

T.C.  
BİTLİS EREN ÜNİVERSİTESİ ve VAN YÜZÜNCÜ YIL ÜNİVERSİTESİ  
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

KİMYA ANABİLİM DALI YÜKSEK LİSANS TEZİ

ALERJİK RİNİT TEDAVİSİNDE KULLANILAN BAZI İLAÇLARIN İYONLAŞMA  
SABİTLERİNİN SIVI KROMATOĞRAFİK YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

Yasemin TEKİN KOCABAY

TEMMUZ 2019

KİMYA ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

ALERJİK RİNİT TEDAVİSİNDE KULLANILAN BAZI İLAÇLARIN İYONLAŞMA  
SABİTLERİNİN SIVI KROMATOĞRAFİK YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

Hazırlayan  
Yasemin TEKİN KOCABAY

Danışman  
Dr. Öğr. Üyesi Dilara BAŞAT DERELİ

Jüri Üyeleri  
Prof. Dr. Halit DEMİR  
Dr. Öğr. Üyesi Dilara BAŞAT DERELİ  
Dr. Öğr. Üyesi Engin Yılmaz

TEMMUZ 2019

## ONAY

Yasemin TEKİN KOCABAY tarafından hazırlanan "Alerjik Rinit Tedavisinde Kullanılan Bazı İlaçların İyonişma Sabitlerinin Sıvı Kromatografik Yöntemi İle Tayini" adlı tez çalışması 24/07/2019 tarihinde yapılan sınavla aşağıdaki jüri tarafından oybirliği/oyçokluğu ile Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda YÜKSEK LİSANS TEZİ olarak kabul edilmiştir.

### Jüri Üyeleri

Prof. Dr. Halit DEMİR

(Başkan)

Dr. Öğr. Üyesi Dilara BAŞAT DERELİ

(Danışman)


Dr. Öğr. Üyesi Engin YILMAZ

(Üye)

### İmza



Bu tezin kabulü, Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun 2019/25/2019 gün ve 44/35 sayılı kararı ile onaylanmıştır.



Doç.Dr. Fatih Ahmet ÇELİK

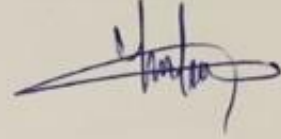
Enstitü Müdürü V.

**BİTLİS EREN ÜNİVERSİTESİ FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI**  
**ETİK BEYANI**

Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü tez yazım kılavuzuna göre hazırlamış olduğum “ **Alerjik Rinit Tedavisinde Kullanılan Bazı İlaçların İyonlaşma Sabitlerinin Sıvı Kromatografik Yöntemi İle Tayini**” adlı tezimin özgün bir çalışma olduğunu, tez hazırlanırken tüm aşamalarda bilimsel etik ilkelerine uygun davrandığımı, tez kapsamında sunulan tüm verileri bilimsel etik ilkelerine uygun elde ettiğimi, tezde faydalandığım tüm eserlere atıf yaptığımı ve kaynaklar kısmında bu eserleri gösterdiğimi beyan ederim.

17/07/2019

**Yasemin TEKİN KOCABAY**



## ÖZET

### ALERJİK RİNİT TEDAVİSİNDE KULLANILAN BAZI İLAÇLARIN İYONLAŞMA SABİTLERİNİN SIVI KROMATOĞRAFİK YÖNTEMİ İLE TAYİNİ

Yasemin TEKİN KOCABAY

Yüksek Lisans Tezi

Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Dilara BAŞAT DERELİ

Temmuz 2019, 62 sayfa

Günümüzde en sık görülen sorunların başında alerji ve neden olduğu hastalıklar gelmektedir. Alerjik rinit de bir alerji çeşidi olup normalde zararsız olan maddelere karşı bağışıklık sisteminin farklı ve aşırı tepki göstermesi olarak tanımlanır. Çocuklarda; dikkat eksikliği, sınav başarısızlığı, konsantrasyon eksikliği ve özgüvende azalmaya sebep olabilir. Yetişkinlerde ise depresyon, anksiyete, iş üretkenliğinde azalma ve bunların neticesinde yaşam kalitesinde düşme görülebilir. Alerjik rinitin tedavisinde öncelikle alerjenlerden kaçınma ve ilaç tedavisi kullanılır. İlaç olarak daha çok alerjenin etkisini azaltan antihistaminikler kullanılır. Bu sebeple son yıllarda bu ilaçların çözünürlük, biyolojik aktivite, absorpsiyon, lipofilik etkileri ve iyonlaşma sabitleri gibi fizikokimyasal parametreleri, yan etkileri ve ilaç etkileşimleri daha kapsamlı araştırılmaktadır. İyonlaşma sabiti ( $pK_a$ ) bir molekülün iyonlaşmış ve iyonlaşmamış formlarının birbirine eşit olduğu pH değeridir.  $pK_a$  değeri ilaç absorpsiyonunu etkiler. İlaçların çoğu suda az çözünen moleküller olduğu için iyonlaşma sabitlerinin tayinlerinde su-organik çözücü ikili karışımları kullanılır. Bu tez çalışmasında antihistaminik ilaçlardan Loratadin ve Desloratadin'in su-asetonitril çözücü karışımında iyonlaşma sabiti değerleri HPLC yöntemiyle tayin edilmiştir. Non lineer regresyon programı (NLREG) kullanılarak elde edilen  $pK_a$  değerlerinden Mol kesri- $pK_a$  yöntemi ve Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle sudaki  $pK_a$  değerlerine geçilmiştir. Elde edilen verilerin bilgisayar programı ile hesaplanan verilerle uyum içerisinde olduğu gözlenmiştir.

**Anahtar kelimeler:** İyonlaşma sabiti, Sıvı Kromatografik Yöntem, Alerjik Rinit

## ABSTRACT

### DETERMINATION OF IONIZATION CONSTANTS OF SOME DRUGS USED IN THE TREATMENT OF ALLERGIC RHINITIS BY LIQUID CHROMATOGRAPHY

Yasemin TEKİN KOCABAY

Master Thesis

Bitlis Eren University Graduate School of Natural and Applied Sciences

Department of Chemistry

Supervisor: Asst. Prof. Dr. Dilara BAŞAT DERELİ

July 2019, 62 pages

Allergies and diseases are the most common problems these days. Allergic rhinitis is also a type of allergy and is characterized by different and overreaction of the immune system against normally harmless substances. In children; attention deficit, exam failure, lack of concentration and self-confidence may lead to a decrease. In adults, depression, anxiety, and decrease in work productivity may result in a decrease in quality of life. In the treatment of allergic rhinitis, primarily allergens and drug treatment are used. Antihistamines are used to reduce the effect of allergens. Therefore, physicochemical parameters, side effects and drug interactions such as solubility, biological activity, absorption, lipophilic effects and ionization constants of these drugs have been investigated in recent years. The ionization constant ( $pK_a$ ) is the pH at which the ionized and non-ionized forms of a molecule are equal to each other.  $pK_a$  value affects the drug absorption. Because most of the drugs are insoluble in water, water-organic solvent binary mixtures are used in the determination of ionization constants. In this thesis, ionisation constant values of loratadine and desloratadine in water-acetonitrile solvent mixture of antihistaminic drugs were determined by HPLC method. The  $pK_a$  values obtained by using nonlinear regression program (NLREG) were changed to  $pK_a$  values in water by means of Mole fraction- $pK_a$  method and Yasuda-Shedlovsky extrapolation method. It was observed that the data obtained were in harmony with the data calculated by the computer program.

**Keywords:** Ionization constant, Liquid Chromatography Method, Allergic Rhinitis

## TEŞEKKÜR

Yapılan bu alıőmanın her aőamasında beni yönlendiren, sabır gösteren, her türlü bilgi birikimini benimle paylaőan hiçbir zaman desteğini esirgemeyen değerli tez danıőmanım Sn. Dr. Öğr. Üyesi Dilara BAŞAT DERELİ'ye teőekkürü bir borç bilirim.

Bu tez alıőması Bitlis Eren Üniversitesi Bilimsel Araőtırma Projeleri Biriminde BEBAP 2018.05 nolu proje ile desteklenmiőtir. Çalıőmamızı maddi olarak destekleyen Bitlis Eren Üniversitesi Bilimsel Araőtırma Projeleri Birimi'ne teşekkür ederiz.

Hayatımın her alanında bana yardımcı olan ve maddi manevi desteğini esirgemeyen kıymetli anneme ve eőim İbrahim KOCABAY'a Őükranlarımı sunarım.



# İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET .....	i
ABSTRACT .....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	iv
TABLolar DİZİNİ.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
SİMGELER DİZİNİ .....	x
KISALTMALAR DİZİNİ.....	xi
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
1.1. Antihistaminik İlaçlar .....	2
1.2. Antihistaminiklerin Sınıflandırılması .....	3
1.3. Loratadin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri .....	4
1.4. Desloratadin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri .....	5
1.5. pH ve pK <sub>a</sub> İlişkisi.....	5
1.6. pK <sub>a</sub> 'yı Etkileyen Parametreler .....	7
1.7. pK <sub>a</sub> Tayini İçin Kullanılan Yöntemler.....	10
1.8. Kromatografinin Genel Betimi .....	15
1.8.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC).....	15
1.8.2. HPLC'nin Uygulama Alanı .....	16
1.8.3. HPLC Cihazları .....	17
1.9. HPLC Yönteminde Kullanılan Temel Parametreler .....	19
1.9.1. Alıkonma Süresi .....	19
1.9.2. Bileşenlerin Göç Hızları: Alıkonma Faktörü- Kapasite Faktörü.....	21
1.9.3. Bağlı Göç Hızları: Seçicilik Faktörü- Seçicilik Katsayısı .....	22
1.9.4. Kolon Veriminin Nicel Betimi- Teorik Tabaka Sayısı.....	23



1.9.5. Kolonun Ayırma Gücü .....	27
1.10. HPLC Yönteminde Su Ortamındaki pK <sub>a</sub> Değerlerinin Belirlenmesi.....	29
1.10.1. Yasuda-Shedlovsky Yöntemi .....	29
1.10.2. Mol Kesri-pK <sub>a</sub> Yöntemi .....	29
1.11. Önceki Çalışmalar .....	31
1.11.1. Fizikokimyasal Parametrelerin Tayini .....	31
1.11.2. İlaç Preparatlarında, Biyolojik Sıvılarda Kromatografik Metotlarla Nitel ve Nicel Tayini .....	32
<b>2. MATERYAL ve YÖNTEM.....</b>	<b>37</b>
2.1. Deneysel Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözücüler .....	37
2.2. Kromatografik Çalışmalar .....	38
2.2.1. Kullanılan Cihazlar .....	38
2.2.1.1. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi Cihazı .....	38
2.2.1.2. pH/İyon Metre .....	38
2.2.2. HPLC Kolon Seçimi .....	39
2.2.3. Kullanılan Çözeltiler .....	39
2.2.3.1. Kromatografik Çalışmalar .....	39
2.2.3.1.1. %20 (h/h) Asetonitril-Su İkili Karışımı .....	39
2.2.3.1.2. %25 (h/h) Asetonitril-Su İkili Karışımı .....	40
2.2.3.1.3. %30 (h/h) Asetonitril-Su İkili Karışımı .....	40
2.2.3.1.4. %35 (h/h) Asetonitril-Su İkili Karışımı .....	40
2.2.3.1.5. %40 (h/h) Asetonitril-Su İkili Karışımı .....	40
2.2.3.1.6. %45 (h/h) Asetonitril-Su İkili Karışımı .....	41
2.2.3.1.7. %50 (h/h) Asetonitril-Su İkili Karışımı .....	41
2.2.3.2. Loratadin ve Desloratadin İlaçlarının Çözeltileri .....	41
2.2.3.3. Urasil Çözeltisi .....	41
2.3. Yöntem.....	42

<b>3. BULGULAR</b> .....	43
3.1. Bileşiklerin Chemicalize ile Hesaplanmış İyonlaşma Sabitleri .....	43
3.2. Loratadinin HPLC Yöntemiyle Asetonitril-Su Organik Çözücü İkili Karışımlarında İyonlaşma Sabiti Tayini .....	44
3.3. Desloratadin'in HPLC Yöntemiyle Asetonitril-Su Organik Çözücü İkili Karışımlarında İyonlaşma Sabiti Tayini .....	46
3.4. Mol kesri-pK <sub>a</sub> Yöntemi ile Bileşiklerin Su Ortamındaki pK <sub>a</sub> Değerlerinin Tayini.....	49
3.5. Yasuda - Shedlovsky Yöntemi ile Bileşiklerin Su Ortamındaki pK <sub>a</sub> Değerlerinin Tayini.	50
<b>4. SONUÇ ve ÖNERİLER</b> .....	51
<b>5. KAYNAKLAR</b> .....	54
<b>ÖZGEÇMİŞ</b> .....	62

## ÇİZELGELER DİZİNİ

<u>ÇİZELGE</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Antihistaminiklerin Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması.....	3
1.2. Antistaminikler Üretim-Gelişim Süreçlerine Göre Sınıflandırılması.....	4
1.3. 25°C’Demetanol-Su İkili Karışımı için Bazı Makroskopik Veriler Metanol-Su İkili .....	30
1.4. 25 °C’de Asetonitril-Su İkili Karışımı için Bazı Makroskopik Veriler.....	30
1.5. 25 °C’de Tetrahidrofuran-Su İkili Karışımı için Bazı Makroskopik Veriler .....	30
2.1. Çalışmada Kullanılan Bileşiklerin Özellikleri.....	37
2.2. Kimyasal Malzemeler Ve Kullanım Amaçları .....	38
3.1.Loratadin ve Desloratadinin Chemicalize Programıyla Hesaplanmış Tahmini Pk <sub>a</sub> Değerleri	43
3.2.Loratadin için %35, %40, %45 ve %50 (h/h) Asetonitril İçeren Asetonitril-Su İkili Karışımlarında Elde Edilen Alıkonma Faktörleri Değerleri .....	44
3.3.Desloratadin için %20, %25, %30 ve %35 (h/h) Asetonitril İçeren Asetonitril-Su İkili Karışımlarında Elde Edilen Alıkonma Faktörleri Değerleri .....	47
4.1.Loratadin için NLREG Programıyla Hesaplanmış pK <sub>a</sub> Değerleri ve Türlerle Ait Alıkonma Zamanı Değerleri.....	51
4.2.Desloratadin için NLREG Programıyla Hesaplanmış pK <sub>a</sub> Değerleri ve Türlerle Ait Alıkonma Zamanı Değerleri.....	52
4.3.Bileşiklerin Mol Kesri-pK <sub>a</sub> Yöntemiyle ve Yasuda-Shedlosky Yöntemiyle Hesaplanan Su Ortamındaki pK <sub>a</sub> Değerleri.....	52

## ŞEKİLLER DİZİNİ

<u>ŞEKİL</u>	<u>Sayfa</u>
1.1. Histidinden Histamin Oluşumunu Gösteren Reaksiyon.....	2
1.2. Loratadinden Desloratadinin Oluşum Reaksiyonu.....	5
1.3. Farklı $pK_a$ Değerleri İle Sıcaklığın Değişimi. ....	8
1.4. 18 °C’de Sudaki Asetik Asitin $pK_a$ ’sı İle İyonik Şiddetinin Değişimi.....	9
1.5. Benzoik asit $pK_a$ ’sının farklı çözücü bileşimindeki değişimi (25 °C’deki sudaki metanol ve I = 0.02 M).....	9
1.6. $pK_a$ Tayini İçin Kullanılan Çeşitli Yöntemlerin Kronolojik Sıralaması.....	10
1.7. $pK_a$ Tayini İçin Kullanılan Çeşitli Yöntemlerin Kıyaslanması .....	13
1.8. pH'ya Karşı Ölçülmüş Bir Miktarın Çizilmesiyle Oluşturulan Sigmoidal Eğrinin Klasik Bir Örneği.....	14
1.9. LC Tipinin Seçimi .....	17
1.10. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Cihazının Şematik Görünüşü.....	18
1.11. İki Bileşenli Bir Karışım İçin Tipik Bir Kromatogram .....	20
1.12. $H=\sigma^2/(L)$ Şeklinde Verilen Tabaka Yüksekliğinin Tanımı.....	24
1.13. Tabaka Sayısının Tayini .....	25
1.14. Üç Ayrı Ayırma Gücündeki Kromatogramlar.....	28
3.1. Loratadin için %35 (h/h) Asetonitril İçeren Asetonitril-Su İkili Karışımlarındaki pH-tR İlişkisi.....	45
3.2. Loratadin için %40 (h/h) Asetonitril İçeren Asetonitril-Su İkili Karışımlarındaki pH-tR İlişkisi.....	45
3.3. Loratadin için %45 (h/h) Asetonitril İçeren Asetonitril-Su İkili Karışımlarındaki pH-tR İlişkisi.....	46
3.4. Loratadin için %50 (h/h) Asetonitril İçeren Asetonitril-Su İkili Karışımlarındaki pH-tR İlişkisi.....	46
3.5. Desloratadin için %20 (h/h) Asetonitril İçeren Asetonitril-Su İkili Karışımlarındaki pH-tR İlişkisi.....	47
3.6. Desloratadin için %25 (h/h) Asetonitril İçeren Asetonitril-Su İkili Karışımlarındaki pH-tR İlişkisi.....	48
3.7. Desloratadin için %30 (h/h) Asetonitril İçeren Asetonitril-Su İkili Karışımlarındaki pH-tR İlişkisi.....	48

3.8. Desloratadin için %35 (h/h) Asetonitril İçeren Asetonitril-Su İkili Karışımlarındaki pH-tR İlişkisi .....	48
3.9. Loratadin İçin Mol Kesri-pK <sub>a</sub> Yöntemiyle Sudaki pK <sub>a</sub> Değerinin Hesaplanması .....	49
3.10. Loratadin İçin Mol Kesri-pK <sub>a</sub> Yöntemiyle Sudaki pK <sub>a</sub> Değerinin Hesaplanması .....	49
3.11. Asetonitril-Su Ortamında Loratadinin Yasuda-Shedlovsky Ekstrapolasyon Grafiği.....	50
3.12. Asetonitril-Su Ortamında Desloratadinin Yasuda-Shedlovsky Ekstrapolasyon Grafiği.....	50



## SİMGELER DİZİNİ

T:	Sıcaklık
I:	İyonik Şiddet
$\epsilon$ :	Dielektrik Sabiti
$\Delta M$ :	Ayrışma Entalpi Değişimi
$\Delta G$ :	Gibbs Serbest Enerji Değişimi
$\Delta S$ :	Entropi Değişimi
R:	Gaz Sabiti
z:	İyonik Türün Yüğü
c:	İyonik Türün Konsantrasyonu
$\mu m$ :	Mikrometre
$t_R$ :	Alıkonma Süresi
k:	Alıkonma Faktörü
$V_S$ :	Durgun Faz Hacmi
$V_M$ :	Faz Hacmi
H:	Tabaka Yüksekliğı
N:	Teorik Tabaka Sayısı
L:	Kolon Dolgusu Uzunluğı
$R_S$ :	Kolon Ayırma Gücü

## KISALTMALAR DİZİNİ

HPLC:	Yüksek Basınç Sıvı Kromatografi
NLREG:	Non Lineer Regrasyon Programı
CE:	Kapiler Elektroforez
UV:	Morötesi (Ultraviolet)
NMR:	Nükleer Manyetik Rezonans
LC:	Sıvı Kromatografi



## 1. GİRİŞ

Çağın giderek yaygınlaşan hastalıklarından biri alerjik rinittir. Alerjik rinit genel bir halk sağlığı problemi olup tedavi kontrol altına alınmadığı durumlarda hayat kalitesini azaltmaktadır. Bu nedenle alerjik rinitin erken dönemde tanısının konulması ve tedavisinin uygulanması önem taşımaktadır. Alerjik rinitin tedavisinde bulguları tetikleyen alerjenlerden kaçınma ve ilaç tedavisi esastır. İlaç tedavisi olarak en sık kullanılan madde antihistaminiklerdir. Antihistaminik ilaçların sık kullanımlarından dolayı lipofilik etkileri, çözünürlükleri, iyonlaşma sabitleri gibi fizikokimyasal parametreleri, yan etkileri ve ilaç etkileşimleri son yıllarda daha dikkatli incelenmeye başlanmıştır.

İyonlaşma sabiti ( $pK_a$ ), bir molekülün iyonlaşma davranışını belirleyen temel parametredir. İlaçların iyonlaşma sabitlerinin belirlenmesi ile biyolojik sıvılardaki çözünürlük, lipofilisite, asitlik, transfer davranışı, reseptörlere bağlanma ve geçirgenlik gibi özellikleri hakkında kritik bilgiler elde edilebilir. Ayrıca ilaç formülasyonlarının tayinlerinde ve ilaçların analizlerinde metot geliştirme işlemlerinde bu değerlerin bilinmesi gerekir. İlaçların iyonlaşma sabitlerinin sudaki tayinleri, bileşiğin sudaki çözünürlüğünün az olması durumunda su-organik çözücü ikili karışımlarının kullanılmasını zorunlu kılar. Bu ikili karışımlar kullanılarak organik çözücünün yeterli çözme gücünden yararlanılabilmektedir.

Su-organik çözücü karışımlarında yapılan iyonlaşma sabiti tayinlerinde klasik yöntemler olan potansiyometrik titrasyon ve spektrofotometri yöntemleri kullanılır. Ancak günümüzde yüksek basınçlı sıvı kromatografik (HPLC) yöntemi ve kapiler elektroforez yöntemleri tercih edilmektedir. Bu yöntemlerde su-organik çözücü ikili karışımı kullanıldığında ekstrapolasyon yöntemleriyle ilacın su-organik çözücü ikili karışımlarından elde edilen iyonlaşma sabiti değerlerinden sudaki iyonlaşma sabiti değerine ulaşılır.

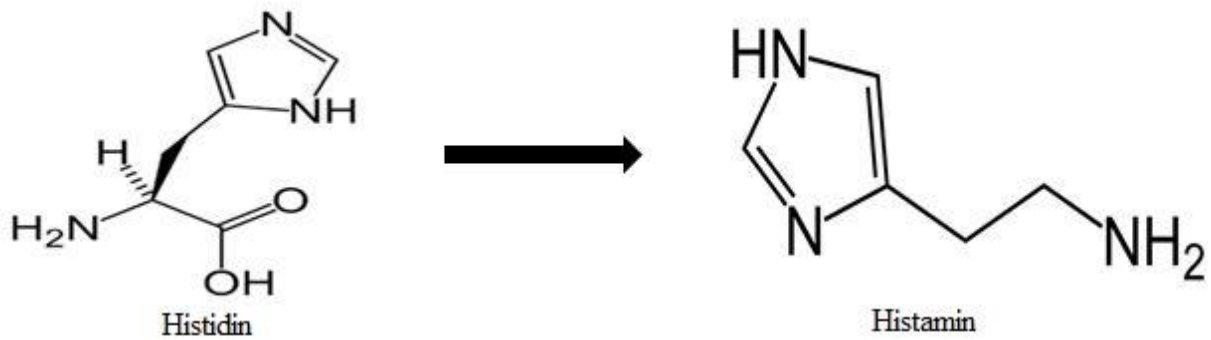
Bu tez çalışmasında antihistaminik ilaçlardan piperidin grubu olan Loratadin ve Desloratadin'in sudaki çözünürlükleri az olması nedeniyle 4 farklı su-asetonitril yüzdeleri için iyonlaşma sabiti değerleri HPLC yöntemiyle tayin edilmiştir.  $pK_a$  değerleri hesaplanırken sıvı kromatografik verilerden iyonlaşma sabiti hesaplamayı sağlayan non lineer regresyon programı (NLREG) kullanılmıştır. Bu farklı 4 ortamdan elde edilen iyonlaşma sabiti değerlerinden sudaki iyonlaşma sabiti değerleri Mol kesri- $pK_a$  yöntemi ve Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemiyle belirlenmiştir. HPLC ile iyonlaşma sabiti değerleri tayininde pH'nın kapasite faktörü üzerinde etkisi incelenmiştir. İyonlaşma sabitlerinin sıvı kromatografik yöntemle tayininden elde edilen veriler bu ilaç aktif bileşiklerle çalışan AR-GE çalışanlarına kaynak bilgi oluşturacaktır.



## 1.1. Antihistaminik İlaçlar

İlk olarak 1937’de Avrupa’da kullanılmaya başlanan ve 1945’den sonra yaygın bir şekilde veterinerlikte ve tıpta özellikle alerjik rinit tedavisinde kullanılmaktadır. (Börçek, 2010; Kiremitçi, 2004; Simons, 2003; Braun-Falco, Plewig, Wolff ve Burgdorf, 2000). Rinit burun iltihabı, alerjik rinit ise iltihabın alerji kaynaklı olmasıdır. Alerjik rinit; hapşırma, burun akıntısı ve burun tıkanıklığı ile karakterizedir. Sıklıkla göz, burun ve damak kaşıntısı eşlik eder. Ülkemizde görülme sıklığı çocuklarda %2-37, erişkinlerde %8-30 arasında değişmektedir (Anonim, 2015). Yaygınlığı astıma oranla daha fazladır ve dünya çapında da giderek artış göstermektedir. Alerjik rinit genel bir halk sağlığı problemi olup, semptomların kontrol altına alınamaması durumunda çocuklarda otit ve sinüzit, yetişkinlerde horlama gibi hastalıklara zemin hazırlamaktadır. Hayatı tehdit eden bir hastalık değildir ancak hayat kalitesini azaltmaktadır. Bu nedenle alerjik rinitin erken dönemde tanısının konulması ve tedavisinin uygulanması önem taşımaktadır (Bousquet, Van Cauwenberge ve Khaltaev, 2001).

Alerjik rinitin tedavisinde bulguları tetikleyen alerjenlerden kaçınma ve ilaç tedavisi esastır. İlaç tedavisi olarak en sık kullanılan madde antihistaminiklerdir. Bu ilaçlar alerjik reaksiyonlarda rol oynayan histamini azaltmaya yöneliktir. Histamin, vücuttaki dokularda meydana gelen kişinin alerjik olduğu madde ile karşılaştığında veya iltihap durumlarında ortaya çıkan önemli bir kimyasal ajandır. (Börçek, 2010; Kiremitçi, 2004; Simons, 2003; Braun-Falco ve diğerleri, 2000). Şekil 1.1’de görüldüğü gibi histidin adındaki aminoasitin dekarboksilasyonu sonucu histamin ( $\beta$ -imidazol etilamin) oluşur (Kontaş, 2012; Kaleli, 2010; Ülker, 1991; Hill, 1990). Antihistaminikler ise histamin etkisiyle vücutta ortaya çıkan etkileri inhibe eden ya da tamamen ortadan kaldırmak için dışarıdan verilen ilaçlardır.



Şekil 1.1. Histidinden Histamin Oluşumunu Gösteren Reaksiyon

Antihistaminik ilaçların bu yaygın kullanımlarından dolayı etkileri, yan etkileri ve ilaç etkileşimleri son yıllarda daha dikkatli incelenmeye başlanmıştır.

## 1.2. Antihistaminiklerin Sınıflandırılması

Kimyasal yapılarına göre antihistaminikler Çizelge 1.1'den görüldüğü üzere altı gruba ayrılmaktadır (Börçek, 2010; Kiremitçi, 2004; Simons, 2003; Özlüoğlu, Saydam ve Kızılay, 1994).

**Çizelge 1. 1.** Antihistaminiklerin Kimyasal Yapılarına Göre Sınıflandırılması

Ethanolaminler	Etilendiaminler	Alkilaminler	Piperidinler	Fenotiazinler	Piperazinler
Diphenhidramin	Tripelenamin	Bromfeniramin	Siproheptadin	Prometazin	Hidroksizin
Klemastin	Prilamin	Dimetibden	Mizolastin	Trimeprazin	Trankilizan
Bromazin	Methapirilen	Feniramin	Loratadin	Methdilazin	Buklizin
Klorfenoksamin	Antazolin	Tripolidin	Terfenadin		Meklizin
Dimenhidrinat		Klorfeniramin	Feksofenadin		Setirizin
Doksilamin		Tripalidin	Ebastin		Siklizin
		Akrivastin	Astemizol		Oksatomid
			Desloratadin		

Antihistaminikler üretim-gelişim süreçlerine göre de Çizelge 1.2'de görüldüğü üzere birinci, ikinci, üçüncü kuşak olmak üzere üç gruba ayrılmaktadır (Kontaş, 2012; Kiremitçi, 2004; Handley, Magnetti ve Higgins, 1998).

**Çizelge 1. 2.** Antistaminikler Üretim-Gelişim Süreçlerine Göre Sınıflandırılması

<b>Birinci Kuşak</b>	<b>İkinci Kuşak</b>	<b>Üçüncü Kuşak</b>
Dimetindenmaleat	Akrivastin	Fexofenadin
Klorfeniraminmaleat	Setirizin	Norastemizol
Klemastin	Loratadin	Levosetirizin
Klorfenoksaminhidroklorür	Fexofenadin	Desloratadin
Siproheptadinhidroklorür		
Difenhidraminhidroklorür		
Hidroksizinpamoat / hidroklorür		
Feniraminmaleat		
Karbinoksaminmaleat		
Mebhidrolinnapodisikat		
Triprolidinhidroklorür		

Lipofilik yapıdaki birinci kuşak antihistaminikler yeni kuşak antihistaminiklerin aksine, kan-beyin bariyerini kolayca geçer ve belirgin derecede sedatif ve antikolinergik yan etkiler oluştururlar (Kontaş, 2012; Kiremitçi, 2004). Diğer ilaçlarla olan etkileşimleri özellikle önemlidir. Santral sinir sistemini deprese eden bazı maddelerin etkilerini arttırmırlar (Kontaş, 2012; Özlüoğlu ve diğerleri, 1994; Kayaalp, 1986).

Yan etkilerini, ilaç etkileşimlerini ve antikolinergik etkilerini azaltarak farmakolojik etkilerini korumak ve güçlendirmek amacıyla yeni grup antihistaminikler geliştirilmiştir (Kontaş, 2012; Özlüoğlu ve diğerleri, 1994; Krause, 1992). İnteraksiyona girdikleri ilaç sayısı oldukça azdır. Yarılanma süreleri değişkenlik gösterebilmektedir. Ancak genellikle etki süreleri uzundur (Kontaş, 2012; Özlüoğlu ve diğerleri, 1994; Kaliner, 1992).

Üçüncü kuşak antihistaminikler ise lipofobik yapıya sahiptirler. İkinci kuşak antihistaminik ilaçların aktif metabolitlerinden meydana gelirler. Bu grupta yer alan antihistaminikler, ikinci kuşak antihistaminikler gibi kan-beyin bariyerini geçemezler. Sedatif etki göstermezler (Kontaş, 2012; Kiremitçi, 2004).

Bu çalışmada antihistaminik ilaçlardan piperidin grubu olan Loratadin ve Desloratadin seçilmiştir. Loratadin 2.kuşak, desloratadin ise 3.kuşak antihistaminiklerdendir.

### **1.3. Loratadin Fiziksel ve Kimyasal Özellikleri**

1973 yılında Schering Plough tarafından 1. kuşak antihistaminik olan N-metilazetidin'in etilkloroformat ile tepkimesinden elde edilen bileşiğe klor bağlanması ile loratadin elde



rolü büyüktür. Zayıf asit ve zayıf baz özelliğinde olan ilaçların bağıl konsantrasyonları, ilacın  $pK_a$ 'sı ve ortamın pH'sına göre değişir (Noyanalpan, 1978).

Belirli pH'da bir ilacın iyonlaşmış ya da iyonlaşmamış şekillerinin bağıl konsantrasyonu Henderson-Hasselbach eşitliği ile hesaplanabilir. Zayıf asitler için 1 nolu eşitlikten, zayıf bazlar için 2 nolu eşitlikten yararlanılır.

$$pH = pK_a + \log\left(\frac{[A^-]}{[HA]}\right) \quad (1)$$

[A<sup>-</sup>]: Konjuge bazın konsantrasyonu

[HA]: Zayıf asitin konsantrasyonu

$$pOH = pK_b + \log\left(\frac{[HB^+]}{[B]}\right) \quad \text{ya da} \quad pH = pK_a + \log\left(\frac{[B]}{[HB]}\right) \quad (2)$$

[HB<sup>+</sup>]: Konjuge baz konsantrasyonu

[B]: Zayıf baz konsantrasyonu

Bu eşitliklere göre zayıf asit içeren bir çözeltinin pH'sı yükseldikçe asitin iyonlaşmış şeklinin konsantrasyonu, bazın iyonlaşmamış şeklinin konsantrasyonu yükselir.

Henderson-Hasselbach eşitliği ile zayıf zayıf asit molekülünün iyonlaşma yüzdesi de hesaplanabilir. Zayıf asitlerin yüzde iyonlaşmaları eşitlik 3, zayıf bazların ise eşitlik 4 ile hesaplanabilir.

$$\%İ = 100 / (1 + \text{antilog}(pK_a - pH)) \quad (3)$$

İ: İlacın iyonlaşmış şeklinin konsantrasyonudur.

$$\%İ = 100 / (1 + \text{antilog}(pH - pK_a)) \quad (4)$$

Eşitlik 3 ve 4'ten bir ilacın  $pK_a$  değeri ve ortamın pH'sı bilindiği sürece asit ve baz özellikteki ilacın % iyonlaşması hesaplanabilir.

Asitler düşük pH değerinde, bazlar ise yüksek pH değerinde iyonlaşmanın artmasından dolayı güçlü biyolojik etki gösterirler. İlaç molekülleri genellikle hücre zarlarını moleküler yani iyonlaşmamış durumda geçerler, fakat hücre içinde iyonlaşmış şekilde etki gösterirler. Zayıf asitler, düşük pH'da iyonlaşmamış halde buldukları için hücre zarını kolaylıkla geçerler ve

yüksek etki gösterirler. Zayıf bazlar ise düşük pH değerlerinde çoğunlukla katyonik durumda bulunurlar. Böylece hücre zarını geçemez ve biyolojik etkileri düşüktür (Noyanalpan, 1978).

### 1.6. pK<sub>a</sub>'yı Etkileyen Parametreler

Evrensel bir sabit olarak adlandırılmasına rağmen, iyonlaşma sabiti (pK<sub>a</sub>) aslında tam olarak sabit değildir; sıcaklığa (T), iyonik şiddete (I) ve çözücü dielektrik sabitine (ε) bağlıdır.

pK<sub>a</sub> değerlerinin sıcaklık ile olan ilişkisi 5 nolu eşitlik olan Van't Hoff eşitliği ile ilişkilendirilir.

$$d \ln K_a/dT = \Delta H/RT^2 \quad (5)$$

ΔH: Ayrışma entalpi değişimi

R: Gaz sabitidir.

ΔH değeri genellikle negatiftir. ΔH'nin sıcaklıktan bağımsız olduğu durumda, pK<sub>a</sub> değerini 1/T'ye göre çizmek doğrusal bir grafik verir. Bu değerlerden ekstrapolasyon yapılarak diğer sıcaklıklardaki pK<sub>a</sub> değerleri bulunabilir (Monzyk ve Crumbliss, 1980; Poth-Brink ve Crumbliss, 1982).

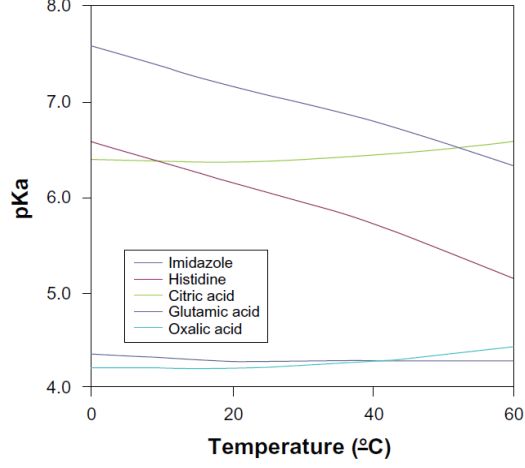
Deneysel verilerin ekstrapolasyonu elbette tavsiye edilmeyen bir durumdur. Bunun için ΔH aşağıdaki eşitlik 6'daki gibi yeniden düzenlenebilir.

$$\Delta H = \Delta G + T\Delta S \quad (6)$$

ΔG: Gibbs serbest enerji değişimi

ΔS: Entropi değişimi

Belirtilen doğrusal ilişki sadece ΔH >> TΔS ise geçerlidir. Üstelik bazı durumlarda ΔS, pK<sub>a</sub>'nın 1 / T'ye doğrusal olmayan bağımlılığı ile sonuçlanan sıcaklığa da bağlıdır. pK<sub>a</sub>'nın sıcaklık ile olan ilişkisi Şekil 1.3'te görülebilir.



**Şekil 1. 3.** Farklı pK<sub>a</sub> Değerleri İle Sıcaklığın Değişimi (Everaerts, Beckers ve Verheggen, 1976).

Ölçülen pK<sub>a</sub> değerleri ayrıca çalışılan çözeltinin iyonik şiddetine de bağlıdır. İyonik şiddet, ilgili iyonik türün yükünün karesi ile konsantrasyonunun çarpımlarının toplamı olarak eşitlik 7'deki gibi tanımlanır:

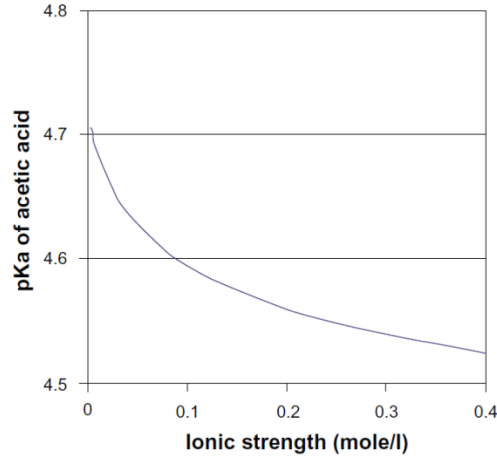
$$I = \frac{1}{2} \sum z^2 \cdot c \quad (7)$$

z: İyonik türün yükü

c: İyonik türün konsantrasyonu

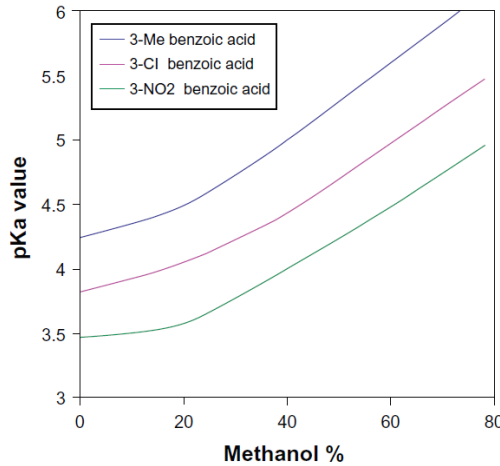
pH skalasının aşırı değerlerinde, H<sup>+</sup> veya OH<sup>-</sup> katkısı da dahil edilmelidir. Çözeltideki farklı iyonik türlerin aktivite katsayıları ( $\gamma$ ) iyonik şiddete kuvvetle bağlıdır (Debye-Hückel teorisi).

pK<sub>a</sub> aktivite katsayılarına da bağlı olduğundan, iyonik şiddet özellikle yüksek iyonik yüklü (z) türlerde pK<sub>a</sub>'yı etkileyecektir. Bu bağımlılığın bu örneği, Şekil 1.4' te gösterilmiştir.



**Şekil 1. 4.** 18 °C’de Sudaki Asetik Asitin pK<sub>a</sub>’sı İle İyonik Şiddetinin Değişimi (Cohn, Heyroth ve Menkin, 1928)

Asit-baz dengesi çözelti içinde gerçekleştiğinden, çözücü bileşimi pK<sub>a</sub> değerlerini de etkileyebilir (Şekil 1.5). Organik çözücü ve su karışımlarının pH’sının ölçülmesi kolay değildir. Bir asitin ayrışma reaksiyonuyla ilgili olarak, üç termodinamik adım göz önünde bulundurulur: (1) asidin çözücünden gaz fazına çözünmesi, (2) asidin iyonlara ayrışması ve (3) iyonların çözücüye geçtiği çözelti aşaması. İlk ve son aşamada, çözücü katılmaktadır. Çözücünün etkisi göz önüne alındığında, asidin çözülme enerjileri ve ayrılmış asit arasındaki fark, son pK<sub>a</sub> değerlerini etkiler. Dolayısıyla bir çözücünün pH aralığı başka bir çözücününkinden farklı olabilir (Reijenga, Hoof, Loon, Teunissen, 2013).



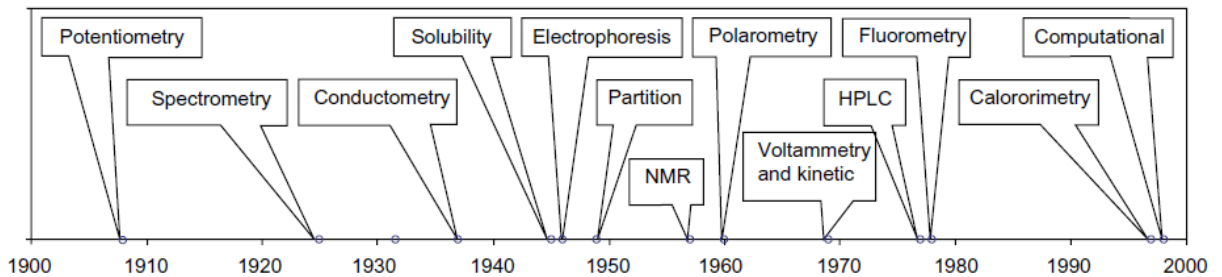
**Şekil 1. 5.** Benzoik asit pK<sub>a</sub>’sının farklı çözücü bileşimindeki değişimi (25 °C’deki sudaki metanol ve I = 0.02 M) (Sarmini ve Kenndler, 1998)



$pK_a$  ölçümleri yapılırken, anlamlı bir sonuç elde etmek için belirtilen tüm parametrelerin sabit tutulması gerektiği vurgulanmalıdır. pH ölçümlerinde de böyle olduğu genellikle göz ardı edilmektedir. Kullanımdan önce, pH metre aynı sıcaklık, iyonik şiddet ve çözücü koşullarında kalibre edilmelidir. Literatürde  $pK_a$  değerlerinin raporlanması ayrıca sıcaklık, iyonik şiddet ve çözücü gibi kesin koşulların belirtilmesini gerektirir. Bu detayların ihmal edilmesi durumunda suda ölçümü, oda sıcaklığında ve sonsuz seyreltmeye ekstrapolasyonlandığı varsayılmaz (Reijenga ve diğerleri, 2013).

## 1.7. $pK_a$ Tayini İçin Kullanılan Yöntemler

Bir bileşiğin iyonlaşma sabitinin belirlenmesi için, spektrofotometri (Rossotti ve Rossotti, 1962; Wigler ve Wilson, 1966), potansiyometri (Benet ve Goyan, 1967; Albert ve Serjeant, 1971), iletkenlik (Kroflıç, Apelblat ve Beşter-Rogaç, 2012; Sixma ve Wynberg, 1964), proton manyetik rezonans spektrometresi (Albert ve Serjeant, 1971; Rabenstein ve Sayer, 1976), çözünürlük (Zimmerman, 1982), kromatografik (Horvath, Melander ve Molnar, 1977), voltametik (Kim ve Chung, 2001), kalorimetrik (Tajc, Tolbert, Basavappa ve Miller, 2004), elektroforetik (Fuguet, Rafols, Bosch ve Roses, 2009), florometrik (Rosenberg, Simons ve Schulman 1979), polarimetrik (Katzin ve Gulyas, 1960), kinetik (Bunnett ve Nudelman, 1969), bilgisayar destekli programlar (Tehan, Lloyd, Wong, Pitt ve Montana, 2002), gibi çeşitli deneysel yöntemler mevcuttur. Her yöntemin farklı avantajları ve dezavantajları vardır.  $pK_a$  tayini için kullanılan çeşitli yöntemlerin kronolojik sıralaması şekil 1.6'da verilmiştir.



**Şekil 1. 6.**  $pK_a$  Tayini İçin Kullanılan Çeşitli Yöntemlerin Kronolojik Sıralaması (Reijenga ve diğerleri, 2013)

$pK_a$  belirleme yöntemleri içinde Potansiyometrik titrasyonlar basitliği ve düşük maliyeti nedeniyle en sık kullanılan yöntemlerden biridir. Potansiyometrik olarak titrasyon, aşamalı olarak analit çözeltisine hacmi bilinen bir reaktif eklenir. Potansiyeldeki değişim bir indikatör

diğeri referans elektrot olan iki elektrot arasındaki reaksiyona dayanır. Bu elektrotlar günümüzde entegre edilmiş ve yaygın olarak kombine pH elektrotu olarak geçer. Eklenen hacme karşı potansiyeli verir. pH'sı bilinen standartların kullanılması durumunda bu potansiyel doğrudan  $pK_a$ 'ya eşit bir pH'a dönüştürülebilir.

Geleneksel potansiyometrik titrasyonlar, yaklaşık  $10^{-4}$  M'la sınırlı bir konsantrasyona sahiptir, ancak bu aralığı genişletmek için çeşitli yöntemler geliştirilmiştir. Bir başka komplikasyon, suda çözünürlüğü düşük olan maddelerin  $pK_a$  ölçümüdür. Bu sorun su-organik çözücü ikili karışımı kullanılarak giderilebilir (Avdeef, Comer ve Thomson, 1993). Başka bir yaklaşım aynı doğruluk seviyesini veren ve ekstrapolasyondan kaynaklı sıkıntıları önleyen sürfaktanların kullanılmasıdır ( $\pm 0.2$   $pK_a$  değeri) (Ravichandiran, Devajaran ve Masilamani, 2011). Potansiyometrik titrasyon, yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve kapiler elektroforez (CE) gibi ayırma yöntemleriyle karşılaştırıldığında nispeten büyük miktarda numune gerektirir (Reijenga ve diğerleri, 2013).

1900'den önce asitlikteki bir değişikliğin doğal maddelerin renk değişikliklerine neden olabileceği zaten biliniyordu. Görünür bölgedeki spektrometri, asit/baz indikatörlerinin  $pK_a$  değerlerini ölçmeyi mümkün kıldı ve bu, diğer bileşenlerin  $pK_a$ 'larını ölçmek için UV ışığının kullanımına fırsat kıldı. Spektrofotometrik yöntemle  $pK_a$  tayini için gerekli olan şey molekül içindeki iyonlaşma bölgesine yakın bir kromoforun varlığıdır. Ayrıca, ilgili iyonik ve moleküler türlerin farklı spektrumlara sahip olması gerekir. Prensip, her iki formun dalga boyunun aynı molar absorptiviteye sahip olduğu izobestik nokta dışında,  $pK_a$ 'nin belirlenmesi için herhangi bir dalga boyu kullanılabilir. Bununla birlikte en iyi seçim, molar absorpsiyonun mümkün olduğu kadar farklı olduğu bir dalga boyudur.

Yöntem, iki farklı dalga boyunun absorpsiyonunu değişken bir pH'da ölçerek daha da geliştirildi. Bu iki dalga boyunda absorpsiyon oranı, pH'a karşı çizilir. Bu şekilde, bir sigmoid eğrisi elde edilir ve  $pK_a$  sigmoidal noktasından normal olarak belirlenebilir. Bu yöntem, bir boyanın "ayırışma" sabiti ölçüldüğü 1925'te Holmes ve Snyder tarafından tanıtıldı (Holmes ve Snyder, 1925). Bu daha sonra Flexser ve arkadaşları tarafından 1935'te farklı iyonizasyon sabitleri belirleyerek daha da geliştirildi (Flexser, Hammet ve Dingwall, 1935). 1960'larda, Wigler ve arkadaşları, diprotik bileşiklerin  $pK_a$  değerlerini belirleyen ilk kişilerdi (Wigler, 1963; Wilson ve Wigler, 1966).

Bu noktaya kadar hesaplanan  $pK_a$  değerleri, nötr ve iyonlaştırılmış bileşiğin absorpsiyon katsayıları gibi deneysel verilerin önceden bilinmesini gerektirir. Bütün bir dalga boyu aralığını ölçerek, Allen ve arkadaşları, bu önceki bilgi olmadan  $pK_a$  değerlerini belirleyebildiler (Allen, Box, Comer, Peake ve Tam, 1998). Ölçümler de çok daha hızlı yapılabilir. Bu yöntem önceki tek

dalga boyu yöntemleriyle (Takacs-Novak ve Tam, 2001), iyi bir uyum göstermiş ve daha sonra Saurina ve arkadaşları tarafından otomatikleştirilmiştir (Saurina, Hernandez-Cassou, Tauler ve Izquierdo-Ridorsa, 2000).

Proton manyetik rezonans yönteminin ultraviyole spektrumları iyonlaşma üzerine değişmeyen ve suda çözünebilir maddeler için faydalı olduğu kanıtlanmıştır. Proton manyetik rezonans yönteminin sınırlamaları kullanılması gereken tampon çözeltiler ve en az bir protonun iyonlaşmamış türden iyonlaşmış türe geçerken göstermesi gereken önemli bir kimyasal kaymanın olması gerektiğidir (Grunwald, Loewenstein ve Meiboom, 1957; Popov, Rönkkömaki ve Lajunen, 2006). Bu ilk üç yöntemin tümü çok saf bir bileşik gerektirir.

Günümüzde  $pK_a$  tayini için daha çok kromatografi yöntemi kullanılmaktadır ( Horvath ve diğerleri, 1977). Bu yöntem az miktarda bileşikle çalışabilmesi, suda az çözünürlüğün bir dezavantaj olmaması ve numunelerin saf olmalarının gerekmemesi nedeniyle daha avantajlıdır.

Kromatografik yöntemlerden gaz kromatografisi, kağıt kromatografisi, ince tabaka kromatografisi ve yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC) gibi yöntemler  $pK_a$  tayininde kullanılabilir. Gaz kromatografisi metodu bileşiklerin sulu çözelti yerine buhar fazında olmasından dolayı kullanımı sınırlıdır. (Vitenberg, Loffe, Dimitrova ve Strukova, 1976).

Tüm sıvı kromatografi metotları farklı pH değerlerindeki mobil fazları içermektedir. Örneğin, kağıt kromatografisi yöntemiyle de bu şekilde çalışıldığında (Dykhovichnaya, Bonderanko, Illarionova ve Rann, 1971; Padhye ve Kulkarni, 1973) ortaya çıkan iyonlaşma sabitlerinin, geleneksel teknikler kullanılarak daha önce yayınlanmış sonuçlarla karşılaştırıldığında, iyi bir durum içinde oldukları bulunmuştur. Maddelerin yağ/su dağılım katsayısı iyonlaşma sabiti ile ilgili olduğu için iyonlaşma sabitlerinin ince tabaka kromatografisi ile de belirlenmesi mümkündür (Tyman-Szram, Musiol, Sajewicz ve Polanski, 2005).

Günümüzde yeni ilaçların zayıf çözünürlük özellikleri nedeniyle bu tür ilaçların  $pK_a$  değerlerini tahmin etmek için yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) yöntemi çok kullanılmaktadır. HPLC yöntemi, basitliği ve çeşitli izokratik HPLC sistemlerinin kullanılabilmesi nedeniyle tercih edilmektedir. Ayrıca minimum miktarda ilaç maddesi gereksinimi, yüksek kalite ve kabul edilebilir verimliliği olması bu yöntemi farmasötik endüstrisi içinde tercih edilebilir bir yöntem haline getirmiştir. HPLC yöntemi temel olarak, analitin iyonlaşmış ve iyonlaşmamış formlarının farklı tutunma davranışına dayanmaktadır. Alıkonma süresi, mobil fazın pH değeri ile ilişkili olarak belirlenir.  $pK_a$  değeri, elde edilebilecek olan sigmoidal eğrisindeki dönüm noktasıdır ve kolayca elde edilebilir (Manderscheid ve Eichinger, 2003).

$pK_a$  tayini için kullanılan yöntemlerin çoğu, yalnızca analitin değil aynı zamanda çeşitli diğer bileşenlerin de bulunduğu tamponlanmış çözeltileri de içerir. Analit ve bu diğer bileşenler arasında iyonik veya başka bir etkileşim olmadığından emin olunmalıdır.

Şekil 1.6' dan da görüldüğü üzere yöntemlerin tanıtılması ve uygulanması farklı zaman dilimlerini kapsamaktadır. Çünkü analizi yapılacak maddenin özellikleri, miktarı, konsantrasyonu ve elde olan mevcut imkanlar göz önünde bulundurulduğunda yöntem seçimi oldukça önemli olmaktadır. Bu yöntemlerin kıyaslanması Şekil 1.7' den daha ayrıntılı olarak görülmektedir.

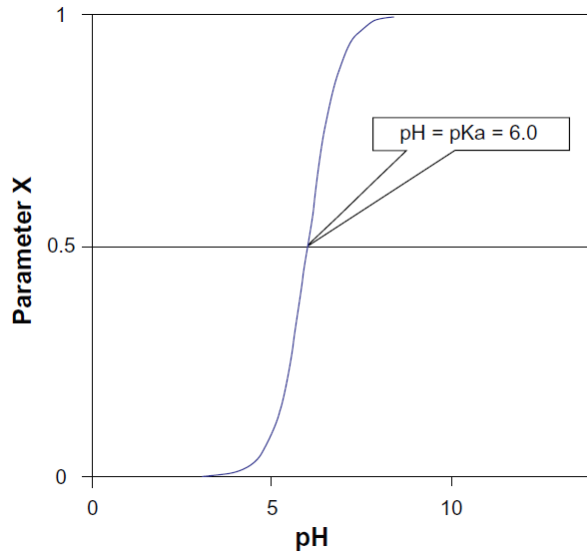
	Amount/conc	Restrictions	pKa range	Costs/time	Precision	T, l and e
Potentiometry	-	+	---	++	+	+
Conductometry	-	++	-	+	+	-
Voltammetry	-	+	+	+	+	+
Calorimetry	-	++	++	+	+	+
NMR	-	-	++	---	++	-
Electrophoresis	++	+	+	+	++	++
HPLC	++	+	-	+	+	+
Solubility	-	-	+	---	+	-
Spectrometry	+	+	+	+	++	++
Fluorimetry	+	-	+	+	---	+
Polarimetry	+	---	+	+	+	+
Kinetic	---	---	-	-	+	+
Computational	++	-	++	-	---	-

**Şekil 1. 7.**  $pK_a$  Tayini İçin Kullanılan Çeşitli Yöntemlerin Kıyaslanması (Xie, Gulnik, Collins, Gustchina, Suvorov ve Erickson, 1997; Barbosa, Barron, Jimenez-Lozano ve Sanz-Nebot, 2001; Manchester, Walkup, Rivin ve You, 2010)

Karakterizasyon için organik mikro-sentezde sadece küçük miktarlar mevcutsa, yöntemlerin çoğu kullanılamaz. Diğer örnek kısıtlamaları arasında, örneğin, üst üste binen  $pK_a$ 'lar, çok düşük çözünürlük, bir kromofor eksikliği, vb. sayılabilir. pH ölçeğinin uç noktalarında ölçüm yapmak bazen imkansızdır. Tüm bunların yanında finansal faktörler de dikkate alınmalıdır. Örneğin yılda sadece birkaç  $pK_a$  değeri belirlemek amacıyla NMR cihazına yatırım yapmak mali açıdan zorlayıcı olabilir.

Elde edilen verilerin kesinliği konusunda, kabaca bir tahmin için ( $\pm 1$  pK birimi) ihtiyaç duyulan tek şey bir yazılım paketidir (Xing, Glen, Clark, 2003; Babic, Horvat, Mutavdzic ve Kastelan-Macan, 2007). Ancak deneyimli kimyagerler bunu çoğu zaman yapısal formülden tahmin edebilirler. Ek olarak, eğer saf analit bir asit ve güçlü bir bazın bir tuzu olarak mevcutsa, her ikisinin de bir 1:1 çözeltisi,  $4 < pH < 10$  aralığında pH'ya eşit bir  $pK_a$ 'ya sahip olacaktır (Reijenga ve diğerleri, 2013).

$pK_a$  değerini belirlemek için birçok deneysel yöntemde pH'nın bir fonksiyonu olarak belli bir parametre ölçülür. Bu sonuçlar Şekil 1.8' de görüldüğü gibi sigmoidal bir eğri verir.



**Şekil 1. 8.** pH'ya Karşı Ölçülmüş Bir Miktarın Çizilmesiyle Oluşturulan Sigmoidal Eğrinin Klasik Bir Örneği (Reijenga ve diğerleri, 2013)

Genel olarak, asidik bileşenler için X, yalnızca ayrılmamış asit çözeltisinin büyük bir kısmının özelliğinden, sadece ayrılmış asidin mevcut olduğu duruma kadar değişir. Eğer burada X parametresi 0 ile 1 arasında değişen ve ayrışma derecesi olan  $\alpha$  olarak düşünülürse, sigmoidal eğrinin orta noktasında  $\alpha = 0.5$  olacak, bu da pH'nın  $pK_a$ 'ya eşit olduğu nokta olacaktır. Asitler için ayrışma derecesi  $\alpha$  olarak eşitlik 8'deki gibi tanımlanmaktadır.

$$\alpha = [A^-]/([HA] + [A^-]) \quad (8)$$

Anyonlar için eşitlik 1 ve 8 birleştirilirse, aşağıdaki Eşitlik 9 elde edilir.

$$pH - pK_a = \log(\alpha/(1 - \alpha)) \quad (9)$$

Bununla birlikte, konsantrasyon çözelti veya  $pK_a$ 'nın pH ölçeğinin uç noktalarına yakın olduğu durumlar için, hidrojen iyonunun tahmini ve gerçek konsantrasyonu arasında önemli farklılıklar olduğu gösterilmiştir (Po ve Senozan, 2001).

Henderson-Hasselbalch denklemi yalnızca sulu çözeltilerdeki seyreltik asitler için doğru sonuçlar verdiği için, asit kuvvetinin ölçümü için başka bir formül Hammett tarafından

geliştirilmiştir (Hammett, 1928). Hammett, çözeltide bulunan türlerin konsantrasyonunu ölçmek yerine, bir asidin gücünü, hidrojen iyon aktivitesi (a) ile çözelti içindeki çeşitli türlerin aktivite katsayıları (f) arasındaki ilişki olarak tanımladı. Ancak, bu modeldeki parametrelerin doğru bir şekilde belirlenmesiyle ilgili zorluktan dolayı, Henderson-Hasselbalch denklemi kadar yaygın kullanılmamaktadır (Reijenga ve diğerleri, 2013).

## **1.8. Kromatografinin Genel Betimi**

Kromatografi, bütün bilim dallarında uygulama alanına sahip güçlü bir ayırma yöntemidir. Kromatografi yirminci yüzyılın başında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından bulunmuş ve onun tarafından isimlendirilmiştir. Tswett bu tekniği, çok ince öğütülmüş toz kalsiyum karbonat doldurulmuş bir cam kolondan bitki pigmentleri çözeltilerini geçirerek klorofil ve ksantofil gibi birçok bitki pigmentini ayırmada kullanmıştır. Ayrılan maddeler kolonda renkli bantlar şeklinde gözüktüğünden, yöntem için kromatografi adını seçmiştir (Yunancada chroma ‘renk’ ve graphein ‘yazı’ anlamına gelmektedir). (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

Kromatografi, kompleks karışımlarda bulunan birbirine yakın özellikteki bileşenleri ayırmak, teşhis etmek ve tayin etmek için kullanılan birçok farklı ve önemli yöntemler grubunu kapsar; bu ayırmaların çoğu başka yöntemlerle mümkün değildir. Bütün kromatografik ayırmalarda numune gaz, sıvı veya bir süperkritik akışkanı halinde bir hareketli fazda çözülür. Bu hareketli faz sonra, bir kolonda veya bir katı yüzeyde sabitleştirilmiş kendisi ile karışmayan bir durgun faz içinden geçmeye zorlanır. Bu faz numune bileşenlerinin hareketli ve durgun fazlarda farklı oranlarda dağılmasını sağlayacak şekilde seçilir. Durgun faz tarafından kuvvetli tutulan numune bileşenleri, hareketli fazın akışıyla çok yavaş hareket ederler. Buna karşılık, durgun faz tarafından zayıf tutulan bileşenler hızlı hareket ederler. Bu hareket hızlarının farklılığı sonucu, numune bileşenleri birbirlerinden nitel ve/veya nicel olarak analizlenebilen farklı bantlar veya bölgeler şeklinde ayrılırlar. (Skoog, Holler, ve Crouch, 2013).

### **1.8.1. Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi (HPLC)**

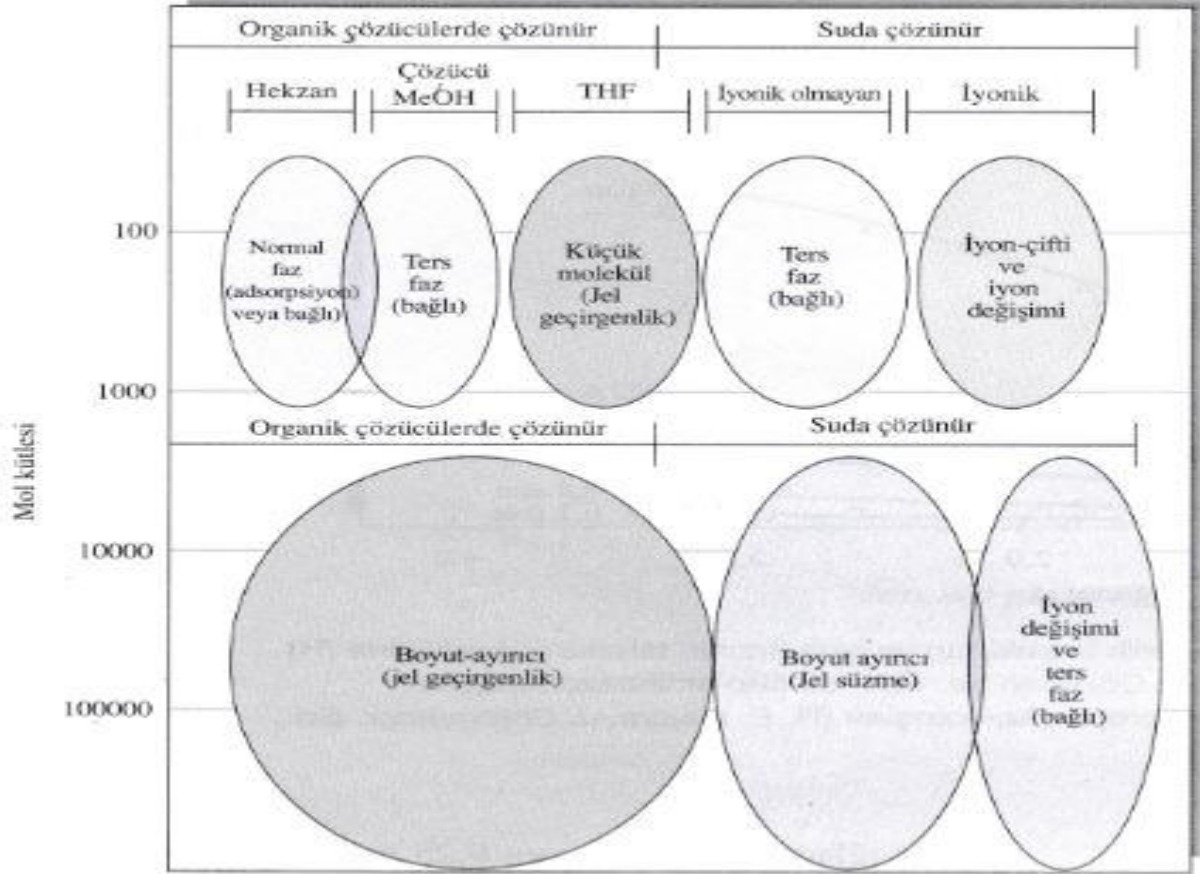
İlk sıvı kromatografi LC uygulamaları, çapı 10-50mm olan cam kolonlarda gerçekleştirilmiş olup bu kolonlar 50-500cm yükseklikte katı taneciklerle doldurulmuştu. Dolgu tanecikleri, durgun fazı oluşturan adsorplanmış bir sıvı ile kaplanmıştı. Uygun akış hızları temin etmek için, katı destek fazı oluşturan taneciklerin çapı, genellikle 150-200 µm aralığında

tutulmuştu. Bu durumda bile, akış hızları düşüktü ve analitin kolondaki ilerleme hızı dakikada milimetrenin birkaç ondalık kesri kadar oluyordu. Bu yüzden, ayırma süreleri çok uzundu ve çoğu zaman bu işlem saatlerce sürüyordu. Bu klasik kromatografi işlemlerini hızlandırmak için vakum veya basınç uygulama girişimleri de pek yararlı olmadı; çünkü akış hızı artınca, teorik tabaka yüksekliği, akış hızı-tabaka yüksekliği eğrisindeki minimum noktasının ötesinde yükseklik artışlarına yol açıyor, sonuçta ayırma verimi düşüyordu. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

Sıvı kromatografinin geliştiği ilk yıllarda, bilim adamları, dolguda kullanılan taneciklerin boyutunun azaltılması ile kolon veriminin, önemli ölçüde artacağını farkettiler. Ancak, tanecik çapı 3-10µm kadarküçük olan dolgu maddelerinin üretim teknolojisinin gelişmesi ve kullanılması 1960'lı yılların sonlarına kadar başarısız oldu. Bu teknoloji, basit cam kolonlardaki klasik yerçekimi-akışlı sıvı kromatografinin aksine, yüksek basınçta çalışan, gelişmiş cihazlara ihtiyaç göstermektedir. Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC) ismi, preparatif amaçla halen kullanılan eski tip yöntemlerden, daha yeni işlemleri ayırtmak için kullanılmaktadır. Günümüzde LC uygulamalarının hemen hemen hepsi basınç altında akış kullanır ve genelde LC ile HPLC aynı anlama gelir. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

### **1.8.2. HPLC'nin Uygulama Alanı**

LC bütün analitik ayırma yöntemleri arasında yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının başlıca sebepleri, duyarlılığı, doğru nicel tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, otomasyon kolaylığı uçucu olmayan veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olması ve hepsinden de önemlisi endüstriyi, birçok bilim dalını ve halkı yakından ilgilendiren maddelere örnek olarak; amino asitler, proteinler, nükleik asitler, hidrokarbonlar, karbonhidratlar, ilaçlar, terpenoitler, pestisitler, antibiyotikler, steroidler, metal organik türler ve çeşitli anorganik bileşikler sayılabilir. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

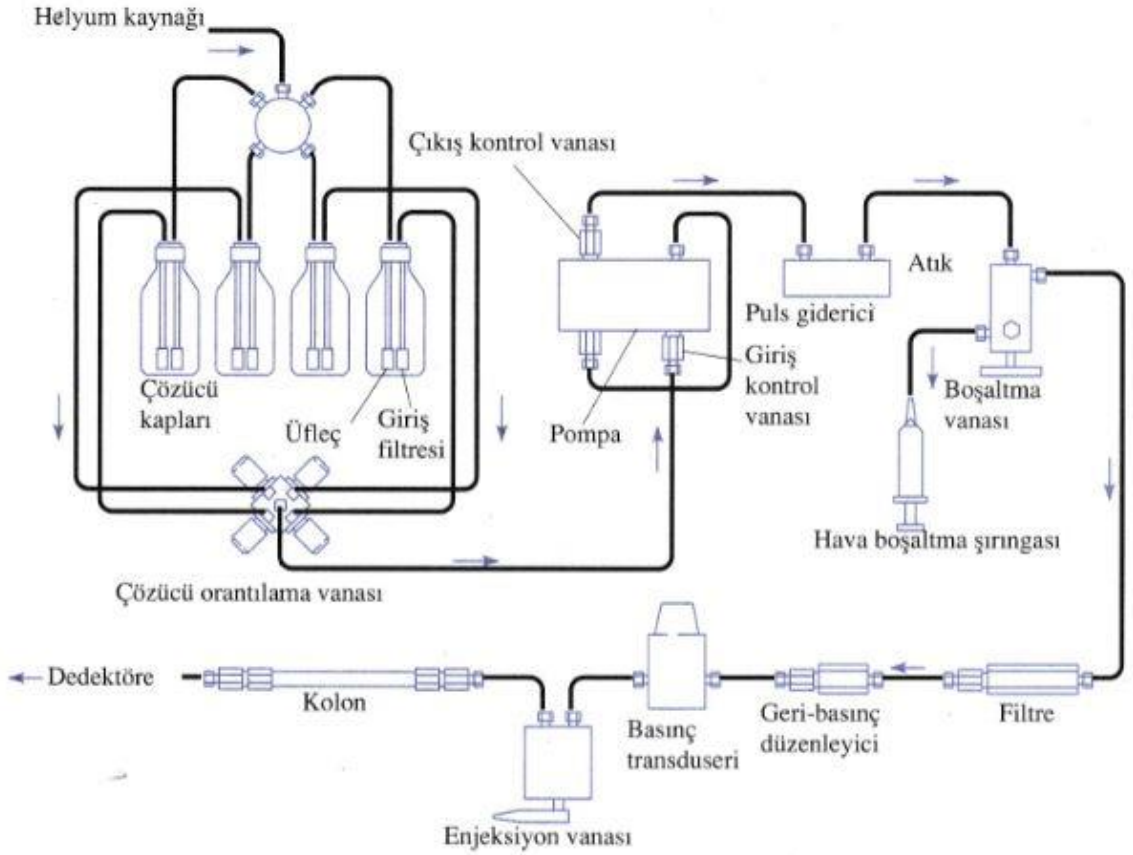


Şekil 1. 9. LC Tipinin Seçimi

### 1.8.3. HPLC Cihazları

Modern HPLC'lerde 3-10  $\mu\text{m}$ 'lik dolgu maddeleriyle doldurulmuş kolonlarda normal bir akış hızı elde etmek için, birkaç yüz atmosferlik basınç uygulanması gerekir. Bu yüksek basınç uygulaması nedeniyle, hplc için donanım, diğer kromatografi donanımlarına göre, daha pahalı ve daha karmaşıktır. Şekil 1.10'da bir HPLC cihazının önemli bileşenleri şematik olarak gösterilmiştir. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).





**Şekil 1. 10.** Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi Cihazının Şematik Görünüşü

Sıvı kromatografik pompaları için gerekli özellikleri şu şekilde sıralayabiliriz;

- ✓ 400 atm kadar basınç üretimi
- ✓ Vuruntusuz basınç çıkışı
- ✓ 0,10mL/dakika aralığında akış hızları
- ✓ %0,5 veya daha iyi bir bağıl akış tekrarlanabilirliği
- ✓ Çeşitli çözücülere karşı korozyon dayanıklılığı.

Sıvılar çok fazla sıkıştırılmadığından HPLC pompaları tarafından üretilen basıncın bir patlama tehlikesi oluşturmadığına da dikkat edilmelidir. Böylece bileşenlerin birbirinde oluşabilecek bir çatlak, sadece çözücü kaçağı ile sonuçlanacaktır. Tabii ki böyle kaçaklar bir yangın tehlikesine veya çözücünün çevreye zarar vermesine neden olabilir. LC de kullanılan başlıca iki tip pompa vardır. Bunlardan birincisi pistonlu pompalar ikincisi ise vida güdümlü sürgülü pompalardır. Modern ticari kromatogramların hemen hemen hepsinde pistonlu pompalar kullanılır. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

Sıvı kromatografi de kolonların genelde, iç çapı homojen olup paslanmaz çelik borulardan yapılır. Kimi hallerde, kalın duvarlı cam borulardan ve polietereketon (PEEK) gibi

polimer borulardan da HPLC kolonları yapılabilir. Ayrıca, içine cam veya PEEK astarlar kaplı çelik kolonlar da vardır. Boyutları ve iç dolgusu bakımından farklılık gösteren yüzlerce tip hazır kolon bulmak mümkündür. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

Sıvı kromatografik yöntem için ideal bir dedektör seçimi de oldukça önemlidir. HPLC için ideal bir dedektör; (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

- ✓ Yeterli duyarlılıkta olmalıdır. Yeterli duyarlık nicel terimlerle tam olarak tanımlanamaz. Genel olarak günümüzde kullanılan dedektörlerin duyarlılıkları  $10^{-10}$ - $10^{-15}$  g madde/s arasında değişmektedir.
- ✓ İyi bir kararlılık ve tekrarlanabilirliğe sahip olmalıdır.
- ✓ Geniş bir doğrusal çalışma aralığı; tercihen üst ve alt sınırlar oranı  $10^4$  veya daha büyük olmalıdır.
- ✓ Akış hızından bağımsız kısa bir sürede cevap vermelidir.
- ✓ Dedektör deneyimsiz operatörler tarafından kullanılırken olabildiğince az hata vermeli ve kullanımı kolay, güvenilirliği yüksek olmalıdır.
- ✓ Her türden analit için benzer cevaplar alınmalıdır. Veya belirli sınıf maddelere karşı tahmini kolay ve seçici cevap verme özelliğine sahip olmalıdır.
- ✓ Dedektör numuneyi parçalamamalıdır.
- ✓ Bir HPLC dektörü, bant genişlemesini azaltmak için minimum iç hacimde olmalı ve sıvı akışı ile uyum sağlayabilmelidir.

Ancak şunu da belirtmek gerekir ki, hiçbir dedektör bu şartların tamamını aynı anda sağlamaz. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

Sıvı kromatografide dedektörleri temel olarak iki tipdir. Yığın özelliği dedektörleri ve analit özelliği dedektörleri olarak sınıflandırılırlar. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

## **1.9. HPLC Yönteminde Kullanılan Temel Parametreler**

### **1.9.1. Alıkonma Süresi**

Alıkonma süresini anlayabilmek için, iki pikten oluşan basit bir kromatogramı gösteren Şekil 1.11' e bakalım. Soldaki küçük pik kolonda hiç alıkonmayan bir türe aittir. Çoğu zaman, numunede veya hareketli fazda alıkonmayan bir tür bir bulunur. Böyle bir tür yoksa, piklerin teşhisinde yardımcı olması için gerekli süre  $t_M$ ' ye ölü süre veya boş süre denir. Ölü süre, hareketli fazın otalama göç hızının bir ölçüsüdür ve analit piklerinin tanınmasında önemli bir parametredir. Bütün bileşenlerin hareketli fazda geçirdikleri bu süre  $t_M$  kadardır. Şekil 1.11' de

sağdaki büyük pik bir analit türe ait olup bu bandın numune uygulama anından detektöre ulaşma anına kadar geçen süreye ‘‘alınma süresi ( $t_R$ )’’ denir. Analit alınmaktadır; çünkü, durgun fazda tutunarak geçirdiği fazlardan bir  $t_S$  süresi vardır. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

O halde alınma süresi;

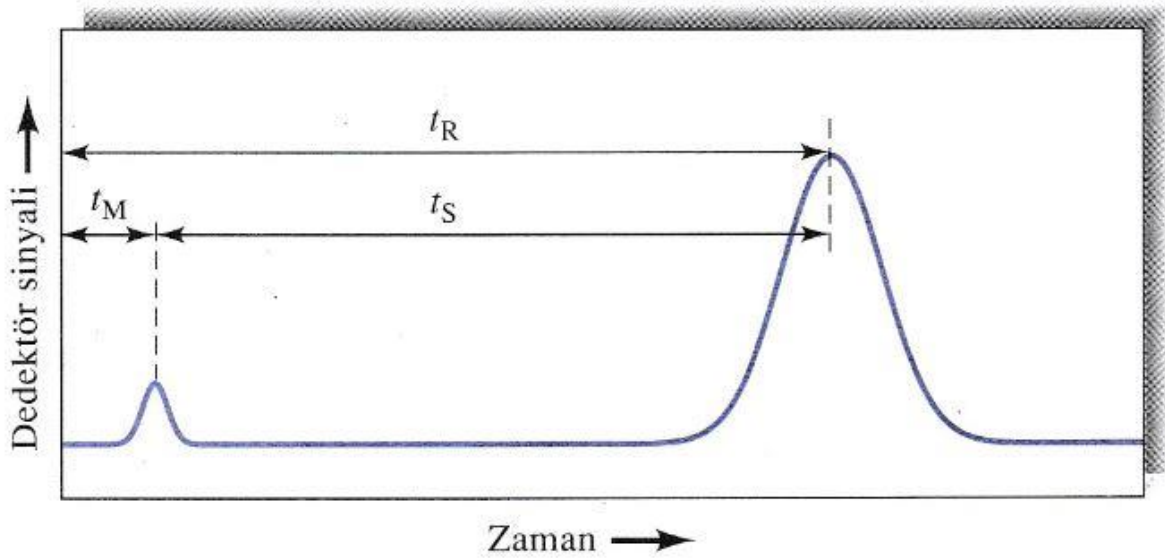
$$T_R = t_S + t_M \quad (10)$$

İle verilir. Çözünmüş türün kolon boyunca ortalama doğrusal göç hızı,

$$\bar{v} = \frac{L}{t_R} \quad (11)$$

burada  $L$ , kolon dolgusunun uzunluğudur. Benzer şekilde, hareketli faz moleküllerinin ortalama doğrusal hızı  $v$ , aşağıda ki eşitlikle verilir. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

$$v = \frac{L}{t_M} \quad (12)$$



Şekil 1. 11. İki Bileşenli Bir Karışım İçin Tipik Bir Kromatogram

$F$ , kolon çıkışındaki doğrusal akış hızı  $v_0$  ile aşağıdaki gibi ilişkilendirilebilir.

$$F = v_0 A = v_0 \times \pi r^2 \quad (13)$$

Burada  $A$ , borunun dik kesit alanıdır ( $\pi r^2$ ). Dolgulu bir kolonda kolon hacminin tamamına sıvı dolamayacağı için Eşitlik 13 aşağıdaki gibi yazılmalıdır:

$$F = \pi r^2 v_0 \varepsilon \quad (14)$$

Burada  $\varepsilon$ , sıvı tarafından kullanılabilir kolon hacminin toplam (gözenekler dahil) kesridir. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

### 1.9.2. Bileşenlerin Göç Hızları: Alıkonma Faktörü- Kapasite Faktörü

Alıkonma faktörü  $k$ , analitlerin kolondaki göç hızlarını karşılaştırmada çok işe yarayan önemli bir deneysel büyüklüktür.  $k$ 'nın böylesine faydalı olmasının sebebi, kolon geometrisinden ve hacimsel akış hızından bağımsız olmasıdır. Bu, numune bileşenleri, hareketli faz ve durgun faz belli olduğu sürece, kolon geometrisi ve hareketli faz akış hızı ne olursa olsun aynı alıkonma faktörü elde edilecek demektir. Numunedeki  $A$  bileşeni için  $k_A$  faktörü aşağıdaki gibi tanımlanır. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

$$k_A = K_A \frac{V_S}{V_M} \quad (15)$$

Burada  $K_A$ ,  $A$  türü için dağılım sabitidir.

$V_S$  ; Durgun faz hacmi

$V_M$  ; Faz hacmidir.

$k_A$ 'nın bir kromatogramdan nasıl türetilbileceğini göstermek için, eşitlikler yeniden düzenlenir.

(Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

$$\frac{L}{t_R} = \frac{L}{t_M} \times \frac{1}{1+k_A} \quad (16)$$

Bu eşitlik tekrar düzenlenecek olursa:

$$K_A = \frac{t_R - t_M}{t_M} \quad (17)$$

Elde edilir. Kimi zaman analitin durgun fazda geçirdiği süre, yani  $t_R - t_M$  farkı, düzeltilmiş alıkonma süresi adını alır ve  $t_R$  ile gösterilir. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

Şekil 1.11’de gösterildiği gibi,  $t_R$  ve  $t_M$  bir kromatogramdan kolaylıkla elde edilebilir. Sonra bu büyüklükler ve Eşitlik 17 kullanılarak alıkonma faktörünün birden çok küçük olması, bu türün ölü süreye çok yakın bir anda kolondan çıkması demektir. Alıkonma faktörü 20-30’dan büyük olduğunda, elüsyon süresi çok uzun olur. İdealde, ayırmalar bir karışımdaki çözünenlerin alıkonma faktörlerinin 1-10 arasında olduğu koşullarda yapılır. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

### 1.9.3. Bağlı Göç Hızları: Seçicilik Faktörü- Seçicilik Katsayısı

Bir kolonun A ve B gibi iki tür için seçicilik faktörü ( $a$ ) aşağıdaki gibi tanımlanır:

$$a = \frac{K_B}{K_A} \quad (18)$$

Bu eşitlikte  $K_B$  daha kuvvetli tutulan B türü için dağılma sabiti;  $K_A$  ise, daha zayıf tutulan veya daha hızlı elue edilen A türü için dağılma sabitidir. Bu tanıma göre  $a$  daima birden büyüktür. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

Eşitlik 15’in ve B türü için yazılmış benzer eşitliğin, Eşitlik 18’de yerine konması ve yeniden düzenlenmesi ile, iki çözünen tür için seçicilik faktörü ve bu türlerin alıkonma faktörleri arasında aşağıdaki bağıntı elde edilir. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

$$a = \frac{k_B}{k_A} \quad (19)$$

Burada  $k_A$  ve  $k_B$  sırasıyla B ve A türleri için alıkonma faktörleridir. İki tür için ayrı ayrı yazılan Eşitlik 17’nin Eşitlik 19’da yerine konması,  $a$ ’nın deneysel kromatogramdan elde edilmesini mümkün kılan bir bağıntı verir. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

$$a = \frac{(t_R)_B - t_M}{(t_A)_M} \quad (20)$$

#### 1.9.4. Kolon Veriminin Nicel Betimi-Teorik Tabaka Sayısı

Kromatografik kolon veriminin nicel bir ölçüsü olarak, birbiri ile ilgili iki terim yaygın biçimde kullanılır. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

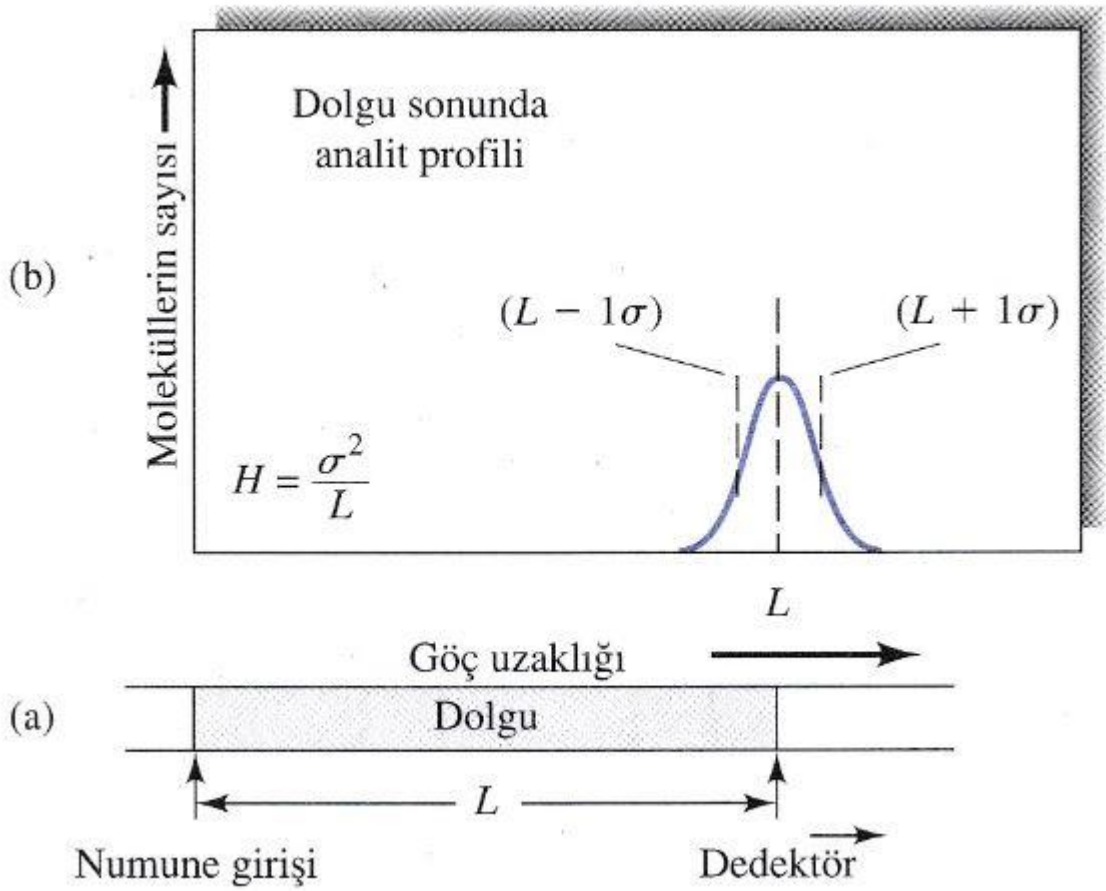
- (1) Tabaka yüksekliği (H),
- (2) Tabaka sayısı veya teorik tabaka sayısı (N).

Bu iki terim arasında aşağıdaki gibi bir bağıntı vardır:

$$N = \frac{L}{H} \quad (21)$$

Bu eşitlikte L, kolon dolgusunun uzunluğudur (çoğu zaman santimetre olarak). Kromatografik kolonların verimi tabaka sayısı N arttıkça ve tabaka yüksekliği H azaldıkça artar. Kolon tipine, durgun ve hareketli fazların cinslerine bağlı olarak kolonların veriminde büyük ölçüde farklılıklar ortaya çıkar. Tabaka sayısı cinsinden kolon verimi birkaç yüz ile yüzbinler arasında değişir; tabaka yüksekliği ise, santimetrenin onda birleri ile binde birleri veya daha da düşük değerler arasında değişir. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S.R., (2013). Enstrümantal Analiz İlkeleri. Ankara: Bilim Yayınevi.

“Tabaka yüksekliği” ve Teorik Tabaka Sayısı” terimleri ilk kez, Martin ve Syngé’in öncü teorik incelemesinde kullanılmıştır. Bu incelemede, kromatografik kolon teorik tabaka olarak adlandırılan, birbirini izleyen, fakat ayrı, ince tabakalardan oluşmuş bir damıtma kolonuna benzetilmiştir. Her bir tabakada, çözünenin durgun ve hareketli fazlar arasında dengeye ulaştığı kabul edilir. Çözünen türün kolon boyunca hareketi, dengedeki hareketli fazın bir tabakadan diğerine kademeli şekilde aktarımı olarak ele alınmıştır. Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S.R., (2013). Enstrümantal Analiz İlkeleri. Ankara: Bilim Yayınevi.

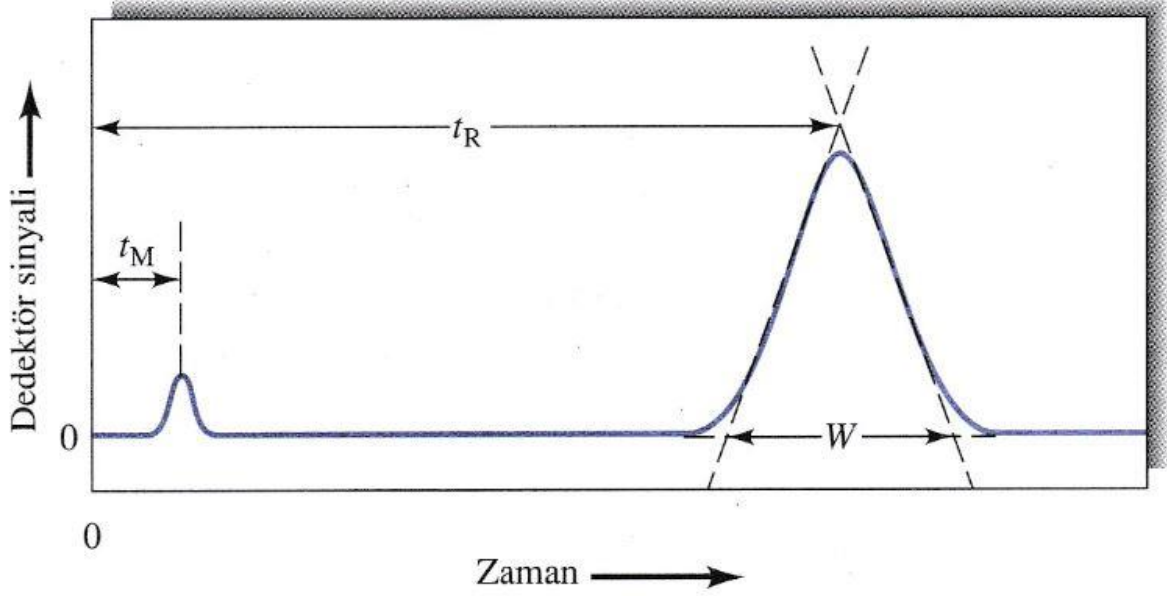


Şekil 1. 12.  $H = \frac{\sigma^2}{L}$  Şeklinde Verilen Tabaka Yüksekliğinin Tanımı

Tabaka teorisi, kromatografik piklerin Gauss eğrisi şeklinde oluşumu ve kolonda ilerleyişini başarılı bir şekilde açıklamaktadır. Bu teori, pik genişlemesini bir mekanizma ile açıklayamadığı için, tamamen terkedilmiş ve yerine hız teorisi gelmiştir. Genelde, kolon verimi ile ilgili orijinal terimler hız teorisinde de kullanılmaktadır. Bu terimler bir bakıma şanssızlık sayılır; çünkü, bu terimler kullanılınca bir kolonda tabakaların olduğu ve hep ardışık dengeler kurulduğu yanılgısı doğmaktadır. Gerçekte, sürekli hareket halindeki hareketli fazda denge durumuna hiçbir zaman ulaşılmaz. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

(1) Tabaka Yüksekliğinin Tanımı (H):

Bir Gauss eğrisinin genişliği, ölçümlerin standart sapması  $\sigma$  veya varyansı  $\sigma^2$  ile doğrudan ilgilidir.



**Şekil 1. 13.** Tabaka Sayısının Tayini

Kromatografik bantların genellikle Gauss tipi olduğu kabul edildiğinden, bir kolonun verimini kolonun birim uzunluğu başına varyans cinsinden tanımlamak uygun olmaktadır. Bu durumda tabaka yüksekliği

$$H = \frac{\sigma^2}{L} \quad (22)$$

şeklinde verilir.(Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

(2) H ve N'nin Deneysel Bulunuşu:

Şekil 1.13, zamanın yatay eksen olarak alındığı tipik bir kromatogramı gösterir. Basit bir grafik işlemi ile elde edilebilen çözünen madde pikinin varyansı, genellikle saniye kare birimine sahiptir ve santimetre kare birimine sahip  $\sigma^2$ 'den ayırt etmek için genellikle  $\mathcal{J}^2$  ile gösterilir.  $\mathcal{J}$  ve  $\sigma$  standart sapmaları arasında

$$\mathcal{J} = \frac{\sigma}{L/t_R} \quad (23)$$

bağıntısı vardır. Bu bağıntıdaki  $L/t_R$ , saniyede santimetre cinsinden çözünen ortalama doğrusal hızı  $\bar{v}$ 'dir. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).



Şekil 1.13, deneysel bir kromatogramdan  $\tau$  ve  $\sigma$ 'nın yaklaşık bulunuşu ile ilgili bir yöntemi göstermektedir. Kromatografik pikin iki kenarına çizilen teğetler uzatılıp kromatogramın taban çizgisi kestirilerek bir üçgen oluşturulur. Bu üçgenin alanının toplam pik alanının %96'sı kadar olduğu gösterilebilir. Şekil 1.13'de gösterilen kesişme notaları, pik maksimumundan yaklaşık  $\pm 2\tau$  uzaklığındadır; üçgenin taban genişliği olan  $w$  ise,  $w = 4\tau$ 'dur. Bu eşitlik 23'de yerine konup yeniden düzenlenirse, aşağıdaki eşitlik elde edilir. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

$$\sigma = \frac{LW}{4t_R} \quad (24)$$

Bu eşitlikteki  $\sigma$ , Eşitlik 22'de yerine konursa, aşağıdaki bağıntı bulunur:

$$H = \frac{LW^2}{16t_R^2} \quad (25)$$

$N$ 'i elde etmek için bu eşitlik Eşitlik 21'de yerine konur:

$$N = 16 \left( \frac{t_R}{W} \right)^2 \quad (26)$$

Böylece  $N$ , iki süre ( $t_R$  ve  $W$ ) ölçümü ile hesaplanabilir;  $H$ 'yi hesaplayabilmek için kolon dolgu uzunluğu ( $L$ ) da bilinmelidir. Bu hesaplamaların mutlak değil yaklaşık olduğu ve piklerin Gauss tipi varsayıldığı unutulmamalıdır. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

Bazı araştırmacıların daha güvenilir sonuç verdiği inandığı diğer bir yaklaşık  $N$  değeri hesaplama yolunda ise,  $W_{1/2}$ 'nin yani, pik yüksekliğinin yarısındaki pik genişliğinin tayine gerekmektedir. Tabaka sayısı aşağıdaki gibi verilir. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

$$N = 5,54 \left( \frac{t_R}{W_{1/2}} \right)^2 \quad (27)$$

$H$  ve  $N$  parametrelerinin deneysel tayini, piklerin Gauss tipinde olduğu varsayımına dayandığı için, verilen bütün hesaplamalardan yaklaşık değerler elde edilir. Gauss tipinden sapmış pikler durumunda daha doğru sonuçlar veren yöntemler literatürde bulunabilir. Bu

yöntemler, piklerin varyansını istatistikteki ikinci-an hesaplamaları ile bulma esasına dayanır. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

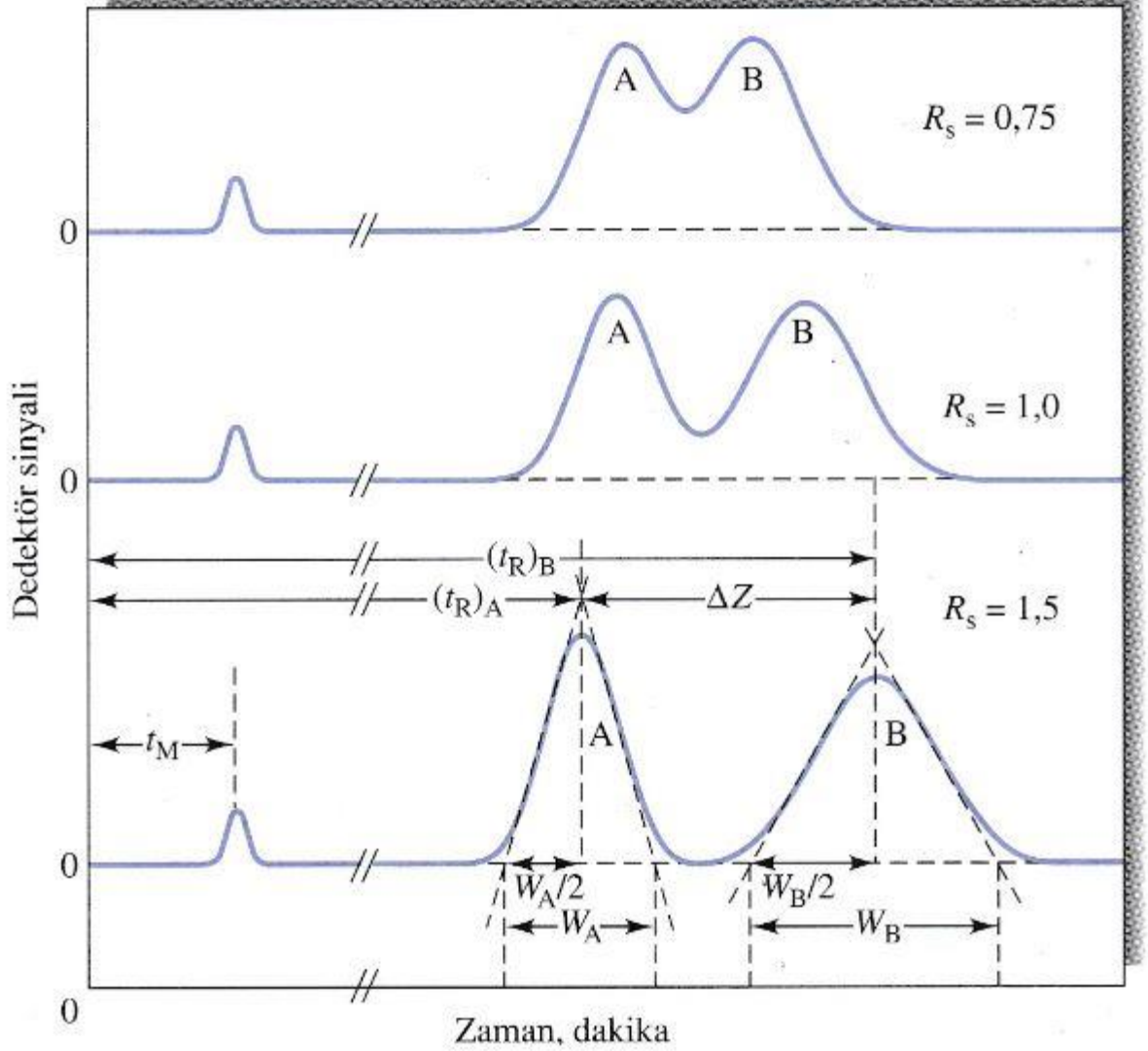
Tabaka sayısı N ve tabaka yüksekliği H literatürde ve cihaz üreticileri tarafından yaygın şekilde kullanılmaktadır. Farklı kolonların ayırma güçlerini ve verimlerini karşılaştırmada bu parametreler çok yararlı olabilir. Ancak, bu sayıların iki kolonu kıyaslamada kullanılmasının anlamlı olabilmesi için aynı bileşik ile tayin edilmiş gerekir. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

### 1.9.5. Kolonun Ayırma Gücü

Bir kolonun ayırma gücü  $R_s$ , iki bant arasındaki uzaklığın, bant genişliği cinsinden değeri demektir. Ayırma gücü, bir kolonun iki analiti ayırma yetisinin nicel bir ölçüsüdür. Şekil 1.14'de, bu terimin önemi gösterilmektedir. Burada farklı ayırma güçlerine sahip üç kolonda A ve B türlerinin kromatogramları görülmektedir. Her kolonun ayırma gücü aşağıdaki gibi verilebilir. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

$$R_s = \frac{\Delta Z}{\frac{W_A + W_B}{2}} = \frac{2\Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2[(t_R)_B - (t_R)_A]}{W_A + W_B} \quad (28)$$

Bu eşitlikte yer alan bütün terimlerin anlamları Şekil 1.14'de açıklandığı gibidir.



**Şekil 1. 14.** Üç Ayırma Gücündeki Kromatogramlar

Şekil 1.14'de görüldüğü gibi, ayırma gücü 1,5 olduğunda iki bileşenin ayrılması yaklaşık olarak tam sağlandığı halde, 0,75'lik ayırma gücü ile sağlanmaz. Ayırma gücü ile sağlanamaz. Ayırma gücü 1,0 olduğunda ise, A bölgesi yaklaşık %4 B ve B bölgesi de benzer miktarda A içerir. Ayırma gücü 1,5 iken, üst üste örtüşme yaklaşık %0,3' tür. Belli bir durgun faz için ayırma gücü kolon uzunluğunu, böylece tabaka sayısını artırarak iyileştirilebilir. Ancak, ilave teorik tabakaların bileşenlerin ayrılması için gerekli olan süreyi artırma gibi olumsuz bir etkisi vardır. (Skoog, Holler ve Crouch, 2013).

## 1.10. HPLC Yönteminde Su Ortamındaki pK<sub>a</sub> Değerlerinin Belirlenmesi

İyonlaşma sabiti ya da pK<sub>a</sub> belirleme yöntemlerinin en büyük kısıtlamalarından biri bileşiğin suda çözünürlüğünün az olmasıdır. Bu sebeple iyonlaşmadan dolayı pH'daki farklılıkların ölçülmesi zordur. Suda çözünürlüğün çok düşük olduğu durumlarda su-organik çözücü karışımı kullanılarak çözünürlük artırılabilir (Takacs-Novak, Box ve Avdeff, 1997). Çözeltiliye organik çözücü ilave edilmesi çözücünün polaritesini değiştirir bu da aynı zamanda ayrışmayı ve pK<sub>a</sub> değerini etkiler. Bu ortamlardaki pK<sub>a</sub> değerlerinden sudaki pK<sub>a</sub> değerine geçiş için birçok metot mevcuttur ancak bu tez çalışması kapsamında Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemi kullanılacaktır (Yasuda, 1959; Shedlovsky, 1962).

### 1.10.1. Yasuda-Shedlovsky Yöntemi

Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemi ile farklı su-organik çözücü konsantrasyonlarında elde edilen pK<sub>a</sub> ( ${}^s pK_a$ ) değerlerinden sudaki pK<sub>a</sub> değeri ( ${}^w pK_a$ ) elde edilebilir. Bunun için kullanılan eşitlik aşağıda verilmiştir:

$${}^s pK_a + \log[H_2O] = a_\varepsilon \varepsilon^{-1} + b_\varepsilon \quad (29)$$

${}^s pK_a$ : Mobil fazın pK<sub>a</sub> değeri

$\varepsilon$  : Su-organik çözücü ikili karışımındaki organik çözücünün dielektrik sabiti

$a_\varepsilon$  : Doğrusal eşitlikten elde edilmiş eğim değeri

$b_\varepsilon$  : Doğrusal eşitlikten elde edilmiş kesim değeri

Eşitlik 29 kullanılarak suda çözünmeyen bileşiklerin sudaki pK<sub>a</sub> değeri ( ${}^w pK_a$ ) doğru olarak hesaplanabilir.

### 1.10.2. Mol Kesri-pK<sub>a</sub> Yöntemi

Bu yöntemde mobil fazdaki organik çözücünün hacimce kesrine karşılık mol kesri değerinin bilinmesi gerekir. (Çizelge 1.5, Çizelge 1.6, Çizelge 1.7) (Roses ve Bosch, 2002). Mobil fazdaki organik çözücünün mol kesrine karşı, mobil fazdaki pK<sub>a</sub> ( ${}^s pK_a$ ) değerleri grafiğe geçirilerek lineer bir doğru elde edilir. Lineer doğrudan elde edilen fonksiyonun kesim noktası analitin sudaki pK<sub>a</sub> değerini verir.

**Çizelge 1. 3.** 25°C'Demetanol-Su İkili Karışımı İçin Bazı Makroskopik Veriler Metanol-Su İkili

%MeOH(h/h)	Mol Kesri ( $X_{MeOH}$ )	Yoğunluk ( $kg\ dm^{-3}$ )	$pK_{su}$
0	0,000	0,995	14,00
10	0,047	0,983	14,08
20	0,100	0,969	14,08
30	0,160	0,955	14,07
40	0,229	0,939	14,09
50	0,308	0,921	14,14
60	0,400	0,901	14,23
70	0,509	0,878	14,39
80	0,640	0,852	14,63
90	0,800	0,822	15,04
100	1,000	0,787	16,77

**Çizelge 1. 4.** 25 °C'de Asetonitril-Su İkili Karışımı İçin Bazı Makroskopik Veriler

%ACN (h/h)	Mol Kesri ( $X_{ACN}$ )	Yoğunluk ( $kg\ dm^{-3}$ )	$pK_{su}$
0	0,000	0,995	14,00
10	0,040	0,983	14,24
20	0,079	0,968	14,47
30	0,130	0,950	14,74
40	0,186	0,931	15,08
5	0,260	0,908	15,48
60	0,339	0,885	15,90
70	0,440	0,859	16,42
80	0,578	0,829	17,14
90	0,755	0,802	17,13
100	1,000	0,782	34,40

**Çizelge 1. 5.** 25 °C'de Tetrahidrofur-Su İkili Karışımı İçin Bazı Makroskopik Veriler

% THF (h/h)	Mol Kesri ( $X_{THF}$ )	Yoğunluk ( $kg\ dm^{-3}$ )	$pK_{su}$
0	0,000	0,991	14,00
10	0,024	0,993	14,12
20	0,053	0,989	14,31
30	0,087	0,983	14,52
40	0,129	0,974	14,79
50	0,182	0,964	15,13
60	0,250	0,950	15,56
70	0,342	0,937	16,14
80	0,471	0,921	-
90	0,667	0,903	-
100	1,000	0,882	34,7

## 1.11. Önceki Çalışmalar

Bu tez kapsamında çalışılmış olan Loratadin ve Desloratadin ile ilgili yapılan çalışmalar genel anlamda 2 grupta değerlendirilebilir.

- 1) Fizikokimyasal parametrelerin tayini
- 2) İlaç preparatlarında, biyolojik sıvılarda kromatografik metotlarla nitel ve nicel tayini

### 1.11.1. Fizikokimyasal Parametrelerin Tayini

Çözünürlük, dağılma katsayısı, iyonlaşma sabiti tayini gibi fizikokimyasal parametreleri içeren çalışmaları kapsar. Bu bileşiklerin asit baz davranışlarını ve suda çözünürlüklerini inceleyen çalışmalar biyokimyasal farmakoloji açısından önemlidir. Bunun yanında pH'nın bir fonksiyonu olarak türlerin dağılma katsayısı ilaç analizlerinde optimum koşulun seçilmesi açısından oldukça önemlidir.

Loratadin ve desloratadin'in homojen ve heterojen ortamlarda asit-baz dengelerini spektrofotometrik olarak incelemişlerdir. Loratadin için  $pK_a$  değeri 5.25; desloratadin için  $pK_{a1}$  4.41 ve  $pK_{a2}$  değeri 9.97 olduğunu bulmuştur. Loratadin ve desloratadin'in spesifik çözünürlük değerleri sırasıyla  $8.65 \times 10^{-6}$  M ve  $3.82 \times 10^{-4}$  M'dir. Bu bileşikler suda az çözünen bazik yapıli bileşikler oldukları için çözünürlükleri pH'nın bir fonksiyonu olarak ölçülmüş ve çözünürlüklerin artırılmasında anyonik katyonik ve iyonik olmayan yüzey aktif maddeler kullanılmıştır. Sonuçlar, misel ortamında suda elde edilen değerlerle karşılaştırıldığında  $pK_a$  değerlerinde kayma olduğu ortaya çıkmıştır. Bu kaymalar ( $pK_a$ ) -2.24 ile + 1.24 arasında değişmektedir (Popovic, Cakar ve Agbaba, 2009).

Loratadin ikinci nesil trisiklik bir antihistamin olup çözünürlüğü pH'ya bağlı olarak değişmektedir. pH'nın artmasıyla loratadinin çözünürlüğü azalmaktadır. Bu yüzden oral kullanımında biyoaktivitesi farklılık gösterir ve bu da dezavantajlı bir durumdur. Bu sorunları çözmek için loratadinin miseller ortamında siklodekstrin türevleri ile kompleksleri oluşturularak sudaki çözünürlüğü arttırılmaya çalışılmıştır (Soovali, Rodima, KAljurand, Kütt, Koppel ve Leito, 2006; Nacsa, Ambrus, Berkesi, Szabo-Revesz ve Aigmer, 2008).

Loratadin ve Desloratadin bileşiklerinin partisyon ve dağılma katsayısı dodekan/su ortamında potansiyometrik yöntem ile çalışılmış, ayrıca potansiyometrik yöntem ile loratadinin  $pK_a$  değeri 4.58, desloratadinin ise 8.65 olarak hesaplanmıştır ( Ter-Laak, Tsai, Kelder, Carrupt, Testa ve Timmerman, 1994).

### **1.11.2. İlaç Preparatlarında, Biyolojik Sıvılarda Kromatografik Metotlarla Nitel ve Nicel Tayini**

Bu başlık altında düşünülebilecek çalışmalar fizikokimyasal parametrelerinin tayini çalışmalarından daha fazladır. Çalışmalar genellikle insan plazmasında ve ilaç preparatlarında uygulanmıştır.

İnsan plazmasında loratadin ve onun aktif metaboliti olan desloratadinin eş zamanlı olarak belirlenebilmesi için despiraminin iç standart olarak kullanıldığı LC-MS-ESI metodu geliştirmişlerdir. Desloratadin, pH 7.0 (70:30 v / v) bir metanol-fosfat tamponu karışımı mobil faz olarak kullanılarak Inertsil ODS-3 V kolonu (250 mm uzunluk, 4.6 mm id, 5 um parçacık boyutu) üzerinde değerlendirilmiştir. Dakikada 1.0 mL'lik bir akış hızıyla, 254 nm'de UV dedektörü ile çalışmışlardır. Geliştirilip kullanılan bu yöntem, Uluslararası Uyumlaştırma Konferansı (ICH) kurallarına göre de onaylanmıştır. Önerilen yöntem başarılı bir şekilde uygulanmıştır. Ekonomide ve zamanın önemli olduğu için farmasötik formülasyonlarda DLT'nin kantitatif analizi için önerilen bir yöntem olmuştur (Patel, Sharma, Sanyal, Sanyal ve Shrivastav, 2010).

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi tandem kütle spektrometresi (HTLC-MS / MS) ile plazmada ilaçların ve bu ilaçların metabolitlerinin yüksek verimli bir şekilde ölçülmesi için bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemin insan plazmasındaki loratadin ve desloratadinin aynı anda değerlendirilebilmesi için güvenilir bir çalışma olduğunu göstermişlerdir. Yöntemin doğruluk, hassaslık, doğruluk ve istikrar bakımından iyi performans gösterdiği kanıtlanmıştır. Bu yöntemle örnek işleme verimliliğinde belirgin bir iyileşme sağlanmış ve önerilen yöntem farmakokinetik ve biyoeşdeğerlik çalışmaları için faydalı olmuştur (Srinubabu, Patel, Shedbalkar, Rao, Rao ve Bandaru, 2007).

Loratadin, desloratadin ve setirizini kapiler bölge elektroforez ile aynı anda belirlemişlerdir. Bu çalışmanın yapılmasındaki amaç sık kullanılan antihistamin türevlerinin saptanması için daha basit ve hızlı bir analitik metot geliştirmektir. Sonuç olarak tampon bileşimi, tampon pH'sı, voltaj, sıcaklık, basınç enjeksiyonu, zaman, maksimum çözünürlük ve minimum analiz süresi kriterleri altında deney parametrelerini göz önüne alarak ayırma koşullarının optimizasyonu üzerine yoğunlaşmıştır. Önerilen bu yöntem ise ICH klavuzlarına göre doğrulanmıştır. Kullanmış oldukları bu yöntemin, rutin analizlerde kullanımı için tüm değerlerinin yeterince iyi olduğunu kanıtlamışlardır. Yöntemin sağlam, hassas, basit ve spesifik olmasının yanısıra, farmasötik maddelerden ve biyolojik örneklerden alınan antihistaminlerin

pratik olarak belirlenmesi için de oldukça uygun olduğu yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Hancu, Campian, Rusu, Mircia ve Kelemen, 2014).

İnsan plazmasında loratadin (LOR) ve aktif metabolit deskarboetoksiloratadin (DSL) miktarının tespiti için kütle spektrometresi (LC / MS / MS) ile birleştirilmiş yeni hassas ve seçici bir sıvı kromatografi yöntemi geliştirmişlerdir ve geliştirmiş oldukları bu yöntem doğrulanmıştır. Sonuç olarak önerilen bu yöntem, 40 mg loratadinin oral yoldan verilmesinden sonra insan plazmasındaki loratadin ve desloratadinin kantitatif tayininde doğruluk ve hassaslık sağlamıştır. Protein çöktürmesi ve seçilen izleme sinyalleriyle yapılan basit örnek hazırlama, çok sayıda plazma örneğinin spesifik ve verimli bir şekilde analiz edilmesini sağlamıştır. Ayrıca bu durum metodun daha üretken hale gelmesini ve böylece daha uygun maliyetli olup kullanılabilirliğini de arttırmıştır (Vlase, Imre, Muntean ve Leucuta, 2007).

İlaç maddesi ve farmasötik preparatlarda desloratadinin belirlenmesi için basit ve seçici bir LC yöntemi geliştirmişlerdir. Geliştirilen bu yöntem seçicilik, doğrusalılık, nicelik sınırı, hassasiyet, doğruluk ve çözelti kararlılığı açısından doğrulanmıştır. Önerilen LC yöntemi, desloratadin ve loratadin arasında, desloratadin ilaç maddesinde ve diğer safsızlıklarda tatmin edici bir çözünürlük sağlamıştır. Sonuç olarak geliştirilen LC yöntemi desloratadin ve loratadinin farmasötik formülasyonlarda aynı anda bulunması için basit ve seçicidir. Desloratadin sentezinin kontrolü için ve sıradan laboratuvarlarda ilaç maddesi ve formüle edilmiş ürünlerdeki desloratadinin tayini için kullanılabilir bir yöntem olduğu gösterilmiştir (Meiling, Wang ve Geng, 2005).

Loratadin ilaç maddesindeki safsızlıkların saptanması ve doğrulanması için yeni bir HPLC yönteminin geliştirilmesinin gerekliliğini anlatmışlardır. Aynı zamanda kullanılan bu yöntemin, seçici, hassas, safsızlıkların ve bozunum ürünlerinin tayini için doğru olduğu da yapılan araştırmalarla gösterilmiştir. Sonuç olarak bu metodun, farmasötik kalite kontrol laboratuvarlarındaki rutin tayinlerde kullanılabilirliği kanıtlanmıştır (Ramulu, Kumar, Vyas, Suryanarayana ve Mukkanti, 2011).

Farmasötik preparatlarda ve biyolojik sıvılarda yeni bir antihistaminik ilaç olan desloratadinin (DSL) belirlenmesi için dört hassas, basit ve spesifik yöntem geliştirmişlerdir. Yöntem I ve II, sarı renkli bir reaksiyon ürününün elde edildiği pH 7.6 borat tamponunda DSL'nin 4-kloro-7-nitrobenzo-2-oksa-1,3-diazol (NBD-Cl) ile birleştirilmesine ve spektrofotometrik olarak 485 nm'de ölçülmesiyle yapılmıştır (Yöntem I). Aynı ürünün, 480 nm'de uyarımdan sonra 538 nm'de spektrofotometrik olarak ölçülebilir olduğu gösterilmiştir (Yöntem II). Yöntem III ve IV, DSL'nin, pH 9.0'ın borat tamponunda 2,4-dinitro florobenzen (DNFB) ile türevlendirilmesini kapsar; bu, 375 nm'de maksimum absorbe eden sarı renkli bir



üründür (Yöntem III). Aynı türev, HPLC'nin ardından ayırma işleminden sonra tespit edilmiştir (Yöntem IV). Ayırma, 375 nm'de UV tespiti ile 1.0 ml / dak akış hızı ile asetonitril-su (60:40, v / v) içeren bir mobil faz ile dengelenmiş siyanopropil bağlı durağan faz ile paketlenmiş bir kolon üzerinde gerçekleştirilmiştir. Önerilen yöntemler, loratadin varlığında DSL'nin belirlenmesi için oldukça spesifik bir metot olduğunu da göstermiştir ( El-Enany, El-Sherbiny ve Belal, 2007).

Çözücü olarak bir mikro emülsiyon kullanarak antihistaminik ilaç maddesi loratadin ve bunun analog maddesi olan desloratadini içeren farmasötik preparatların analitik kalite kontrolü için hızlı bir HPLC prosedürü geliştirmişlerdir. Geliştirmiş oldukları bu yöntemin özgüllük, doğrusallık, kantifikasyonun alt sınırı, algılamanın alt sınırı, hassasiyet ve doğruluğa göre uygunluğu kanıtlanmıştır. Kullanılan bu yöntem ile loratadin ve desloratadin arasında uygun çözünürlük elde edilmiştir. Ayrıca kullanılan bu yöntem, minimum değerlerde numune kullanımı gerektiren hızlı bir yöntemdir (10 dakika). Diğer bir özelliği ise tekrarlanabilir olmasıdır (RSD < % 2.0). Sonuç olarak loratadin ve desloratadinin eşzamanlı tespiti için hem güvenilir hem de spesifik bir HPLC yöntemi geliştirilmiştir. Bu yöntemin HPLC ile tayin yapan kalite kontrol laboratuvarlarının kullanımı için yeterince iyi olduğu gösterilmiştir. Aynı zaman da bu yöntem loratadin ve desloratadinin birbiri içindeki saflığını ölçmek için de oldukça iyi bir yöntemdir (El-Sherbiny, El-Enany, Belal ve Hansen, 2007).

Loratadinin ve onun metaboliti olan deskarboetoksiloratadin (DCL), insan plazmasında eşzamanlı olarak belirlenmesi için, floresan tespiti ile yüksek performanslı bir sıvı kromatografi (HPLC) yöntemini geliştirmişlerdir. Toluen ile iki aşamalı sıvı-sıvı ekstraksiyonun ardından analitler, metanol-asetonitril-fosfat tamponundan oluşan bir gradyan mobil faz kullanılarak ayrılmıştır. Sonuç olarak insana ait plazmada Loratadinin ve onun metaboliti olan deskarboetoksiloratadinin aynı anda saptanması için güvenilir ve spesifik bir yöntem olan floresan algılama özelliğine sahip bir HPLC kullanılmıştır. Kullanılan bu yöntem de yapılan çalışmalarla daha da geliştirilmiştir. Ayrıca kullanılan bu yöntemin, klinik farmakokinetik çalışmalar için uygun olduğu da gösterilmiştir. Kullanılan bu yöntemin oldukça büyük bir gelişme olarak kabul edilmesinin asıl sebebi ise hem Loratadini hemde onun metaboliti olan deskarboetoksiloratadin tek bir kromatografik deneyde belirleme yeteneğine sahip olmasıdır. (Ophelia, Xiaojin ve Moses, 2003).

Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) ve ikinci türev spektrofotometri yöntemlerini, farmasötik formülasyonlar da loratadinin ve montelukastın eşzamanlı olarak belirlenmesi için kullanmışlardır. Kullanmış oldukları her iki yöntem de tamamen doğrulanmıştır ve bu bağlamda seçilen ilaçların tahlil tayini için karşılaştırmalar yapılmıştır. Bu karşılaştırmalar sonucunda kullanmış oldukları yöntemlerin istenilen amaca göre oldukça uygun olduğunu teyit

etmişlerdir. Ayrıca bu yöntemlerin basit, hassas ve hızlı olmasında ekstra bir kazanç olmuştur (Radhakrishna, Narasaraju, Ramakrishna ve Satyanaraya, 2003).

İnsan plazmasında antihistaminik ilaç loratadin ve aktif metabolit deskarboetoksiloratadin aynı anda analizini gerçekleştirebilmek için tandem kütle spektrometrisini (LC / MS / MS) ve sıvı kromatografisini kullanarak hassas bir yöntem geliştirmişlerdir ve geliştirmiş oldukları bu yöntem yapmış oldukları çalışmalarla doğrulanmıştır. Sonuç olarak loratadinin ve insan plazmasındaki metaboliti deskarboetoksiloratadin ölçümü için kolay, hassas ve güvenilir bir LC / MS / MS yöntem başarıyla geliştirilmiş ve onaylanmıştır. Ayrıca plazma örneklerinden analitleri çıkarabilmek için de basit bir sıvı / sıvı özütleme prosedürü kullanılmıştır. Duyarlılığı arttırmak için bir silika sütunu ve sulu organik bir mobil faz kullanmışlardır (Naidong, Addison, Schneider, Jiang ve Halls, 2003).

Desloratadin ve onun aktif metaboliti 3-hidroksidesloratadin konsantrasyonları LC/MS/MS metodu ile hızlı ve basit olarak belirlenmiş ve valide edilerek farmakokinetik çalışmalarda uygulanmıştır (Xu, Li, Chen ve Chu, 2007).

Loratadinin belirlenmesi için floresans dedektörün kullanıldığı HPLC yöntemi geliştirilmiş ve biyoyararlanım çalışmalarında kullanılmıştır (Amini ve Ahmadiani, 2004).

Loratadinin insan plazmasında belirlenmesi için LC-ESI-IT-MS/MS yöntemi geliştirilmiştir. Elde edilen sonuçlar, FDA biyoanalitik yöntem validasyon rehberinde belirtildiği üzere kabul edilen kriterler dahilindedir. Önerilen yöntem, loratadinin farmakokinetik, biyoyararlanım veya biyoeşdeğerlik çalışmaları için belirgin bir şekilde tanımlanmasını ve hesaplanmasını sağlar (Salem, Idrees ve Al Tamimi, 2004).

Loratadinin türevi olan desloratadinde de bazik merkezli tek azot atomunun olması nedeniyle yük transfer reaksiyonundan yola çıkarak yeni bir spektrofotometrik bir yöntem geliştirilmiştir. Bu yöntemle farmosötik formülasyonlarda desloratadin tayini hızlı ve basit bir şekilde yapılabilir (Gouda ve Kasseem, 2016).

Psödoefedrin sülfat, deksbromfeniramin maleat ve loratadinin farmasötik preparatlarda eş zamanlı tayini için türev spektrofotometri ve spektrum oranları türev spektrofotometri yöntemiyle çalışılmıştır (Onur, Yüesoy, Dermis, Kartal ve Kökdil, 2000).

Desloratadin ve safsızlıklarını ilaç dozaj formlarında belirlemek için RP-UPLC metodu geliştirilmiştir. Geliştirilen metot ICH kılavuzlarına göre valide edilmiştir (Rao, Satyanarayana, Reddy, Sait, Chakole ve Mukkanti, 2010).

İlaç geliştirme ve kalite kontrolü için Loratadinin ve içerdiği safsızlıklar kapiler elektroforez yöntemiyle tanımlanmış ve hesaplanmıştır (Fernandez, Ruperez ve Barbas, 2003).

Hidrofilik ve hidrofobik antihistaminik bileşenlerden Loratadin ve psödoefedrin sülfatın tabletlerde tayini için izokrotik HPLC metodu geliştirilmiştir (Abu-Lathou, Hamdan ve Tahraoui, 2005).

Desloratadin ve ilgili bileşiklerinin ilaç tabletlerinde ayrılabilmesi için iyon çifti kromatografi yöntemi geliştirilmiştir. Geliştirilen bu yöntem, doğruluk, doğruluk, nicelik sınırı / algılama limiti, hassaslık, özgüllük ve sağlamlık bakımından ICH kılavuzlarına göre başarıyla doğrulanmıştır (Zheng ve Rustum, 2010).

HPLC yöntemi ilaç analizlerinde tahlil, çözünme analizleri, safsızlık tespiti, proses kontrolü, ilaç metabolizması çalışmaları ve iyonlaşma sabiti, log P, log D, ve çözünürlük gibi fizikokimyasal özelliklerin anlaşılması için sıklıkla kullanılan kromatografik bir yöntemdir. Bu tezde çalışılan bileşiklerin daha önce HPLC yöntemi ile iyonlaşma sabiti tayini bulunmaması nedeniyle diğerlerinden farklıdır. Ayrıca su-organik çözücü ikili karışımında pH optimizasyonu temel alınarak sıvı kromatografik yöntemin de optimize edilmesini sağlamak çalışmamızın özgün değerini ortaya koymaktadır.

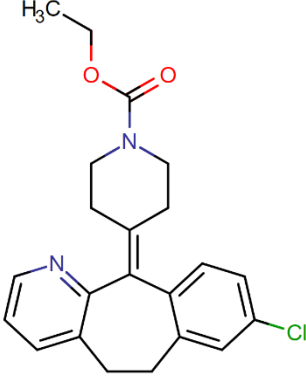
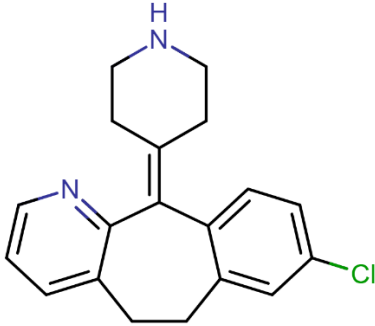
## 2. MATERYAL ve YÖNTEM

Bu bölümde loratadin ve desloratadinin iyonlaşma sabitlerinin, su-asetonitril ikili karışımlarında ters faz sıvı kromatografik yöntemle tayininde kullanılan cihazlar ve kimyasallar hakkında bilgi verilmiştir.

### 2.1. Deneysel Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler ve Çözücüler

Deneysel çalışmada kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya HPLC safıktadır. Bu tezde çalışılan bileşiklerin özellikleri, Çizelge 2.1’de verilmiştir.

Çizelge 2. 1. Çalışmada Kullanılan Bileşiklerin Özellikleri

Bileşik	Kimyasal Yapısı	Bileşik Özellikleri
<b>Loratadin</b> Etil-4-(8-kloro-5,6-dihidro-11H-benzo[5,6]siklohepta[1,2-b]piridin-11-ylidene)-1-piperidinkaboksilat		$M_A$ : 382,883 g/mol CAS No: 79794-75-5 Kimyasal Formülü: $C_{22}H_{23}ClN_2O_2$ $pK_a$ : 4,33; 5,25
<b>Desloratadin</b> 8-Kloro-6,11-dihidro-11-(4-piperidinyliden)-5H-benzo[5,6]siklohepta[1,2b]piridin		$M_A$ : 310,821 g/mol CAS No: 100643-71-8 Kimyasal Formülü: $C_{19}H_{19}ClN_2$ $pK_a$ : 9,73; 4,2 – 9,7

Kromatografik çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler ve kullanım amaçları, Çizelge 2.2’ de verilmiştir.

**Çizelge 2. 2. Kimyasal Malzemeler ve Kullanım Amaçları**

<b>Adı</b>	<b>Kullanım Amacı</b>	<b>Temin Edildiği Firma</b>
Loratadin	HPLC ile pK <sub>a</sub> tayini yapılan bileşik	Sigma-Aldrich
Desloratadin	HPLC ile pK <sub>a</sub> tayini yapılan bileşik	Sigma-Aldrich
Asetonitril	Mobil faz için kullanılan organik çözücü	Sigma-Aldrich
Sodyum hidroksit	Mobil faz pH'sının ayarlanmasında	Merck
Urasil	Kolonda tutunmayan tür	Sigma-Aldrich
Fosforik asit	Mobil faz pH'sının ayarlanmasında	Riedel-de Haën
pH 4,01; 7,01; 10,01 tampon çözeltileri	Elektrot kalibrasyonunda	Hanna

## **2.2. Kromatografik Çalışmalar**

### **2.2.1. Kullanılan Cihazlar**

#### **2.2.1.1. Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi Cihazı**

Çalışılan bileşiklerin pK<sub>a</sub> değerlerinin tayininde, Agilent 1260 Infinity marka Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi cihazı kullanılmıştır. Sistemde, 1260 Quat Pump VL pompa, 1260 DAD VL dedektör, 1260 ALS otomatik numune enjeksiyon kısmı bulunmaktadır.

#### **2.2.1.2. pH/İyon Metre**

HPLC mobil fazının pH ölçümlerinde Hanna HI 221 pH metre cihazı kullanılmış ve ölçümlerde Hanna HI 1131 cam elektrottan yararlanılmıştır. Elektrot kalibrasyonu için elektrot pH 4,01; 7,01 ve 10,01 değerlerine kalibre edilerek pH ayarlaması yapıldı. Mobil faz pH'ının ayarlanması esnasında sıcaklık 25°C ± 0,1°C' de sabit tutulmuştur.

## 2.2.2. HPLC Kolon Seçimi

Zorbax Eclipse Plus kolonları, silika bazlı diğer kolonlarla karşılaştırıldığında üstün performans göstermesi nedeniyle çok tercih edilen bir kolondur. Eclipse Plus kolonları en zorlu bazik bileşiklerde bile düzgün pik şekli verir ve bu tür bazik bileşikler için verimliliği ve çözünürlüğü artırır. Tüm bu özelliklerinden dolayı bu çalışmada Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 3,5 µm, 4,6x100 mm kolon kullanılmıştır.

## 2.2.3. Kullanılan Çözeltiler

### 2.2.3.1. Kromatografik Çalışmalar

Kromatografik çalışmada, pK<sub>a</sub> değerlerinin tayini yapılan bileşiklerden loratadinin pikleri bir gün sonraki çalışmada bozulduğu için her iki bileşik günlük olarak hazırlanmıştır. Analitik safılıkta temin edilen bileşiklerin her birinden 0,0010 g tartılıp, 10 mL mobil fazda çözülerek 100 ppm'lik stok çözeltileri hazırlanmıştır. Hazırlanan bu çözeltilerden 20 µL sıvı kromatografi cihazına enjekte edilmiştir. Her bir bileşik için iki kez enjeksiyon yapılarak ortalama alıkonma zamanları belirlenmiştir. Bileşiklerin iyonlaşma sabitlerinin tayini için asetonitril-su ikili karışımı kullanılmış, kolon sıcaklığı 25°C, akış hızı 1 mL/dakika olarak belirlenmiştir. Loratadin, ve desloratadin için 210 nm, ursoril için 254 nm dalga boyunda çalışılmıştır. Loratadinin iyonlaşma sabitinin tayini için %35, %40, %45 ve %50 (h/h) asetonitril-su ikili karışımlarında çalışılmıştır. Desloratadinin iyonlaşma sabitinin tayini için %20, %25, %30 ve %35 (h/h) asetonitril-su ikili karışımlarında çalışılmıştır.

#### 2.2.3.1.1. %20 (h/h) Asetonitril-Su İkili Karışımı

80 mL saf su alınmış ve üzerine 20 mL asetonitril ilave edilerek 100 mL'lik stok çözelti hazırlanmıştır. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim bütünlüğünden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Mobil faza derişimi 50 mM olacak şekilde H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%85 (a/a); 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama derişimi 1 M olan NaOH ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerleri (2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6) olan mobil fazlar hazırlanmıştır.

#### **2.2.3.1.2. %25 (h/h) Asetonitril-Su İkili Karışımı**

75 mL saf su alınmış ve üzerine 25 mL asetonitril ilave edilerek 100 mL'lik stok çözelti hazırlanmıştır. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Mobil faza derişimi 50 mM olacak şekilde H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%85 (a/a); 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama derişimi 1 M olan NaOH ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerleri (2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6) olan mobil fazlar hazırlanmıştır.

#### **2.2.3.1.3. %30 (h/h) Asetonitril-Su İkili Karışımı**

70 mL saf su alınmış ve üzerine 30 mL asetonitril ilave edilerek 100 mL'lik stok çözelti hazırlanmıştır. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Mobil faza derişimi 50 mM olacak şekilde H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%85 (a/a); 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama derişimi 1 M olan NaOH ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerleri (2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6) olan mobil fazlar hazırlanmıştır.

#### **2.2.3.1.4. %35 (h/h) Asetonitril-Su İkili Karışımı**

65 mL saf su alınmış ve üzerine 35 mL asetonitril ilave edilerek 100 mL'lik stok çözelti hazırlanmıştır. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Mobil faza derişimi 50 mM olacak şekilde H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%85 (a/a); 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama derişimi 1 M olan NaOH ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerleri (2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6) olan mobil fazlar hazırlanmıştır.

#### **2.2.3.1.5. %40 (h/h) Asetonitril-Su İkili Karışımı**

60 mL saf su alınmış ve üzerine 40 mL asetonitril ilave edilerek 100 mL'lik stok çözelti hazırlanmıştır. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Mobil faza derişimi 50 mM olacak şekilde H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (%85 (a/a); 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama derişimi 1 M olan NaOH

ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerleri (2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6) olan mobil fazlar hazırlanmıştır.

#### **2.2.3.1.6. %45 (h/h) Asetonitril-Su İkili Karışımı**

55 mL saf su alınmış ve üzerine 45 mL asetonitril ilave edilerek 100 mL'lik stok çözelti hazırlanmıştır. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Mobil faza derişimi 50 mM olacak şekilde  $H_3PO_4$  (%85 (a/a); 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama derişimi 1 M olan NaOH ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerleri (2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6) olan mobil fazlar hazırlanmıştır.

#### **2.2.3.1.7. %50 (h/h) Asetonitril-Su İkili Karışımı**

50 mL saf su alınmış ve üzerine 50 mL asetonitril ilave edilerek 100 mL'lik stok çözelti hazırlanmıştır. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Mobil faza derişimi 50 mM olacak şekilde  $H_3PO_4$  (%85 (a/a); 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama derişimi 1 M olan NaOH ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerleri (2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6) olan mobil fazlar hazırlanmıştır.

#### **2.2.3.2. Loratadin ve Desloratadin İlaçlarının Çözeltileri**

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

#### **2.2.3.3. Urasil Çözeltisi**

Çalışılan koşullarda kapasite faktörlerinin belirlenmesi için kullanılan urasil çözeltisi, derişimi %0,01 (a/h) olacak şekilde suda hazırlanmıştır. Urasilin hazırlanan bu çözeltilisinden 20



$\mu\text{L}$  enjekte edilerek kolonda tutunmayan türe özgü  $t_0$  alıkonma zamanı belirlenmiştir. Çalışma dalga boyu 254 nm'dir.

### 2.3. Yöntem

HPLC yöntemi ile iyonlaşma sabitlerinin tayini çalışmasında, 4 farklı asetonitril-su ikili karışımlarında çalışılmıştır. Elektrot, pH değerleri belirlenirken pH 4,01; 7,01 ve 10,01 tampon çözeltileri ile kalibre edilmiştir. Elektrot, okunan değerlerin kararlı olabilmesi için çalışılan su-organik çözücü karışımında bekletilmiştir. Asetonitril-su ikili karışımları için pH ayarlamaları her bir ortam için pH değeri 2,5-6 aralığında olacak şekilde mobil fazlar hazırlanmıştır. Bu ayarlama işlemlerinde tampon aralığı dikkate alınarak 50 mM o-fosforik asit kullanılmıştır. HPLC çalışmasında kapasite faktörlerinin belirlenmesi için gerekli  $t_0$  değeri urasilin sudaki %0,01 (a/h) derişimindeki çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmada gerek urasil ve gerekse bileşiklerin alıkonma zamanları, ikişer enjeksiyonla ölçümlerin ortalaması alınarak belirlenmiş ve bu değerler yardımıyla kapasite faktörleri (k) hesaplanmıştır.

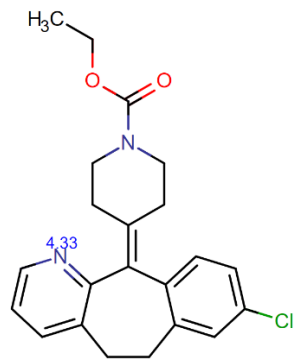
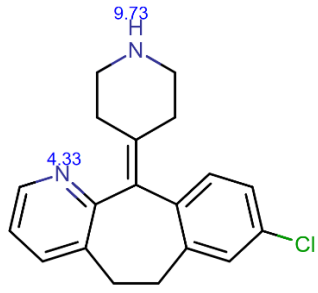
### 3. BULGULAR

Bu tez çalışmasında loratadin ve desloratadinin iyonlaşma sabitleri değerlerinin tayini HPLC metodu ile gerçekleştirilmiştir. Loratadin ve desloratadin piperidin grubu bileşiklerdir. Bileşiklerin yapısındaki piridin halkasına ait olan iyonlaşma sabitleri tayin edilmiştir. Bileşiklerin iyonlaşan kısımlarına ait  $pK_a$  değerleri, tahmini iyonlaşma sabiti hesaplayan Chemicalize programıyla hesaplanmıştır.

#### 3.1. Bileşiklerin Chemicalize ile Hesaplanmış İyonlaşma Sabitleri

Tezde çalışılan Loratadin yapısında bulunan piridin halkasına ait olan  $pK_a$  ve desloratadin yapısında bulunan piridin ve piperidin grubuna ait  $pK_a$  değerleri Chemicalize programı ile belirlenmiştir. Bu değerler Çizelge 3.1' de verilmiştir.

**Çizelge 3. 1.** Loratadin Ve Desloratadinin Chemicalize Programıyla Hesaplanmış Tahmini  $pK_a$  Değerleri

Bileşikler	Kimyasal Yapıları
Loratadin	
Desloratadin	

Bu program kullanılarak yapılan hesaplamalarda bileşiklerin yapısında bulunan piridin grubuna ait iyonlaşma sabiti değerleri 4,33 olarak tahmin edilmiştir. Desloratadin için

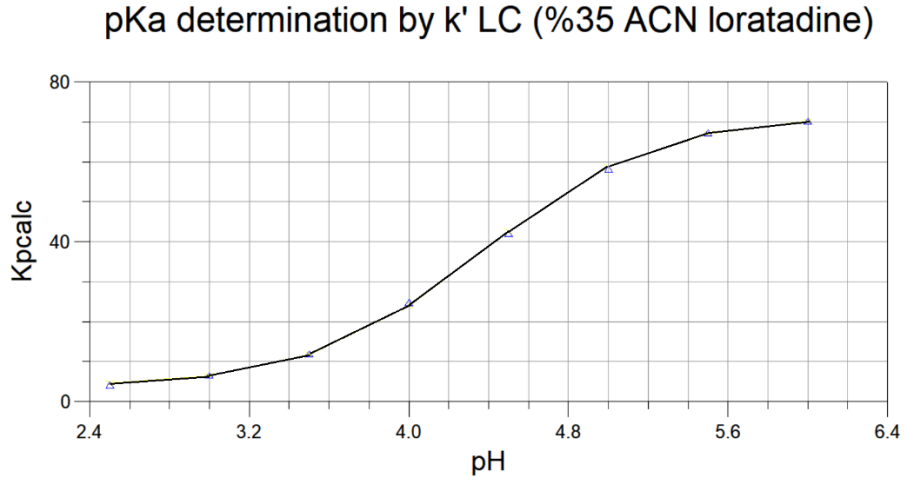
loratadinden farklı olarak yapısında bulunan piperidin grubuna ait iyonlaşma sabiti değeri 9,73 olarak tahmin edilmiştir.

### 3.2. Loratadinin HPLC Yöntemiyle Asetonitril-Su Organik Çözücü İkili Karışımlarında İyonlaşma Sabiti Tayini

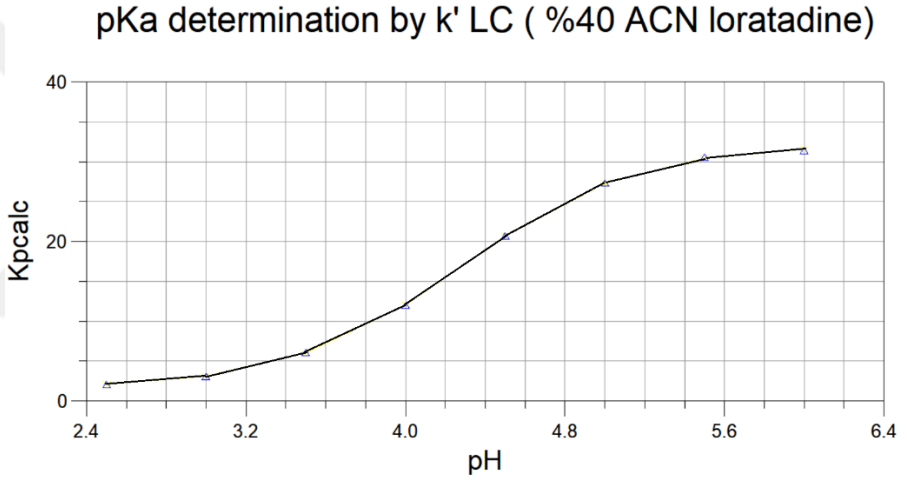
Bu tez çalışmasında Loratadin için iyonlaşma sabiti tayini %35, %40, %45 ve %50 (h/h) asetonitril-su ortamında çalışılmıştır. Her bir asetonitril-su ikili karışımlarında farklı pH değerleri 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6 olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Bileşiğe ait  $pK_a$  değerleri, kapasite faktörü ile pH arasındaki ilişki kullanılarak non lineer modeli esas alan NLREG programıyla hesaplanmıştır. Loratadin için farklı pH' larda ve dört farklı koşulda elde edilen alıkonma faktörleri ( $t_R$ ), Çizelge 3.2' de gösterilmiştir. Bu dört farklı koşulda pH- $t_R$  ilişkisini gösteren grafikler ise non lineer regresyon ( NLREG ) programı kullanılarak çizilmiştir (Şekil 3.1-3.2-3.3-3.4).

**Çizelge 3. 2.** Loratadin için %35, %40, %45 ve %50 (h/h) Asetonitril İçeren Asetonitril-Su İkili Karışımlarında Elde Edilen Alıkonma Faktörleri Değerleri

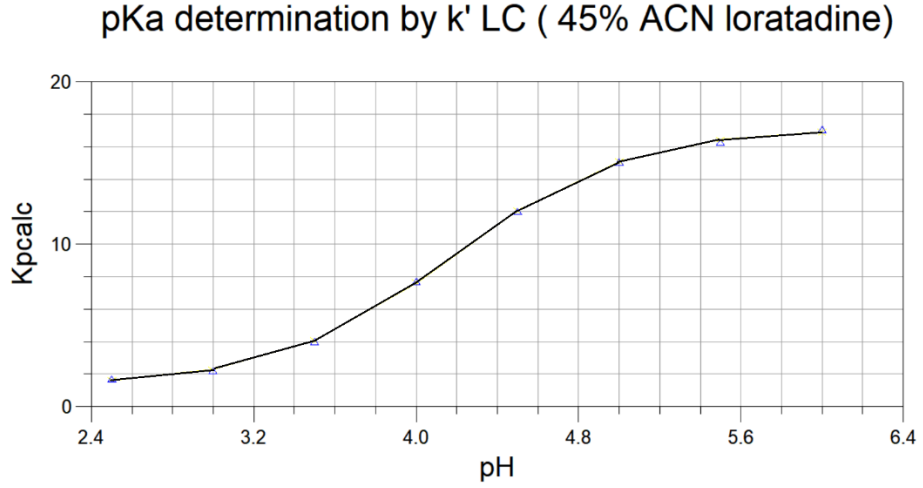
pH	%35 ACN ortamı için Alıkonma faktörleri ( $t_R$ )	%40 ACN ortamı için Alıkonma faktörleri ( $t_R$ )	%45 ACN ortamı için Alıkonma faktörleri ( $t_R$ )	%50 ACN ortamı için Alıkonma faktörleri ( $t_R$ )
2,5	4,713	2,807	2,397	1,585
3,0	6,823	3,671	2,835	2,038
3,5	11,798	5,943	4,435	3,168
4,0	23,578	11,074	7,717	5,206
4,5	41,897	19,017	11,562	7,114
5,0	54,179	24,693	14,261	8,798
5,5	61,948	28,456	15,326	9,548
6,0	65,065	29,188	16,043	9,382



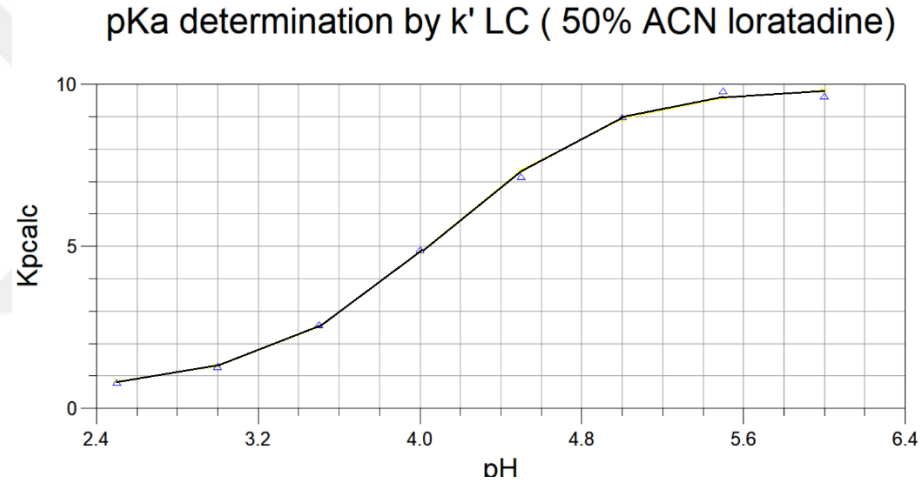
Şekil 3. 1. Loratadin için %35 (h/h) Asetonitril İçeren Asetonitril-Su İkili Karışımlarındaki pH-tR İlişkisi



Şekil 3. 2. Loratadin için %40 (h/h) Asetonitril İçeren Asetonitril-Su İkili Karışımlarındaki pH-tR İlişkisi



**Şekil 3. 3.** Loratadin için %45 (h/h) Asetonitril İçeren Asetonitril-Su İkili Karışımlarındaki pH-tR İlişkisi



**Şekil 3. 4.** Desloratadin için %50 (h/h) Asetonitril İçeren Asetonitril-Su İkili Karışımlarındaki pH-tR İlişkisi

Loratadin yapısında bulunan piridin fonksiyonel grubu bazik davranış gösterdiği için bu bileşiğin alıkonma zamanı mobil faz pH değerinin artmasıyla artmıştır. Mobil fazdaki asetonitril oranının artmasıyla birlikte alıkonma zamanı azalmıştır.

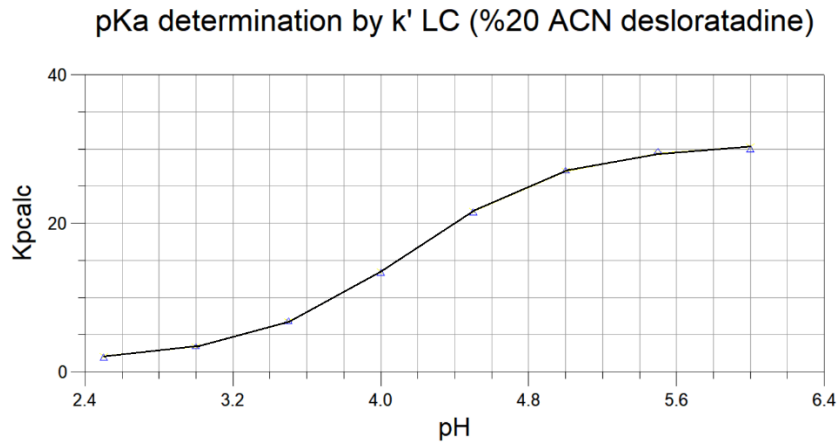
### 3.3. Desloratadin'in HPLC Yöntemiyle Asetonitril-Su Organik Çözücü İkili Karışımlarında İyonlaşma Sabiti Tayini

Bu tez çalışmasında desloratadin için iyonlaşma sabiti tayini %20, %25, %30 ve %35 (h/h) asetonitril-su ortamında çalışılmıştır. Her bir asetonitril-su ikili karışımlarında farklı pH değerleri 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6 olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Bileşiğe ait pK<sub>a</sub> değerleri,

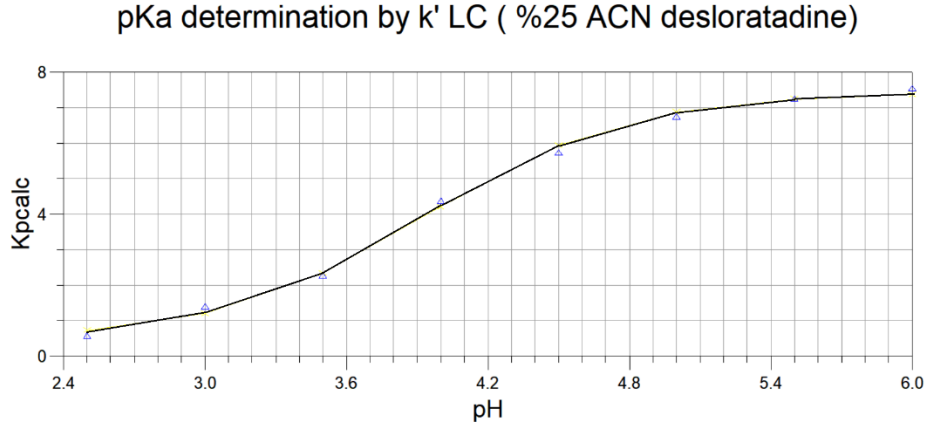
kapasite faktörü ile pH arasındaki ilişki kullanılarak non lineer modeli esas alan NLREG programıyla hesaplanmıştır. Desloratadin için farklı pH' larda ve dört farklı koşulda elde edilen alıkonma faktörleri ( $t_R$ ), Çizelge 3.3' de gösterilmiştir. Bu dört farklı koşulda pH- $t_R$  ilişkisini gösteren grafikler ise non lineer regresyon ( NLREG ) programı kullanılarak çizilmiştir (Şekil 3.5-3.6-3.7-3.8).

**Çizelge 3. 3.** Desloratadin için %20, %25, %30 ve %35 (h/h) Asetonitril İçeren Asetonitril-Su İkili Karışımlarında Elde Edilen Alıkonma Faktörleri Değerleri

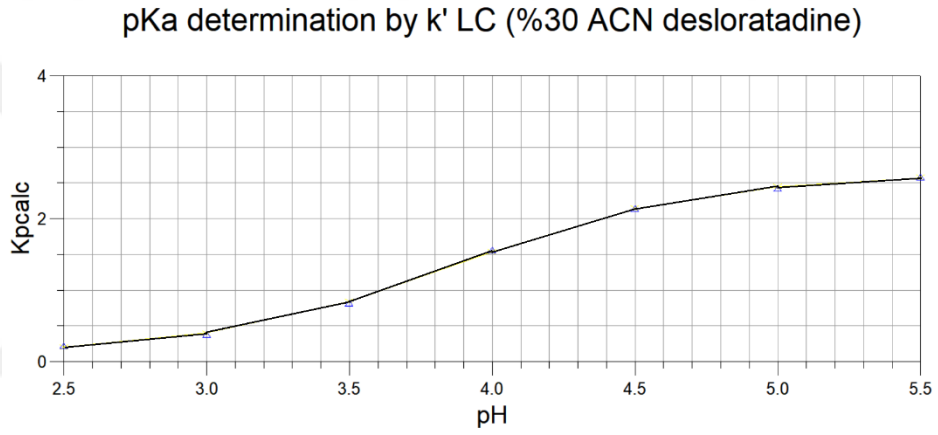
pH	%20 ACN ortamı için Alıkonma faktörleri ( $t_R$ )	%25 ACN ortamı için Alıkonma faktörleri ( $t_R$ )	%30 ACN ortamı için Alıkonma faktörleri ( $t_R$ )	%35 ACN ortamı için Alıkonma faktörleri ( $t_R$ )
2,5	2,960	1,511	1,143	0,962
3,0	4,390	2,300	1,290	1,086
3,5	7,805	3,137	1,699	1,255
4,0	14,252	5,671	2,401	1,582
4,5	22,282	6,259	2,925	1,737
5,0	27,909	7,442	3,203	1,808
5,5	30,526	7,925	3,343	1,838
6,0	30,776	8,207	3,732	1,898



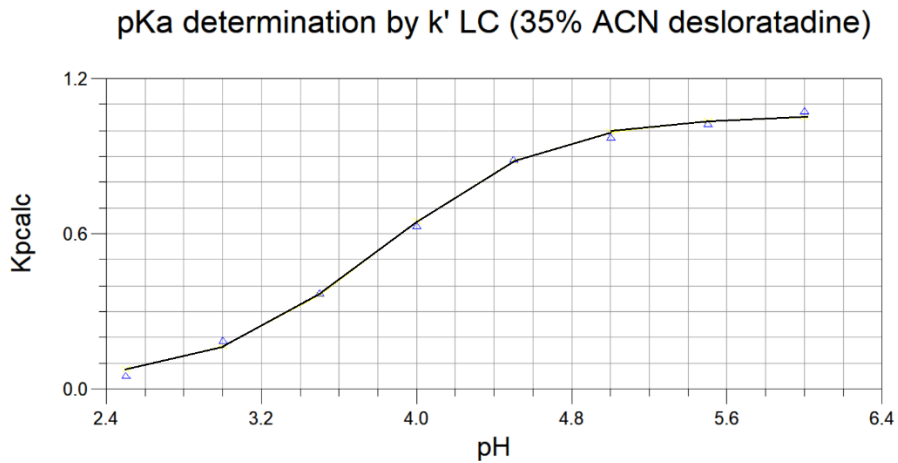
**Şekil 3. 5.** Desloratadin için %20 (h/h) Asetonitril İçeren Asetonitril-Su İkili Karışımlarındaki pH- $t_R$  İlişkisi



Şekil 3. 6. Desloratadin için %25 (h/h) Asetonitril İçeren Asetonitril-Su İkili Karışımlarındaki pH-tR İlişkisi



Şekil 3. 7. Desloratadin için %30 (h/h) Asetonitril İçeren Asetonitril-Su İkili Karışımlarındaki pH-tR İlişkisi

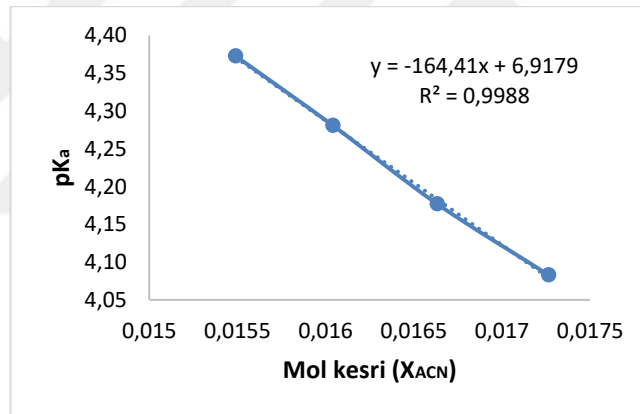


Şekil 3. 8. Desloratadin için %35 (h/h) Asetonitril İçeren Asetonitril-Su İkili Karışımlarındaki pH-tR İlişkisi

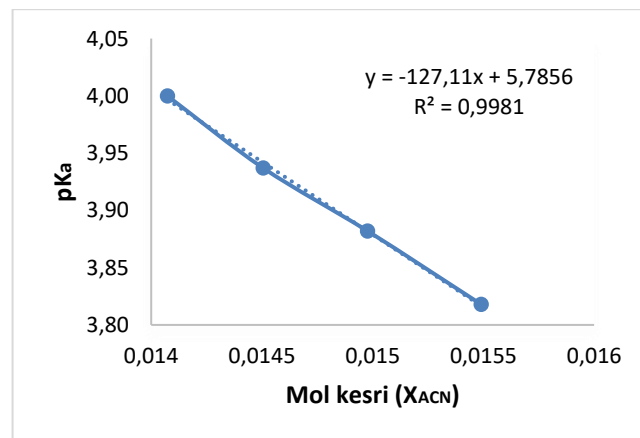
Desloratadin yapısında bulunan piridin fonksiyonel grubu bazik davranış gösterdiği için bu bileşiğin alıkonma zamanı mobil faz pH değerinin artmasıyla artmıştır. Bu bileşiğin piperidin bazik fonksiyonel grubuna ait pK<sub>a</sub> değeri HPLC yöntemiyle tayin edilememiştir. Bunun sebebi çalışmada seçilen kromatografik kolonun pH aralığının 2-9 arasında olmasıdır.

### 3.4. Mol kesri-pK<sub>a</sub> Yöntemi ile Bileşiklerin Su Ortamındaki pK<sub>a</sub> Değerlerinin Tayini

Bu yöntem kullanılarak loratadin için %35, %40, %45 ve %50 (h/h) asetonitril içeren ortamlarda ve desloratadin için %20, %25, %30 ve %35 (h/h) asetonitril içeren ortamlardaki mol kesri (X) değerlerine karşı NLREG programı kullanılarak hesaplanan pK<sub>a</sub> değerlerine karşı çizilen grafikten elde edilen doğrusal eşitliklerin kesim noktaları bu iki bileşiğin sudaki pK<sub>a</sub> değerini vermiştir. Loratadin için elde edilen grafik Şekil 3.9'da, Desloratadin için elde edilen grafik ise Şekil 3.10'da verilmiştir.



Şekil 3. 9. Loratadin İçin Mol Kesri-pK<sub>a</sub> Yöntemiyle Sudaki pK<sub>a</sub> Değerinin Hesaplanması

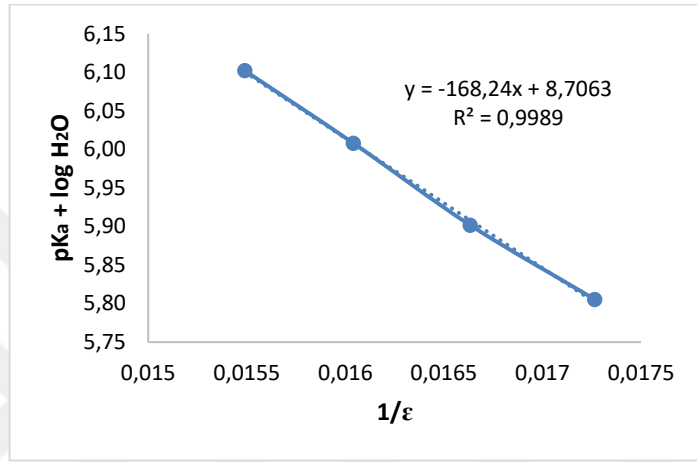


Şekil 3. 10. Desloratadin İçin Mol Kesri-pK<sub>a</sub> Yöntemiyle Sudaki pK<sub>a</sub> Değerinin Hesaplanması

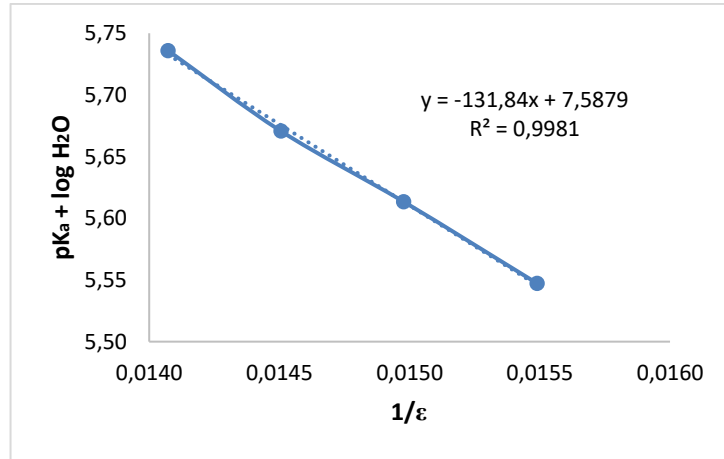


### 3.5. Yasuda - Shedlovsky Yöntemi ile Bileşiklerin Su Ortamındaki pK<sub>a</sub> Değerlerinin Tayini

Yasuda - Shedlovsky metoduyla, loratadin için %35, %40, %45 ve %50 (h/h) asetonitril ve desloratadin için %20, %25, %30 ve %35 (h/h) asetonitril ortamındaki  $1/\epsilon$  değerlerine karşı  $pK_a + \log H_2O$  değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen bağıntıdan sudaki pK<sub>a</sub> değerlerine geçilmiştir. Loratadin için elde edilen grafik Şekil 3.11' de, desloratadin için elde edilen grafik Şekil 3.12' de verilmiştir.



Şekil 3. 11. Asetonitril-Su Ortamında Loratadinin Yasuda-Shedlovsky Ekstrapolasyon Grafiği



Şekil 3. 12. Asetonitril-Su Ortamında Desloratadinin Yasuda-Shedlovsky Ekstrapolasyon Grafiği

#### 4. SONUÇ ve ÖNERİLER

Antihistaminik ilaçlar alerjik reaksiyonlarda rol oynayan histaminin etkisiyle vücutta ortaya çıkan etkileri inhibe eden ya da tamamen ortadan kaldırmak için dışarıdan verilen ilaçlardır. En sık kullanılan antihistaminik ilaçlardan Loratadin ve Desloratadin piperidin grubu zayıf bazik özellik gösteren ilaç aktif maddeleridir. Bu ilaç aktif maddelerinin sulu ortamda iyonize olma oranları ortamın pH'sı ve ilacın iyonlaşma sabiti değeri ile ilgilidir. İyonlaşma sabiti değerinin bilinmesiyle ilaçların protonlanmış ve protonlanmamış oranları bilinebilir ve böylece vücutta hücre membranından geçip geçmeyeceği yani absorpsiyon özellikleri kolaylıkla anlaşılabilir.

Loratadin ve Desloratadin suda çözünürlüğü az olan ilaç aktif maddeleri olduğu için öncelikle su- asetonitril çözücü ortamında çözünürlükleri sağlanmıştır. Loratadin %20, %25 ve %30 (h/h) asetonitril-su ortamında kolondan alınamamıştır o yüzden %35, %40, %45 ve %50 (h/h) asetonitril- su ortamında çalışılmıştır. Desloratadin ise %20, %25, %30 ve %35 (h/h) ortamında çalışılmıştır. Her iki bileşik için piperidin grubuna ait  $pK_a$  değeri hesaplanmıştır ancak desloratadin için piperidin grubuna ait  $pK_a$  değeri kolonun pH aralığının 2-9 aralığında olması sebebiyle piklerde gözlenen genişlemeden dolayı hesaplanamıştır. İyonlaşma değerleri HPLC yöntemi ile her bir ortam için NLREG programı ile hesaplanmıştır. Bileşikler için NLREG programıyla hesaplanmış iyonlaşma sabiti ( $pK_a$ ) değerleri ve türlere ait alıkonma zamanı değerleri ( $t_{R_{HA}}, t_{R_{A^-}}$ ) standart sapmalarıyla, Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2' de verilmiştir.

**Çizelge 4.1.** Loratadin İçin NLREG Programıyla Hesaplanmış  $pK_a$  Değerleri ve Türlerle Ait Alıkonma Zamanı Değerleri

Bileşik	% ACN	$pK_a$	$k_{HA}$	$k_A$
Loratadin	% 35	4,373 ( $\pm 0,015$ )	3,697 ( $\pm 0,395$ )	71,644 ( $\pm 0,446$ )
	% 40	4,281 ( $\pm 0,009$ )	1,606 ( $\pm 0,116$ )	32,163 ( $\pm 0,119$ )
	% 45	4,177 ( $\pm 0,014$ )	1,284 ( $\pm 0,094$ )	17,144 ( $\pm 0,087$ )
	% 50	4,083 ( $\pm 0,032$ )	0,595 ( $\pm 0,130$ )	9,924 ( $\pm 0,110$ )

**Çizelge 4.2.** Desloratadin İçin NLREG Programıyla Hesaplanmış pK<sub>a</sub> Değerleri ve Türlerine Ait Alıkonma Zamanı Değerleri

Bileşik	%ACN	pK <sub>a</sub>	k <sub>HA</sub>	k <sub>A</sub>
Desloratadin	%20	4,000 (±0,014)	1,456 (±0,166)	30,707 (±0,151)
	%25	3,937 (±0,052)	0,481 (±0,169)	7,430 (±0,124)
	%30	3,882 (±0,021)	0,101 (±0,023)	2,627 (±0,020)
	%35	3,818 (±0,044)	0,028 (±0,023)	1,057 (±0,015)

Loratadin ve desloratadinin yapısında bulunan bazik fonksiyonel grup olan piridine ait iyonlaşma sabiti değerleri Çizelge 4.1 ve Çizelge 4.2' de görüldüğü üzere organik çözücü yüzdesinin artmasıyla azalmaktadır.

Deneysel olarak bulunan pK<sub>a</sub> değerleri kullanılarak mol kesri-pK<sub>a</sub> yöntemiyle ve Yasuda-Shedlosky metodu ile su ortamındaki pK<sub>a</sub> değerleri hesaplanmıştır. Bu ekstrapolasyon yöntemi kullanılarak, elde edilen doğrusal eşitliklerin kesim noktalarından su ortamındaki pK<sub>a</sub> değerleri tayin edilmiştir (Çizelge 4.3).

**Çizelge 4.3.** Bileşiklerin Mol Kesri-pK<sub>a</sub> Yöntemiyle ve Yasuda-Shedlosky Yöntemiyle Hesaplanan Su Ortamındaki pK<sub>a</sub> Değerleri

Bileşikler	Mol kesri-pK <sub>a</sub>	Yasuda-Shedlosky	Literatür verileri
Loratadin	4,821	4,817	4,58 <sup>a</sup> 5,25 <sup>b</sup>
Desloratadin	4,159	4,169	8,65 <sup>a</sup> 4,41-9,97 <sup>b</sup>

a Ref. [Ter-Laak vd. 1994].

b Ref. [Popovic vd. 2009].

Bu veriler Chemicalize bilgisayar programı ile hesaplanmış değerlerle ve literatür verileri ile kıyaslandığında uyum içinde olduğu görülmüştür (Çizelge 3.1 ve Çizelge 4.3).

Bu tez konusu üzerinde yapılan detaylı literatür taraması sonucunda bileşiklerin HPLC yöntemiyle iyonlaşma sabiti tayinine rastlanmamıştır. Bu tezde çalışılan bileşiklerin hedef yapısındaki yapısal grupların neler olduğu, etkileşmelerinin hangi yönde olduğu, vücutta hücre membranından geçişinin nasıl değerlendirileceği gibi hususlar iyonlaşma sabiti değerinin

bilinmesiyle aydınlatılabilir. Bu değerin bilinmesiyle yapısal özellik, biyolojik aktiflik çalışanlara ve ilaç etken maddesi tasarımı konusunda çalışanlara önemli bir kaynak olacaktır.



## 5. KAYNAKLAR

- Abu-Lathou A, Hamdan II, Tahraoui A, 2005. A New HPLC Approach for the Determination of Hydrophilic and Hydrophobic Components: The Case of Pseudoephedrine Sulfate and Loratadine in Tablets. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 31 (6): 577-588.
- Albert A, Serjeant EP, 1971. *The Determination of Ionization Constants and Laboratory Manual*. Chapman and Hall Ltd. London.
- Allen RI, Box KJ, Comer JEA, Peake C, Tam KY, 1998. Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants of ionisable drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17 (4-5): 699-712.
- Amini H, Ahmadiani A, 2004. Rapid determination of loratadine in small volume plasma samples by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *Journal of Chromatography B*, 809 (2): 227-230.
- Anonim, 2015. Türkiye Ulusal Allerji ve Klinik İmmünoloji Derneği. <http://www.aid.org.tr/tr/allerjik-hastaliklar-menu/allerjik-rinit-nezle.html> (Erişim Tarihi: 25.08.2016)
- Avdeef A, Comer JEA, Thomson SJ, 1993. pH-Metric log P. 3. Glass electrode calibration in methanol water, applied to pK<sub>a</sub> determination of water in soluble substances. *Anal. Chem.*, 65 (1): 42-49.
- Babic S, Horvat AJM, Mutavdzic Pavlovic D, Kastelan-Macan M, 2007. Determination of pK<sub>a</sub> values of active pharmaceutical ingredients. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 26 (11): 1043-1061.
- Barbos J, Barron D, Jimenez-Lozano E, Sanz-Nebot V, 2001. Comparison between capillary electrophoresis, liquid chromatography, potentiometric and spectrophotometric techniques for evaluation of pK<sub>a</sub> values of zwitterionic drugs in acetonitrile-water mixtures. *Analytica Chimica Acta*, 437 (2): 309-321.
- Benet LZ, Goyan JE, 1967. Potentiometric determination of dissociation constants. *J. Pharm. Sci.*, 56 (6): 665-680.
- Bousquet J, Van Cauwenberge P, Khaltaev N, 2001. Allergic rhinitis and its impact on asthma. *Journal of allergy and clinical immunology*, 108 (5): 147-334.
- Börçek KC, 2010. Antihistaminik İlaç Olarak Kullanılan Feksofenadin Etken Maddesinin İnsan Periferik Lenfositleri Üzerindeki Genotoksik Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu.

- Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, 2000. In Dermatology. Second Ed. Springer, Berlin. 1747-1766.
- Bunnett JF, Nudelman NS, 1969. Independent, Kinetic Method for Determining Acid Dissociation Constants in Methanol. *J. Org. Chem.*, 34 (7): 2043-2046.
- Cohn EJ, Heyroth FF, Menkin MF, 1928. The dissociation constant of acetic acid and the activity coefficients of the ions in certain acetate solutions. *J. Am. Chem. Soc.*, 50 (3): 696-714.
- Dykhovichnaya DE, Bondarenko BN, Illarionova RP, Rann YV, 1971. Determination of the dissociation constants of antibiotic electrolytes by paper chromatography. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 5 (4): 56-58.
- El-Enany N, El-Sherbiny D, Belal F, 2007. Spectrophotometric, Spectrofluorometric and HPLC Determination of Desloratadine in Dosage Forms and Human Plasma. *Chem. Pharm. Bull.*, 55 (12): 1662-1670.
- El-Sherbiny DT, El-Enany N, Belal FF, Hansen SH, 2007. Simultaneous determination of loratadine and desloratadine in pharmaceutical preparations using liquid chromatography with a microemulsion as eluent. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43 (4): 1236-1242.
- Everaerts FM, Beckers JL, Verheggen TPEM, 1976. Isotachopheresis: theory, instrumentation and applications. (*Journal of chromatography library*; Vol. 6). Amsterdam: Elsevier Scientific.
- Fernandez H, Ruperez FJ, Barbas C, 2003. Capillary electrophoresis determination of loratadine and related impurities. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31 (3): 499-506.
- Flexser LA, Hammet LP, Dingwall A, 1935. The Determination of Ionization by Ultraviolet Spectrophotometry: Its Validity and its Application to the Measurement of the Strength of Very Weak Bases. *J. Am. Chem. Soc.*, 57 (11): 2103-2115.
- Fuguet E, Rafols C, Bosch E, Roses M, 2009. Fast highthroughput method for the determination of acidity constants by capillary electrophoresis: I. Monoprotic weak acids and bases. *J. Chromatogr. A.*, 1216 (17): 3646-3651.
- Gouda AA, Kasseem M, 2016. Novel spectrophotometric methods for determination of desloratidine in pharmaceutical formulations based on charge transfer reaction. *Arabian Journal of Chemistry*, 9 (2): 1712-1720.

- Grunwald E, Loewenstein A, Meiboom S, 1957. Rates and mechanisms of protolysis of methylammonium ion in aqueous solution studied by proton magnetic resonance. *J. Chem. Phys.*, 27 (3): 630.
- Hammett LP, 1928. The theory of acidity. *J. Am. Chem. Soc.*, 50 (10): 2666-2673.
- Hancu G, Campian C, Rusu A, Mircia E, Kelemen H, 2014. Simultaneous Determination of Loratadine, Desloratadine and Cetirizine by Capillary Zone Electrophoresis. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 4 (2): 161-165.
- Handley AD, Magnetti A, Higgins AJ, 1998. Therapeutic advantages of Third Generation Antihistaminis. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 7 (7): 1045-1054.
- Hill SJ, 1990. Distribution, properties and functional characteristics of three classes of histamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 42 (1): 45-83.
- Holmes WC, Snyder EJ, 1925. Spectrophotometric determination of hydrogen-ion concentrations and of the apparent dissociation constants of indicators iv. 1-naphthol-2-sodium sulfonate indophenol. *J. Am. Chem. Soc.*, 47 (8): 2232-2236.
- Horvath C, Melander W, Molnar I, 1977. Liquid chromatography of ionogenic substances with nonpolar stationary phases (Solvophobic Theory of Reversed Phase Chromatography, Part II). *Anal. Chem.*, 49 (1): 142-154.
- Kaleli E, 2010. Loratadin'den Desloratadin Sentezi ve Polimorfik Yapılarının İncelenmesi. Yüksek Lisans Tezi, Gazi Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ankara.
- Kaliner MA, 1992. Nonsedatign Antihistamines. *Pharmacology Clinical Efficacy and Adverse Effects. American Family Physician.*, 45 (3): 1337-1342.
- Katzin LI, Gulyas E, 1960. Dissociation constants of tartaric acid with the aid of polarimetry. *J. Phys. Chem.*, 64 (11): 1739-1741.
- Kayaalp O, 1986. Tıbbi Farmakoloji. 2260-2291 içinde. Ulucan matbaası. Ankara.
- Kim H, Chung TD, 2001. Voltammetric determination of the pK<sub>a</sub> of various acids in polar aprotic solvents using 1,4-benzoquinone. *J. Electroanalytical Chem.*, 498 (1-2): 209-215.
- Kiremitçi H, 2004. Polianyonlarla Katkılanmış Polipirol Filmlerinin Elektrokimyasal Sentezi ve Karakterizasyonu. Yüksek Lisans Tezi, Kocaeli Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Kocaeli.
- Kontaş S, 2012. Loratadin'in İnsan Periferik Lenfositleri Üzerindeki Sitotoksik ve Genotoksik Etkileri. Yüksek Lisans Tezi, Ordu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Ordu.
- Krause FH, 1992. Antihistamines and Decongestants. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery*, 107 (6): 835-840.

- Kroflıç A, Apelblat A, Beszter-Rogac M, 2012. Dissociation constants of parabens and limiting conductance's of their ions in water. *J. Phys. Chem. B.*, 116 (4): 1385-1392.
- Li JJ, Johnson DS, Sliskovic DR, Roth BD, 2004. Contemporary drug synthesis. John Wiley & Sons. New Jersey Published Simultaneously in Canada, 41-47.
- Manchester J, Walkup G, Rivin O, You Z, 2010. Evaluation of pK<sub>a</sub> estimation methods on 211 druglike compounds. *J. Chem. Inf. Model.*, 50 (4): 565–571.
- Manderscheid M, Eichinger T, 2003. Determination of pK<sub>a</sub> Values by Liquid Chromatography. *Journal of Chromatographic Science*, 41 (6): 323-326.
- Meiling QI, Wang P, Geng Y, 2005. Determination of desloratadine in drug substance and pharmaceutical preparations by liquid chromatography, 38 (2): 355–359.
- Monzyk B, Crumbliss AL, 1980. Acid dissociation constants (K<sub>a</sub>) and their temperature dependencies ( $\Delta H_a$ ,  $\Delta S_a$ ) for a series of carbon- and nitro-gensubstituted hydroxamic acids in aqueous solution. *J. Org. Chem.*, 45 (23): 4670-4675.
- Nacsa A, Ambrus R, Berkesi, Szabo-Revesz P, Aigner Z, 2008. Water-soluble loratadine inclusion complex: Analytical control of the preparation by microwave irradiation. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 48 (3): 1020-1023.
- Naidong W, Addison T, Schneider T, Jiang X, Halls TDJ, 2003. A sensitive LC/MS/MS method using silica column and aqueous-organic mobile phase for the analysis of loratadine and descarboethoxy-loratadine in human plasma. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 32 (4-5): 609-617.
- Noyanalpan N, (1978). *Farmasötik ve Medisinal Kimya Ders Kitabı*. Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Yayınları, 59, 91-96. Erişim Adresi: <http://kitaplar.ankara.edu.tr/dosyalar/pdf/249.pdf>
- Onur F, Yücesoy C, Dermis S, Kartal M, Kökdil G, 2000. Simultaneous determination of pseudoephedrine sulfate, dexbrompheniramine maleate and loratadine in pharmaceutical preparations using derivative spectrophotometry and ratio spectra derivative spectrophotometry. *Talanta*, 51 (2): 269-279.
- Ophelia QPY, Xiaojin S, Moses SSC, 2003. Reliable and specific high-performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of loratadine and its metabolite in human plasma. *Journal of Chromatography B.*, 796 (1): 165-172.
- Özlüoğlu LN, Saydam L, Kızılay A, 1994. Antihistaminikler. *K.B.B. ve Baş Boyun Cerrahisi Dergisi*, 2 (1): 71-74.
- Padhye SB, Kulkarni BA, 1973. Determination of dissociation constants by paper chromatography *I AJ. of Sci. and Techno.* 44, 45.



- Patel BN, Sharma N, Sanyal M, Shrivastav PS, 2010. LC–MS-ESI for the Determination of Loratadine and Descarboethoxyloratadine in Human Plasma. *Journal of Chromatographic Science*, 48 (1): 35-44.
- Po HN, Senozan NM, 2001. Henderson-Hasselbalch equation: its history and limitations. *J. Chem. Educ.*, 78 (11): 1499–503.
- Popov K, Rönkkömaki H, Lajunen LHJ, 2006. Guidelines for NMR measurements for determination of high and low pK<sub>a</sub> values (IUPAC Technical Report). *Pure. Appl. Chem.*, 78 (3): 663–675.
- Popovic G, Cakar M, Agbaba D, 2009. Acid–base equilibria and solubility of loratadine and desloratadine in water and micellar media. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 49 (1): 42-47.
- Poth-Brink C, Crumbliss AL, 1982. Temperature-dependent acid dissociation constants (K<sub>a</sub>, Δ.H<sub>a</sub>, Δ.S<sub>a</sub>) for a series of nitrogen-substituted hydroxamic acids in aqueous solution. *J. Org. Chem.*, 47 (7): 1171–1176.
- Prashant MB, Gautam RD, 2006. Form I of desloratadine, a tricyclic antihistamine. *Acta Crystallographica*, 62: 362-363.
- Rabenstein LD, Sayer LT, 1976. Determination of microscopic acid dissociation constants by nuclear magnetic resonance spectrometry. *Anal. Chem.*, 48 (8): 1141-1146.
- Radhakrishna T, Narasaraju A, Ramakrishna M, Satyanarayana A, 2003. Simultaneous determination of montelukast and loratadine by HPLC and derivative spectrophotometric methods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 31 (2): 359-368.
- Ramulu G, Kumar YR, Vyas K, Suryanarayana MV, Mukkanti K, 2011. A New Validated Liquid Chromatographic Method for the Determination of Loratadine and its Impurities. *Scientia Pharmaceutia*, 79 (2): 277-291.
- Rao DD, Satyanarayana NV, Reddy AM, Sait SS, Chakole D, Mukkanti K, 2010. A validated stability-indicating UPLC method for desloratadine and its impurities in pharmaceutical dosage forms. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51 (3): 736–742.
- Ravichandiran V, Devajaran V, Masilamani K, 2011. Determination of ionization constant (pK<sub>a</sub>) for poorly soluble drugs by using surfactants: a novel approach. *Der Pharmacia Lettre*, 3 (4): 183–92.
- Reijenga J, Hoof A, Loon A, Teunissen B, 2013. Development of Methods for the Determination of pK<sub>a</sub> Values. *Analytical Chemistry Insights*, 8: 53–71.
- Rosenberg LS, Simons J, Schulman SG, 1979. Determination of pK<sub>a</sub> values of N-heterocyclic bases by fluorescence spectrophotometry. *Talanta*, 26 (9): 867-871.

- Roses M, Bosch E, 2002. Influence of Mobile Phase Acid–Base Equilibria on The Chromatographic Behaviour of Protolytic Compounds. *Journal of Chromatography A.*, 982 (1): 1–30.
- Rosotti FJC, Rosotti H, 1962. The Determination of Stability Constants and Other Equilibrium Constants in Solution, (Series in Advanced Chemistry). Doi: 10.1021/ed039p379.1
- Salem II, Idrees J, Al Tamimi JI, 2004. Determination of loratadine in human plasma by liquid chromatography electrospray ionization ion-trap tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34 (1): 141-151.
- Sarmini K, Kenndler E, 1998. Capillary zone electrophoresis in mixed aqueous-organic media: effect of organic solvent on actual ionic mobilities, acidity constants and separation selectivity of substituted aromatic acids. I. Methanol. *J. Chromatogr. A.*, 806 (2): 325–335.
- Saurina J, Hernandez-Cassou S, Tauler R, Izquierdo-Ridorsa A, 2000. Spectrophotometric determination of pK(a) values based on a pH gradient flow-injection system. *Anal. Chim. Acta.*, 408 (1–2): 135–143.
- Shedlovsky T, 1962. The behavior of carboxylic acids in mixed solvents. 146-151, in. (Eds: Pesce B ), *Electrolytes*. Pergamon Press, New York.
- Simons FER, 2003. Allergy Principles and Practice. 834-870, in. (Eds: Middleton EJr, Reed CE, Ellis EF, Adkinson NFJr, Yunginger JW, Busse WW, ). *Antihistamins* , Philadelphia.
- Sixma JLF, Wynberg H, 1964. *A Manual of Physical in Organic Chemistry*, 69 (7): 1-655.
- Skoog DA, Holler FJ, Crouch SR, 2013. Kromatografik Ayırmalara Giriş- Gaz Kromatografisi- Sıvı Kromatografisi. 762-851, içinde. (Eds: Kılıç E, Yılmaz H), *Enstrümantal Analiz İlkeleri*. Bilim Yayınevi, Ankara.
- Soovali L, Rodima T, Kaljurand I, Kütt A, Koppel IA, Leito I, 2006. Basicity of some P1 phosphazenes in water and in aqueous surfactant solution Basicity of some P1 phosphazenes in water and in aqueous surfactant solution. *Org. Biomol. Chem.*, 4: 2100-2105.
- Srinubabu G, Patel RS, Shedbalkar VP, Rao AA, Rao MN, Bandaru VVR, 2007. Development and validation of high-throughput liquid chromatography–tandem mass spectrometric method for simultaneous quantification of loratadine and desloratadine in human plasma. *Journal of Chromatography B.*, 860 (2): 202-208.
- Tajc SG, Tolbert BS, Basavappa R, Miller BL, 2004. Direct determination of thiol pK<sub>a</sub> by isothermal titration microcalorimetry. *J. Am. Chem. Soc.*, 126 (34): 10508-10509.
- Takacs-Novak K, Tam KY, 2001. Multiwavelength spectrophotometric determination of acid dissociation constants: a validation study. *Anal. Chim. Acta.*, 434 (1): 157–167.

- Takacs-Novak K, Box KJ, Avdeef A, 1997. Potentiometric  $pK(a)$  determination of water-insoluble compounds: Validation study in methanol/water mixtures. *International Journal of Pharmaceutics*, 151 (2): 235-248.
- Tehan BG, Lloyd EJ, Wong MG, Pitt WR, Montana JG, 2002. Estimation of  $pK_a$  using semi empirical molecular orbital methods. Part 1: Application to phenols and carboxylic acids. *QSAR.*, 21 (5): 457-472.
- Ter-Laak AM, Tsai RS, Kelder GM, Carrupt PA, Testa B, Timmerman H, 1994. Lipophilicity and hydrogen-bonding capacity of H1-antihistaminic agents in relation to their central sedative side-effects. *Europe Journal Pharmaceutical Science*, 2 (5-6): 373-384.
- Tyman-Szram B, Musiol R, Sajewicz M, Polanski J, 2005. Thin-layer chromatographic determination of the  $pK_a$  values of organic acids and bases. *Journal of Planar Chromatography - Modern TLC.*, 8 (104): 323-325.
- Ülker S, 1991. İzole İnsan Lökositlerinden Histamin Saliverilmesi ve Histamin Reseptörlerinin Rolü. Tıpta Uzmanlık Tezi, Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi, İzmir.
- Vitenberg G, Ioffe VB, Dimitrova StZ, Strukova PT, 1976. Application of gas chromatographic headspace analysis to the characterization of chemical equilibria in solutions. *Journal of Chromatography A.*, 126 (3): 205-211.
- Vlase L, Imre S, Muntean D, Leucuta SE, 2007. Determination of loratadine and its active metabolite in human plasma by high-performance liquid chromatography with mass spectrometry detection. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44 (3): 652-657.
- Wigler PW, 1963. The kinetics of snake venom phosphodiesterase, with a new type of substrate, 3-pyridyl thymidine 5'-phosphate. *J. Biol. Chem.*, 238: 1767-1771.
- Wigler WP, Wilson EL, 1966. Spectrophotometric determination of the acid dissociation constants of 3-hydroxypyridine. *Analytical Biochemistry*, 15 (3): 421-425.
- Xie D, Gulnik S, Collins L, Gustchina E, Suvorov L, Erickson JW, 1997. Dissection of the pH dependence of inhibitor binding energetics for an aspartic protease: direct measurement of the protonation states of the catalytic aspartic acid residues. *Biochemistry*, 36 (51): 16166-16172.
- Xing L, Glen RC, Clark RD, 2003. Predicting  $pK(a)$  by molecular tree structured fingerprints and PLS. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.*, 43 (3): 870-879.
- Xu HR, Li XN, Chen WL, Chu NN, 2007. Simultaneous determination of desloratadine and its active metabolite 3-hydroxydesloratadine in human plasma by LC/MS/MS and its

application to pharmacokinetics and bioequivalence. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 45 (4): 659-666.

Yasuda M, 1959. Dissociation Constants of Some Carboxylic Acids in Mixed Aqueous Solvents. *Bulletin Chemical Society Japan*, 32 (5): 429–432.

Zheng J, Rustum AM, 2010. Rapid separation of desloratadine and related compounds in solid pharmaceutical formulation using gradient ion-pair chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 51 (1): 146-152.

Zimmerman I, 1982. Determination of  $pK_a$  values from solubility data. *Int. J. Pharm.*, 13 (1): 57-65.



## ÖZGEÇMİŞ

08.12.1986 tarihinde Muş ilinde dünyaya geldi. İlk ve ortaöğrenimini Muş' da tamamladı. 2011 yılında Tunceli Üniversitesi Mühendislik Fakültesi Kimya Mühendisliği Bölümü' nde lisans eğitimine başladı. 2015 yılında mezun oldu ve aynı yıl içinde Bitlis Eren Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı' nda tezli yüksek lisans öğrenimine başladı. Evli olup, yabancı dili İngilizce' dir.

Yasemin TEKİN KOCABAY

