

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

**ZOFENOPRİL, ASEKLOFENAK VE DEKSKETOPROFENİN
pKa DEĞERLERİNİN TERS FAZ SIVI KROMATOĞRAFİK
YÖNTEMLE TAYİNİ**

Nevzat ÇINAR

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

**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2016**



© 2016 [Nevzat ÇINAR]

TEZ ONAYI

Nevzat ÇINAR tarafından hazırlanan " Zofenopril, Aseklufenak ve Deksketoprofenin pKa Değerlerinin Ters Faz Sıvı Kromatografik Yöntemle Tayini " adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

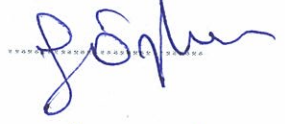
Danışman

Prof. Dr. A. Güleren ALSANCAK
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. A. Güleren ALSANCAK
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Doç. Dr. Gülден BAŞYİĞİT KILIÇ
Mehmet Akif Ersoy Üniversitesi



Enstitü Müdürü

Doç.Dr.Yasin TUNCER

TAAHHÜTNAME

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

Nevzat ÇINAR



İÇİNDEKİLER

| | Sayfa |
|--|-------|
| İÇİNDEKİLER | i |
| ÖZET | iii |
| ABSTRACT | iv |
| TEŞEKKÜR | v |
| ŞEKİLLER DİZİNİ | vi |
| ÇİZELGELER DİZİNİ | ix |
| 1. GİRİŞ | 1 |
| 1.1. Antihipertansif İlaçlar | 1 |
| 1.1.1. Renin anjiyotensin aldosteron sistemi (RAAS) | 2 |
| 1.1.2. Antihipertansif ilaçların sınıflandırılması | 2 |
| 1.1.3. Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörleri | 4 |
| 1.1.4. Zofenopril | 5 |
| 1.2. Antienflamatuar İlaçlar | 6 |
| 1.1.5. NSAID'lerin etki mekanizmaları ve kullanım alanları | 8 |
| 1.1.6. NSAID'lerin farmakokinetik özellikleri | 9 |
| 1.1.7. Aseklofenak | 9 |
| 1.1.8. Deksketoprofen | 9 |
| 1.1.9. NSAID grubu ilaçların iyonlaşma sabitleri | 10 |
| 1.2. Kromatografi | 10 |
| 1.2.1. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması | 11 |
| 1.2.2. Yüksek performans sıvı kromatografi | 12 |
| 1.2.3. Yüksek performans sıvı kromatografide kullanılan temel kavramlar | 15 |
| 1.2.3.1. Alıkonma suresi | 15 |
| 1.2.3.2. Kapasite faktörü (Alıkonma faktörü) | 15 |
| 1.2.3.3. Seçicilik katsayısı (α) | 16 |
| 1.2.3.4. Kolon verimliliğinin kantitatif tanımı | 16 |
| 1.2.3.5. Bir kolonda teorik tabaka sayısı | 16 |
| 1.2.3.6. Ayırma gücü (R_s) | 17 |
| 1.2.4. Alıkonmada önemli parametreler | 17 |
| 1.2.5. Sabit faz | 18 |
| 1.2.6. Su-organik çözücü karışımlarında pH | 20 |
| 1.2.7. Su –Organik çözücü ikili karışımlarında iyonlaşma sabiti tayini | 20 |
| 1.2.8. Sıvı kromatografi yöntemiyle pK_a tayini | 21 |
| 1.3. Potansiyometrik Titrasyonlar | 25 |
| 1.4. Potansiyometrik Yöntemle pK_a Tayininde Kullanılan Bağlıntılar | 25 |
| 1.4.1. Kuvvetli Monoprotik Asitler için Gran Eşitlikleri | 25 |
| 1.4.2. Zayıf Monoprotik Asitler için Gran Eşitlikleri | 29 |
| 2. KAYNAK ÖZETLERİ | 32 |
| 3. MATERYAL VE METOT | 33 |
| 3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler | 33 |
| 3.2. Kullanılan Cihazlar | 34 |
| 3.2.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı | 34 |
| 3.2.2. Kolon | 35 |
| 3.2.3. pH/iyon metre | 35 |
| 3.3. Kullanılan çözeltiler | 35 |
| 3.3.1.1. %30 (v/v) ACN:H ₂ O ikili karışımı | 35 |

| | |
|---|----|
| 3.3.1.2. %35 ACN:H ₂ O (v/v) ikili karışımı | 36 |
| 3.3.1.3. %40 (v/v) ACN:H ₂ O (v/v).ikili karışımı | 36 |
| 3.3.1.4. Potasyum hidrojen fitalat çözeltisi..... | 36 |
| 3.3.1.5. Zofenopril, aseklofenak ve deksketoprofen çözeltileri..... | 37 |
| 3.4. Potansiyometrik Titrasyonlar | 37 |
| 3.4.1. Kullanılan Cihazlar | 37 |
| 3.4.1.1. pH/ iyon metre | 37 |
| 3.4.2. pK _a Tayininde Kullanılan Çözeltiler | 37 |
| 3.4.2.1. %50 ACN:H ₂ O (v/v).İkili Karışımının Hazırlanması..... | 37 |
| 3.4.2.2. İyonik Şiddet Ayarlayıcının Hazırlanması..... | 37 |
| 3.4.2.3. Asit Çözeltisinin Hazırlanması | 38 |
| 3.4.2.4. Baz Çözeltisinin Hazırlanması..... | 38 |
| 3.4.2.5. Zofenopril, aseklofenak ve deksketoprofen çözeltileri..... | 38 |
| 3.5. Yöntem | 38 |
| 3.5.1. Sıvı kromatografik yöntemle tayin | 38 |
| 3.5.2. Potansiyometrik Titrasyonlar..... | 39 |
| 4. ARAŞTIRMA BULGULARI | 40 |
| 4.1. Bileşiklerin Marvin Sketch Programı İle İyonlaşma/Protonasyon Sabitlerinin Tayini..... | 40 |
| 4.2. Bileşiklerin ACD-Lab Programı İle İyonlaşma/Protonasyon Sabitlerinin Tayini | 41 |
| 4.3. Bileşiklerin HPLC Yöntemiyle Farklı Su-Organik Çözücü İkili Karışımlarında İyonlaşma Sabitlerinin Tayini | 42 |
| 4.3.1. Zofenopril için sıvı kromatografik veriler | 42 |
| 4.3.2. Aseklofenak için sıvı kromatografik veriler | 49 |
| 4.3.3. Deksketoprofen için sıvı kromatografik veriler..... | 55 |
| 4.4. Potansiyometrik Yöntemle İyonlaşma Sabiti Tayini..... | 62 |
| 4.4.1. KHP İçin %50 ACN:H ₂ O (v/v) İkili Karışımındaki Potansiyometrik Titrasyon Grafikleri..... | 62 |
| 4.4.2. Zofenoprilin potansiyometrik titrasyon veri ve grafikleri | 65 |
| 4.4.3. Aseklofenakın potansiyometrik titrasyon veri ve grafikleri | 67 |
| 4.4.4. Deksketoprofenin potansiyometrik titrasyon veri ve grafikleri..... | 69 |
| 4.5. Su Ortamındaki pK _a Değerlerinin Tayini..... | 72 |
| 4.5.1. Mol kesri ile pK _a tayini yöntemi..... | 72 |
| 5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR | 74 |
| 6. KAYNAKLAR | 76 |

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ZOFENOPRİL, ASEKLOFENAK VE DEKSKETOPROFENİN pK_a DEĞERLERİNİN TERS FAZ SIVI KROMATOĞRAFİK YÖNTEMLE TAYİNİ

Nevzat ÇINAR

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Güleren ALSANCAK

Hipertansiyon, arteriyel kan basıncının sürekli 140/90 mmHg üzerinde olması ile kendini gösteren sistemik bir hastalıktır. Hipertansiyon tedavisindeki temel hedefler, kalp damar morbidite ve ölüm oranını azaltmaktır. NSAID'ler analjezik antipretik ve antienflamatuar olarak kullanılan ilaçlardır.

Bu çalışmada, zofenopril, aseklofenak ve deksketoprofenin HPLC metodu ile pK_a tayini amaçlanmıştır. Çünkü bu bileşiklerle ilgili literatürlerde çok fazla veri bulunmamaktadır. Zofenopril, aseklofenak ve deksketoprofenin pK_a tayininde hareketli faz asetonitril derişimi ile mobil faz pH sınır bileşiklerin alıkonma zamanı üzerine etkileri incelenmiştir. Bu çalışmada, Nucleosil 300-5 C4 (250 mm, 4,6 mm, 5 µm) kolonu kullanılmıştır. Mobil faz akış hızı 1 mL/dakika ve kolon sıcaklığı 37°C olarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Zofenopril, Aseklofenak, Deksketoprofen, NSAID, ADE, HPLC,

pK_a

2016, 81 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

DETERMINATION of pK_a VALUES of ZOFENOPRİL, ACECLOFENAC AND DEXKETOPROFEN BY USING REVERSED PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHIC METHOD

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

Supervisor: Prof. Dr. A. Güleren ALSANCAK

Hypertension is a systematic disease that occurs with high arterial blood pressure and is defined as the rising of blood pressure above 140/90 mmHg and over. The main objective in hypertension treatment is to reduce heart-vessel morbidity and mortality rate. NSAIDs are used commonly analgesic, antipyretic and anti-inflammatory.

The aim of this study was to determine the pK_a values of some NSAIDs in acetonitrile water binary mixtures in order to estimate the effect of ACN concentration on these values. For this, a high-performance liquid chromatography method was preferred and the pK_a's of the compounds were determined at three different concentration of ACN by using the relationships between retention times and eluent pH. Experimental studies were carried out using Nucleosil 300-5 C4 (25 cm × 4,6 mm × 5µm) column. The results obtained revealed the method can be used for this purpose.

Keywords: Zofenopril, Aceclofenac, Dexketoprofen, HPLC, NSAID, ACE, pK_a

2016, 81 page

TEŞEKKÜR

Bu araştırma için beni yönlendiren, her zaman bilgi ve tecrübesi ile yanımda olan değerli Danışmanım Prof. Dr. Güleren ALSANCAK'a, tez çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Hocam Doç.Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY'a ve tüm çalışmalarım boyunca hep destek olan her soruma güleryüzle cevap veren ve hiç yalnız bırakmayan Araş. Görev. Kader POTURCU ve Günseli ELGÖMÜŐ'e teőekkürlerimi sunarım.

Tezimin her aşamasında beni yalnız bırakmayan, maddi-manevi hep yanımda olan ve beni sonuna kadar destekleyen Ailem'e sonsuz sevgi ve saygılarımı sunarım.

Nevzat ÇINAR
ISPARTA, 2016

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

| | |
|---|----|
| Şekil 1.1. ADE inhibitörlerinin genel yapısı..... | 4 |
| Şekil 1.2. Zofenopril ve zofenoprilatın yapısı..... | 6 |
| Şekil 1.3. Maddelerin bantlar şeklinde ayrılması..... | 11 |
| Şekil 1.4. Mobil faz ve durgun faz etkileşimi | 12 |
| Şekil 1.5. HPLC' nin yapısı | 14 |
| Şekil 1.6. Ayırma gücünün şematik gösterimi | 17 |
| Şekil 1.7. Hareketli faz pH'sının asidik, bazik ve zwitter iyonik türlerin alıkonma faktörlerine etkisi..... | 18 |
| Şekil 1.8. Bazı sabit faz türleri | 19 |
| Şekil 1.9. Farklı özellikteki kolonlar..... | 20 |
| Şekil 1.10. Zayıf asidik bileşiklerde pH'nın kapasite faktörüne etkisi | 24 |
| Şekil 4.1. Zofenoprilin %30 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki pH'nın alıkonma faktörüne etkisi | 43 |
| Şekil 4.2. Zofenoprilin %35 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki pH'nın alıkonma faktörüne etkisi | 43 |
| Şekil 4.3. Zofenoprilin %40 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki pH'nın alıkonma faktörüne etkisi | 44 |
| Şekil 4.4. Zofenopril için %30 ACN:H ₂ O (v/v) ortamında $\log(1-(D^*1-f))-\log t_r$ grafiği | 44 |
| Şekil 4.5. Zofenopril için %35 ACN:H ₂ O (v/v) ortamında $\log(1-(D^*1-f))-\log t_r$ grafiği | 45 |
| Şekil 4.6. Zofenopril için %40 ACN:H ₂ O (v/v) ortamında $\log(1-(D^*1-f))-\log t_r$ grafiği | 45 |
| Şekil 4.7. Zofenoprilin %30 ACN:H ₂ O (v/v) ortamında deneysel $\log t_r$ -hesaplanan $\log t_r$ grafiği | 46 |
| Şekil 4.8. Zofenoprilin %35 ACN:H ₂ O.(v/v) ortamında deneysel $\log t_r$ -hesaplanan $\log t_r$ grafiği | 46 |
| Şekil 4.9. Zofenoprilin %40 ACN:H ₂ O ortamında deneysel $\log t_r$ -hesaplanan $\log t_r$ grafiği | 46 |
| Şekil 4.10. Zofenoprilin %30 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 4,2.. | 47 |
| Şekil 4.11. Zofenoprilin %30 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 6,0.. | 47 |
| Şekil 4.12. Zofenoprilin %35 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 2,4.. | 47 |
| Şekil 4.13. Zofenoprilin %35 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 4,2.. | 48 |
| Şekil 4.14. Zofenoprilin %40 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 3,0.. | 48 |
| Şekil 4.15. Zofenoprilin %40 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 6,0.. | 48 |
| Şekil 4.16. Aseklofenak için %30 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki pH'nın alıkonma faktörüne etkisi..... | 50 |
| Şekil 4.17. Aseklofenak için %35 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki pH'nın alıkonma faktörüne etkisi..... | 50 |
| Şekil 4.18. Aseklofenak için %40 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki pH'nın alıkonma faktörüne etkisi..... | 50 |
| Şekil 4.19. Aseklofenakın %30 ACN:H ₂ O.(v/v) ortamında $\log(1-(D^*1-f))-\log t_r$ grafiği | 51 |
| Şekil 4.20. Aseklofenakın %35 ACN:H ₂ O (v/v) ortamında $\log(1-(D^*1-f))-\log t_r$ grafiği | 51 |
| Şekil 4.21. Aseklofenakın %40 ACN:H ₂ O (v/v) ortamında $\log(1-(D^*1-f))-\log t_r$ grafiği | 52 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.22. Aseklöfenakın %30 ACN:H ₂ O (v/v) ortamında deneysel log t _r - hesaplanan | 52 |
| Şekil 4.23. Aseklöfenakın %35 ACN:H ₂ O (v/v) ortamında deneysel log t _r - hesaplanan | 53 |
| Şekil 4.24. Aseklöfenakın %40 ACN:H ₂ O (v/v) ortamında deneysel log t _r - hesaplanan | 53 |
| Şekil 4.25. Aseklöfenakın %30 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 3,6..... | 53 |
| Şekil 4.26. Aseklöfenakın %30 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 5,4..... | 54 |
| Şekil 4.27. Aseklöfenakın %35 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 2,4..... | 54 |
| Şekil 4.28. Aseklöfenakın %35 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 6,0..... | 54 |
| Şekil 4.29. Aseklöfenakın %40 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 4,2..... | 55 |
| Şekil 4.30. Aseklöfenakın %40 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 6,6..... | 55 |
| Şekil 4.31. Deksketoprofen için %30 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki pH'nın alıkonma faktörüne etkisi | 56 |
| Şekil 4.32. Deksketoprofen için %35 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki pH'nın alıkonma faktörüne etkisi | 57 |
| Şekil 4.33. Deksketoprofen için %40 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki pH'nın alıkonma faktörüne etkisi | 57 |
| Şekil 4.34. Deksketoprofenin %30 ACN:H ₂ O (v/v) ortamında log(1-(D*1-f))-log t _r grafiği | 58 |
| Şekil 4.35. Deksketoprofenin %35 ACN:H ₂ O (v/v) ortamında log(1-(D*1-f))-log t _r grafiği | 58 |
| Şekil 4.36. Deksketoprofenin %40 ACN:H ₂ O (v/v) ortamında log(1-(D*1-f))-log t _r grafiği | 58 |
| Şekil 4.37. Deksketoprofenin %30 ACN:H ₂ O (v/v) ortamında deneysel log t _r - hesaplanan log t _r grafiği | 59 |
| Şekil 4.38. Deksketoprofenin %35 ACN:H ₂ O (v/v) ortamında deneysel log t _r - hesaplanan log t _r grafiği | 59 |
| Şekil 4.39. Deksketoprofenin %40 ACN:H ₂ O (v/v) ortamında deneysel log t _r - hesaplanan log t _r grafiği | 60 |
| Şekil 4.40. Deksketoprofenin %30 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 3,6..... | 60 |
| Şekil 4.41. Deksketoprofenin %30 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 6,6..... | 61 |
| Şekil 4.42. Deksketoprofenin %35 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 2,4..... | 61 |
| Şekil 4.43. Deksketoprofenin %35 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 4,2..... | 61 |
| Şekil 4.44. Deksketoprofenin %40 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 4,8..... | 62 |
| Şekil 4.45. Deksketoprofenin %40 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 7,2..... | 62 |
| Şekil 4.46. KHP'nin % 50 (v/v) ACN:H ₂ O ortamındaki titrasyon grafiği | 64 |

| | |
|--|----|
| Şekil 4.47. KHP'nin %50 (v/v) ACN:H ₂ O ortamındaki potansiyometrik titrasyon grafiği | 64 |
| Şekil 4.48. KHP'nin %50 (v/v) ACN:H ₂ O ortamındaki Bjerrum grafiği | 64 |
| Şekil 4.49. Zofenoprilin %50 (v/v) ACN:H ₂ O ortamındaki titrasyon grafiği | 66 |
| Şekil 4.50. Zofenoprilin %50 (v/v) ACN:H ₂ O ortamındaki poansiyometrik titrasyon grafiği | 66 |
| Şekil 4.51. Zofenoprilin %50 (v/v) ACN:H ₂ O ortamındaki Bjerrum grafiği | 66 |
| Şekil 4.52. Aseklofenakın %50 (v/v) ACN:H ₂ O ortamındaki titrasyon grafiği | 68 |
| Şekil 4.53. Aseklofenakın %50 (v/v) ACN:H ₂ O ortamındaki poansiyometrik titrasyon pH-φ grafiği..... | 68 |
| Şekil 4.54. Aseklofenakın %50 (v/v) ACN:H ₂ O ortamındaki Bjerrum grafiği | 68 |
| Şekil 4.55. Deksketoprofenin titrasyon grafiği:%50 (v/v) ACN:H ₂ O ortamında | 71 |
| Şekil 4.56. Deksketoprofenin %50 (v/v) ACN:H ₂ O ortamındaki poansiyometrik titrasyon pH-φ grafiği..... | 71 |
| Şekil 4.57. Deksketoprofenin %50 (v/v) ACN:H ₂ O ortamındaki Bjerrum grafiği.... | 71 |
| Şekil 4.58. Zofenopril için ACN:H ₂ O ortamında mol kesrinin pK _a üzerine etkisi.... | 72 |
| Şekil 4.59. Aseklofenak için ACN:H ₂ O ortamında mol kesrinin pK _a üzerine etkisi. | 72 |
| Şekil 4.60. Deksketoprofen için ACN:H ₂ O ortamında mol kesrinin pK _a üzerine etkisi | 73 |

ÇİZELGELER DİZİNİ

Sayfa

| | |
|---|----|
| Çizelge 1.1. Hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçlar..... | 3 |
| Çizelge 1.2. Opioid, analid ve NSAID'lerin sınıflandırılması..... | 7 |
| Çizelge 2.1. Zofenopril, aseklofenak ve deksketoprofenle ilgili çalışmalar | 32 |
| Çizelge 3.1. Çalışılan bileşikler ve özellikleri | 33 |
| Çizelge 3.2. Kromatografik çalışmada kullanılan kimyasal maddeler | 34 |
| Çizelge 3.3. Potansiyometrik çalışmada kullanılan kimyasal maddeler | 34 |
| Çizelge 4.1. Zofenopril, aseklofenak ve deksketoprofen'in Marvin Sketch programıyla hesaplanmış pK_a ve $\log P$ değerleri..... | 40 |
| Çizelge 4.2. Zofenopril, aseklofenak ve deksketoprofen'in ACD-Lab programıyla hesaplanmış $\log P$ değerleri | 41 |
| Çizelge 4.3. Zofenopril için %30 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki alıkonma zamanı (t_r), kuyruklanma faktörü (T_f) ve etkin tabaka sayısı (N) değerleri | 42 |
| Çizelge 4.4. Zofenopril için %35 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki alıkonma zamanı (t_r), kuyruklanma faktörü (T_f) ve etkin tabaka sayısı (N) değerleri | 42 |
| Çizelge 4.5. Zofenopril için %40 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki alıkonma zamanı (t_r), kuyruklanma faktörü (T_f) ve etkin tabaka sayısı (N) değerleri | 43 |
| Çizelge 4.6. Aseklofenak için %30 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki alıkonma zamanı (t_r), kuyruklanma faktörü (T_f) ve etkin tabaka sayısı (N) değerleri | 49 |
| Çizelge 4.7. Aseklofenak için %35 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki alıkonma zamanı (t_r), kuyruklanma faktörü (T_f) ve etkin tabaka sayısı (N) değerleri | 49 |
| Çizelge 4.8. Aseklofenak için %40 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki alıkonma zamanı (t_r), kuyruklanma faktörü (T_f) ve etkin tabaka sayısı (N) değerleri | 49 |
| Çizelge 4.9. Deksketoprofen için %30 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki alıkonma zamanı (t_r), kuyruklanma faktörü (T_f) ve etkin tabaka sayısı (N) değerleri | 55 |
| Çizelge 4.10. Deksketoprofen için %35 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki alıkonma zamanı (t_r), kuyruklanma faktörü (T_f) ve etkin tabaka sayısı (N) değerleri..... | 56 |
| Çizelge 4.11. Deksketoprofen için %40 ACN:H ₂ O (v/v) ortamındaki alıkonma zamanı (t_r), kuyruklanma faktörü (T_f) ve etkin tabaka sayısı (N) değerleri..... | 56 |
| Çizelge 4.12. KHP'nin % 50 (v/v) ACN:H ₂ O ortamındaki titrasyon verileri | 63 |
| Çizelge 4.13. Zofenoprilin % 50 (v/v) ACN:H ₂ O ortamındaki titrasyon verileri..... | 65 |
| Çizelge 4.14. Aseklofenakın % 50 (v/v) ACN:H ₂ O ortamındaki titrasyon verileri.. | 67 |
| Çizelge 4.15. Deksketoprofenin % 50 (v/v) ACN:H ₂ O ortamındaki titrasyon verileri | 69 |
| Çizelge 5.1. Zofenopril kalsiyum, aseklofenak ve deksketoprofen trometamol bileşiklerinin potansiyometrik titrasyon yöntemiyle elde edilen pK_a değerleri | 74 |
| Çizelge 5.2. Zofenopril için Origin Pro2015 programıyla hesaplanan $t_{r,HA}$, $t_{r,A}$ ve pK_a değerleri | 74 |
| Çizelge 5.3. Aseklofenak için Origin Pro2015 programıyla hesaplanan $t_{r,HA}$, $t_{r,A}$ ve pK_a değerleri..... | 75 |
| Çizelge 5.4. Deksketoprofen için Origin Pro2015 programıyla hesaplanan $t_{r,HA}$, $t_{r,A}$ ve pK_a değerleri..... | 75 |

1. GİRİŞ

Bu çalışmada karboksil grubu içeren üç ilaç aktif maddesinin fonksiyonel gruplarına ait iyonlaşma sabitleri ters faz sıvı kromatografi yöntemiyle tayin edilmiştir. Zofenopril, hipertansiyon tedavisine kullanılan anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörüdür. Aseklufenak ve deksketoprofen, anti-inflamatuvar, analjezik ve antipiretik özellikler gösteren ilaç etken maddeleridir.

1.1. Antihipertansif İlaçlar

Hipertansiyon, atardamarlardaki kan basıncının yükseldiği kronik bir tıbbi durumdur. Bu basınç artışı sonucu, kalp kanın damarlarda dolaşımını sağlamak için normalden daha fazla çalışmak zorunda kalır. Kan basıncı iki, sistolik ve diyastolik ölçümü içermekte olup, bunlar kalp kaslarının kalp atışları arasında kasılması (sistol / büyük tansiyon) veya gevşemesine (diyastol / küçük tansiyon) bağlıdır. Dinlenme halinde normal kan basıncı, büyük tansiyon 100–140 mmHg (en yüksek nokta) ve küçük tansiyon 60–90 mmHg (en alt nokta) arasında seyrederek. Yüksek tansiyon, tansiyonun sürekli 140/90 mmHg ve üzerinde bir seviyede olmasıdır (Mycek vd., 1998).

Hipertansiyon birincil (sürekli) hipertansiyon veya ikincil hipertansiyon olarak sınıflandırılır. Vakaların yaklaşık %90–95'i "birincil hipertansiyon" olarak sınıflandırılmış olup bu, altta yatan herhangi belirli bir sebep olmadan kan basıncının yüksek olması anlamına gelir. Böbrekleri, atardamarları, kalbi veya endokrin sistemini etkileyen ikincil hipertansiyon vakaların, geri kalan %5-10'luk dilimini oluşturur (Zungur ve Yıldız, 2004).

Hipertansiyon; inme, miyokard enfarktüsü (kalp krizleri), kalp yetmezliği, atardamar aneurizması, periferik arter hastalığı için ana risk faktörü olup, kronik böbrek hastalığının da nedenlerinden biridir. Arteriyel kan basıncının azıcık artışı bile ortalama yaşam süresinin kısalması ile bağlantılıdır. Beslenme ve yaşam şeklindeki değişiklikler tansiyon kontrolünü iyileştirebilir ve ilgili sağlık komplikasyon risklerini azaltabilir. Ancak, yaşam şeklindeki değişikliklerin etkili olmadığı veya

yetersiz kaldığı kişiler için genelde ilaçla tedavi gereklidir. Yüksek tansiyon sonucu Beyin Kanaması gerçekleşmesi oranı oldukça yüksektir.

1.1.1. Renin anjiyotensin aldosteron sistemi (RAAS)

Renin-anjiyotensin sistemi (RAS) ya da Renin anjiyotensin aldosteron sistemi (RAAS), kan basıncını ve sıvı dengesini düzenleyen hormonal bir sistemdir.

Kan basıncı düştüğünde, jukstaglomerüler hücreye ulaşan sodyum klorür seviyesi düştüğünde böbrekteki jukstaglomerüler hücreler renin salgırlar. Renin, anjiyotensinojenden anjiyotensin I oluşumunu uyarır. Anjiyotensin I ise daha sonra anjiyotensin dönüştürücü enzim ile (ADE-ACE) anjiyotensin II ye dönüştürülür. Anjiyotensin II kan damarlarında kan basıncının artmasını sağlayan vazokonstriksiyonu oluşturur. Anjiyotensin II aynı zamanda adrenal korteksten aldosteron hormonunun salınımını uyarır. Aldosteron böbrek tübüllerinden kana sodyum ve su geri alımını artırır. Bu vücudun sıvı miktarını ve dolayısıyla kan basıncını artırır (Guyton ve Hall,2007).

Renin anjiyotensin aldosteron sistemi fazla aktifse, kan basıncı fazla olacaktır. Birçok ilaç farklı basamaklarda bu sistemi keserek kan basıncını düşürürler. Bu ilaçlar, hipertansiyonun, kalp ve böbrek yetmezliklerinin, diyabetin zararlı etkilerinin önlenmesinde ana yollardan birini teşkil ederler.

1.1.2. Antihipertansif ilaçların sınıflandırılması

Hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçlar 5 ana grupta toplanabilir. Bunlar, diüretikler, sempatikolitikler ya da adrenerjik sinir sistemi antagonistleri, renin anjiotensin sistemini (RAS) etkileyen ilaçlar, damar düz kasında etkili ilaçlar ve yeni geliştirilmekte olan ilaçlardır. Hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçlar çizelge 1.1’de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Hipertansiyon tedavisinde kullanılan ilaçlar.

I. Diüretikler

- a. **Tiazitler:** Bendroflumetiazit, benzotiazit, kloпамid, klortalidon, klorotiazit, siklotiazit, hidroklorotiazit, indapamid, mefrusid, metolazon, ksipamid
- b. **Loop diüretikleri:** Furosemid, bumetanid, torsemid, azosemid, muzolimin, piretanid, tripamid
- c. **K⁺ tutucu diüretikler:** Amilorid, triamteren
- d. **Aldosteron reseptör antagonistleri:** Spironolakton, eflerenon, kanrenon, atekanrenon

II. Adrenerjik sinir sistemi antagonistleri

- A. Merkezi etkililer
- B. Periferik etkililer
 - a. Adrenerjik nöron blokerleri
 - b. Ganglion blokerleri
- C. Adrenerjik reseptör blokerleri
 - a. α reseptör blokerleri
 - b. β reseptör blokerleri
 - c. α ve β reseptör blokerleri (mikst etkililer)

III. Renin-anjiyotensin sistemini etkileyen ilaçlar

A. ACE inhibitörleri:

- a. Sülfür içerenler (kaptopril, alacepril, phentiapril, pivalopril, zofenopril).
- b. Karboksil grubu içerenler (enalapril, perindopril, trandolapril, ramipril, quinapril, delapril, cilazapril, benazepril, lisinopril, pentopril)
- c. Fosforil grubu içerenler (fosinopril)

B. Angiotensin II tip 1 reseptör antagonistleri: Losartan, valsartan, kandesartan, eprosartan, irbesartan, tasosartan, telmisartan

IV. Damar düz kasında etkili ilaçlar:

- #### A. Kalsiyum kanal blokerleri
- a. Dihidropridin (DHP) türevleri (nifedipin, lerkanidipine ve benzerleri)
 - b. Fenilalkil amin türevleri (verapamil ve gallopamil)
 - c. Benzodiazepin türevleri (diltiazem)
 - d. Tetralol türevleri (mifebradil)

B. Potasyum kanal açıcılar

C. Doğrudan damar düz kasını gevşetici ilaçlar

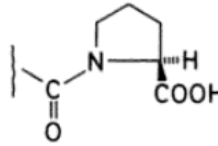
V. Yeni geliştirilmekte olan ilaçlar

- A. Nötral endopeptidaz peptid(NEP) inhibitörleri
- B. Endotelin I reseptör antagonistleri
- C. Renin inhibitörleri ve diğerleri

1.1.3. Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ADE) inhibitörleri

Kimyasal olarak ACE çinko iyonunun ligandı olan sülfidril, karboksil ya da fosforile olmak üzere üç tane farklı ADE inhibitörü sınıfı geliştirilmiştir. Değişik yapıda olmaları, dokulardaki dağılımlarını ve atılım yollarını etkilemektedir.

ADE inhibitörleri genel olarak yapılarında serbest karboksil grubu ve peptit bağı bulundurulur (Şekil 1.1). Karboksil grubuna ek olarak ADE inhibitörleri, yapılarına asitlik ya da amfolit özelliği sağlayan primer ve sekonder amino grupları ve sülfidril gibi gruplara sahip olabilir.



Şekil 1.1. ADE inhibitörlerinin genel yapısı

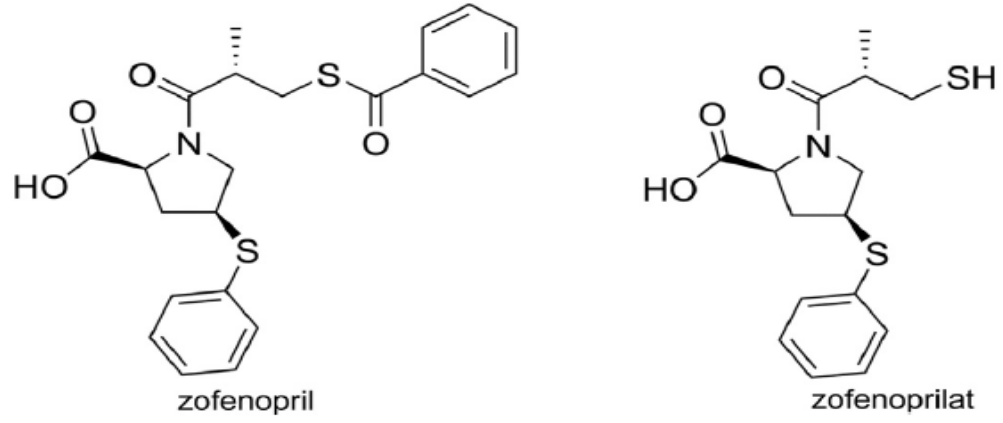
Sülfidril grubu içeren ADE inhibitörleri kaptopril, omaprilat, zofenopril ve pivalopril de içine alan gruptur. ADE inhibitörleri arasında fosinopril ve zofenopril sulu çözeltide, prolin terminal karboksil grubu iyonlaşabilen tek fonksiyonel grup olduğundan monoprotik asitler gibi davranır. Kaptopril, karboksil grubunun yanında bir diğer asidik grup olan sülfidril içerir. Aktif bir ilaç olan (aktif drog) kaptopril absorbe edildiğinde metabolize edilmeden etkisi başlamaktadır. Absorpsiyon %70'dir. Absorpsiyon hızlıdır ve kanda alındıktan 15 dakika sonra tespit edilir. Böbreklerle elimine edilir.

Dikarboksilat grubu içeren ADE inhibitörleri, enalapril, perindopril, trandolapril, ramipril, kinapril, delapril, silazepiril, benazepril, lisinopril, pentopril gibi inhibitörleri kapsayan en geniş ADE inhibitörü grubudur. Bu grup ilaçlar, bir asidik karboksil ve bir bazik sekonder amin grubu içeren amfolit türlerdir. Fosinopril dışında bütün ADE inhibitörleri, katyon, zwitteriyon ve anyon olmak üzere üç farklı formda bulunurlar. Bu grup ilaçlar, lisinopril hariç ön ilaçlardır. Absorbe edildikten sonra karaciğerde aktif ilaç haline çevrilir. Bu nedenle etkileri geç başlar.

Lisinopril bir diğerk ADE inhibitörü olan enalaprilin aktif metaboliti olan enalaprilatın lisin analogudur. Prolin grubu içeren, çözeltide amin bağı etrafında karşılıklı dönüşen iki izomer içerir. Polifonksiyonel, amfolit yapıda ve iki karboksil grubu (terminal ve proksimal) ve iki amino grubu (primer ve sekonder) olmak üzere dört iyonlaşabilen tür içermektedir. Lisinopril, ADE inhibitörleri arasında dört farklı pKa değeri olması nedeniyle farklılanmaktadır ve bu nedenle diğerk ADE inhibitörleri üç farklı formda (katyon, zwitteriyon ve anyon) bulunurken lisinopril, dikasyon, katyonik zwitteriyon, zwitteriyon, anyonik zwitteriyon ve dianyon olmak üzere beş farklı formda bulunmaktadır (Hillabert ve Van den Bossche, 2000). Metabolize edilmeyen bir prototiptir. Absorpsiyonu düşük orandadır (%30-40). Aktivasyonu için metabolize edilmesi gerekmez. Proteine bağlanmaz ve değışmemiş olarak böbreklerle atılır (Opie L.H., 1992). Fosinopril, inaktif özellik taşıyan fakat hidroliz sonucu tamamen aktif bir diasit olan fosinoprilata dönüştüğünden bir pro-drug gibi davranan, fosfat grubu içeren ADE inhibitörlerinin tek üyesidir. Prolin terminal karboksil grubu iyonlaşabilen tek fonksiyonel grup olduğundan zofenopril gibi monoprotik asit gibi davranır.

1.1.4. Zofenopril

Zofenopril uzun süreli doku penetrasyonu ve kardiyak anjiotensin dönüştürücü enzim inhibisyonu olan çok lipofilik bir anjiotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörüdür. Hafif ve orta şiddette hipertansiyonun tedavisi ve hemodinamik olarak stabil, kalp yetmezliği belirti ve semptomları olan akut miyokard enfarktüsülü hastaların tedavisinde kullanılmaktadır (Federico vd. 2014). Zofenopril bir ön ilaçtır; vücutta hidrolize uğrayarak zofenaprilata dönüşür. Zofenoprilat kimyasal yapı olarak sülfidril (SH) grubu içermesiyle karakterizedir. Yapılan çalışmalarda sülfidril grubu içeren bir ACE inhibitörü olan zofenoprilin nonsuperoksid serbest radikal temizleyici olarak etkin olduğunu; SH grubu içermeyenlerin ise inaktif olduğu gösterilmiştir (Pasini A.F., 2007). Zofenopril ve zofenoprilatın yapısı şekil 1.2'de gösterilmiştir.



Şekil 1.2. Zofenopril ve zofenoprilatın yapısı

Zofenopril, anjiyotensin I'in vazokonstriktör peptid anjiyotensin II'ye dönüşümünü katalize eden enzimi bloke edebilen bir sülfidril ADE inhibitörüdür, böylelikle vazopresör etkinlik azalır ve aldosteron salınımı azalır. Bu ikinci azalma sodyum ve sıvı kaybı ile beraber serum potasyum konsantrasyonunda bir artışa yol açabilir.

Anjiyotensin II'nin renin sekresyonu üzerindeki negatif geri besleme etkisinin kesilmesi plazma renin aktivitesinde artışa neden olur. Zofenoprilin kan basıncını azaltma mekanizmasının, öncelikle renin–anjiyotensin–aldosteron sisteminin baskılanması olduğuna inanılmaktadır (Giuseppe vd, 2010).

1.2. Antienflamatuar İlaçlar

Non-steroidal anti-inflamatuar ilaçlar ya da steroid dışı yangı önleyici ilaçlar, kısaca NSAID'ler, analjezik, antipiretik ve antienflamatuar etkili ilaçlardır. Ağrı, ateş ve inflamasyonu azaltırlar. "Non-steroidal" terimi bu ilaçları benzer etkileri olan (çok daha geniş etki alanları vardır) steroidlerden ayırmak için kullanılır. NSAID'ler narkotik değildirler.

1829'un başlarında, salisilik asitin izolasyonu ile birlikte NSAID'ler ağrının (düşük dozlarda) ve enflamasyonun (yüksek dozlarda) ilaçla tedavisinin önemli bir kısmını oluşturmaya başladı. NSAID'lerin popüler olmasında opioidlere göre çok az bağımlılık potansiyeli taşıması ve sedasyon veya solunum depresyonu yapmaması büyük rol oynadı.

NSAID'ların kısa tarihçesine bakıldığında; ilk kez 1820'de kolşisin, 1860'da salisilik asitin tanımlanmış ve ilk Aspirin tablet 1897'de Felix Hoffman tarafından sentezlenmiştir. Non-streoid antiinflamatuvar ilaç isminin 1949 yılında ilk kullanılışı, fenilbütazon'un sentezlenmesi ile eş zamanlıdır. 1971'de John R. Vane etki mekanizmaları konusunda yaptığı çalışmalar sonucunda ilk defa siklooksijenaz (COX) enzimini tanımlamış ve bu buluşla Nobel ödülü almıştır. 1976'da ise ilk defa prostoglandin endoperoksit sentetaz (siklooksijenaz) enzimi elde edilmiştir. Bu konu ile ilgili son gelişme 1990'ların başında COX'un tek bir molekul olmadığı, birden fazla izomerlerinin ve bunların da farklı işlevlerinin olduğunun gösterilmesi olmuştur (Prinesh vd, 2013).

Avrupa birliği ülkelerinde ağrı kesiciler, doğum kontrol ilaçları, antibiyotikler, kalp ilaçları, kolesterol ilaçları, sinir ve kemoterapi ilaçları vb. tıbbi ilaç yapımında yaklaşık 3000 farklı madde kullanılmaktadır (Fent vd, 2005). Tüm dünyada NSAID'ler en sık reçete edilen ilaç grubudur. NSAID'ler birçok ülkede yıllık yüzlerce ton mertebesinde kullanılmaktadır. Örneğin Türkiye'de 2007 yılında yaklaşık 130 milyon kutu NSAID kullanılmıştır. Amerika Birleşik Devletleri (ABD)nde ise yılda yaklaşık 100 milyon NSAID reçetesi yazılmaktadır. ABD'de yılda 40 milyar tablet aspirin kullanılmaktadır. Dünyada 300 ve ABD'de 14 milyondan fazla hasta düzenli olarak NSAID kullanmaktadır.

Opioid ve anilidler analjezik olarak kullanılırlar. Opioidler narkotik anilidler narkotik değildir. NSAID'ler anljezik antipiretik ve antiinflamatuvar olarak kullanılmaktadır ve narkotik değildir. Opioid, anilid ve NSAID'lerin sınıflandırılması çizelge 1.2'de verilmiştir.

Çizelge 1.2. Opioid, analid ve NSAID'lerin sınıflandırılması

| Opioids | Afyon ve Alkaloidler | Kodein, morfin, afyon, laudanum, paregorik |
|----------------|--------------------------------------|--|
| | Yarı-Sentetik Afyon Türevleri | Asetildihidrokodein, benzilmorfin, dezomorfin, dihidrokodein, dihidromorfin, etilmorfin, diamorfin, hidrokodon, hidromorfinol, hidromorfon, nikokodein, nikodikodein, nikomorfin, oksikodon, oksimorfon, tebakon |

Çizelge 1.2. Opioid, analid ve NSAID'lerin sınıflandırılması(devamı)

| | | |
|--|---|---|
| | Sentetik Opioidler | Alfaprodin, anileridin,buprenorfin, butorfanol, dekstromoramid, dekstropropoksipfen, dezosin,fentanil, ketobemidon, levorfanol,metadon, meptazinol, nalbufin, pentazocine, propoxyphene, propiram, pethidine, fenazosin, piminodin, piritramid, tapentadol, tilidin, tramadol |
| | Pirazolon sınıfı | Ampiron/aminofenazon, metamizol, fenazon |
| | Kannabinoidler | Ajulemikasit, AM404, kannabidiol, kenevir, nabilon, tetrahidrokannabinol |
| Anilidler | | Parasetamol (asetaminofen), fenasetin, propasetamol |
| Non Steroidal Anti-enflamatuvar ilaçlar | Salisilik asitler (salisilatlar) | Aspirin, amoksiptin, benorilat , kolin magnezyum salisilat, diflunisal, faislamin, metil salisilat, magnezyum salisilat, salisil salisilat (salsalat) |
| | Arilalkanoik asitler | Diklofenak, aseklofenak , asemetazin, bromfenak, etodolak, indometazin, ketorolak, nabumeton, sulindak, tolmetin |
| | Arilpropiyonik asitler (profenler) | İbuprofen, karpofen, fenbufen, fenoprofen, flurbiprofen, ketoprofen , loksoprofen, naproksen, tiyaprofenik asit, suprofen, pranoprofen |
| | N-Arilantranilik asitler(fenamik asitler) | Mefenamik asit,meklofenamik asit |
| | Pirazolidin türevleri | Fenibütazon, azapropazon, metamizol, oksifenbütazon, profenezon |
| | Oksikamlar | Piroksikam, lornoksikam, meloksikam,tenoksikam |
| | COX-2 inhibitörleri Sülfonanilidler | Selekoksib, etorikoksib, lumirakoksib, parekoksib, rofekoksib, valdekoksib, nimesulid |
| | Diğerleri | Likofelon, omega-3 yağ asitleri, benzidamizin, parasetamol, prokuazon |

1.1.5. NSAID'lerin etki mekanizmaları ve kullanım alanları

NSAID'ler siklooksijenaz enzimini inhibe ederek etkilerini gösterirler. Siklooksijenaz-1 (COX-1) ve siklooksijenaz-2 (COX-2) izoenzimlerinin her ikisini de inhibe ederler. Siklooksijenaz araşidonik asitten tromboksan ve prostaglandin yapımında katalizör görevi görür. Prostaglandinler inflamasyon oluşum sürecinde diğer görevli maddelerle birlikte iletim molekülü olarak rol oynar (Milan vd, 2007). Prostaglandinlerin sentezini azaltarak inflamasyonu hafifletirler. NSAID'ler ağrı eşliğini etkilemezler veya önceden sentezlenmiş prostaglandinler üzerine herhangi bir etkileri yoktur. Analjezik etkileri çoğu zaman periferik niteliktedir. Antipiretik etkileri santral sinir sisteminde hipotalamusu etkilemelerine bağlı vazodilatasyon yaparak gösterirler. Bu etkileri sonucunda cilt damarları genişler, ciltten ısı kaybı artar ve sonuçta ateş düşer, NSAID'ler anti-inflamatuvar, analjezik, anti-piretik, gut

hastalığının tedavisi, kalp-damar hastalıklarının proklaksisi, kolorektal kanser profilaksisi, alzheimer hastalığı tedavisi ve böbrek sancısının tedavisinde kullanılır.

1.1.6. NSAID'lerin farmakokinetik özellikleri

NSAID genelde zayıf asidiktirler ve pK_a 'ları 3,0-5,0 aralığındadır. Mide ve bağırsak mukozasından iyi emilirler. Plazma proteinlerine çok yüksek oranda bağlanırlar. Genellikle albümine bağlanarak taşınırlar; böylece dağılım hacimleri yaklaşık olarak plazma hacmine çok yakın değerdedir. Karaciğerde oksidasyon ve konjugasyon ile inaktif metabolitlerine metabolize olurlar ve tipik olarak idrarla atılırlar. Hastalık durumlarında metabolizma anormalleşebilir ve normal dozda dahi vücutta birikim oluşabilir (Milan vd, 2007).

1.1.7. Aseklfenak

Aseklfenak fenil asetik asit türevi ve diklofenakla ilişkili NSAID bir ilaçtır (Jayanthi vd, 2012). COX-2 enzimine olan seçiciliği nedeniyle diğer NSAID'lere göre üstün olduğu, gastrointestinal tolerabilite ve kardiyovasküler güvenilirliğinin daha iyi olduğu ileri sürülmüştür. Diğer NSAID'lerden hızlı ve güçlü etki gösterir. Osteoartrit, romatoid artrit ve ankilozan spondilite görülen ağrı ve iltihabın tedavisinde kullanılır. Aseklfenak antienflamatuvar ve analjezik etkisini prostaglandin sentezi için gerekli siklooksijenaz enzimini güçlü bir şekilde inhibe ederek gösterir. Ağrı eşliğini değiştirmez (Venkata vd, 2014).

1.1.8. Deksketoprofen

Deksketoprofen trometamol steroid olmayan analjezik, antienflamatuvar ve antipiretik etkili bir ilaçtır. Kas iskelet sistemi ağrıları, dismenore, diş ağrısı, postprandiyel ağrı gibi orta şiddetteki ağrıların tedavisinde kullanılır (Kadam A., Patil V., 2013). Ketoprofen S(+) ve R(-) enantiyomerlerinden oluşan rasemik bir karışımdır. Enantiyomerler farklı farmakolojik ve fiziksel özellikler taşıyabilir. Deksketoprofen, ketoprofenin S(+) enantiyomeridir, analjezik ve antienflamatuvar etkiye sahiptir. Ketoprofenin R(-) enantiyomeri inaktiftir ve ketoprofenin terapötik özelliklerine katkıda bulunmaz, fakat metabolizma sürecine katılır. Deksketoprofen trometamol

tuzu halinde hazırlanır. Bu suda çözünürlüğünün artması ve bağırsak duvarından hızlı absorbe olmasını sağlar (David vd., 2012).

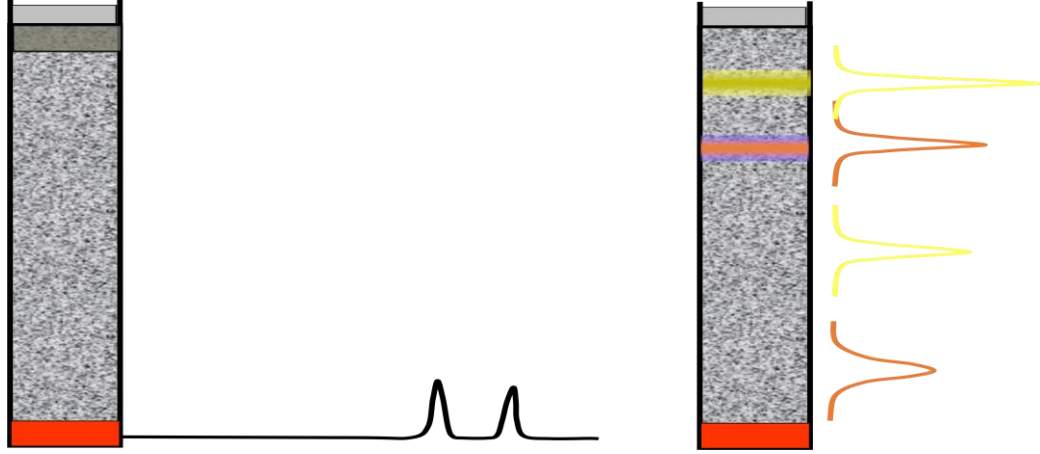
1.1.9. NSAID grubu ilaçların iyonlaşma sabitleri

İlaçların biyolojik etki mekanizması ile fiziksel ve kimyasal özellikleri arasında ilişki vardır. Bu sebeple ilacın organizma tarafından alınmasından atılımına kadar geçen sürede ilaçta meydana gelen kimyasal değişimlerin bilinmesi önem taşımaktadır. Molekülün fizokimyasal parametreleri (çözünürlük, iyonlaşma sabiti- pK_a ve dağılım katsayısı- $\log P$) etkileşmeye yönelik özelliklerini belirler (Naeemurrahman M., Ashish. N. P.). NSAID'ler, karboksil grubu (-COOH) içeren ve zayıf asidik özellik gösteren bileşiklerdir.

1.2. Kromatografi

Kromatografi bilimin tüm dallarında uygulaması bulunan güçlü bir ayırma yöntemidir. Kromatografi 20.yy'ın başında Rus botanikçi Mikhail Tswett tarafından bulunmuş ve onun tarafından isimlendirilmiştir. Bu tekniği, toz kalsiyum karbonat ile doldurulmuş bir cam kolondan bitki pigmentleri çözeltisini geçirerek klorofil ve ksantofil gibi birçok bitki pigmentini ayırma da kullanmıştır. Ayrılan maddeler kolonda renkli bantlar şeklinde gözüktüğünden, yöntem için kromatografi adını kullanmıştır (Yunancada chroma "renk" ve graphein "yazma" anlamına gelmektedir).

Kromatografi, karışımlardaki kimyasal bileşiklerin ayrılması, tanınması ve tayini için kullanılan bir analitik metottur. Bütün kromatografik ayırmalarda numune, gaz veya sıvı olan hareketli faz ile taşınır. Bu hareketli faz bir kolonda veya bir katı yüzeyde sabitleştirilmiş kendisi ile karışmayan bir durgun faz içerisinde geçirilir. Durgun faz tarafından kuvvetli tutulan numune bileşenleri, hareketli fazın akışıyla çok yavaş hareket ederler. Buna karşılık durgun faz tarafından zayıfça tutulan bileşenler hızlı hareket ederler. Bu hareket hızlarının farklılığı sonucu, numune bileşenleri birbirinden kalitatif ve kantitatif olarak analizlenebilen farklı bantlar veya bölgeler şeklinde ayrılırlar (şekil 1.3).



Şekil 1.3. Maddelerin bantlar şeklinde ayrılması

1.2.1. Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

- ✓ Ayrılma Mekanizmalarına Göre
- ✓ Uygulama Biçimine Göre
- ✓ Faz Tiplerine Göre
- Ayrılma Mekanizmalarına Göre
 - ❖ Adsorpsiyon kromatografisi
 - ❖ Partisyon kromatografisi
 - ❖ İyon değişirme kromatografisi
 - ❖ Jel filtrasyon (Moleküler eleme) kromatografisi
 - ❖ İyon çifti kromatografisi
 - ❖ Afinite kromatografisi
- Uygulama Biçimine Göre
 - ❖ Düzlemsel kromatografi
 - Kağıt kromatografisi
 - İnce tabaka kromatografisi (TLC)
 - ❖ Kolon kromatografisi
 - Gaz kromatografisi (GC)
 - Yüksek basınçlı sıvı kromatografisi (HPLC)
 - Süperkritik akışkanlı kromatografi (SFC)
- Faz Tiplerine Göre
 - ❖ Sıvı kromatografisi
 - Sıvı-Katı kromatografisi
 - Sıvı-Sıvı kromatografisi

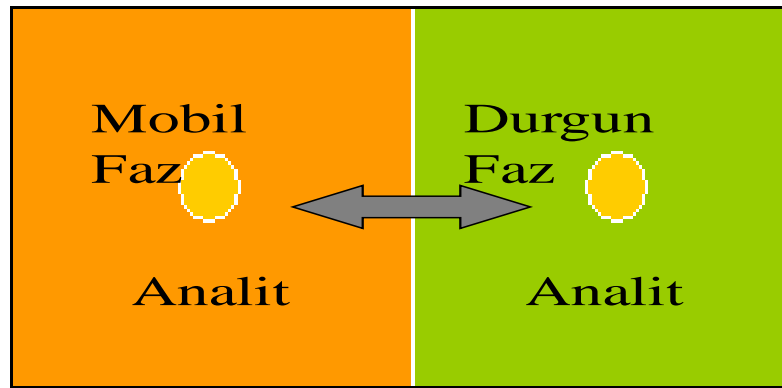
- ❖ Gaz kromatografisi
 - Gaz-Katı kromatografisi
 - Gaz-Sıvı kromatografisi

1.2.2. Yüksek performans sıvı kromatografi

Yüksek performans sıvı kromatografi (HPLC), besin kimyası, klinik kimya, biyokimya, farmosotik kimya, moleküler biyoloji ve çevre kimyası ile ilgili problemlerin çözümünde kullanılabilen çok amaçlı ayırma yöntemidir. Yüksek performans sıvı kromatografinin yaygın olarak kullanılmasının sebepleri, duyarlılığı, doğru kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olmasıdır.

Kolon kromatografik tekniklerden HPLC, oldukça hızlı gelişen bir tekniktir; sabit fazların ayırmayı kolaylaştırması, adsorpsiyon, jel geçirgenlik, afinite ve iyon değişim kromatografi gibi farklı teorik temelleri olması da bu tekniğin gelişmesinde oldukça etkili olmuştur.

Kromatografik metotların tümünde bir durgun faz ve bir de hareketli faz vardır. Bir kolon veya düz bir yüzeyde tutturulmuş faza durgun faz; durgun faz üzerinden veya arasından geçen ve analiti içeren faza hareketli faz adı verilir. Karışımdaki bileşenler, akış halindeki gaz veya sıvı fazla durgun faz üzerinden geçirilir; kromatografik ayırma, bileşenlerin göç hızlarına bağlı olarak gerçekleşir (şekil 1.4).



Şekil 1.4. Mobil faz ve durgun faz etkileşimi

Etkin bir ayırma için küçük ve düzenli tanecikli durgun faz üzerinden mobil fazın geçişinde sabit akış hızı sağlayan pompa sistemlerinin gelişmiş olması; ayrıca farklı fiziksel özellikleri takip edebilen dedektörlerinin olması HPLC'yi günümüzde giderek daha avantajlı kılmaktadır.

Dolgu materyalindeki gelişme adsorpsiyon özelliklerini geliştirmiştir

1973 10 μ tanecik boyutu 30x3,9 kolon boyutu

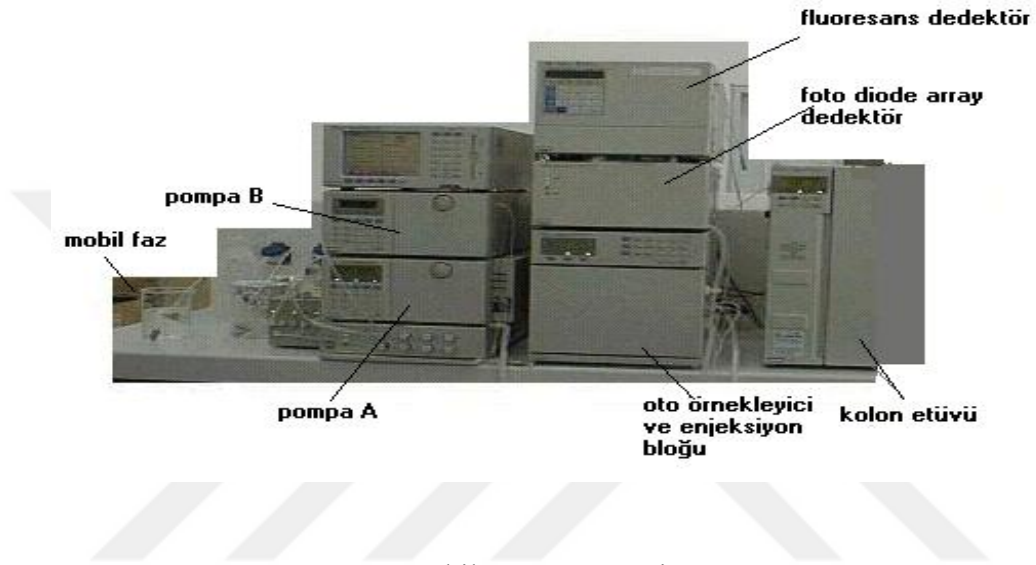
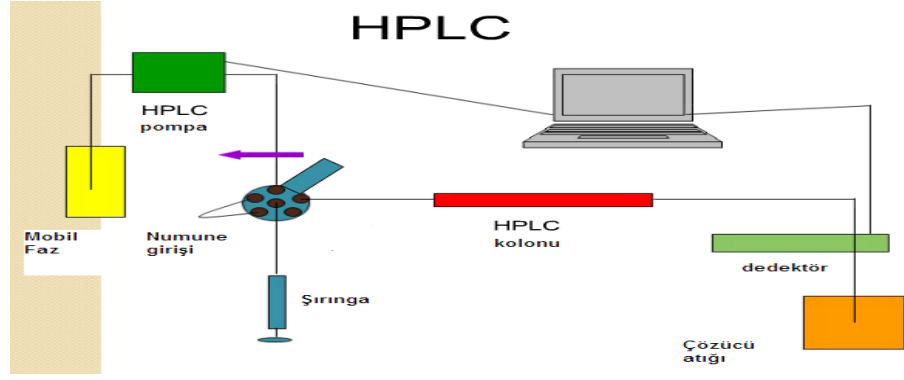
1973-1978 5 μ ve daha tekrarlanabilir malzeme

1978-1983 iyon kromatografi anorganik analizde temel yöntem; ters fazda seçicilik kavramı 1983 den günümüze ayırma mekanizması daha iyi anlaşılır hale gelmiştir.

HPLC, hareketli faz, sıvı; durgun faz, çok küçük boyutta katı parçacıklardan oluşur. Bu kromatografi türü, verilen bir numunedeki bileşenlerin hızla ayırımına, ayrıca uçucu olmayan veya sıcaklıkla bozunan ve bu nedenlerle gaz kromatografik tayinleri zorlukla gerçekleştirilen maddelerin ayırımına da imkân tanır. Yüksek performans sıvı kromatografi, durgun faz ve hareketli fazın bağıl polaritelerine göre iki tiptir.

- Normal faz dağılma kromatografisinde durgun faz polar, hareketli faz apolardır.
- Ters faz dağılma kromatografisinde durgun faz apolar, hareketli faz polardır.

Bir yüksek performans sıvı kromatografi sistemi şekilde görüldüğü gibi elue edici haznesi, pompalama sistemi, enjeksiyon sistemi, ön kolon, kolon, dedektör, kaydedici ve atık şişesi kısımlarından oluşur. Pompa tek veya çift olabilir. Çift pompalı sistemde elue edici kompozisyonu zamanla değiştirilerek çalışılır; bu çalışma şekli maddelerin ayrılmasında önemli avantaj sağlar. Bir enjektör yardımıyla belli hacimde numune kolona uygulanır, bilgisayar ve dedektör ile numunenin kolondan akışı takip edilir. HPLC'nin yapısı şematik olarak şekil 1.5'te gösterilmiştir.



Şekil 1.5. HPLC' nin yapısı

HPLC'de bir tek çözücü sistemi kullanılarak yapılan çalışma izokratik çalışmadır. Bu tip çalışmanın yeterli olmadığı durumlarda çözücü bileşimi çift pompa sistemi kullanılarak zaman içerisinde değiştirilir, bu durumda yapılan çalışma gradient çalışmadır.

Gradient çalışmada, polariteleri birbirinden farklı iki veya üç çözücü sistemi kullanılır. Elüsyon başladıktan sonra, belli bir programa göre bazen sürekli olarak ve bazen de bir seri basamaklar halinde çözücülerin oranı değiştirilir. HPLC'de kolondan çıkan maddenin derişimi, kolon çıkışına koyulan bir dedektör ile ölçülür. Genellikle tek dedektör sistemi kullanılmakla beraber, birden fazla dedektör sisteminin yer aldığı cihazlar da mevcuttur. HPLC'de UV dedektör, floresans dedektör, elektrokimyasal dedektör, kondüktometrik dedektör. Refraktometrik dedektör ve kütle spektrometre dedektör gibi dedektörler kullanılmaktadır.

1.2.3. Yüksek performans sıvı kromatografide kullanılan temel kavramlar

Bu yöntemde kolonun sonuna tayini yapılan analitin derişimine cevap veren bir dedektor konulur ve sinyal zamana karşı grafiğe gecirilirse bir dizi simetrik pik elde edilir. Bu grafiğe kromatogram adı verilir ve hem nitel, hem de nicel analizde kullanılır. Piklerin zaman eksenindeki konumları numunedeki bileşikleri tanımak için; piklerin altındaki alanlar ise her türün nicel tayini için kullanılır. HPLC yöntemiyle tayini yapılan analitlerin hem kalitatif hem de kantitatif belirlenebilmesi için kullanılan terimler aşığıda verilmiştir (Skoog vd., 2011).

1.2.3.1. Alıkonma suresi

Kolonda tutunmayan türe ait pik suresi olü zaman (t_0) olarak adlandırılır ve analit piklerinin tanınmasında önemli rol oynar. Numunenin enjeksiyonu ile bu pikin dedektöre ulaşması için geçen süreye alıkonma süresi denir ve t_r simgesiyle gösterilir (Skoog vd., 2011).

1.2.3.2. Kapasite faktörü (Alıkonma faktörü)

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

$$k = (t_r - t_0) / t_0 \quad (1.1.)$$

Bir çözünen madde için alıkonma faktörü birden çok küçük ise, elusyon çok hızlıdır. Öte yandan alıkonma faktörü 10'dan büyükse elusyon süreleri gereksiz şekilde uzar. Karışımındaki çözünenler için alıkonma faktörlerinin 1 ile 5 arasında olmasını sağlayan şartlarda ayırmalar en ideal şekilde yapılır (Skoog vd., 2011).

1.2.3.3. Seçicilik katsayısı (α)

A ve B gibi iki çözünen için bir kolonun seçicilik katsayısı

$$\alpha = k_B/k_A = (t_{r2} - t_{r0}) / (t_{r1} - t_{r0}) \quad (1.2)$$

şeklinde tanımlanır. Burada k_B daha kuvvetli tutunan B türü için dağılım katsayısı; k_A ise, daha az kuvvetle tutunan veya daha hızlı olarak kolondan elüe edilen A türü için ise aynı sabittir. Bu tanıma göre α daima 1'den büyüktür, 1,15 ise iki bileşiğin %98 oranında birbirinden ayrıldığı kabul edilir (Poole ve Poole, 1991).

1.2.3.4. Kolon verimliliğinin kantitatif tanımı

Kromatografik kolon verimliliklerinin nicel ölçümünde birbiriyle bağıntılı iki terim sıkça kullanılır: (1) tabaka yüksekliği (H) ve (2) teorik tabaka sayısı (N). Bu iki terim arasındaki bağıntı aşağıdaki gibidir:

L, kolon dolgusunun uzunluğudur. Bir kolonda, tabakaların sayısının artması (N) ve tabaka yüksekliğinin (H) azalmasıyla verimlilik artar. Kolonlardaki verimlilik türlerine, içerdikleri hareketli ve durgun fazların çeşitlerine bağlı olarak farklılıklar gösterir.

1.2.3.5. Bir kolonda teorik tabaka sayısı

Bir kromatogramdan teorik tabaka sayısı (N) değeri aşağıdaki bağıntı kullanılarak bulunur:

$$N = 5,54(t_r/W_{0,5})^2 \quad (1.3)$$

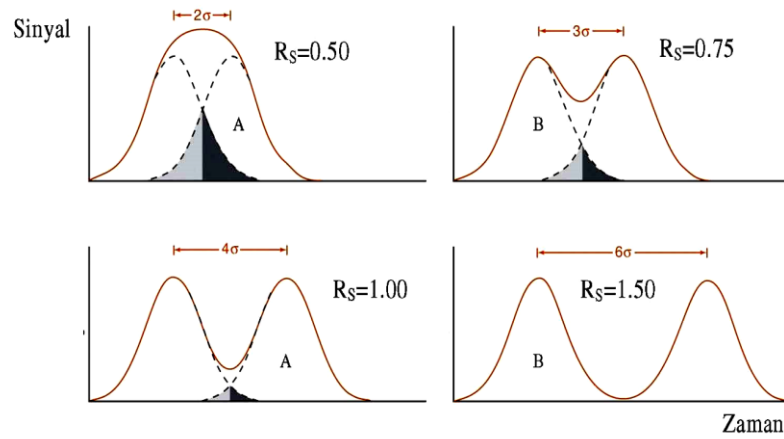
Burada t_r , bir pik için alıkonma süresi ve $W_{0,5}$ pik yarı yüksekliğindeki pik genişliği (zaman birimiyle) dir (Poole ve Poole, 1991).

1.2.3.6. Ayırma gücü (Rs)

Birbirini izleyen iki pik arasındaki ayırma gücü, R_s , için farklı bağıntılar geliştirilmiştir. Aşağıdaki bağıntı kullanılarak ayırma gücü hesaplanabilir.

$$R_s = \frac{2\Delta Z}{W_A + W_B} = \frac{2[(tr)_A - (tr)_B]}{W_A + W_B} \quad (1.4)$$

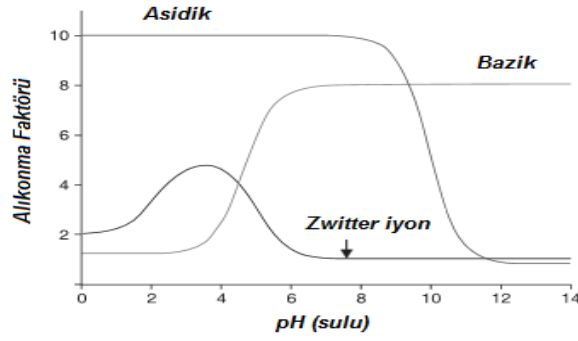
Bir kromatografik ayırmada en az ayrılan pikler, kritik pik çifti olarak adlandırılır. Pik çiftinin temel çizgide birbirinden ayrılabilmesi için ayırma gücünün en az 1,5 olması istenir. Ayırma gücü, 1'den küçük olduğunda yeterli ayırım olmamaktadır. (Şekil 1.6) (Poole ve Poole, 1991).



Şekil 1.6. Ayırma gücünün şematik gösterimi

1.2.4. Alıkonmada önemli parametreler

HPLC yöntemi bileşiklerin kromatografik davranışlarını incelemeye günümüzde en yaygın ve kullanışlı yöntemdir. Özelliklerini incelediğimiz birçok bileşik asidik ve bazik fonksiyonel grup bulundurmaktadır. Bu bileşikler için pH, ayırmada çok önemli olmaktadır. İyonlaşabilen bileşiklerde alıkonma zamanı mobil faz pH'sı ile sigmoidal biçimli değişimler gösterir (Şekil 1.7).



Şekil 1.7. Hareketli faz pH'sının asidik, bazik ve zwitter iyonik türlerin alıkonma faktörlerine etkisi.

Ters faz sıvı kromatografi yönteminde, su-organik çözücü ikili karışımları kullanılır. Mobil fazda organik modifiyer olarak asetonitril, metanol ve tetrahidrofuran tercih edilir. Bir kromatografik ayırmada mobil faz pH sı, tamponlarla belirlenir. Ters faz sıvı kromatografide mobil faz pH'sının iyonlaşan analitlerin alıkonmasında etkileri kullanılan tampon tipi/derişimine bağlıdır. Uygun olmayan tampon seçimi iyonlaşabilen polar bileşiklerin ayrılmasında tekrar edilemeyen alıkonmalara ve kuyruklanmalara yol açabilir. Kısmen iyonlaşan analitlerin kalıntı silanol gruplarıyla etkileşimleri gibi problemler doğru tampon seçimi ile giderilebilir.

1.2.5. Sabit faz

Sıvı kromatografi çalışmalarında önce cam kolonlar kullanılmıştır. Bunların uzunlukları 50-500 cm olup çapları 1-5 cm dir. Katı dolgu maddelerinin çapları ise 150-200 µm dir. Bu kolonlarla düşük akış hızları elde edilebilmiş ve ayırma zamanı uzun olmuştur. Parçacık boyutlarının küçülmesi (3-10 µm) ile kolon etkinliği arttırılmıştır. Günümüzde ise HPLC kolonları, çapı 3-5 mm ve boyu 10-30 cm arasında değişen paslanmaz çelik borulardır. İlk geliştirilen kolonlar 2-7 pH aralığı için uygun olan kolonlardır. Bu tip kolonlarla çalışmada ancak bu aralıkta yer alan değerler tayin edilebilmektedir. Günümüzde pH aralığı 1-12 aralığında olan kolonlar hazırlanarak bu sorun aşılmaya çalışılmaktadır. Son yıllarda RPLC çalışmalarının çoğunda kolon özellikleri, kolon seçiciliğini etkileyen faktörler, kolonların benzerlikleri ve birbirinden farklılıkları üzerinde durulmakta ve ters faz sıvı kromatografide kullanılan dolgu materyallerinin dezavantajlarını yok etmek ve

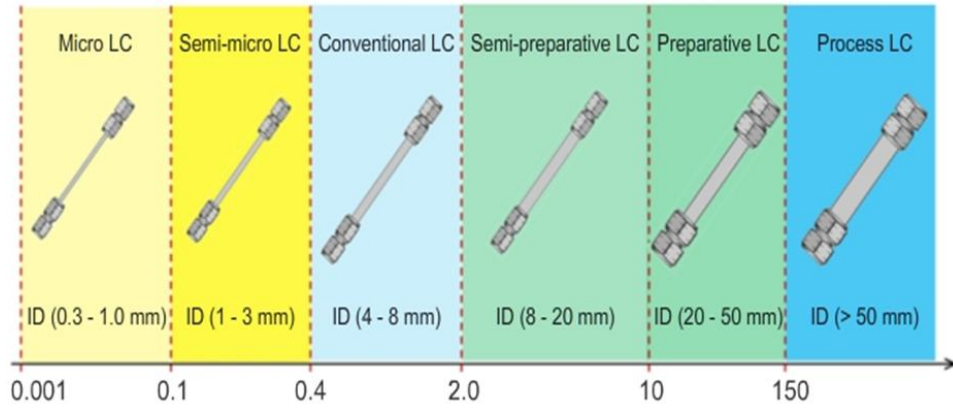
ayırmadaki davranışlarını daha iyi bir koşula getirmek için çalışmalar devam etmektedir.

HPLC’de sabit faz dolgu maddesi olarak kullanılanların çoğu silika esaslı bağlı fazlar içerir. Ters faz ayırmalarında da etkin olan bu dolgu maddelerinin hidrofobik yüzeyi genellikle kovalent bağlı organosilanların silika yüzeyine tutturulmasıyla elde edilir. Bu olayda monofonksiyonel alkildimetilchlorosilanların yüzeydeki silanol gruplarıyla etkileşimi gerçekleşir. Ticari olarak uygun ve yaygın olarak kullanılan oktadesilsilanda (C18) bunlardan biridir. Ayrıca farklı sayıda karbon atomu içeren (C1, C4, C8, C12, C30, C₆H₅) alkil tipi ligantlar ve fenil fonksiyonlu fazlarda kullanılabilir. C18 den sonra yaygın olarak kullanılan kolon C12 dir. C12 nin uzunluğunun C18 den kısa olması endcapping işleminde daha başarılı olduğu görülmüştür.

| | | |
|-----|-------------|---|
| C18 | Oktadesil | $-\text{Si}-\text{C}_{18}\text{H}_{37}$ |
| C8 | Oktil | $-\text{Si}-\text{C}_8\text{H}_{17}$ |
| C2 | Etil | $-\text{Si}-\text{C}_2\text{H}_5$ |
| CH | Sikloheksil | $-\text{Si}-\text{C}_6\text{H}_{11}$ |
| PH | Fenil | $-\text{Si}-\text{C}_6\text{H}_5$ |

Şekil 1.8. Bazı sabit faz türleri

Ayırmada metot geliştirirken sabit fazların çeşitli türleriyle çalışmak genellikle faydalı olur; çünkü bir örnekteki bileşik için her kolonun seçiciliği farklıdır. Sabit fazlarda, küçük tanecikler, büyük yüzey alanını getirir. Bu gözenek yapısı moleküllerin ve ilaçların ayrılmasında uygundur. Büyük tanecikler ise geniş gözenek yapısını ve küçük yüzey alanını getirir. Bu gözenek yapısı büyük moleküllerin ve proteinlerin ayrılmasında uygundur.



Şekil 1.9. Farklı özellikteki kolonlar

1.2.6. Su-organik çözücü karışımlarında pH

Organik çözücü oranı %70'e kadar ikili karışımlarda pH sudaki gibi ölçülebilmektedir. Sıvı kromatografide, iyonlaşabilen bileşiklerin ters faz sıvı kromatografik ayrılmalarında etkisi incelenen temel deneysel faktörler; organik modifiyer derişimi, pH ve sıcaklıktır. Nötral çözünenlerde mobil faz pH sınır ayırmada etkisi yokken iyonlaşabilen bileşiklerde alıkonma zamanı mobil faz pH sı ile sigmoidal biçimde değişir. İyonik form, yüksek polaritesi ve yüksek çözünürlüğü nedeniyle kolonda tutunmazken nötral form istekle tutunur. Nötral türlerde pH alıkonmayı etkilemezken analitin asidik veya bazik olması durumunda nötral türlerin daha çok, iyonik türlerin daha az tutunduğu bilinir.

1.2.7. Su –Organik çözücü ikili karışımlarında iyonlaşma sabiti tayini

İyonlaşma sabiti, bir molekülün iyonlaşma davranışını belirlememizi sağlayan temel parametredir. İyonlaşma sabitlerinin su ortamındaki tayinleri, bileşiğin sudaki çözünürlüğünün az olması durumunda su-organik çözücü ikili karışımlarının kullanılmasını zorunlu kılar. Sıvı kromatografide su-organik modifiyer karışımları olarak su-asetonitril, su-metanol, su-tetrahidrofuran kullanılmaktadır ve bu ikili karışımlarda pH standardizasyonunda herhangi bir problem kalmamıştır. Bileşiklerin su-organik çözücü karışımlarındaki pK_a değerleri, sıvı kromatografi yönteminde ayrılmalarının optimizasyonunda gerekli değerlerdir. Çünkü kromatografik ayırmada optimum koşulda mobil faz pH değeri genellikle $pK_a \pm 2$ aralığında olmaktadır.

Bilindiği gibi iyonlaşma sabitlerinin tayininde ilk yöntemler titrimetrik ve spektroskopik yöntemlerdir. Halen geçerliliğini koruyan bu yöntemler yanısıra günümüzde gerek sıvı kromatografi gerekse kapiler elektroforez gibi ayırma yöntemlerinin de bu amaçla kullanıldığını görmekteyiz.

Özellikle çözünürlüğü yeterli olmadığı için klasik tekniklerle iyonlaşma sabitlerini tayin edemediğimiz durumlarda daha düşük derişimde çalışma imkânı sağlayan bu teknikler uygun teorik yaklaşımlarda çok az miktarda madde kullanarak ve bileşiğin yapısındaki safsızlıkların olumsuz etkisinde kalmadan iyonlaşma sabitlerinin tayinine imkân tanımaktadır.

Ayrıca suda çözünürlüğü az olan bu nedenle su ortamında pK_a değerleri tayin edilemeyen bileşiklerin sudaki pK_a değerlerine geçişte de su-organik çözücü ikili karışımlarındaki değerlerden yararlanılmaktadır.

1.2.8. Sıvı kromatografi yöntemiyle pK_a tayini

Sıvı kromatografik yöntemler, asitlerin ve bazların iyonlaşma sabitlerinin tayininde son yıllarda sıklıkla kullanılan metodlar arasındadır. Bu metotta kullanılan kolonun özelliklerine göre belirlenen pH değerlerinde alıkonma zamanı ölçülür. Sıvı kromatografi yöntemi düşük derişimlerde analit ile çalışabilme, çalışılan bileşiklerdeki safsızlıkların belirlenebilmesi ve bu safsızlıkların hata getirmemesi gibi avantajlarından dolayı sıklıkla kullanılır. Alıkonma zamanının pH ile değişimi grafiğe geçirildiğinde yine sigmoidal davranış gözlenir. Bu sigmoidalin orta noktasındaki pH değeri, o bileşiğin çalışılan ortamdaki iyonlaşma sabitini verir. Su-organik çözücü ikili karışımlarında organik çözücünün farklı derişimlerinde pK_a değerlerinin hesaplanması için geliştirilmiş matematiksel modeller analizciye son derece yararlı bilgiler sağlamaktadır. Su-organik çözücü ikili karışımlarında az sayıda deney yaparak iyonlaşma sabitlerini tahmin edebilmek ancak bu matematiksel modellerle mümkündür. Ayrıca asidik veya bazik bileşiklerin pK_a sabitlerinin tayininde ortamın iyonik şiddetini de dikkate alarak hesaplama yapabilen non-lineer regresyon programları da geliştirilmiştir. Sıvı kromatografik yöntemlerin en önemli dezavantajı mobil fazın pH sınır dolayısıyla tayin edilen pK_a değerinin kolon dolgu metaryalinin belli bir pH aralığında kullanılabilmesinden dolayı sınırlı olmasıdır. Bu

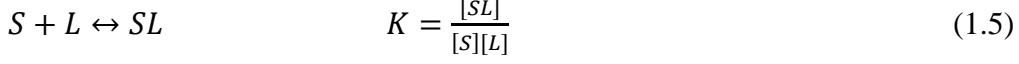
metotta kullanılan kolonun pH sınırları dikkate alınarak mobil fazın pH sı ayarlanmalıdır. Ayrıca su ortamı için iyonlaşma sabitlerinin tayini ancak su ile elue olan bileşikler için yapılabilir. Ayrıca düşük organik çözücü bileşimlerinde alıkonma zamanlarının uzun olmasından dolayı ve kolon etkileşimlerinden dolayı pK_a sabitlerinin yeterli doğrulukta tayini mümkün olmamaktadır. Asidik bileşiklerde daha yeterli doğruluk ve kesinlikteki veriler, piklerin simetrik olmalarına bağlanmaktadır. Bazik bileşiklerin protonasyon sabitlerinin tayinlerinde pik kuyruklanmaları tayinde olumsuz etki yapmaktadır.

Sıvı kromatografik yöntemle tayinde bileşiğin $pK_a \pm 2$ değerleri dikkate alınarak mobil fazın pH değerleri belirlenir ve pH sı belli mobil fazlar kullanılarak kapasite faktörleri tayin edilir. Kapasite faktörünün pH ile değişimi grafiğe geçirildiğinde yine sigmoidal davranış gözlenir. Bu sigmoidalin orta noktasındaki pH değeri, o bileşiğin çalışılan ortamdaki iyonlaşma sabitini verir. Ayrıca asidik veya bazik bileşiklerin iyonlaşma sabitlerinin tayininde sıvı kromatografik yöntemle ortamın iyonik şiddetini de dikkate alarak hesaplama yapabilen non-lineer regresyon programları da geliştirilmiştir.

Bu yöntem, düşük derişimler de analit ile çalışabilme imkânı tanır. Bileşiğin saf olması gerekmez. Potansiyometrik yöntemlerde olduğu gibi titrant ve analit derişiminin kesin olarak bilinmesi gerekli değildir. Çalışılan ortam su-organik çözücü ikili karışımıdır. Hidroorganik çözücü karışımlarında pH standardizasyonunun bilinmesi gereklidir. Bazik bileşiklerde kolonla analit arasındaki olumsuz etkileşimlerin pik simetrisini bozması, çok hidrofobik bileşiklerde kolondan alınmama veya kuyruklanma problemleri söz konusudur.

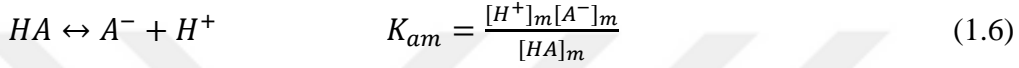
Sıvı kromatografisi (LC) ile pK_a tayininde ilk çalışmalar Harvath-Melander'a aittir. Çalışmacılar, ters faz sıvı kromatografide kolon dolgu materyali ile asidik-bazik fonksiyonel gruplu yapıların etkileşimlerini dikkate alarak gerekli bağıntıları hazırlamışlar ve monoprotik, diprotik asitlerde, monofonksiyonlu bazlarda ve ikiz iyonlarda kapasite faktörü, mobil fazın hidronyum iyonu derişimi ve bileşiğin pK değerleri arasındaki bağıntıları türetmişlerdir. Bu bağıntılara göre kapasite faktörünün mobil faz pH sı ile değişimini gösteren grafikleride önermişleridir. Sıvı kromatografisi ile iyonlaşma sabiti tayininde bileşiğin kolon ile etkileşim dengesi

teorik olarak geliştirilir. Bilindiği gibi kromatografik ayırma, çözünen (S) ile ODS gibi hidrokarbon ligand (L) arasında oluşan kompleksin davranışıyla gerçekleşir. Bu dengeye ait denge ve denge sabiti;

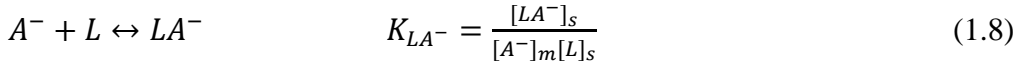
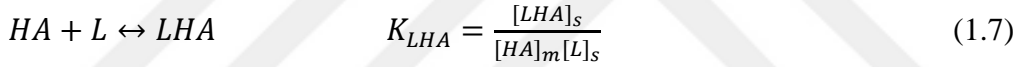


Eşitlikleriyle verilir.

Bilindiği gibi monoprotik zayıf asitlerin iyonlaşması ve iyonlaşma sabiti aşağıdaki gibi verilir.



Moleküler formdaki monoprotik asit ile anyonun sabit fazdaki ligand ile dengesi ve ilgili sabitler, aşağıdaki eşitlikler ile gösterilir.



Kapasite faktörü, HA'nın sabit ve mobil fazlar arasındaki dağılıma oranına bağlı olarak hesaplanabilir. Burada ϕ organik modifiyer yüzdesine bağlı bir sabittir.

$$k = \phi \frac{[LA]_s + [LA^-]_s}{[HA]_m + [A^-]_m} \quad (1.9)$$

Önceki eşitlikler kapasite faktöründe yerine yazılırsa yandaki genel formül elde edilebilir.

$$k = \phi \frac{K_{LHA}[L]_s + K_{LA^-}[L]_s \frac{K_{am}}{[H^+]_m}}{1 + \frac{K_{am}}{[H^+]_m}} \quad (1.10)$$

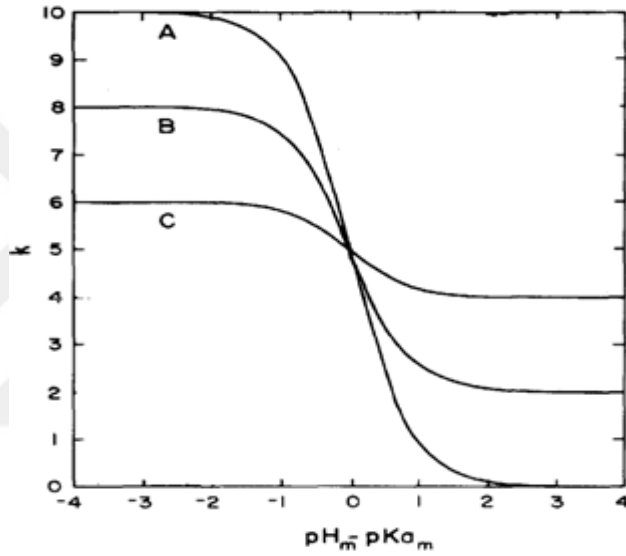
$$\text{Moleküler formun kapasite faktörü; } k_0 = \Phi [L]_s K_{LHA} \quad (1.11)$$

$$\text{İyonlaşan formun kapasite faktörü; } k_{-1} = \Phi[L]_s K_{LA^-} \quad (1.12)$$

$$\text{Bu bağıntılar genel eşitlikte yerine yazılırsa son denklem; } k = \frac{k_0 + k_{-1} \frac{K_{am}}{[H^+]_m}}{1 + \frac{K_{am}}{[H^+]_m}} \quad (1.13)$$

Bu şekilde elde edilir.

Zayıf asitin iyonlaşma sabiti, bu bağıntı, mobil faz pH sı ve kapasite faktörleri kullanılarak hesaplanabilir.



Şekil 1.10. Zayıf asidik bileşiklerde pH'nın kapasite faktörüne etkisi

Özetlenecek olursa bir bileşiğin pK_a tayini sıvı kromatografik yöntemle yapmak istendiğinde mobil fazın bileşimi sabit tutulur. Farklı pH değerlerinde mobil fazların hazırlanması ve her bir pH koşulu için üçer enjeksiyonla alıkonma zamanları belirlenir. $pK_a \pm 2$ aralığında farklı pH değerlerinde kapasite faktörleri belirlenir. Daha sonra x ekseninde pH'lar, y ekseninde kapasite faktörleri kullanılarak hazırlanan sigmoidalların dönüm noktası bileşiğin iyonlaşma sabitini verir. Bu şekilde pK_a tayin edilmiş olur.

1.3. Potansiyometrik Titrasyonlar

Karşılaştırma elektrodu ile uygun ikinci bir elektrot ile oluşturulan elektrokimyasal hücrede ölçülen gerilim değerleri kullanılarak hücre çözeltisindeki iyonların nicel analizine potansiyometri denir. Potansiyometrik titrasyon yönteminde her titrant eklenmesinden sonra ölçülen potansiyel değeri eklenen titrant hacmine karşı grafiğe geçirilerek potansiyometrik titrasyon eğrisi oluşturulur. S şeklinde olan potansiyometrik titrasyon eğrisinde, eğrinin eğiminin en büyük olduğu nokta dönüm noktasıdır. Asit-baz tepkimelerinde cam elektrot iyon secici elektrot olarak kullanılmaktadır. Cam elektrot, hidrojen iyonu için en önemli indik特or elektrottur ve birçok koşulda pH ölçümleri için çok yönlü bir alettir (Yıldız vd., 1997).

Potansiyometrik titrasyonlar da eşdeğerlik noktasında pH değerinde birdenbire büyük bir değişme olur. Asitin ve bazın kuvveti azaldıkça, dönüm noktasında gözlenen pH değişiminin büyüklüğü ve keskinliği azalır. Aynı durum, kullanılan titrant derişiminin azaldığı zaman ve zayıf asidin kuvvetli bir baz yerine zayıf bir bazla titre edildiği durumlarda da gözlenir (Yıldız vd., 1997; Skoog vd., 2011).

Potansiyometrik titrasyon sudan başka çözücülerde de uygulanabilir. Potansiyometrik yöntemler, su-organik çözücü ikili sistemlerinde de kullanılmaktadır (Yıldız vd., 1997).

1.4. Potansiyometrik Yöntemle pK_a Tayininde Kullanılan Bağıntılar

1.4.1. Kuvvetli Monoprotik Asitler için Gran Eşitlikleri

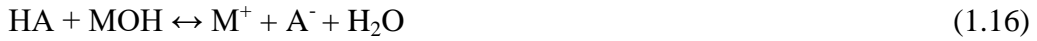
V_a hacminde C_a derişiminde olan bir kuvvetli monoprotik asiti, C_b derişimindeki MOH kuvvetli bazı ile titre edelim. Titrasyon yaparken asit çözeltisine ilave edilen baz ile asitin bir kısmı tepkimeye girer ve aynı zamanda hacmin artışı nedeniyle geride kalan asit derişiminde seyrelme olur. Çözeltide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

$$[H^+] = \frac{C_a V_a - C_b V_b}{V_a + V_b} \quad (1.14)$$

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

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

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



$$[\text{A}^-] = \frac{C_a V_a}{V_a + V_b} \quad (1.17)$$

$$[\text{M}^+] = \frac{C_b V_b}{V_a + V_b} \quad (1.18)$$

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

$$[\text{H}^+] + [\text{M}^+] = [\text{A}^-] + [\text{OH}^-] \quad (1.19)$$

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

$$[\text{H}^+] + \frac{C_b V_b}{V_a + V_b} = \frac{C_a V_a}{V_a + V_b} + [\text{OH}^-] \quad (1.20)$$

$$\Delta = [\text{H}^+] - [\text{OH}^-] \quad (1.21)$$

yi vermek üzere düzenleyelim. Bir titrasyonda nötralleşme kesri, aşağıdaki gibi ifade edilir. φ , nötralize edilen asitin kesrini gösteren mol oranıdır.

$$\varphi_{ab} = \frac{C_b V_b}{C_a V_a} \quad (1.22)$$

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

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

$$\varphi_{ab} = \frac{C_b V_{eş}}{C_a V_a} \quad (1.23)$$

$$V_{eş} = \frac{C_a V_a}{C_b} \quad (1.24)$$

Eşdeğerlik noktasını lineer bir ilişki ile belirlemek istediğimizde 1.14 nolu eşitliği Δ cinsinden ifade ederiz.

$$\Delta = [H^+] - [OH^-] = \frac{C_a V_a - C_b V_b}{V_a + V_b} \quad (1.25)$$

Eşitlik 1.24'de $C_a V_a$ ' yı $V_{eş} C_b$ olarak ifade edelim.

$$\Delta = \frac{C_b V_{eş} - C_b V_b}{V_a + V_b} \quad (1.26)$$

$$\Delta (V_a + V_b) = C_b (V_{eş} - V_b) \quad (1.27)$$

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

$$\Delta (V_a + V_b) = C_b V_{eş} - C_b V_b \quad (1.28)$$

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

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

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

$$[H^+] (V_a + V_b) = C_b (V_{eş} - V_b) \quad (1.29)$$

şeklinde gösterilir. Bu bağıntı sıklıkla aşağıdaki şekilde verilir.

$$\varphi = (V_0 + V_{\text{KOH}}) \cdot 10^{-\text{pH}} \quad (\text{asidik bölge}) \quad (1.30)$$

Eşdeğerlik ötesi bazik bölgede $\Delta = [\text{H}^+] - [\text{OH}^-] \cong -[\text{OH}^-]$ olduğundan

$$\Delta (V_a + V_b) = C_b(V_{\text{eş}} - V_b) \text{ gösterimi} \quad (1.31)$$

$$-[\text{OH}^-](V_a + V_b) = C_b(V_{\text{eş}} - V_b) \text{ veya} \quad (1.32)$$

$$[\text{OH}^-](V_a + V_b) = C_b(V_b - V_{\text{eş}}) \text{ şeklinde gösterilir.} \quad (1.33)$$

Bu son bağıntıyı biraz daha düzenleyelim.

$$[\text{OH}^-](V_a + V_b) = C_b(V_b - V_{\text{eş}}) \quad (1.34)$$

$$\frac{K_{\text{su}}}{[\text{H}^+]}(V_a + V_b) = C_b(V_b - V_{\text{eş}}) \quad (1.35)$$

$$\frac{(V_a + V_b)}{[\text{H}^+]} = \frac{C_b}{K_{\text{su}}} (V_b - V_{\text{eş}}) \quad (1.36)$$

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

$$\varphi = (V_a + V_{\text{KOH}}) \cdot 10^{+\text{pH}} \quad (\text{bazik bölge}) \quad (1.37)$$

Bu bağıntılar, karbonat hatasının belirlenmesinde gerekli bağıntılardır.

1.4.2. Zayıf Monoprotik Asitler için Gran Eşitlikleri

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

Bilindiği gibi HA asitinin iyonlaşma dengesi



dir. Bu dengeye ait asitlik sabiti

$$K_a = \frac{[H^+][A^-]}{[HA]} \quad (1.39)$$

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

$$[HA] \cong \frac{C_a V_a - C_b V_b}{V_a + V_b} \quad (1.40)$$

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

$$[A^-] \cong \frac{C_b V_b}{V_a + V_b} \quad (1.41)$$

Bu iki eşitliği kullanarak tampon bölgede hidronyum derişimini hesaplamak istediğimizde

$$[H^+] = \frac{K_a [HA]}{[A^-]} \cong \frac{K_a (C_a V_a - C_b V_b)}{\frac{C_b V_b}{V_a + V_b}} \quad (1.42)$$

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

$$[H^+] = \frac{K_a[HA]}{[A^-]} \cong \frac{K_a(CaVa - CbVb)}{\frac{Cb}{CbVb}} \quad (1.43)$$

$$[H^+] = \frac{K_a(Veş - Vb)}{Vb} \quad (1.44)$$

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

$$[H^+] \cdot V_b = K_a V_{eş} - K_a V_b \quad (y = a - mx) \quad (1.45)$$

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

$$[H^+] \cong \frac{K_a(CaVa - CbVb)}{CbVb} \quad (1.46)$$

$$[H^+]C_bV_b = K_aC_aV_a - K_aC_bV_b \quad (1.47)$$

olarak yazabiliriz.

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

$$\frac{[H^+]C_bV_b}{CaVa} = \frac{K_aCaVa}{CaVa} - \frac{K_aC_bV_b}{CaVa} \quad (1.48)$$

$$\varphi_{ab} = \frac{CbVb}{CaVa} \quad (1.49)$$

$$[H^+] \varphi_{ab} = K_a - K_a\varphi_{ab} \quad (1.50)$$

dir. φ_{ab} , V_b ile değişir ve eşdeğerlik noktasında 1’dir. $\varphi_{ab} = 0$ olduğunda titrasyon başlangıç noktasındadır. Bu fonksiyonda da eğim yine $-K_a$ ’ yı verir. Eşdeğerlik sonrası bölgede ise ortamda kuvvetli baz hakimdir ve kuvvetli bazla ilgili Gran

fonksiyonu bu amaçla kullanılır. Bu bağıntı protonlanmış zayıf monoprotik bazik türler (BH^+) içinde aynen uygulanır.



2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu tez çalışmasının konusu olan zofenopril, aseklofenak ve deksketoprofen hakkında yapılan literatür araştırmalarında iyonlaşma sabitleri konusunda yeterli bilgi birikiminin olmadığı görülmektedir. Bulunan çalışmalar, ilaçlarda bu bileşiklerin kantitatif tayinleri ile ilgilidir (Çizelge 2.1). Yapılan taramada görüldüğü gibi sıklıkla C8 ve C18 kolon kullanılmıştır. Çizelge 2.1’de görüldüğü gibi organik çözücü olarak metanol, asetonitril ve tetrahidroforan tercih edilmiştir; organik çözücü içeriği yüksektir. Fosfat tamponu seçilmiştir. Çalışmalar iyonlaşmanın engellendiği pH’larda yapılmıştır.

Çizelge 2.1. Zofenopril, aseklofenak ve deksketoprofenle ilgili çalışmalar

| Bileşik | Kolon /Kolon sıcaklığı | Hareketli faz /Dalga boyu | Literatürler |
|---------------------------|-----------------------------------|---|--------------------|
| Deksketoprofen trometamol | Hypersil BDS C 18 40 °C | 0,01 m fosfat tamponu; pH 6: asetonitril (75:25, % v/v)/ 254 nm | Pokharkar; 2011 |
| Deksketoprofen trometamol | Hypersil ODS–C 18 25 °C | metanol: amonyum asetat tamponu (65: 35, % v/v)/ 256 nm | Toufik; 2011 |
| Deksketoprofen trometamol | Purosphere STAR RP- 18e 25 °C | metanol :fosfat tamponu; pH 4,5 (65:35, % v/v)/ 260 nm | Harde; 2012 |
| Deksketoprofen trometamol | Agiland eclipse C 8 25 °C | Asetonitril: %0,1 H ₃ PO ₄ çözeltisi; pH 2,6: (41,9 : 58,1; % v/v)/ 254 nm | Shivani; 2015 |
| Aseklofenak | Symetry nukleosil C 8 25 °C | 0,01 m NaH ₂ PO ₄ tamponu : asetonitril (40/60, % v/v)/ 260 nm | Reddy; 2014 |
| Aseklofenak | Phenomenex gemini C 18 20 °C | fosfat tamponu ; pH 5: asetonitril (60:40 % v/v)/275 nm | Paul; 2011 |
| Aseklofenak | Zorbaks SP C 18 25 °C | Asetonitril: 50 mM H ₃ PO ₄ tamponu; pH 6 (40:60 ,% v/v) /270 nm | Shaikh; 2008 |
| Aseklofenak | Shimpack C 18 30 °C | Asetik asit çözeltisi pH 3,5: metanol, (50/50, % v/v) /273nm | Ashraful; 2011 |
| Zofenopril | Phenomenex gemini C 18 25 °C | metanol(çözücü A)- fosforik asit tamponu pH 2,5 (çözücü B)/270 nm | Aslan; 2011 |
| Zofenopril | Prospher BDS C 18 25 °C | Asetonitril:metanol:0,02m NaH ₂ PO ₄ tamponu pH:7,2 (40:20:40 % v/v)/245 nm | Devika; 2012 |
| Zofenopril | Agilent LiChrospher C 18 25 °C | Su-TFA (99,9:0,1; % v/v)(Çözücü A)- Asetonitril-TFA (99,9:0,1; % v/v)/245 nm | Carlucci; 2010 |

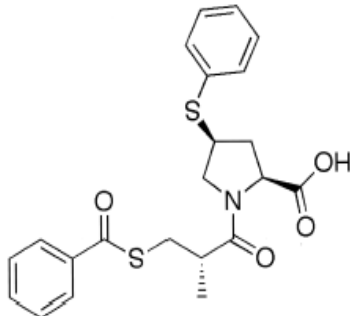
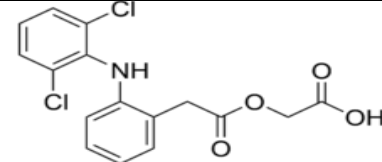
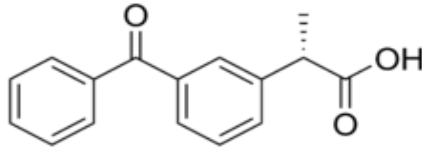
3. MATERYAL VE METOT

Bu bölümde zofenopril, aseklufenak ve deksketoprofen'in ters faz sıvı kromatografik yöntemle iyonlaşma sabitlerinin, su-asetonitril karışımında ters faz sıvı kromatografik yöntemle tayininde kullanılan cihazlar ve kimyasallar hakkında bilgi verilmiştir.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyleerde kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya HPLC saflıktadır. Bu tezde çalışılan bileşikler, Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışılan bileşikler ve özellikleri

| Bileşik | Kimyasal Yapısı | Özellikler |
|--|--|--|
| Zofenopril $C_{22}H_{23}NO_4S_2$ 429,552 g/mol |  (2S,4S)-1-[(2S)-3-(benzoil-sulfanyl)-2-metilpropanoil]-4-(fenil sulfanyl)pirolidin-2-karboksilik asit | E.N: 257,03°C CAS No: <u>81872-10-8</u> HPLC saflıkta > %98 |
| Aseklufenak $C_{16}H_{13}Cl_2NO_4$ 354,184 g/mol |  2-[(2-{2-[(2,6-dikloro fenil) amino] fenil} asetil)oxy] asetik asit | E.N: 200°C CAS No: <u>89796-99-6</u> HPLC saflıkta > %98 |
| Deksketoprofen Trometamol $C_{16}H_{14}O_3$ 254,280 g/mol |  5-benzoil-2,3-dihidro-1H-pirolidin-1-karboksilik asit | E.N: 149,15 °C CAS No: <u>22161-81-5</u> HPLC saflıkta > %98 |

Çalışmada yararlanılan diğer kimyasal maddeler ve özellikleri, Çizelge 3.2’de verilmiştir.

Çizelge 3.2. Kromatografik çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

| Adı | Kullanım amacı | Açıklama |
|---------------------------|--|----------------------------------|
| Potasyum hidrojen fitalat | Elektrot kalibrasyonu için referans standart | Merck (Referans Değer Standardı) |
| Fosforik asit | Mobil faz pH’ sının ayarlanmasında | Merck, analitik saflıkta |
| Sodyum hidroksit | Mobil faz pH’ sının ayarlanmasında | Merck, analitik saflıkta |
| Asetonitril | Mobil faz için kullanılan organik çözücü | Merck , HPLC saflıkta |
| Urasil | Kolonda tutunmayan türün kolonu terk etme zamanını belirlemede | Sigma, HPLC saflıkta |

Çizelge 3.3. Potansiyometrik çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

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

3.2. Kullanılan Cihazlar

3.2.1. Yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı

Çalışılan bileşiklerin sıvı kromatografik davranışlarının incelenmesinde ve pK_a değerlerinin tayininde, Shimadzu marka HPLC cihazı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sistemde, sistem kontrol ünitesi (CBM 20A), pompa (LC20 AD), dedektör (SPDM 20A UV dedektör), kolon fırını (CTO 20 AC) ve gaz giderme ünitesi (DGU 20 A) bulunmaktadır.

3.2.2. Kolon

Çalışmada zofenopril, aseklofenak ve Deksketoprofen'in ters faz sıvı kromatografik tayinleri için Nucleosil 300-5 C4 (250 mm, 4,6 mm, 5 µm) ters faz sıvı kromatografi kolonu kullanılmıştır. Bu kromatografik çalışmalar için kolon sıcaklığı 37 °C akış hızı 1 mL/dakika olarak belirlenmiştir.

3.2.3. pH/iyon metre

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

3.3. Kullanılan çözeltiler

Kromatografik çalışmada, pK_a değerlerinin tayini yapılan bileşiklerin her biri günlük olarak hazırlanmıştır. Analitik saflıkta temin edilen bileşiklerin her birinden 0,005 g, 5 mL mobil fazda çözülerek 100 ppm'lik stok çözeltileri hazırlanmış ve +4°C' de muhafaza edilmişlerdir.

Hazırlanan çalışma çözeltilerinden 20 µL sıvı kromatografi cihazına enjekte edilmiştir. Çalışma dalga boyları, zofenopril 245 nm, aseklofenak 275 nm ve Deksketoprofen 254 nm olarak seçilmiştir. Her bileşik için ikişer enjeksiyon yapılarak ortalama alıkonma zamanları belirlenmiştir. İyonlaşma sabitlerinin tayini için zofenopril, aseklofenak ve Deksketoprofen'in %30, %35 ve %40 ACN:H₂O (v/v) ikili karışımlarında çalışılmıştır.

3.3.1.1. %30 (v/v) ACN:H₂O ikili karışımı

200 mL'lik stok ortam için 140 mL saf su alınmış ve üzerine 60 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak ACN:H₂O ikili karışımlarında hacim

büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Mobil faza 25 mM derişimde olacak şekilde H_3PO_4 (% 85 (w/w) ; 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran ACN:H₂O karışımında hazırlanmış NaOH'den (1 M) ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen pH değerleri (2,4; 3; 3,6; 4,2; 4,8; 5,4; 6; 6,6; 7,2) olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Mobil fazlar ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

3.3.1.2. %35 ACN:H₂O (v/v) ikili karışımı

200 mL'lik stok ortam için 130 mL saf su alınmış ve üzerine 70 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak ACN:H₂O (v/v) ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Mobil faza 25 mM derişimde olacak şekilde H_3PO_4 (% 85 (w/w); 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran ACN:H₂O (v/v).karışımında hazırlanmış NaOH'den (1 M) ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen pH değerleri (2,4; 3; 3,6; 4,2; 4,8; 5,4; 6; 6,6; 7,2) olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Mobil fazlar ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

3.3.1.3. %40 (v/v) ACN:H₂O (v/v).ikili karışımı

200 mL'lik stok ortam için 120 mL saf su alınmış ve üzerine 80 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak ACN:H₂O (v/v) ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Mobil faza 25 mM derişimde olacak şekilde H_3PO_4 (% 85 (w/w) ; 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran ACN:H₂O (v/v).karışımında hazırlanmış NaOH'den (1 M) ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen pH değerleri (2,4; 3; 3,6; 4,2; 4,8; 5,4; 6; 6,6; 7,2) olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Mobil fazlar ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

3.3.1.4. Potasyum hidrojen fitalat çözeltisi

Potasyum hidrojen fitalat çözeltisi, $C_6H_4(COOK)(COOH)$, primer standart pH referans çözeltisi olarak 0,05 molal derişimde kullanılmış ve pH metre bu bileşik için gerekli değere ayarlandıktan sonra mobil fazların pH değerleri ayarlanmıştır. 2 saat

110 °C'da kurutulmuştur. Çalışmalarda gerekli çözeltiler, kullanılacakları gün hazırlanmıştır.

3.3.1.5. Zofenopril, aseklofenak ve deksketoprofen çözeltileri

Kromatografik çalışmada bileşiklerin her birinden 0,005 g, 5 mL mobil fazda çözülerek 100 ppm'lik çözeltileri hazırlanmıştır. Sıvı kromatografi cihazına her bir stok çözeltiden 20 µL enjekte edilmiştir. Her bir bileşik için ikişer kez enjeksiyon yapılarak ortalama alıkonma zamanları belirlenmiştir.

3.4. Potansiyometrik Titrasyonlar

3.4.1. Kullanılan Cihazlar

3.4.1.1. pH/ iyon metre

Potansiyometrik titrasyon pH ölçümlerinde Mettler Toledo MA 235 pH/ İyon analiz cihazı kullanılmıştır. Mettler Toledo InLab 412 Ag/AgCl kombine cam elektrottan yararlanılmıştır. pH ölçümlerinde sabit sıcaklık banyosu (HETO CBN 8- 30 ve HETO HMT 200 sıcaklık kontrol ünitesi) kullanılarak 25 °C ± 0,1 °C sıcaklıkta çalışılmıştır.

3.4.2. pK_a Tayininde Kullanılan Çözeltiler

3.4.2.1. %50 ACN:H₂O (v/v).İkili Karışımının Hazırlanması

100 mL' lik stok ortam için 50 mL su alınmış ve üzerine 50 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril-su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir.

3.4.2.2. İyonik Şiddet Ayarlayıcının Hazırlanması

İyonik şiddeti ayarlamak üzere KCl kullanılmış ve kullanılan bütün çözeltilerde, çözücü karışımlarına 0,1 M derişimi sağlanacak şekilde KCl çözeltisi eklenmiştir.

3.4.2.3. Asit Çözeltisinin Hazırlanması

1 M standart HCl çözeltisi (titrisol), ortamın organik modifiyer yüzdesine uygun olarak 0,1 M'a seyreltilmiştir. Protonlama aşamasında bu çözeltiden yararlanılmıştır.

3.4.2.4. Baz Çözeltisinin Hazırlanması

1 M standart KOH çözeltisi, çalışılan organik modifiyer-su ikili karışımında 0,05 M olacak şekilde seyreltilerek titrant olarak kullanılmıştır. Çözelti, $2.0 \cdot 10^{-3}$ M KHP çözeltisi kullanılarak ayarlanmıştır.

3.4.2.5. Zofenopril, aseklofenak ve deksketoprofen çözeltileri

Zofenopril, aseklofenak ve deksketoprofenin standart çözeltileri, $2.0 \cdot 10^{-3}$ M derişiminde olacak şekilde asetonitril-su ikili karışımında 30 mL olarak hazırlanmış ve çözelti çift cidarlı hücreye alınarak potansiyometrik yöntemle titre edilmiştir.

3.5. Yöntem

3.5.1. Sıvı kromatografik yöntemle tayin

Kromatografik çalışmada, pK_a değerlerinin tayini yapılan bileşiklerin her biri günlük olarak hazırlanmıştır. Analitik saflıkta temin edilen bileşiklerin her birinden 0,005 g alınıp, 5 mL mobil fazda çözülerek 100 ppm'lik stok çözeltileri hazırlanmış ve $+4$ °C' de muhafaza edilmiştir.

Hazırlanan çalışma çözeltilerinden 20 μ L alınarak sıvı kromatografi cihazına enjekte edilmiştir. Çalışma dalga boyları, zofenopril için 245 nm, aseklofenak için 275 ve deksketoprofen için 254 nm olarak seçilmiştir. Her bileşik için ikişer enjeksiyon yapılarak ortalama alıkonma zamanları belirlenmiştir. Zofenopril, aseklofenak ve deksketoprofen'in iyonlaşma sabitlerinin tayini için %30, %35 ve %40 ACN:H₂O (v/v) ikili karışımlarında çalışılmıştır.

HPLC yöntemi ile iyonlaşma sabitlerinin tayininde, asetonitrilin üç farklı derişiminde çalışılmıştır. pH metre, mobil faz pH değerleri belirlenmeden önce potasyum hidrojen fitalat (KHP) çözeltisi ile kalibre edilmiştir. pH metrenin kalibrasyonu, kombine pH elektrodu ile 298 K referans alınarak yapılmıştır. pH elektrodu, okunan değerlerin kararlı olabilmesi için çalışılan su-organik çözücü karışımında bekletilmiştir. Her bir ortam için KHP çözeltisi 0,05 mol/kg derişiminde hazırlanmış ve başlangıç potansiyel değeri belirlenmiştir. Her bir çözelti için 3 ölçüm yapılmıştır. Takiben her bir koşula ait pH değeri 2,4-7,2 aralığında olacak şekilde ayarlanmıştır. Bu ayarlama işlemlerinde tampon aralığı dikkate alınarak 25 mM o-fosforik asit kullanılmıştır. Bu o-fosforik asit ilavelerinden sonra mobil faza 1 M NaOH ilave edilerek istenen pH değerine ulaşılmıştır.

3.5.2. Potansiyometrik Titrasyonlar

NSAID'lerin iyonlaşma sabitlerinin potansiyometrik yöntemle tayininde, ACN:H₂O ikili karışımının % 50(v/v) derişiminde çalışılmıştır. Bu ortamda iyonik şiddeti ayarlamak üzere KCl kullanılmıştır. KCl derişimi 0,1 M olacak şekilde ayarlanmıştır.

Titrant (KOH çözeltisi), 0,05 M derişiminde hazırlanmış ve bu çözelti 30 mL 0,002 M KHP çözeltisi ile potansiyometrik titrasyonla ayarlanmıştır. Karbonat hatasının olmadığı asitin ayarlı baz ile titre edilmesi ile kontrol edilmiştir. Su-organik çözücü karışımında otoprotoliz sabiti, hücrenin E⁰ standart potansiyeli ve eğimi belirlenmiştir. Zofenopril, aseklofenak ve deksketoprofenin 0,002 M'lık çözeltileri ayarlı baz çözeltisi ile 30 mL'lik çift cidarlı hücrede titre edilmiştir. Zofenopril, zofenopril kalsiyum tuzu halinde; deksketoprofen, deksketoprofen trometamol tuzu halinde bulunduğundan çözeltisine 1 M HCl (stok, titrisol)'den uygun hacim ilave edilerek bileşik stokiyometrik oranda protonlanmıştır. Aseklofenak asit halinde bulunduğundan protonlama yapılmamıştır. Titrasyonlar, 25°C de gerçekleştirilmiştir. Titrasyon verileri, φ-pH grafiklerinde değerlendirilmiştir; Bjerrum yaklaşımı kullanılarak potansiyometrik verilerin uygunluğu kontrol edilmiştir. Potansiyometrik titrasyonla ilgili grafikler değerlendirilerek, titrasyonun stokiyometrik davranışı belirlenmiş ve çalışılan bileşiklerin pK_a değerleri tayin edilmiştir.

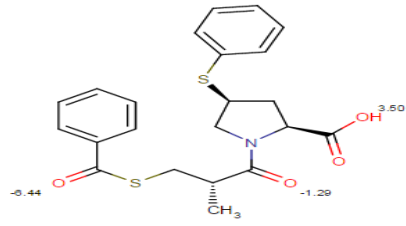
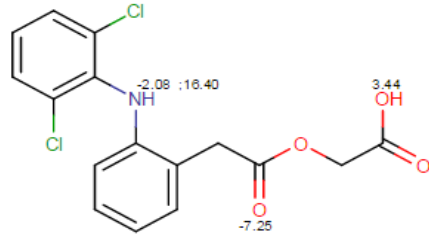
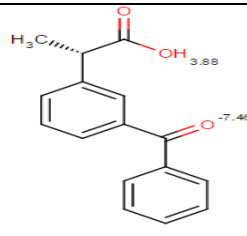
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Zofenopril, aseklofenak ve deksketoprofen yapılarında karboksil grubu bulundurlar. Bu bileşiklerle ilgili olarak, su-organik çözücü ikili karışımlarında iyonlaşma sabitleri ve kromatografik davranışlarına dair literatürler de yeterli veri bulunmamaktadır. Bunun için, literatürlerde bu bileşiklerin iyonlaşan kısımlarına ait pK_a değerleri, tahmini iyonlaşma sabiti paket programlarıyla hesaplanarak verilmiştir.

4.1. Bileşiklerin Marvin Sketch Programı İle İyonlaşma/Protonasyon Sabitlerinin Tayini

Zofenopril, aseklofenak ve deksketoprofen'in su ortamındaki tahmini pK_a ve $\log P$ değerleri Marvin Sketch programı ile hesaplanmış ve bu değerler çizelge 4.1'de verilmiştir.

Çizelge 4.1. Zofenopril, aseklofenak ve deksketoprofen'in Marvin Sketch programıyla hesaplanmış pK_a ve $\log P$ değerleri

| Bileşikler | Kimyasal Yapıları |
|----------------|---|
| Zofenopril |  $\log P = 4,31$ |
| Aseklofenak |  $\log P = 3,88$ |
| Deksketoprofen |  $\log P = 3,61$ |

4.3. Bileşiklerin HPLC Yöntemiyle Farklı Su-Organik Çözücü İkili Karışımlarında İyonlaşma Sabitlerinin Tayini

Zofenopril, aseklofenak ve deksketoprofenin iyonlaşma sabitlerinin tayini %30, %35 ve %40 ACN:H₂O.(v/v) ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Alıkonma zamanına elüent pH'sının etkisi farklı pH değerleri 2,4; 3,0; 3,6; 4,2; 4,8; 5,4; 6,0; 6,6; 7,2; 7,5 olan mobil fazlar kullanılarak incelenmiştir. Bileşiğe ait pK_a değerleri, alıkonma zamanı ile pH arasındaki ilişki kullanılarak Origin Pro2015 programıyla hesaplanmıştır.

4.3.1. Zofenopril için sıvı kromatografik veriler

Zofenopril için farklı pH'larda ve üç farklı koşulda elde edilen alıkonma zamanları (t_r), kuyruklanma faktörü (T_f) ve etkin tabaka sayısı (N) değerleri çizelge 4.3, 4.4 ve 4.5'de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Zofenopril için %30 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki alıkonma zamanı (t_r), kuyruklanma faktörü (T_f) ve etkin tabaka sayısı (N) değerleri

| pH | t _{r, ort} | T _f | N |
|-----|---------------------|----------------|------|
| 2,4 | 53,153 | 0,997 | 6282 |
| 3 | 52,279 | 1,068 | 5170 |
| 3,6 | 50,835 | 1,068 | 5170 |
| 4,2 | 37,243 | 1,038 | 4592 |
| 4,8 | 23,9235 | 0,882 | 3352 |
| 5,4 | 15,9295 | 1,06 | 2403 |
| 6 | 12,856 | 1,143 | 1815 |
| 6,6 | 13,309 | 1,15 | 1360 |

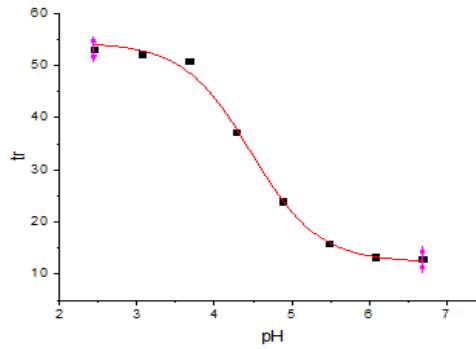
Çizelge 4.4. Zofenopril için %35 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki alıkonma zamanı (t_r), kuyruklanma faktörü (T_f) ve etkin tabaka sayısı (N) değerleri

| pH | t _{r, ort} | T _f | N |
|-----|---------------------|----------------|------|
| 2,4 | 25,579 | 1,04 | 5873 |
| 3 | 25,9815 | 1,042 | 5810 |
| 3,6 | 24,334 | 1,047 | 5675 |
| 4,2 | 19,796 | 1,02 | 5105 |
| 4,8 | 14,299 | 0,831 | 2906 |
| 5,4 | 10,4345 | 0,831 | 2906 |
| 6 | 7,843 | 1,059 | 2662 |
| 6,6 | 7,655 | 1,02 | 2318 |

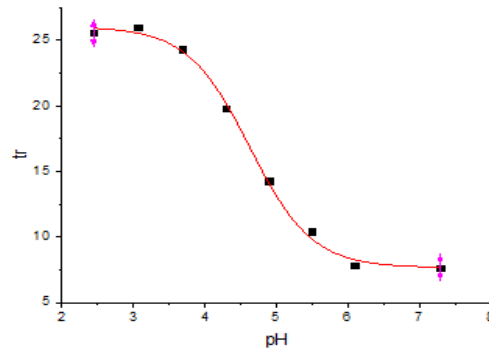
Çizelge 4.5. Zofenopril için %40 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki alıkonma zamanı (t_r), kuyruklanma faktörü (T_f) ve etkin tabaka sayısı (N) değerleri

| pH | t_r , ort | T_f | N |
|-----|-------------|-------|------|
| 2,4 | 13,7655 | 1,074 | 7523 |
| 3 | 14,2905 | 1,092 | 6338 |
| 3,6 | 13,1145 | 1,056 | 6078 |
| 4,2 | 12,0625 | 1,052 | 5520 |
| 4,8 | 9,5055 | 0,959 | 4641 |
| 5,4 | 7,423 | 0,845 | 3128 |
| 6 | 5,5765 | 0,997 | 3235 |
| 6,6 | 5,516 | 1,063 | 2977 |

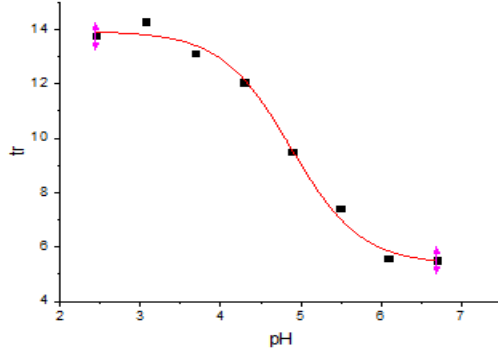
Zofenopril için bu üç farklı koşulda pH- t_r ilişkisini gösteren grafikler Origin Pro2015 programıyla çizilmiştir. Grafikler %30 için şekil 4.1, %35 için şekil 4.2 ve %40 için şekil 4.3'te verilmiştir.



Şekil 4.1. Zofenoprilin %30 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki pH'nın alıkonma faktörüne etkisi

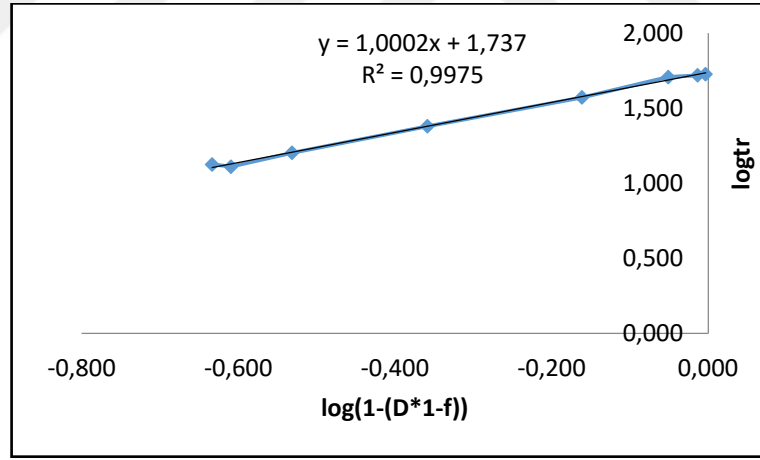


Şekil 4.2. Zofenoprilin %35 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki pH'nın alıkonma faktörüne etkisi

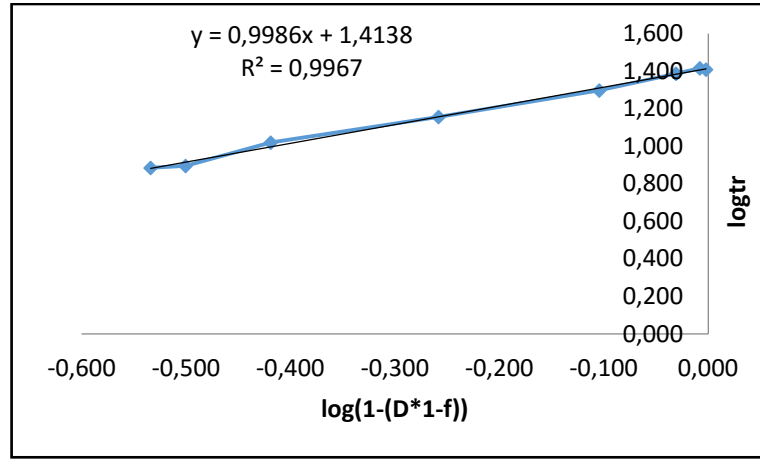


Şekil 4.3. Zofenoprilin %40 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki pH'nın alikonma faktörüne etkisi

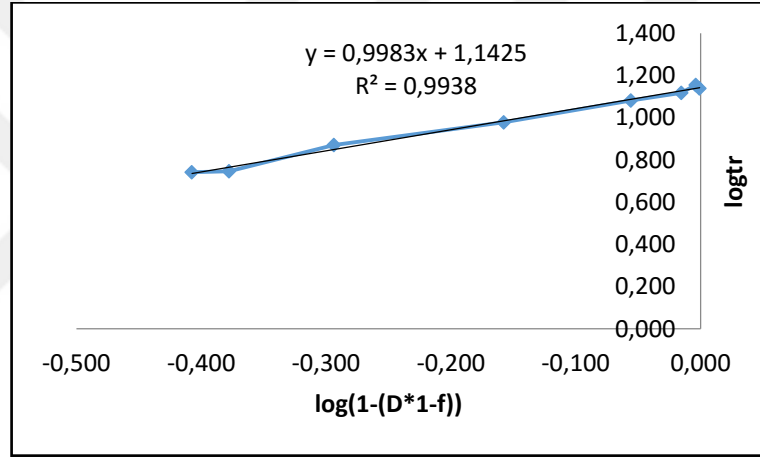
Zofenoprilin pK_a değerlerinin doğruluğu farklı yaklaşımlar kullanılarak kanıtlanmıştır. Burada istenen değerler eğimin güven aralığının 1 veya 1'e yakın olması, kesimin güven aralığının 0 veya 0'a yakın olması ve R² değerinin de 1'e yakın olması istenmektedir. Şekil 4.4, 4.5 ve 4.6'da zofenopril için tüm ortamlarda bu koşulu sağladığı görülmektedir.



Şekil 4.4. Zofenopril için %30 ACN:H₂O (v/v) ortamında log(1-(D*1-f))-log t_r grafiği

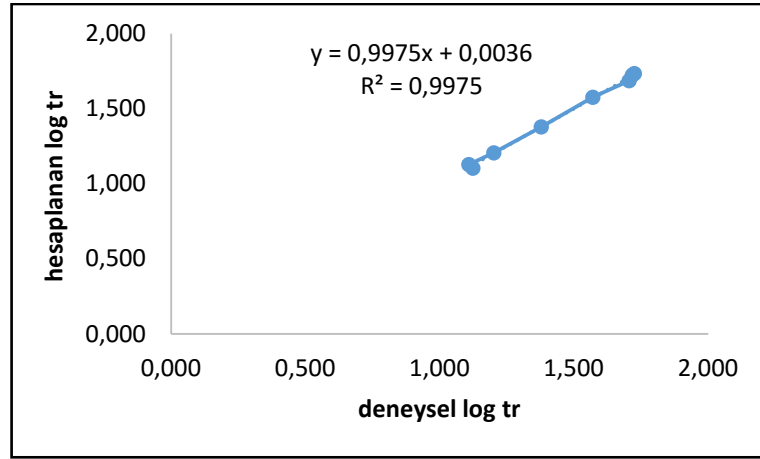


Şekil 4.5. Zofenopril için %35 ACN:H₂O (v/v) ortamında log(1-(D*1-f))-log t_r grafiği

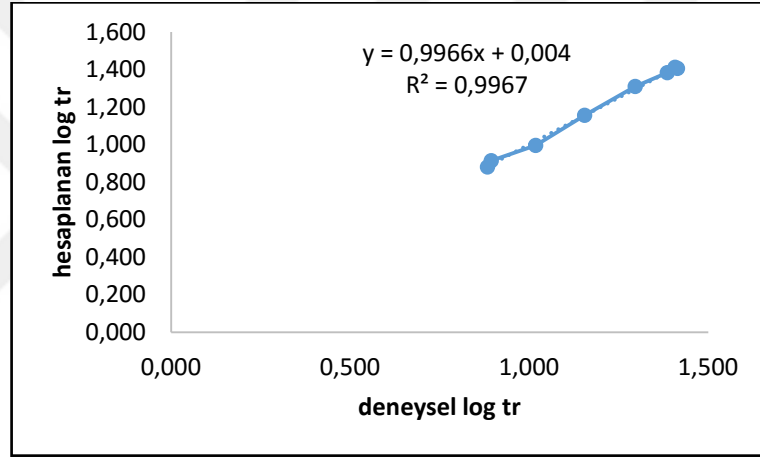


Şekil 4.6. Zofenopril için %40 ACN:H₂O (v/v) ortamında log(1-(D*1-f))-log t_r grafiği

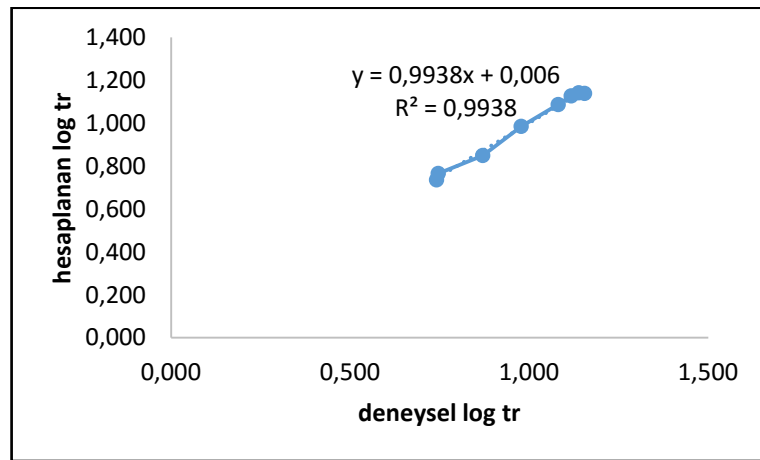
Zofenoprilin deneylerden elde edilen alıkonma zamanları ve hesaplanan alıkonma zamanları arasında çizilen grafikte eğimin güven aralığının 1 veya 1'e yakın kesimin güven aralığının 0 veya 0'a yakın olması ve R^2 değerinin de 1'e yakın olması istenmektedir. Şekil 4.7, 4.8 ve 4.9'da zofenopril için tüm ortamlarda bu koşulu sağladığı görülmektedir.



Şekil 4.7. Zofenoprilin %30 ACN:H₂O (v/v) ortamında deneySEL log t_r -hesaplanan log t_r grafiği

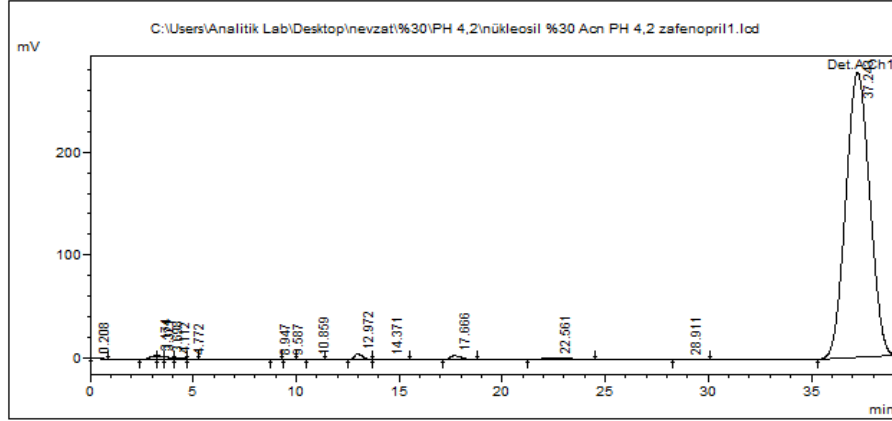


Şekil 4.8. Zofenoprilin %35 ACN:H₂O.(v/v) ortamında deneySEL log t_r -hesaplanan log t_r grafiği

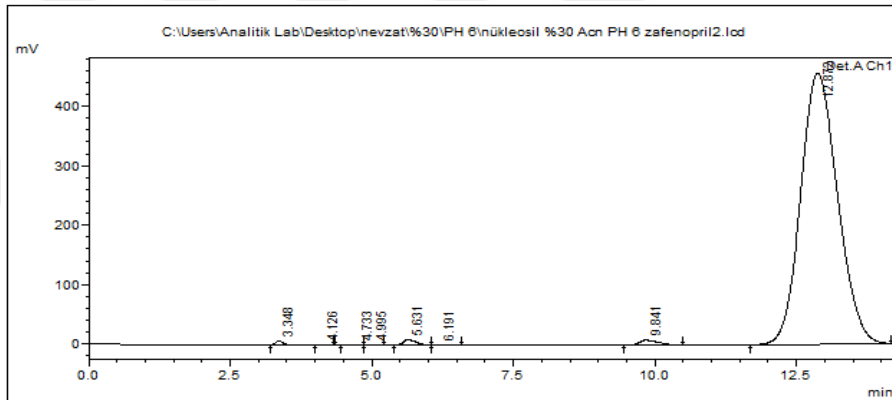


Şekil 4.9. Zofenoprilin %40 ACN:H₂O ortamında deneySEL log t_r -hesaplanan log t_r grafiği

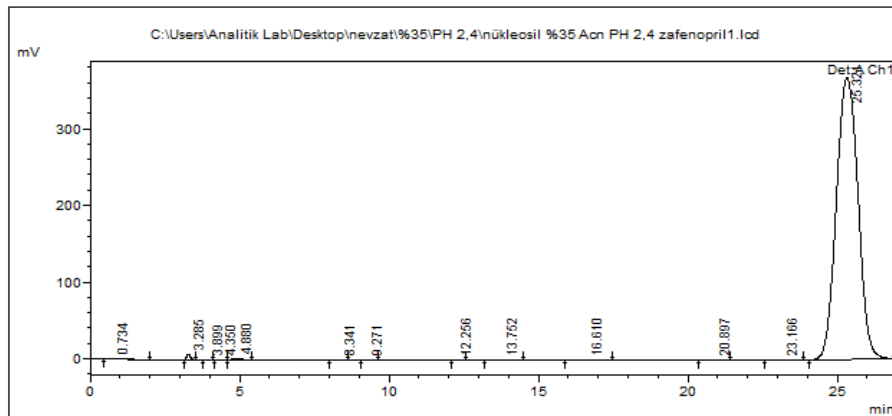
Zofenopril için seçilen kromatogram örnekleri şekil 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14 ve 4.15'te verilmiştir.



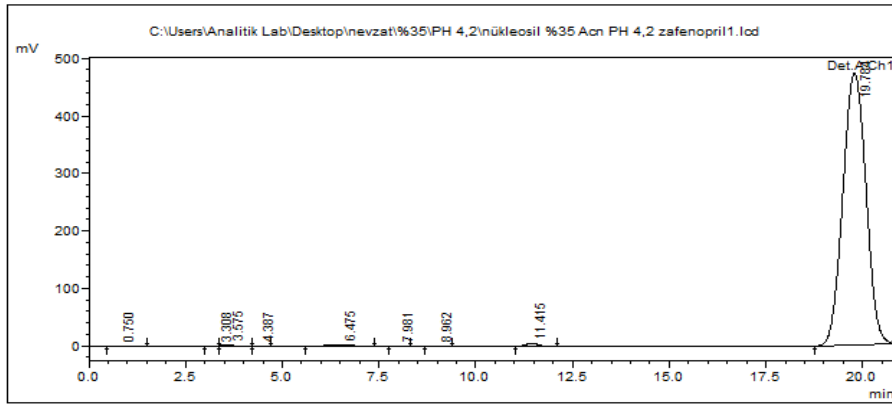
Şekil 4.10. Zofenoprilin %30 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 4,2



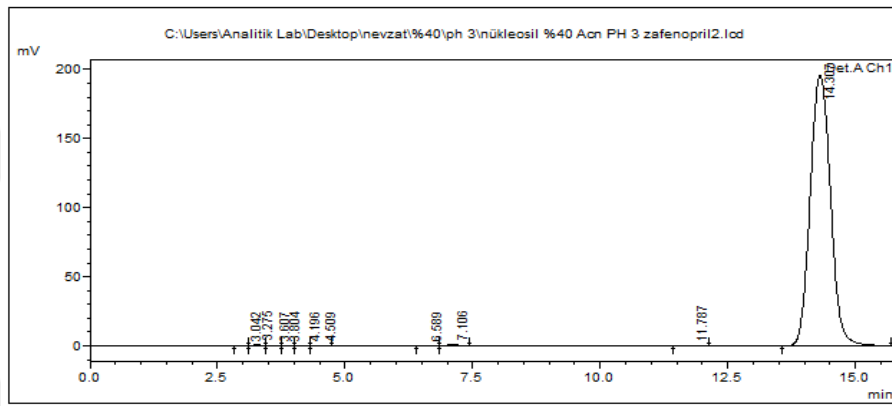
Şekil 4.11. Zofenoprilin %30 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 6,0



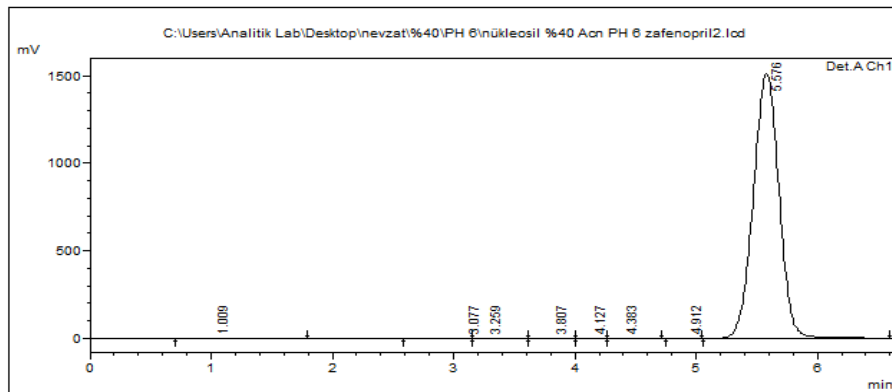
Şekil 4.12. Zofenoprilin %35 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 2,4



Şekil 4.13. Zofenoprilin %35 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 4,2



Şekil 4.14. Zofenoprilin %40 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 3,0



Şekil 4.15. Zofenoprilin %40 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 6,0

4.3.2. Aseklofenak için sıvı kromatografik veriler

Aseklofenak için farklı pH'larda ve üç farklı koşulda elde edilen alıkonma zamanları (t_r), kuyruklanma faktörü (T_f) ve etkin tabaka sayısı (N) değerleri çizelge 4.6, 4.7 ve 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.6. Aseklofenak için %30 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki alıkonma zamanı (t_r), kuyruklanma faktörü (T_f) ve etkin tabaka sayısı (N) değerleri

| pH | $t_{r, \text{ort}}$ | T_f | N |
|-----|---------------------|-------|------|
| 2,4 | 38,278 | 1,131 | 7981 |
| 3 | 34,902 | 1,158 | 7615 |
| 3,6 | 27,691 | 1,35 | 6114 |
| 4,2 | 17,619 | 1,449 | 5804 |
| 4,8 | 12,7835 | 1,533 | 5389 |
| 5,4 | 10,615 | 1,459 | 4144 |
| 6 | 9,7465 | 1,452 | 3504 |
| 6,6 | 10,24 | 1,574 | 2099 |

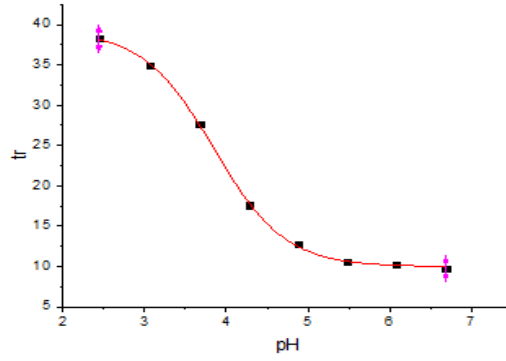
Çizelge 4.7. Aseklofenak için %35 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki alıkonma zamanı (t_r), kuyruklanma faktörü (T_f) ve etkin tabaka sayısı (N) değerleri

| pH | $t_{r, \text{ort}}$ | T_f | N |
|-----|---------------------|-------|------|
| 2,4 | 21,221 | 1,147 | 7606 |
| 3 | 20,278 | 1,151 | 7556 |
| 3,6 | 16,721 | 1,202 | 7197 |
| 4,2 | 11,524 | 0,995 | 6293 |
| 4,8 | 8,7005 | 0,743 | 5031 |
| 5,4 | 7,469 | 1,005 | 6569 |
| 6 | 6,4475 | 1,393 | 5392 |
| 6,6 | 6,472 | 1,269 | 5368 |

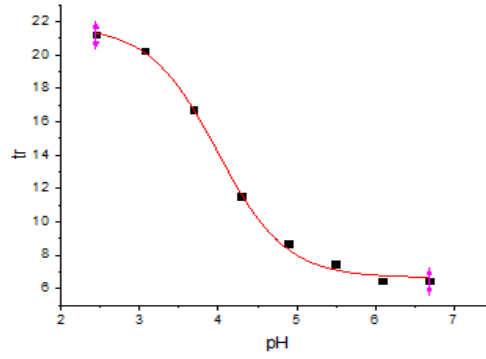
Çizelge 4.8. Aseklofenak için %40 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki alıkonma zamanı (t_r), kuyruklanma faktörü (T_f) ve etkin tabaka sayısı (N) değerleri

| pH | $t_{r, \text{ort}}$ | T_f | N |
|-----|---------------------|-------|------|
| 2,4 | 12,229 | 1,087 | 8722 |
| 3 | 12,4995 | 1,101 | 8104 |
| 3,6 | 10,595 | 1,067 | 7429 |
| 4,2 | 8,425 | 1,05 | 6466 |
| 4,8 | 6,5925 | 0,771 | 4181 |
| 5,4 | 5,8045 | 0,914 | 4726 |
| 6 | 4,913 | 1,118 | 5047 |
| 6,6 | 4,985 | 1,302 | 4859 |

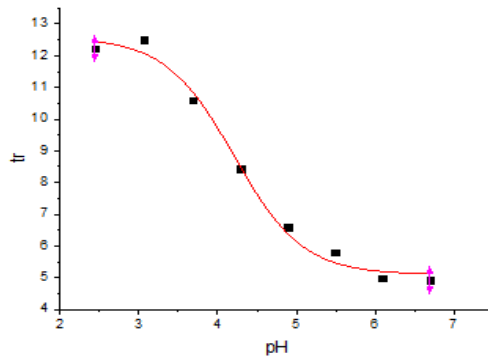
Aseklofenak için bu üç farklı koşulda pH- t_r ilişkisini gösteren grafikler Origin Pro2015 programıyla çizilmiştir.



Şekil 4.16. Aseklofenak için %30 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki pH'nın alıkonma faktörüne etkisi

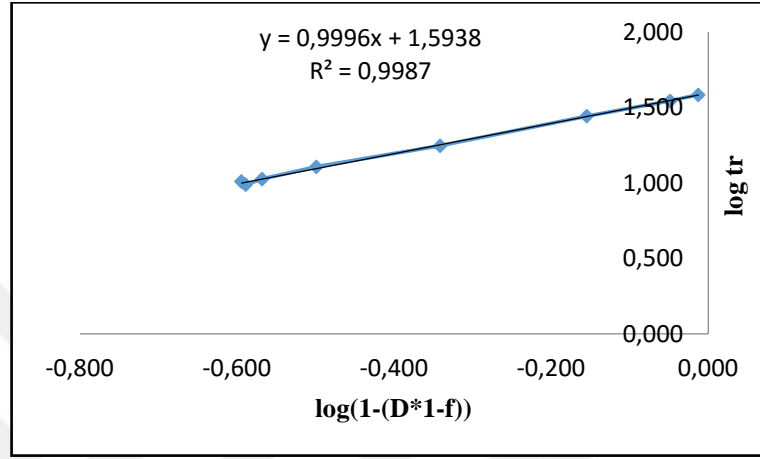


Şekil 4.17. Aseklofenak için %35 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki pH'nın alıkonma faktörüne etkisi

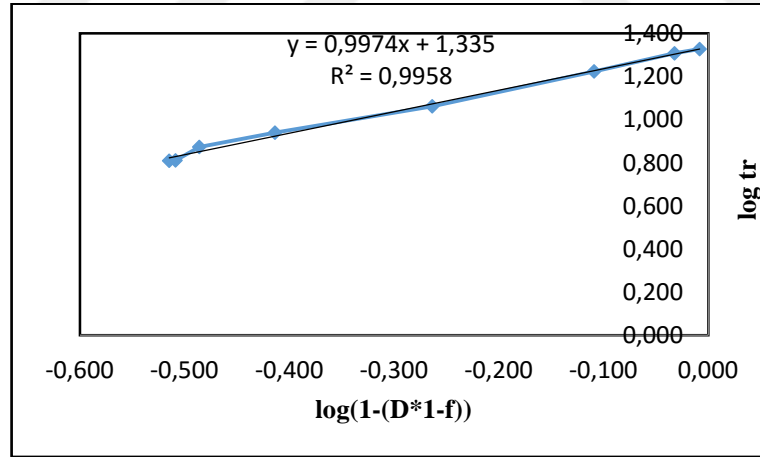


Şekil 4.18. Aseklofenak için %40 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki pH'nın alıkonma faktörüne etkisi

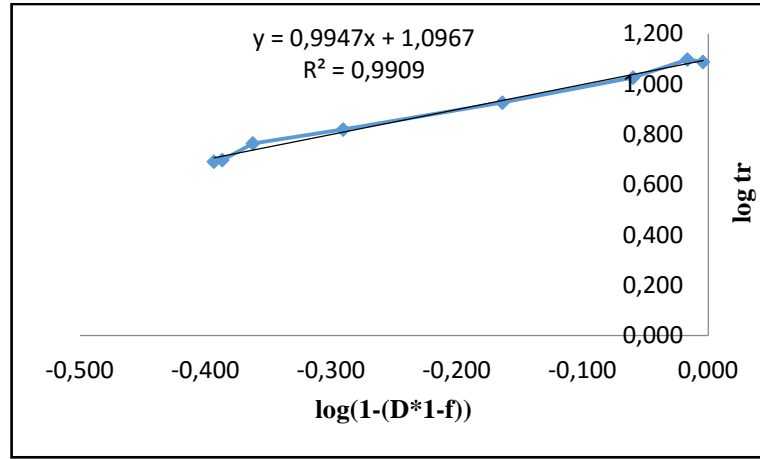
Aseklofenakın pKa değerlerinin doğruluğu farklı yaklaşımlar kullanılarak kanıtlanmıştır. Burada istenen değerler eğimin güven aralığının 1 veya 1'e yakın olması, kesimin güven aralığının 0 veya 0'a yakın olması ve R^2 değerinin de 1'e yakın olması istenmektedir. Şekil 4.19, 4.20 ve 4.21'de aseklofenak için tüm ortamlarda bu koşulu sağladığı görülmektedir.



Şekil 4.19. Aseklofenakın %30 ACN:H₂O.(v/v) ortamında log(1-(D*1-f))-log t_r grafiği

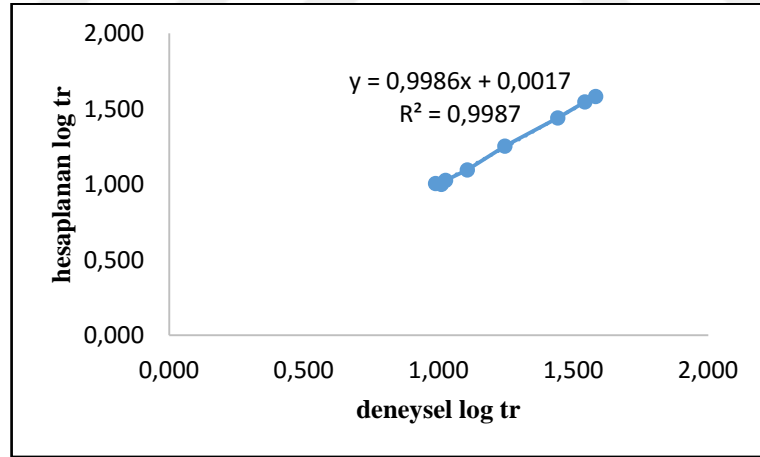


Şekil 4.20. Aseklofenakın %35 ACN:H₂O (v/v) ortamında log(1-(D*1-f))-log t_r grafiği

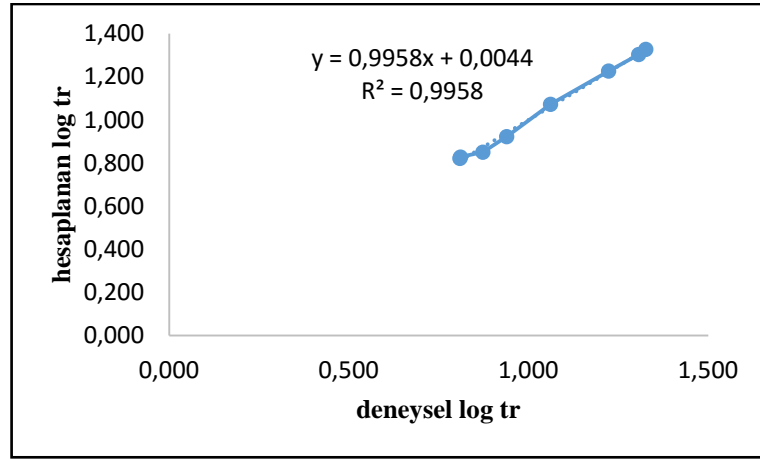


Şekil 4.21. Aseklofenakın %40 ACN:H₂O (v/v) ortamında log(1-(D*1-f))-log t_r grafiği

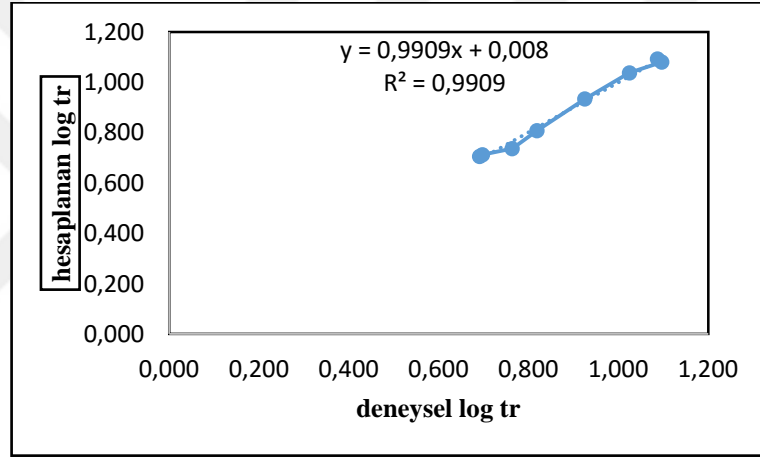
Aseklofenakın deneylerden elde edilen alıkonma zamanları ve hesaplanan alıkonma zamanları grafiğe geçirildiğinde eğimin güven aralığının 1 veya 1'e yakın kesimin güven aralığının 0 veya 0'a yakın olması ve R² değerinin de 1'e yakın olması istenmektedir. Şekil 4.22, 4.23 ve 4.24'te aseklofenak için tüm ortamlarda bu koşulu sağladığı görülmektedir.



Şekil 4.22. Aseklofenakın %30 ACN:H₂O (v/v) ortamında deneysel log t_r-hesaplanan log t_r grafiği

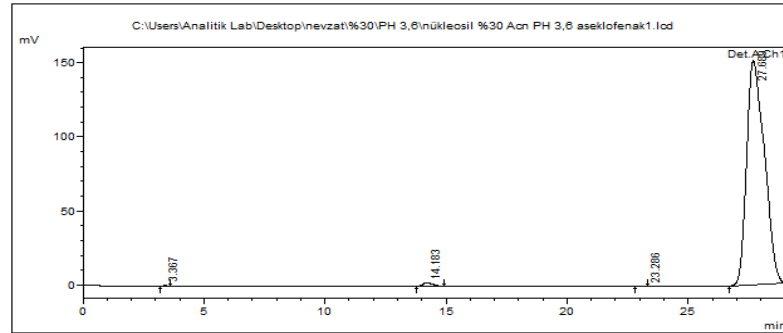


Şekil 4.23. Aseklfenakın %35 ACN:H₂O (v/v) ortamında deneysel log t_r-hesaplanan log t_r grafiği

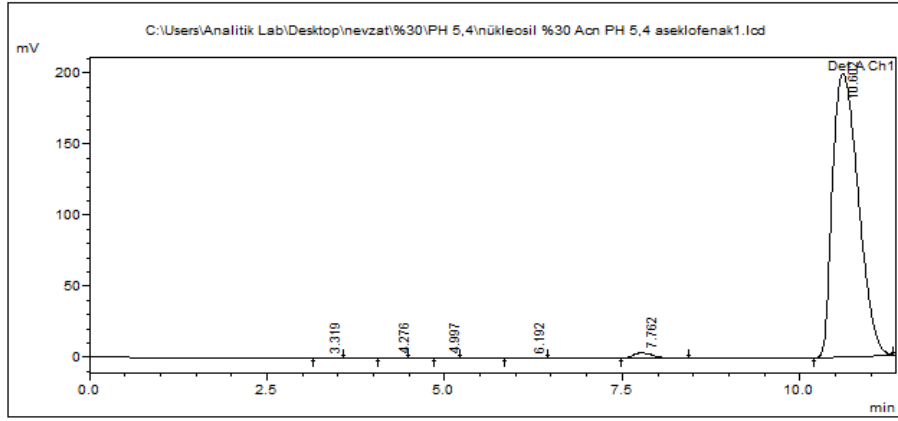


Şekil 4.24. Aseklfenakın %40 ACN:H₂O (v/v) ortamında deneysel log t_r-hesaplanan log t_r grafiği

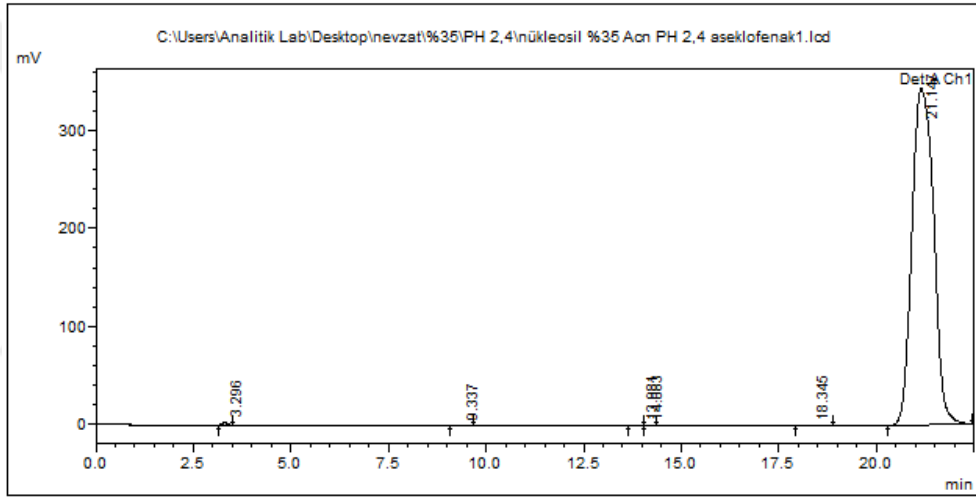
Aseklfenak için seçilen kromatogram örnekleri şekil 4.25, 4.26, 4.27, 4.28, 4.29 ve 4.30'da verilmiştir.



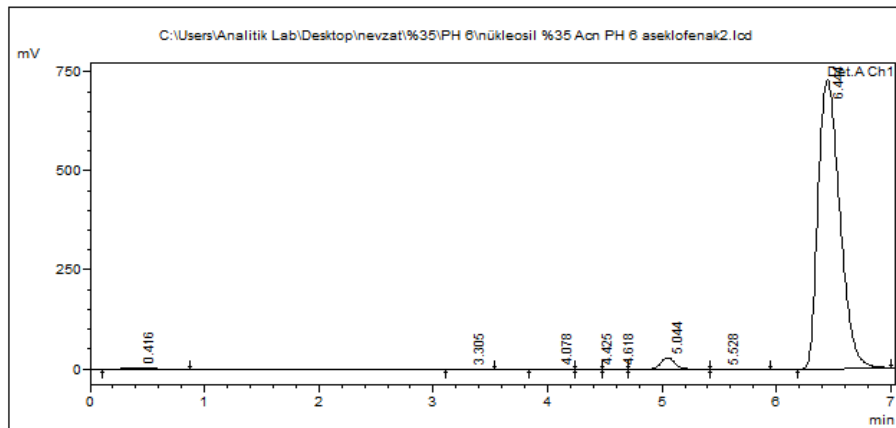
Şekil 4.25. Aseklfenakın %30 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 3,6



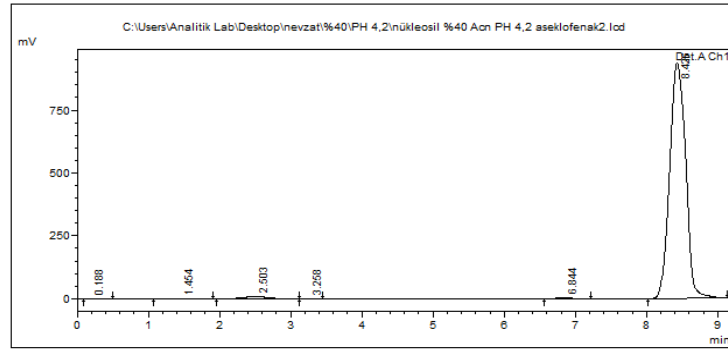
Şekil 4.26. Aseklfenakın %30 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 5,4



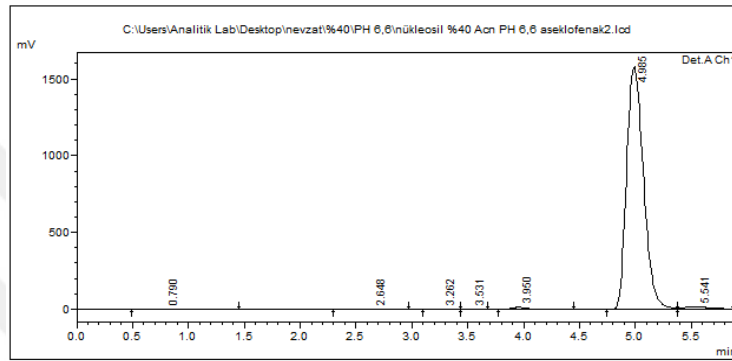
Şekil 4.27. Aseklfenakın %35 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 2,4



Şekil 4.28. Aseklfenakın %35 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 6,0



Şekil 4.29. Aseklöfenakın %40 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 4,2



Şekil 4.30. Aseklöfenakın %40 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 6,6

4.3.3. Deksketoprofen için sıvı kromatografik veriler

Deksketoprofen için farklı pH'larda ve üç farklı koşulda elde edilen alıkonma zamanları, kuyruklanma faktörü (T_f) ve etkin tabaka sayısı değerleri çizelge 4.10, 4.11 ve 4.12'de verilmiştir.

Çizelge 4.9. Deksketoprofen için %30 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki alıkonma zamanı (t_r), kuyruklanma faktörü (T_f) ve etkin tabaka sayısı (N) değerleri

| pH | t_r , ort | T_f | N |
|-----|-------------|-------|------|
| 2,4 | 13,615 | 1,215 | 7401 |
| 3 | 13,860 | 1,232 | 7295 |
| 3,6 | 14,102 | 1,450 | 5712 |
| 4,2 | 12,955 | 1,427 | 5866 |
| 4,8 | 10,941 | 0,858 | 5917 |
| 5,4 | 8,275 | 0,671 | 1870 |
| 6 | 5,693 | 1,105 | 4390 |
| 6,6 | 4,885 | 1,655 | 2469 |
| 7,2 | 4,572 | 1,770 | 2429 |

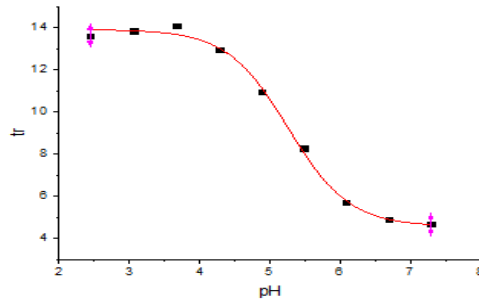
Çizelge 4.10. Deksketoprofen için %35 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki alıkonma zamanı (t_r), kuyruklanma faktörü (T_f) ve etkin tabaka sayısı (N) değerleri

| pH | $t_{r, \text{ort}}$ | T_f | N |
|-----|---------------------|-------|------|
| 2,4 | 9,362 | 1,198 | 7083 |
| 3 | 9,508 | 1,190 | 7164 |
| 3,6 | 9,450 | 1,265 | 6920 |
| 4,2 | 8,944 | 1,236 | 6975 |
| 4,8 | 8,155 | 1,322 | 6825 |
| 5,4 | 7,000 | 0,650 | 2840 |
| 6 | 5,115 | 0,946 | 6640 |
| 6,6 | 4,329 | 1,177 | 5331 |
| 7,2 | 4,028 | 1,198 | 4870 |
| 7,5 | 3,879 | 1,193 | 4912 |

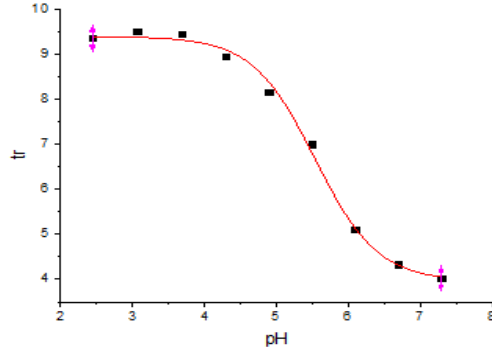
Çizelge 4.11. Deksketoprofen için %40 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki alıkonma zamanı (t_r), kuyruklanma faktörü (T_f) ve etkin tabaka sayısı (N) değerleri

| pH | $t_{r, \text{ort}}$ | T_f | N |
|-----|---------------------|-------|------|
| 2,4 | 6,869 | 1,127 | 7149 |
| 3 | 7,102 | 1,132 | 7323 |
| 3,6 | 6,898 | 1,052 | 6817 |
| 4,2 | 6,846 | 1,078 | 6666 |
| 4,8 | 6,497 | 1,098 | 6796 |
| 5,4 | 5,772 | 0,872 | 5347 |
| 6 | 4,703 | 0,712 | 2627 |
| 6,6 | 3,975 | 1,072 | 5540 |
| 7,2 | 3,755 | 1,161 | 5169 |
| 7,5 | 3,694 | 1,206 | 5537 |

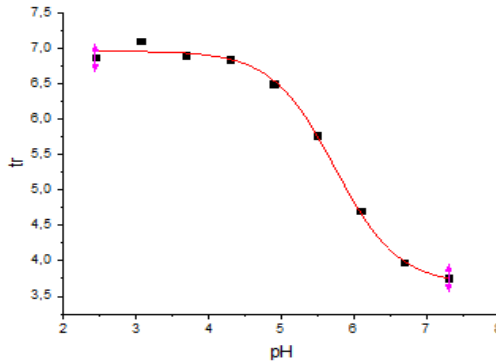
Deksketoprofen için bu üç farklı koşulda pH- t_r ilişkisini gösteren grafikler Origin Pro2015 programıyla çizilmiştir.



Şekil 4.31. Deksketoprofen için %30 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki pH'nın alıkonma faktörüne etkisi

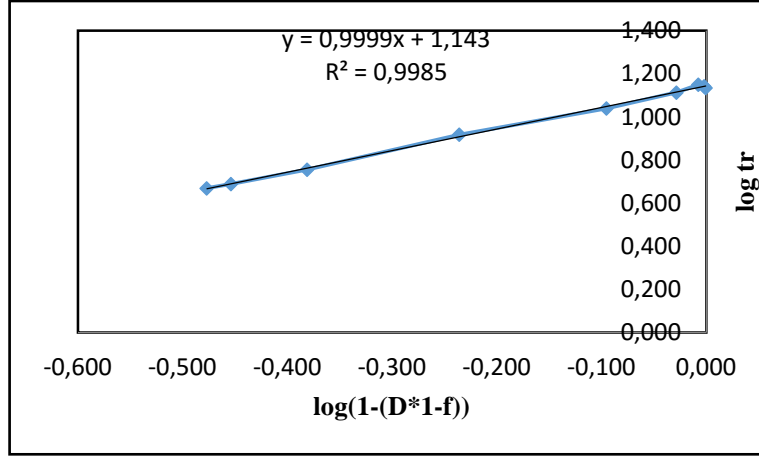


Şekil 4.32. Deksketoprofen için %35 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki pH'nın alıkonma faktörüne etkisi

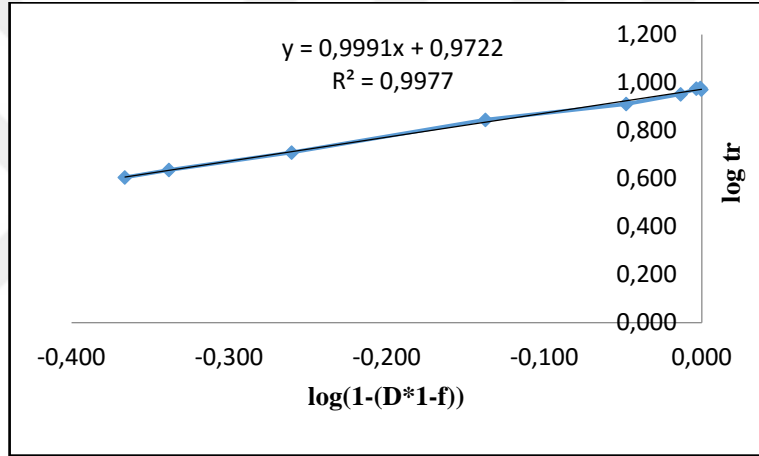


Şekil 4.33. Deksketoprofen için %40 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki pH'nın alıkonma faktörüne etkisi

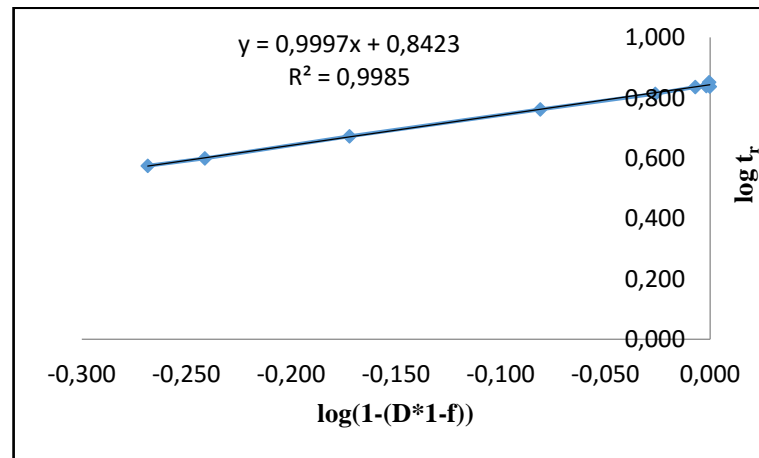
Deksketoprofenin pKa değerlerinin doğruluğu farklı yaklaşımlar kullanılarak kanıtlanmıştır. Burada istenen değerler eğimin güven aralığının 1 veya 1'e yakın olması, kesimin güven aralığının 0 veya 0'a yakın olması ve R² değerinin de 1'e yakın olması istenmektedir. Şekil 4.34, 4.35 ve 4.36'de deksetoprofen için tüm ortamlarda bu koşulu sağladığı görülmektedir.



Şekil 4.34. Deksketoprofenin %30 ACN:H₂O (v/v) ortamında $\log(1-(D*1-f))$ - $\log t_r$ grafiği

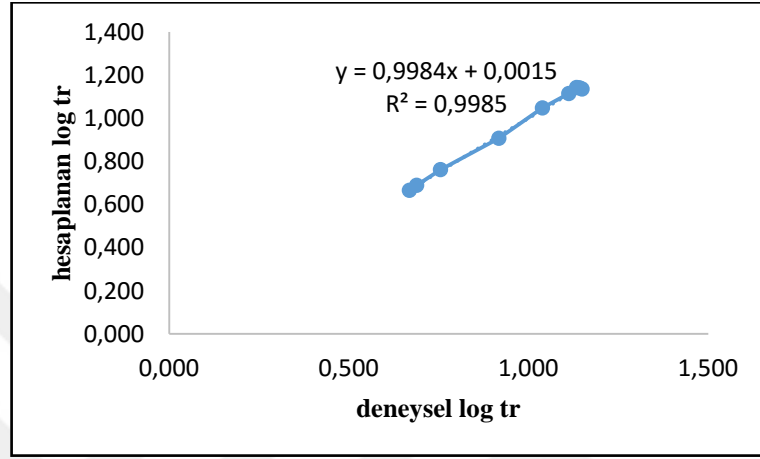


Şekil 4.35. Deksketoprofenin %35 ACN:H₂O (v/v) ortamında $\log(1-(D*1-f))$ - $\log t_r$ grafiği

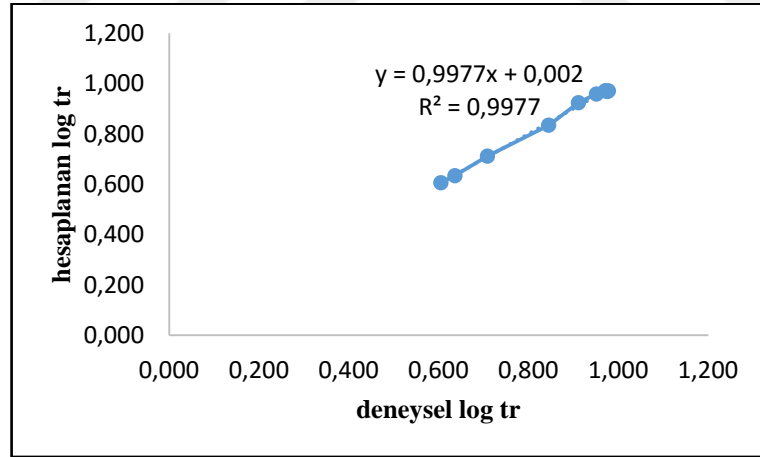


Şekil 4.36. Deksketoprofenin %40 ACN:H₂O (v/v) ortamında $\log(1-(D*1-f))$ - $\log t_r$ grafiği

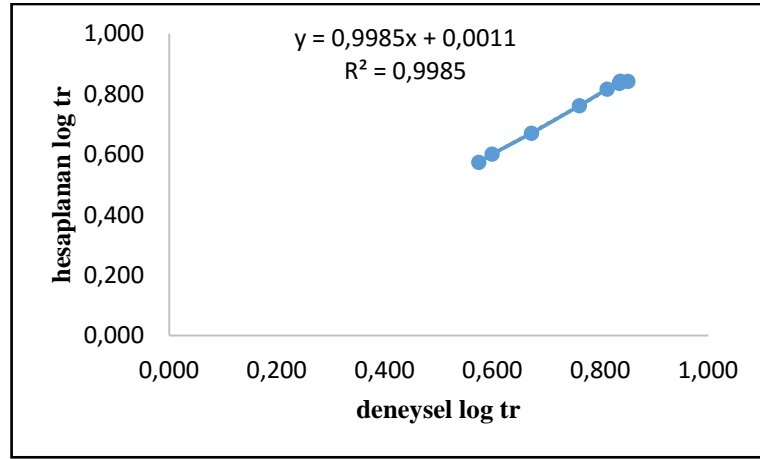
Deksketoprofenin deneylerden elde edilen alıkonma zamanları ve hesaplanan alıkonma zamanları grafiğe geçirildiğinde eğimin güven aralığının 1 veya 1'e yakın kesimin güven aralığının 0 veya 0'a yakın olması ve R^2 değerinin de 1'e yakın olması istenmektedir. Şekil 4.37, 4.38 ve 4.39'te deksketoprofen için tüm ortamlarda bu koşulu sağladığı görülmektedir.



Şekil 4.37. Deksketoprofenin %30 ACN:H₂O (v/v) ortamında deneysel log t_r- hesaplanan log t_r grafiği

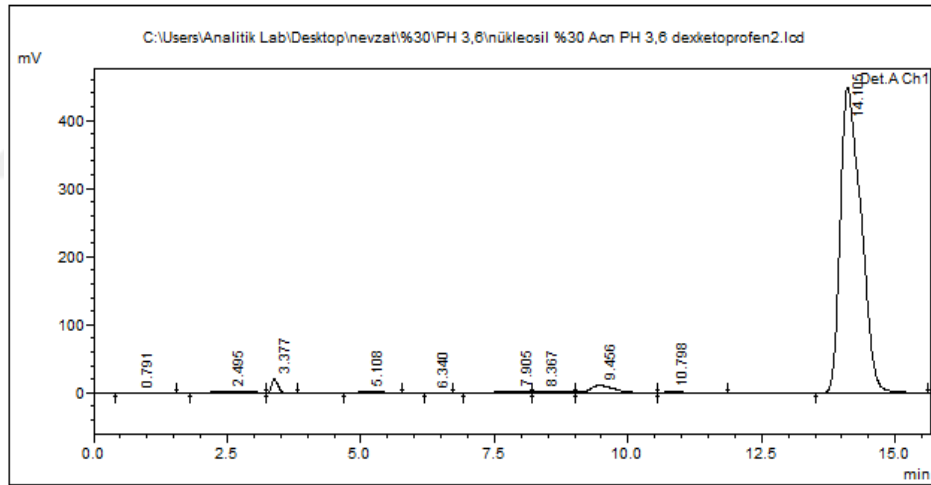


Şekil 4.38. Deksketoprofenin %35 ACN:H₂O (v/v) ortamında deneysel log t_r- hesaplanan log t_r grafiği

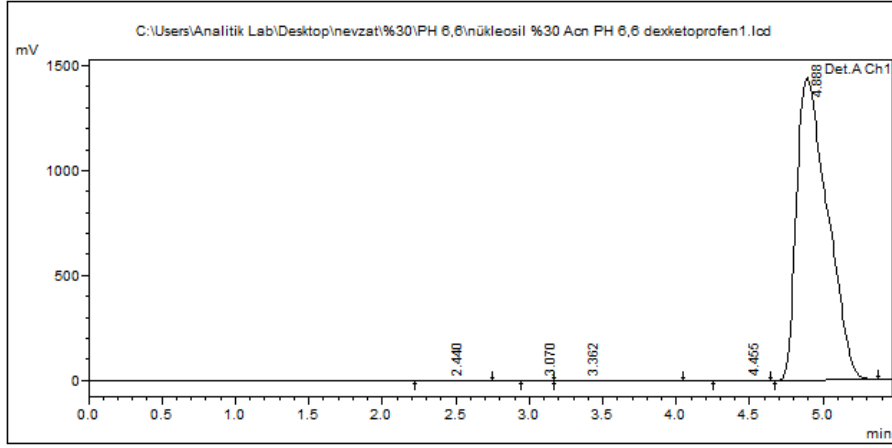


Şekil 4.39. Deksketoprofenin %40 ACN:H₂O (v/v) ortamında deneyysel log t_r - hesaplanan log t_r grafiği

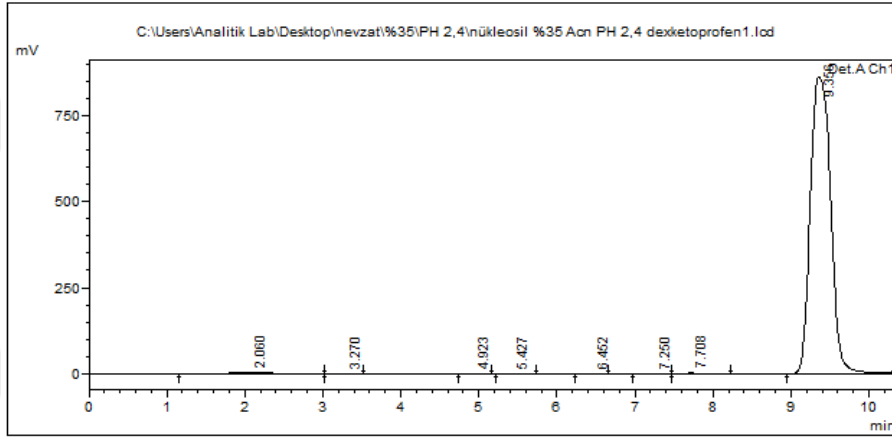
Deksketoprofen için seçilen kromatogram örnekleri şekil 4.40, 4.41, 4.42, 4.43, 4.44 ve 4.45'te verilmiştir.



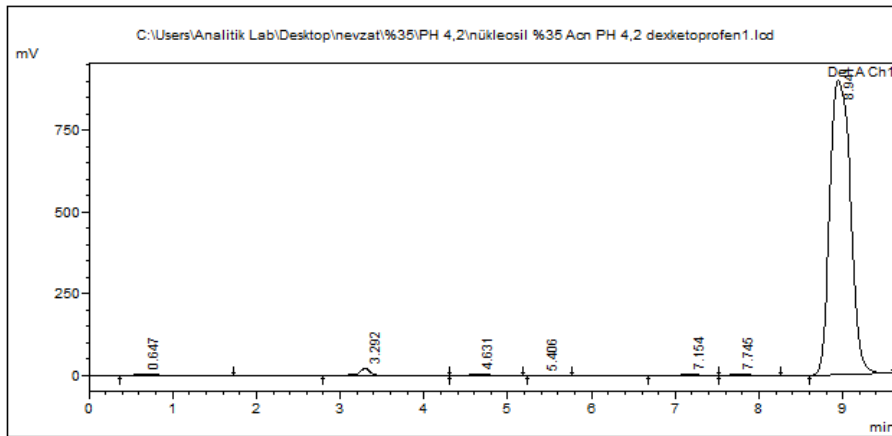
Şekil 4.40. Deksketoprofenin %30 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 3,6



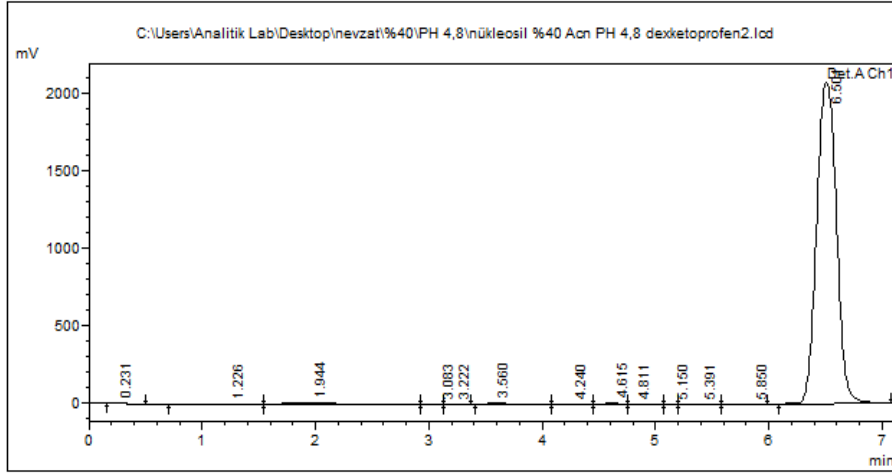
Şekil 4.41. Deksketoprofenin %30 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 6,6



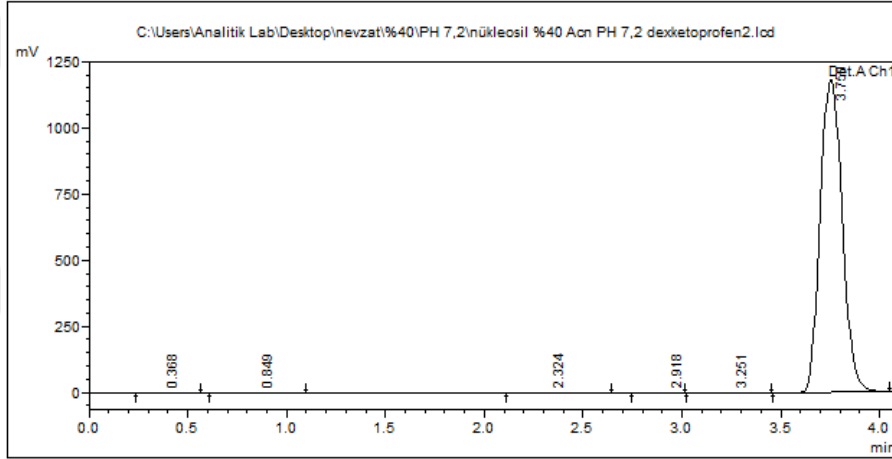
Şekil 4.42. Deksketoprofenin %35 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 2,4



Şekil 4.43. Deksketoprofenin %35 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 4,2



Şekil 4.44. Deksketoprofenin %40 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 4,8



Şekil 4.45. Deksketoprofenin %40 ACN:H₂O (v/v) ortamındaki kromatogramı, pH 7,2

4.4. Potansiyometrik Yöntemle İyonlaşma Sabiti Tayini

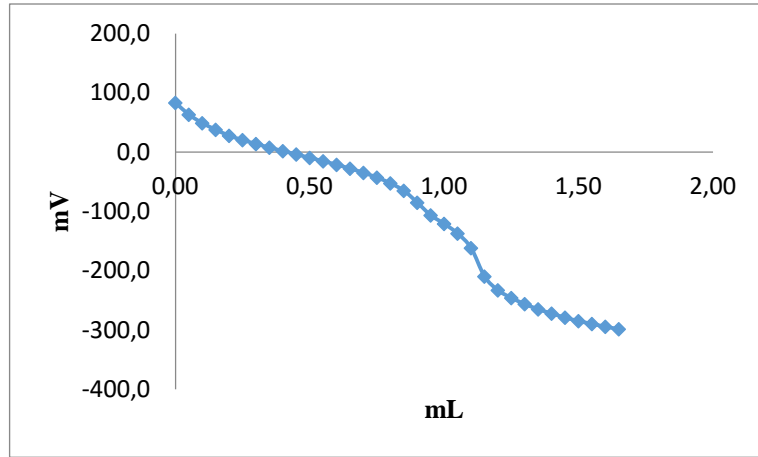
4.4.1. KHP İçin %50 ACN:H₂O (v/v) İkili Karışımındaki Potansiyometrik Titrasyon Grafikleri

2.10⁻³ M'lık KHP çözeltisinin 30 mL si, ayarlı KOH ile titre edilmiştir. Elde edilen mV verileri ve mV değerlerinin pH'a dönüştürülmüş değerleri çizelge 4.13'de verilmiştir.

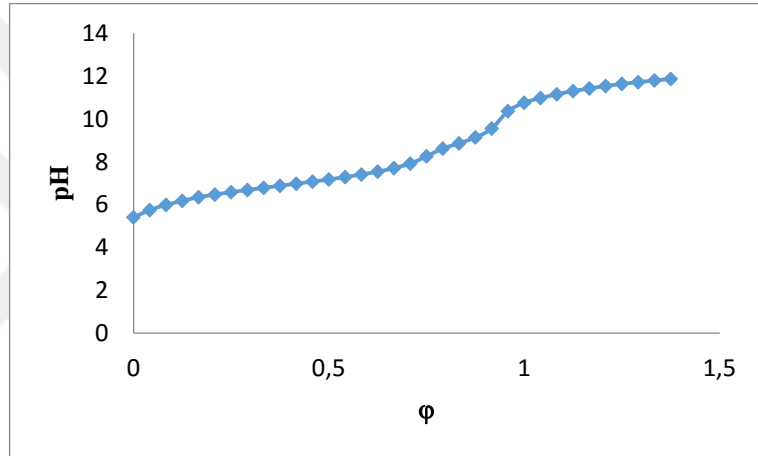
Çizelge 4.12. KHP'nin % 50 (v/v) ACN:H₂O ortamındaki titrasyon verileri

| mL | mV | pH |
|-----------|-----------|-----------|
| 0,00 | 83,0 | 5,409 |
| 0,05 | 63,0 | 5,747 |
| 0,10 | 48,7 | 5,989 |
| 0,15 | 37,6 | 6,176 |
| 0,20 | 27,5 | 6,347 |
| 0,25 | 20,2 | 6,471 |
| 0,30 | 13,6 | 6,582 |
| 0,35 | 7,5 | 6,685 |
| 0,40 | 1,6 | 6,785 |
| 0,45 | -4,0 | 6,880 |
| 0,50 | -9,8 | 6,978 |
| 0,55 | -15,5 | 7,074 |
| 0,60 | -21,5 | 7,175 |
| 0,65 | -28,0 | 7,285 |
| 0,70 | -35,1 | 7,405 |
| 0,75 | -43,1 | 7,541 |
| 0,80 | -52,8 | 7,705 |
| 0,85 | -65,3 | 7,916 |
| 0,90 | -85,4 | 8,256 |
| 0,95 | -106,8 | 8,617 |
| 1,00 | -121,1 | 8,859 |
| 1,05 | -137,5 | 9,136 |
| 1,10 | -162,0 | 9,550 |
| 1,15 | -210,0 | 10,362 |
| 1,20 | -233,2 | 10,754 |
| 1,25 | -246,2 | 10,974 |
| 1,30 | -256,5 | 11,148 |
| 1,35 | -265,3 | 11,296 |
| 1,40 | -272,5 | 11,418 |
| 1,45 | -279,3 | 11,533 |
| 1,50 | -285,2 | 11,633 |
| 1,55 | -290,0 | 11,714 |
| 1,60 | -294,7 | 11,793 |
| 1,65 | -298,8 | 11,863 |

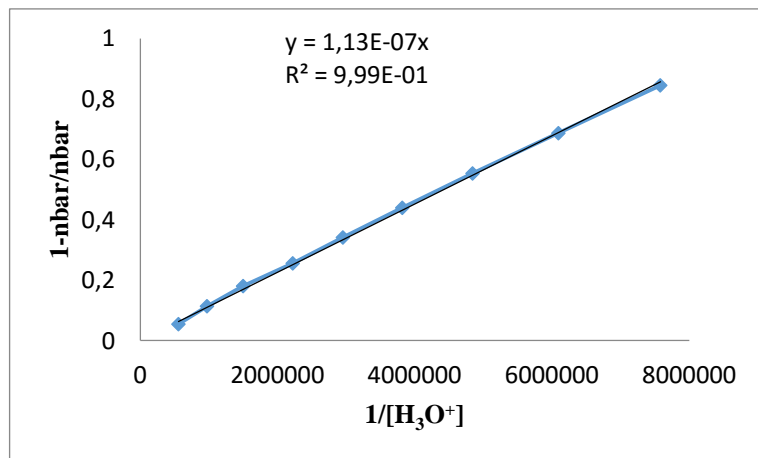
KHP bileşiğın titrasyonuna ait titrant mL-mV, pH-φ ve Bjerrum grafikleri, sırasıyla şekil 4.46, 4.47 ve 4.48'de verilmiştir.



Şekil 4.46. KHP'nin % 50 (v/v) ACN:H₂O ortamındaki titrasyon grafiği



Şekil 4.47. KHP'nin %50 (v/v) ACN:H₂O ortamındaki potansiyometrik titrasyon grafiği



Şekil 4.48. KHP'nin %50 (v/v) ACN:H₂O ortamındaki Bjerrum grafiği

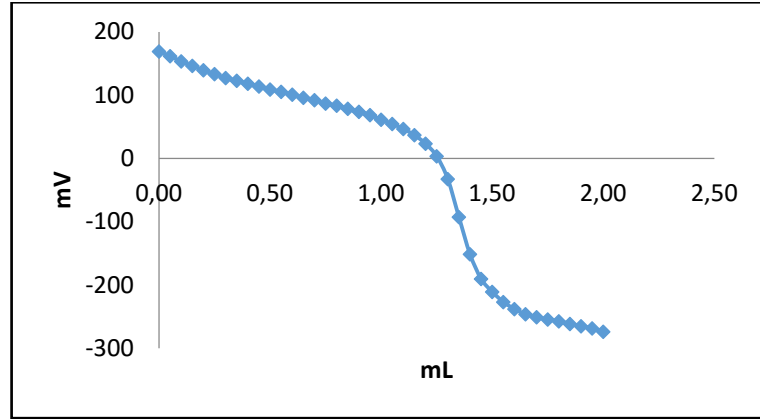
4.4.2. Zofenoprilin potansiyometrik titrasyon veri ve grafikleri

2.10⁻³ M'lık zofenopril çözeltilisinin 30 mL si, ayarlı KOH ile titre edilmiştir. Elde edilen mV verileri ve mV değerlerinin pH'a dönüştürülmüş değerleri çizelge 4.14'de verilmiştir.

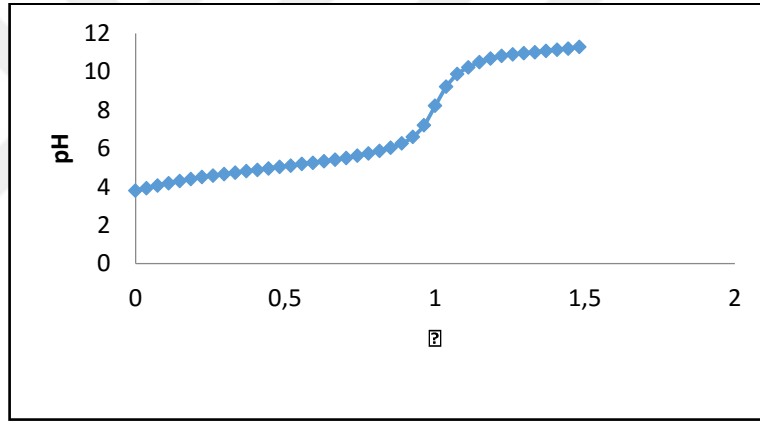
Çizelge 4.13. Zofenoprilin % 50 (v/v) ACN:H₂O ortamındaki titrasyon verileri

| mL | mV | pH |
|------|--------|--------|
| 0,00 | 168,9 | 3,805 |
| 0,05 | 161,5 | 3,930 |
| 0,10 | 153,3 | 4,069 |
| 0,15 | 146,2 | 4,189 |
| 0,20 | 139,3 | 4,305 |
| 0,25 | 133,2 | 4,408 |
| 0,30 | 127,0 | 4,513 |
| 0,35 | 122,7 | 4,586 |
| 0,40 | 118,0 | 4,665 |
| 0,45 | 113,6 | 4,740 |
| 0,50 | 108,8 | 4,821 |
| 0,55 | 105,2 | 4,882 |
| 0,60 | 100,7 | 4,958 |
| 0,65 | 95,8 | 5,041 |
| 0,70 | 92,0 | 5,105 |
| 0,75 | 86,6 | 5,196 |
| 0,80 | 83,3 | 5,252 |
| 0,85 | 78,4 | 5,335 |
| 0,90 | 73,6 | 5,416 |
| 0,95 | 68,4 | 5,504 |
| 1,00 | 61,1 | 5,627 |
| 1,05 | 54,4 | 5,740 |
| 1,10 | 46,5 | 5,874 |
| 1,15 | 36,7 | 6,040 |
| 1,20 | 23,2 | 6,268 |
| 1,25 | 3,3 | 6,604 |
| 1,30 | -32,7 | 7,213 |
| 1,35 | -92,8 | 8,229 |
| 1,40 | -151,5 | 9,221 |
| 1,45 | -190,5 | 9,880 |
| 1,50 | -211,0 | 10,227 |
| 1,55 | -227,1 | 10,499 |
| 1,60 | -238,2 | 10,686 |
| 1,65 | -246,3 | 10,823 |
| 1,70 | -251,0 | 10,903 |
| 1,75 | -254,6 | 10,963 |
| 1,80 | -257,5 | 11,013 |
| 1,85 | -261,7 | 11,084 |
| 1,90 | -265,3 | 11,144 |
| 1,95 | -268,7 | 11,202 |
| 2,00 | -274,0 | 11,291 |

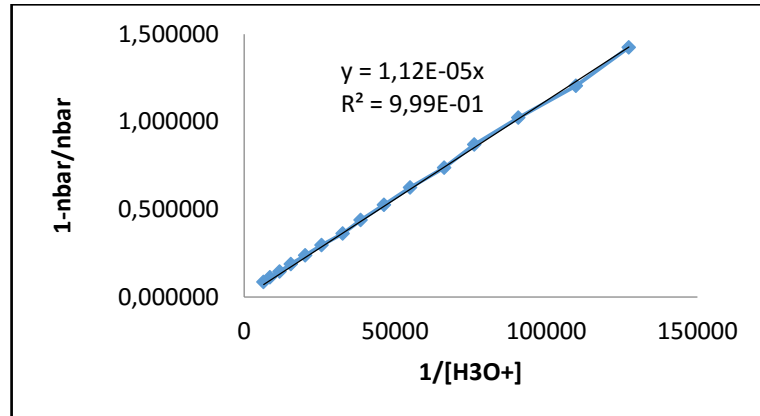
Zofenopril bileşiminin titrasyonuna ait titrant mL-mV, pH-φ ve Bjerrum grafikleri, sırasıyla şekil 4.49, 4.50 ve 4.51’de verilmiştir.



Şekil 4.49. Zofenoprilin %50 (v/v) ACN:H₂O ortamındaki titrasyon grafiği



Şekil 4.50. Zofenoprilin %50 (v/v) ACN:H₂O ortamındaki potansiyometrik titrasyon grafiği



Şekil 4.51. Zofenoprilin %50 (v/v) ACN:H₂O ortamındaki Bjerrum grafiği

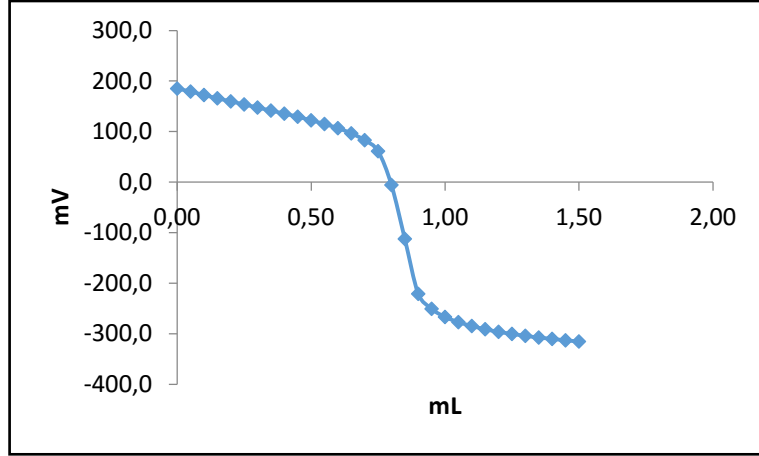
4.4.3. Aseklofenakın potansiyometrik titrasyon veri ve grafikleri

2.10⁻³ M'lık aseklofenak çözeltisinin 30 mL si, ayarlı KOH ile titre edilmiştir. Elde edilen mV verileri ve mV değerlerinin pH'a dönüştürülmüş değerleri çizelge 4.15'de verilmiştir.

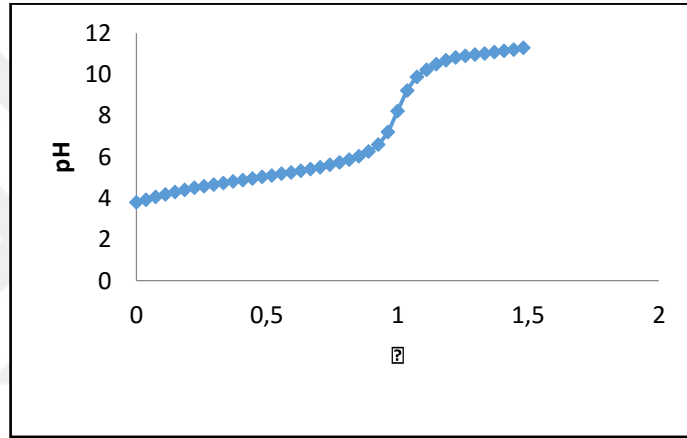
Çizelge 4.14. Aseklofenakın % 50 (v/v) ACN:H₂O ortamındaki titrasyon verileri

| mL | mV | pH |
|------|--------|--------|
| 0,00 | 185,3 | 3,697 |
| 0,05 | 179,4 | 3,796 |
| 0,10 | 172,6 | 3,911 |
| 0,15 | 166,1 | 4,021 |
| 0,20 | 160,0 | 4,124 |
| 0,25 | 153,9 | 4,228 |
| 0,30 | 147,8 | 4,331 |
| 0,35 | 141,8 | 4,432 |
| 0,40 | 135,7 | 4,535 |
| 0,45 | 129,6 | 4,638 |
| 0,50 | 122,5 | 4,758 |
| 0,55 | 115,2 | 4,882 |
| 0,60 | 107,0 | 5,020 |
| 0,65 | 96,7 | 5,194 |
| 0,70 | 83,2 | 5,423 |
| 0,75 | 61,4 | 5,791 |
| 0,80 | -5,4 | 6,920 |
| 0,85 | -112,1 | 8,724 |
| 0,90 | -220,8 | 10,561 |
| 0,95 | -250,5 | 11,063 |
| 1,00 | -266,6 | 11,335 |
| 1,05 | -276,8 | 11,508 |
| 1,10 | -284,5 | 11,638 |
| 1,15 | -290,8 | 11,744 |
| 1,20 | -296,0 | 11,832 |
| 1,25 | -300,1 | 11,902 |
| 1,30 | -303,9 | 11,966 |
| 1,35 | -307,3 | 12,023 |
| 1,40 | -310,0 | 12,069 |
| 1,45 | -312,8 | 12,116 |
| 1,50 | -315,1 | 12,155 |

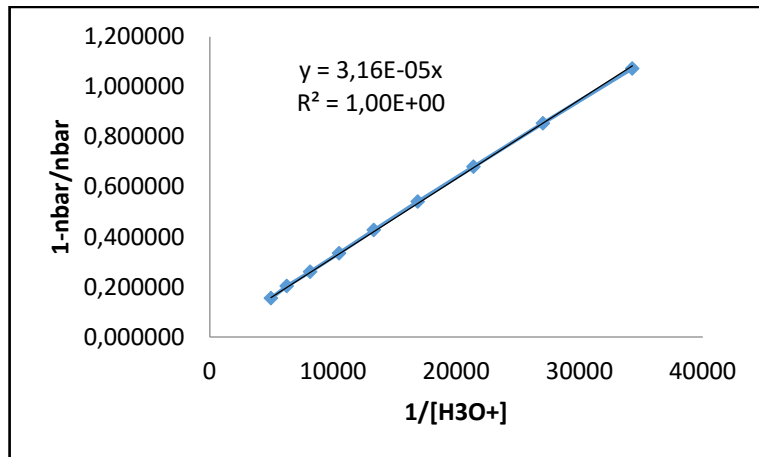
Aseklofenak bileşiğın titrasyonuna ait titrant mL-mV, pH-φ ve Bjerrum grafikleri, sırasıyla şekil 4.52, 4.53 ve 4.54'de verilmiştir.



Şekil 4.52. Aseklofenakın %50 (v/v) ACN:H₂O ortamındaki titrasyon grafiği



Şekil 4.53. Aseklofenakın %50 (v/v) ACN:H₂O ortamındaki potansiyometrik titrasyon pH-φ grafiği



Şekil 4.54. Aseklofenakın %50 (v/v) ACN:H₂O ortamındaki Bjerrum grafiği

4.4.4. Deksketoprofenin potansiyometrik titrasyon veri ve grafikleri

2.10⁻³ M'lık deksetoprofen çözeltisinin 30 mL si, ayarlı KOH ile titre edilmiştir. Elde edilen mV verileri ve mV değerlerinin pH'a dönüştürülmüş değerleri çizelge 4.16'de verilmiştir.

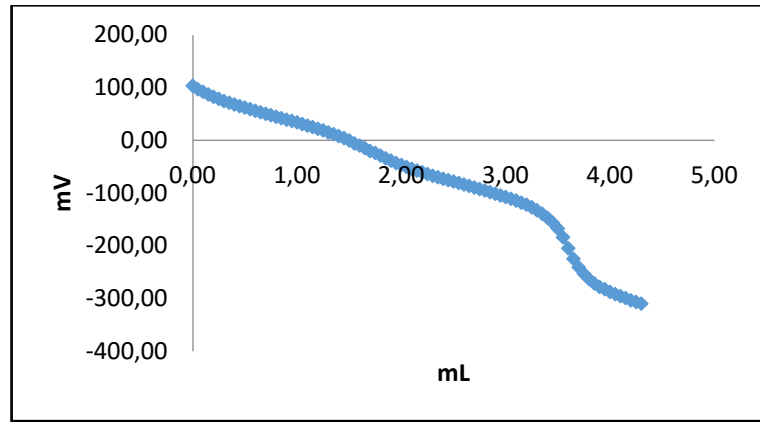
Çizelge 4.15. Deksketoprofenin % 50 (v/v) ACN:H₂O ortamındaki titrasyon verileri

| mL | mV | pH |
|------|--------|-------|
| 0,00 | 103,60 | 4,909 |
| 0,05 | 96,80 | 5,024 |
| 0,10 | 92,00 | 5,105 |
| 0,15 | 87,00 | 5,189 |
| 0,20 | 82,50 | 5,265 |
| 0,25 | 78,70 | 5,330 |
| 0,30 | 74,40 | 5,402 |
| 0,35 | 71,30 | 5,455 |
| 0,40 | 68,00 | 5,510 |
| 0,45 | 64,80 | 5,565 |
| 0,50 | 62,10 | 5,610 |
| 0,55 | 59,20 | 5,659 |
| 0,60 | 56,10 | 5,712 |
| 0,65 | 53,20 | 5,761 |
| 0,70 | 50,30 | 5,810 |
| 0,75 | 47,70 | 5,854 |
| 0,80 | 44,60 | 5,906 |
| 0,85 | 42,00 | 5,950 |
| 0,90 | 39,10 | 5,999 |
| 0,95 | 36,80 | 6,038 |
| 1,00 | 34,10 | 6,084 |
| 1,05 | 30,90 | 6,138 |
| 1,10 | 28,00 | 6,187 |
| 1,15 | 25,10 | 6,236 |
| 1,20 | 21,80 | 6,291 |
| 1,25 | 19,00 | 6,339 |
| 1,30 | 14,90 | 6,408 |
| 1,35 | 11,80 | 6,460 |
| 1,40 | 8,00 | 6,525 |
| 1,45 | 4,20 | 6,589 |
| 1,50 | -0,20 | 6,663 |
| 1,55 | -5,90 | 6,760 |
| 1,60 | -9,80 | 6,826 |
| 1,65 | -14,70 | 6,908 |
| 1,70 | -20,30 | 7,003 |
| 1,75 | -23,80 | 7,062 |
| 1,80 | -28,90 | 7,148 |
| 1,85 | -34,10 | 7,236 |
| 1,90 | -38,40 | 7,309 |
| 1,95 | -43,10 | 7,388 |
| 2,00 | -46,80 | 7,451 |

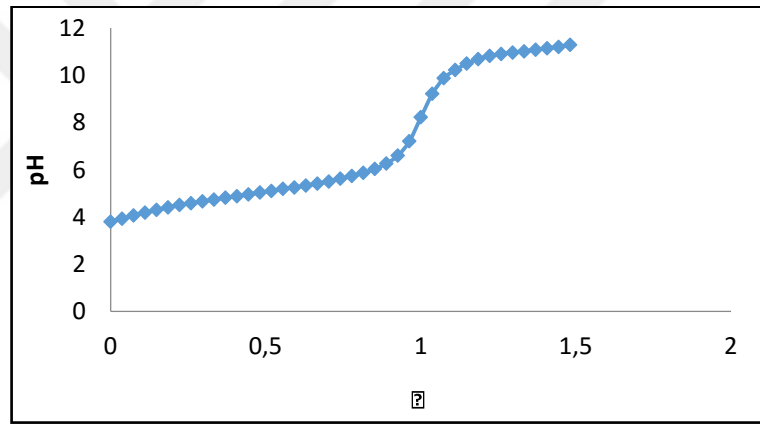
Çizelge 4.16. Deksketoprofenin % 50 (v/v) ACN:H₂O ortamındaki titrasyon verileri(Devam)

| mL | mV | pH |
|------|--------|--------|
| 2,05 | -50,5 | 7,514 |
| 2,10 | -54,0 | 7,573 |
| 2,15 | -57,4 | 7,630 |
| 2,20 | -60,6 | 7,684 |
| 2,25 | -64,0 | 7,742 |
| 2,30 | -67,2 | 7,796 |
| 2,35 | -69,9 | 7,841 |
| 2,40 | -73,0 | 7,894 |
| 2,45 | -75,5 | 7,936 |
| 2,50 | -78,1 | 7,980 |
| 2,55 | -80,9 | 8,027 |
| 2,60 | -83,8 | 8,076 |
| 2,65 | -86,4 | 8,120 |
| 2,70 | -89,5 | 8,173 |
| 2,75 | -92,4 | 8,222 |
| 2,80 | -95,1 | 8,267 |
| 2,85 | -98,1 | 8,318 |
| 2,90 | -101,2 | 8,371 |
| 2,95 | -104,5 | 8,426 |
| 3,00 | -107,5 | 8,477 |
| 3,05 | -110,8 | 8,533 |
| 3,10 | -114,2 | 8,590 |
| 3,15 | -118,3 | 8,660 |
| 3,20 | -122,0 | 8,722 |
| 3,25 | -126,9 | 8,805 |
| 3,30 | -132,6 | 8,901 |
| 3,35 | -139,2 | 9,013 |
| 3,40 | -146,8 | 9,141 |
| 3,45 | -155,9 | 9,295 |
| 3,50 | -167,3 | 9,488 |
| 3,55 | -183,8 | 9,767 |
| 3,60 | -204,7 | 10,120 |
| 3,65 | -224,7 | 10,458 |
| 3,70 | -240,7 | 10,729 |
| 3,75 | -253,0 | 10,936 |
| 3,80 | -263,1 | 11,107 |
| 3,85 | -271,4 | 11,247 |
| 3,90 | -278,0 | 11,359 |
| 3,95 | -282,2 | 11,430 |
| 4,00 | -287,4 | 11,518 |
| 4,05 | -291,6 | 11,589 |
| 4,10 | -295,4 | 11,653 |
| 4,15 | -299,1 | 11,716 |
| 4,20 | -303,4 | 11,788 |
| 4,25 | -306,4 | 11,839 |
| 4,30 | -309,7 | 11,895 |

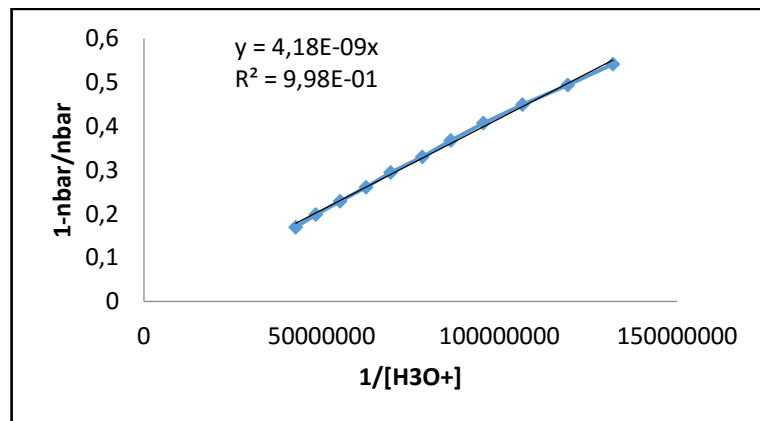
Deksketoprofen bileşiminin titrasyonuna ait titrant mL-mV, pH-φ ve Bjerrum grafikleri, şekil 4.55, 4.56 ve 4.57’de verilmiştir.



Şekil 4.55. Deksketoprofenin titrasyon grafiği: %50 (v/v) ACN:H₂O ortamında



Şekil 4.56. Deksketoprofenin %50 (v/v) ACN:H₂O ortamındaki potansiyometrik titrasyon pH-φ grafiği



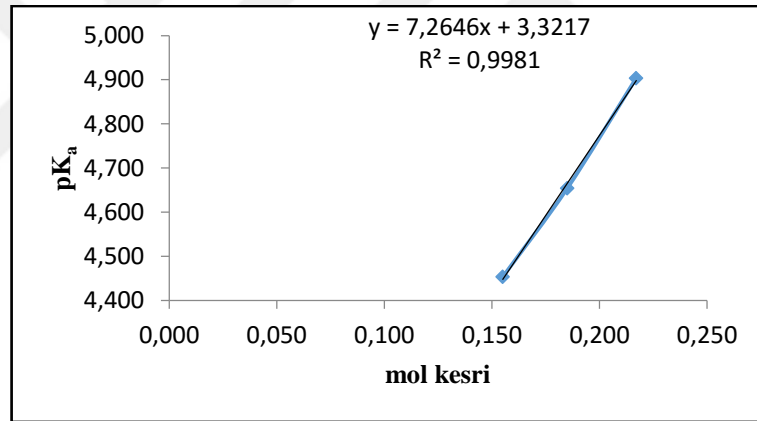
Şekil 4.57. Deksketoprofenin %50 (v/v) ACN:H₂O ortamındaki Bjerrum grafiği

4.5. Su Ortamındaki pK_a Değerlerinin Tayini

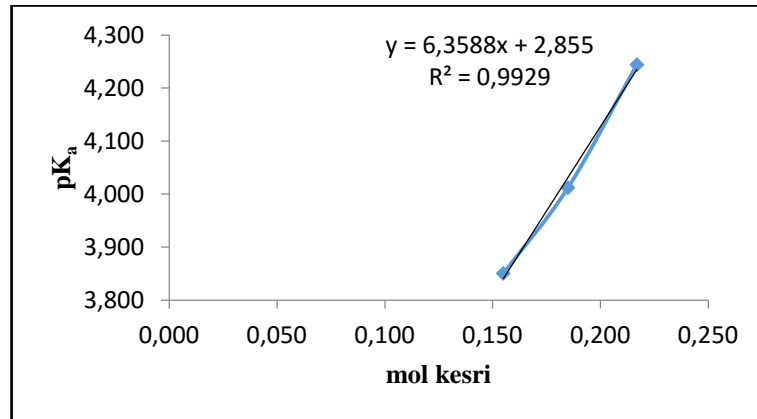
Bu tez çalışmasında seçilen zofenopril, aseklofenak ve deksketoprofen bileşikleri hidrofobik bileşikler olduğundan suda çözünürlükleri azdır.

4.5.1. Mol kesri ile pK_a tayini yöntemi

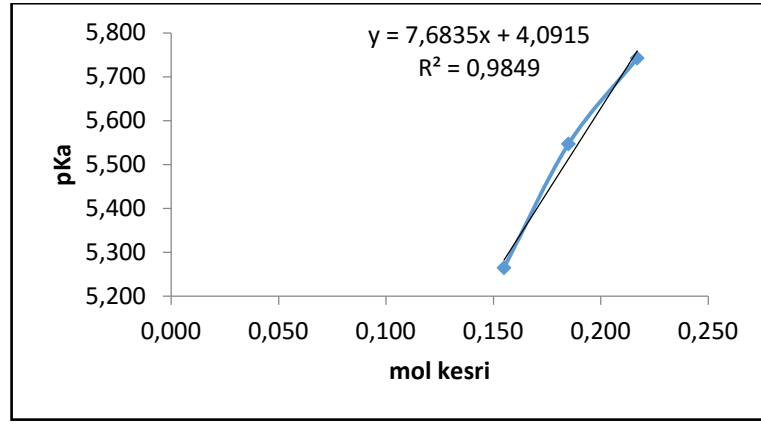
Bu yöntem kullanılarak zofenopril, aseklofenak ve deksketoprofen için %30, %35 ve %40 (v/v) ACN:H₂O ortamında elde edilen pK_a değerlerinin mol kesri (X) değerlerine karşı bu ortamlardaki pK_a değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen bağıntıların kesim noktalarından sudaki pK_a değerleri belirlenmiştir. Zofenopril için elde edilen grafik Şekil 4.58.'de, aseklofenak için elde edilen grafik Şekil 4.59.'de, deksketoprofen için elde edilen grafik Şekil 4.60.'de verilmiştir.



Şekil 4.58. Zofenopril için ACN:H₂O ortamında mol kesrinin pK_a üzerine etkisi



Şekil 4.59. Aseklofenak için ACN:H₂O ortamında mol kesrinin pK_a üzerine etkisi



Şekil 4.60. Deksketoprofen için ACN:H₂O ortamında mol kesrinin pK_a üzerine etkisi

5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Bu çalışmada tez projesinde belirtildiği şekilde deksketoprofen, aseklofenek ve zofenoprilin pK_a değerleri ters faz sıvı kromatografik yöntemle tayin edilmiştir. Karşılaştırma yöntemi olarak potansiyometrik yöntemden yararlanılmıştır. Her 2 yöntemle elde edilen sonuçlar uyumludur.

Potansiyometri yönteminde % 50 (v/v) ACN:H₂O ortamında elde edilen veriler; mL-mV grafiklerinde, pH-φ grafiklerinde ve Bjerrum doğrusal grafiğinde değerlendirilerek bileşiklerin pK_a değerleri hesaplanmıştır. Bu değerler çizelge 5.1’de görülmektedir.

Çizelge 5.1. Zofenopril kalsiyum, aseklofenak ve deksketoprofen trometamol bileşiklerinin potansiyometrik titrasyon yöntemiyle elde edilen pK_a değerleri

| Bileşik | pK_a |
|---------------------------|--------|
| Zofenopril kalsiyum | 5,083 |
| Aseklofenak | 4,520 |
| Deksketoprofen trometamol | 6,007 |

pK_a değerleri, ACN:H₂O ikili karışımlarında tayin edilmiştir. LC’ de alıkonma üzerinde pH’ nin etkisi, C4 kolon kullanılarak ACN:H₂O ikili karışımının üç farklı koşulu için (%30; 35; 40, v/v) belirlenmiştir. Bu değerlerin ekstrapolasyonu ile sudaki değerlere geçilmiştir. Tezde C4 kolonun kullanımı ile daha düşük derişimde asetonitrilin kullanılması pH standardizasyonunda problem yaşanmamasını sağlamıştır. Bileşiklere ait pK_a değerleri, alıkonma zamanı ile pH arasındaki ilişki kullanılarak non lineer modeli esas alan Origin Pro2015 programıyla hesaplanmıştır. Bu değerler zofenopril için çizelge 5.2’de, aseklofenak için çizelge 5.3’de deksketoprofen için çizelge 5.4’te verilmiştir.

Çizelge 5.2. Zofenopril için Origin Pro2015 programıyla hesaplanan $t_{r,HA}$, $t_{r,A}$ ve pK_a değerleri

| % ACN (v/v) Miktarı | $t_{r,HA}$ | $t_{r,A}$ | pK_a |
|---------------------|----------------|----------------|---------------|
| %30 ACN | 54,404 ± 0,810 | 12,294 ± 0,758 | 4,474 ± 0,050 |
| %35 ACN | 26,044 ± 0,317 | 7,658 ± 0,317 | 4,627 ± 0,046 |
| %40 ACN | 13,930 ± 0,212 | 5,362 ± 0,265 | 4,877 ± 0,075 |

Çizelge 5.3. Aseklofenak için Origin Pro2015 programıyla hesaplanan $t_{r,HA}$, $t_{r,A}$ ve pK_a değerleri

| % ACN (v/v) Miktarı | $t_{r,HA}$ | $t_{r,A}$ | pK_a |
|---------------------|----------------|---------------|---------------|
| %30 ACN | 39,272 ± 0,258 | 9,964 ± 0,148 | 3,848 ± 0,018 |
| %35 ACN | 21,723 ± 0,268 | 6,648 ± 0,174 | 3,993 ± 0,039 |
| %40 ACN | 12,568 ± 0,261 | 5,096 ± 0,200 | 4,210 ± 0,082 |

Çizelge 5.4. Deksketoprofen için Origin Pro2015 programıyla hesaplanan $t_{r,HA}$, $t_{r,A}$ ve pK_a değerleri

| % ACN (v/v) Miktarı | $t_{r,HA}$ | $t_{r,A}$ | pK_a |
|---------------------|----------------|---------------|----------------|
| %30 ACN | 13,911 ± 0,136 | 4,560 ± 0,173 | 5,259 ± 0,047 |
| %35 ACN | 9,388 ± 0,082 | 3,959 ± 0,125 | 5,536 ± 0,053 |
| %40 ACN | 6,957 ± 0,038 | 3,664 ± 0,067 | 5,5738 ± 0,043 |

Bu değerler, az sayıdaki literatür ile uyumludur. Bu verilerin literatürde yer alması diğer çalışmacılara ışık tutacaktır. Sonuç olarak bu tezin kendi alanında özgün bir çalışma olduğunu ve alanına katkı vereceği inancındayız.

6. KAYNAKLAR

ACD Lab. Program, 2012. Erişim Tarihi: 13.10.2015. <http://www.acdlabs.com>

Archana, K., Vikas, P., Development and Validation of Reversed- Phase High Performance Liquid Chromatographic Method for Estimation of Dexketoprofen Trometamol in Bulk and Tablet Dosage Form, American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics, ISSN 2321 – 2748, AJPCT1[4][2013]395-400

Ardoin SP., Sundy JS., Update on nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Curr Opin Rheumatol* 2006;18:221-26.

Barbosa, J. and Sanz-Nebot, V., 1993. Standard pH-Values in Non-Aqueous Mobile Phases Used in Reversed- Phase Liquid Chromatography. *Analytica Chimica Acta*, 283, 320-325.

Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., 1995. Assignment of Reference pH-Values to Primary Standard Buffer Solutions for Standardization of Potentiometric Sensors in Acetonitrile-Water Mixtures. *Fresenius Journal of Analytical Chemistry*, 353, 148-155.

Barbosa, J., Bergés, R. and Sanz-Nebot., V., 1996. Solvatochromic Parameter Values and pH in Aqueous-Organic Mixtures Used in Liquid Chromatography Prediction of Retention of a Series of Quinolones. *Journal Chromatography A*, 719, 27-36.

Barbosa, J., Berges, R., Sanz-Nebot, V., 1998a. Retention Behaviour of Quinolone Derivatives in High-Performance Liquid Chromatography; Effects of pH and Evaluation of Ionization Constants. *Journal of Chromatography A*, 823, 411-422.

Barbosa, J., Berges, R., Sanz-Nebot, V., I., Toro, 1999. Chromatographic Behaviour of Ionizable Compounds in Liquid Chromatography. Part 2. Standardization of Potentiometric Sensors and Effect of pH and Ionic Strength on The Retention of Analytes Using Acetonitrile-Water Mobile Phases. *Analytica Chimica Acta*, 389, 43-52.

Barzanti, C., Evans, R., Fouquet, J., Gouzin, L., Howarth, N.M., Kean, G., Levet, E., Wang, D., Wayemberg, E., Yeboah, A.A., Kraft, A., 2007. Potentiometric Determination of Octanol–Water and Liposome–Water Partition Coefficients (Logp) of Ionizable Organic Compounds. *Tetrahedron Letters*, 48, 3337–3341.

Benhaim, D., Grushka, E., 2010. Characterization of Ascentis RP-Amide Column: Lipophilicity Measurements and Linear Solvation Energy Relationships. *Journal Chromatography A*, 1217, 65-74.

- Bosch, E., Bou, P., Roses, M., 1994. Linear Description of Solute Retention in Reversed Phase Liquid Chromatography By a New Mobile Phase Polarity Parameter. *Analitica Chimica Acta*, 299, 219-229.
- Bosch, E., Espinosa, S., Roses, M., 1998. Retention of Ionizable Compounds on High Performance Liquid Chromatography. III Variation of pK Values of Acids and pH Values of Buffers in Acetonitrile-Water Mobile Phases. *Journal of Chromatography A*, 824, 137-146.
- Covington, A. K., Bates R. G., Durst, R. A., 1985. Definition of pH Scales, Standard Reference Values, Measurements of pH and related terminology. *Pure and Applied Chemistry*, 57, 531.
- Drugbank, <http://www.drugbank.ca>.
- Federico, L., Elisa, C., Margherita, I., Giacomo, C., Colin, G.E., Selene, M., Acrossover randomized comparative study of zofenopril and ramipril on cough reflex and airway inflammation in healthy volunteers and Giovanni A Fontana, *Cough* (2014) 10:7 DOI 10.1186/s12997-014-0007-5
- Giuseppe, C., Lucia Di F., Piera I., HPLC-DAD method for the simultaneous determination of zofenopril and hydrochlorothiazide in oral pharmaceutical formulations, *J. Sep. Sci.* 2010, 33, 1717–1722
- Gran, G., 1952. Determination of the Equivalence Points in Potentiometric Titrations. Part II, *Analyst*, 77, 661-671.
- Gran, G., 1988. Equivalence Volumes in Potentiometric Titrations. *Analytica Chimica Acta*, 206, 111-123.
- Guyton ve Hall Tıbbi Fizyoloji 11. Basım Nobel Tıp Kitabevi, 2007 syf 324
- Gündüz, T., 2002. *İnstrümental Analiz*, 913s, Ankara.
- Hamilton, R.J., Sewel, P.A. (1982). *Introduction to HPLC*, 2 nd ed, Chapman and Hall, New York, 1-160.
- Hilal, S., H., Karicckhoff, s., W., Carreira, L., A., 2004. Prediction of The Solubility, Activity Coefficient, and Liquid/Liquid Partition Coefficient of Organic Compounds. *QSAR & Combinatorial Science*, 23, 709-719.
- Hillaert, S., Van den Bossche, W. 2000. Optimization of capillary electrophoretic separation of several inhibitors of the angiotensin-converting enzyme, *journal of chrom. A*, 895, 33-42.
- Horvath, C., Melander, W., Molnar, I., 1977. Liquid Chromatography of Ionogenic Substances With Nonpolar Stationary Phases. *Analytical Chemistry*, 49, 142-154.

- Jayanthi, B., Madhusudhan, S., Mohanta, G.P., Manna, P.K., Preformulation Characterisation, Designing and Formulation of Aceclofenac Loaded Microparticles, International Journal of Drug Development & Research, |July-September 2012 | Vol. 4 | Issue 3 | ISSN 0975-9344 |
- Johnson, B. P., Khaledi, M. G., Dorsey, J. G., 1986. Solvatochromic Solvent Polarity Measurements and Retention in Reversed Phase Liquid Chromatography. Analytical Chemistry, 58; 2354-2365.
- Kamlet, M.J., Abboud, J.-L.M., Abraham, M.H., Taft, R.W. 1983. Linear Solvation Energy Relationships. 23. A Comprehensive Collection of The Solvatochromic Parameters, Π^* , α and β , and Some Methods For Simplifying The Generalized Solvatochromic Equation. Journal of Organic Chemistry, 48-17, 2877-2887.
- Martínez-Pla, J.J, Martí-Biosca, Y., Sagrado, S., Villanueva-Camañas, R.M., Medina-Hernández, M.J., 2004. Evaluation of the pH Effect of Formulations on the Skin Permeability of Drugs by Biopartitioning Micellar Chromatography. Journal of Chromatography A, 1047 ,255–262.
- Marti R., Bolliet, D., Poole, C.F., Comparison of solute descriptors for predicting retention of ionic compounds (phenols) in reversed-phase liquid chromatography using the solvation parameter model, Journal of Chromatography A, 829 (1998) 29–40
- Marvin Sketch Program, 2015. Chemaxon. Erişim Tarihi: 26.11.2015. <http://www.chemaxon.com>
- Maauleón, D. , , Artiga, R. s. , García, M. L., Carganico, G., Preclinical and Clinical Development of Dexketoprofen Drugs, Pub Med, 1996, Volume 52, Supplement 5, pp 24-46
- Milan, M., Sylva, B., Lubomír, G.; The thermodynamic dissociation constants of four non-steroidal anti-inflammatory drugs by the least-squares nonlinear regression of multiwavelength spectrophotometric pH-titration data, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 45 (2007) 552–564
- Meyer, R. V. (1988), Practical HPLC, John Wiley & Sons, Toronto, Canada, 35-42.
- Mussini, P.R., Mussini, T., Rondinini, S., 1997. Reference Value Standards and Primary Standards for pH Measurements in D2O and Aqueous- Organic Solvent Mixtures: New Accessions and Assessments. Pure & Applied Chemistry, 69, 1007-1014.
- Mycek, J.M., Harvey, A.R., Champe, C.P. Lippicott's Illustrated Review Serisinden: Farmakoloji. 2. Baskı. İstanbul. NobelTip Kitapevi. 1998.
- Naemurrahman, M., Ashish, N. P., Improvement of Physicochemical Properties of Aceclofenac by Developing Nove Aminoacid Conjugetes, World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Vol 4, Issue 05, 2015., 1218-1229.

- Opie, L.H. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors:Scientific Basis for Clinical Use. Authors' Publishing House, New York, USA, 1992, pp: 21-60.
- Opie, L.H. Angiotensin Converting Enzyme Inhibitors:Scientific Basis for Clinical Use. Authors' Publishing House, New York, USA, 1992, pp: 149-193.
- Pasini, A.F., Garbin, U., Nava, M.C., Stranieri, C., Pellegrini, M., Boccioletti, V., Luchetta, M.L., Fabrizzi, P., L, Cascio V., Cominacini,L: Effect of sulfhydryl and non-sulfhydryl angiotensin-converting enzyme inhibitors on endothelial function in essential hypertensive patients.,Am J Hypertens,2007; 20(4): 443-450
- Poole, C.F. and Poole, S.K., 1991. Chromatography Today. Elsevier Science, 1026p, Amsterdam.
- Prinesh, N.P., Gananadhamu S., Vishalkumar S., Sudipkumar C.M., and Jainishkumar R. C.; RP-HPLC Method for Determination of Several NSAIDs and Their Combination Drugs, Hindawi Publishing Corporation Chromatography Research International ,Volume 2013, Article ID 242868, 13 pages
- Reichardt, C., 1994. Solvatochromic dyes as solvent polarity indicators. Chemical Reviews., 94, 2319-2358.
- Rondinini, S., Mussini, P. R., Mussini ,T., 1987. Reference Value Standard and Primary Standard For pH Measurements in Organic Solvents and Water - Organic Solvent Mixtures of Moderate To High Permittivities. Pure & Applied Chemistry, 59(11), 1549-1560.
- Roses, M. and Bosch, E., 1993. Linear Solvation Energy Relationships in Reversed Phase Liquid Chromatography. Prediction of Retention From a Single Solvent and a Single Solute Parameter. Analitica Chimica Acta, 274, 147-162.
- Roses, M., Canals, I., Allemann, H., Katrin, S., Bosch, E. 1996. Retention of Ionizable Compounds on HPLC. 2. Effect of pH, Ionic Strength and Mobile Phase Composition on Retention of Weak Acids. Analytical Chemistry, 68, 4094-4100.
- Schoenmakers, P. J., Van Molle, S., Hayes, C. M. G., Uunk, L. G. M., 1991. Effectsof pH in Reversed Phase Liquid Chromatography. Analitica Chimica Acta, 250,1-19.
- Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R., 2011. Analitik Kimya Temel İlkeler.Cev. Kılıc, E., Yılmaz, H., Bilim Yayınları, 1051s, Ankara.

Takács-Novák, K., Box, K.S., Avdeef, A., 1997. Potentiometric pKa Determination of Water-Insoluble Compounds. Validation Study in Methanol/Water Mixtures. *International Journal of Pharmaceutics*, 151, 235-248.

Theocharis, S., 2007. Octanol/Water Partitioning Simulation By Reversed- Phase High Performance Chromatography For Structurally Diverse Acidic Drugs: Effect Of n-Octanol As Mobile Phase Additive. *Journal Chromatography A*, 1166, 116-125.

Valko, K., 2004. Application of High-Performance Liquid Chromatography Based Measurements Of Lipophilicity To Model Biological Distribution. *Journal of Chromatography A*, 1037, 299-310.

Vane, JR., Inhibition of prostaglandin synthesis as a mechanism of action for aspirin-like drugs. *Nature New Biology* 1971; 231: 235-37.)

Venkata, S. S., Rajeswar, K.D., Development and Validation of RP-HPLC Method for the Simultaneous Estimation of Aceclofenac and Thiocolchioside in Tablet Dosage Form, *Int.journal of Pharmacy and Anatical Research* vol-3(1) 2014(55-66)

Wikipedia, <http://www.wikipedia.org>

Zungur, M., Yıldız, A. Hipertansif Hastaya Yaklaşım. *Sted* 2004; cilt no 13 (sayı 8): sayfa 298.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı :Nevzat ÇINAR
Doğum Yeri ve Yılı :Bozkurt/1974
Medeni Hali :Evlü
Yabancı Dili :İngilizce
E-posta :redoks_25@hotmail.com

Eğitim Durumu

Lise :İstanbul Üsküdar Beylerbeyi Lisesi 1989-1992
Lisans :Uludağ Üniversitesi Balıkesir Necatibey Eğitim Fakültesi
Kimya Öğretmenliği 1992-1996

Yayımları

Çınar, N., Elgömuş, G., Demiralay,E.Ç., Alsancak, A.G., 2016. Zofenopril, Aseklofenak ve Deksketoprofenin pKa Değerlerinin HPLC ile Tayini. 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 30 Mayıs-3 Haziran 2016, Isparta, 66.