6.90	1.30	5.30
15:85	4.77	0.73	3.11
30:70	3.00	0.28	1.10



**Şekil 4.12.** KAB için C18 kolonunda ACN yüzdelerine göre kapasite faktörü ( $k'$ ) değişimi

Ayrıca, hareketli fazdaki ACN miktarı azaldıkça pik asimetri oranında artış gözlenmiştir (Tablo 4.4, Şekil 4.13).



**Şekil 4.13.** KAB için C18 kolonunda ACN yüzdelere göre pik asimetri oranı değişimi

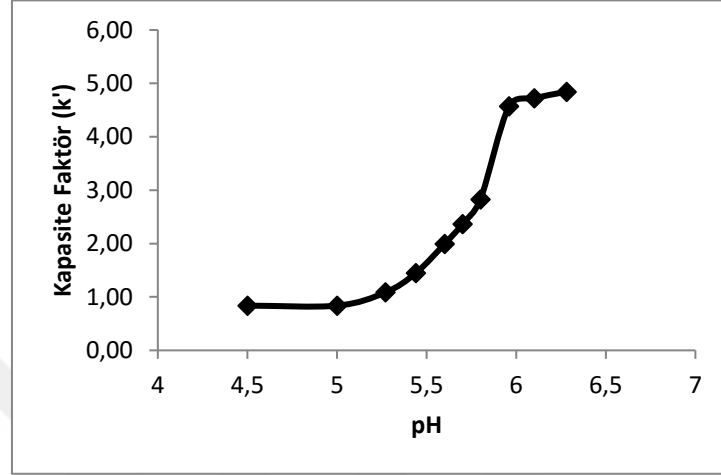
KAB etkin maddesi için en uygun kromatografik sistem olarak C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm) kolonu ile ACN: Fosfat tamponundan (30:70, h/h) oluşan hareketli faz seçilmiştir.

pK<sub>a</sub> tayini amacıyla, hareketli faza eklenen tamponun pH değeri artırılarak KAB pikine ait alıkonma zamanı kayması izlenmiştir. pH değeri arttıkça KAB pikinin alıkonma zamanı artmıştır (Tablo 4.5).

**Tablo 4.5.** Farklı pH değerlerindeki KAB ve URA'ye ait alıkonma zamanları ile KAB'e ait kapasite faktörleri

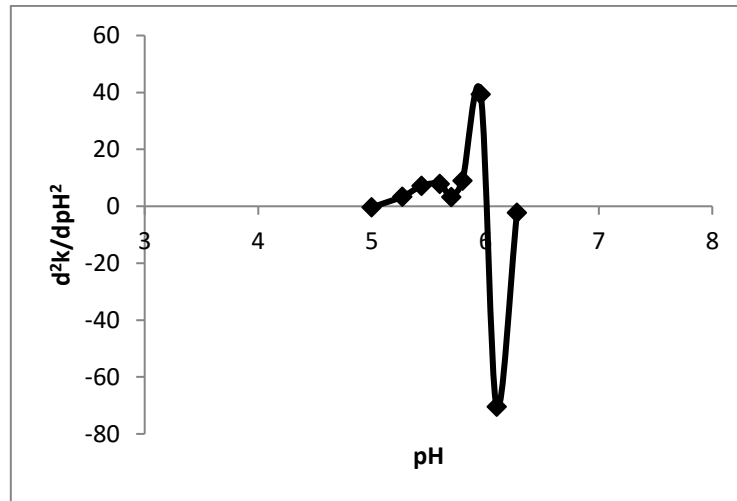
pH	t <sub>0</sub> (URA)	t <sub>R</sub> (KAB)	k'
4.50	2.34	4.20	0.83
5.00	2.34	4.30	0.84
5.27	2.34	4.88	1.09
5.44	2.34	5.73	1.49
5.60	2.34	7.00	2.08
5.70	2.34	7.87	2.36
5.80	2.34	8.75	2.74
5.96	2.34	13.04	4.57
6.10	2.34	13.39	4.72
6.28	2.34	13.67	4.84

$pK_a$ , maddeye ait pikin kapasite faktörüne bağlı olarak hesaplanır. Alikonma zamanları ile hesaplanan KAB kapasite faktörleri pH'a karşı grafiğe geçirilmiştir. Elde edilen eğrinin dönüm noktası  $pK_a$  değerine eşittir (Şekil 4.14).



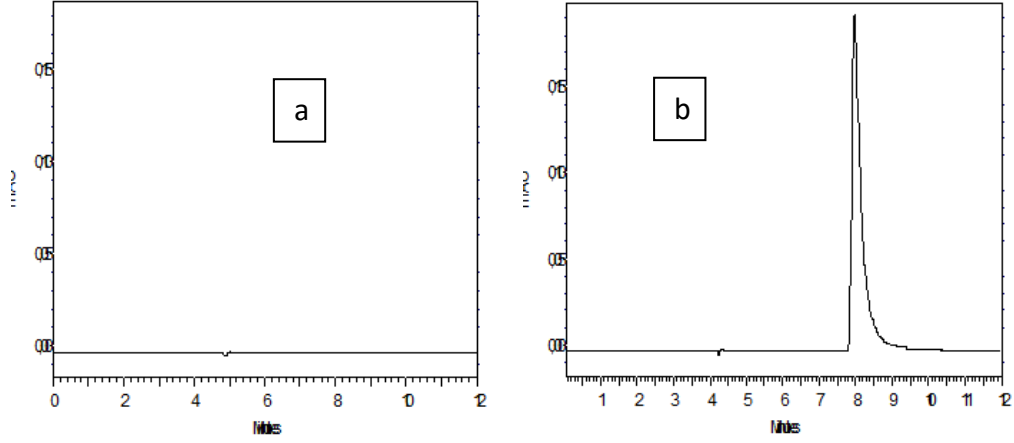
**Şekil 4.14.** HPLC ile KAB'e ait pH'a karşılık kapasite faktörü grafiği

Dönüm noktasının daha iyi belirlenebilmesi için eğrinin pH'ya göre ikinci türevi alınmıştır (Şekil 4.15). KAB için çizilen ikinci türev grafiğinde eğrinin x-eksenini kestiği pH 6.00 değeri KAB'ın  $pK_a$ 'sı olarak belirlenmiştir.  $pK_a = 6.00$  değerinde elde edilen KAB piki Şekil 4.16'da verilmiştir.



**Şekil 4.15.** KAB'ın HPLC ile analizinde elde edilen pH- $d^2k/dpH^2$  eğrisi





**Şekil 4.16.** Örnek kromatogramlar: **(a)** hareketli faz ve **(b)** standart KAB ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ )

#### 4.4. $pK_a$ Tayin Yöntemleri için Tekrarlanabilirlik Çalışmaları

##### 4.4.1. Spektrofotometrik Yöntem için Tekrarlanabilirlik

##### KAB'a ait $pK_a$ Tayini için Tekrarlanabilirlik Çalışması

KAB etkin maddesinin spektrofotometrik yöntem ile  $pK_a$  tayini için uygulanan yöntemin cihaz ve yöntem tekrarlanabilirliği test edilmiştir. Bu amaçla, KAB'ın  $pK_a$  değerine yakın bir değer olan pH 6.0 ortamında hazırlanmış KAB standardının ( $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) absorpsiyonu, spektrofotometrik yöntem analizlerinin yapıldığı dalgaboyunda (225 nm), aynı ( $n=6$ ) ve farklı bağımsız çözeltilerinden olmak üzere ölçülmüştür ( $n=6$ ). Bu absorpsiyon değerleri ile ortalama değer, standart sapma ve bağıl standart sapma hesaplanmıştır (Tablo 4.6).

**Tablo 4.6.** KAB etkin maddesinin spektrofotometrik yöntem ile pK<sub>a</sub> tayini için cihaz ve yöntem tekrarlanabilirliği bulguları

KAB	Cihaz Tekrarlanabilirliği	Yöntem Tekrarlanabilirliği
<b>Absorbans (225 nm)</b>	1.2099	1.3547
	1.2060	1.3544
	1.2039	1.3516
	1.2034	1.3464
	1.2048	1.3554
	1.2053	1.3544
$\bar{X}$	1.2056 ± 0.0010	1.3528 ± 0.1027
<b>SS</b>	0.0023	0.0340
<b>BSS (%)</b>	0.1931	0.2515

$\bar{X}$  : Ortalama ± standart hata, SS: Standart sapma, BSS : % Bağıl standart sapma.

#### **TAD'a ait pK<sub>a</sub> Tayini için Tekrarlanabilirlik Çalışması**

TAD etkin maddesinin spektrofotometrik yöntem ile pK<sub>a</sub> tayini için uygulanan yöntemin cihaz ve yöntem tekrarlanabilirliği test edilmiştir. Bu amaçla, TAD'ın pK<sub>a</sub> değerine yakın bir değer olan pH 4.5 ortamında hazırlanmış TAD standardının (20 µg mL<sup>-1</sup>) absorsiyonu, spektrofotometrik yöntem analizlerinin yapıldığı dalgaboyunda (285 nm), aynı (n=6) ve farklı bağımsız çözeltilerinden olmak üzere ölçülmüştür (n=6). Bu absorbans değerleri ile ortalama değer, standart sapma ve bağıl standart sapma hesaplanmıştır (Tablo 4.7).

**Tablo 4.7.** TAD etkin maddesinin spektrofotometrik yöntem ile pK<sub>a</sub> tayini için cihaz ve yöntem tekrarlanabilirliği bulguları

TAD	Cihaz Tekrarlanabilirliği	Yöntem Tekrarlanabilirliği
Absorbans (285 nm)	1.4734	1.4997
	1.4792	1.4495
	1.4737	1.4325
	1.4679	1.4580
	1.4641	1.4881
	1.4537	1.4916
$\bar{X}$	1.4687 ± 0.0037	1.4699 ± 0.0110
SS	0.0090	0.0270
BSS (%)	0.6122	1.8373

$\bar{X}$  : Ortalama ± standart hata, SS: Standart sapma, BSS : % Bağıl standart sapma.

#### 4.4.2. HPLC Yöntemi için Tekrarlanabilirlik

##### KAB Etkin Maddesinin HPLC ile pK<sub>a</sub> Tayini için Tekrarlanabilirlik Çalışması

KAB etkin maddesinin HPLC yöntemi ile pK<sub>a</sub> tayini için enjeksiyon ve yöntem tekrarlanabilirliği incelenmiştir. Enjeksiyon ve yöntem tekrarlanabilirlikleri KAB piki için hesaplanan kapasite faktörleri esas alınmıştır (n=6, Tablo 4.8).

**Tablo 4.8.** KAB etkin maddesinin HPLC yöntemi ile pK<sub>a</sub> tayini için enjeksiyon ve yöntem tekrarlanabilirliği bulguları

KAB	Enjeksiyon Tekrarlanabilirliği	Yöntem Tekrarlanabilirliği
k'	4.34	4.42
	4.37	4.45
	4.43	4.50
	4.41	4.59
	4.39	4.72
	4.42	4.45
$\bar{X}$	4.39 ± 0.01	4.52 ± 0.03
SS	0.03	0.07
BSS (%)	0.73	1.66

$\bar{X}$  : Ortalama ± standart hata, SS: Standart sapma, BSS : % Bağıl standart sapma.

KAB ve TAD maddelerinin pK<sub>a</sub> tayini amacıyla kullanılan yöntemlerle elde edilen pK<sub>a</sub> değerlerinin birbiri ile uyumluluğunun sınanması amacıyla spektrofotometri, potansiyometri ve HPLC ile tekrarlı analizler yapılmıştır. KAB için spektrofotometrik yöntemle elde edilen pK<sub>a</sub> değerleri ile diğer yöntemlerle saptanan pK<sub>a</sub> değerleri arasında % 95 güvenlik düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı fark vardır ( Kruskal-Wallis testi, p > 0.05, Ek.4). TAD için spektrofotometrik ve potansiyometrik yöntemle elde edilen pK<sub>a</sub> değerleri arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı değildir (Mann Whitney U testi, p < 0.05, Ek.3).

**Tablo 4.9.** KAB ve TAD maddeleri için spektrofotometri, potansiyometri ve HPLC yöntemleri ile deneysel olarak hesaplanan pK<sub>a</sub> değerleri\*

	Spektrofotometri	Potansiyometri		HPLC
<b>KAB</b>	6.43 ± 0.29 (0.55) <sup>§</sup>	<b>MeOH:su (50:50, h/h)</b>	<b>MeOH:su (40:60. h/h)</b>	6.00 ± 0.031 (0.92) <sup>**</sup>
		6.05 ± 0.003 (0.095) <sup>**</sup>	6.05 ± 0.009 (0.253) <sup>**</sup>	
<b>TAD</b>	3.44 ± 0.15 (0.73) <sup>**</sup>	<b>MeOH:su (60:40. h/h)</b>		-
		3.52 ± 0.012 (0.59) <sup>**</sup>		

(\*) : Değerler ortalama ± SS (% BSS) olarak verilmiştir (n=6).

(\*\*) : p < 0.05

(§) : p > 0.05

## 5. TARTIŞMA

Asidik iyonlaşma sabiti ( $pK_a$ ) ilacın iyonize ve noniyonize form düzeylerini, dolayısıyla hücre içine geçiş, plazma proteinlerine bağlanma ve doku penetrasyonunu önemli biçimde etkileyen bir fizikokimyasal parametredir. İlacın farklı pH değerlerindeki iyonlaşma dereceleri biyofarmasötik sınıflandırılmadaki (BCS) yerinin belirlenmesini, ilacın çözünürlüğünü ve membranlardan geçişini doğrudan etkilediği için  $pK_a$  değeri doğru belirlenmesi gereken bir parametredir. Spektrofotometri, potansiyometri ve HPLC temelli deneysel yöntemlerle değişik ilaç moleküllerinin  $pK_a$  değerleri tayin edilebilir. Ancak, ilaç moleküllerinin bir çoğunun suda çözünürlüğü az olduğu için  $pK_a$  tayini için yapılan deneylerde bazı kısıtlamalar vardır. Giderek yaygınlaşan diğer bir yaklaşım da,  $pK_a$  değerlerinin modellemelere dayalı yazılım programları aracılığı ile hesaplanmasıdır.

KAB ve TAD etkin maddelerine ait  $pK_a$  değerlerini deneysel olarak belirleyen bir çalışma literatürde yer almamaktadır. Bu tez çalışmasında, suda çözünmeyen KAB ve TAD etkin maddelerine ait  $pK_a$  değerleri potansiyometrik, spektrofotometrik ve kromatografik yöntemlerle deneysel olarak saptanmıştır.

Potansiyometri  $pK_a$  tayini için bilinen ilk yöntemdir. Yöntemin basit ve ucuz oluşu tercih edilme sebebidir. Diğer avantajları ise analiz duyarlılığının yüksek ve kararlı olmasıdır. Bu çalışmada KAB için potansiyometrik yöntemde (50:50, h/h) ve (40:60, h/h) olmak üzere çözünebildiği iki farklı MeOH:su ortamında analiz yapılmıştır. Bulgular her iki ortamda elde edilen  $pK_a$  değerinin birbirinden farklı olmadığını göstermektedir ( $p < 0.05$ , Tablo 4.9.). TAD etkin maddesine ait  $pK_a$  değerinin potansiyometrik tayininde, sadece çözünebildiği MeOH:su (60:40, h/h) ortamı kullanılmıştır. TAD'ın suda az çözünmesi sebebiyle daha düşük MeOH oranında çalışmak mümkün olmamıştır.

Potansiyometrik yöntemde KAB ve TAD etkin maddelerine ait  $pK_a$  değerleri Gran Yöntemi ile hesaplanmıştır. KAB ve TAD için  $pK_a$  değerleri sırasıyla 6.05 ve 3.52 bulunmuştur (Şekil 4.6 ve 4.9). Tekrarlanan analizler sonucu bulunan  $pK_a$  değerlerindeki BSS'nin en fazla 0.59 olduğu, dolayısıyla sonuçların birbirleriyle tutarlı olduğu görülmektedir.

Spektrofotometrik yöntem suda az çözünen bileşiklerin  $pK_a$  tayini için uygun olduğu bildirilen yöntemlerden biridir. Çok düşük miktarlarda (yaklaşık  $10^{-6}$  M) analitin yeterli olması bu yöntemin avantajlarından biridir. Fakat bu yöntemin kesin ve doğru sonuç verebilmesi için analiz edilen maddenin en az bir kromofor grubu bulunmalı ve iyonize ile noniyonize olmayan türün spektrumları birbirinden farklı olmalıdır.

Bu tezin spektrofotometrik tayin kısmında KAB ve TAD için elde edilen absorbans değerleri, Albert-Serjeant yöntemi ile Henderson-Hasselbalch eşitliğinde yerine konularak her pH düzeyinde hesaplanan  $pK_a$  değerlerinin ortalaması olarak bulunmuştur. Bu  $pK_a$  değerleri, KAB için  $6.43 \pm 0.29$  ve TAD için  $3.44 \pm 0.15$ 'dir (Tablo 4.1 ve 4.2).

Spektrofotometrik yöntemde, cihaz ve yöntem tekrarlanabilirliğinin ölçüsü olan BSS değerleri, KAB için sırasıyla 0.19 ve 0.25; TAD için sırasıyla 0.61 ve 1.84 olarak hesaplanmıştır (Tablo 4.6 ve 4.7). Cihaz tekrarlanabilirliği için kabul edilen en yüksek BSS % 1, yöntem tekrarlanabilirliği için ise % 2 olmak koşulu (75) esas alındığında cihaz ve yöntem yüksek kesinliktedir.

Spektrofotometrik yöntemde gerçekleştirilen önceki çalışmalar, incelenen molekül yanıtlarında pH değişimlerine duyarlı güçlü spektral kaymaların olması durumunda spektrofotometrik yöntemin uygun bir yöntem olacağını göstermektedir. Güçlü spektral kayma olması için de iyonlaşan bölge ile kromofor bölge arasında en fazla üç  $\sigma$  bağ olmalıdır (76). Bu çalışmanın spektrofotometrik yöntem ile yapılan kısmındaki farklı pH değerlerine ait KAB absorpsiyon spektrumunun çok fazla açılmadığı, iyonik ve iyonik olmayan türlerinin absorbans değerleri arasında çok fazla fark olmadığı gözlenmiştir. Bu durum bize KAB maddesinin iyonlaşan kısmının kromofor bölgeye çok yakın olmadığını göstermiştir. Dolayısıyla, KAB için spektrofotometrik olarak saptanan  $pK_a$  değeri ( $6.43 \pm 0.29$ ) potansiyometri ve HPLC yöntemleriyle saptanan  $pK_a$  değerlerinden istatistiksel olarak farklı bulunmuştur ( $p > 0.05$ ). TAD için potansiyometrik ve spektrofotometrik yöntemlerle bulunan  $pK_a$  değerleri istatistiksel olarak aynıdır ( $p < 0.05$ ). Bulgulara

dayanılarak, spektrofotometrik yöntemin KAB için  $pK_a$  tayininde uygun olmadığı söylenilebilir.

HPLC yöntemi ile  $pK_a$  tayininde, KAB molekülünün polaritesi nedeniyle ( $\log P = 2.60$ ) ters faz HPLC yöntemi kullanılmıştır. Kromatografik koşulların optimizasyonu amacıyla C18, C8 ve CN kolonlarda, farklı bileşimlerine sahip hareketli fazlar (pH 2.5) kullanılarak denemeler yapılmıştır. CN ve C8 fonksiyonel grubu taşıyan kolonlarda hacimce 10:90, 15:85 ve 20:80 ACN: Fosfat tamponu (% 0.04 TEA) hareketli faz karışımında pH 2.5'de saptanan alıkonma zamanlarının  $pK_a$  tayini için uzun olduğu görülmüştür (Tablo 4.5). Bu kolonlarda, hareketli fazın pH değeri arttırıldıkça alıkonma zamanları daha da artmış (örneğin, pH:6.0'da, 45 dk) ve giderek KAB piki yayvanlaşarak zeminden ayırlanamamıştır. Bu nedenle, aynı ACN oranında en kısa alıkonma zamanının sağlayan ve en apolar C18 kolonu çalışma kolonu olarak seçilmiştir.

KAB etkin maddesinin C18 kolonundan elüsyonu için kullanılan hareketli fazdaki ACN miktarı hem alıkonma zamanları hem de pik şekilleri dikkate alınarak belirlenmiştir. Düşük ACN oranında alıkonma zamanının arttığı ve piklerin bozulduğu görülmüştür (Tablo 4.4, Şekil 4.12 ve 4.13). ACN oranı hacimce % 30 olduğunda KAB pikinin asimetri oranı 1.10 değerine düşmüş, bu nedenle en uygun ACN oranı olarak seçilmiştir.

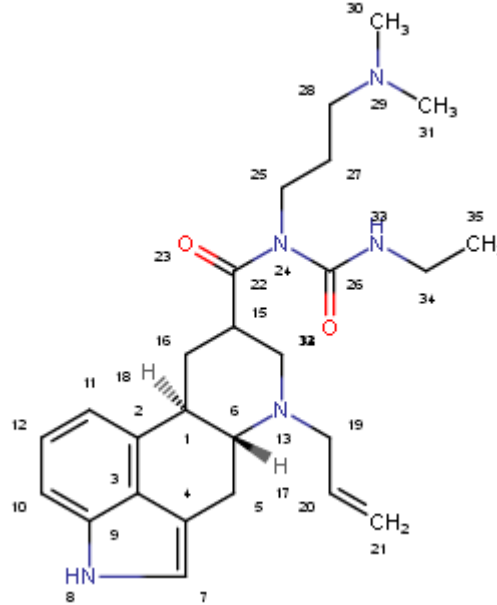
Kolon ve hareketli faz optimizasyonu sonrasında, KAB etkin maddesinin  $pK_a$  değerinin tayininde başlangıç koşulları olarak, C18 (250×4.6 mm, 5  $\mu$ m) kolonu ve ACN:Fosfat tamponu (10 mM, pH: 2.5) (30:70, h/h) karışımı hareketli faz olarak seçilmiştir. Hareketli fazın akış hızı 1 mL dk<sup>-1</sup> ve dedektör dalga boyu 280 nm dir. HPLC ile  $pK_a$  analizinde değişen hareketli faz pH'ına karşılık değişen alıkonma zamanları incelenmektedir. KAB molekülünün C18 kolonu ile etkileşimi, hareketli fazın düşük pH değerlerinde azdır ve alıkonma zamanı kısadır. Hareketli fazın pH değeri arttıkça KAB molekülü giderek daha fazla noniyonik hale dönüşür, dolayısıyla kapasite faktörü artmıştır (Tablo 4.5). Hareketli fazın pH değeri ile kapasite faktörü arasındaki sigmoidal ilişkiden yararlanılarak  $pK_a$  bir eğri elde edilmiştir (Şekil 4.14 ve 4.15). Bu amaçla kullanılan cihazın enjeksiyon kesinliği ile yöntemin kesinliği için



hesaplanan BSS değerleri sırasıyla 0.78 ve 1.66'dır. Bu değerler, kabul edilen enjeksiyon tekrarlanabilirliği için <%1 ve yöntem tekrarlanabilirliği için <%2 koşulunu sağlamaktadır (75). Ayrıca, tekrarlayan tayinlerde elde edilen sonuçlar hem birbiri içerisinde tutarlı hem de potansiyometrik yöntemle uyumludur (Tablo 4.9). KAB ve TAD için ilaç bilgilendirme kartlarında verilen  $pK_a$  değerleri sırasıyla 9.91 ile 15.25 ve 4.2 ile 15.17'dir (77).

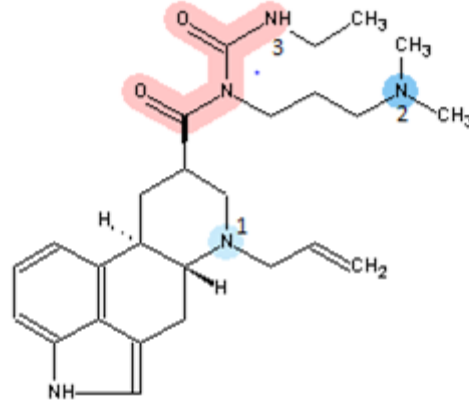
$pK_a$  değerlerinin hesaplanması için kullanılan birçok bilgisayar programı bulunmaktadır.  $pK_a$  değerini tahmin etmek için kullanılan bu programlar, molekülleri optimize edip bağ enerjilerini hesaplamakta ve böylelikle moleküle ait fizikokimyasal parametreleri tahmin ederek bir sonuç vermektedir. Fakat bu programlar her zaman doğru sonuç verememektedir. Bu durum molekülün çözelti ortamındaki durumu ile programda önerilen durumu arasında farklılık olabileceğini göstermektedir.

ACE and JChem (78) ve ACD/Labs (79) programları bu amaçla geliştirilerek web ortamına konulmuş yazılımlardır. KAB etkin maddesi için ACE & JChem programında N13 atomunun protonlanması sonucu elde edilen  $pK_a$  değeri 8.0, N29 için ise 9.3 olarak hesaplanmıştır (Şekil 5.1)



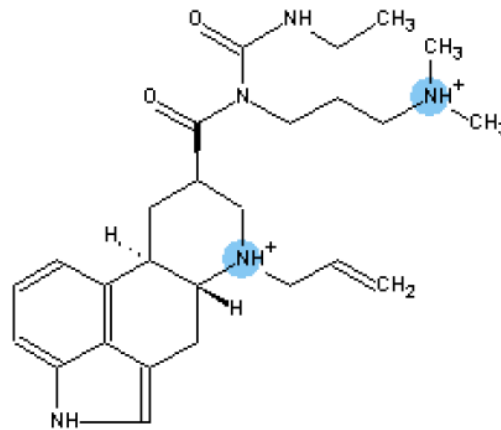
**Şekil 5.1.** KAB için ACE & JChem program ile  $pK_a$  hesaplanması sonucu KAB molekülüne ait atomların numaralandırılması

KAB için ACD/Labs programında hesaplama yapıldığında ise protonlanmanın gerçekleşeceği kısımlar renkli gösterilmiştir (Şekil 5.2).

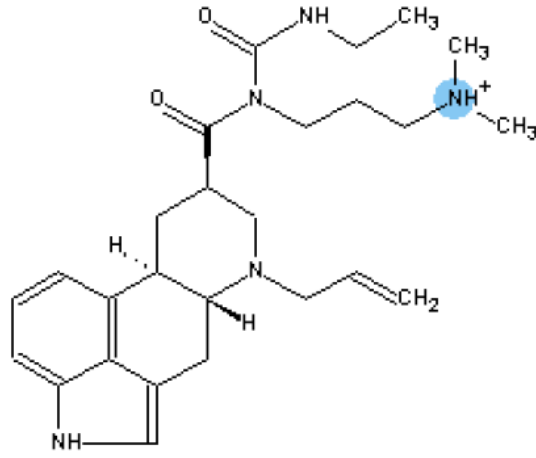


**Şekil 5.2.** ACD/Labs programı ile KAB molekülü için öngörülen aktif bölgeler

Bu durumda, ACD/Labs programında, KAB molekülünün en güçlü  $pK_{a1}$  değeri  $9.6 \pm 0.4$ ,  $pK_{a2}$  değeri  $13.6 \pm 0.9$  olarak hesaplanmıştır. Bu hesaplama göre 1 ve 2 numaralı N atomları protonlanmıştır (Şekil 5.3). Ortam pH değeri artış simülasyonunda 6.7 değerinde 1 numaralı N atomuna bağlı H atomunun koptuğunu göstermektedir (Şekil 5.4).

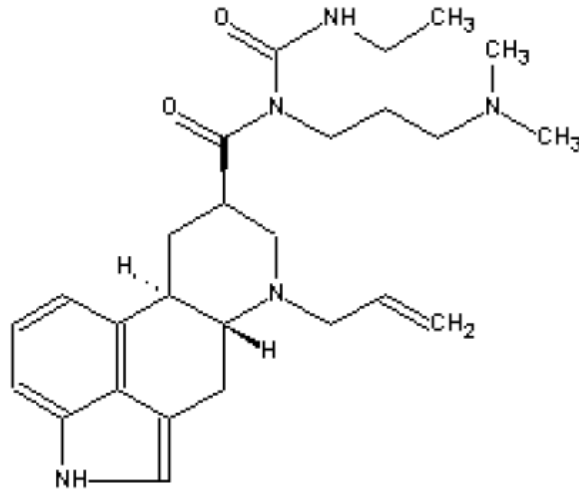


**Şekil 5.3.** KAB molekülünün protonlanmış hali



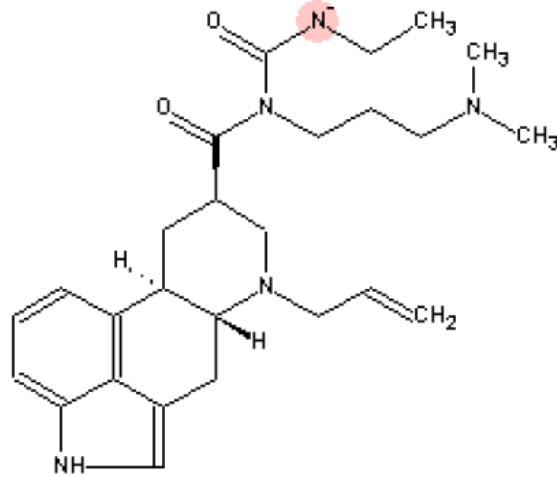
**Şekil 5.4.** İlk protonu verdikten sonra öngörülen KAB molekülü

Aynı simülasyonun devamında pH 9.6 değerinde ise 2 numaralı N atomundaki H atomunun kopduğu öngörülmektedir (Şekil 5.5).



**Şekil 5.5.** İkinci iyonlaşmadan sonraki öngörülen KAB molekülü

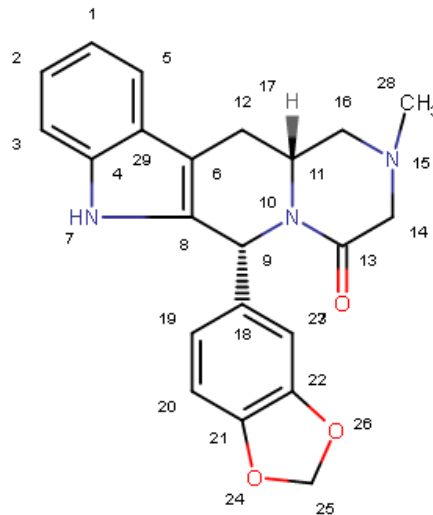
Son olarak simülasyonda pH 13.6 değerinde 3 numaralı N atomuna bağlı H'in kopması ile molekülün negatif yüklendiği öngörülmüştür (Şekil 5.6).



**Şekil 5.6.** pH 13.6 değerinde gerçekleşmesi öngörülen iyonlaşmanın ardından KAB molekülü

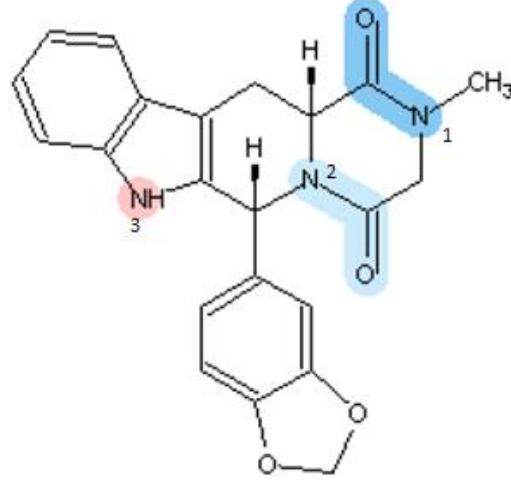
Bu tahminler sonrasında, KAB molekülü için  $6.7 \pm 0.4$ ,  $9.6 \pm 0.4$  ve  $13.6 \pm 0.9$  olmak üzere 3  $pK_a$  değeri öngörülmektedir. Fakat program, bunlar içinden 2 tane değeri kuvvetli olarak göstermiş ve 6.7 değerini yok saymıştır.

TAD molekülünün  $pK_a$  değeri de aynı bilgisayar programlarıyla hesaplanabilir. ACE & JChem programında, TAD molekülünün N15 atomundan protonlandığı ve  $pK_a$  değeri 5.4 olacak şekilde iyonlaştığı öngörülmektedir (Şekil 5.7).



**Şekil 5.7.** ACE & JChem programında TAD molekülüne ait numaralandırma

TAD molekülünün  $pK_a$  değeri ACD/Labs programında hesaplandığında ise biri negatif olmak üzere 2  $pK_a$  değeri bulunmuştur. Programa göre 1 ve 2 numaralı N atomları protonlanmakta, molekül % 68 N1, % 32 N2 atomlarından olacak şekilde iyonlaşmaktadır (Şekil 5.8). Program bu iyonlaşmalar için  $-1.8 \pm 0.5$  değerinde tek bir  $pK_a$  öngörmektedir. Bu değer kimyasal olarak gözlenmesi mümkün değildir.



**Şekil 5.8.** ACD/Labs programı ile TAD molekülü için öngörülen aktif bölgeler

ACD/Labs programına göre TAD molekülünde ikinci iyonlaşma N3 atomunda meydana gelmektedir. Program, bu iyonlaşma için  $15.6 \pm 0.9$   $pK_a$  değeri öngörmüştür.

Sonuç olarak, KAB ve TAD için iki farklı bilgisayar programda hesaplanan  $pK_a$  değerleri (Tablo 5.1) hem kendi içlerinde hem de deneysel bulgularla örtüşmemektedir. Bu durum, KAB ve TAD molekül optimizasyon programlarının deneysel bulgulardan çok farklı olduğunu göstermektedir.

**Tablo 5.1.** KAB molekülüne ait ACE & JChem ve ACD/Labs programları ile hesaplanmış  $pK_a$  değerleri

	ACE & JChem		ACD/Labs		
	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a1}$	$pK_{a2}$	$pK_{a3}$
<b>KAB</b>	8.0	9.3	6.7	9.6 (güçlü)	13.6 (güçlü)
<b>TAD</b>	5.4	-	-1.8	15.6	-

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında, KAB etkin maddesinin  $pK_a$  değeri potansiyometri, spektrofotometri ve HPLC yöntemleriyle, TAD etkin maddesinin  $pK_a$  değeri ise potansiyometrik ve spektrofotometrik yöntemlerle analiz edilmiştir. Bulgular, hem uygulanan yöntemler arasında hem de ACD/Labs ve ACE & JChem molekül optimizasyon programları ile hesaplanmış değerlerle karşılaştırılmıştır.

KAB'ın  $pK_a$  değerinin spektrofotometrik yöntem ile analizinde bileşiğin iyonik ve noniyonik formlarının yarattığı spektral kaymanın doğru bir  $pK_a$  tayini için yeterli olmadığı saptanmıştır. Potansiyometrik yöntem, KAB'ın  $pK_a$  değerinin tayininde en uygun yöntemdir. Analiz, KAB suda az çözünen bir bileşik olduğu için ortamda tamamen çözündüğü (50:50, h/h) ve (40:60, h/h) MeOH:su ortamında yapılmıştır. Potansiyometrik yöntemde elektrot kalibrasyonu için Gran yöntemi uygulanmıştır. Analiz sonucunda KAB'ın  $pK_a$  değeri (50:50, h/h) ve (40:60, h/h) MeOH:su oranının ikisinde de 6.05 bulunmuştur. KAB'ın HPLC ile  $pK_a$  tayinindeki kolon ve hareketli faz optimizasyonu sonucu C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm) kolonu ve ACN: Fosfat tamponu (10 mM, pH 2.5) (30:70, h/h) bileşimindeki hareketli faz kullanılmıştır. pH değerindeki artış, KAB pikinin kapasite faktörünü ( $k'$ ) arttırmıştır. Bu kaymadan yararlanılarak, KAB için  $pK_a = 6.00$  bulunmuştur. KAB etkin maddesi için ACE & JChem ve ACD/Labs programları ile  $pK_{a1}$  değerleri sırasıyla 8.0 ve 9.6 (güçlü) hesaplanmıştır. Bu değerler, deneysel olarak elde edilen  $pK_a$  değerlerine çok uzaktır. Ayrıca, bu tez çalışmasında KAB'ın  $pK_a$  değerinin tayini için geliştirilen bütün yöntemler yüksek tekrarlanabilirlik dolayısıyla kesinlik göstermektedir.

TAD molekülünün  $pK_a$  değeri ise potansiyometrik ve spektrofotometrik yöntemler ile deneysel olarak sırasıyla 3.52 ve 3.44 bulunmuştur. Bu tez çalışmasında, TAD etkin maddesinin  $pK_a$  değerinin tayini için geliştirilen yöntemlerin tekrarlanabilirliği ve kesinliği yüksektir. Ayrıca, TAD için potansiyometrik ve spektrofotometrik yöntemlerle elde edilen  $pK_a$  değerleri birbirine yakın ve tutarlıdır. TAD molekülü için ACE & JChem ve ACD/Labs programları ile  $pK_a$  değeri hesaplandığında, sırasıyla 5.4 ve -1.8 bulunmuştur. Bu değerler, hem birbirleriyle hem de deneysel olarak elde edilen bulgularla tutarsızlık göstermektedir.

Bu tez çalışmasının bulguları, KAB için  $pK_a$ 'ın potansiyometrik ve kromatografik; TAD için ise spektrofotometrik ve potansiyometrik tayinin mümkün olduğunu, deneysel  $pK_a$  değerlerinin ilaç bilgilendirme kartlarında yer alan değerler veya yazılım programlarındaki önermelerle örtüşmediğini göstermektedir. Benzeri durum,  $pK_a$  değeri deneysel olarak tayin edilmemiş pek çok ilaç etkin maddesi için de söz konusu olabilir. Bu nedenle, ilacın vücutta absorpsiyonu, dağılımı ve eliminasyonu mekanizmalarında önemli rol oynayan bir fizikokimyasal parametre olarak ilaç etkin maddelerinin  $pK_a$  değerlerinin deneysel olarak saptanması önerilir.





## KAYNAKLAR

1. Skoog, D., West, D., Holler, F., Crouch, S. (2013). *Fundamentals of Analytical Chemistry*: Nelson Education.
2. Kayaalp, O. (1996). *Tıbbi Farmakoloji: Hacettepe-Taş*.
3. Colao, A., Lombardi, G., Annunziato, L. (2000) Cabergoline. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 1 (3), 555-574.
4. Curran, M.P., Perry, C.M. (2004) Cabergoline. *Drugs*, 64 (18), 2125-2141.
5. Earll, M. (1999) A Guide to log P and pKa Measurements and Their Use. *C Chem MRS*, 3-4.
6. Martínez, V., Maguregui, M., Jimenez, R., Alonso, R. (2000) Determination of the pKa values of beta-blockers by automated potentiometric titrations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 23 (2-3), 459-468.
7. Herrero-Martínez, J.M., Repollés, C., Bosch, E., Rosés, M., Ràfols, C. (2008) Potentiometric determination of aqueous dissociation constants of flavonols sparingly soluble in water. *Talanta*, 74 (4), 1008-1013.
8. Seok, Y.-J., Yang, K.-S., Kang, S.-O. (1995) A simple spectrophotometric determination of dissociation constants of organic compounds. *Analytica Chimica Acta*, 306 (2), 351-356.
9. Angelov, T., Vlasenko, A., Tashkov, W. (2007) HPLC determination of pKa of parabens and investigation on their lipophilicity parameters. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 31 (2), 188-197.
10. Hilal, S., Karickhoff, S., Carreira, L. (1995) A rigorous test for SPARC's chemical reactivity models: Estimation of more than 4300 ionization pKas. *Quantitative Structure - Activity Relationships*, 14 (4), 348-355.
11. Shamsipur, M., Maddah, B., Hemmateenejad, B., Rouhani, S., Haghbeen, K., Alizadeh, K. (2008) Multiwavelength spectrophotometric determination of acidity constants of some azo dyes. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 70 (1), 1-6.
12. Reijenga, J., van Hoof, A., van Loon, A., Teunissen, B. (2013) Development of methods for the determination of pKa values. *Analytical Chemistry Insights*, 8, 53-71.

13. Gran, G. (1952) Determination of the equivalence point in potentiometric titrations. Part II. *Analyst*, 77 (920), 661-671.
14. Gran, G. (1988) Equivalence volumes in potentiometric titrations. *Analytica Chimica Acta*, 206, 111-123.
15. Brittain, H.G. (2013). Profiles of drug substances, excipients and related methodology (c. 38): Academic Press.
16. Takács-Novák, K., Deák, K., Béni, S., Völgyi, G. (2013) Physico-chemical Profiling of the ACE-inhibitor Lisinopril: Acid-base Properties. *ADMET and DMPK*, 1 (2), 6-16.
17. Avdeef, A., Comer, J.E., Thomson, S.J. (1993) pH-Metric log P. 3. Glass electrode calibration in methanol-water, applied to pKa determination of water-insoluble substances. *Analytical Chemistry*, 65 (1), 42-49.
18. Avdeef, A., Box, K., Comer, J., Gilges, M., Hadley, M., Hibbert, C. ve diğerleri. (1999) PH-metric logP 11. pK a determination of water-insoluble drugs in organic solvent–water mixtures. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 20 (4), 631-641.
19. Willard, H.H., Merritt Jr, L.L., Dean, J.A., Settle Jr, F.A. (1988) Instrumental Methods of Analysis.
20. Beltrán, J.L., Sanli, N., Fonrodona, G., Barrón, D., Özkan, G., Barbosa, J. (2003) Spectrophotometric, potentiometric and chromatographic pKa values of polyphenolic acids in water and acetonitrile–water media. *Analytica Chimica Acta*, 484 (2), 253-264.
21. Albert, A., Serjeant, E. (1984). Some other methods for the determination of ionization constants. The Determination of Ionization Constants, *Springer*, 120-124.
22. Watson, D.G. (2012). Pharmaceutical Analysis, A Textbook for Pharmacy Students and Pharmaceutical Chemists, 3: Pharmaceutical Analysis: Elsevier Health Sciences.
23. Şanlı, S. (2013) UV Spectroscopic Method for Determining pK a Values of Some Antipsychotic Drugs in Water and Acetonitrile–Water Binary Mixtures. *Journal of Solution Chemistry*, 42 (5), 967-978.
24. Singh, S., Sharda, N., Mahajan, L. (1999) Spectrophotometric determination of pK a of nimesulide. *International Journal of Pharmaceutics*, 176 (2), 261-264.
25. Şanlı, S., Şanlı, N., Alsancak, G. (2010) Spectrophotometric determination of acidity constants of some macrolides in acetonitrile-water binary mixtures. *Acta Chimica Slovenica*, 57 (4), 980-987.

26. Skoog, D.A., Holler, F.J., Crouch, S.R. (2007). Instrumental analysis: Cengage Learning India.
27. Hardcastle, J.E., Jano, I. (1998) Determination of dissociation constants of polyprotic acids from chromatographic data. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 717 (1), 39-56.
28. Erdemgil, F., Şanlı, S., Şanlı, N., Özkan, G., Barbosa, J., Guiteras, J., Beltrán J.L. (2007) Determination of pK<sub>a</sub> values of some hydroxylated benzoic acids in methanol–water binary mixtures by LC methodology and potentiometry. *Talanta*, 72 (2), 489-496.
29. Sanli, N., Sanli, S., Alsancak, G.I. (2010) Determination of dissociation constants of folinic acid (leucovorin), 5-fluorouracil, and irinotecan in hydro-organic media by a spectrophotometric method. *Journal of Chemical & Engineering Data*, 55 (8), 2695-2699.
30. Pandey, M., Jaipal, A., Kumar, A., Malik, R., Charde, S. (2013) Determination of pK<sub>a</sub> of felodipine using UV–Visible spectroscopy. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 115, 887-890.
31. Takács-Novák, K., Box, K.J., Avdeef, A. (1997) Potentiometric pK<sub>a</sub> determination of water-insoluble compounds: validation study in methanol/water mixtures. *International Journal of Pharmaceutics*, 151 (2), 235-248.
32. Qiang, Z., Adams, C. (2004) Potentiometric determination of acid dissociation constants (pK<sub>a</sub>) for human and veterinary antibiotics. *Water Research*, 38 (12), 2874-2890.
33. Islamoglu, F., Colak, E., Bal, E. (2013) Determination of pK<sub>a</sub> Values of Some New Triazole Derivatives Using Different Methods. *Revista De Chimie*, 64 (1), 31-37.
34. Demiralay, E.Ç., Yilmaz, H. (2012) Potentiometric pK<sub>a</sub> determination of piroxicam and tenoxicam in acetonitrile-water binary mixtures. *SDÜ Fen Dergisi*, 7 (1).
35. Ando, H.Y., Heimbach, T. (1997) pK<sub>a</sub> determinations by using a HPLC equipped with DAD as a flow injection apparatus. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 16 (1), 31-37.
36. Chiang, P.C., Foster, K.A., Whittle, M.C., Su, C.C., Pretzer, D.K. (2006) Medium Throughput pK<sub>a</sub> Determinations of Drugs and Chemicals by Reverse Phase HPLC with an Organic Gradient. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 29 (15), 2291-2301.

37. O'Neil, M., Smith, A., Heckelman, P. (2001) The Merck Index Thirteenth Edition, Merck & Co. Inc., Whitehouse Station, NJ, USA.
38. Del Dotto, P., Bonuccelli, U. (2003) Clinical pharmacokinetics of cabergoline. *Clinical Pharmacokinetics*, 42 (7), 633-645.
39. Fariello, R. (1998) Pharmacodynamic and pharmacokinetic features of cabergoline. *Drugs*, 55 (1), 10-16.
40. Rinne, U., Bracco, F., Chouza, C., Dupont, E., Gershanik, O., Masso, J.M., Montastruc J.L., Marsden C.D., Dubini A., Orlando N., Grimaldi R. (1997) Cabergoline in the treatment of early parkinson's disease Results of the first year of treatment in a double-blind comparison of cabergoline and levodopa. *Neurology*, 48 (2), 363-368.
41. Lera, G., Vaamonde, J., Rodriguez, M., Obeso, J. (1993) Cabergoline in Parkinson's disease Long - term follow - up. *Neurology*, 43 (12), 2587-2587.
42. Persiani, S., Pianezzola, E., Broutin, F., Fonte, G., Benedetti, M.S. (1992) Radioimmunoassay for the synthetic ergoline derivative cabergoline in biological fluids. *Journal of Immunoassay and Immunochemistry*, 13 (3), 457-476.
43. Battaglia, R., Strolin Benedetti, M., Mantegani, S., Castelli, M., Cocchiara, G., Dostert, P. (1993) Disposition and urinary metabolic pattern of cabergoline, a potent dopaminergic agonist, in rat, monkey and man. *Xenobiotica*, 23 (12), 1377-1389.
44. Del Dotto, P., Colzi, A., Pardini, C., Lucetti, C., Dubini, A., Grimaldi, R. ve diğeri. (1994) Cabergoline improves motor disability without modifying L-dopa plasma levels in fluctuating Parkinson's disease patients. *Journal of Neural Transmission. Supplementum*, 45, 259-265.
45. Gottwald, M.D., Bainbridge, J.L., Dowling, G.A., Aminoff, M.J., Alldredge, B.K. (1997) New pharmacotherapy for Parkinson's disease. *Annals of Pharmacotherapy*, 31 (10), 1205-1217.
46. Verhelst, J., Abs, R., Maiter, D., van den Bruel, A., Vandeweghe, M., Velkeniers, B. ve diğeri. (1999) Cabergoline in the treatment of hyperprolactinemia: a study in 455 patients. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 84 (7), 2518-2522.
47. SO, K. (2000) Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. 9. baskı. Ankara: Hacettepe-Taş Kitapçılık, 3 (45), 581-612.
48. Pianezzola, E., Bellotti, V., La Croix, R., Benedetti, M.S. (1992) Determination of cabergoline in plasma and urine by high-performance liquid chromatography with

- electrochemical detection. *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, 574 (1), 170-174.
49. Allievi, C., Dostert, P. (1998) Quantitative Determination of Cabergoline in Human Plasma Using Liquid Chromatography Combined. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, 12, 33-39.
50. Igarashi, K., Hotta, K., Kasuya, F., Abe, K., Sakoda, S. (2003) Determination of cabergoline and L-dopa in human plasma using liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography B*, 792 (1), 55-61.
51. Önal, A., Sağırılı, O., Şensoy, D. (2007) Selective LC determination of cabergoline in the bulk drug and in tablets: in vitro dissolution studies. *Chromatographia*, 65 (9-10), 561-567.
52. Önal, A., Çağlar, S. (2007) Spectrophotometric determination of dopaminergic drugs used for Parkinson's disease, cabergoline and ropinirole, in pharmaceutical preparations. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 55 (4), 629-631.
53. Dogan, A., Pehlivan, I., Basci, N.E. (2011) Method development and validation for the determination of cabergoline in tablets by capillary zone electrophoresis. *Latin American Journal of Pharmacy*, 30.
54. Piroozi, F., Ghasemi, E., Qomi, M., Rezaee, R., Hashemian, F. (2014) Hollow fiber liquid phase microextraction combined with high performance liquid chromatography for preconcentration and determination of cabergoline in biological samples. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 37 (5), 760-771.
55. Abdel-Aziz, A., Asiri, Y., El-Azab, A., Al-Omar, M., Kunieda, T. (2010) Tadalafil. *Profiles of drug substances, excipients, and related methodology*, 36, 287-329.
56. Fogue, S.T., Patterson, B.E., Bedding, A.W., Payne, C.D., Phillips, D.L., Wrishko, R.E., Mitchell M.I. (2006) Tadalafil pharmacokinetics in healthy subjects. *British journal of clinical pharmacology*, 61 (3), 280-288.
57. Corbin, J., Francis, S. (2001) Pharmacology of phosphodiesterase-5 inhibitors. *International journal of clinical practice*, 56 (6), 453-459.
58. Francis, S., Corbin, J. (1994) Cyclic GMP: synthesis, metabolism, and function. *Advances in Pharmacology*, ed. Murad P. New York: Academic Press 1994; 115, 70.

59. Wrishko, R., Sorsaburu, S., Wong, D., Strawbridge, A., McGill, J. (2009) Safety, Efficacy, and Pharmacokinetic Overview of Low - Dose Daily Administration of Tadalafil. *The Journal of Sexual Medicine*, 6 (7), 2039-2048.
60. Angulo, J., Gadau, M., Fernandez, A., Gabancho, S., Cuevas, P., Martins, T. ve diğeri. (2001) IC351 enhances NO-mediated relaxation of human arterial and trabecular penile smooth muscle. *Eur Urol*, 39 (Suppl 5), 106.
61. ilacpedia. Ağ Sitesi: <http://www.ilacpedia.com/etken-madde/tadalafil>
62. Desai, R., Bhamre, P., Rajput, S.J. (2014) Simultaneous Estimation Of Ambrisentan And Tadalafil By Rphplc And Classical Uv Spectrophotometric Methods In Laboratory Sample. *Indo American Journal of Pharmaceutical Research*, 4(9), 3703-3711.
63. Aboul-Enein, H.Y., Ali, I. (2005) Determination of tadalafil in pharmaceutical preparation by HPLC using monolithic silica column. *Talanta*, 65 (1), 276-280.
64. Pettit, R.S., Johnson, C.E., Caruthers, R.L. (2012) Stability of an extemporaneously prepared tadalafil suspension. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 69 (7), 592-594.
65. Reddy, B.P., Reddy, K.A., Reddy, M. (2010) Validation and stability indicating RP-HPLC method for the determination of tadalafil API in pharmaceutical formulations. *Research in Pharmaceutical Biotechnology*, 2 (1), 001-006.
66. Sonawane, P., Panzade, P., Kale, M. (2013) Rapid estimation of tadalafil by reverse-phase high-performance liquid chromatography method in bulk and tablet formulation. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75 (2), 230.
67. Bojanapu, A., Subramaniam, A., Munusamy, J., Dhanapal, K., Chennakesavalu, J., Sellappan, M., Javaprakash V. (2015) Validation and Method Development of Tadalafil in Bulk and Tablet Dosage Form by RP-HPLC. *Drug Research*, 65 (2), 82-85.
68. Patel, J.K., Patel, N.K. (2014) Stability-indicating RP-HPLC method for the determination of ambrisentan and tadalafil in pharmaceutical dosage form. *Scientia Pharmaceutica*, 82 (4), 749.
69. Giri, A.D., Bhusari, V.K., Dhaneshwar, S.R. (2012) Validated HPLC method for simultaneous quantitation of Tadalafil and Dapoxetine hydrochloride in bulk drug and formulation. *Int J Pharm Pharm Sci*, 4 (2), 654-658.

70. Rao, D.S., Radhakrishnanand, P., Himabindu, V. (2008) Stress degradation studies on tadalafil and development of a validated stability-indicating LC assay for bulk drug and pharmaceutical dosage form. *Chromatographia*, 67 (1-2), 183-188.
71. Park, M., Ahn, S. (2012) Quantitative analysis of sildenafil and tadalafil in various fake drugs recently distributed in Korea. *Journal of Forensic Sciences*, 57 (6), 1637-1640.
72. Barot, T.G., Patel, P.K. (2010) Determination of Tadalafil in pure powder and tablet dosage form by high-performance liquid chromatography. *Journal of AOAC International*, 93 (2), 516-522.
73. Chandran, M., Kannan, K. (2012) A Validated RP-HPLC Method for Simultaneous Estimation of Tadalafil and Dapoxetine in Tablet Dosage Form. *Journal of Scientific Research in Pharmacy*, 1 (2), 36-39.
74. Kannappan, N., Deepthi, Y., Divya, Y., Shashikanth, M.R., Mannavalan, R. (2010) Method development and validation of stability indicating methods for assay of Tadalafil and Sildenafil citrate by HPLC. *Int J Chem Tech Res*, 2, 329-333.
75. Shabir, G.A., John Lough, W., Arain, S.A., Bradshaw, T.K. (2007) Evaluation and application of best practice in analytical method validation. *Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies*, 30 (3), 311-333.
76. Tam, K.Y., Takács-Novák, K. (2001) Multi-wavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: a validation study. *Analytica Chimica Acta*, 434 (1), 157-167.
77. DrugBank Ağ Sitesi: <http://www.drugbank.ca/drugs>
78. ACE and JChem. Ağ Sitesi: <https://epoch.uky.edu/ace/public/pKa.jsp>
79. ACD/I-Lab. Ağ Sitesi: <https://ilab.acdlabs.com/iLab2/>

## EKLER

### Ek 1. Potansiyometrik Titrasyon ile pK<sub>a</sub> Tayininde Elektrot Kalibrasyonu

Potansiyometrik yöntemle pK<sub>a</sub> tayininde elektrot kalibrasyonu MeOH:su (50:50, h/h) ve (40:60, h/h) bileşimlerinde Gran yöntemi kullanılarak yapılmıştır. Bu kalibrasyon yöntemi 2 basamakta gerçekleştirilmiştir.

MeOH:su (50:50, h/h) ortamındaki pK<sub>a</sub> analizinde yapılan elektrot kalibrasyonu için 1.basamakta 2.94 M KHP, 0.1 M KOH ile titre edilmiştir. Her 100 µL titrant eklenmesine karşılık potansiyel değerleri ölçülmüştür. Bu potansiyel değerleriyle  $\phi$  değerleri hesaplanmıştır.

2.94 M KHP çözeltisine 100 µL 0.1 M KOH eklendiğinde her bir ekleme için  $\phi$  değeri hesaplanmıştır.

Zayıf asit-kuvvetli baz titrasyonu için kullanılan Gran Eşitliği

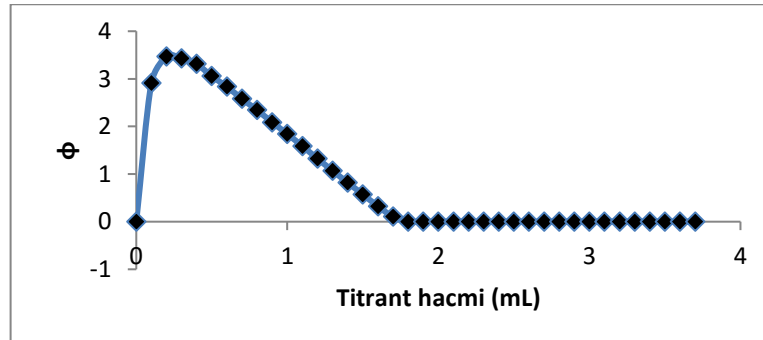
$$\phi = V_t 10^{pH}$$

$$\phi = V_t 10^{E/(2302.6RT/V)}$$

$$\phi = V_t 10^{E/59.16}$$

Eşitlikteki  $V_t$ , eklenen titrant hacmini;  $E$  ise okunan potansiyel değerini mV cinsinden göstermektedir.  $2.3026RT/F$  ifadesinin 25°C'taki değeri 0.05916 V olarak belirlenmiştir.

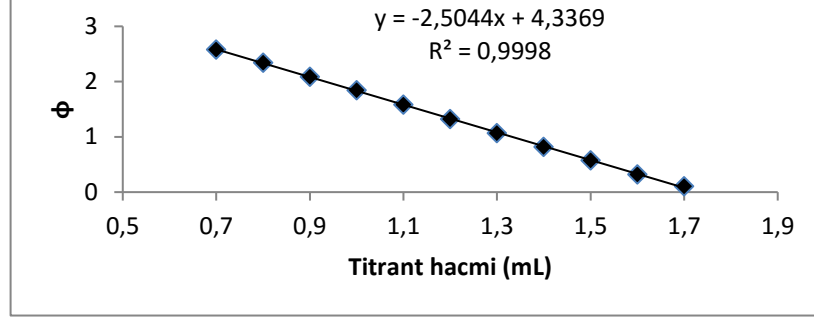
Bu eşitlikle hesaplanan  $\phi$  değerleri, eklenen titrant hacmine karşı grafiğe geçirilir.



**Şekil 1.** Zayıf asit ile elektrot kalibrasyonunda MeOH:su (50:50, h/h) ortamında titrant hacmi ile  $\phi$  değeri değişimini gösteren şekil



Titrant hacmi-  $\phi$  grafiğinin doğrusal olduğu kısım alınır.



**Şekil 2.** Zayıf asit ile elektrot kalibrasyonunda MeOH:su (50:50, h/h) ortamında titrant hacmi ile  $\phi$  değeri değişimini gösteren eğrinin doğrusal kısmı

Şekil 2'deki grafikten elde edilen doğru denkleminin kesim/eğim oranı;

$$\frac{\text{kesim}}{\text{eğim}} = \frac{4.3369}{2.5044} = 1.7317$$

hesaplanmıştır ve bu değer, dönüm noktasına kadar harcanan titrant hacmini ( $V_{eş}$ ) vermektedir. KHP'nin mol sayısı kesim/eğim oranına bölüldüğünde titrant bazın molaritesi bulunmuştur.

$$n_{KHP} = (M_{KHP})(V_{Analit})$$

$$n_{KHP} = (2.94 \text{ M})(0.050 \text{ L})$$

$$n_{KHP} = 0.147 \text{ mol}$$

$$M_{Titrant} = \left( \frac{0.147 \text{ mol}}{1.7317} \right)$$

$$M_{Titrant} = 0.085 \text{ M}$$

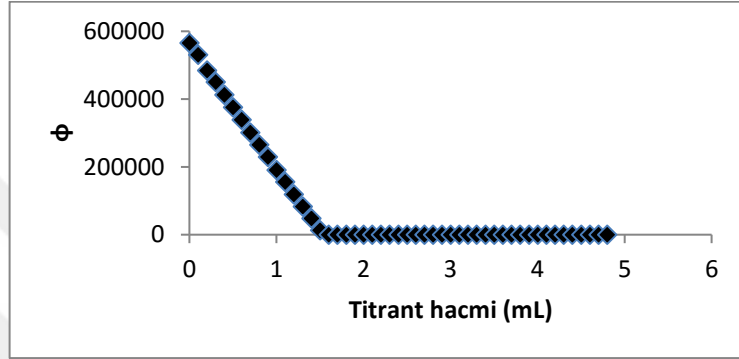
Bu hesaplama sonucunda titrant olarak kullanılan KOH ayarlanmıştır ve derişimi 0.085 M olarak belirlenmiştir.

Elektrot kalibrasyonunun 2. basamağında, titrant kuvvetli bir asitle ayarlanmıştır. Bu basamakta MeOH:su (50:50, h/h) ortamında 0.03 N HCl ile 0.1 M KOH titre edilmiştir. Eklenen her 100  $\mu\text{L}$  titrant hacmine karşılık gelen potansiyel değerleri kaydedilmiştir. Bu değerler, kuvvetli asit-kuvvetli baz titrasyonu için

kullanılan Gran eşitliğinde yerine konulmuş ve her bir nokta için  $\phi$  değerleri hesaplanmıştır.

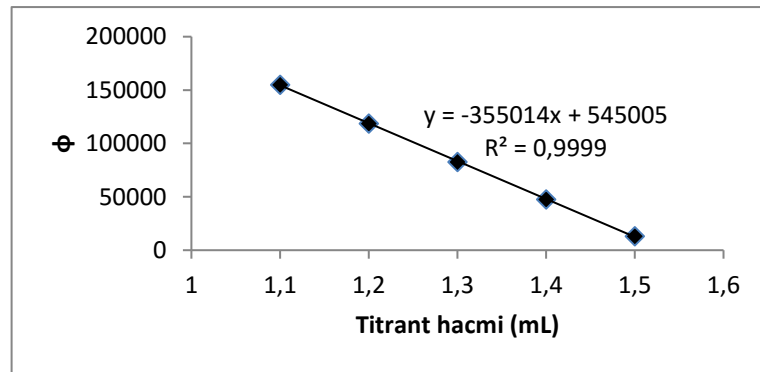
$$\phi = 10^{pH} (V_{Analit} + V_{Titrant})$$
$$\phi = 10^{E/59.16} (V_{Analit} + V_{Titrant})$$

Hesaplanan  $\phi$  değerleri eklenen titrant hacmine karşılık grafiğe geçirilmiştir.



**Şekil 3.** Kuvvetli asit ile elektrot kalibrasyonunda MeOH:su (50:50, h/h) ortamında titrant hacmi ile  $\phi$  değeri değişimini gösteren şekil

Değişimi gösteren Şekil 3 grafiğinin doğrusal olduğu aralık bulunmuştur (Şekil 4).



**Şekil 4.** Kuvvetli asit ile elektrot kalibrasyonunda MeOH:su (50:50, h/h) ortamında titrant hacmi ile  $\phi$  değeri değişimini gösteren eğrinin doğrusal kısmı

Bu grafiğin doğru denklemi hesaplanmış ve kesim/eğim oranı 1.536 olarak bulunmuştur ve bu değer  $V_{eş}$  değerine eşittir.

$$\frac{Kesim}{Eğim} = \frac{545005}{355014} = 1.536$$

Zayıf asit ile kalibrasyon işlemi sonucunda bulunan titrant molaritesi (0.085 M KOH)  $V_{eş}$  ile çarpılıp HCl'ye ait mol sayısı elde edilmiş, buradan da asidin ilk hacmine bölünüp HCl'nin gerçek molaritesi hesaplanmıştır.

$$\begin{aligned} M_{KOH}V_{eş} &= M_{HCl}V_{asit} \\ (0.085 M)(1.536 mL) &= M_{HCl}(50 mL) \\ M_{HCl} &= 0.0026 M \end{aligned}$$

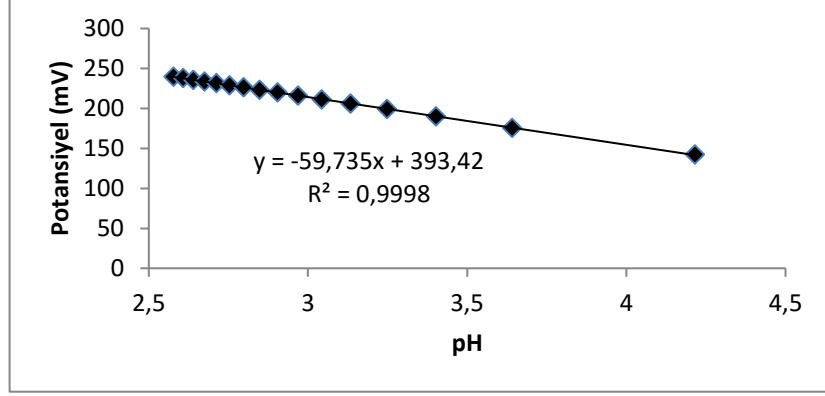
Ortamdaki her 100  $\mu$ L titrant eklenmesiyle değişen hidrojen iyonu derişimi  $[H^+]$  hesaplanan gerçek asit ve baz derişimleri ile belirlenmiştir.

$$[H^+] = \frac{(M_{HCl} V_{HCl}) - (M_{KOH} V_{KOH})}{V_{Toplam}}$$

Elde ettiğimiz  $[H^+]$  değerleriyle her titrant eklenişindeki ortam pH'ı hesaplanmıştır.

$$pH = -\log [H^+]$$

Hesaplamalar sonucunda bulunan pH değerleri kuvvetli asit ile kalibrasyon sırasında elde edilen potansiyel (mV) değerleri ile grafiğe geçirilmiş ve doğru denklemi hesaplanmıştır (Şekil 5).



**Şekil 5.** Hesaplanan pH değerlerinin karşılık geldiği potansiyel değerlerinin ilişkisini gösteren şekil

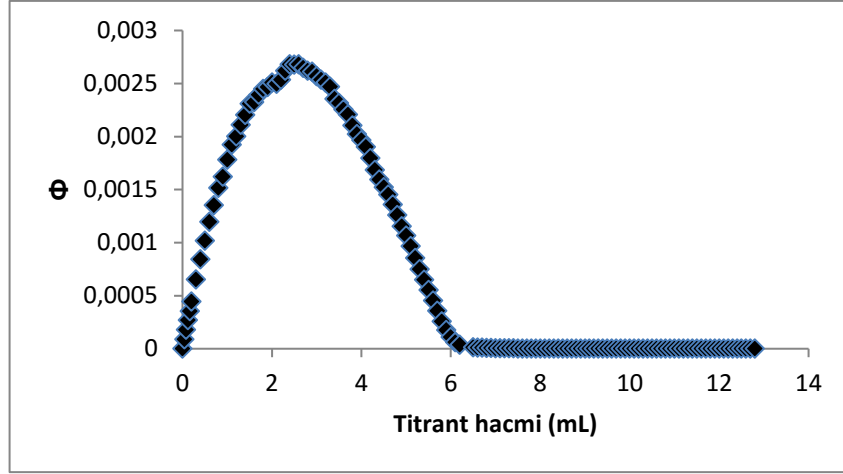
Şekil 5'teki grafiğin doğru denkleminin eğim ve kesim değerleri sırasıyla 59.735 ve 393.42 olarak belirlenmiştir. Bu değerler, etkin maddelerin pK<sub>a</sub> analizinde her 100 µL titrant eklenmesiyle ölçülen potansiyellerinin pH değerlerinin hesaplanmasında katsayı olarak kullanılmıştır.

$$pH = \frac{(-E + 393.42)}{59.735}$$

Bu hesaplama sonucu, ölçülen her potansiyel değerine karşılık gelen pH değeri hesaplanmıştır. Hesaplanan bu pH değerleri ile zayıf asit-kuvvetli baz titrasyonlarında kullanılan Gran eşitliği kullanılarak  $\phi$  değerleri belirlenmiştir.

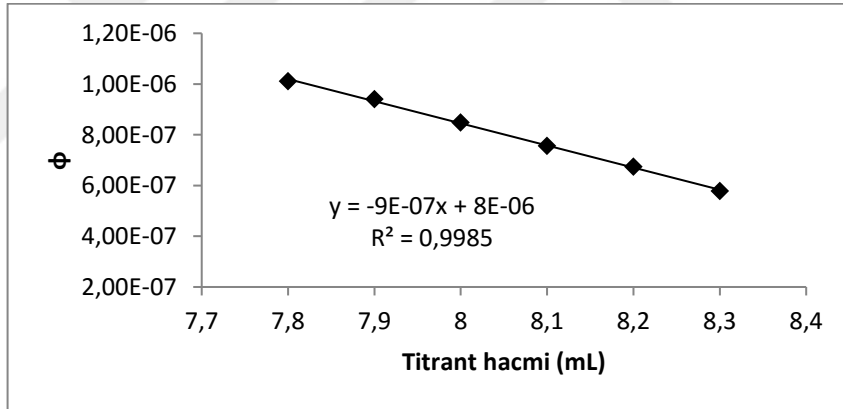
$$\phi = V_t 10^{pH}$$

Bu  $\phi$  değerleri eklenen titrant hacmine karşılık grafiğe geçirilmiştir (Şekil 6).



**Şekil 6.** Titrant hacmi ile  $\phi$  değerinin değişimini gösteren eğri

Şekil 6'daki grafiğin doğrusal olmaya başladığı kısım ayrılmıştır ve doğru denklemi hesaplanmıştır (Şekil 7).



**Şekil 7.** Titrant hacmi ile  $\phi$  değerinin değişimini gösteren eğrinin doğrusal kısmı

$\phi$  ile potansiyel arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu aralık, titrasyonun dönüm aralığı olarak belirlenmiştir. Bu aralığa ait doğru denkleminin eğimi  $-K_a$  değerini ifade etmiştir. Buradan  $K_a$  değeri hesaplanmıştır.

$$pK_a = -\log K_a$$

$$pK_a = -\log(9 \cdot 10^{-7})$$

$$pK_a = 6.05$$

Doğru denkleminde hesaplanan  $K_a$  değerinin logaritması alınmış ve  $pK_a$  değerini belirlenmiştir. Bunun sonucunda, MeOH:su (50:50, h/h) ortamında Gran yöntemi ile yapılan analizde KAB'e ait  $pK_a$  değerini 6.05 olarak belirlenmiştir.

Gran yöntemiyle yapılan bu hesaplama, KAB'ın MeOH:su (50:50, h/h) ortamındaki  $pK_a$  analizine aittir. Bu hesaplamaların aynısı KAB için MeOH:su (40:60, h/h) ve TAD için MeOH:su (60:40, h/h) ortamında da tekrarlanmıştır.



## Ek 2. İstatistiksel Katsayıların Hesaplanması

### Bağıl Standart Sapma Hesaplanması

$$\text{Bağıl Standart Sapma (BSS)} = \frac{SS}{\bar{X}} \times 100$$

SS: Standart Sapma

$\bar{X}$  : Aritmetik ortalama

### Standart Hata Hesaplanması

$$\text{Standart Hata (SH)} = \frac{SS}{\sqrt{n}}$$

SS: Standart sapma

n: Ölçüm sayısı

### Ek 3. Mann-Whitney U testi

Parametrik olmayan iki bağımsız gruba ilişkin ortalamaların karşılaştırılmasında kullanılır.

Mann–Whitney U testinde, her iki gruptaki gözlem sayıları 20 ya da daha az olduğunda test işlemLeri:

$H_0$ : İki dağılım arasında fark yoktur.

$H_1$ : İki dağılım arasında fark vardır.

$$U_1 = n_1n_2 + \frac{n_1(n_1 + 1)}{2} - R_1$$

$$U_2 = n_1n_2 - U_1$$

ile verilir. Burada;

$n_1$ = Birinci gruptaki gözlem sayısı

$n_2$ = İkinci gruptaki gözlem sayısı

$R_1$ = Birinci gruptaki değerlerin sıra numaralı toplamı

İstatistiksel karar için;  $U_1$  ve  $U_2$  değerinden büyük olanı seçilen  $\alpha$  yanılma düzeyindeki  $n_1$  ve  $n_2$  serbestlik dereceli  $U_{Tablo}$  istatistiği ile karşılaştırılır.  $U_{Hesap} > U_{Tablo}$  ise  $H_0$  hipotezi kabul edilir,  $U_{Tablo} > U_{Hesap}$  ise  $H_0$  hipotezi reddedilir.



#### Ek 4. Kruskal Wallis Varyans Testi

Parametrik olmayan, bir değişken yönünden ikiden fazla bağımsız grup arasındaki farkın anlamlı olup olmadığının belirlenmesinde kullanılır.

Test istatistiğinin hesaplanması:

$$KW = \frac{12}{n(n+1)} \left[ \sum_{j=1}^k \frac{T_j^2}{n_j} \right] - k(n+1)$$

$T_j$ : j. Gruptaki değerlerin sıra numaraları toplamı (her bir grup için)

$n_j$ : j. Gruptaki denek sayısı (her bir grup için)

k: Grup sayısı

n: Toplam denek sayısı

$H_0$ : İki yöntemle elde edilen sonuçlar arasında farklılık yoktur.

Hesaplanan KW değeri,  $\alpha$  yanılma düzeyindeki tablo değeri ( $KW_T$ ) ile kıyaslanır.

Karar:  $KW_T > KW$  ise  $H_0$  hipotezi kabul edilir.

$KW_T < KW$  ise  $H_0$  hipotezi reddedilir.

## EK 5. İyonik Şiddet

Bir elektrolitte, iyonlar arasındaki ortalama elektrostatik etkileşimleri tanımlayan eşitliklerdir. İyonik şiddet, çözelti içindeki her bir iyonun yükünün karesiyle, iyonun molaritesi çarpılarak elde edilen terimlerin toplamının yarısına eşittir.

$$\mu = \frac{1}{2} ([A]Z_A^2 + [B]Z_B^2 + [C]Z_C^2 + \dots)$$

[A], [B], [C],... : A,B,C,... türlerinin molar derişimlerini göstermektedir.

Z<sub>A</sub>, Z<sub>B</sub>, Z<sub>C</sub>,... : A,B,C,... türlerinin yüklerini göstermektedir.

## ÖZGEÇMİŞ

1985 yılında Ankara'da doğdum. Ortaokul ve liseyi Ankara Anadolu Lisesi'nde okudum. Hacettepe Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nden 2009 yılında mezun oldum. 2013 yılında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına başladım.

