

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

**BAZI SEÇİCİ SEROTONİN GERİALIM İNHİBİTÖRLERİNİN PROTONASYON
SABİTLERİNİN KROMATOĞRAFİK TAYİNİ**

Fatma ÜRER

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

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



© 2016 [Fatma ÜRER]

TEZ ONAYI

Fatma ÜRER tarafından hazırlanan "**Bazı Seçici Serotonin Gerilim İnhibitörlerinin Protonasyon Sabitlerinin Kromatografik 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

Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Prof. Dr. Esengül KIR
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi

Yrd. Doç.Dr. Hale SEÇİLMİŞ CANBAY
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.

Fatma ÜRER

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
İÇİNDEKİLER	i
ÖZET	iii
ABSTRACT	iv
TEŞEKKÜR	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	vi
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	viii
1.GİRİŞ	1
1.1. Antidepresanlar	1
1.1.1.Non-siklik antidepresanlar	1
1.2. Protonasyon Sabiti Tayini	4
1.2.1. Potansiyometrik titrasyonlar	4
1.2.2.Spektrofotometrik titrasyonlar	5
1.2.3. Kromatografik yöntemler	6
1.2.4.Sıvı kromatografik yöntemler	7
1.3. Yüksek Performans Sıvı Kromatografide Kullanılan Temel Kavramlar	8
1.4. Ters Faz Sıvı Kromatografisinde İyonlaşan Bileşiklerin pK_a Değerinin Tayini...13	
1.4.1. Bazik bileşikler	14
1.4.2. Asidik bileşikler	15
1.4.3.Amfiprotik bileşikler	17
1.5. Ters Faz Sıvı Kromatografide Teorik Kapasite Faktörünün Hesaplanması	17
1.6.İyonlaşan Analitin Alıkonmasında pH' nin Etkisi	19
1.7. İyonlaşan Analitin Alıkonmasında Organik Modifiyerin Etkisi	21
1.8. Ters Faz Sıvı Kromatografi Yönteminde Su Ortamındaki pK_a Değerlerinin Belirlenmesi.....	22
1.8.1.Yasuda-Shedlovsky yöntemi	23
1.8.2. Mol kesri- pK_a yöntemi	23
1.9. Metot Validasyon Parametreleri	25
1.9.1. Doğruluk	26
1.9.2. Kesinlik.....	27
1.9.3. Seçicilik	28
1.9.4. Gözlenebilirlik sınırı (LOD)	29
1.9.5. Tayin alt sınırı (LOQ)	29
1.9.6. Lineerlik	30
2. KAYNAK ÖZETLERİ	32
3. MATERYAL VE YÖNTEM.....	37
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	37
3.2. Kromatografik Çalışmalar	38
3.2.1. Kullanılan cihazlar	38
3.2.1.1. Yüksek performans sıvı kromatografisi cihazı.....	38
3.2.1.2. pH /iyon metre.....	38
3.2.2. Kullanılan çözeltiler	39
3.2.2.1. Kromatografik çalışmalar.....	39
3.3. Yöntem	41
3.3.1. Sıvı kromatografik yöntemle tayin	41

4. ARAŞTIRMA BULGULARI	43
4.1. Sertralinin Protonasyon Sabitinin Tayini	43
4.1.1. Marvin Sketch programı	43
4.1.2. Sıvı Kromatografik Yöntemle Farklı Su-Organik Çözücü İkili Karışımlarında Protonasyon Sabitinin Tayini	43
4.2. Sitalopramın Protonasyon Sabiti Tayini	45
4.2.1. Marvin Sketch programı	45
4.2.2. Sıvı Kromatografik Yöntemle Farklı Su-Organik Çözücü İkili Karışımlarında Protonasyon Sabitinin Tayini	46
4.3. Fluvoksaminin Protonasyon Sabiti Tayini	48
4.3.1. Marvin Sketch programı	48
4.3.2. Sıvı Kromatografik Yöntemle Farklı Su-Organik Çözücü İkili Karışımlarında Protonasyon Sabitinin Tayini	48
4.4. Tez Kapsamında Seçilen Bileşiklerin Su Ortamındaki pK_a Değerlerinin Tayini	50
4.4.1. Mol kesri- pK_a yöntemi	50
4.4.2. Yasuda-Shedlovsky metodu	51
4.5. Kromatografik Ayırmanın Optimizasyonu	53
4.6. Numune Çalışması	54
4.6.1. İç standartın belirlenmesi	54
4.6.2. Sistem uygunluk testi sonuçları	55
4.6.3. Sertralin, sitalopram, fluvoksaminin ters faz sıvı kromatografi yöntemi ile analizinde metod validasyonu	56
4.6.3.1. Kalibrasyon doğrusu ve duyarlılık	56
4.6.3.2. Doğruluk ve kesinlik	59
4.6.3.3. İlaç formülasyonunda geri kazanım çalışması	61
5. TARTIŞMA VE SONUÇLAR	65
KAYNAKLAR	69
ÖZGEÇMİŞ	73

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

BAZI SEÇİCİ SEROTONİN GERİALIM İNHİBİTÖRLERİNİN PROTONASYON SABİTLERİNİN KROMATOĞRAFİK TAYİNİ

Fatma ÜRER

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Doç. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY

Protonasyon sabiti, çözünürlük, lipofilisite, biyolojik aktivite, absorpsiyon gibi ilaç özellikleri hakkında bilgiler sağlayan çok önemli fizikokimyasal parametrelerden birisidir. Bu tezde asetonitril yüzdeleri % 40, 45, 50 ve 55 (h/h) olan asetonitril-su ikili karışımlarındaki kromatografik veriler kullanılarak fluvoksamin, sertralin ve sitapramin protonasyon sabiti (pK_a) ters faz sıvı kromatografik metotla tayin edilmiştir. pH değerleri hareketli faz olarak kullanılan hidroorganik karışımda ölçülmüştür. Bu bileşiklerin kromatografik davranışlarında iki faktörün (solvent yüzdesi ve hareketli fazın pH' sı) birleştirilmiş etkisi araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar hareketli fazda organik modifiyerin artmasıyla protonasyon sabitlerinin azaldığını göstermektedir. Bu bileşiklerin pK_a değerleri ve alıkonma faktörleri kromatografik eşitlikler kullanılarak hesaplanmıştır. Bu değerlerden çalışılan ilaçların sudaki pK_a değerleri farklı yaklaşımlarla hesaplanmıştır. Kromatografik tayin Xterra RP18 (250 mm × 4.6 mm, 5 μ m I.D.) analitik kolonla gerçekleştirilmiştir. Bazı HPLC metotları ilaçlarda ve biyolojik numunelerde bu ilaçların tayini için daha önce rapor edilmiştir. Fakat pK_a değerleri için hiçbir sistematik çalışma bulunmamaktadır. Geliştirilen metot bu ilaç aktif bileşiklerin aynı anda ayrımı ve onların ticari ilaç dozaj formlarında tayini için başarıyla uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Depresyon Tedavisi, Protonasyon sabiti, RPLC, Kromatografik davranış, Metot validasyonu

2016, 73 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

CHROMATOGRAPHIC DETERMINATION OF PROTONATION CONSTANTS OF SOME SELECTIVE SEROTONIN RE-UP TAKE INHIBITORS

Fatma ÜRER

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

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Ebru ÇUBUK DEMİRALAY

The protonation constant is one of the most important physicochemical parameters that can provide critical information about drug properties such as solubility, lipophilicity, biological activity, absorption. In this thesis, protonation constant (pK_a) of fluvoxamine, sertraline and citalopram using chromatographic data in acetonitrile-water binary mixtures with acetonitrile percentages of 40, 45, 50 and 55% (v/v) were determined with reverse phase liquid chromatographic method (RPLC). pH values were measured in the hydroorganic mixture, which was used as the mobile phase. The combined effect of the two factors (solvent percentage and pH of the mobile phase) on the chromatographic behavior of these compounds was investigated. The results obtained show that the protonation constants decrease with increasing organic modifier in mobile phase. pK_a values and limiting retention factors of these compounds were calculated chromatographically using equations derived. From these values, the aqueous pK_a of studied drugs was calculated by different approaches. The chromatographic determination was achieved on a Xterra RP18 (250 mm $\times$ 4.6 mm, 5 μ m I.D.) analytical column. Several HPLC methods have been previously reported for the determination of these drugs in pharmaceuticals and biological samples. But there is no systematic report for pK_a values. The developed method was successfully applied to both the simultaneous separation of these drug active compounds and individual determination in their commercial pharmaceutical dosage forms.

Key Words: Depression Treatment, Protonation constant, RPLC, Chromatographic behavior, Method validation

2016, 73 pages

TEŞEKKÜR

Bu tez çalışması süresince beni yönlendiren, karşılaştığım zorlukları bilgi ve tecrübesiyle aşmamda yardımcı olan değerli Danışman hocam Doç. Dr. Ebru Çubuk DEMİRALAY'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım.

Çalışmamda emeği geçen tüm arkadaşlarıma ve desteklerini esirgemeyip yanımda olan sevgili aileme de teşekkürü bir borç bilirim.

Fatma ÜRER
ISPARTA, 2016



ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa
Şekil 1.1. Sıvı kromatografik proses	8
Şekil 1.2. HPLC kromatogramı	9
Şekil 1.3. Organik çözücü değişiminin kapasite faktörüne etkisi.....	10
Şekil 1.4. Seçicilikte kolon farklılığının gösterimi.....	11
Şekil 1.5. Kolon asimetrisi.....	12
Şekil 1.6. Seçicilik faktörünün ayırma gücüne etkisi	13
Şekil 1.7. Ters faz sıvı kromatografide hidrofobik etkileşim	14
Şekil 1.8. 2 pH kuralının şematik gösterimi	14
Şekil 1.9. Bazik bileşiklerin kapasite faktörü değerinin pH' ya bağımlılığı	15
Şekil 1.10. Asidik bileşiklerin kapasite faktörü değerinin pH' ya bağımlılığı	15
Şekil 1.11. Amfiprotik bileşiklerin alıkonmasında pH' nın etkisi.....	17
Şekil 1.12. İyonlaşabilen bileşiklerin alıkonmasında mobil faz pH sınırının etkisi (1. pH 2,2;9. pH 8,9)	19
Şekil 1.13. Bir analitin tayininde mobil faz pH sınırının pik şekline olan etkisi.....	20
Şekil 1.14. Asidik analitin pK_a değerine organik modifiyerin etkisi	22
Şekil 1.15. Bazik analitin pK_a değerine organik modifiyerin etkisi.....	22
Şekil 1.16. Aletli analizde kalibrasyon işlemi	30
Şekil 4.1. Sertralinin iyonlaşma dengesi.....	43
Şekil 4.2. Sertralinin dört farklı asetonyitril-su ortamında elde edilen kapasite faktörü (k)-pH ilişkisi	44
Şekil 4.3. Sertralinin dört farklı asetonyitril-su ortamındaki NLREG grafikleri.....	45
Şekil 4.4. Sitalopramın iyonlaşma dengesi	46
Şekil 4.5. Sitalopramın dört farklı asetonyitril-su ortamında elde edilen kapasite faktörü (k)-pH ilişkisi	49
Şekil 4.6. Sitalopramın dört farklı asetonyitril-su ortamındaki NLREG grafikleri	47
Şekil 4.7. Fluvoksaminin iyonlaşma dengesi	48
Şekil 4.8. Fluvoksaminin dört farklı asetonyitril-su ortamında elde edilen kapasite faktörü (k)-pH ilişkisi	49
Şekil 4.9. Fluvoksaminin dört farklı asetonyitril-su ortamındaki NLREG grafikleri.....	50
Şekil 4.10. Sertralinin mol kesri- pK_a yöntemiyle sudaki pK_a değerinin hesaplanması	50
Şekil 4.11. Sitalopramın mol kesri- pK_a yöntemiyle sudaki pK_a değerinin hesaplanması	50
Şekil 4.12. Fluvoksaminin mol kesri- pK_a yöntemiyle sudaki pK_a değerinin hesaplanması	50
Şekil 4.13. Sertralinin Yasuda-Shedlovsky yöntemiyle sudaki pK_a değerinin hesaplanması	51
Şekil 4.14. Sitalopramın Yasuda-Shedlovsky yöntemiyle sudaki pK_a değerinin hesaplanması	51
Şekil 4.15. Fluvoksaminin Yasuda-Shedlovsky yöntemiyle sudaki pK_a değerinin hesaplanması	51
Şekil 4.16. Standart karışım kromatogramı 1) Fluvoksamin 2) Sitalopram 3) İmipramin (IS) 4) Sertralin	56
Şekil 4.17. Fluvoksaminin analizi için doğrusal kalibrasyon fonksiyonu	57
Şekil 4.18. Sitalopramın analizi için doğrusal kalibrasyon fonksiyonu.....	58

Şekil 4.19. Sertralinin analizi için doğrusal kalibrasyon fonksiyonu	59
Şekil 4.20. Sitalopram içeren Citol (20 mg) tabletinin analiz yöntemine ait kromatogram; 4 µg/mL sitalopram (1) ve 1 µg/mL derişiminde imipramin (IS) (2)	62
Şekil 4.21. Fluvoksamin içeren Faverin (100 mg) tabletinin analiz yöntemine ait kromatogram; 6 µg/mL fluvoksamin (1) ve 1 µg/mL derişiminde imipramin (IS) (2)	62
Şekil 4.22. Sertralin içeren Lustral (50 mg) tabletinin analiz yöntemine ait kromatogram; 1 µg/mL derişiminde imipramin (IS) (1) ve 2 µg/mL sertralin (2)	63
Şekil 4.23. Sitalopram içeren Citol (20 mg) tabletinin katkı numune analizine ait kromatogramı; 8 µg/mL derişiminde sitalopram (1) ve 1 µg/mL derişiminde imipramin (IS) (2)	63
Şekil 4.24. Fluvoksamin içeren Faverin (100 mg) tabletinin katkı numune analizine ait kromatogramı; 12 µg/mL derişiminde fluvoksamin (1) ve 1 µg/mL derişiminde imipramin (IS) (2)	63
Şekil 4.25. Sertralin içeren Lustral (50 mg) tabletinin katkı numune analizine ait kromatogramı; 1 µg/mL derişiminde imipramin (IS) (1) ve 4 µg/mL sertralin (2)	64

ÇİZELGELER DİZİNİ

	Sayfa
Çizelge 1.1. Sertralin, Sitalopram ve Fluvoksaminin kimyasal yapısı	3
Çizelge 1.2. Yaygın kullanılan HPLC tamponlarının özellikleri	20
Çizelge 1.3. Ters faz sıvı kromatografide yaygın kullanılan çözücülerin solvatokromik ve fizikokimyasal özellikleri	21
Çizelge 1.4. 25 °C' de metanol-su ikili karışımı için bazı makroskopik veriler	24
Çizelge 1.5. 25 °C' de asetonitril-su ikili karışımı için bazı makroskopik veriler	24
Çizelge 1.6. 25 °C' de tetrahidrofuran-su ikili karışımı için bazı makroskopik veriler	24
Çizelge 3.1. Çalışılan bileşikler ve özellikleri	37
Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler	37
Çizelge 4.1. Sertralinin dört farklı asetonitril-su ortamında elde edilen kapasite faktörü değerleri	44
Çizelge 4.2. Sitalopramın dört farklı asetonitril-su ortamında elde edilen kapasite faktörleri değerleri	47
Çizelge 4.3. Fluvoksaminin dört farklı asetonitril-su ortamında elde edilen kapasite faktörleri değerleri	49
Çizelge 4.4. Bileşiklerin % 50 asetonitril (h/h) pH 9,0 ortamında elde edilen kapasite faktörü, seçicilik ve ayırma gücü değerleri	54
Çizelge 4.5. Bileşikler için sistem uygunluk parametreleri	55
Çizelge 4.9. Fluvoksaminin analizine ait kalibrasyon fonksiyonu özellikleri	57
Çizelge 4.10. Sitalopramın analizine ait kalibrasyon fonksiyonu özellikleri	58
Çizelge 4.11. Sertralinin analizine ait kalibrasyon fonksiyonu özellikleri	59
Çizelge 4.12. Fluvoksaminin analiz yöntemine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk analiz bulguları	60
Çizelge 4.13. Sitalopramın analiz yöntemine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk analiz bulguları	60
Çizelge 4.14. Sertralinin analiz yöntemine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk analiz bulguları	60
Çizelge 4.15. Sitalopram, fluvoksamin, ve sertralin içeren tabletlerin analizine ait bulgular	61
Çizelge 4.16. Sitalopram, fluvoksamin ve sertralin içeren tabletlerin % geri kazanım sonuçları	62
Çizelge 5.1. Sertralin NLREG programıyla hesaplanmış pK_a değerleri ve türlere ait kapasite faktörü değerleri	66
Çizelge 5.2. Sitalopram NLREG programıyla hesaplanmış pK_a değerleri ve türlere ait kapasite faktörü değerleri	66
Çizelge 5.3. Fluvoksamin NLREG programıyla hesaplanmış pK_a değerleri ve türler ait kapasite faktörü değerleri	67
Çizelge 5.4. Farklı derişimlerde asetonitril ortamlarındaki deneysel pK_a değerleri ile mol kesri arasındaki lineer eşitlikler	67
Çizelge 5.5. Sertralin, sitalopram ve fluvoksaminin mol kesri, Yasuda-Shedlovsky bağıntısı ve Marvin Sketch programıyla elde edilmiş su ortamındaki pK_a değerleri	68

1.GİRİŞ

1.1. Antidepresanlar

Günümüzde klinik olarak kullanılan, sayısı 20'nin üzerinde etkin antidepresan ilaç bulunmakla birlikte halen daha spesifik ve daha hızlı etki başlangıcı sağlayan ilaç arayışları sürmektedir. Birinci kuşakta yer alan trisiklik antidepresanlar (TSA) ve monoaminoksidaz inhibitörleri (MAOI) ilk kullanılan antidepresanlardır. Bu iki grup ilaç da, merkezi noradrenerjik ve serotoninergik sistem fonksiyonlarını güçlendirerek, depresyonun tedavisinde son derece etkilidir. Ancak TSA histaminergik, kolinerjik ve $\alpha 1$ adrenerjik reseptörleride bloke ederek, kilo alma, ağız kuruluğu, konstipasyon, sersemlik, postural hipotansiyon vb. yan etkilere yaygın olarak yol açmaktadır. MAOI de kullanımları sırasında diyetle alınan tiramin ile hipertansif krize yol açma ve ayrıca sıklıkla diğer ilaçlarla etkileşme potansiyeli taşımaktadır. İkinci kuşak antidepresanlar arasında yer alan özellikle son 15 yılda kullanımı gündeme gelmiş olan selektif serotonin geri alım inhibitörleri veya serotonin reseptör antagonistleri ile yan etkiler azalmıştır. Her iki kuşak ilaçla da tedavi başlangıcından itibaren klinik etkinin gözlenmesine kadar 2-4 haftalık bir periyodun gerekmesi, olguların yaklaşık %30 kadarında çalışma hayatlarını sürdürememe gibi problemlerin yaşanması söz konusudur. Ayrıca çocuklarda selektif serotonin geri alım inhibitörlerinin kullanımı ile ilgili daha ayrıntılı araştırma gereksinimi de vardır. Üçüncü kuşak antidepresan ilaçlar, reboksetin hariç, merkezi hem serotoninergik ve hem de noradrenerjik nörotransmisyonu etkileyerek etki gösteren ilaçlardır. Reboksetin seçici olarak noradrenerjik sistemi etkileme özelliği taşır. Bu grupta daha az yan etki ve daha hızlı etki başlangıcı olması hedeflenmektedir (Savcı, 2006) .

1.1.1.Non-siklik antidepresanlar

Antidepresan olarak 1950'lerden beri kullanılan trisiklik antidepresanların ortak yan etkileri olan konvülsiyon eşiğini düşürme (epileptojenik etkinlik), antikolinerjik etkiler gösterme, yüksek dozda daha belirgin direk kardiyo toksisite hipotansiyon(kan basıncı düşüklüğü) gibi sakıncalarını çok az veya hiç göstermeyen ilaçlar bulmak amacıyla yapılan sistemli araştırmalar sonucu trisiklik olmayan yeni

antidepresanlar geliştirilmiştir. Ancak bunların hepsi değil sadece bazıları yukarıda sayılan hedeflere ulaşmıştır. Selektif serotonin geri-alım inhibitörleri, tedavi dozlarında beyinde diğer nörotransmitter (örneğin noradrenalin ve dopamin) sistemlerine dokunmadan serotonin geri-alımını çok güçlü şekilde bloke ederler. Farmakolojik etki profilleri, serotonerjik aşırımı selektif etkilemeleri ve yan tesirleri dışında, trisiklik antidepresanlara benzer. MAO(monoamin oksidaz) inhibitörleriyle etkileşirler, trisiklik ilaçların aksine iştahı azaltabilirler. Selektif serotonin geri-alım inhibitörler ilaçları fluoksetin, sertralin, paroksetin, fluvoksamin, sitaloqram ve esitalopramdır. Bu tez çalışmasında sertralin, sitaloqramve fluvoksamin üzerinde durulacaktır (Çizelge1.1).

Sertralin

Nefilnaftilamin türevi ve yapıcı diğer ilaçlara benzemeyen güçlü bir serotonin gerialım inhibitörüdür. Bağırsakda kısmen absorbe edilir ve yemek sırasında alınması absorbsiyon oranını arttırır. Karaciğerde demetilasyon sonucu kısmen N-desmetilsertralin'e yıklılır, bu etkin bir metabolittir. Eliminasyon yarılanma ömrü 24-26 saattir; etkin metabolitininki dahada uzundur (62-104 saat). Bazı karaciğer mikromozal oksidasyonlarını hafif olarak indükleyebilir farmakojik etki profili fluoksetininkine benzer. Belirgin derecede bir enzim inhibisyonu yapmaması ve eliminasyonyarılanma ömrünün fluoksetin ve özellikle onun aktif metaboliti olan norfluoksetininkine göre kısa olması bu ilaca üstünlük sağlar.

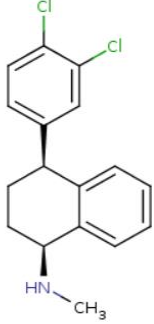
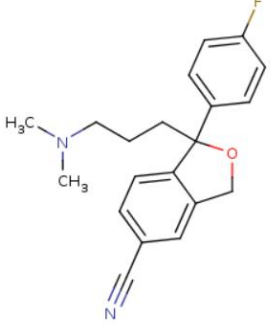
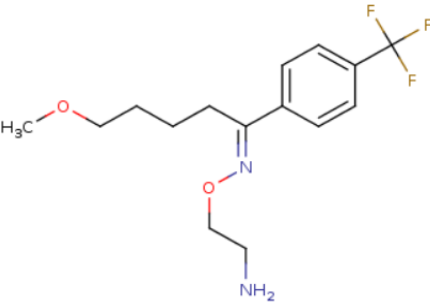
Fluvoksamin

Diğer SSRI (seçici serotonin gerialım inhibitörü) ilaçlar gibi sedatif (sakinleştirici) etkisi, antimuskarinik etkileri (ağız kuruluğu, görmede bulanıklık, idrar tutukluğu, çarpıntı ve kabızlıktır) ve kardiyotoksititesi zayıf olan bir antidepresandır. Major depresyon ve obsesif kompulsif bozukluk (anksiyete- endişe bozukluğu) tedavisinde kullanılır. Kafein ve teofilini yıkan CYP1A2 enziminin en güçlü inhibitörüdür; birlikte alındığında kafeinin eliminasyon yarılanma ömrünü 6 kat arttırır. Teofilin veya aminofilin ile birlikte kullanılmamalıdır. CYP3A4 enzimini (ilaçların parçalanmasına yardımcı olan enzim) de inhibe ettiğinden onun tarafından büyük ölçüde yıklan terfenadin gibi görece toksik ilaçlarla birlikte kullanılmamalıdır.

Sitalopram

Genel nitelikleri diğ er SSRI (seçici serotonin gerialım inhibitörü) ilaçlara benzerdir. Eliminasyon yarılanma ömrü 33 saat kadardır; CYP3A4 ve CYP2C19 enzimleri tarafından demetilasyon, deaminasyon ve oksidasyon ile aktif ve inaktif metabolitlere dönüştürülür. Depresyondan başka, panik bozuklukta da etkilidir (Kayaalp, 2005).

Çizelge 1.1. Sertralin, sitalopram ve fluvoksaminin kimyasal yapısı

Bileşikler	Kimyasal Yapı
Sertralin	
Sitalopram	
Fluvoksamin	

1.2. Protonasyon Sabiti Tayini

Protonasyon sabiti, çözünürlük, lipofilisite, biyolojik aktivite, absorpsiyon gibi ilaç özellikleri hakkında bilgiler sağlayan çok önemli fizikokimyasal parametrelerden birisidir. Suda çözünmesi yeterli olmayan ve bu nedenle su ortamında protonasyon sabitleri tayin edilemeyen bileşiklere ait bu sabitlerin tayininde sıklıkla su-organik çözücü ikili karışımları kullanılır (Kazakevich ve Lobrutto, 2007; Narasimham ve Barhate, 2011). Günümüzde su-organik çözücü ikili karışımlarında protonasyon sabitlerinin tayininde potansiyometrik, spektrofotometrik, sıvı kromatografik ve kapiler elektroforez yöntemleri tercihli olarak kullanılmaktadır (Barbosa vd., 2001; Poole vd., 2004; Demiralay vd., 2009; Sanli vd., 2009; Demiralay vd., 2010; Canbay vd., 2011; Demiralay vd., 2012; Daldal vd., 2016; Soleimani vd., 2016).

Farklı yöntemler kullanılarak, asitlerin ve bazların iyonlaşma/ protonasyon sabiti pH' ya bağımlı olarak tayin edilir.

1.2.1. Potansiyometrik titrasyonlar

Bir karşılaştırma elektrodu ve uygun bir ikinci elektrot ile oluşturulan elektrokimyasal hücrede ölçülen gerilim değerleri kullanılarak hücrenin çözeltisindeki iyonların nicel analizine potansiyometri denir. Potansiyometrik titrasyon yönteminde her titrant eklenmesinden sonra ölçülen gerilim değeri eklenen titrant hacmine karşı grafiğe geçirilerek potansiyometrik titrasyon eğrisi oluşturulur. S şeklinde olan potansiyometrik titrasyon eğrisinde dönüm noktası eğrinin eğiminin en büyük olduğu noktadır. Asit-baz tepkimelerinde kullanılan iyon seçici elektrot, cam elektrottur. Cam elektrot, hidrojen iyonu için en önemli indikatör elektrottur ve birçok koşulda pH ölçümleri için çok yönlü bir alettir (Yıldız vd., 1997).

Bu tip titrasyonlar da eşdeğerlik noktasında pH değerinde birdenbire büyük bir değişme olur. Asitin ve bazın kuvveti azaldıkça, yani pK_a veya pK_b değerleri arttıkça, dönüm noktasında gözlenen pH değişmesinin büyüklüğü ve keskinliği azalır. Aynı durum, kullanılan titrant derişiminin azaldığı zaman ve zayıf asidin kuvvetli bir baz yerine zayıf bir bazla titre edildiğinde de gözlenir (Yıldız vd., 1997; Skoog vd., 2011).

Potansiyometrik titrasyon sudan başka çözücülerde de uygulanabilir. Sudan daha asidik olan ve protojenik çözücüler adını alan asetik asit ve formik asit gibi çözücülerde çok zayıf bir baz olmaları nedeniyle sulu ortamda titre edilemeyen bazlar titre edilebilir. Sudan daha bazik olan ve protofilik çözücüler adını alan ve etilendiamin ve pridin gibi çözücülerde ise, çok zayıf bir asit olmaları nedeniyle sulu ortamda titre edilemeyen asitler titre edilebilir.

Dimetilformamid, dimetilsülfoksit, asetonitril, metil izobütil keton, metanol ve kloroform gibi aprotik veya inert susuz çözücülerde ise sulu ortamda titrant ile aynı anda tepkimeye giren bazı maddeler ayrı ayrı dönüm noktası verebilirler. Aynı şekilde potansiyometrik yöntemler, su-organik çözücü ikili sistemlerinde kullanılmaktadır (Yıldız vd., 1997).

Bu metot genellikle çok miktarda saf bileşik gerektirmektedir ve çözünübilirlik problemi yaratmaktadır. Potansiyometrik yöntemler seçici değildir. Çünkü titrasyonun eşdeğerlik noktası doğru bir şekilde belirlenemezse tayini yapılacak olan analitin pK_a ' sı için hatalı değerler belirlenebilmektedir.

1.2.2.Spektrofotometrik titrasyonlar

Bu yöntemde herhangi bir indikatör kullanılmaz. Ortamın pH değerini belirlemek için cam elektrot kullanılır. Titrasyon boyunca, titrant eklendikten ve çözelti karıştırıldıktan sonra bir miktar çözelti spektrofotometrik ölçüm kabına aktarılır ve absorbans değeri ölçülür. Bu çözeltiler titrasyon kabına geri dökülerek titrasyona devam edilir. Bu tür bir titrasyonda dönüm noktasının kaçırılması endişesi yoktur, çünkü titrasyon eğrisini oluşturmak için dönüm noktası sonrasında da birkaç ölçümün yapılması gerekir. Genellikle iyonlaşma/protonasyon sabitleri tayin edilen bileşiklerin iyonlaşmış ve moleküler formlarının absorpsiyon spektrumları farklıdır. Bu spektrumlardan, moleküler veya iyonlaşmış türlerden birinin ışığı tek başına absorpladığı dalga boyu seçilir. Farklı pH değerlerinde, ışığı absorpladığı dalga boyunda çözeltilerin absorbansı ölçülür ve bu absorbans değerleri pH' ya karşı geçirilir. S şeklindeki eğrinin eğiminin değiştiği orta nokta pK_a değerini verir (Yıldız vd., 1997).

Bu yöntemle pK_a tayininde, diğer bir yaklaşımda Eşitlik 1.1 temel alınmaktadır.

$$pK_a = pH + \log \frac{A - A'}{A'' - A} \quad (1.1)$$

Bu bağıntıda A' , moleküler formun, A'' , iyonlaşmış türün absorbanans değerlerini ifade etmektedir. $\log ((A-A')/(A''-A))$, pH ya karşı grafiklenerek kesim noktasından pK_a değerleri bulunabilir (Harvey, 2000).

Spektroskopik titrasyonda absorbanstaki en büyük değişme, pH' nın pK_a civarında olduğu koşulda gözlenir. Bu yaklaşımla suda az çözünen bileşiklerin pK_a değerleri tayin edilebilmektedir. Bu amaçla geliştirilmiş bilgisayar programları, pH ile dalga boyu ve absorbanans arasındaki üçlü ilişkiyi temel alır (Beltran vd., 1993; Mitchell vd., 1999).

Spektrofotometrik yöntemlerde, eğer tayini yapılacak olan bileşik saf değilse, sudaki çözünürlüğü zayıfsa ve belirgin UV kromofora sahip değilse bu yöntemle pK_a' nın belirlenmesi oldukça zordur. Ayrıca nötral ve iyonlaşmış formların spektral özelliklerinin yeterince farklı olması gerekir.

1.2.3. Kromatografik yöntemler

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. Tüm kromatografik uygulamalarda “sabit faz” ve “durgun faz” kavramları 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 hareketli fazla durgun faz üzerinden geçirilir; kromatografik ayırma, bileşenlerin göç hızlarına bağlı olarak gerçekleşir. Durgun faz tarafından kuvvetli tutulan numune bileşenleri, hareketli fazın akışıyla çok yavaş hareket ederler. Buna karşılık durgun faz tarafından zayıfca tutulan bileşenler hızlı hareket ederler. Bu hareket hızlarının farklılığı sonucu, numune bileşenleri birbirinden kalitatif ve kantitatif olarak analizlenebilen farklı bantlar veya bölgeler şeklinde ayrılırlar. Kromatografik yöntemler iki şekilde

sınıflandırılabilir. *Kolon kromatografide*, durgun faz ince bir kolonda tutulur ve hareketli faz basınç altında bu durgun faz arasından geçmeye zorlanır. *Düzlemsel kromatografide*, durgun faz düz bir plaka üzerine veya bir kağıdın gözenekleri arasına tutturulur ve bu durumda hareketli faz durgun faz arasından kapiler etkisiyle veya yerçekimi etkisiyle hareket eder. Kromatografinin daha temel sınıflandırması kullanılan durgun faz ve hareketli fazların tipleri ve fazlar arasında madde aktarımını sağlayan dengelerin cinslerine göre yapılır (Kazakevich ve Lobrutto, 2007).

Kolon Kromatografik yöntemlerin sınıflandırılması

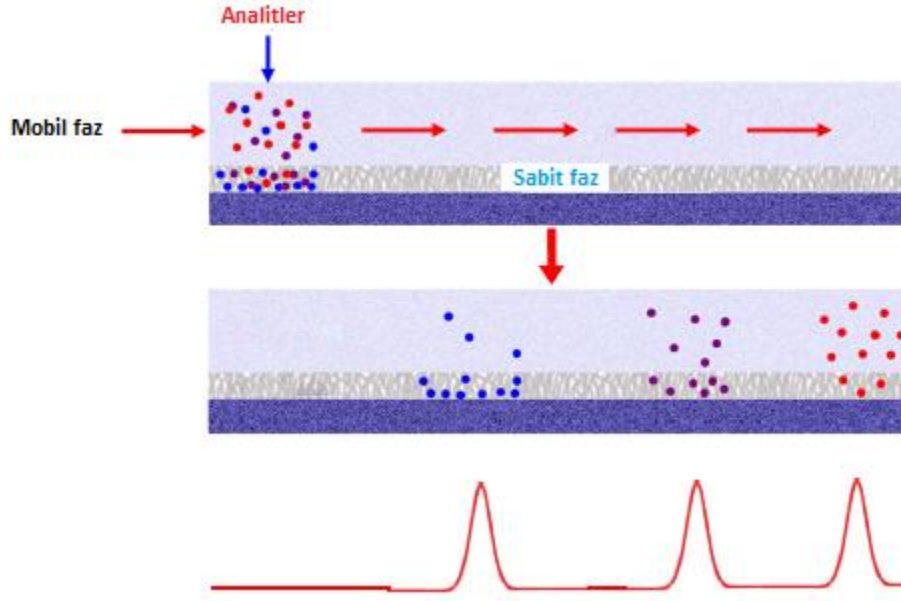
- Sıvı Kromatografi (LC) hareketli faz: sıvı
- Gaz Kromatografi (GC) hareketli faz: gaz
- Süperkritik akışkanlı kromatografi (SFC) hareketli faz: süper kritik sıvı

1.2.4.Sıvı kromatografik yöntemler

Sıvı kromatografik yöntemler nötral, asidik ve bazik özellikteki bileşiklerin kalitatif ve kantitatif analizleri için yaygın olarak kullanılan bir analitik tekniktir. Yüksek performans sıvı kromatografide (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 imkan tanır. Bunun yanı sıra asitlerin ve bazların iyonlaşma/protonasyon sabitlerinin (pK_a) tayininde sıklıkla kullanılmaktadır. Yüksek performans sıvı kromatografi, durgun faz ve hareketli fazın bağlı polaritelerine göre iki tiptir.

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

Bu yöntemde az miktarda bileşiğe ihtiyaç duyulmaktadır yani çözünübilirlik önemli bir sorun teşkil etmemektedir ve bileşiğin saf olmasına gerek yoktur. Tayini yapılan bileşiklerdeki safsızlıkların belirlenebilmesi ve bu safsızlıkların hata getirmemesi gibi avantajlarından dolayı sıklıkla kullanılır. Bu yöntemde sıklıkla su-organik çözücü ikili karışımında tayinler yapılmaktadır. HPLC yöntemiyle bileşiklerin ayırımı sabit faz ve mobil fazla analit moleküllerinin etkileşimini temel alır (Şekil 1.1)



Şekil 1.1. Sıvı kromatografik proses

Sıvı kromatografik yöntemle iyonlaşma/protonasyon sabitlerinin tayininde 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/protonasyon sabitini verir. Ayrıca asidik veya bazik bileşiklerin iyonlaşma sabitlerinin tayininde sıvı kromatografik yöntemle hesaplama yapabilen non-lineer regresyon programları da geliştirilmiştir (NLREG Version 4.0).

1.3. Yüksek Performans Sıvı Kromatografide Kullanılan Temel Kavramlar

Yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemi, bütün analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanıdır. Yöntemin bu kadar yaygın olmasının sebepleri, duyarlılığı, doğru kantitatif tayinlere kolaylıkla uyarlanabilir olması, uçucu olmayan türlerin veya sıcaklıkla kolayca bozunabilen türlerin ayrılmasına uygun olmasıdır (Skoog vd., 2011).

Bu yöntemde tayin edilen analitin derişimine cevap veren bir dedektör kolonun sonuna konulur ve sinyal zamana karşı grafiğe geçirilirse bir dizi simetrik pik elde edilir. Böyle bir grafiğe kromatogram adı verilir ve hem nitel, hem de nicel analizde

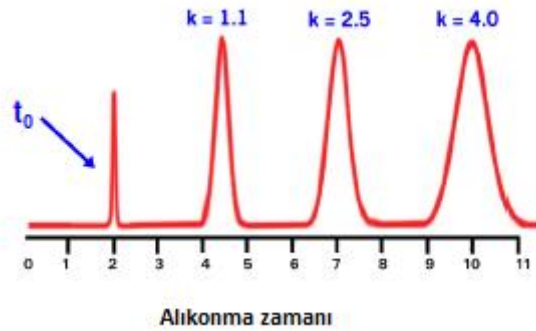
kullanılır. Piklerin zaman eksenindeki konumları numunedeki bileşikleri tanımak için; piklerin altındaki alanlar ise her türün nicel tayini için kullanılır. HPLC yöntemiyle tayini yapılan analitlerin hem kalitatif hem de kantitatif belirlenebilmesi için kullanılan terimler aşağıda verilmiştir (Skoog vd., 2011).

Alıkonma süresi

Numune enjeksiyonundan sonra kolonda tutunmayan türe ait pik süresi ölü zaman (t_0) olarak adlandırılır ve analit piklerinin tanınmasında önemli rol oynar. t_0 , ölü zaman olarak tanımlanır ve hareketli fazın ortalama göç hızını verir. t_0 belirleyici olarak organik çözücü veya iyonlaşan bileşenlerle çalışmada potasyum bromür, urasil veya sodyum nitrat gibi tuzların sudaki çözeltileri kullanılır. Bu değerin yeterli doğrulukta belirlenmesi kapasite faktörlerinin hesaplanmasında son derece önemlidir. Numunenin enjeksiyonu ile bu pikin dedektöre ulaşması için geçen süreye alıkonma süresi denir ve t_R simgesiyle gösterilir (Skoog vd., 2011).

Kapasite faktörü (Alıkonma faktörü)

Kapasite faktörü (k) önemli bir deneysel parametre olup, tayin edilen analitlerin kolonda göç hızlarını tanımlamakta yaygın olarak kullanılır. Aynı zamanda bu nicelik hareketli faz ve sabit faz arasındaki afiniteyi de göstermektedir (Şekil 1.2).



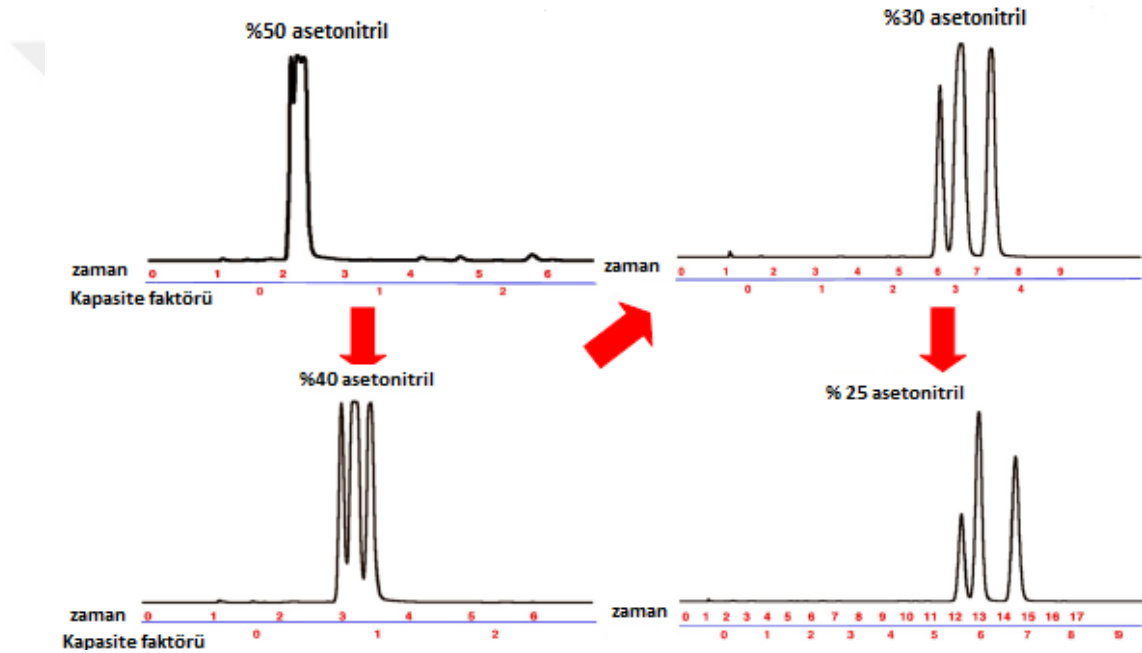
Şekil 1.2. HPLC kromatogramı

Bu parametre aşağıdaki bağıntı ile hesaplanır:

$$k = \frac{t_R - t_0}{t_0} \quad (1.2)$$

Bir çözünen madde için alıkonma faktörü birden çok küçük ise, elüsyon o kadar hızlı olur ki; alıkonma süresinin doğru tayini zorlaşır. Öte yandan alıkonma faktörü 20-30 gibi bir sayıdan daha büyük ise, elüsyon süreleri gereksiz şekilde uzar. Karışımdaki çözünenler için alıkonma faktörlerinin 1 ile 5 arasında olmasını sağlayan şartlarda ayırmalar en ideal şekilde yapılır (Skoog vd., 2011).

Çalışılan herhangi bir analit için kapasite faktörü değeri daha çok mobil fazdaki organik çözücünün (metanol, asetonytril, tetrahidrofuran) yüzdesinin değiştirilmesiyle istenilen değere getirilir (Şekil 1.3).



Şekil 1.3. Organik çözücü değişiminin kapasite faktörüne etkisi

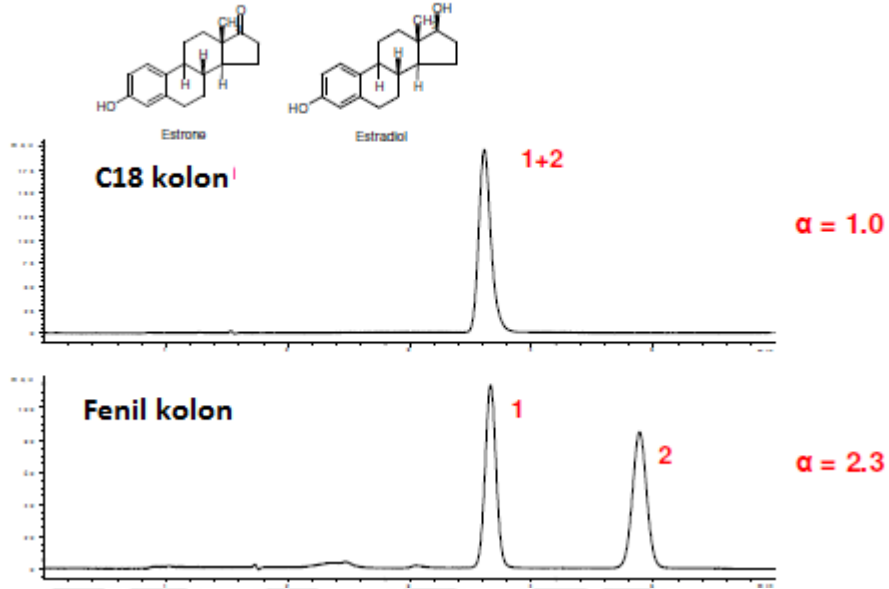
Seçicilik katsayısı (α)

A ve B gibi iki çözünen için bir kolonun seçicilik katsayısı

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} = \frac{t_{R_B} - t_{R_0}}{t_{R_A} - t_{R_0}} \quad (1.3)$$

şeklinde tanımlanır. Burada k_B daha kuvvetli tutunan B türü için dağılma katsayısı; k_A ise, daha az kuvvetle tutunan veya daha hızlı olarak kolondan elue edilen A türü için ise aynı sabittir. Bu tanıma göre α daima birden büyüktür. α , 1,15 ise iki bileşiğin %

98 oranında birbirinden ayrıldığı kabul edilir (Poole ve Poole, 1991). Sabit fazın seçiminde analitin seçiciliği ayırmayı belirgin bir şekilde etkiler (Şekil 1.4).



Şekil 1.4. Seçicilikte kolon farklılığının gösterimi

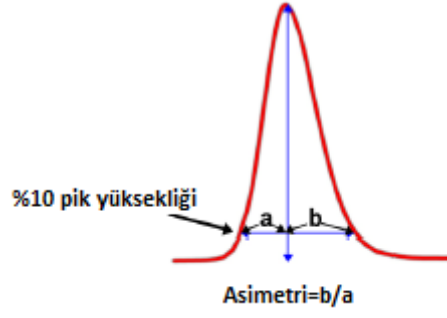
Kolon verimliliğinin kantitatif tanımı

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 ($H=L/N$) kolon verimliliğini anlatmada sıklıkla kullanılır.

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

Pik asimetrisi

Bir pik için asimetri değeri eniyi pik şekli değerinin belirlenmesi için ölçülen bir niceliktir. Pikin asimetri değeri 1 den büyük olursa pik önden kuyruklanma, bu değer 1' den küçük olursa arkadan kuyruklanma yapar (Şekil 1.5).



Şekil 1.5. Kolon asimetrisi

Bir kolonda teorik tabaka sayısı

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

$$N = 5,54 \left(\frac{t_R}{W_{0,5}} \right)^2 \quad (1.4)$$

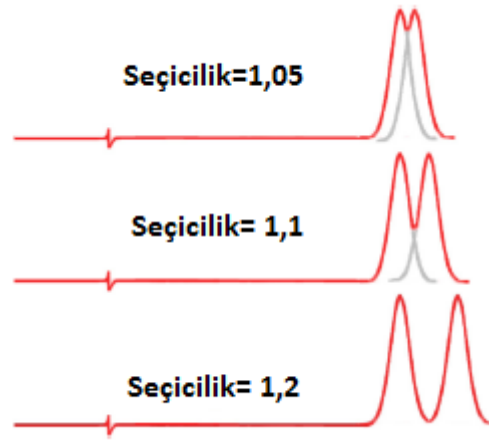
Burada t_R , bir pik için alıkonma süresi ve $W_{0,5}$, pik yarı yüksekliğindeki pik genişliği (zaman birimiyle) dir (Poole ve Poole, 1991).

Ayırma gücü (R_s)

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

$$R_s = \frac{1}{4} \sqrt{N} \left[\frac{(\alpha - 1)}{\alpha} \right] \left[\frac{k_2}{(1 + k_2)} \right] \quad (1.5)$$

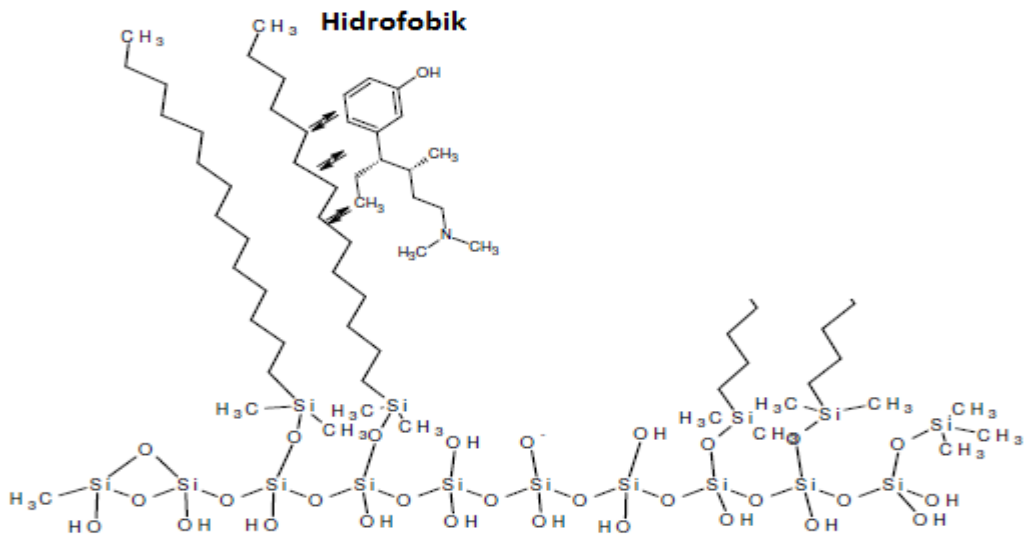
Bir kromatografik ayırmada en az ayrılan pikler, kritik pik çifti olarak adlandırılır. Pik çiftinin temel çizgide birbirinden ayrılabilmesi için ayırma faktörünün en az 1,5 olması istenir. Ayırma gücü, 1'den küçük olduğunda yeterli ayırım olmamaktadır (Poole ve Poole, 1991). Ayrıca bir ayırmada seçicilik faktöründeki değişim ayırma gücünü büyük oranda etkiler (Şekil 1.6)



Şekil 1.6. Seçicilik faktörünün ayırma gücüne etkisi

1.4. Ters Faz Sıvı Kromatografisinde İyonlaşan Bileşiklerin pK_a Değerinin Tayini

Ters faz sıvı kromatografisinde temel kural daha hidrofobik olan bileşik daha fazla kolonda tutunur (Şekil 1.7). Bu etkileşim Van Der Waals etkileşimi olarak ta adlandırılır. Bu etkileşimle birlikte, herhangi bir iyonlaşan bileşiğin nötral formunun iyonlaşan formuna göre daha uzun kolonda tutunacağı sonucuna ulaşılmaktadır. Bütün iyonlaşan bileşikler ters faz kolonlarıyla (sabit faz) hidrofobik bir etkileşim göstermektedir. Bu zayıf etkileşim bileşiklerin ayrılmasında önemli bir seçicilik sağlar. Ayrıca pH, analitin iyonlaşma bölgesinin değişimi boyunca seçiciliğin kontrolü için kullanılan en önemli fonksiyondur. İyonlaşma pH' ya bağlıdır ve mobil fazın pH sınırın değişimi asidik ve bazik bileşik içeren kompleks organik karışımların ayırımında önemli bir etkiye sahiptir.



Şekil 1.7. Ters faz sıvı kromatografide hidrofobik etkileşim

The diagram shows a central vertical bar representing the ionization state of an analyte across a pH range. The bar is divided into five horizontal segments with a color gradient from red at the bottom to green at the top. A horizontal red line intersects the bar at the boundary between the second and third segments from the bottom. This line is labeled "Analit pKa".

On the left side of the bar, under the heading "Asitler" (Acids), the following states are indicated:

- Top: %100 iyonlaşmış (100% ionized)
- Moving up: 2 pH birimi (2 pH units)
- At pKa: (indicated by the red line)
- Moving down: 2 pH birimi (2 pH units)
- Bottom: %100 iyonlaşmamış (100% not ionized)

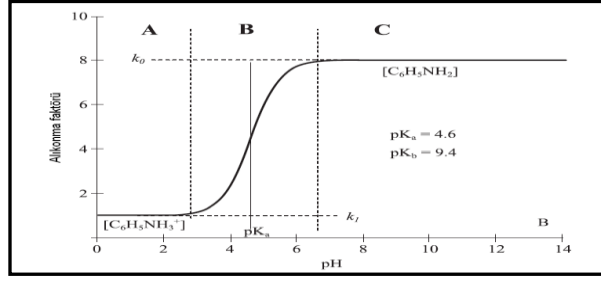
On the right side of the bar, under the heading "Bazlar" (Bases), the following states are indicated:

- Top: %100 iyonlaşmamış (100% not ionized)
- Moving up: 2 pH birimi (2 pH units)
- At pKa: (indicated by the blue line)
- Moving down: 2 pH birimi (2 pH units)
- Bottom: %100 iyonlaşmış (100% ionized)

Şekil 1.8. 2 pH kuralının şematik gösterimi

1.4.1. Bazik bileşikler

Bazik bileşiklerin kapasite faktörü değerinin pH' ya bağımlılığı bir sigmoidal şeklindedir (Şekil 1.9).



Şekil 1.9. Bazik bileşiklerin kapasite faktörü değerin pH' ya bağımlılığı

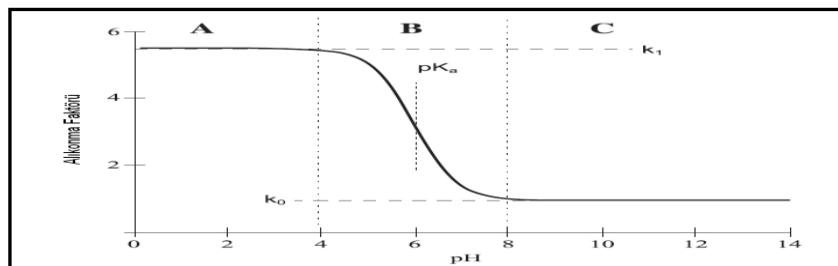
A bölgesinde, tamamen protonlanmış analit (katyonik form) düşük alıkonma zamanı gösterir. Analitin çoğu hidrofobik sabit faz ile çok az etkileşim gösterdiği için hidrofilik formdadır.

B bölgesi, kısmen protonlanmış bölge olarak tanımlanabilir. Bu bölgede analit protonlanmış ve protonlanmamış olmak üzere iki şekilde bulunur ve iyi olmayan pik şekli ve kararsız bir alıkonma gösterir. Analit, moleküler forma doğru ilerledikçe, sabit fazla daha güçlü bir etkileşime girdiği için daha uzun bir alıkonma zamanına sahip olur. Bu bölgede, mobil fazda küçük değişimlerle analitin alıkonmasında büyük kaymalar olur.

C bölgesinde, analit moleküler formda (çok hidrofobik) olduğundan büyük alıkonma zamanları gösterir.

1.4.2. Asidik bileşikler

Asidik bileşikler içinde benzer alıkonma eğrisi elde edilecektir. Fakat bu bileşiklerin alıkonmaya bağımlılığı bazik analitler için olan eğrinin ayna görüntüsü şeklindedir (Şekil 1.10).



Şekil 1.10. Asidik bileşiklerin kapasite faktörü değerin pH' ya bağımlılığı

A bölgesinde, asidik bileşikler moleküler formda olduğundan büyük alıkonma zamanları gösterir.

B bölgesi, kısmen protonlanmış bölge olarak tanımlanabilir. Bu bölgede analit protonlanmış ve protonlanmamış olmak üzere iki şekilde bulunur ve iyi olmayan pik şekli ve kararsız bir alıkonma gösterir. Analit, iyonlaşmış forma doğru ilerledikçe, sabit fazla zayıf bir etkileşime girdiği için daha kısa bir alıkonma zamanına sahip olur. Bu bölgede, mobil fazda küçük değişimlerle analitin alıkonmasında büyük kaymalar olur.

C bölgesinde, tamamen protonlanmış analit düşük alıkonma zamanı gösterir. Analitin çoğu hidrofobik sabit faz ile çok az etkileşim gösterdiği için hidrofilik formdadır.

Asidik veya bazik bileşiklerin kapasite faktörü değerleri A ve C bölgesinde mobil faz pH'ı sıyla çok az değişim gösterir. Bu üç bölgenin de dezavantajları vardır. Bu yüzden HPLC koşullarının seçiminde bütün olabilecek etkiler göz önüne alınmalıdır. Bu dezavantajlardan bazıları aşağıda belirtilmiştir.

A bölgesinin etkileri: Bazik analitler düşük alıkonma gösterir. Katotropik ajan ilavesiyle protonlanmış bazik analitlerin alıkonmasına bir miktar etki yapılabilir. Bununla birlikte bu bölgede asidik bileşikler moleküler formda oldukları için daha uzun alıkonma zamanı gösterir.

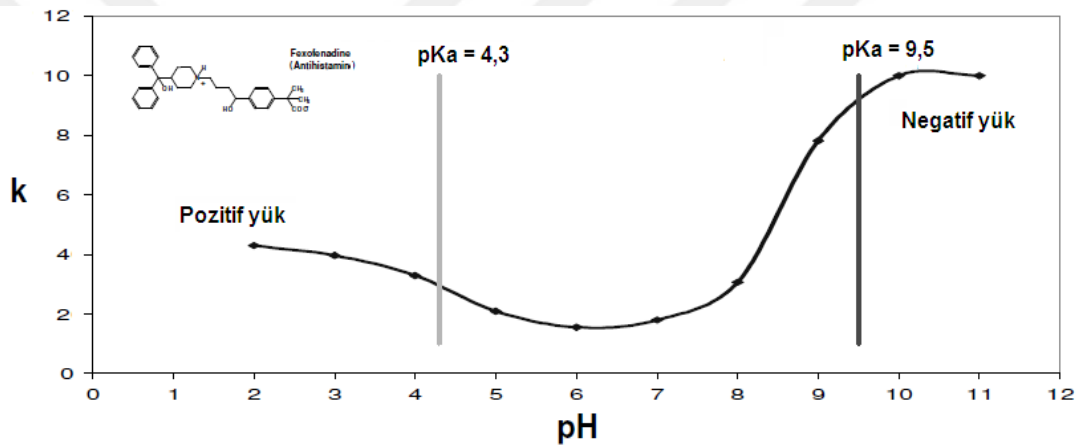
B bölgesinin etkileri: Bu bölgede analit protonlanmış ve protonlanmamış olmak üzere iki şekilde bulunur. Hem asidik hem de bazik bileşiklerde pik genişlemesi görülür ve mobil fazın iyonik şiddetine bağlı olarak piklerde önden veya arkadan kuyruklanma görülür. Çok kararsız alıkonma gözlenir ve mobil fazın bileşiminde veya pH'ındaki küçük değişiklikler önemli kaymalara neden olur. Çözücü bileşimindeki küçük değişiklikler seçicilik faktöründe değişikliklere sebep olabilir.

C bölgesinin etkileri: Asidik analit düşük alıkonma zamanı gösterir. Bazik analitler için çok uzun alıkonma zamanı olduğu için bu bölgede mobil fazda yüksek konsantrasyonda organik çözücü ile çalışmak gerekmektedir. Bu yüzden silika

kolonlarda yüksek pH' larda çalışılırsa kolon materyali bozulabilir ve kolon etkinliğini kaybedebilir.

1.4.3. Amfiprotik bileşikler

Amfiprotik bileşikler yapısında hem asidik hem de bazik fonksiyonel grup bulunduran bileşiklerdir. Bu tip bileşiklerin pK_a değerleri arasındaki farka bağlı olarak biri asidik gruba diğeri de bazik gruba ait olan iki ayrı sigmoidal gözlenir. Amfiprotik bileşiklerde gözlenen sigmoidaller, dikey yada tersine çevrilmiş şekildedir. Bu tip sigmoidallerin gözlenebilmesi için asidik ve bazik grubun pK_a değerleri arasında en az 2 birim fark olması gereklidir (Şekil 1.11) (Kazakevich ve Lobrutto, 2007).



Şekil 1.11. Amfiprotik bileşiklerin alıkonmasında pH'nın etkisi

1.5. Ters Faz Sıvı Kromatografide Teorik Kapasite Faktörünün Hesaplanması

Ters faz sıvı kromatografisinde asidik ve bazik bileşikler için kapasite faktörünün pH'ya bağımlılığı için yapılan çalışmalarda, teorik olarak kapasite faktörünü hesaplamak için kullanılan formüller Horvath ve arkadaşları tarafından türetilmiştir (Horvath vd., 1977).

Zayıf monoprotik bir asit için kapasite faktörünün değişimini gösteren bu eşitlikte,

$$k = \frac{k_{HA} + k_{A^-} \frac{K_a}{a_{H_m^+} \gamma_{A_m^-}}}{1 + \frac{K_a}{a_{H_m^+} \gamma_{A_m^-}}} \quad (1.6)$$

k_A : İyonlaşmış zayıf asidin kapasite faktörü

$a_{H_m^+}$: Mobil fazdaki hidrojen iyonu aktivitesini

K_a : Zayıf asidin iyonlaşma sabiti

$\gamma_{A_m^-}$: Debye-Hückel eşitliği tarafından hesaplanan mobil fazdaki iyonlaşan asidin aktivite katsayısı

k_{HA} : İyonlaşmamış zayıf asidin kapasite faktörü

k_{A^-} : İyonlaşmış zayıf asidin kapasite faktörü

Zayıf monoprotik bir baz için kapasite faktörünün değişimini gösteren bu eşitlikte,

$$k = \frac{k_{BH^+} + k_B \frac{K_a \gamma_{BH_m^+}}{a_{H_m^+}}}{1 + \frac{K_a \gamma_{BH_m^+}}{a_{H_m^+}}} \quad (1.7)$$

$a_{H_m^+}$: Mobil fazdaki hidrojen iyonu aktivitesi

K_b : Zayıf bazın protonasyon sabiti

$\gamma_{BH_m^+}$: Debye-Hückel eşitliği tarafından hesaplanan mobil fazdaki iyonlaşan asidin aktivite katsayısı

k_{BH^+} : İyonlaşmamış zayıf bazın kapasite faktörü

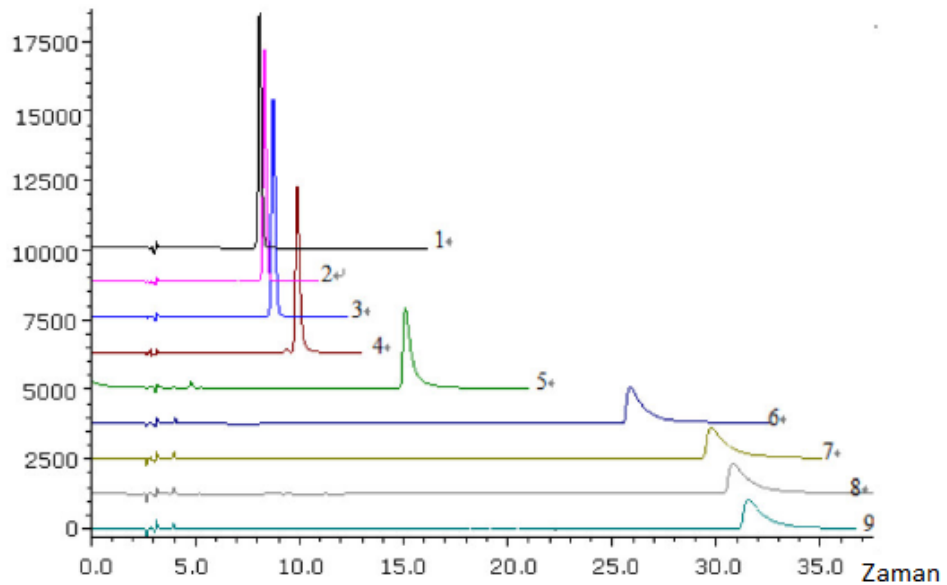
k_B : İyonlaşmış zayıf bazın kapasite faktörü

dür. Bu bağıntılardan görüldüğü gibi iyonlaşan bileşikte kapasite faktörünü etkileyen 3 etken vardır. Bunlar, moleküler türün ve iyonik türün kapasite faktörleri ve bileşiğin iyonlaşma sabitidir. Bu üç deneysel değer de organik modifiyerin derişimine bağlı değerlerdir. Bu bağıntı herhangi bir iyonlaşan bileşikte organik modifiyerin belli derişimi için iyonlaşma sabiti değeri ve su-organik çözücü ikili karışımının hidronyum derişimi biliniyorsa bize teorik kapasite faktörü değerlerini hesaplama imkanı sağlar.

Bir bileşiğin pK_a tayini sıvı kromatografik yöntemle yapılmak istendiğinde mobil fazın bileşimi sabit tutulur. Farklı pH değerlerinde mobil fazın hazırlanması ve her bir pH koşulu için üçer enjeksiyonla alıkonma zamanlarının belirlenmesi gerekir. Bu tip tayinde $pK_a \pm 2$ aralığında farklı pH değerlerinde kapasite faktörleri belirlenir. Absis ekseninde pH' lar, y ekseninde kapasite faktörleri kullanılarak hazırlanan sigmoidallerin dönüm noktası bileşiğin iyonlaşma/protonasyon sabitini verir.

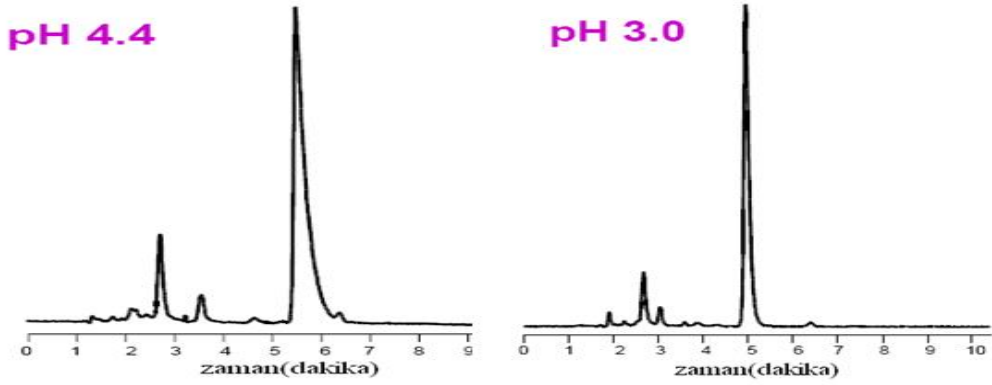
1.6.İyonlaşan Analitin Alıkonmasında pH' nın Etkisi

İyonik bileşiklerin alıkonması hareketli faz pH' ıyla önemli değişiklikler gösterir. Ters faz sıvı kromatografide alıkonma ve seçiciliğin kararlılığı için ters faz sistemlerinde pH' nın kontrolü çok önemlidir(Şekil 1.12) pH' daki küçük değişikliklere karşı alıkonma için en kararlı koşullar genellikle pH 2-4 arasında sağlanır. Özellikle zayıf asit ve bazik özellikteki bileşikler içeren birçok numune için metot geliştirmeye bu pH aralığında başlanması tercih edilmelidir. Ayrıca ayırma işleminin gerçekleşebilmesi için karışımdaki analitlerin pK_a değerlerinin bilinmesi de çok önemlidir.Örneğin, iki analit, birisi bazik ve birisi asidik ve pK_a değerleri yaklaşık olarak 4 civarında ise bu iki analitin karışımı pH 2,3 ve pH 6,0 da analizlenirse baz, pH 2,3 de düşük alıkonma pH 6,0 da yüksek alıkonma gösterir. Asidik bileşik ise pH 2,3 de yüksek alıkonma pH 6,0 da düşük alıkonma gösterir.



Şekil 1.12. İyonlaşabilen bileşiklerin alıkonmasında mobil faz pH sının etkisi (1. pH 2,2;9. pH 8,9)

Bir analitin tayininde mobil faz pH'nın pik şekline olan etkisi mutlaka dikkate alınmalıdır. Mobil fazın pH'ı mutlaka analizi yapılan analitin pK_a 'sından en az bir birim farklı olmalıdır (Şekil 1.13).



Şekil 1.13. Bir analitin tayininde mobil faz pH'nın pik şekline olan etkisi

Kompleks ayırmalarda (asitler, bazlar ve her ikisinin karışımı) pH optimizasyonunda dikkatli olmak gerekir. Bunun için de tamponlanmış mobil fazın kullanımı gerekmektedir. Seçilen tamponun pK_a sının 1 pH birimi altında ve üstünde hazırlanan hareketli fazı tamponlama özelliği vardır. Tampon derişimi yüksek olmamalıdır. 10 mM'ın altındaki tamponlar çok düşük tamponlama kapasitesine sahiptir ve pH'daki değişikliklere dirençli değildirler. 50 mM'dan yüksek derişimde ve yüksek organik derişim (> %60 asetonitril) varlığında tuz şeklinde çökme riski vardır. Tampon derişimi normal olarak 25-100 mM aralığında seçilebilir ve metot geliştirme esnasında çalışmanın bir parçası olarak tampon derişiminin etkisinde araştırılmalıdır. Çünkü ayırmada alıkonma ve seçiciliği tamponun derişimi ve tipindeki değişiklikler etkileyecektir (Çizelge 1.2). Eğer çalışmada UV dedektör kullanılıyorsa tamponun UV absorbansı bilinmelidir. Eğer kütle dedektörü kullanılıyorsa uçucu tamponların kullanılması gerekmektedir.

Çizelge 1.2. Yaygın kullanılan HPLC tamponlarının özellikleri

Tampon	pK_a	pH aralığı	UV (nm)
Fosfat	2,1; 7,2; 12,3	1,1-3,2; 6,2-8,2; 11,3-13,3	<200
Sitrat	3,1; 4,7; 6,4	2,1-4,1; 3,7-5,7; 5,4-7,4	230
Format	3,8	2,8-4,8	210 (10 mM)
Asetat	4,8	3,5-5,8	210 (10 mM)
Amonyum	9,3	8,3-10,3	200 (10 mM)

1.7. İyonlaşan Analitin Alıkonmasında Organik Modifiyerin Etkisi

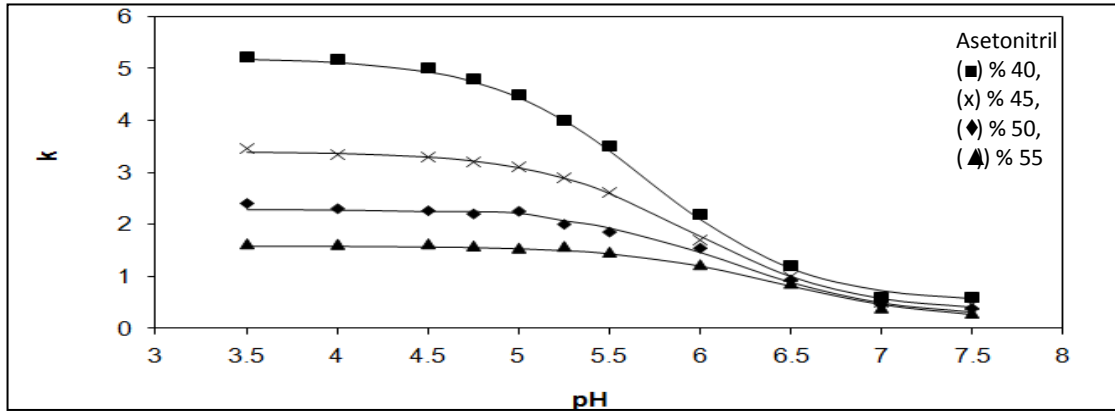
Ters faz sıvı kromatografi ayırmalarında, hareketli faz sabit faz yüzeyinden daha polar (daha hidrofilik) olmalıdır. Bu ayırmalarda su-organik çözücü karışımlarında genellikle metanol veya asetonitril tercih edilmektedir. Organik modifiyerin seçimi ayırmanın seçiciliğini etkileyecektir. Çünkü metanol ve asetonitril dipol moment, asitlik ve baziklik gibi farklı solvatokromik özelliklere sahiptir (Çizelge1.3). Asetonitril yüksek bir dipol momente sahiptir ve asitliği (hidrojen bağ donörü) oldukça baskındır. Buna karşın metanol daha düşük dipol momente sahiptir ve bazikliği (hidrojen baği akseptörü) oldukça baskındır ve oldukça düşük elüsyon gücüne sahiptir. Su ile bu çözücülerin oluşturduğu ikili ve üçlü karışımlar metot geliştirme esnasında ayırma seçiciliğinde kullanılmaktadır. Asetonitril düşük UV absorbansa, düşük viskoziteye ve yüksek kaynama noktasına sahip olduğundan sıklıkla kullanılmaktadır.

Çizelge 1.3. Ters faz sıvı kromatografide yaygın kullanılan çözücülerin solvatokromik ve fizikokimyasal özellikleri

Çözücü	Dipol moment	Asitlik α	Baziklik β	UV (nm)	Viskozite (mPa s)	Kaynama noktası (°C)	Polarite (P')
Su	0,39	0,43	0,18	200	1,00	100	9,0
Metanol	0,28	0,43	0,29	205	0,60	65	6,6
Asetonitril	0,60	0,15	0,25	190	0,37	82	6,2

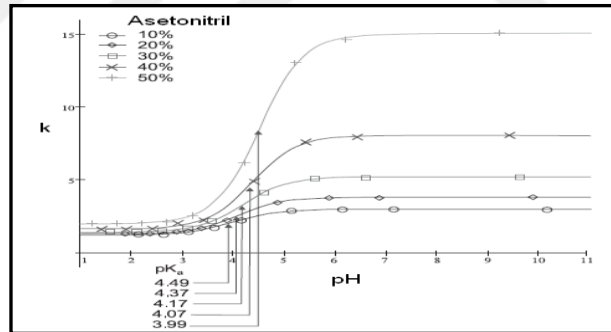
Ters faz sıvı kromatografi yönteminde, %100 su ortamında çalışmak mümkün değildir. Mutlaka mobil fazda bir miktar organik modifiyer bulunması gerekmektedir. Asidik analitler için, su-organik çözücü ikili karışımında organik çözücünün artmasıyla bileşiğin pK_a değeri artmaktadır (Şekil 1.14). Şekilde naproksen için % 40, 45, 50 ve 55 (h/h) asetonitril-su ikili karışımları için pH' ya

bağımlı kapasite faktörü değerleri kullanılarak elde edilen sigmoidaller görülmektedir.



Şekil 1.14. Asidik analitin pK_a değerine organik modifiyerin etkisi

Bazik analitler için, su-organik çözücü ikili karışımında organik çözücünün artmasıyla bileşiğin pK_a değeri azalmaktadır. Şekilde Anilin için % 10, 20, 30, 40 ve 50 (h/h) asetonitril-su ikili karışımları için pH'ya bağımlı kapasite faktörü değerleri kullanılarak elde edilen sigmoidaller görülmektedir (Şekil 1.15).



Şekil 1.15. Bazik analitin pK_a değerine organik modifiyerin etkisi

1.8. Ters Faz Sıvı Kromatografi Yönteminde Su Ortamındaki pK_a Değerlerinin Belirlenmesi

Ters faz sıvı kromatografi yönteminde % 100 su veya % 100 organik modifiyer ortamında çalışmak mümkün değildir. Mobil fazda bir miktar organik modifiyer veya suyun mutlaka bulunması gereklidir. Mobil fazda organik modifiyerin varlığı analitin pK_a 'sını direkt olarak etkiler. Bir bileşiğin su ortamında çözünmemesi bileşiğin su ortamındaki pK_a değerinin hesaplanması için engel teşkil etmemektedir. Bileşiğin su-

organik çözücü karışımında elde edilen pK_a verileri kullanılarak farklı metotlarla bileşiğin sudaki değerini hesaplamak mümkündür. Su ortamındaki pK_a değerlerinin hesaplanması için birçok metot olduğundan, tez kapsamında kullanılan Yasuda-Shedlovsky bağıntısı ve farklı organik modifiyer ortamındaki mol kesri- pK_a değerleri kullanılarak hesaplama yöntemleri anlatılacaktır (Takacs-Novak vd., 1997; Avdeef vd., 1999; Babić, 2007; Yasuda, 1959; Shedlovsky, 1962).

1.8.1. Yasuda-Shedlovsky yöntemi

Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemi özellikle suca zengin bölgelerde çok kullanılmaktadır. Mobil faz pK_a değerinden ($^s pK_a$) sudaki pK_a değerini ($^w pK_a$) bu yöntemle tayin etmek mümkündür. Bunun için kullanılan eşitlik aşağıda verilmiştir (Yasuda, 1959; Shedlovsky, 1962).

$$^s pK_a + \log[H_2O] = a_\epsilon \epsilon^{-1} + b_\epsilon \quad (1.8)$$

$^s pK_a$: mobil fazın pK_a değeri

ϵ : su-organik çözücü ikili karışımındaki organik çözücünün dielektrik sabiti

a_ϵ : lineer eşitlikten elde edilmiş eğim değeri

b_ϵ : lineer eşitlikten elde edilmiş kesim değeri

Eşitlik 1.24 kullanılarak suda çözünmeyen bileşiklerin sudaki pK_a değerleri ($^w pK_a$) doğru olarak hesaplanabilir.

1.8.2. Mol kesri- pK_a yöntemi

Bu yöntemde mutlaka mobil fazda kullanılan organik çözücünün hacimce kesrine karşılık mol kesri değerlerinin bilinmesi gereklidir (Çizelge 1.4, Çizelge 1.5, Çizelge 1.6) (Rosés ve Bosch, 2002). Mobil fazdaki organik çözücünün mol kesrine karşı, mobil fazdaki pK_a ($^s pK_a$) değerleri grafiğe geçirilerek lineer bir doğru elde edilir. Lineer doğrudan elde edilen fonksiyonun kesim noktası analitin sudaki pK_a değerini verir.

Çizelge 1.4. 25 °C' de metanol-su ikili karışımı için bazı makroskopik veriler

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

Çizelge 1.5. 25 °C' de asetonitril-su ikili karışımı için bazı makroskopik veriler

%ACN (h/h)	Mol Kesri (X_{ACN})	Yoğunluk (kg dm^{-3})	pK_{su}
0	0,000	0,995	14,00
10	0,040	0,983	14,24
20	0,079	0,968	14,47
30	0,130	0,950	14,74
40	0,186	0,931	15,08
50	0,260	0,908	15,48
60	0,339	0,885	15,90
70	0,440	0,859	16,42
80	0,578	0,829	17,14
90	0,755	0,802	17,13
100	1,000	0,782	34,40

Çizelge 1.6. 25 °C' de tetrahidrofuran-su ikili karışımı için bazı makroskopik veriler

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

1.9. Metot Validasyon Parametreleri

Metot Validasyonu, uygun kesinlik ve doğruluk ile metodun güvenilirliğini gösteren ölçüm işlemleridir. Bu işlemin amacı, seçilen metodun istenen amaca uygun nitelikte sonuç verdiğini belirlemek ve metodun sürekli kullanımı sırasında istenen performansı sağlayan koşulları belirlemek ve kontrol altında tutmaktır. Bu bölümde metot validasyonu için gerekli olan istatistiksel parametreler açıklanacaktır.

Yayılma

Yayılma istatistik ile ilgili önemli bir terimdir. Bir grup tekrarlı analizden elde edilen analizinden elde edilen sonuçlardan en küçük değerle en büyük değer arasındaki farka yayılma denir. Yayılmaya saçılma, dağılma veya değişkenlik de denir ve genel olarak b veya W ile gösterilir. Yayılma, bir metodun kesinliğinin ölçüsüdür. Ancak iyi bir ölçüsü değildir (Gündüz, 2010).

Ortalama değer

Numune ortalaması (x_{ort}) genel olarak 5-10 gibi sınırlı sayıda tekrar analizi (ölçme) sonucundan elde edilir. Ortalama, tekrar analizinden elde edilen sonuçların toplamının, yapılan analiz sayısına bölünmesiyle elde edilir ve x_{ort} ile gösterilir. Alınan analiz sonuçları $x_1, x_2, \dots, x_n$ olduğuna göre ortalama değer Eşitlik 1.9 ile hesaplanır.

$$x_{ort} = \frac{x_1 + x_2 + \dots + x_n}{n} = \frac{\sum x_i}{n} \quad (1.9)$$

Ortalama değer kendisinin hesaplanmasında kullanılan her hangi bir analiz sonucundan daha güven vericidir. Çünkü ortalama değere grupta bulunan bütün değerlerin katkısı vardır (Gündüz, 2010).

Ortanca değer

Analiz sonuçlarının, doğru değer altında ve üstünde eşit olarak dağılması teorisinden hareketle, bir analizin sonucu, ortanca değer olarak da verilebilir ve M ile gösterilir. Ortanca değeri bulmak için, analiz sonuçları en küçükten en büyüğe

doğru sıraya konulur ve sıranın ortasına düşen sonuca ortanca değer denir (Gündüz, 2010).

Güven sınırları, güven aralığı ve güven seviyesi

Güven sınırları, güven aralığı ve güven seviyesi tayinleri önemli işlemlerdir. Çünkü bu tayinler yardımıyla kendisine hiçbir zaman ulaşılabilen doğru veya gerçek değere (μ), yaklaşırlar veya doğru değer içinde bulunacağı konsantrasyon aracılığı belirli bir ihtimalle belirlenir. Bu aralığın iki ucuna güven sınırları, bu iki uç arasındaki açıklığa güven aralığı, doğru değer hangi ihtimalle (yüzde olarak) bu sınırlar içinde bulunacağına da, güven seviyesi denir (Gündüz, 2010).

1.9.1. Doğruluk

Doğruluk, doğru veya gerçek değerle, bulunan ortalama değer arasındaki farktır. Sonuçlar ortalama % geri kazanım olarak verilir. Ortama ilave edilen analitin analiz yapılan ortamdan hangi oranda geri alınabildiğini gösterir. Seçilen her bir derişim için minimum 5 tayin yapılmalıdır (Riley ve Rosanske, 1996). Doğruluk mutlak veya bağıl olarak verilir.

Mutlak bağıl ve yüzde bağıl hatalar

Mutlak hata, bir aletin veya cihazın üreticisi tarafından tespit edilen hatasıdır. Bağıl hata ise boyutsuz bir sayıdır. Bağıl hataya, bağıl standart sapmada denir ve bias (% Bias) olarak ifade edilir. Bias, genelde sistematik hata anlamında kullanılır. Böyle bir hata artı veya eksi olabilir. Bağıl standart sapma genellikle % olarak ifade edilir (%BSS) (Eşitlik 1.10, Eşitlik 1.11) (Gündüz, 2010).

$$\%BSS = \frac{SS}{X_{ort}} \times 100 \quad (1.10)$$

$$\%BH = \frac{GD - X_{ort}}{GD} \times 100 \quad (1.11)$$

GD: Gerçek Değer

SS: Standart Sapma

X_{ort} : Ortalama Değer

1.9.2. Kesinlik

Kesinlik ve doğruluk çok önemli ayrı iki terim olmalarına rağmen, çoğu zaman birbiriyle karıştırılır. Bir analizde bulunan sonuçların birbirine yakınlığına kesinlik denir. Kesinliğin bir başka tanımı da, bir grup analiz sonucunda en küçük sonuçla en büyük sonuç arasındaki farktır (yayılmadır). % BSS (Bağıl Standart Sapma) veya % VK (Varyasyon Katsayısı) olarak ifade edilir. Ölçüm yapılan her bir derişim için minimum 5-6 tayin yapılmalıdır. Kesinlikle doğruluk arasında direkt bir bağlantı yoktur. Bir analizde, sonuçların kesinliğine bakarak doğruluk hakkında kesin bir şey söylenemez. Kesinlik değişik şekillerde belirtilebilir (Gündüz, 2010).

- Standart sapma ve bağıl standart sapma
- Varyans
- Yayıma
- Sapma, ortalama sapma ve bağıl ortalama sapma

Standart sapma

Standart sapma analizle (ölçümle) bulunan sonuçların ortalama değer etrafında dağılımını gösteren bir kesinlik parametresidir. Bu parametreye (standart sapmaya) sonuçların ortalama değer etrafında değişkenlik değeri de denir. Bir analizde hesaplanan standart sapma değeri ne kadar küçükse, analizin kesinliği o kadar iyidir veya yüksektir denir (Gündüz, 2010).

Varyans

Varyans hataların yayılmasında ve hesaplanmasında çok kullanılan bir terimdir. Varyans standart sapmanın (σ) , karesine (σ^2) eşittir.

Sapma, Ortalama Sapma ve Bağıl Sapma

Analizde elde edilen sonuçlardan her birinin ortalama değerden (x_{ort}) farkına sapma denir ve d ile gösterilir.

$$d = |x_i - x_{ort}| \quad (1.12)$$

Sapmaların toplamını analiz sayısına (n) bölünmesiyle bulunan değere ortalama sapma denir ve ($\bar{d}$) ile gösterilir.

$$\bar{d} = \frac{(x_1 - x_{ort}) + (x_2 - x_{ort}) + ...(x_n - x_{ort})}{n} \quad (1.13)$$

Ortalama sapmanın ortalama değere bölünmesiyle bulunan değere bağlı ortalama sapma denir (Gündüz, 2010) .

Kesinlik, tekrarlanabilirlik (repeatability), orta kesinlik (intermediate precision) ve tekrar elde edilebilirlik (reproducibility) olmak üzere üç kısımda incelenmektedir.

Tekrarlanabilirlik, kısa zaman aralığı içerisinde aynı işlem koşulları altındaki kesinliği ifade eder. Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi hazırlanır ve bu çözeltilerden en az 10 ölçüm yapılır. Bu tekrar edilebilirlik gün içi veya çalışma sırasındaki kesinlik olarak da adlandırılır. Sonuçta, kesinlik elde edilen değerlerin %BSS' ı verilerek ifade edilir ve %BSS ≤1,0 olmalıdır.

Orta kesinlik, çalışmalar arası, deneyler arası veya günler arası kesinlik olarak tanımlanan bu değer çalışmanın tam anlamda kesinliğini belirtir. Bu kesinliği sağlayan çalışma diğer kesinlik parametrelerini de sağlamış olur.

Analizi yapılacak maddenin çalışma ortamındaki çözeltisi ayrı ayrı hazırlanır ve bu çözeltilerin her birinden en az 3'er ölçüm, farklı günlerde ve/veya farklı analizciler tarafından ve/veya farklı cihazlarla yapılır. Sonuçta, orta kesinlik elde edilen değerlerin %BSS' ı verilerek ifade edilir ve %BSS ≤2,0 olmalıdır. Biyolojik numunelerle çalışırken %BSS değerleri 10-15'e kadar çıkabilmektedir.

1.9.3. Seçicilik

Analizi yapılacak maddenin numunede bulunan girişim yapma ihtimali bulunan diğer yardımcı veya etken maddeler yanında miktarının tam ve doğru olarak tayin edilebileceğini gösteren bir parametredir. Seçicilik, miktar tayini sırasında gerekli

validasyon işlemleri yapılırken, teşhis testleri ve safsızlıkların tayini sırasında yapılmalıdır.

1.9.4. Gözlenebilirlik sınırı (LOD)

Analizi yapılan örneğin belirlediği fakat nicel sınırlar içerisine girmediği en alt derişimdir. Doğrudan yapılan deneylerden, gözlenerek yapılan hesaplamalarda genel olarak sinyal/gürültü (signal/noise) oranı 3 olarak alınır.

Teşhis sınırı, Eşitlik 1.14 kullanılarak hesaplanır.

$$LOD= 3 \times SS / m \quad (1.14)$$

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

1.9.5. Tayin alt sınırı (LOQ)

Analizi yapılan maddenin kabul edilebilir düzeyde kesin ve doğru olarak miktarının tayin edilebileceği, doğrusallık sınırları içerisine girmeyen veya kalibrasyon eğrisinin en alt derişimini oluşturan derişim düzeyidir. Doğrudan yapılan deneylerden gözlenerek LOQ tesbiti için genel olarak sinyal/gürültü oranı 10 olarak alınır.

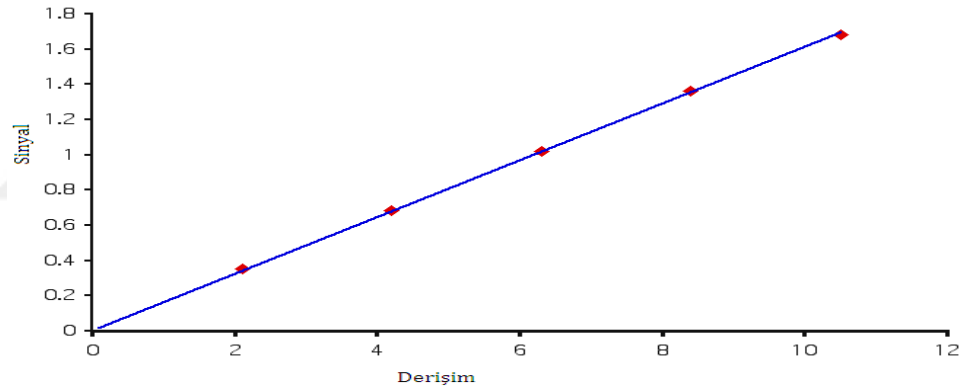
Tayin alt sınırı, Eşitlik 1.15 kullanılarak hesaplanır.

$$LOQ= 10 \times SS / m \quad (1.15)$$

eşitliği kullanılır. SS= Kör çözeltilerinde (en az 5 adet) yöntem uygulandığında elde edilen sonuçların veya y eksenindeki kesişim değerinin standart sapması, m= ilgili kalibrasyon doğrusunun eğim değeridir. SS ve m değerleri LOD eşitliğinde kullanılan değerlerle aynıdır.

1.9.6. Lineerlik

Derişime karşı cevabın doğru orantılı olarak artması ve çizilen grafikte noktaların düz bir çizgi üzerinde yer almasıdır. Lineer aralığın belirlenmesinde, içerisinde tayini yapılacak madde derişimleri bilinen en az 5 değişik derişim içeren çözeltinin analiz edilmesi gerekir. Kalibrasyon grafiği elde edildikten sonra, bu grafik kullanılarak herhangi bir numune içerisindeki aranan madde derişimi Şekil 1.16' dan da görüleceği gibi bu doğrusal grafikten elde edilen bağıntısından bulunabilir (Miller ve Miller, 2008). Bir analizde elde edilen bir seri noktayı en iyi temsil edecek doğrunun çizilebilmesi için en küçük kareler metodundan yararlanılır. Bir seri analiz sonucuna regresyon analizi uygulanarak korelasyon katsayısı (r) belirlenir. Korelasyon katsayısı iki değişken arasındaki bağıntının (ilginin) bir ölçüsüdür. Bu bağıntı genel olarak r ile gösterilir ve r değeri +1 ile -1 arasında değişir.



Şekil 1.16. Aletli analizde kalibrasyon işlemi

Kalibrasyon doğrusu, 3 farklı metotla çizilebilir: dış standart metodu, iç standart metodu ve standart ekleme metodu.

Dış standart metodu en basit kalibrasyon eğrisi çizme metodudur ve bundan dolayı basit analitik problemler için kullanılmalıdır. Elde edilen sonuçlar tekrarlanabilir olmalıdır.

İç standart metodu, enjeksiyon hacminden gelebilecek hataları bertaraf etmek için kullanılan önemli bir metottur. Numune hazırlama ve numune uygulama sırasında olabilecek numune kayıplarının düzeltilmesi amacıyla kullanılır. İç standart

metodunda, kalibrasyon grafiği analit sinyalinin iç standart sinyaline oranı olarak grafiğe geçirilir. Uygun iç standart madde seçmek çok kolay olmayabilir. Bu yöntemde seçilen iç standart madde, saf olmalı, numune matriksinde numuneye karşı reaktif olmamalı, numunenin diğer bileşenlerinden tamamen ayrılmalı, benzer dedektör yanıtına sahip olmalıdır (Gündüz, 2010).

Standart ekleme metodu analiz edilecek madde miktarı sınırlı değilse iyi bir metottur. Matriks etkinin büyük ölçüde var olduğu karmaşık numunelerin analizinde standart ilave yöntemi yaygın olarak kullanılır. Standard ilave yöntemi ile yapılan çalışmalarda numune ortamına belli hacimlerde standard eklenir. Bu katkılı çözeltelerde okunan dedektör sinyaline her iki deşişimin (numune, ilave edilen standart) katkısı vardır. Standardın ilave edilen hacmi ile okunan sinyal arasında lineer bir ilişki vardır. Bu ilişkiden yararlanılarak bilinmeyen deşişimine geçilir.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Bu tez çalışmasında depresyon hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlardan, sertralin, sitalopram ve fluvoksaminin protonasyon sabitlerinin tayini ters faz yüksek performans sıvı kromatografi yöntemiyle farklı derişimlerdeki asetonitril-su ikili karışımlarında yapılmıştır. Bu bileşiklerin protonasyon sabitlerinin tayinine yönelik HPLC metoduyla yapılmış hiçbir çalışma olmadığı detaylı literatür araştırması sonucu belirlenmiştir. Bu tez çalışması HPLC yöntemiyle pK_a tayini için ilk çalışma olacaktır.

Sertralin, sitalopram ve fluvoksaminin farklı numunelerde tek başlarına veya bozunma ürünleriyle birlikte tayinine yönelik çalışmalar literatürde yer almaktadır. Bu bölümde seçilen bileşiklere ait metot validasyonu çalışmalarına değinilmiştir.

Kristoffersen vd. (1999) çalışmalarında, seçici serotonin gerilim inhibitörlerinden sitalopram (CIT), fluoksetin (FLU), paroksetin (PAR) ve onların metabolitlerinin kan ve plazmada eş zamanlı tayini için sıvı kromatografik bir metot geliştirmişlerdir. Çalışmacılar kanda ve plazmada bu bileşiklerin tayini için C8 kartuş ile katı faz ekstraksiyon metodu uygulamışlardır. Analitler iki farklı dedektörle (floresans ve UV dedektör) tayin edilmiştir. Sitalopram, fluoksetin, paroksetin, Cl-sitalopram ve iç standart madde olarak seçilen protriptilin için katı faz ekstraksiyon metodun sağlamlığı, kısmi faktöriyel dizayn metodu kullanılarak test edilmiştir. Sıvı kromatografik ayırmanın sağlamlığı ve optimizasyonu merkezi kompozit dizaynla incelenmiştir. Parametreler olarak mobil fazdaki asetonitril miktarı ve pH seçilmiştir. Çalışılan bileşiklerin ayrılması Sentry ön kolon (20×3,9mm) kullanılarak Symmetry C18 (150×3,9mm, 5µm) kolonda gerçekleştirilmiştir. Ayırma 45mM amonyum format (pH 4) ve asetonitril (70:30, h/h) ikili karışımı bulunan mobil fazda gerçekleşmiştir. Mobil fazın pH'sı 5M formik asit ile istenilen pH'ya ayarlanmıştır. Çalışmada akış hızı 1mL/dakika, kolon sıcaklığı 45±0,1C° ve enjeksiyon hacmi 15 µL'ye ayarlanmıştır. Çalışmada FLU ve NFLU UV dedektörde; CIT, PAR ve onların metabolitleri floresans dedektörde tayin edilmiştir. Norfluoksetin (NFLU), ve fluoksetin (FLU) için UV dedektör dalga boyu 230nm'ye, sitalopram (CIT) ve Cl-sitalopram (CITCl) için eksitasyon dalga boyu 245 nm'ye emisyon dalga boyu ise 295 nm'ye; protriptilin

(PRO), paroksetin (PAR) ve onun metabolitleri için eksitasyon dalga boyu 295 nm'ye emisyon dalga boyu 350 nm'ye ayarlanmıştır. Bileşiklerin ayrılması izokratik olarak, 15 dakikadan daha az bir zamanda gerçekleşmiştir. Piklerin ayırma gücü değerleri 1,5'dan büyük olarak belirtilmiştir. Metot floresans dedeksiyonla 0,05-5µmol/L derişim aralığında; ultraviyole dedeksiyonla 0,12-5µmol/L derişim aralığında valide edilmiştir. Gün içi ve günlerarası çalışmalarda bağıl standart sapma değerleri sırasıyla % 1,4-10,6 ve %3,1-20,3 olarak bulunmuştur. Bileşikler için geri kazanma değerleri %63-114 aralığında, metabolitler için % 38-95 aralığında bulunmuştur.

Adams vd.(2001) çalışmalarında tablette sertralin analizi için izokratik modda sıvı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Ayırma Merck LiChrospher 100RP-8 (125mm × 4mm I.D, 5µm) kolonda gerçekleşmiştir. Geliştirilen metodun akış hızı ve UV dedektörün dalga boyu sırasıyla 1,0 mL/dakika ve 270 nm'ye ayarlanmıştır. Çalışmada pH'sı 5,5 ayarlanmış sodyum fosfat tamponu ve asetonitril (30:70, h/h) karışımından oluşan mobil faz kullanılmıştır. Çalışmada sertralinin alıkonma zamanı 3,8 dakika olarak belirlenmiştir. Geliştirilen metot, doğruluk ve kesinlik parametrelerine göre valide edilmiştir. Oluşturulan kalibrasyondogrusu 0,5-2,5 mg/mL aralığında lineerdir ve korelasyon katsayısı 0,9999 olarak verilmiştir. Çalışmada dış kalibrasyon metodu kullanılmıştır.

Skibiński ve Misztal (2001) çalışmalarında moklobemid, paroksetin ve fluvoksaminin tablette tayini için HPLC metodu geliştirmişlerdir. Bu ilaçların kromatografik ayrımı Nova-Pak C18 (150×3.9mm I.D, 4µm) kolonla gerçekleştirilmiştir. Paroksetin ve fluvoksaminin HPLC ile tayini için metanol/tetrahidrofuran/fosfat tamponu (pH 2, 65) (53:5:42, h/h/h) üçlü karışımı; moklobemidin tayini için metanol ve fosfat tamponu (pH 2,65) karışımı (7:3, h/h) mobil faz olarak kullanılmıştır. Bileşiklerin dedeksiyonu 235 nm' de gerçekleştirilmiştir. Kantitatif uygulama için lineer kalibrasyon doğruları 3 bileşik içinde çizilmiş ve lineer aralık 5-50 µg/mL olarak tayin edilmiştir. Metodun doğruluğunun belirlenebilmesi için geri kazanma çalışmaları yapılmıştır. Geri kazanma değerleri 3 ilaç için % 99,01 - % 100,94 arasında tayin edilmiştir.

Chen vd.(2004) çalışmalarında tablet ve kapsüllerde sertralinin tayin için sterospesifik yüksek performanslı sıvı kromatografi yöntemini geliştirmişlerdir. Sertralinin enantromerik formları ve trans drasteroizomerlerinin kromatografik ayrımı Altima C18 (250mm×4,6mm I.D, 5µm) kolonla gerçekleştirilmiştir. Yüksek performans sıvı kromatografi yönteminde şiral selektör olarak kullanılan hidroksipropil-β-siklodekstrin mobil faz katkı maddesi olarak kullanılmıştır. Bu ayırmada mobil faz olarak 18 mM sulu Hp-β-CD içeren 170 mM fosfat tamponu ve asetonitril (68:32, h/h)karışımı kullanılmıştır. Bileşiklerin hepsi 225 nm’de dedekte edilmiştir. Sertralin için lineer kalibrasyon derişim aralığı 1-120 µg/mL olarak tayin edilmiştir. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 0,029 ve 0,097 µg/mL olarak hesaplanmıştır. Gün içi ve günlerarası çalışmada RSD değeri % 1 in altında bulunmuştur.

Juan vd. (2005) çalışmalarında depresyon tedavisinde kullanılan fluoksetin, sitalopram, paroksetin ve venlafaksin eş zamanlı tayini için HPLC-MS/ESI yöntemi geliştirmişlerdir. HPLC-MS/ESI yöntemiyle geliştirilen bu eş zamanlı tayin, 4 bileşiğin insan plazmasında tayini için uygulanmıştır. Analitlerin HPLC ayrımı Macherey-Nagel C18 (250 mm × 4,6 mm, 5µm) kolonla, su (% 0,6 formik asit, 30mM amonyum asetat)-asetonitril (35:65, h/h) ikili karışımının mobil faz olarak kullanıldığı koşulda gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kolon sıcaklığı ve akış hızı sırasıyla 40°C ve 0,85 mL/dakikaya ayarlanmıştır. Bütün bileşikler için lineer aralık 5-1000 ng/mL arasında bulunmuştur. Dedeksiyon limitleri fluoksetin, sitalopram, paroksetin ve venlafaksin için sırasıyla 0,5; 0,3; 0,3 ve 0,1 ng/ mL olarak tayin edilmiştir. Gün içi ve günlerarası varyasyon katsayıları % 15 ’in altında bulunmuştur. Sonuçta geliştirilen yöntemin bu ilaçların farmokinetik ve metabolizma çalışmaları için uygun olduğu belirtilmiştir.

Mandrioli vd. (2006) çalışmalarında insan plazmasında sertralin ve onun aktif metaboliti N-desmetilsertralinin analizi için UV dedeksiyonla sıvı kromatografik yöntem geliştirmişlerdir. Çalışılan analitlerin ayrımı Genesis C8 (150 mm × 4,6 mm I.D, 4µm) ters faz kolonla gerçekleştirilmiştir. Ayırma için asetonitril ve % 0,1 trietilamin (35:65 h/h) içeren 12,3 mM, pH ‘ sı 3 olan fosfat tamponu karışımı mobil faz olarak seçilmiştir. Çalışmada klomipramin iç standart olarak kullanılmıştır.

Çalışmada akış hızı 1,2 mL/dakika, enjeksiyon hacmi 20 µL ve UV dedektörün dalga boyu 220 nm'ye ayarlanmıştır. İnsan plazmasında bu ilaçların tayini için C2 kartuşlar kullanılarak katı faz ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır. Bu kartuşun ortamdaki matriks etkinin en aza indirilmesi ve ekstraksiyon veriminin yüksek olması (> %94) nedeniyle seçildiği belirtilmiştir. Kantitatif tayin için belirlenen lineer aralıklar sertralin için 7,5 – 250 ng/mL; N-desmetilsertralin için 10-500 ng/mL'dir. Geliştirilmiş analitik metot kesinlik, ekstraksiyon verimi ve doğruluk parametreleri için valide edilmiştir. Kesinlik için % RSD değerleri % 3,9'un altında, doğruluk için geri kazanma değerleri % 90 'nın üzerinde bulunmuştur.

Ulu (2006) çalışmasında ilaç dozaj formunda fluvoksaminin tayini için ters faz sıvı kromatografi yöntem geliştirmiş ve yöntemi valide etmiştir. HPLC ayırımını µ-Bondapak C₁₈ kolonla (250 mm × 4,6 mm, 5µm) gerçekleştirmiştir. Bileşiğin tablette tayini için iç standart olarak triptamin kullanmıştır. Mobil faz olarak asetonitril-su (80:20, v/v) ikili karışımını kullanmıştır. Ayırma oda sıcaklığında, akış hızı 1ml/dakikada gerçekleşmiştir. Çalışmacı fluvoksaminin tayininde 1,2-naftakinon-4-sülfonik asit sodyum tuzu ile türevlendirme yapmıştır. Türevlendirme sonucunda bileşiği 450 nm'de tayin etmiştir. Çalışmacı elde edilen optimum kromatografik koşulda bileşiğin sistem kararlılık testlerini gerçekleştirmiştir. Metot spesifiklik, lineerlik, kesinlik ve doğruluk parametreleri kullanılarak valide edilmiştir. Fluvoksaminin 45-145 ng/mL derişim aralığında lineer olduğu bulunmuştur. LOD ve LOQ değerleri sırasıyla 15 ng/mL ve 50 ng/mL olarak tayin edilmiştir. Ayrıca fluvoksaminin ve iç standartın 15 gün boyunca kararlılık testleri yapılmıştır. Sonuçta bu bileşiklerin oda sıcaklığında 12 saat ve 4°C'de 5 gün kararlı oldukları bulunmuştur.

Hattori vd. (2007) insan serumunda sertralin, fluvoksamin ve paroksetinin analizini yeni bir polimer kolonla (Shim-pack MAYI-ODS) sıvı kromatografi-tandem kütle spektrometresiyle gerçekleştirmişlerdir. Geliştirilen bu yöntende komplike ön muamele olmaksızın biyolojik numunede bu bileşiklerin direkt enjeksiyonla tayinini gerçekleştirmişlerdir. Bu yöntemde deksrometorfan iç standart olarak seçilmiştir. İnsan serumunda bu üç ilacın geri kazanımı 20 ng/mL derişimde yapılan

katkılandırmada %29,2-45,7 ve 80 ng/mL derişimde yapılan katkılandırmada %52- %53,7 olarak hesaplanmıştır. Her bir ilacın dedeksiyon limiti 1-3 ng/mL olarak tayin edilmiştir. Sonuçta yeni bir polimerik kolon kullanılarak geliştirilen bu yöntemin biyolojik numunelerde sertralin, fluvoksamin ve paroksetinin toksik ve terapötik seviyelerinin analizi için hızlı ve duyarlı olduğu belirlenmiştir.

Souri vd. (2015) çalışmalarında fluvoksamin maleatın farklı koşullardaki kararlılığını belirlemek için HPLC metodu geliştirmişlerdir. Kromatografik ayırma Nova – Pak CN (150 mm × 3,9 mm, 4µm) kolonla ve 50 mM K₂HPO₄ (pH 7,0) ve asetonitril (60:40, v/v) karışımının mobil faz olarak kullanıldığı izokratik sistemde gerçekleştirilmiştir. Bileşik 235 nm’ de UV dedektörle tayin edilmiştir. Geliştirilen metotla fluvoksaminin 1-80µg/mL derişim aralığında (kabul edilen kesinlik CV değeri < %2 ve doğruluk hata değeri < %1,6) lineer olduğu belirlenmiştir. Fluvoksaminin bozunma çalışmaları asidik, bazik ve oksidatif koşullarda ve UV ışınına maruz bırakılarak gerçekleştirilmiştir. Bu koşullarda bileşiğin kararsız olduğu durumlar belirlenmiştir. Ayrıca önerilen metot bileşiğin tablet formülasyonundaki tayini içinde uygulanmıştır.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu bölümde sertralin, sitalopram ve fluvoksaminin su-asetonitril ikili karışımlarında protonasyon sabitlerinin tayini ve ilaç formülasyonlarında kantitatif tayinine yönelik ters faz sıvı kromatografik yöntemle belirlenmesi için kullanılan cihazlar ve kimyasallar hakkında bilgi verilmiştir.

3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneylerde kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya HPLC saflıktadır. Bu tezde çalışılan bileşiklerin özellikleri, Çizelge 3.1’ de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Çalışılan bileşikler ve özellikleri

Bileşik	Kimyasal yapısı	Temin Edildiği Firma	Maksimum Absorbans Yaptığı Dalga Boyu
Sertralin hidroklorür	$C_{17}H_{18}Cl_3N$ 342,691 g/mol	Sigma-Aldrich	UV 210 nm
Sitalopram hidrobromür	$C_{20}H_{22}BrFN_2O$ 405,304 g/mol	Sigma-Aldrich	UV 210 nm
Fluvoksamin maleat	$C_{15}H_{21}F_3N_2O_2$ 318,334 g/mol	Sigma-Aldrich	UV 210 nm
İmipramin hidroklorür (iç standart)	$C_{19}H_{24}N_2$ 280,407 g/mol	Sigma-Aldrich	UV 210 nm

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

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler

Adı	Kullanım amacı	Açıklama
Urasil	Kolonda tutunmayan türün kolonu terk etme zamanını belirlemede	Merck, analitik saflıkta
Potasyum hidrojen fitalat	Elektrot kalibrasyonu için referans standart	Merck (Referans Değer Standardı)
Asetonitril	Su ile ikili karışımları halinde çalışılan ortam	Merck, HPLC saflığında
Amonyum bikarbonat	Mobil faz pH’ının ayarlanmasında	Merck, analitik saflıkta
Amonyak	Mobil faz pH’ının ayarlanmasında	Riedel-de Haën, analitik saflıkta

Çizelge 3.2. Çalışmada kullanılan kimyasal maddeler (Devam)

Fosforik asit	Mobil faz pH'ının ayarlanmasında	Riedel-de Haën, analitik saflıkta
Sodyum hidroksit	Mobil faz pH'ının ayarlanmasında	Merck, analitik saflıkta

3.2. Kromatografik Çalışmalar

3.2.1. Kullanılan cihazlar

3.2.1.1. Yüksek performans sıvı kromatografisi cihazı

Çalışılan bileşiklerin sıvı kromatografik davranışlarının incelenmesinde ve pK_a değerlerinin tayininde, Shimadzu marka Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi cihazı kullanılmıştır. Sistemde, pompa (LC-20AD), UV-Visible dedektör (SPD-20A), kolon fırını (CTO-20A) ve gaz giderme ünitesi (DGU-20A₃) bulunmaktadır.

Çalışmada, sertralin, sitalopram ve fluvoksaminin sıvı kromatografik tayinleri için X Terra C₁₈ (250 mmx4,6 mm ID, 5 µm) (Waters) kolon kullanılmıştır. Bu kolon, bazik bileşiklerin analizi için uygun, pH aralığı geniş (1-12), yeni jenerasyon kolondur ve tekrarlanabilirliği çok iyidir. Bu kromatografik çalışmalar için kolon sıcaklığı 30 °C, akış hızı 1 mL/dakika olarak belirlenmiştir.

3.2.1.2. pH/iyon metre

HPLC mobil fazının pH ölçümlerinde Metleer Toledo MA 235 pH/ İyon 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'ının ayarlanması esnasında sıcaklık 25 °C ± 0,1 °C' de sabit tutulmuştur.

3.2.2. Kullanılan çözeltiler

3.2.2.1. Kromatografik çalışmalar

Kromatografik çalışmada, pK_a değerlerinin tayini yapılan bileşiklerin her biri günlük olarak hazırlanmıştır. Analitik saflıkta temin edilen bileşiklerin her birinden 0,0010 g, 10 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. Her bir bileşik için üçer kez enjeksiyon yapılarak ortalama alıkonma zamanları belirlenmiştir. Protonasyon sabitlerinin tayini için sertralin, sitalopram ve fluvoksamin için %40, 45, 50 ve 55 (h/h) asetonitril-su ikili karışımlarında çalışılmıştır.

% 40 (h/h) Asetonitril-su ikili karışımı

100 mL'lik stok ortam için 60 mL saf su alınmış ve üzerine 40 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Mobil faza pH 6 ile 8 aralığında 25 mM derişimde olacak şekilde H_3PO_4 , pH 8,5 ile 10,5 aralığında 25 mM derişimde olacak şekilde NH_4HCO_3 ilave edilmiştir. % 40 (h/h) asetonitril -su ortamında, çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerlerinde mobil fazlar, 6; 6,5; 7; 7,5; 8 pH aralığında 1 M NaOH' den ilave edilerek, 8,5; 9; 9,5; 10 ve 10,5 pH aralığında derişik NH_3 'den ilave edilerek hazırlanmıştır. Mobil fazlar ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

% 45 (h/h) Asetonitril-su ikili karışımı

100 mL'lik stok ortam için 55 mL saf su alınmış ve üzerine 45 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Mobil faza pH 6 ile 8 aralığında 25 mM derişimde olacak şekilde H_3PO_4 , pH 8,5 ile 10,5 aralığında 25 mM derişimde olacak şekilde NH_4HCO_3 ilave edilmiştir. % 45 (h/h) asetonitril -su ortamında, çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerlerinde mobil fazlar, 6; 6,5; 7; 7,5; 8 pH aralığında 1 M NaOH' den ilave edilerek, 8,5; 9; 9,5; 10 ve 10,5 pH

aralığında derişik NH_3 'den ilave edilerek hazırlanmıştır. Mobil fazlar ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

% 50 (h/h) Asetonitril-su ikili karışımı

100 mL'lik stok ortam için 50 mL saf su alınmış ve üzerine 50 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiliyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Mobil faza pH 6 ile 8 aralığında 25 mM derişimde olacak şekilde H_3PO_4 , pH 8,5 ile 10,5 aralığında 25 mM derişimde olacak şekilde NH_4HCO_3 ilave edilmiştir. % 50 (h/h) asetonitril -su ortamında, çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerlerinde mobil fazlar, 6; 6,5; 7; 7,5; 8 pH aralığında 1 M NaOH' den ilave edilerek, 8,5; 9; 9,5; 10 ve 10,5 pH aralığında derişik NH_3 'den ilave edilerek hazırlanmıştır. Mobil fazlar ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

% 55 (h/h) Asetonitril-su ikili karışımı

100 mL'lik stok ortam için 45 mL saf su alınmış ve üzerine 55 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiliyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Mobil faza pH 6 ile 8 aralığında 25 mM derişimde olacak şekilde H_3PO_4 , pH 8,5 ile 10,5 aralığında 25 mM derişimde olacak şekilde NH_4HCO_3 ilave edilmiştir. % 55 (h/h) asetonitril -su ortamında, çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerlerinde mobil fazlar, 6; 6,5; 7; 7,5; 8 pH aralığında 1 M NaOH' den ilave edilerek, 8,5; 9; 9,5; 10 ve 10,5 pH aralığında derişik NH_3 'den ilave edilerek hazırlanmıştır. Mobil fazlar ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

Urasil çözeltisi

Çalışılan koşullarda kapasite faktörlerinin belirlenmesi için kullanılan urasil çözeltisi, derişimi %0,01 (a/h) olacak şekilde suda hazırlanmıştır. Urasilin hazırlanan bu çözeltisinden 20 μL enjekte edilerek kolonda tutunmayan türe özgü t_0 alıkonma zamanı belirlenmiştir. Çalışma dalga boyu, 210 nm'dir.

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. Çalışmalarda gerekli çözeltiler, kullanılacakları gün hazırlanmışlardır.

Tez Kapsamında çalışılan ilaçların çözeltisi

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

Tablet numune çalışması

Sertralin, sitalopram ve fluvoksaminin ilaç formülasyonlarında kantitatif tayinini yapabilmek amacıyla 10 tablet ezilmiş ve 1 tablete eşdeğer miktardaki tablet tozu, 100 mL' lik balon jojeye alınmıştır. Üzerine mobil faz eklenerek ultrasonik banyoda 20 dakika çözünmesi için bekletilmiştir ve hacmine mobil fazla tamamlanmıştır. Hazırlanan çözelti mavi bant süzgeç kağıdından süzölmüş ve her bir bileşiğin kalibrasyon aralığındaki derişimde olacak şekilde süzöntü farklı seyrelme oranlarında hazırlanmıştır.

3.3. Yöntem

3.3.1. Sıvı kromatografik yöntemle tayin

HPLC yöntemi ile protonasyon sabitlerinin tayini farklı derişimlerde asetronitril-su ikili karışımlarında yapılmıştır. pH metre, pH değerleri belirlenirken potasyum hidrojen fitalat çözeltisi ile ayarlanmıştır. pH metrenin kalibrasyonu, kombine pH elektrodu ile 298,15 K referans alınarak yapılmıştır. Elektrot, okunan değerlerin kararlı olabilmesi için çalışılan su-organik çözücü karışımında bekletilmiştir. Her bir ortam için potasyum hidrojen fitalat çözeltisi 0,05 mol/kg derişimde hazırlanmış ve başlangıç potansiyel değeri belirlenmiştir. Farklı derişimlerde kiasetronitril-su ikili karışımlarında mobil faz pH değerleri 6,0-10,5 aralığında olacak şekilde

ayarlanmıştır. Bu ayarlama işlemlerinde tampon aralığı dikkate alınarak 25 mM H_3PO_4 , 25 mM NH_4HCO_3 kullanılmıştır. Bu asit ilavelerinden sonra pH aralığı dikkate alınarak hazırlanan mobil fazlara 1 M NaOH, derişik NH_3 ve ilave edilerek istenen pH değeri sağlanmıştır.

Bilindiğı gibi HPLC çalışmasında kapasite faktörleri, t_0 dikkate alınarak hesaplanır. Sertralin, sitaopram, vefluvoksamin için kapasite faktörlerinin hesaplanmasında kullanılacak t_0 değeri, urasilin sudaki %0,01 (a/h) derişimindeki çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir. Bu çalışmada gerek urasil ve gerekse bileşiklerin alıkonma zamanları, üçer enjeksiyonla ölçümlerin ortalaması alınarak belirlenmiş ve bu değerler yardımıyla kapasite faktörleri (k) hesaplanmıştır.

3.3.2. Çalışılan bileşiklerin ayrılmaları için optimum koşulun belirlenmesi

X terra C18 kolonla farklı asetonitril-su ikili karışımlarında her bir bileşik için farklı pH koşullarında alıkonma zamanları belirlenmiştir. Bu veriler kullanılarak bileşiklerin kapasite faktörü değerleri, bileşik çiftleri için seçicilik faktörü ve ayırma gücü değerleri hesaplanmıştır.

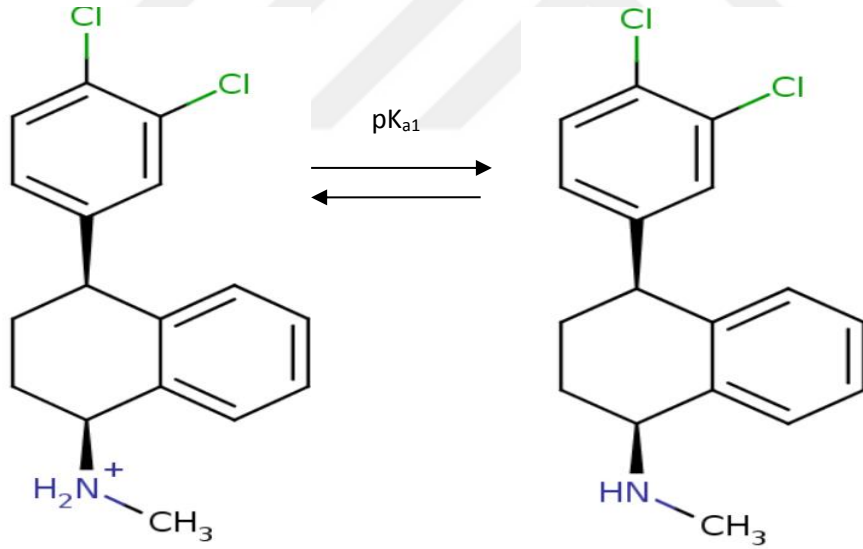
4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Sertralin, sitalopram ve fluvoksamin bazik özellikteki bileşiklerdir. Yapılan detaylı literatür taramasında, bu tez çalışması için seçilen bileşiklerin HPLC yöntemiyle protonasyon sabitlerinin tayinine dair herhangi bir veri bulunamamıştır. Bu nedenle, seçilen bileşiklerin iyonlaşan kısımlarına ait pK_a değerleri öncelikle tahmini protonasyon sabiti hesaplayan program, Marvin Sketch ile hesaplanmıştır.

4.1.Sertralinin Protonasyon Sabitinin Tayini

4.1.1. Marvin Sketch programı

Marvin Sketch programı kullanılarak yapılan hesaplamalarda sertralinin yapısında bulunan sekonder amine ait protonasyon sabiti değeri 9,85 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.1) (Marvin Sketch, 2015).

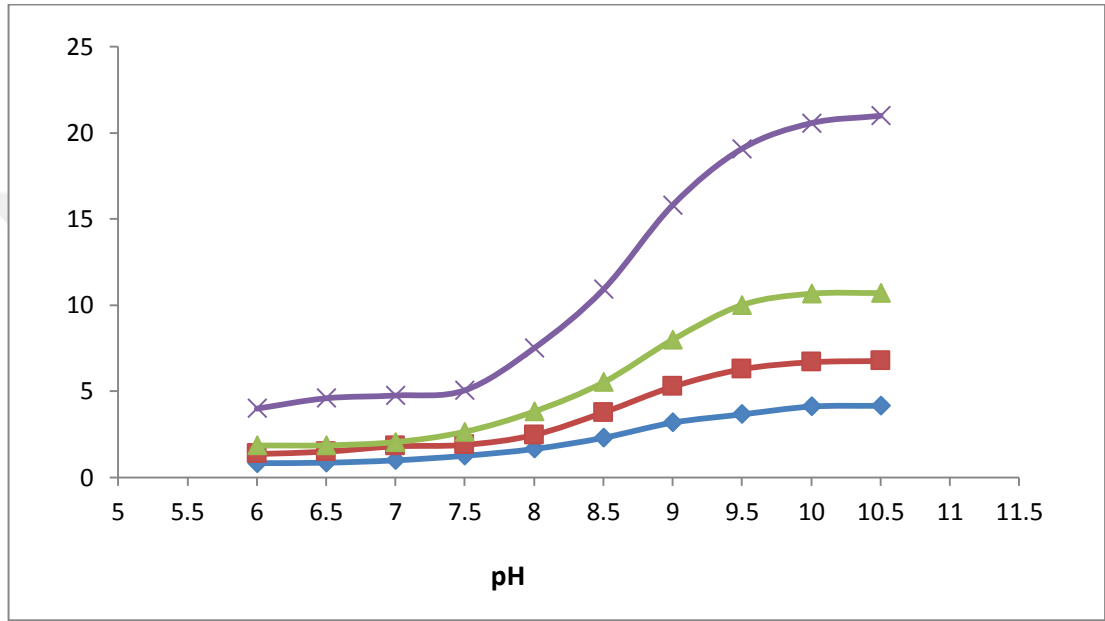


Şekil 4.1. Sertralinin iyonlaşma dengesi

4.1.2. Sıvı Kromatografik Yöntemle Farklı Su-Organik Çözücü İkili Karışımlarında Protonasyon Sabitinin Tayini

Bu tez çalışmasında, sertralin protonasyon sabitinin tayini, %40, 45, 50 ve 55 (h/h) asetonitril-su ikili karışımlarında gerçekleştirilmiştir. %40, %45, %50 ve %55 (h/h) asetonitril-su ortamlarında elde edilen kapasite faktörleri ile hareketli faz pH' sı

arasındaki ilişkiyi gösteren sigmoidal, Şekil 4.2’ de verilmiştir. Her bir asetonitril-su ikili karışımlarında farklı pH değerlerinde (6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5; 10; 10,5) hareketli fazlar hazırlanmıştır. Bileşiğe ait pK_a değerleri, kapasite faktörü ile pH arasındaki non lineer ilişkiyi esas alan NLREG programı kullanılarak hesaplanmıştır (NLREG, 2016). Her bir kapasite faktörünün hesaplanmasında kullanılan kolonda tutulmayan türe ait t_o alıkonma zamanının belirlenmesi için urasil kullanılmıştır.



Şekil 4.2. Sertralinin dört farklı asetonitril-su ortamında elde edilen kapasite faktörü (k)-pH ilişkisi

Sertralin için farklı pH’ larda ve dört koşulda elde edilen kapasite faktörleri Çizelge 4.1’ de verilmiştir.

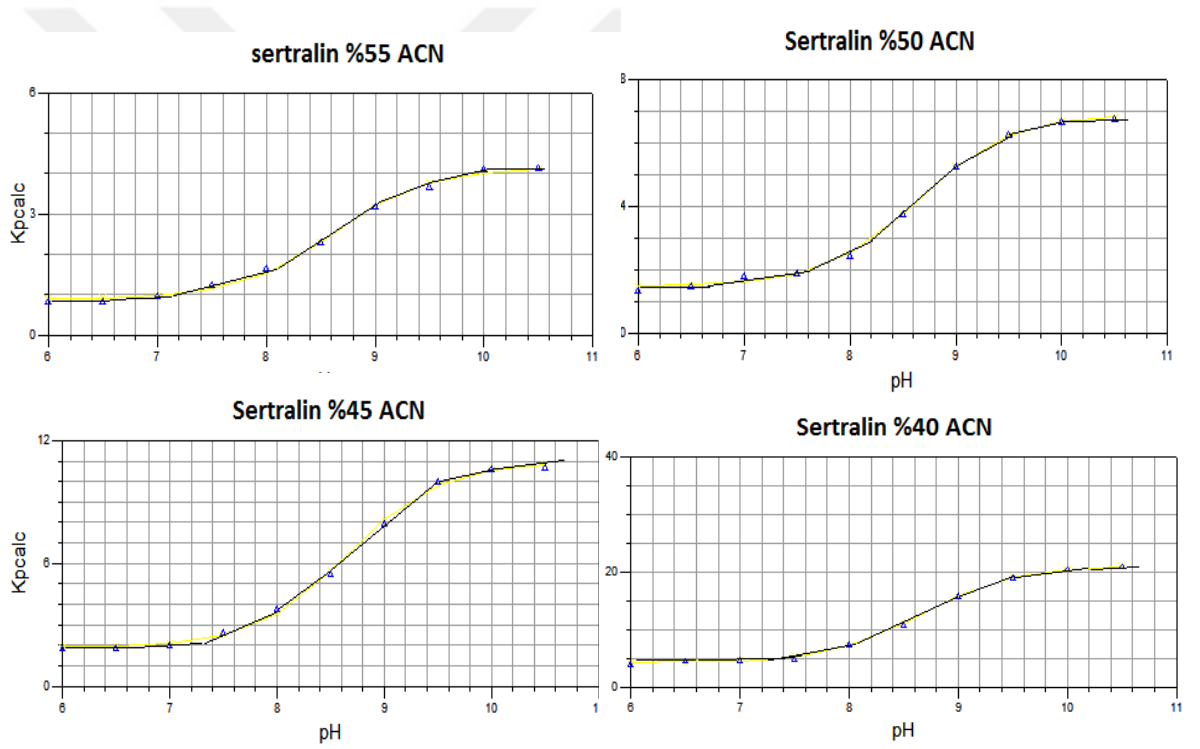
Çizelge 4.1. Sertralinin dört farklı asetonitril-su ortamında elde edilen kapasite faktörü değerleri

	%55	%50	%45	%40
pH	k	k	k	k
6	0,833	1,362	1,859	3,996
6,5	0,859	1,499	1,869	4,598
7	0,995	1,807	2,055	4,759
7,5	1,259	1,893	2,653	5,060

Çizelge 4.2. Sertralinin dört farklı asetonitril-su ortamında elde edilen kapasite faktörü değerleri (Devam)

8	1,653	2,466	3,828	7,500
8,5	2,301	3,768	5,517	10,908
9	3,181	5,266	7,994	15,808
9,5	3,661	6,281	10,009	19,083
10	4,115	6,689	10,669	20,569
10,5	4,163	6,763	10,708	20,998

Sertralinin dört farklı asetonitril-su ikili karışımında pH-k ilişkisini gösteren grafikler NLREG programı kullanılarak da çizilmiştir (Şekil 4.3).

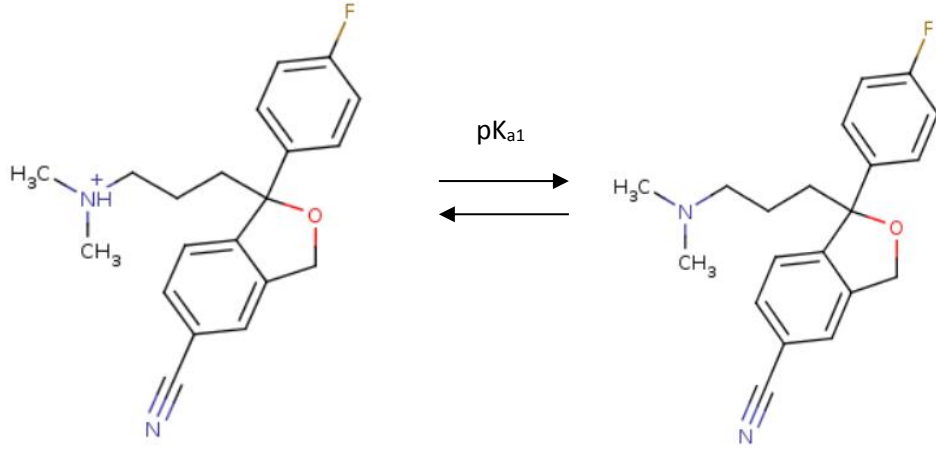


Şekil 4.3. Sertralinin dört farklı asetonitril-su ortamındaki NLREG grafikleri

4.2. Sitalopramın Protonasyon Sabiti Tayini

4.2.1. Marvin Sketch programı

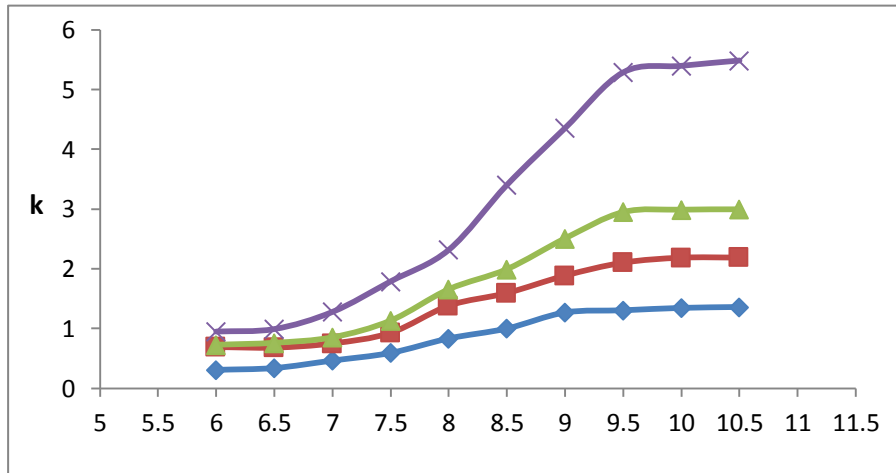
Marvin Sketch program kullanılarak yapılan hesaplamalarda Sitalopramınyapısındaki tersiyer aminin protonasyon sabiti 9,78 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.4) (Marvin Sketch, 2015).



Şekil 4.4. Sitalopramın iyonlaşma dengesi

4.2.2. Sıvı Kromatografik Yöntemle Farklı Su-Organik Çözücü İkili Karışımlarında Protonasyon Sabitinin Tayini

Bu tez çalışmasında, sitalopramın protonasyon sabitinin tayini, %40, 45, 50 ve 55 (h/h) asetonitril-su ikili karışımlarında gerçekleştirilmiştir. %40, %45, %50 ve % 55 asetonitril-su ortamlarında elde edilen kapasite faktörleri ile hareketli faz pH' sı arasındaki ilişkiyi gösteren sigmoidal, Şekil 4.5' de verilmiştir. Her bir asetonitril-su ikili karışımlarında farklı pH değerlerinde (6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5; 10; 10,5) mobil fazlar hazırlanmıştır. Bileşiğe ait pK_a değerleri, kapasite faktörü ile pH arasındaki non lineer ilişkiyi esas alan NLREG programı kullanılarak hesaplanmıştır (NLREG, 2016). Her bir kapasite faktörünün hesaplanmasında kullanılan kolonda tutulmayan türe ait t_0 alıkonma zamanının belirlenmesi için urasil kullanılmıştır.



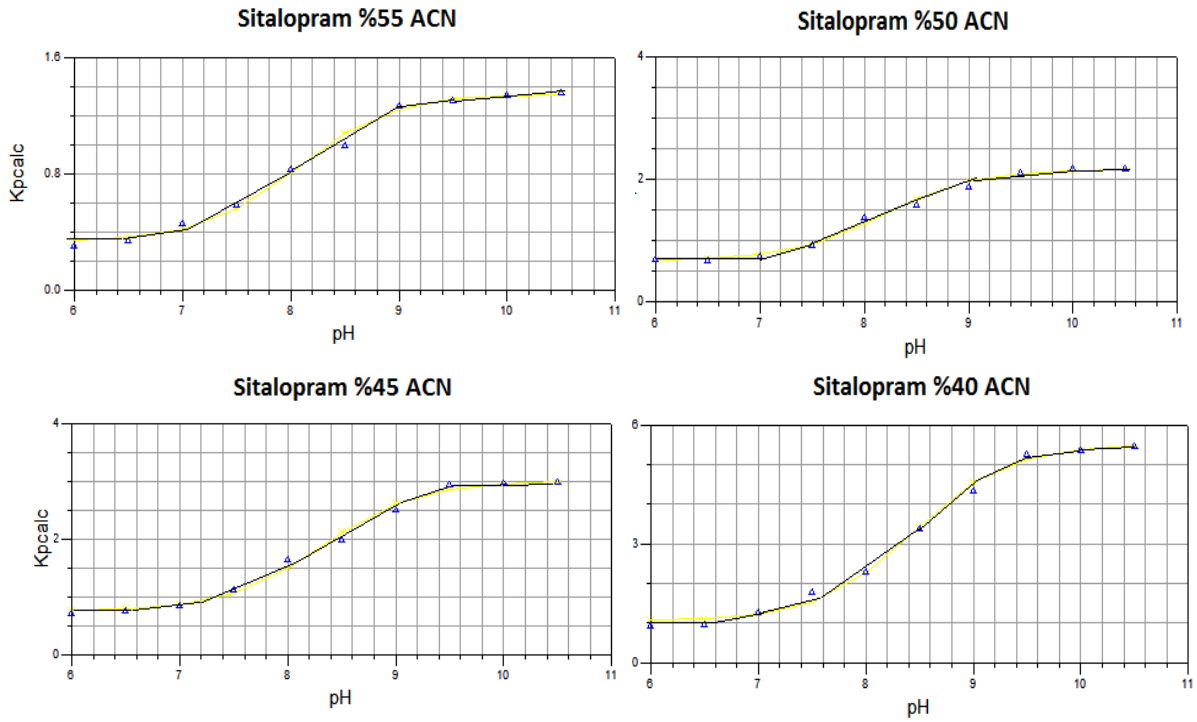
Şekil 4.5. Sitalopramın dörtfarklı asetonitril-su ortamında elde edilen kapasite faktörü (k)-pH ilişkisi

Sitalopram için farklı pH' larda ve dört koşulda elde edilen kapasite faktörleri Çizelge 4.2' de verilmiştir.

Çizelge 4.2. Sitalopramın dört farklı asetonitril-su ortamında elde edilen kapasite faktörleri değerleri

	%55	%50	%45	%40
pH	k	k	k	k
6	0,310	0,692	0,730	0,951
6,5	0,341	0,683	0,763	0,993
7	0,466	0,753	0,855	1,280
7,5	0,594	0,930	1,135	1,790
8	0,836	1,384	1,659	2,318
8,5	1,002	1,595	1,995	3,404
9	1,270	1,887	2,510	4,355
9,5	1,307	2,104	2,950	5,287
10	1,347	2,187	2,990	5,397
10,5	1,362	2,189	2,996	5,486

Sitalopramın dört farklı asetonitril-su ikili karışımında pH-k ilişkisini gösteren grafikler NLREG programı kullanılarak da çizilmiştir (Şekil 4.6).

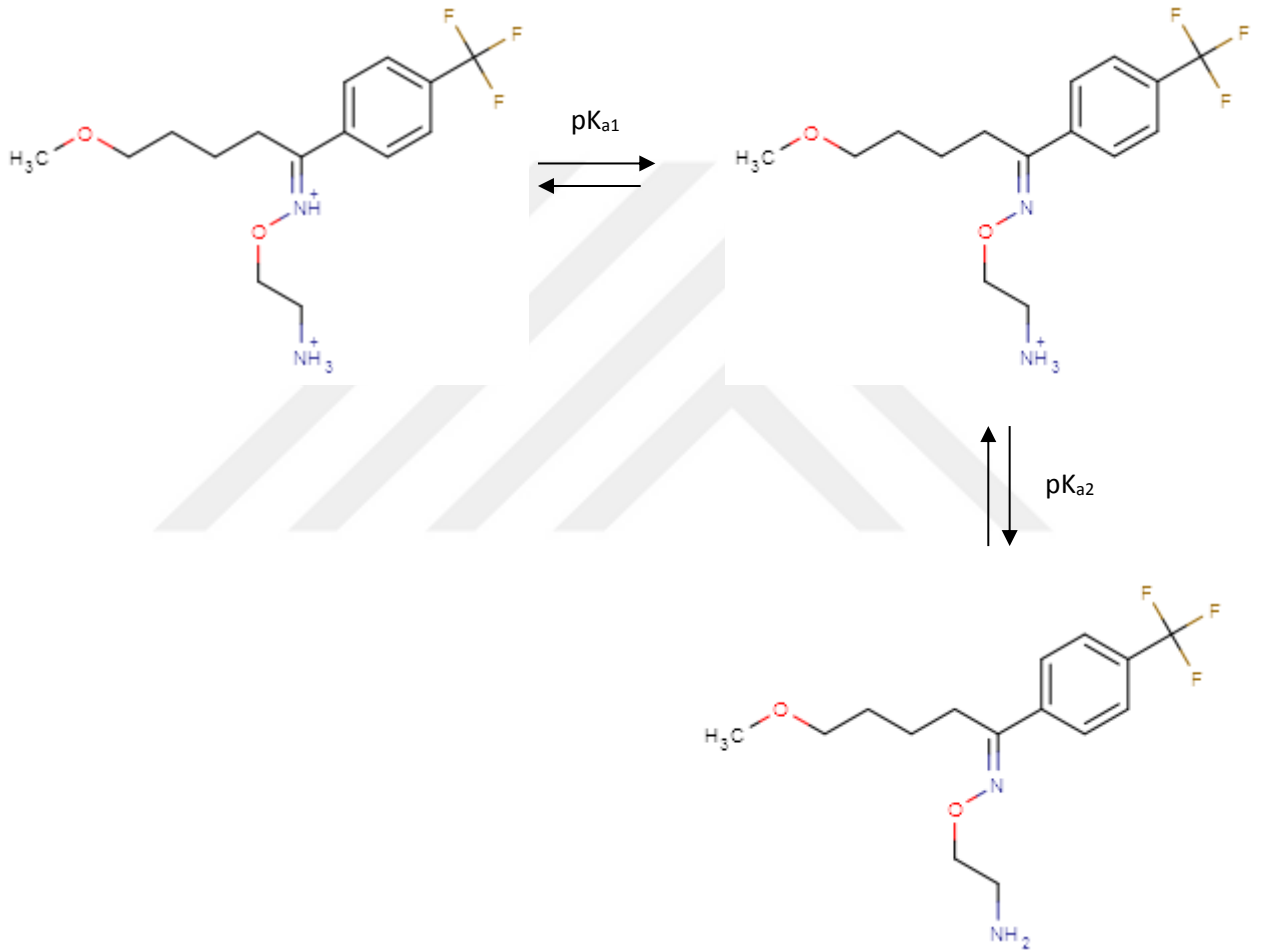


Şekil 4.6. Sitalopramın dört farklı asetonitril-su ortamındaki NLREG grafikleri

4.3. Fluvoksaminin Protonasyon Sabiti Tayini

4.3.1. Marvin Sketch programı

Marvin Sketch programı kullanılarak yapılan hesaplamalarda fluvoksaminin yapısında bulunan azot grubuna ait protonasyon sabiti değeri 1,52; primer amine ait protonasyon sabiti değeri 9,16 olarak belirlenmiştir (Şekil 4.7) (Marvin Sketch, 2015).

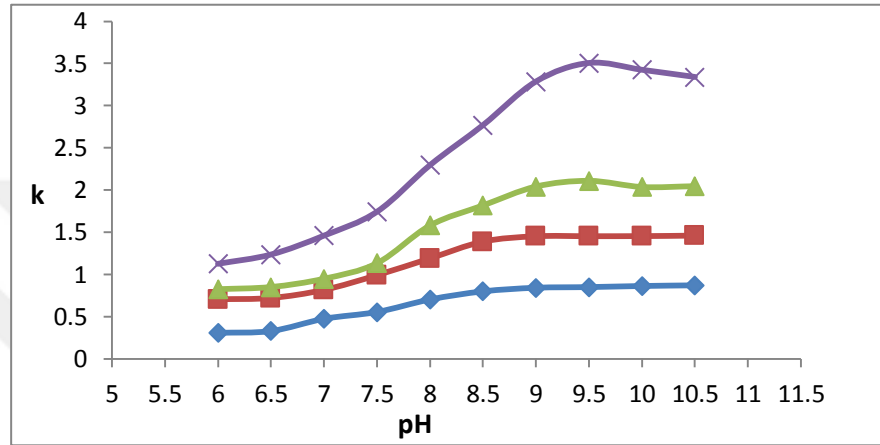


Şekil 4.7. Fluvoksaminin iyonlaşma dengesi

4.3.2. Sıvı Kromatografik Yöntemle Farklı Su-Organik Çözücü İkili Karışımlarında Protonasyon Sabitinin Tayini

Bu tez çalışmasında, fluvoksaminin protonasyon sabitinin tayini, % 40, 45, 50 ve 55 (h/h) asetonitril-su ikili karışımlarında gerçekleştirilmiştir. %40, %45, %50 ve %55

(h/h) asetonitril-su ortamlarında elde edilen kapasite faktörleri ile hareketli faz pH' sı arasındaki ilişkiyi gösteren sigmoidal Şekil 4.8' de verilmiştir. Her bir asetonitril-su ikili karışımlarında farklı pH değerlerinde (6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9; 9,5; 10; 10,5) hareketli fazlar hazırlanmıştır. Bileşiğe ait pK_a değerleri, kapasite faktörü ile pH arasındaki non lineer ilişkiyi esas alan NLREG programı kullanılarak hesaplanmıştır (NLREG, 2016). Her bir kapasite faktörünün hesaplanmasında kullanılan kolonda tutulmayan türe ait t_o alıkonma zamanının belirlenmesi için urasil kullanılmıştır.



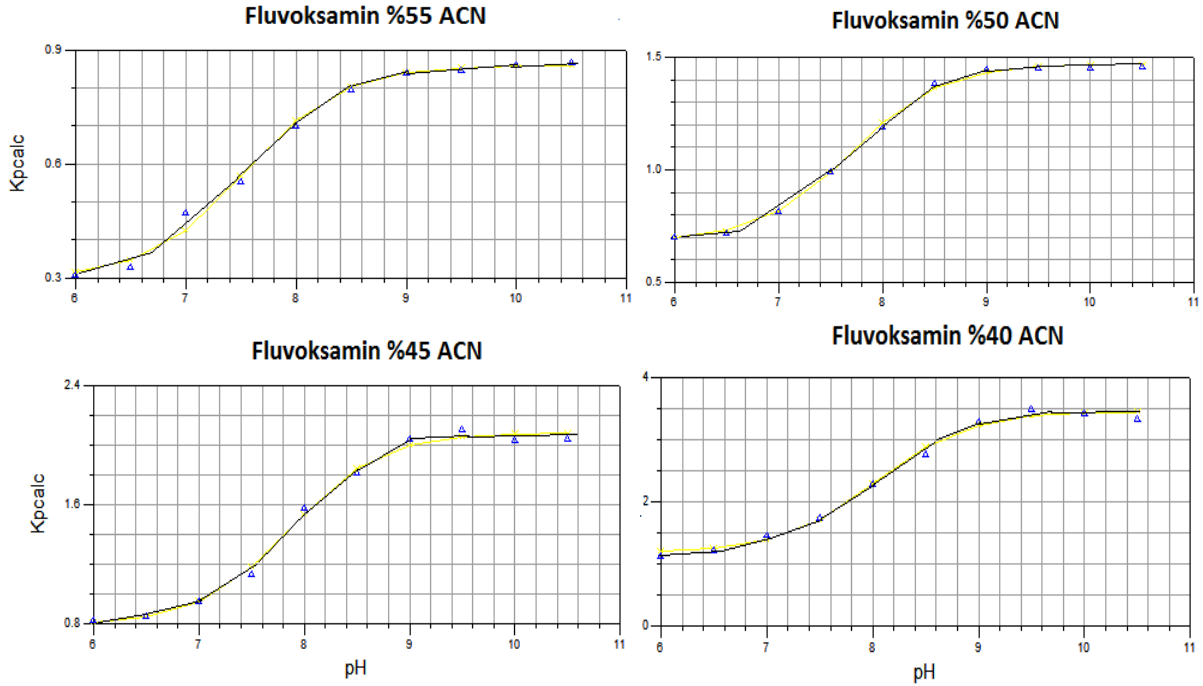
Şekil 4.8. Fluvoksaminin dört farklı asetonitril-su ortamında elde edilen kapasite faktörü (k)-pH ilişkisi

Fluvoksamin için farklı pH' larda ve dört koşulda elde edilen kapasite faktörleri Çizelge 4.3' de verilmiştir.

Çizelge 4.3. Fluvoksaminin dört farklı asetonitril-su ortamında elde edilen kapasite faktörleri değerleri

	%55	%50	%45	%40
pH	k	k	k	k
6	0,308	0,706	0,825	1,126
6,5	0,329	0,721	0,851	1,236
7	0,474	0,817	0,949	1,460
7,5	0,555	0,991	1,133	1,743
8	0,703	1,190	1,580	2,295
8,5	0,799	1,389	1,817	2,769
9	0,842	1,452	2,041	3,286
9,5	0,850	1,453	2,109	3,506
10	0,863	1,454	2,036	3,425
10,5	0,871	1,460	2,046	3,340

Fluvoksaminin dört farklı asetonitril-su ikili karışımında pH-k ilişkisini gösteren grafikler NLREG programı kullanılarak da çizilmiştir (Şekil 4.9).



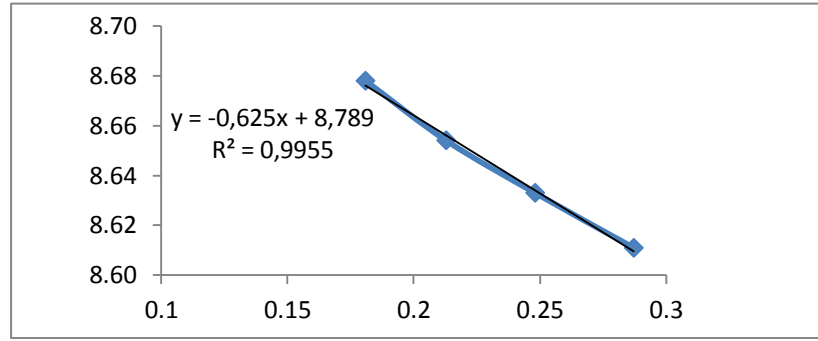
Şekil 4.9. Fluvoksaminin dört farklı asetonitril-su ortamındaki NLREG grafikleri

4.4. Tez Kapsamında Seçilen Bileşiklerin Su Ortamındaki pK_a Değerlerinin Tayini

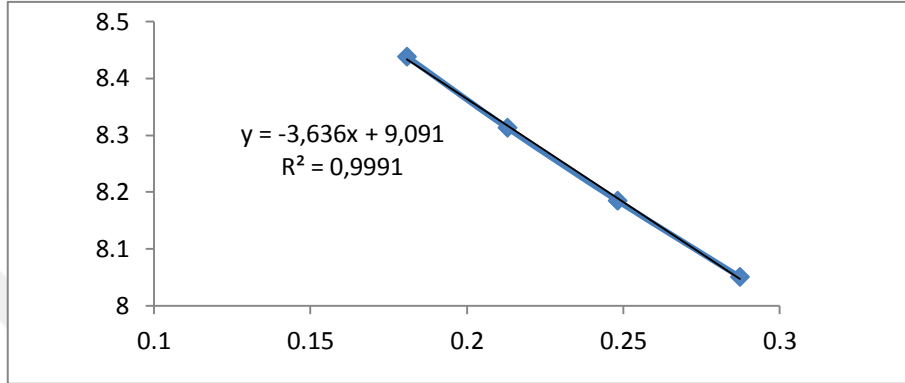
Bu tez kapsamında seçilen bileşikler suda çözünürlüğü az olan hidrofobik bileşiklerdir. Bu yüzden bu bileşiklerin % 100 su ortamında protonasyon sabitlerinin tayin edilmesi mümkün değildir. Günümüzde literatürlerde çok sık kullanılan iki farklı yaklaşımla seçilen bu ilaçların su ortamındaki pK_a değerleri belirlenmiştir.

4.4.1. Mol kesri-pK_a yöntemi

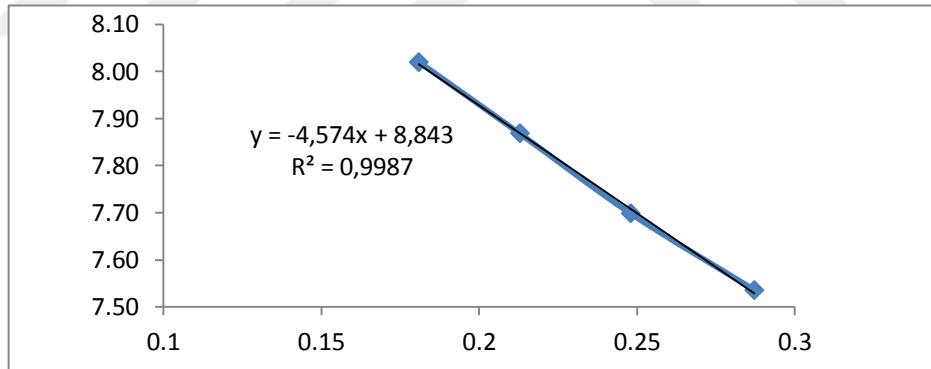
Bu yöntem kullanılarak, sertralin, sitalopram ve fluvoksamin için % 40, % 45, % 50 ve % 55 (h/h) asetonitril- su ikili karışımlarında, mol kesri (X) değerlerine karşı NLREG programı kullanılarak bu ortamlar için hesaplanan pK_a değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen bağıntıların kesim noktalarından sudaki pK_a degerleri belirlenmiştir. Sertralin için elde edilen grafik Şekil 4. 10' da, sitalopram için elde edilen grafik, Şekil 4.11'de, fluvoksamin için elde edilen grafik Şekil 4.12'de verilmiştir.



Şekil 4.10. Sertralinin mol Kesri- pK_a yöntemiyle sudaki pK_a değerinin hesaplanması



Şekil 4.11. Sitalopramın mol Kesri- pK_a yöntemiyle sudaki pK_a değerinin hesaplanması

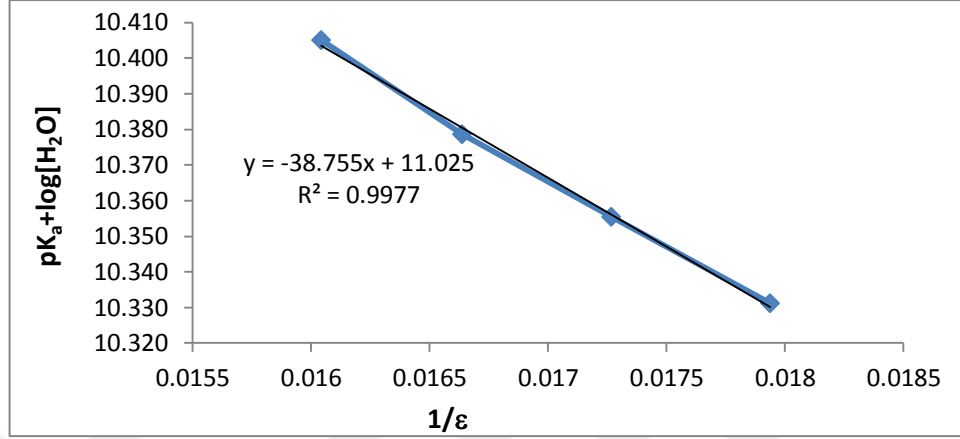


Şekil 4.12. Fluvoksaminin mol Kesri- pK_a yöntemiyle sudaki pK_a değerinin hesaplanması

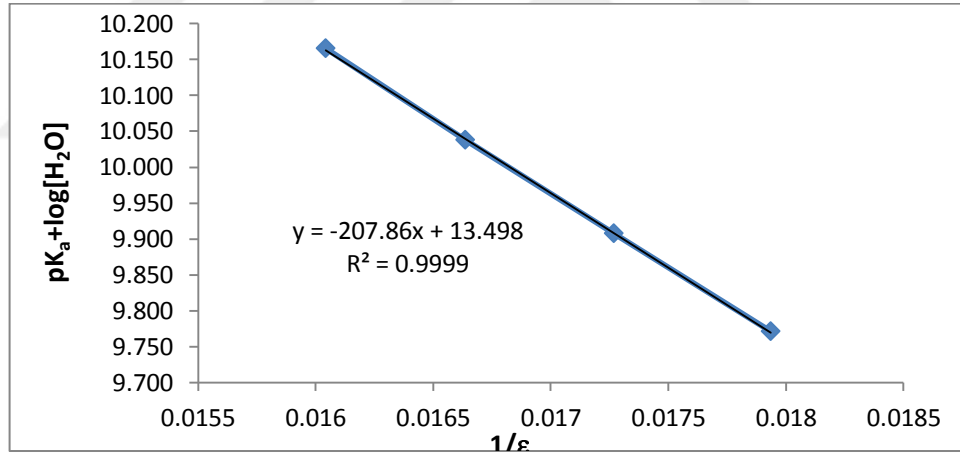
4.4.2. Yasuda-Shedlovsky metodu

Yasuda- Shedlovsky metoduyla, sertraline, sitalopram ve fluvoksamin için %40, %45, %50 ve %55 (h/h) asetonitril- su ortamlarındaki $1/\epsilon$ değerlerine karşı $\log[H_2O] + pK_a$ değerlerinin grafiğe geçirilmesiyle elde edilen bağıntıdan sudaki pK_a değerleri

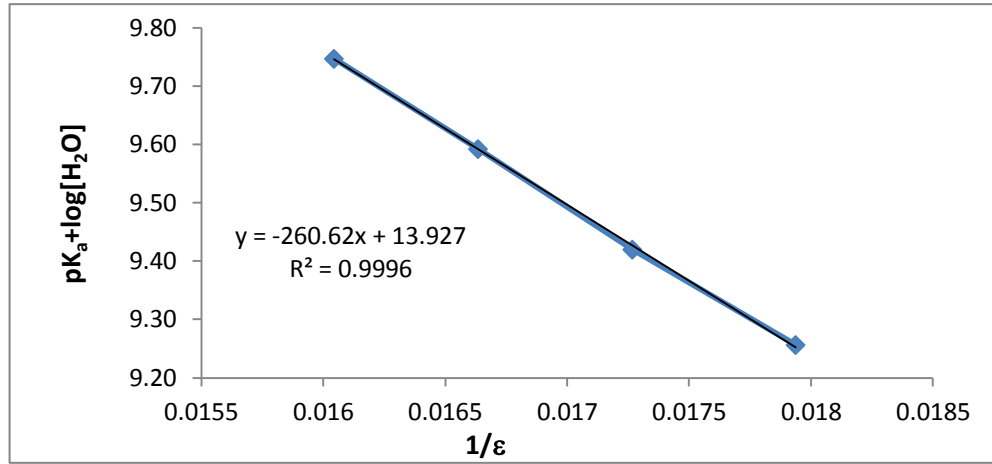
hesaplanmıştır. Elde edilen lineer eşitlikler sertralin için, Şekil 4.13' de, sitalopram için, Şekil 4.14' de, fluvoksamin için, Şekil 4.15' de verilmiştir.



Şekil 4.13. Sertralinin Yasuda-Shedlovsky yöntemiyle sudaki pK_a değerinin hesaplanması



Şekil 4.14. Sitalopramın Yasuda-Shedlovsky yöntemiyle sudaki pK_a değerinin hesaplanması



Şekil 4.15. Fluvoksaminin Yasuda-Shedlovsky yöntemiyle sudaki pK_a değerinin hesaplanması

Yukarıda hesaplanan bağıntılarda x yerine suyun $1/\epsilon$ değeri (1/78,3) konularak y değeri ($\log [H_2O] + pK_{su}$) hesaplanmıştır. y değerinden $\log[H_2O]$ ($\log 55,5=1,744$) değeri çıkarılarak her bir bileşik için pK_{su} değeri hesaplanmıştır.

4.5. Kromatografik Ayırmanın Optimizasyonu

Bu çalışmada depresyon tedavisinde yaygın kullanılan sertralin, sitalopram ve fluvoksamin dört farklı derişimde asetonitril-su ikili karışımlarındaki pK_a değerlerinin tayini ters faz sıvı sıvı kromatografi yöntemiyle gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin pik simetrisi ve alıkonma davranışları incelendiğinde sertralin, sitalopram ve fluvoksamin için pH aralığı geniş (1-12), yeni jenerasyon X Terra C18 (250mm x 4,6 mm ID, 5 μm) (Waters) end-capped kolon tercih edilmiştir. Bu tez çalışmasında bileşiklerin alıkonma zamanları ve pik simetrisi göz önüne alınarak mobil faz organik modifiyeri olarak asetonitril tercih edilmiştir.

Kromatografik ayırmada piklerin birbirinden ayrılabilmesi için kapasite faktörü değerinin 1 ve 1' den büyük olması, α değerinin 1,15 olması, R_s değerinin 2 ve daha büyük olması gerekmektedir. Bu tez çalışmasında, farklı organik modifiyer derişimlerinde ve farklı pH' larda elde edilen kromatografik veriler kullanılarak bileşiklerin ayırımında optimum koşul belirlenmiştir. Numune çalışması için sertralin, sitalopram ve fluvoksaminin protonasyon sabitlerinin tayini çalışmalarından elde

edilen bütün koşullar incelendiğinde % 50 asetonitril (h/h) ortamında, pH 9,0' da kapasite faktörlerinin 1' den daha büyük olduğu ve bileşik çiftleri için α değerlerinin 1,15' den büyük olduğu belirlenmiştir. Ayrıca her bir bileşik çifti için R_s değerleri 2' den büyüktür.

Bu çalışmada optimum ayırma koşulu belirlendikten sonra bileşiklerin ilaç formülasyonlarında kantitatif analizi için iç standart yöntemi kullanılmıştır. Bunun için bu üç bileşikten ayrılabilen, pik simetrisi oldukça iyi olan yine bir antidepresan olan imipramin iç standart olarak seçilmiştir. Sertralin, sitaloqram, fluvoksamin ve imipramin (IS) için % 50 asetonitril (h/h) pH 9,0 ortamında, üç tekrarlı enjeksiyonlardan elde edilen ayırma gücü değerleri (R_s) Çizelge 4.4' de verilmistir.

Çizelge 4.4. Bileşiklerin % 50 asetonitril (h/h) pH 9,0 ortamında elde edilen kapasite faktörü, seçicilik ve ayırma gücü değerleri

Bileşikler	k_2	α	$k_2/k_2 + 1$	$(\alpha - 1)/\alpha$	$\frac{1}{4}\sqrt{N}$	R_s
Fluvoksamin/sitalopram	1,784	1,246	0,641	0,198	22,020	2,789
Sitalopram/ imipramin(I.S)	3,713	2,082	0,788	0,520	24,477	10,022
İmipramin(I.S)/sertralin	5,130	1,381	0,837	0,276	23,286	5,381

4.6. Numune Çalışması

Geliştirilen yöntemin validasyon çalışmalarında; yöntemin duyarlılık, kesinlik, doğruluk parametreleri incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır (ICH, 1996).

4.6.1. İç standartın belirlenmesi

İç standart, analizde belirli miktarda numuneye, kalibrasyon standartlarına eklenen maddedir. Ayrıca kalibrasyon fonksiyonunun hazırlanmasında ve numune hazırlık işlemlerinde derişimi sabit tutulmaktadır. İç standart uygun seçilirse, hem sistematik hem de rastgele hatalar giderilebilir. Sertralin, sitaloqram, fluvoksaminin analizi sırasında kullanılacak iç standart seçimi için farklı ilaç aktif maddeleri denenmiştir.

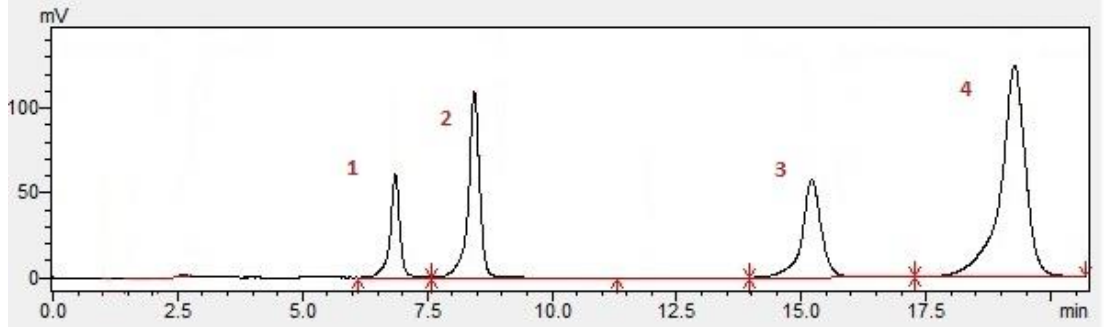
Seçicilik, ayırma gücü ve analiz süresi göz önüne alınarak bileşiklerin analizinde iç standart olarak imipramin seçilmiştir.

4.6.2. Sistem uygunluk testi sonuçları

Sistem Uygunluk Testleri (SUT), Food Drug Administration (FDA) ve United States Pharmacopeia (USP) tarafından önerilen ve sıvı kromatografisi ve diğeri ayırma tekniklerinde yöntem geliştirmenin bir parçasını oluşturan testlerdir. Bu tez çalışmasında sertralin, sitalapram, fluvoksamin için belirlenen optimum koşullarda sistem uygunluk testleri gerçekleştirilmiştir. Belirli derişimlerde hazırlanan çözeltilerin sisteme enjeksiyonundan sonra kromatografik parametreler hesaplanmıştır (izelge 4.5). Sistem uygunluk testinden elde edilen sonucuna göre ayırmanın kromatogramı şekil 4.16' da verilmiştir.

Çizelge 4.5. Bileşikler için sistem uygunluk parametreleri

Parametreler	Fluvoksamin	Sitalopram	İmipramin (IS)	Sertralin	nerilen değeri
t_r	6,553	7,557	12,695	16,592	
Kuyruklanma faktörü	0,950	0,976	1,089	0,982	0,95-1,20
k	1,437	1,798	3,721	5,170	>1
R_s		2,875	9,971	5,455	>2
Tabaka sayısı	6631,992	7950,845	9586,248	8640,986	>2000
Seçicilik faktörü		1,575	1,248	2,212	>1
RSD (tr)	0,216	0,590	0,141	0,885	≤ 1
RSD(alan)	0,872	0,178	0,743	0,455	≤ 1



Şekil 4.16. Standart karışım kromatogramı 1) Fluvoksamin 2) Sitalopram 3) İmipramin (IS) 4) Sertralin

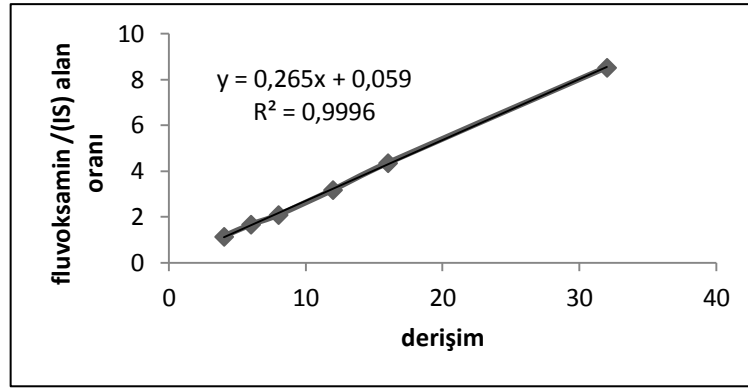
4.6.3. Sertralin, sitalopram, fluvoksaminin ters faz sıvı kromatografi yöntemi ile analizinde metot validasyonu

Geliştirilen yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla validasyon parametrelerine göre test edilmesinde kaynaklarda bildirilen parametreler seçilmiş ve ilgili geçerlilik kriterleri kabul edilmiştir. Bu amaçla, validasyon çalışmalarında; doğrusallık, duyarlılık, kesinlik, geri kazanım, tekrarlanabilirlik parametreleri incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeleri yapılmıştır.

4.6.3.1. Kalibrasyon doğrusu ve duyarlılık

Fluvoksaminin yüksek performans sıvı kromatografisi ile analizi yönteminde doğrusal aralığın ve lineer aralığın saptanmasında fluvoksamin için 4 µg/mL ile 32 µg/mL (Şekil 4.17) arasında farklı derişimlerde çözeltileri hazırlanmıştır.

Kalibrasyon doğrusu, fluvoksaminin her bir derişim değeri için elde edilen pik alanının imipramin (iç standart) pik alanına oranının, fluvoksaminin derişim değerine karşı işaretlenmesiyle oluşturulmuştur. Geliştirilen yöntem fluvoksamin için 4 µg/mL ile 32 µg/mL arasında doğrusaldır. Fluvoksaminin analizi için doğrusal aralık verileri Çizelge 4.6' da verilmiştir.



Şekil 4.17. Fluvoksaminin analizi için doğrusal kalibrasyon fonksiyonu

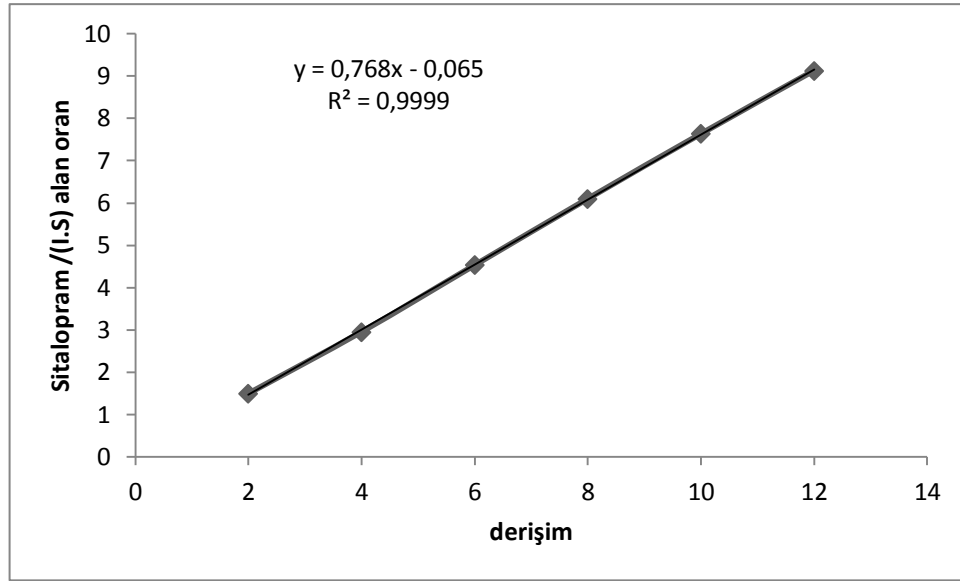
Çizelge 4.6. Fluvoksaminin analizine ait kalibrasyon fonksiyonu özellikleri

Regresyon Denklemi*	$y = 0,265x - 0,059$
Eğimin Standart Hatası	0,003
Kesimin Standart Hatası	0,043
Korelasyon Katsayısı (r)	0,999
Kalibrasyon Aralığı (µg/mL)	4-32
Teşhis Sınırı (µg/mL)	0,773
Tayin Alt Sınırı (µg/mL)	2,343

* $y = bx + a$; x : µg/mL biriminde derişim, y : Fluvoksaminin /iç standart alan oranı

Sitalopramın yüksek performans sıvı kromatografisi ile analizi yönteminde doğrusal aralığın ve lineer aralığın saptanmasında sitalopram için 2 µg/mL ile 12 µg/mL (Şekil 4.18) arasında farklı derişimlerde çözeltileri hazırlanmıştır.

Kalibrasyon doğrusu, sitalopramın her bir derişim değeri için elde edilen pik alanının imipramin (iç standart) pik alanına oranının, sitalopramın derişim değerine karşı işaretlenmesiyle oluşturulmuştur. Geliştirilen yöntem sitalopram için 2 µg/mL ile 12 µg/mL arasında doğrusaldır. Sitalopram analizi için doğrusal aralık verileri Çizelge 4.7' de verilmiştir.



Şekil 4.18. Sitalopramın analizi için doğrusal kalibrasyon fonksiyonu

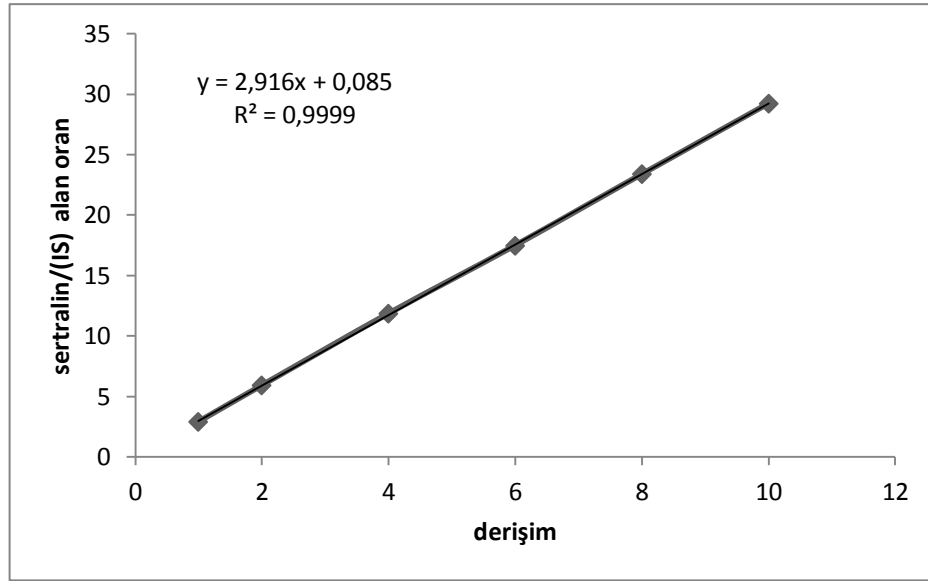
Çizelge 4.7. Sitalopramın analizine ait kalibrasyon fonksiyonu özellikleri

Regresyon Denklemi*	$y = 0,768x - 0,065$
Eğimin Standart Hatası	0,004
Kesimin Standart Hatası	0,032
Korelasyon Katsayısı (r)	0,999
Kalibrasyon Aralığı (µg/mL)	2-12
Teşhis Sınırı (µg/mL)	0,147
Tayin Alt Sınırı (µg/mL)	0,446

* $y = bx + a$; x : µg/mL biriminde derişim, y : Fluvoksaminin /iç standart alan oranı

Sertralinin yüksek performans sıvı kromatografisi ile analizi yönteminde doğrusal aralığın ve lineer aralığın saptanmasında sertralin için 1 µg/mL ile 10 µg/mL (Şekil 4.19) arasında farklı derişimlerde çözeltileri hazırlanmıştır.

Kalibrasyon doğrusu, sertralinin her bir derişim değeri için elde edilen pik alanının imipramin (iç standart) pik alanına oranının, sertralinin derişim değerine karşı işaretlenmesiyle oluşturulmuştur. Geliştirilen yöntem sertralinin için 1 µg/mL ile 10 µg/mL arasında doğrusaldır. Sertralin analizi için doğrusal aralık verileri Çizelge 4.8' de verilmiştir.



Şekil 4.19. Sertralinin analizi için doğrusal kalibrasyon fonksiyonu

Çizelge 4.8. Sertralinin analizine ait kalibrasyon fonksiyonu özellikleri

Regresyon Denklemi*	$y = 2,916x + 0,085$
Eğimin Standart Hatası	0,011
Kesimin Standart Hatası	0,065
Korelasyon Katsayısı (r)	0,999
Kalibrasyon Aralığı (µg/mL)	1-10
Teşhis Sınırı (µg/mL)	0,094
Tayin Alt Sınırı (µg/mL)	0,286

* $y = bx + a$; x : µg/mL biriminde derişim, y : Fluvoksaminin /iç standart alan oranı

4.6.3.2. Doğruluk ve kesinlik

Fluvoksamin, sitalopram ve sertralinin tayini için kesinlik ve doğruluk çalışmaları gün içi ve günler arası değerlendirme sonuçları, Çizelge 4.9, Çizelge 4.10 ve Çizelge 4.11'de verilmiştir.

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

Çizelge 4.9. Fluvoksaminin analiz yöntemine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk analiz bulguları

fluvoksamin	Teorik derişim (µg/mL)	Gün içi derişim ortalaması	% BSS (µg/mL)	Günler arası derişim ortalaması	% BSS (µg/mL)
	6,000	6,136	0,539	6,531	1,641
	16,000	16,036	0,689	16,531	1,013

Çizelge 4.10. Sitalopramın analiz yöntemine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk analiz bulguları

sitalopram	Teorik derişim (µg/mL)	Gün içi derişim ortalaması	% BSS (µg/mL)	Günler arası derişim ortalaması	% BSS (µg/mL)
	4,000	4,051	0,805	3,988	1,438
	10,000	10,070	0,670	9,946	1,494

Çizelge 4.11. Sertralinin analiz yöntemine ait gün içi ve günler arası kesinlik ve doğruluk analiz bulguları

Sertralin	Teorik derişim (µg/ml)	Gün içi derişim ortalaması	% BSS (µg/ml)	Günler arası derişim ortalaması	% BSS (µg/ml)
	2,000	2,016	0,645	2,042	1,397
	8,000	8,090	0,393	8,249	0,737

4.6.3.3. İlaç formülasyonunda geri kazanım çalışması

Sitalopram, fluvoksamin ve sertralinin tayini için geliştirilen yöntem piyasa preparatlarına uygulanmıştır. Fluvoksamin, sitalopram ve sertralini içeren tabletten miktar tayini yapabilmek amacı ile materyal ve metot kısmında anlatıldığı şekilde tablet çözeltileri hazırlanmıştır. Yapılan analiz sonucunda okunan pik alan değerleri ilgili kalibrasyon denkleminde değerlendirilerek tabletlerin içerdiği fluvoksamin, sitalopram ve sertralin miktarları hesaplanmıştır. Tablette bulunan ilaç miktarları Çizelge 4.12' de gösterilmiştir.

Çizelge 4.12. Sitalopram, fluvoksamin, ve sertralin içeren tabletlerin analizine ait bulgular

Numune no	Tablette Bulunan Sitalopram miktarı (mg)	Tablette Bulunan Fluvoksamin miktarı (mg)	Tablette Bulunan Sertralin miktarı (mg)
1	20,489	100,263	49,545
2	20,298	101,199	50,301
3	20,237	98,693	49,912
$X_{ort} \pm GS^*$	20,341 $\pm$ 0,327	100,051 $\pm$ 3,144	49,919 $\pm$ 0,938
SS	0,132	1,266	0,378
% BSS	0,650	1,283	0,757
%Hata	-1,706	-0,052	0,162

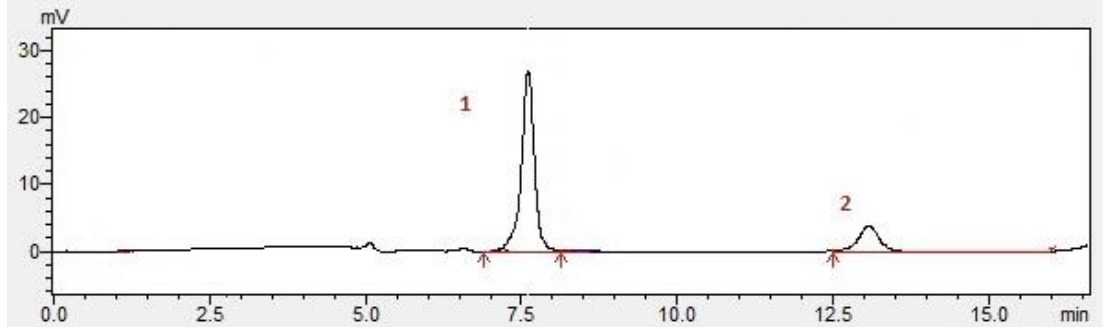
*Güven sınırı

Tablet içerisinde yer alan yardımcı maddelerin analiz yöntemi üzerindeki etkilerini inceleyebilmek için geri kazanım çalışmaları yapılmıştır. Hesaplamalar sonucunda % geri kazanım değerleri hesaplanmıştır. Sonuçlar, Çizelge 4.16' da verilmiştir. Tablet numunelerinin analizini gösteren kromatogramlar ise Şekil 4.20, Şekil 4.21 ve Şekil 4.22' de verilmiştir. Bileşiklerin belirli derişimlerde yapılan katkılı numune analizine ait kromatogramlar ise Şekil 4.23, Şekil 4.24 ve Şekil 4.25' de verilmiştir.

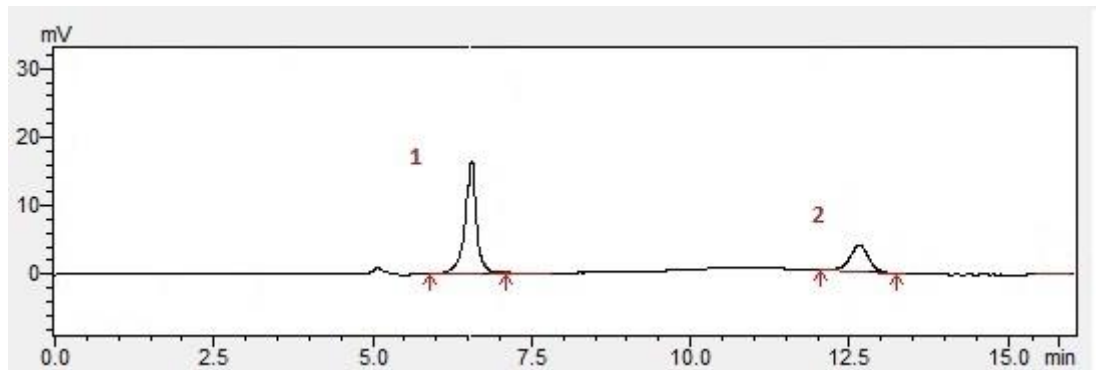
Çizelge 4.13. Sitalopram, fluvoksamin ve sertralin içeren tabletlerin % geri kazanım sonuçları

Numune no	Sitalopram % geri kazanım	Fluvoksamin % geri kazanım	Sertralin % geri kazanım
1	99,167	100,111	100,823
2	100,380	99,935	99,797
3	100,153	101,187	100,125
$X_{ort} \pm GS^*$	99,900 $\pm$ 1,601	100,411 $\pm$ 1,684	100,248 $\pm$ 1,301
SS	0,645	0,678	0,524
% BSS	0,645	0,675	0,522
%Hata	0,100	-0,411	-0,248

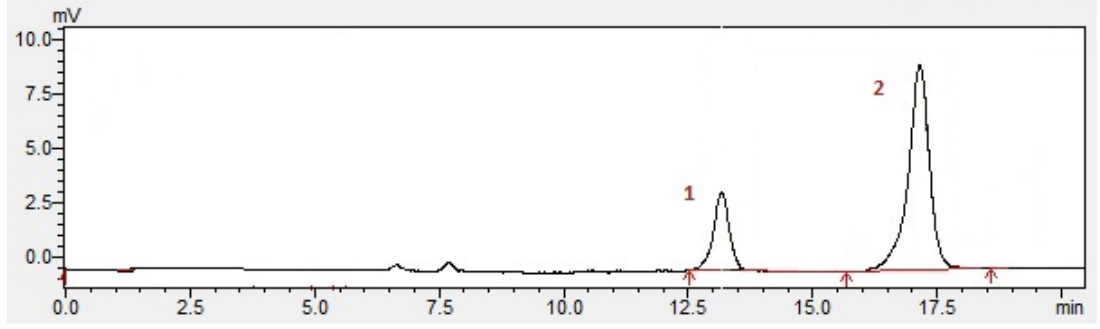
*Güven sınırı



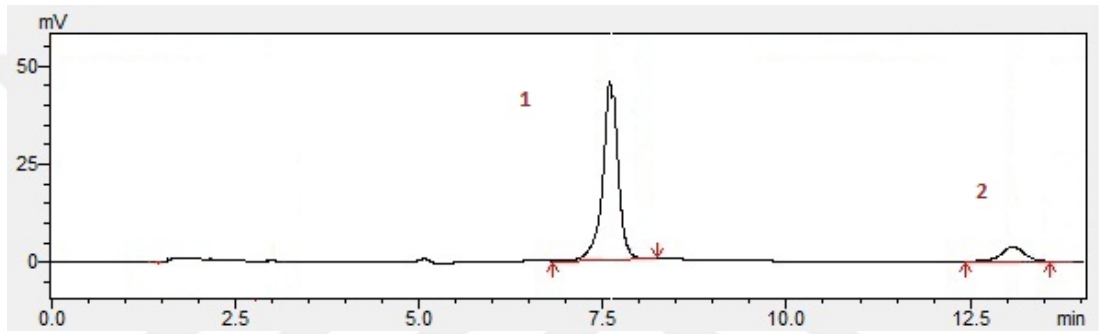
Şekil 4.20. Sitalopram içeren Citol (20 mg) tabletinin analiz yöntemine ait kromatogram; 4 µg/mL sitalopram (1) ve 1 µg/mL derişiminde imipramin (IS) (2)



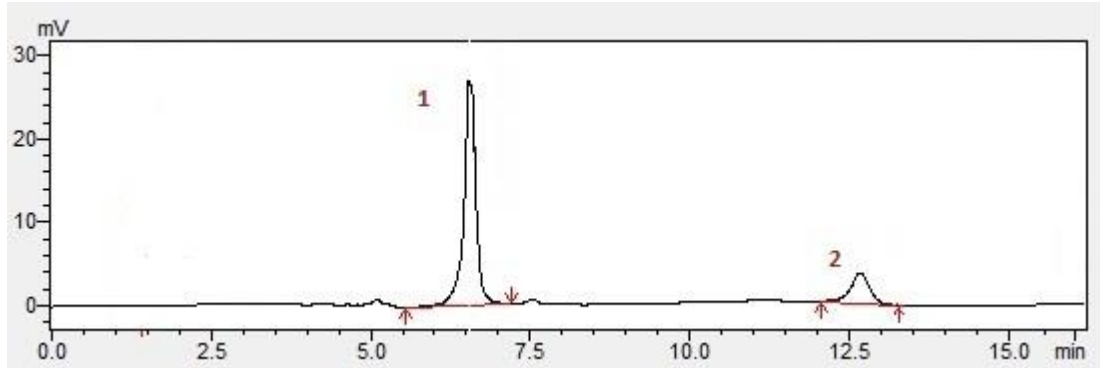
Şekil 4.21. Fluvoksamin içeren Faverin (100 mg) tabletinin analiz yöntemine ait kromatogram; 6 µg/mL fluvoksamin (1) ve 1 µg/mL derişiminde imipramin (IS) (2)



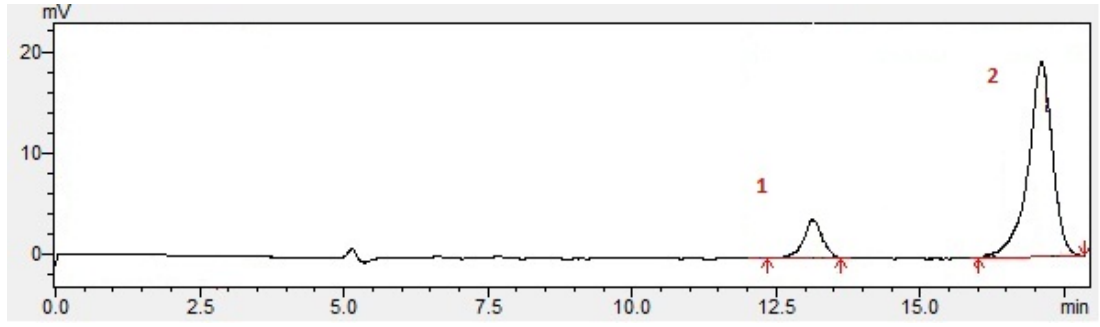
Şekil 4.22. Sertralin içeren Lustral (50 mg) tabletinin analiz yöntemine ait kromatogram; 1 $\mu\text{g/mL}$ derişiminde imipramin (IS) (1) ve 2 $\mu\text{g/mL}$ sertralin (2)



Şekil 4.23. Sitalopram içeren Citol (20 mg) tabletinin katkılı numune analizine ait kromatogramı; 8 $\mu\text{g/mL}$ derişiminde sitalopram (1) ve 1 $\mu\text{g/mL}$ derişiminde imipramin (IS) (2)



Şekil 4.24. Fluvoksamin içeren Faverin (100 mg) tabletinin katkılı numune analizine ait kromatogramı; 12 $\mu\text{g/mL}$ derişiminde fluvoksamin (1) ve 1 $\mu\text{g/mL}$ derişiminde imipramin (IS) (2)



Şekil 4.25. Sertralin içeren Lustral (50 mg) tabletinin katkılı numune analizine ait kromatogramı; 1 µg/mL derişiminde imipramin (IS) (1) ve 4 µg/mL sertralin (2)

5.TARTIŞMA VE SONUÇLAR

Antidepresan ilaçların kullanımı hastaların çoğunda klinik olarak düzelme sağlar. Bu ilaçlar genellikle benzer etkinliğe sahipken yan etki bakımından farklılık gösterirler. Bu tez kapsamında seçilmiş olan seçici serotonin geri alım inhibitörü grubu diğer antidepresanlar içerisinde en çok kullanılan ilaçlardır. Bu ilaçların yan etkileri oldukça azdır ve kısa sürede etkin bir tedavi sağlamaktadır. Bu nedenle en çok tercih edilen ilaç grubudur. Tezin konusu, günümüzde yaygın kullanımı olan ve tayinleri oldukça önemli olan ve halen yeterli bilgi birikimi olmayan serotonin geri alım inhibitörü grubu ilaçlar ile ilgilidir. Konu, kimya alanında çalışan araştırmacılar olduğu kadar tıp ve eczacılık alanlarına yönelik çalışmalar yapan araştırmacıların da ilgisini çekecektir. Sıvı kromatografik yöntemler, günümüzde giderek diğer ayırma yöntemlerinin yerini alan rutin analiz teknikleri haline gelmektedir. Sıvı kromatografik yöntemle tayinde bu bileşiklerin su-organik çözücü ikili karışımlarındaki pK_a değerlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu konuda elde edilecek bilgiler, ilaç aktif maddelerinin ayırma yöntemleri ile tayinlerinde bilgi birikimi oluşmasına yardımcı olacaktır.

Tez kapsamında çalışılan her biri farklı kimyasal özellikteki bileşiklerin kromatografik davranışlarının belirlenmesi için dört farklı derişimde asetonitril-su ikili karışımları kullanılmıştır. Bu tez çalışmasında birinci aşamada depresyon hastalığının tedavisinde kullanılan ilaçlar olan sertralin, sitapram ve fluvoksaminin protonasyon sabitleri, izokratik ters faz sıvı kromatografik yöntem kullanılarak farklı derişimlerdeki asetonitril-su ikili karışımlarındaki kapasite faktörü- pH ilişkisi incelenerek hesaplanmıştır. Deneyisel olarak bulunan bu pK_a değerleri kullanılarak iki farklı yaklaşımla su ortamındaki pK_a değerleri hesaplanmıştır. Bu yöntemde sertralin, sitapram ve fluvoksaminin alıkonma üzerinde pH' nın etkisi yeni jenerasyon kolonlardan ve bazı bileşiklerin analizi için uygun olan X Terra C₁₈ (250 mm, 4,6 mm ID, 5 µm) (Waters) kolon kullanılarak gerçekleştirilmiştir.

Sertralin, sitapram ve fluvoksaminin protonasyon sabitleri, %40, %45, %50 ve %55 (h/h) asetonitril-su ikili karışımlarında ters faz sıvı kromatografi yöntemiyle tayin edilmiştir. Bileşiklerin alıkonmaları, kapasite faktörü (k)-pH grafikleri ile

değerlendirilmiştir. Beklenildiği gibi zayıf monoprotik ve diprotikbaz olan bileşiklere özgü sigmoidal davranış gözlenmiştir. Sertralin için farklı asetonitril oranlarında, NLREG programıyla hesaplanan sekonder amine ait protonasyon sabiti (pK_{a1}) ve türlere ait kapasite faktörü değerleri (k_{BH^+}, k_B) standart sapmalarıyla birlikte verilmiştir (Çizelge 5.1.).

Çizelge 5.1. Sertralin NLREG programıyla hesaplanmış pK_a değerleri ve türlere ait kapasite faktörü değerleri

Ortam	pK_{a1}	k_{BH^+}	k_B
% 40 ACN-H ₂ O	8,678(0,022)*	4,255(0,116)*	21,296(0,156)*
% 45 ACN-H ₂ O	8,654(0,032)*	1,917(0,092)*	10,965(0,122)*
% 50 ACN-H ₂ O	8,633(0,030)*	1,493(0,052)*	6,886(0,068)*
%55 ACN-H ₂ O	8,611(0,049)*	0,910(0,051)*	4,160(0,066)*

* Standart sapma

Sitalopram için farklı asetonitril oranlarında, NLREG programıyla hesaplanan tersiyer amine ait protonasyon sabiti (pK_{a1}) ve türlere ait kapasite faktörü değerleri (k_{BH^+}, k_B) standart sapmalarıyla birlikte verilmiştir (Çizelge 5.2).

Çizelge 5.2. Sitalopram NLREG programıyla hesaplanmış pK_a değerleri ve türlere ait kapasite faktörü değerleri

Ortam	pK_{a1}	k_{BH^+}	k_B
% 40 ACN-H ₂ O	8,439(0,058)*	1,074(0,087)*	5,510(0,099)*
% 45 ACN-H ₂ O	8,313(0,074)*	0,768(0,059)*	3,00(0,062)*
% 50 ACN-H ₂ O	8,185(0,074)*	0,677(0,041)*	2,165(0,039)*
%55 ACN-H ₂ O	8,051(0,071)*	0,338(0,028)*	1,349(0,025)*

* Standart sapma

Fluvoksamin için farklı asetonitril oranlarında, NLREG programıyla hesaplanan primer amine ait protonasyon sabiti (pK_{a2}) ve türlere ait kapasite faktörü değerleri ($k_{BH_2^+}, k_{BH^+}$) standart sapmalarıyla birlikte verilmiştir (Çizelge 5.3).

Çizelge 5.3. Fluvoksamin NLREG programıyla hesaplanmış pK_a değerleri ve türlere ait kapasite faktörü değerleri

Ortam	NLREG pK_{a2}	$k_{BH_2^+}$	k_{BH^+}
% 40 ACN-H ₂ O	8,020(0,066)*	1,180(0,059)*	3,449(0,050)*
% 45 ACN-H ₂ O	7,868(0,055)*	0,794(0,030)*	2,087(0,023)*
% 50 ACN-H ₂ O	7,698(0,034)*	0,683(0,012)*	1,471(0,008)*
%55 ACN-H ₂ O	7,536(0,067)*	0,301(0,018)*	0,860(0,011)*

* Standart sapma

Sudaki ilaçların protonasyon sabitleri, rutin ilaç analizleri için gerekli parametrelerdir. İki farklı yaklaşım kullanılarak mobil faz pK_a ($pK_{a,s}$) değerlerinden sudaki pK_a ($pK_{a,w}$) değerlerine geçilmiştir. Birinci yaklaşım, mol kesri- pK_a' dır. Bu ekstrapolasyon yöntemi kullanılarak, elde edilen lineer eşitliklerin kesim noktalarından su ortamındaki pK_a değerleri tayin edilmiştir (Çizelge 5.4).

Çizelge 5.4. Farklı derişimlerde asetonitril ortamlarındaki deneysel pK_a değerleri ile mol kesri arasındaki lineer eşitlikler

Bileşik	Regresyon denklemi	R ²
Sertralin	y= -0,625x + 8,789	0,996
Sitalopram	y = -3,636x + 9,091	0,999
Fluvoksamin	y = -4,574x + 8,843	0,999

İkinci yaklaşımda, farklı asetonitril yüzdelerindeki deneysel pK_a değerleri, Yasuda-Shedlovsky bağıntısında kullanılmış ve bu yaklaşımla sertralin, sitalopram ve fluvoksaminin sudaki pK_a değerleri hesaplanmıştır (Çizelge 5.5).

Çizelge 5.5. Sertralin, sitalopram ve fluvoksaminin mol kesri, Yasuda-Shedlovsky bağıntısı ve Marvin Sketch programıyla elde edilmiş su ortamındaki pK_a değerleri

Bileşikler	Mol kesri	Yasuda-Shedlovsky	Marvin Sketch
Sertralin	8,789	8,786	9,85
Sitalopram	9,091	9,099	9,78
Fluvoksamin	8,843	8,855	9,16

Tezde ikinci aşamada ise deneysel çalışmalar sonucunda elde edilen kapasite faktörü - pH ilişkisi incelenerek her bir bileşiğin kantitatif tayini için optimum koşul belirlenmiştir ve metot validasyonu çalışması yapılmıştır. LC' de alıkonma üzerinde pH' nın etkisi ve validasyon çalışmaları, yeni jenerasyon kolonlardan X terra C18 (250 mmx4,6 mm ID, 5 μ m) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Her bir bileşiğin kantitatif tayini için optimum koşulun belirlenmesinde gerekli olan şartların (kapasite faktörünün 1-10 arasında, seçicilik katsayısı (α) değerinin 1,15 ve üzerinde ayırma gücü (R_s değerinin 1,5 ve üzerinde) hangi koşulda sağlandığı belirlenmiştir.

Geliştirilen yöntemin sistem uygunluk parametreleri tayin edilmiş ve elde edilen parametreler ışığında yöntemin uygulanabilir olduğu bulunmuştur. Bu yöntemin geçerliliğinin kanıtlanması amacıyla validasyon çalışmasında; doğrusalılık, duyarlılık, kesinlik, geri kazanım, tekrarlanabilirlik vb. parametreler incelenmiş ve istatistiksel değerlendirmeler yapılmıştır. Bu veriler ışığında sertralin, sitalopram ve fluvoksaminin tablette kantitatif tayini iç standart yöntemiyle gerçekleştirilmiştir.

Bu tez konusu üzerinde yapılan detaylı literatür taraması sonucunda bileşiklerin ters faz sıvı kromatografi yöntemiyle protonasyon sabiti tayinine rastlanmamıştır. Elde edilen bu veriler, ters faz sıvı kromatografisi yönteminde analitik prosedürün optimizasyonunda ve ilaçların çözünürlük, absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve eliminasyon gibi fizikokimyasal davranışları hakkında önemli bilgiler sağlayacaktır.

KAYNAKLAR

- Adams, A.I.H., Bergold, A.M., 2001. Assay of Sertraline in Tablets and Drug Substance by Liquid Chromatography. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 26, 505-508.
- Avdeef, A., Box, K.J., Comer, J.E.A., Gilges, M., Hadley, M., Hibbert, C., Patterson, W., Tam, K.Y., 1999. pH Metric log P 11. pK_a Determination of Water Soluble Drugs in Organic Solvent- Water Mixtures. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 20, 631 - 641.
- Babić, S., Horvat, A.J.M., Pavlović, D.M., Kaštelan-Macan, M., 2007. Determination of pK_a Values of Active Pharmaceutical Ingredients. *Trends in Analytical Chemistry*, 26(11), 1043-1061.
- Barbosa, J., Barron, D., Cano, J., Jimenez-Lozano, E., Sanz-Nebot, V., Toro, I., 2001. Evaluation of Electrophoretic Method Versus Chromatographic, Potentiometric and Absorptiometric Methodologies for Determining $pK(a)$ Values of Quinolones in Hydroorganic Mixtures. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24(5-6), 1087-1098.
- Beltran, J.L., Codony, R., Prat, M.D., 1993. Evaluation of Stability Constants from Multiwavelength Absorbance Data: Program STAR. *Analytica Chimica Acta*, 276, 441-454.
- Canbay, H.S., Demiralay, E.C., Alsancak, G., Ozkan, S.A., 2011. Chromatographic Determination of pK_a Values of Some Water-Insoluble Arylpropionic Acids and Arylacetic Acids In Acetonitrile–Water Media. *Journal of Chemical and Engineering Data*, 56(5), 2071-2076.
- Chen, D., Jiang, S., Chen, Y., Hu, Y., 2004. HPLC Determination of Sertraline in Bulk Drug, Tablets and Capsules Using Hydroxypropyl- β -Cyclodextrin as Mobile Phase Additive. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 34, 239-245.
- Daldal, Y.D., Demiralay, E.Ç., Ozkan, S.A., 2016. Effect of Organic Solvent Composition on Dissociation Constants of Some Reversible Acetylcholinesterase Inhibitors. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 27(3), 493-499.
- Demiralay, E.C., Alsancak, G., Ozkan, S.A., 2009. Determination of pK_a Values of Nonsteroidal Antiinflammatory Drug-Oxicams by RP–HPLC and Their Analysis in Pharmaceutical Dosage Forms. *Journal of Separation Science*, 32(17), 2928-2936.
- Demiralay, E.C., Cubuk, B., Alsancak, G., Ozkan, S.A., 2010. Combined Effect of Polarity and pH On The Chromatographic Behaviour of Some Angiotensin II

Receptor Antagonists and Optimization of Their Determination in Pharmaceutical Dosage Forms. J. Pharm. Biomed. Anal., 53, 475-482.

Demiralay, E.C., Koc D., Daldal Y.D., Cakır C., 2012. Determination Of Chromatographic And Spectrophotometric Dissociation Constants Of Some Beta Lactam Antibiotics. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 71, 139– 143.

Gündüz, T., 2010. Kimyacılar için istatistik. Gazi Kitapevi, 292p, Ankara.

Harvey, D., 2000. Modern Analytical Chemistry. McGraw-Hill Companies, 816p, USA.

Hattori, H., Ito, K., Iwai, M., Mizutani, Y., Kumazawa, T., Ishii, A., Suzuki, O., Seno, H., 2007. Rapid Analysis of Sertraline, Fluvoxamine, and Paroxetine in Serum Specimens by LC-MS-MS Using a New Polymer Column. Forensic Toxicology, 25(2), 100-103.

Horvath, C., Melander, W., Molnar, I., 1977. Liquid Chromatography of Ionogenic Substances with Nonpolar Stationary Phases. Analytical Chemistry, 49, 142-154.

International Conference on Harmonization (ICH), 1996. Harmonised Tripartite Guideline Prepared Within The Third International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for The Registration of Pharmaceuticals for Human Use. Text on Validation of Analytical Procedures. Erişim Tarihi: 03.04.2016. <http://www.ifpma.org:ich1.html>.

Juan, H., Zhiling, Z., Huande, L., 2005. Simultaneous determination of fluoxetine, citalopram, paroxetine, venlafaxine in plasma by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography B, 820, 33-39.

Kayaalp, S. O., 2005. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe- Taş Kitapçılık, 198s, Ankara.

Kazakevich, Y., Lobrutto, Y., 2007. HPLC for Pharmaceutical Scientists. Wiley-Interscience, 1135p, Canada, USA.

Kristoffersen, L., Bugge, A., Lundanes, E., Slørdal, L., 1999. Simultaneous determination of citalopram, fluoxetine, paroxetine and their metabolites in plasma and whole blood by high-performance liquid chromatography with ultraviolet and fluorescence detection. Journal of Chromatography B, 734, 229-246.

Mandrioli, R., Saracino, M.A., Ferrari, S., Berardi, D., Kenndler, E., Raggi, M.A., 2006. HPLC analysis of the second-generation antidepressant sertraline and its

main metabolite N-desmethylertraline in human plasma. Journal of Chromatography B, 836, 116-119.

Marvin Sketch Program, 2015. Chemaxon. Erişim Tarihi: 26.06.2015. <http://www.chemaxon.com>

Miller, J., Miller, J., 2008. Analitik Kimyacılar için İstatistik ve Kemometri. Çev. Ahmet Uyanık, İlke Yayınevi, 312s, Ankara.

Mitchell, R. C., Salter, C. J., Tam, K., Y. 1999. Multiwavelength Spectrophotometric Determination of Acid Dissociation Constants. Part III, Resolution of Multiprotic Ionization Systems. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 20, 289 -295.

NLREG Version 4.0. P.H, 2016. Sherrod. Erişim Tarihi: 08.03.2016 <http://www.sandh.com/Sherrod>.

Poole, C.F. and Poole, S.K., 1991. Chromatography Today.Elsevier Science, 1026p, Amsterdam.

Poole, S.K., Patel, S., Dehring, K., Workman, H., Poole, C.F., 2004. Determination of Acid Dissociation Constants by Capillary Electrophoresis. Journal of Chromatography A, 1037(1-2), 445-454.

Riley, C.M., Rosanske, T.W., 1996. Development and Validation of Analytical Methods. Elsevier Science Ltd., 352, New York.

Rosés, M., Bosch, E., 2002. Influence of Mobile Phase Acid–Base Equilibria on The Chromatographic Behaviour of Protolytic Compounds. Journal of Chromatography A, 982, 1–30.

Sanli, S., Sanli, N., Alsancak, G., 2009. Determination of Protonation Constants of Some Tetracycline Antibiotics by Potentiometry and LC Methods in Water and Acetonitrile- Water Binary Mixtures. J. Braz. Chem. Soc., 20, 939-946.

Savcı, V., 2006. Antidepresan İlaçların Farmakolojik Özellikleri. Türkiye Klinikleri Dahili Tıp Bilimleri Dergisi, 2(1), 22-31.

Shedlovsky, T., 1962. The behavior of carboxylic acids in mixed solvents. Pesce B. (Ed), Electrolytes (146-151), Pergamon Press, 455p, NewYork.

Skibiński, R., Misztal, M., 2001. Determination of Moclobemide, Paroxetine, and Fluvoxamine in Tablets by HPLC. Acta Poloniae Pharmaceutica – Drug Research, 58 (2), 97-100.

Skoog, D.A., West, D.M., Holler, F.J., Crouch, S.R., 2011. Analitik Kimya Temel İlkeler.Çev.Kılıç, E., Yılmaz, H., Bilim Yayınları, 1051s, Ankara.

- Soleimani, F., Karimi, R., Gharib, F., 2016. Thermodynamic Studies on Protonation Constant of Acyclovir at Different Ionic Strengths. *Journal of Solution Chemistry*, 45(6), 920-931.
- Souri, E., Donyayi, H., Ahmadkhaniha, R., Barazandeh, M., 2015. A Stability Indicating HPLC Method for the Determination of Fluvoxamine in Pharmaceutical Dosage Forms. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 14(4), 1059.
- Şanlı, S., Şanlı, N., Alsancak, G., 2009. Determination of protonation constants of some tetracycline antibiotics by potentiometry and lc methods in water and acetonitrile-water binary mixtures. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20(5), 939-946.
- 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.
- Ulu, S.T., 2006. Determination and Validation of an LC Method for Fluvoxamine in Tablets. *Chromatographia*, 64, 169-173
- Yasuda, M., 1959. Dissociation Constants of Some Carboxylic Acids in Mixed Aqueous Solvents. *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 32, 429–432.
- Yıldız, A., Genç, Ö., Bektaş, S., 1997. Enstrümental Analiz Yöntemleri. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, A64, 506s, Ankara.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Fatma ÜRER

Doğum Yeri ve Yılı : Balıkesir, 1991

Medeni Hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

E-posta : fatma91urer@hotmail.com



Eğitim Durumu

Lise : Balıkesir Lisesi (Balıkesir), 2009

Lisans : SDÜ, Fen Edebiyat Fakültesi, Kimya Bölümü

Yayınları (SCI ve diğer makaleler)

Daldal, Y.D., Ürer, F., Demiralay, E.Ç., Yılmaz, H., Özkan, S., 2014. Ters Faz Sıvı Kromatografi Yöntemiyle Pirasetamın Protonasyon Sabitinin Tayini. 7. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 1-5 Eylül, Kahramanmaraş.

Ürer, F., Demiralay, E.Ç., Üstün Z., Bazı Seçici Serotonin Gerilim İnhibitörlerinin Protonasyon Sabitlerinin Su-Asetonitril İkili Karışımlarındaki Tayini. 8. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, Süleyman Demirel Üniversitesi, 2016