

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

**ALKİLAMİNO YAN ZİNCİRLİ FENOTİAZİN TÜREVLERİNİN
PROTONASYON SABİTLERİNİN TERS FAZ SIVI
KROMATOĞRAFİK, POTANSİYOMETRİK VE SPEKTROSKOPİK
YÖNTEMLERLE TAYİNİ**

Elif SEKMEN

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


**YÜKSEK LİSANS TEZİ
KİMYA ANABİLİM DALI
ISPARTA - 2015**

© 2015 [Elif SEKMEN]

TEZ ONAYI

Elif SEKMEN tarafından hazırlanan " **ALKİLAMİNO YAN ZİNCİRLİ FENOTİAZİN TÜREVLERİNİN PROTONASYON SABİTLERİNİN TERS FAZ SIVI KROMATOĞRAFİK, POTANSİYOMETRİK VE SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE TAYİNİ** " adlı tez çalışması aşağıdaki jüri üyeleri önünde Süleyman Demirel Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü **Kimya Anabilim Dalı**'nda **YÜKSEK LİSANS TEZİ** olarak başarı ile savunulmuştur.

Danışman **Prof. Dr. A. Güleren ALSANCAK**
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi **Doç. Dr. Ebru Çubuk Demiralay**
Süleyman Demirel Üniversitesi



Jüri Üyesi **Yrd. Doç. Dr. Havva Nilgün Budak**
Süleyman Demirel Üniversitesi

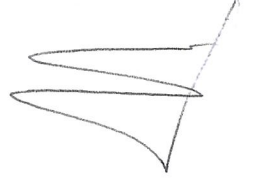


Enstitü Müdürü **Prof.Dr. Ahmet ŞAHİNER**

TAAHHÜTNAME

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

Elif SEKMEN

A handwritten signature in black ink, consisting of several loops and a long horizontal stroke, positioned to the right of the name 'Elif SEKMEN'.

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER.....	ix
ÖZET	xii
TEŞEKKÜR.....	xiv
ŞEKİLLER DİZİNİ	xv
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	xix
1. GİRİŞ	1
1.1. Antipsikotikler.....	1
1.2. Antipsikotiklerin Sınıflandırılması.....	2
1.3. Fenotiazinler	2
1.4. Kimyasal Özellikler ve Yapı Aktivite İlişkileri	4
1.5. İyonlaşma Sabiti Tayini.....	6
1.6. Su-Organik Çözücü İkili Karışımlarında İyonlaşma Sabitleri Tayini.....	7
1.7. Potansiyometrik Analiz Yöntemleri	7
1.7.1. Cam Elektrot.....	7
1.7.2. Potansiyometrik Titrasyon	8
1.8. Spektrofotometrik Yöntemle İyonlaşma Sabiti Tayini	9
1.9. Ters Faz Sıvı Kromatografisi.....	11
1.9.1. Kromatografide Temel Parametreler	12
1.9.1.1. Kapasite faktörü (Alıkonma faktörü)	13
1.9.1.2. Seçicilik, α	14
1.9.1.3. Teorik tabaka sayısı, N	14
1.9.1.4. Ayırma gücü, R_s	15
1.9.2. Sıvı Kromatografi Yöntemiyle İyonlaşma Sabiti Tayini	16
1.9.3. Kromatografide Horváth – Melander Bağlılıkları	17
1.9.4. Sıvı Kromatografide Mobil Faz Optimizasyonu	19
1.9.5. HPLC ayırmalarında mobil faz pH' sının etkisi	21
1.10. Yasuda-Shedlovsky Bağlılığı İle Su Ortamındaki pK_a Değerlerinin Belirlenmesi.....	25
1.11. Mol kesri- pK_a İlişkisi İle Su Ortamındaki pK_a Değerlerinin Belirlenmesi.....	25
1.12. n bar Yöntemi İle pK_a Değerlerinin Belirlenmesi.....	27
1.13. Henderson Hasselbalch Yöntemi İle pK_a Değerlerinin Belirlenmesi.....	28
2. KAYNAK ÖZETLERİ.....	29
3. MATERYAL VE YÖNTEM	37
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler	37
3.2. Potansiyometrik Titrasyonlar	39
3.2.1. Potansiyometrik titrasyonlarda kullanılan cihazlar	39
3.3. Spektroskopik Titrasyonlar	41
3.3.1. Spektroskopik titrasyonlarda kullanılan cihazlar.....	41
3.3.2. Spektroskopik yöntemle pK_a tayininde kullanılan çözeltiler	41
3.4. Kromatografik Çalışmalar	42
3.4.1. Yüksek performans sıvı kromatografisi cihazı.....	42
3.4.2. pH/iyon metre	43
3.4.3. Kullanılan çözeltiler.....	43
3.4.3.1. pK_a tayininde kullanılan fenotiazin çözeltileri	43
4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA.....	46
4.1. Alkilamino Fenotiazinlerin Lipinski Kurallarına Uygunlukları	46

4.2. Fenotiazinlerin Marvin Sketch, ACD/Lab ve Pallas Programı ile Hesaplanan Protonasyon Sabitleri	47
4.2.1. Promazinin protonasyon sabitleri	47
4.2.2. Prometazinin protonasyon sabitlerinin tayini	48
4.2.3. Klorpromazinin protonasyon sabitlerinin tayini	49
4.2.4. Triflupromazinin protonasyon sabitlerinin tayini	50
4.3. Fenotiazinlerin Sıvı Kromatografi Yöntemiyle İyonlaşma Sabiti Tayini	51
4.3.1. Promazinin sıvı kromatografi yöntemiyle protonasyon sabiti tayini .	52
4.3.2. Prometazinin sıvı kromatografi yöntemiyle protonasyon sabiti tayini.....	55
4.3.3. Klorpromazinin sıvı kromatografi yöntemiyle protonasyon sabiti tayini.....	58
4.3.4. Triflupromazinin sıvı kromatografi yöntemiyle protonasyon sabiti tayini.....	61
4.4. Fenotiazinlerin Protonasyon Sabitlerinin Potansiyometrik Yöntemle Tayini	64
4.4.1. Promazinin %35 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon verileri ve grafikleri	64
4.4.2. Promazinin % 40 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon verileri ve grafikleri	66
4.4.3. Promazinin % 45 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon verileri ve grafikleri	68
4.4.4. Promazinin % 50 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon verileri ve grafikleri	69
4.4.5. Klorpromazinin % 35 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon verileri ve grafikleri	71
4.4.6. Klorpromazinin % 40 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon verileri ve grafikleri	72
4.4.7. Klorpromazinin % 45 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon verileri ve grafikleri	73
4.4.8. Klorpromazinin % 50 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon verileri ve grafikleri	75
4.5. Fenotiazinlerin Protonasyon Sabitlerinin Spektroskopik Yöntemle Tayini	76
4.5.1. Promazinin % 35 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki spektrofotometrik titrasyon grafikleri	77
4.5.2. Prometazinin % 35 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki spektrofotometrik titrasyon grafikleri	79
4.5.3. Klorpromazinin % 35 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki spektrofotometrik titrasyon grafikleri	81
4.5.4. Triflupromazinin % 35 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki spektrofotometrik titrasyon grafikleri	83
5. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	85
5.1. Fenotiazinlerin Bilgisayar Programlarıyla Hesaplanan İyonlaşma Sabitleri.....	85
5.2. Fenotiazinlerin Çeşitli Yöntemlerle Hesaplanan Protonasyon Sabitleri.....	86
5.3. Sıvı Kromatografik Yöntem Verileri Kullanılarak Hesaplanan Protonasyon Sabitleri.....	87

5.6. Sonuç.....	92
6. KAYNAKLAR	93
ÖZGEÇMİŞ.....	99

ÖZET

Yüksek Lisans Tezi

ALKİLAMİNO YAN ZİNCİRLİ FENOTİAZİN TÜREVLERİNİN PROTONASYON SABİTLERİNİN TERS FAZ SIVI KROMATOĞRAFİK, POTANSİYOMETRİK VE SPEKTROSKOPİK YÖNTEMLERLE TAYİNİ

Elif SEKMEN

Süleyman Demirel Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Kimya Anabilim Dalı

Danışman: Prof. Dr. A. Güleren ALSANCAK

Antipsikotikler, psikiyatristler tarafından psikotik semptomlarla nitelenen çok farklı klinik bozuklukların tedavisinde sıklıkla kullanılırlar. Fenotiazin bileşikler klinik kimyada antipsikotik ve sakinleştirici olarak yaygın şekilde kullanılan ilaçlardır. Fenotiazinler, azot ve kükürt atomları üzerinden trisiklik sisteme dönüşen iki benzen halkası içeren heterosiklik moleküllerdir. Fenotiazin türevleri, amino alkil yan zinciri içerir ve heterosiklik yapının azot atomuna bağlanarak klinik kimyada tedavi edici olarak önemli rol oynar. Kimyasal yapının fizikokimyasal parametreleri içinde, protonasyon sabiti en önemlilerinden biridir. Protonasyon sabitleri bileşiklerin kromatografik davranışının açıklanması ve tahmini için dağılma katsayıları kadar önemlidir. Bu çalışmada dört fenotiazinin (promazin, klorpromazin, triflupromazin ve prometazin) pK_a değerleri, ACN-su karışımında bu bileşiklerin asit baz denkliliklerine ilişkin bilgi eksikliğini gidermek için UV/pH titrasyon metoduyla ve sıvı kromatografik metotla tayin edilmiştir. Su organik çözücü karışımlarında pK_a değerlerinin tayini için çeşitli teknikler vardır. Sıklıkla, bu ilaçlarda temel zorluk suda çözünmemeleridir ve bu durum spektrofotometrik yöntemlerin kullanımını gerektirir. Bu çalışmada izokratik ters faz sıvı kromatografi metodu pK_a değerlerinin tayini için ikinci yöntem olarak seçilmiştir. Fenotiazinlerin protonasyon sabitleri, kapasite faktörünün mobil fazın pH'sına bağlılığı kullanılarak belirlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fenotiazinler, protonasyon sabitleri, HPLC, potansiyometrik yöntem, spektroskopik yöntem

2015, 100 sayfa

ABSTRACT

M.Sc. Thesis

DETERMINATION OF PROTONATION CONSTANTS OF PHENOTHIAZINE DERIVATIVES HAVING AMINO ALKYL SIDE CHAIN BY USING REVERSED PHASE LIQUID CHROMATOGRAPHIC, POTENTIOMETRIC AND SPECTROSCOPIC METHODS

Elif SEKMEN

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

Supervisor: Prof. Dr. A. Güleren ALSANCAK

Antipsychotics are frequently used by psychiatrists to treat a wide range of very different clinical disorders characterized by psychotic symptoms. Phenothiazine compounds are commonly used in clinical medicine as antipsychotic and tranquilizer drugs. Phenothiazines are heterocyclic molecules containing two benzene rings linked in a tricyclic system through nitrogen and sulfur atoms. Phenothiazine derivatives having amino alkyl side chain and these are connected to the nitrogen atom of heterocyclic unit playing crucial role in medicinal chemistry. Among all of the physicochemical parameters of a chemical entity, the protonation constant is one of the most important values. The protonation constants are just as important as distribution coefficients for predicting and explaining the chromatographic behaviour of the compounds. In this study, pK_a values of four phenothiazines (promazine, chlorpromazine, triflupromazine ve promethazine) was determined in ACN - water mixtures, in order to overcome the lack of information regarding the acid base equilibria of this compounds by means of a UV/pH titration method and liquid chromatographic method. There are a wide range of techniques for determining pK_a values in water organic modifier mixtures. The main difficulty of drugs is their aqueous insolubility and that forces the use of spectrophotometric techniques. In this study isocratic reversed phase liquid chromatographic method was selected as a second method to determine pK_a values. Protonation constants of phenothiazines was determined by using the dependence of the capacity factor on the pH of the mobile phase.

Keywords: Phenothiazines, protonation constant, HPLC, potentiometric method, spectroscopic method.

2015, 100 pages

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince bana bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren, beni özveriyle yetiştiren, desteğini hiçbir zaman esirgemeyerek bu aşamaya gelmemde büyük katkı sağlayan, değerli danışman hocam Prof. Dr. Güleren ALSANCAK' a ve öğrenciliğim süresince beni yönlendiren, yardımını esirgemeyen kıymetli hocam Doç. Dr. Ebru Çubuk DEMİRALAY'a sonsuz saygı ve şükranlarımı sunarım. Tezimin her aşamasında, tüm çalışmalarımda çok büyük emeği olan, desteğini hiçbir zaman eksik etmeyen sevgili yüksek lisans arkadaşım Cansel ÇAKIR' a tüm kalbimle teşekkür ederim. Laboratuvar çalışmalarımda ve tezimin hazırlanmasında yardımlarını esirgemeyen sevgili yüksek lisans arkadaşlarım Sertaç BUDAK' a ve Zehra ÜSTÜN' e çok teşekkür ederim. HPLC deneylerim süresince laboratuvar ve cihaz imkanı sağlayan değerli hocam Prof. Dr. Atif Can SEYDİM'e ve tez jürimde bulunan kıymetli hocam Yrd. Doç. Dr. Havva Nilgün BUDAK ' a çok teşekkür ederim.

3757-YL2-13 No`lu Proje ile tezimi maddi olarak destekleyen Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine teşekkür ederim.

Tezimin gerçekleşmesinde 'Öncelikli Alanlara ve Sanayiye Yönelik Yurt içi Lisansüstü Burs Programı Kapsamında' verdikleri burs ile maddi destek sağlayan TÜBİTAK' a teşekkür ederim.

Varlıkları her daim şükür sebebim olan, haklarını ne yapsam ödeyemeyeceğim, hayatımın her döneminde sevgi, özveri ve anlayışla yanımda olan annem Gülay SEKMEN' e ve babam Haluk SEKMEN' e, hayatıma tat katan, ömrümü paylaştığım biricik yol arkadaşım, kıymetlim Ziya SARI' ya, bugünlere gelmem de çok büyük emekleri olan anneannem Alime PAT ve rahmetli dedem İbrahim PAT' a tüm kalbimle teşekkür ederim. Bana böyle güzel bir hayatı ve ailemi nasip eden, sayısız nimet veren Yüce Allah'a sonsuz şükürler olsun.

Elif SEKMEN
ISPARTA, 2015

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. Fenotiazinlerin genel gösterimi.....	4
Şekil 1.2. Fenotiazinlere bağlanan piperidin, piperazin ve alkil amino yan zincirler.....	5
Şekil 1.3. Kombine cam pH elektrodu.....	8
Şekil 1.4. Spektroskopik bir çalışmada (a) $A - \lambda$ ve (b) log absorbands farkı- pH grafikleri (A_M' : moleküler türün absorbandsı; A_I'' : iyonik türün absorbandsı).....	11
Şekil 1.5. Ters faz sıvı kromatografi yöntemiyle elde edilen kromatogram	13
Şekil 1.6. Ayırma gücünün şematik gösterimi	15
Şekil 1.7. Alıkonma, seçicilik, etkinlik parametrelerinin kromatogram üzerinde gösterimi	16
Şekil 4.1. Promazinin kimyasal yapısı	48
Şekil 4.2. Prometazinin kimyasal yapısı.....	49
Şekil 4.3. Klorpromazinin kimyasal yapısı.....	50
Şekil 4.4. Triflupromazinin kimyasal yapısı	51
Şekil 4.5. Promazinin üç farklı asetonitril-su ortamında elde edilen kapasite faktörü(k)-pH ilişkisi.....	53
Şekil 4.6. Promazinin üç farklı asetonitril ortamındaki protonasyon sabitine ait NLREG grafikleri.....	54
Şekil 4.7. Prometazinin üç farklı asetonitril-su ortamında elde edilen kapasite faktörü(k)-pH ilişkisi.....	55
Şekil 4.8. Prometazinin üç farklı asetonitril ortamındaki protonasyon sabitine ait NLREG grafikleri	57
Şekil 4.9. Klorpromazinin üç farklı asetonitril-su ortamında elde edilen kapasite faktörü(k)-pH ilişkisi.....	58
Şekil 4.10. Klorpromazinin üç farklı asetonitril ortamındaki protonasyon basamağına ait NLREG grafikleri	60
Şekil 4.11. Triflupromazinin üç farklı asetonitril-su ortamında elde edilen kapasite faktörü(k)-pH ilişkisi.....	61
Şekil 4.12. Triflupromazinin üç farklı asetonitril ortamındaki protonasyon basamağına ait NLREG grafikleri	63
Şekil 4.13. % 35 ACN ortamında promazinin için PKPOT grafiği	66
Şekil 4.14. % 40 ACN ortamında promazinin için PKPOT grafiği	67
Şekil 4.15. % 45 ACN ortamında promazinin için PKPOT grafiği	69
Şekil 4.16. % 50 ACN ortamında promazinin için PKPOT grafiği	70
Şekil 4.17. % 35 ACN ortamında klorpromazinin için PKPOT grafiği	72
Şekil 4.18. % 40 ACN ortamında klorpromazinin için PKPOT grafiği	73
Şekil 4.19. % 45 ACN ortamında klorpromazinin için PKPOT grafiği	74
Şekil 4.20. % 50 ACN ortamında klorpromazinin için PKPOT grafiği	76
Şekil 4.21. Promazinin %35 ACN-H ₂ O ortamında spektral davranışı.....	77
Şekil 4.22. %35 (h/h) ACN - H ₂ O ikili karışımında promazinin pH - absorbands verilerinden yararlanarak elde edilen NLREG grafiği	78
Şekil 4.23. % 35 ACN - H ₂ O ikili karışımında promazinin için elde edilen STAR grafiği.....	78
Şekil 4.24. Prometazinin %35 ACN-H ₂ O ortamında spektral davranışı.....	79
Şekil 4.25. %35 (h/h) ACN - H ₂ O ikili karışımında prometazinin pH - absorbands verilerinden yararlanarak elde edilen NLREG grafiği	80

Şekil 4.26. %35 (h/h) ACN – H ₂ O ikili karışımında prometazin için elde edilen STAR grafiği.....	80
Şekil 4.27. Klorpromazinin %35 ACN-H ₂ O ortamında spektral davranışı.....	81
Şekil 4.28. %35 (h/h) ACN – H ₂ O ikili karışımında klorpromazinin pH - absorbans verilerinden yararlanarak elde edilen NLREG grafiği	82
Şekil 4.29. %35 (h/h) ACN – H ₂ O ikili karışımında klorpromazin için elde edilen STAR grafiği	82
Şekil 4.30. Triflupromazinin %35 ACN-H ₂ O ortamında spektral davranışı	83
Şekil 4.31. %35 (h/h) ACN – H ₂ O ikili karışımında triflupromazinin pH - absorbans verilerinden yararlanarak elde edilen NLREG grafiği	84
Şekil 4.32. %35 (h/h) ACN – H ₂ O ikili karışımında triflupromazin için elde edilen STAR grafiği	84
Şekil 5.1. Prometazinin cogent fenil hidrür kolonla yapılan deneyle elde edilen kromatogramı	89
Şekil 5.2. Klorpromazinin cogent fenil hidrür kolonla yapılan deneyle elde edilen kromatogramı	89
Şekil 5.3. Triflupromazinin cogent fenil hidrür kolonla yapılan deneyle elde edilen kromatogramı	89

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Metanol-su karışımında 0,05 m KHP için pH_{RVS} değerleri	22
Çizelge 1.2. Asetonitril-su karışımında 0,05 m KHP için pH_{RVS} değerleri	22
Çizelge 1.3. Asetonitril ortamındaki s_pH değerleri.....	23
Çizelge 1.4. Monohidrojen fosfat tamponu için farklı asetonitril derişimlerdeki s_pH değerler	24
Çizelge 1.5. 25 °C' de metanol-su ikili karışımı için bazı makroskopik veriler....	26
Çizelge 1.6. 25 °C' de asetonitril-su ikili karışımı için bazı makroskopik veriler	26
Çizelge 1.7. 25 °C' THF-su ikili karışımı için bazı makroskopik veriler	26
Çizelge 1.7. Monohidrojen fosfat tamponu için farklı asetonitril derişimlerdeki s_pH değerler	24
Çizelge 1.8. 25 °C' de metanol-su ikili karışımı için bazı makroskopik veriler....	26
Çizelge 1.9. 25 °C' asetonitril-su ikili karışımı için bazı makroskopik veriler.....	26
Çizelge 1.10. 25 °C' THF-su ikili karışımı için bazı makroskopik veriler	26
Çizelge 2.1. Alkil yan zincirli ve piperidin fenotiazinlerin pK_a değerleri	29
Çizelge 2.2. Bileşikler için belirlenen eşitlikler ve regresyon katsayıları	32
Çizelge 2.3. Bileşikler için belirlenen Kamlet-Taft eşitlikleri	32
Çizelge 2.4. Ölçülen pK_a değerleri ve literatürde verilen pK_a değerleri.....	34
Çizelge 2.5. Fenotiazinlerin pK_a değerleri	35
Çizelge 3.1. Potansiyometrik, spektroskopik ve kromatografik çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler	37
Çizelge 3.2. Tezde çalışılan fenotiazin bileşiklerin kimyasal yapısı ve özellikleri.....	38
Çizelge 4.1. Tezde seçilen bileşiklerin Lipinski özellikleri.....	47
Çizelge 4.2. Promazinin Marvin Sketch, ACD/Lab ve Pallas programları ile hesaplanan protonasyon sabitleri	48
Çizelge 4.3. Prometazinin Marvin Sketch, ACD/Lab ve Pallas programları ile hesaplanan protonasyon sabitleri	49
Çizelge 4.4. Klorpromazinin Marvin Sketch, ACD/Lab ve Pallas programları ile hesaplanan protonasyon sabitleri	50
Çizelge 4.5. Triflupromazinin Marvin Sketch, ACD/Lab ve Pallas programları ile hesaplanan protonasyon sabitleri	51
Çizelge 4.6. Promazinin % 30; 40; 45(v/v) asetonitril-su ortamına ait kapasite faktörleri.....	53
Çizelge 4.7. Prometazinin % 30; 40; 45(v/v) asetonitril-su ortamına ait kapasite faktörleri.....	56
Çizelge 4.8. Klorpromazinin % 30; 40; 45(v/v) asetonitril-su ortamına ait kapasite faktörleri.....	59
Çizelge 4.9. Triflupromazinin % 30; 40; 45(v/v) asetonitril-su ortamına ait kapasite faktörleri.....	62
Çizelge 4.10. Promazinin % 35(v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometrik titrasyon verileri.....	65
Çizelge 4.11. Promazinin % 40(v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometriktitrasyon verileri.....	67
Çizelge 4.12. Promazinin % 45(v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometriktitrasyon verileri.....	68
Çizelge 4.13. Promazinin % 50 (v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometrik titrasyon verileri.....	70

Çizelge 4.14. Klorpromazinin % 35 (v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometrik titrasyon verileri	71
Çizelge 4.15. Klorpromazinin % 40 (v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometrik titrasyon verileri	72
Çizelge 4.16. Klorpromazinin % 45 (v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometrik titrasyon verileri	74
Çizelge 4.17. Klorpromazinin % 50 (v/v) asetonitril – su ortamında potansiyometrik titrasyon verileri	75
Çizelge 5.1. Fenotiazinlerin paket programlarıyla hesaplanan protonasyon sabitleri.....	85
Çizelge 5.2. Fenotiazinlerin farklı analitik yöntemler kullanılarak hesaplanan iyonlaşma/protonasyon sabitleri	86
Çizelge 5.3. Promazinin fenotiazin halkasına ait protonasyon sabitinin NLREG ile elde edilen pK_a değerleri	87
Çizelge 5.4. Prometazinin fenotiazin halkasına ait protonasyon sabitinin NLREG ile elde edilen pK_a değerleri	88
Çizelge 5.5. Klorpromazinin fenotiazin halkasına ait protonasyon sabitinin NLREG ile elde edilen pK_a değerleri	88
Çizelge 5.6. Triflupromazinin fenotiazin halkasına ait protonasyon sabitinin NLREG ile elde edilen pK_a değerleri	88
Çizelge 5.7. Fenotiazinlerin PKPOT ile elde edilen	87
Çizelge 5.8. Fenotiazinlerin %35 ACN-H ₂ O ikili karışımında pH-absorbans verileri kullanılarak elde edilen NLREG pK_a değerleri	91
Çizelge 5.9. %35 ACN-H ₂ O ikili karışımında fenotiazinlere ait STAR pK_a verileri	91

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ACN	Asetonitril
C ₆ H ₄ (COOK)(COOH)	Potasyum hidrojen fitalat
CZE	Kapiler zon elektroforez
E ⁰	Hücrenin e.m.f. standardı
H ₂ O	Su
H ₃ PO ₄	Fosforik asit
HPLC	Yüksek performans sıvı kromatografisi
k	Kapasite faktörü
LOD	Dedeksiyon limiti
LOQ	Kantitatif tayin sınırı
N	Tabaka sayısı
NaOH	Sodyum hidroksit
KCl	Potasyum klorür
KOH	Potasyum hidroksit
S	Elektrodun eğimi
α	Seçicilik

1. GİRİŞ

Dialkilaminopropil yan zincirli fenotiazinler, birtakım ruhsal bozuklukların düzeltilmesine yardımcı ilaçlardır. Fenotiazin grubu ilaçlar, antipsikotik ilaçlar arasında yer alırlar. Bu ilaçlar, günümüzde şizofreni ve diğer psikolojik bozuklukların tedavisinde etkin şekilde kullanılmaktadır. Fenotiazin yapılı promazin, klorpromazin, triflupromazin ve prometazin, bu tedavide yaygın kullanım alanı bulan ilaçlardandır. Bunun için bu ilaçlar ile ilgili çalışmalar, günümüzde giderek önem kazanmaktadır. Bu bileşiklerin yapı özelliklerini belirlemek üzere gerçekleştirilen analitik çalışmalar son derece önemlidir. Literatürde bu bileşiklerin iyonlaşma sabitlerinin tayini ile ilgili yeterli çalışma yoktur. Bu tezde promazin, klorpromazin, triflupromazin ve prometazinin iyonlaşma sabitlerinin su-organik çözücü ikili karışımlarında tayini gerçekleştirilmiştir. Bu tayinlerde ayırma yöntemi olarak, sıvı kromatografik yöntem, klasik yöntem olarak spektroskopik yöntem ve potansiyometrik yöntem seçilmiştir. Yöntemlerin birarada kullanılması ile verilerin güvenilirliğinin artırılması amaçlanmıştır. Konu, kimya alanında çalışan araştırmacılar olduğu kadar tıp ve eczacılık alanlarına yönelik çalışmalar yapan araştırmacıların da ilgisini çekecektir.

1.1. Antipsikotikler

Tıpta en çok kullanılan ilaç gruplarından biridir. Tıpta ataraktik, nöroleptik, majör trankilizan gibi adlarla anılan bu ilaçlar günümüzde etkilerine uygun olarak antipsikotik adı altında konuşulmaktadır. Bu ilaçlar; şizofreni, bipolar bozukluk, dirençli depresyon ve anksiyete bozukluklarının tedavisinde kullanılırlar. 1950'lerde fenotiazin grubu ilaçların bulunması, şizofreni tedavisinde çok önemli gelişmeleri beraberinde getirmiştir. Şizofreni, beyindeki kimyasal maddelerin iletiminde bir bozukluk olması ve beyin yapısında bazı farklılıkların görülmesiyle ortaya çıkan bir beyin hastalığıdır. Bu hastalık, toplumda çok sık konuşulan bir hastalık olmasa da oldukça yaygındır. Dünyada 60-65 milyon, ülkemizde ise 600 binden fazla şizofreni hastası vardır. Genelde 16-25 yaş arasında ortaya çıkan bu hastalığın görülme sıklığı yüzde birdir. Başlama yaşı ne

kadar düşerse hem beyinde hem de kişilik üzerinde hasar o kadar fazlalaşır. Bu ilaçlar çoğunlukla şizofreninin akut semptomlarını oldukça çabuk kontrol altına alarak kronik şizofrenlerin akut belirtilerle nüks etmesini önlemede başarılı sonuç verirler. Şizofrenide temel bozukluk, beyinde dopamin fazlalığıdır. Antipsikotik ilaçlar, dopaminin beyindeki etkisini azaltarak etki gösterirler ve hastalarda ortaya çıkan belirtileri yatıştırarak hastanın günlük yaşama uyumunu artırmakta, iş verimini yükseltmekte ve hastalığın tekrar ortaya çıkışını önlemektedir. İlaçların kullanımı hastadan hastaya ve türden türe değişiklik göstermektedir. İlaçların etki süresi de hastadan hastaya değişiklik gösterir ve kullanılan ilacın türüne bağlı değişik yan etkiler görülebilir.

1.2. Antipsikotiklerin Sınıflandırılması

Antipsikotik ilaçlar,

- 1.Fenotiazin türevleri,
 - 2.Tiyoksanten türevleri,
 - 3.Fluorobiturofenon,
 - 4.Difenilbütülpiperidin,
 - 5.Dibenzodiazepin ve dibenzooksepin türevleri,
 - 6.Benzamitler ,
 - 7.İndol türevleri ve izoesterleri,
 - 8.Rezerpin ve diğer Rauwolfia türevleri,
 - 9.Değişik yapıdaki bileşikler
- olmak üzere 9 ana başlıkta gruplanırlar.

1.3. Fenotiazinler

Fenotiazin türevleri, antipsikotiklerin dokuz alt grubundan biridir. Antihelmintik özellikleri nedeniyle tedaviye girmiştir. Yapıda yer alan R1 ve R2 sübstitüentlerine göre farklı farmakolojik etki gösterirler. R1 sübstitüentinin azot taşıyan yapı olması halinde ve R2 sübstitüentine flor gruplarının girmesi ile nöroleptik aktivitenin arttığı düşünülmektedir. R1 sübstitüentindeki dallanma ise nöroleptik aktiviteyi azaltmaktadır.

Fenotiazin türevleri kimyasal yapılarına göre

1. Dialkilaminopropil yan zincirli (promazin, klorpromazin, triflupromazin)
2. Piperidinopropil yan zincirli (tiyoridazin, mezoridazin, piperasetazin)
3. Piperazinopropil yan zincirli (perklorperazin, trifluoperazin, tietilperazinperfenazin, flufenazin, asetofenazin)

türevler olmak üzere sınıflanır.

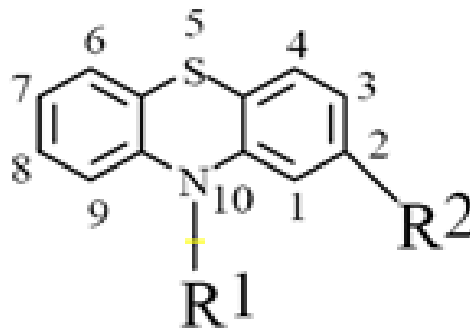
Antipsikotik ilaçların erken gelişimi Swazey(1974), Caldwell (1978) ve Tuillier (1999) tarafından özetlenmiştir. 1950 'lerin başlarında Rauwolfia bitkisinden elde edilen ekstraktların ve daha sonra Woodward tarafından kimyasal olarak sentezlenen, saflaştırılmış aktif alkaloid rezerpinin, yüksek dozlarının bazı antipsikotik etkileri gösterilmiştir. Fenotiazinler 19. Yüzyılın sonlarında anilin boyalarının geliştirilmesini takiben sentezlenmiştir. 1930'ların sonlarında fenotiazin türevi prometazinin antihistaminik ve sedatif etkisi bulunmuştur. Bu gelişme prometazin ve diğer antihistaminiklerin, psikiyatrik hastalarda ajitasyon tedavisi için kullanımına neden olmuştur, ancak bu uygulama başarılı olamamıştır. Prometazinin rodentlerde barbitratla oluşan uyku süresini azalttığı saptanmış ve ilaç klinik anestezide, anesteziyi potansiyalize eden ve otonomik yanıtları stabilize eden bir ilaç olarak tanıtılmıştır.

Bu çalışma, fenotiazin türevlerinin benzer etkilerinin araştırılmasını ve 1949-1950' de Charpentier'in klorpromazini sentezlemesini teşvik etmiştir. Hemen sonra Laborit ve arkadaşları bu bileşiğin anesteziyi potansiyalize ettiğini ve yapay uykuya neden olduğunu göstermiştir. Klorpromazin tek başına bilinç kaybına neden olmaz, uyanıklığı ve hareketleri azaltır, uyku gelişimine yardımcı olur. Bu santral etkiler kısa süre sonra ataraktik ya da nöroleptik etkiler olarak adlandırılmıştır. Klorpromazin ile mental hastalıkların tedavisi, ilk olarak 1951 ve 1952'nin başlarında Paris'te Paraire ve Sigwald tarafından yapılmıştır (Swazey, 1974). 1952' de Delay ve Deniker klorpromazinin ajitasyon ya da anksiyetedesemptomatik iyileşmeden daha fazlasını yaptığından ve mani, şizofreni gibi çeşitli hastalıklarda iyileştirici etkisinin olduğundan emin olmuşlardır. 1954' de Winkelman gibi, Lehmann ve Hanrahan da, klorpromazinin, Kuzey ABD' de şizofreni, psikomotor panik ve manik atakta kullanılmaya başladığını bildirmişlerdir (Swazey, 1974). Klinik çalışmalar

klorpromazinin psikotik hastalıkların birçok tipinde etkili olduğunu ortaya çıkarmıştır.Klorpromazindeki bu gelişmeyle birlikte ..

1.4. Kimyasal Özellikler ve Yapı Aktivite İlişkileri

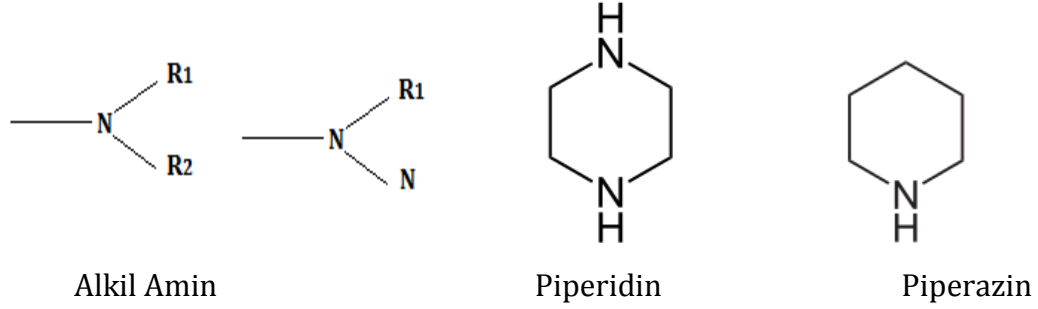
Fenotiazinler, kükürt ve azot atomları ile bağlı iki benzen halkasından oluşan trisiklik bir yapıya sahiptir. Kimyasal olarak ilişkili olan tiyoksantinler, 10 pozisyonunda, R1 grubunun çift bağla bağlandığı, azotun yerini almış karbon atomu taşırlar. 2 pozisyonundaki elektron çekici grubun süstitüsüonu, fenotiazinlerin (klorpromazine karşılık promazin) antipsikotik etkilerini artırır. 10 pozisyonundaki grupların doğası da farmakolojik aktiviteyi etkiler. Fenotiazinler ve tioksanlar bu bölgedeki yan zincirlere göre üç gruba ayrılabilirler. Bunlardan alifatik yan zinciri olanlar klorpromazin ve triflupromazindir. Bu bileşiklerin etkinlikleri göreceli olarak daha düşüktür, ancak klinik etkinlikleri değildir. Yan zincirinde piperidin halkası taşıyanlar tiyoridazin ve mezoridazindir. Flufenazin, perfenazin ve trifluperazin gibi bazı potent fenotiazinler yan zincirlerinde piperazin grubu taşırlar. Antipsikotik fenotiazinler ve tioksantinler, merkez halkanın 10 pozisyonu ile yan zincirin ilk amino azot atomu arasına girmiş üç karbon atomu taşırlar; amin her zaman tersiyerdir. (Şekil1.1.)



Şekil 1.1. Fenotiazinlerin genel gösterimi

Fenotiazinler, yan zincire bağlanan R1 ve R2 sübstütientlerine göre farklı farmakolojik etki gösterir. R2 substütienti H iken farmakolojik etki 1 birim ise, R2 substütienti CF₃ iken 8 birim olmuştur.

H, Cl, OCH₃, COCH₃, CF₃ sırasında nöroleptik aktivite H den CF₃'e doğru artar. Aynı zamanda R1 sübstütienti N taşıyan yapı ise, nöroleptik aktivitenin arttığı da bilinmektedir.



Şekil 1.2. Fenotiazinlere bağlanan piperidin, piperazin ve alkil amino yan zincirler

Bu yüksek lisans tezinde alkilamino yan zincirli fenotiazinlerden promazin, klorpromazin, triflupromazin ve prometazinin p_totonasyon sabitleri tayin edilmiştir. Promazin fenotiazin sınıfına ait antipsikotik ilaçlar arasında yer alır. Şizofreni tedavisinde kullanılan en eski ilaçlardandır. Günümüzde olanzapin gibi yeni ilaçların yanı sıra promazinin de kullanımına devam edilmektedir. Genellikle antikolinergik (parasempatik sinir sistemi içerisinde asetilkolin faaliyetlerini engelleme) yan etkisi vardır. Amerika'da veterinerlik alanında kullanımı bulunmaktadır. Alifatik yan zincire sahip klorpromazin atipik fenotiazin olarak adlandırılır. Düşük-orta bir antipsikotik etki potansiyeli vardır. Antipsikotik aktivitesinin yanı sıra sakinleştirici etkisi ve kronik şizofreni vakalarında akut nüksetmeye karşı korumada temel terapi amaçlı olarak ve sedatif etkisinden dolayı vertigo ile kusma tedavisinde de kullanılmaktadır. Her ne kadar klorpromazin mekanizma ve yan etki profili geliştirilmiş yeni jenerasyon antipsikotiklerle yer değiştirmiş olsa da manik depresyon, şizofreni ve diğer ciddi psikotik hastalıklarda halen kullanılmaktadır. Oldukça lipofilik bir bileşik olan klorpromazin de diğer fenotiazin türevleri gibi kolaylıkla oksidasyona uğrayabilir. Fenotiazin

antipsiktiklerden bir diğeri de triflupromazindir. Potansiyel yan etkileri diğeri antipsiktiklerden daha fazla olduğundan antiemetik terapi için iyi bir standart değildir. Prometazin, fenotiazin ailesinin 1. Jenerasyon antihistaminik, nöroleptik ilaçlarındandır. Güçlü bir sedatif etkisi vardır, ancak antipsiktik etkisi zayıftır. Katı haldeki prometazin tuzu beyaz yeşile benzer renkte, genellikle kokusuz, kristallenmiş yapıdadır. Uzun süre havayla temas etmesi halinde oksidasyona uğrayabilir. Şiral bir bileşik olan prometazin enantiomerlerinin karışımı halinde bulunabilir.

1.5. İyonlaşma Sabiti Tayini

Biomembranlarda ilaçların etkileşimi bu ilaçların vücut içinde absorpsiyon, membranda taşınma, dağılma ve birikmesi ile ilgilidir. Hücre membranı biomembranların temel yapısıdır. İlacın hücre membranı ile etkileşimi, biomembranlar ile etkileşimi için önemli bir göstergedir. İlacın yapısında iyonlaşabilir grup veya gruplar olması durumunda ilacın biomembranlarla etkileşimi onun iyonlaşma sabitine bağlı olarak değişmektedir. Bir molekülün iyonlaşma davranışını belirlememizi sağlaması nedeniyle iyonlaşma sabiti önemli bir fizikokimyasal parametredir. İlaçların çeşitli numunelerdeki analizlerinde metot geliştirme işlemlerinde pKa değerlerinin bilinmesi gerekir. İlaçların bu sabitlerinin sudaki tayinleri, bileşiğin sudaki çözünürlüğünün az olması durumunda su-organik çözücü ikili karışımlarının kullanılmasını zorunlu kılar. Su ile her oranda karışan organik çözücülerin su ile oluşturduğu bu ikili karışımlar kullanılarak organik çözücünün yeterliliğinden yararlanılabilmektedir. (Kazakevich ve Lobrutto, 2007; Narasimham ve Barhate, 2011). Bu parametrenin belirlenmesinde potansiyometrik titrasyonlar, spektrofotometrik yöntemler, kapilarelektroforez ve sıvı kromatografi yöntemleri sıklıkla kullanılmaktadır (Barbosa vd., 2001; Demiralay vd., 2009).

Bazik ilaçlar, ortam asidik ise katyonik durumda olmaya daha yatkındır. Eğer ortam bazikse bazik ilaçların çoğu moleküler durumda olurlar. Zayıf asit ya da zayıf baz niteliğinde olan ilaçların lipoid nitelikteki zarlardan geçişleri, ne kadar iyonlaştıklarına bağlıdır. Bu nedenle bu tip ilaçların yüzde kaçının iyonlaştığı,

yüzde kaçının iyonlaşmadığının hesaplanabilmesi gerekir. İyonlaşmamış durumda olanlar, lipoid nitelikteki zarlardan kolay geçerler.

1.6. Su-Organik Çözücü İkili Karışımlarında İyonlaşma Sabitleri Tayini

İlaç etken maddelerinin analizlerinin güvenilir yöntemlerle yapılması, giderek zorunlu hale gelmektedir. Bileşiklerin sıvı kromatografik yöntemle tayininde su-organik çözücü ikili karışımlarındaki iyonlaşma sabitlerine ihtiyaç duyulmaktadır. İlaçların iyonlaşma sabitlerinin tayininde ayırma yöntemlerinin seçilmesinin nedeni, yöntemlerin su-organik çözücü ikili karışımlarında uygulanabilmesidir. İyonlaşma sabitleri, su-organik çözücü karışımında organik çözücü yüzdesi değiştirilerek organik çözücünün farklı yüzdeleri için tayin edilebilmekte ve gerek çözücü özellikleri ve gerekse ekstrapolasyon yöntemleri kullanılarak sudaki pK değerleri hesaplanabilmektedir. Gerek su-organik çözücü ikili karışımının özellikleri ve gerekse ekstrapolasyon yöntemleri kullanılarak bileşiklerin sudaki pK değerlerinin hesaplanması sağlanabilmektedir.

1.7. Potansiyometrik Analiz Yöntemleri

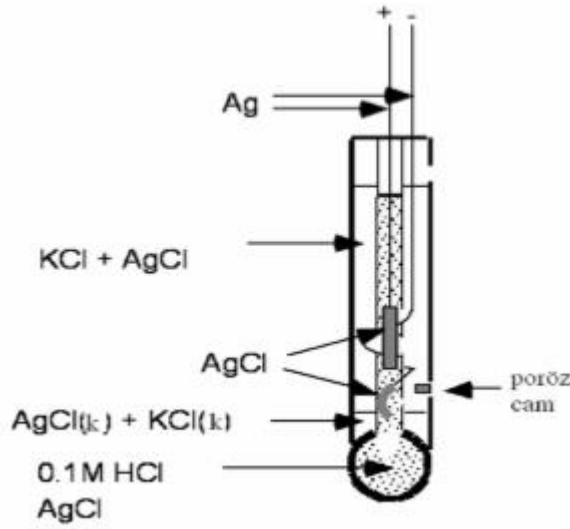
Potansiyometrik analiz yöntemleri, elektrokimyasal hücrelerde fark edilebilir bir akımın geçmediği koşulda yapılan ve potansiyel ölçümlerine dayanan analiz yöntemleridir. Bu yöntemde iyonların nicel analizleri bir karşılaştırma elektrodu ve uygun bir çalışma elektrodu ile oluşturulan elektrokimyasal hücrede ölçülen gerilim değerlerini kullanarak gerçekleştirilir. Potansiyometrik yöntemlerde düzenekler, basit ve ucuzdurlar. Birçok analitik uygulamada, düzenekteki iki elektrottan referans elektrot olarak bilinen elektrotun yarı-hücre potansiyelinin sabit, çalışılan çözeltilinin bileşiminden bağımsız olması ve değerinin bilinmesi istenir.

1.7.1. Cam Elektrot

İyon seçici elektrotlar içinde en yaygın kullanılanı cam elektrottur. Cam elektrotta membran olarak bulunan ince bir cam zar, yapısındaki oksitlerin türüne ve derişimine göre çeşitli iyonlara karşı seçicilik gösterir (Şekil 1.3.).

H⁺ iyonlarına karşı seçicilik gösteren cam elektrot, H⁺ iyonları derişiminin $1 - 10^{-13}$ M olduğu aralıkta Nernst eşitliğine uyar. Ölçülen elektrot gerilim değeri ile pH arasında doğrusal bir ilişki vardır. Nernst eşitliği,

$E_{\text{hücre}} = K - 0,0592 \text{ pH}$ şeklindedir. Bilindiğı üzere ölçüm yapılmadan önce, ölçülecek pH değeri aralığına uygun tampon çözeltilerle kalibre edilmesi gerekir. Bu elektrot, çok asidik ve çok bazik çözeltilerde asit hatası ve çok bazik çözeltilerde alkali hatası nedeniyle kullanılmaz (Gündüz, 2002).



Şekil 1.3. Kombine cam pH elektrodu

1.7.2. Potansiyometrik Titrasyon

Potansiyometrik titrasyon ile nicel analizde her titrant eklenmesinden sonra ölçülen gerilim değerlerinin, eklenen titrant hacmine karşı grafiğe geçirilerek potansiyometrik titrasyon eğrisi oluşturulur. Sigmoidal şekilli olan bu eğrilerde , eşdeğerlik noktası eğrinin eğiminin en büyük olduğu noktadır. Eşdeğerlik noktası civarında titrant eklenmesi çok özenli olarak yapılmalı, bu hacmin yeterli doğruluk ve kesinlikte belirlenmesi gerekmektedir. Asit baz tepkimlerinin oluştuğu potansiyometrik yoldan izlenmesinde uygun bir iyon seçici elektrot kullanılır. Asidin veya bazın kuvveti azaldıkça, dönüm noktasında gözlenen pH değişmesinin büyüklüğü ve keskinliği azalır. Aynı durum, kullanılan titrant derişiminin azaldığı zaman ve zayıf bir asidin kuvvetli bir baz yerine zayıf bir bazla titre edilmesi halinde de gözlenir. Potansiyometrik

titrasyonlarda eşdeğerlik noktasının belirlenmesinde, mL titrant - mV, mL titrant - pH ve ϕ -pH grafiklerinden yararlanılır. Titrasyonda eşdeğerlik hacmi, titrasyon eğrisinin birinci ve ikinci türevleri alınarak saptanabilir.

IUPAC'ın (Uluslar arası kuramsal ve uygulamalı kimya birliği) potansiyometrik yöntemlerde su-organik çözücü karışımlarında titrant olarak önerdiği ayarlı KOH çözeltisidir. Titrasyon karbonat hatası getirmeyecek koşulda yapılmalıdır. İyonlaşma sabitinin tayininde son zamanlarda su-organik çözücü karışımlarında elektrot standardizasyonları yapılabildiği için elde edilen iyonlaşma sabitleri, termodinamik değerlerdir. Tüm titrasyon koşullarını, iyonik şiddet de dâhil olmak üzere dikkate alan ve sistematik yaklaştırmayı temel alan bilgisayar programları bu amaçla kullanılmaktadır. Su-organik çözücü karışımlarının özelliklerinin bilinmesi, iyonlaşma sabitlerinin yorumlanmasını sağlamaktadır. Potansiyometrik yöntemle iyonlaşma sabiti tayininde bileşiğin derişimi, sıçrama aralığını yeterli sağlayacak şekilde seçilir. Suyun otoprotoliz değerleri bellidir. Ancak su-organik çözücü karışımları ile çalışmada su-otoprotoliz değerleri gereklidir. Bu tip bir çalışmada öncelikle potasyum asit fitalatın titrasyonu ile kuvvetli baz, kuvvetli bazın titrasyonu ile kuvvetli asit ayarlanır. Veriler, uygun şekilde kullanılarak otoprotoliz sabitine geçilir. Kuvvetli asit-kuvvetli baz titrasyonundaki veriler, bazda karbonat hatasının belirlenmesine de imkan sağlar. Potansiyometrik titrasyonda su organik çözücü karışımında elde edilen veriler, Yasuda -Shedlovsky ekstrapolasyonu uygulanarak sudaki pKa değerine geçilir (Takacs-Novak vd., 1997; Avdeef vd., 1999; Babic, 2007). Doğruluğu ve kesinliği yeterli bir yöntem olan potansiyometrik yöntemde kullanılan elektrotun kararlı ve çalışılan ortama uygun olması durumunda yeterli tekrarlılıkta sonuçlar alınır. $2,0 \cdot 10^{-3} - 3,0 \cdot 10^{-3}$ M derişim çalışma için uygundur ve çalışılan bileşikler saf olmalıdır. Verilerin değerlendirilmesi için birçok yaklaşımın bulunması bu yöntemin avantajlarından.

1.8. Spektrofotometrik Yöntemle İyonlaşma Sabiti Tayini

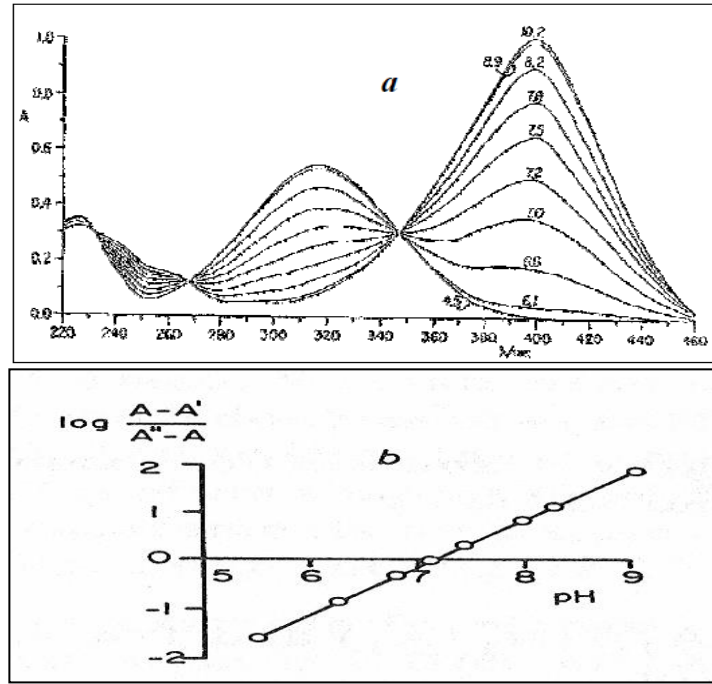
Spektrofotometrik yöntemler, ilaçların pK_a değerlerinin belirlenmesinde çok iyi yöntemlerdir. UV spektrofotometrik metot iyonik ve yüksüz türlerin farklı

spektral özelliklerini temel alır. Spektral veriler, Titrasyon süresince nötral ve iyonlaşmış türlerin varlığını yansıtır.

Spektrofotometrik ölçümlerle iyonlaşma sabitleri tayininde, ortamın pH değerini belirlemek için cam elektrot kullanılır. Titrasyon, titrant eklendikten ve çözelti karıştırıldıktan sonra spektrofotometrik ölçüm kabına aktarılır ve absorbans değeri ölçülür. Genellikle iyonlaşma/protonasyon sabitleri tayin edilen bileşiklerin iyonlaşmış ve moleküler formlarının absorpsiyon spektrumları farklıdır. Farklı pH değerlerinde, çözeltilerin absorbansı ölçülür ve bu absorbans değerleri pH'ya karşı grafiğe geçirilir. S şeklindeki eğrinin eğiminin değiştiği orta nokta pK_a değerini verir (Yıldız, vd., 1997). Spektroskopik titrasyonda, pK_a tayininde belli bir dalga boyu aralığında kaydedilen absorbans verilerinden yararlanılır. Bu yöntemle pK_a tayininde aşağıdaki eşitlik temel alınmaktadır.

$$pK_a = pH + \log \frac{A_{abs} - A_M}{A_I - A_{abs}} \quad (1.1)$$

Bu bağıntıda A_M, moleküler formun, A_I, iyonlaşmış türün absorbans değerlerini ifade etmektedir. Absorbans pH'ya karşı grafiğe geçirilerek veya logaritmik (A_{abs}/A_I)pH ya karşı grafiklenerek kesim noktasından pK_a değerleri bulunabilir (Şekil 1.4). Doğruluğu ve kesinliği yeterli olan spektrofotometrik yöntemler de çalışılan bileşikler saf ve çalışma aralığı 10⁻⁵ – 10⁻⁶ M derişim olmalıdır. Yapıda en az bir tane kromofor grubun bulunması ve bunun absorbans özelliklerinin yeterli olması gereklidir. Aynı zamanda nötral ve iyonlaşmış formların spektral özelliklerinin yeterince farklı olması gerekir. Bileşiğin sudaki çözünürlüğü zayıfsa bu yöntemle pK_a'nın belirlenmesi oldukça zordur.



Şekil 1.4. Spektroskopik bir çalışmada (a) $A - \lambda$ ve (b) logabsorbans farkı-pH grafikleri (A_M' : moleküler türün absorbanansı; A_I'' : iyonik türün absorbanansı)

Spektroskopik yöntemle tayinde günümüzde DAD sistemleri tercih edilmekte ve bu sistemler LC-DAD ve CE-DAD olarak ayırma yöntemleri ile kombine olarak kullanılmaktadır (Beltran vd., 2003). Bu amaçla geliştirilmiş bilgisayar programları, pH ile dalga boyu ve absorbanans arasındaki ilişkiyi temel olarak sabitleri hesaplamaktadır (Allen vd., 1998; Mitchell vd., 1999).

1.9. Ters Faz Sıvı Kromatografisi

Sıvı kromatografik metotlar, bileşiklerin davranışlarını temel alan, kantitatif yapı alıkonma ilişkisi yaklaşımıyla kromatografik verilerden yapı özelliklerine gidebilmeyi sağladığı için son yıllarda sıklıkla kullanılan metotlardır. Bu yöntemler, ilaç etken maddelerinin nitel ve nicel analizlerinde, ilaç etken maddelerinin metabolitlerinin tayininde, biyolojik numune analizlerinde, biyoesdeğerlik, biyoyararlanım çalışmalarında, farmakokinetik bilgilerin değerlendirilmesi ve yorumlanması yanı sıra yapı özelliklerinin tayininde de son 30 yılda giderek tercih edilen yöntemlerdir. Aynı zamanda yöntemin yaygınlığı, kolonların ayırmaya uygun niteliklerle getirilmiş olması ve kolonların pH kararlılıklarının daha yeterli olması sonucu daha da artmaktadır. Teori ile

pratik uygulamanın birbiriyle tam olarak örtüştüğü bu teknikte iyi bir kolon seçimiyle birçok bileşiğin başarılı bir şekilde ayrımı gerçekleştirilebilir.

Bir sıvıda çözünmüş ayrılacak bileşenler, bir kolon içerisinde bulunan genellikle katı bir destek üzerindeki bağlı faz ile farklı etkileşimlere girerler. Bu kolondan hareketli sıvı faz geçirildiğinde analitlerin kolon ve hareketli faz ile farklı etkileşimleri sonucu kolon içinde değişik hızlarda ilerlerler. Kolonu değişik zamanlarda terkederler ve böylece birbirinden ayrılırlar. Bu yöntemde tayin edilen analitin derişimine cevap veren bir dedektör kolonun sonuna konulur ve sinyal zamana karşı grafiğe geçirilirse bir dizi pik elde edilir. Böyle bir grafiğe kromatogram adı verilir ve hem nitel, hem de nicel analizde kullanılır. Piklerin alıkonma zamanları numunedeki bileşikleri tanımak için; piklerin altındaki alanlar ise her türün nicel tayini için kullanılır. Ayrıca sıvı kromatografik yöntemle, asidik/bazik fonksiyonel grup içeren bileşiklerin iyonlaşma/protonasyon sabitleri, oktanol su dağılma katsayıları ve çözünürlükleri, bunların alıkonma davranışları ile organik çözücü su ikili karışımının pH' sı arasındaki ilişkilerden yararlanılarak tayin edilmektedir.

1.9.1. Kromatografide Temel Parametreler

Kromatografik yöntemler analitik ayırma teknikleri arasında en yaygın kullanılanlardandır. Bu tekniklerle etkili bir ayırma gerçekleştirmek; numune bileşenlerinin kolonda tutunabilmesine, numune bileşenlerinin diğerlerinden ayrılabilmesine, numune bileşenlerinin bant genişliklerinin nispeten dar olmasına dikkat edilmesi ile mümkündür. Ayrımı iyileştirmek, uygun sabit faz ve hareketli faz seçimiyle doğrudan ilişkilidir. Koşulların uygunluğu ise, kromatogramların yorumlanmasıyla kontrol edilir. Zaman eksenindeki piklerin yeri, numune bileşenlerini tanımada kullanılır. Pik alanları her bir bileşenin miktarının kantitatif bir ölçüsüdür. HPLC yöntemiyle tayini yapılan analitlerin hem kalitatif hem de kantitatif belirlenebilmesi için kullanılan terimler;

Alıkonma zamanı, t_R

Kapasite faktörü, k

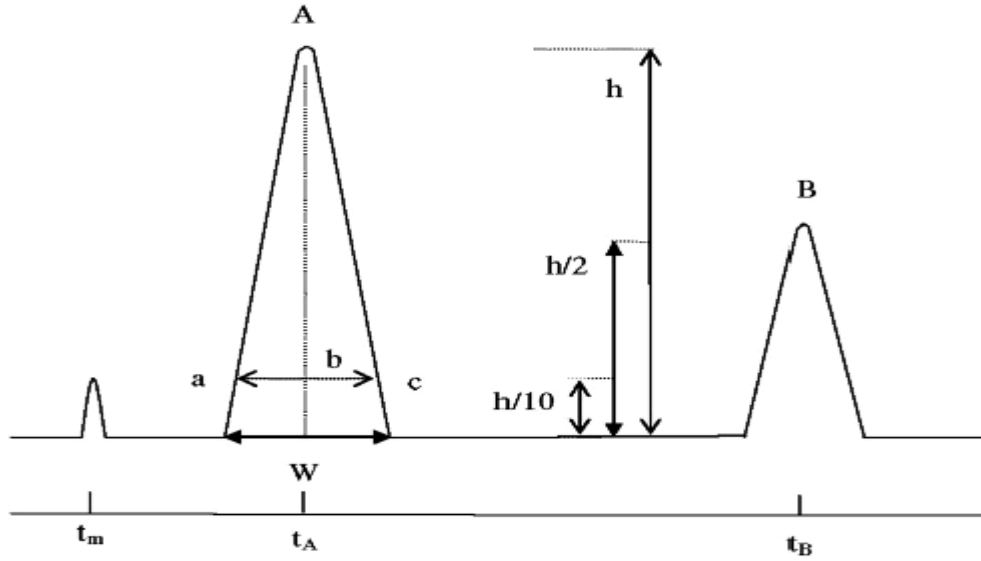
Seçicilik faktörü, α

Kolon ayırma gücü, R_s

Kolon verimliliği, N ve L olarak verilmiştir.

1.9.1.1. Kapasite faktörü (Alıkonma faktörü)

Alıkonma zamanı, analitin kolona verilmesinden sonra dedektöre ulaşması için geçen süredir (Şekil 1.5). ve (t_R) ile gösterilir. Kolonda tutunmayan türe ait pik süresi ölü zaman (t_0), kapasite faktörünün hesaplanmasında kullanılır.



Şekil 1.5. Ters faz sıvı kromatografi yöntemiyle elde edilen kromatogram

Şekil 1.5'de t_m , sabit faz ile etkileşmeyen maddelerin alıkonma zamanını, t_A , A maddesinin alıkonma zamanını, t_B , B maddesinin alıkonma zamanını göstermektedir.

Tayin edilen analitlerin kolonda göç hızlarını tanımlamakta kullanılan bir terim olan kapasite faktörü (k) önemli bir deneysel parametredir. Alıkonma faktörü olarak da bilinen bu parametre

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

bağıntısı ile hesaplanır.

Burada t_R bileşene, t_0 , kolonda tutunmayan türe ait alıkonma zamanlarıdır. İyi bir HPLC ayırması için k , 1-10 arasında olmalıdır. k değerlerinin bu aralıkta

olması, mobil faz özellikleri ve durgun fazın değiştirilmesi ile sağlanır (Poole ve Poole, 1991).

1.9.1.2. Seçicilik, α

Kromatografik sistemde kolon seçiciliği; iki bileşen arasında ayrımı sağlama yeteneğidir. Bu durumda bir kolondaki analitlerin seçicilik katsayısı, bir kolonun söz konusu maddeleri ne kadar iyi ayıracağıнын bir ölçüsüdür. Seçicilik, esas olarak kullanılan sabit fazın özelliğine bağlı olarak değişiklik göstermekle birlikte seçiciliği hareketli faz bileşimi ve pH'nın da etkilediği bilinmektedir. Seçiciliğin matematiksel ifadesi, Eşitlik 1.3' de gösterilmiştir. α , 1,15 ise iki bileşimin %98 oranında birbirinden ayrıldığı kabul edilir. A ve B gibi iki çözünen için bir kolonun seçicilik katsayısı;

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} = \frac{t_{RB} - t_{R0}}{t_{RA} - t_{R0}} \quad (1.3)$$

bağıntısı ile hesaplanır.

1.9.1.3. Teorik tabaka sayısı, N

Kromatografik analizlerde pik genişliği ölçülebilir ve bu kolon verimliliğini ifade eder. Kolon verimliliği kolona karakteristiktir. Pik genişliği kullanılarak kolonun etkin tabaka sayısı hesaplanabilir. Bu sayının ikibinden büyük olması tavsiye edilir.

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

Burada;

N : Teorik tabaka sayısı

t_R : Bileşene ait alıkonma zamanı

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

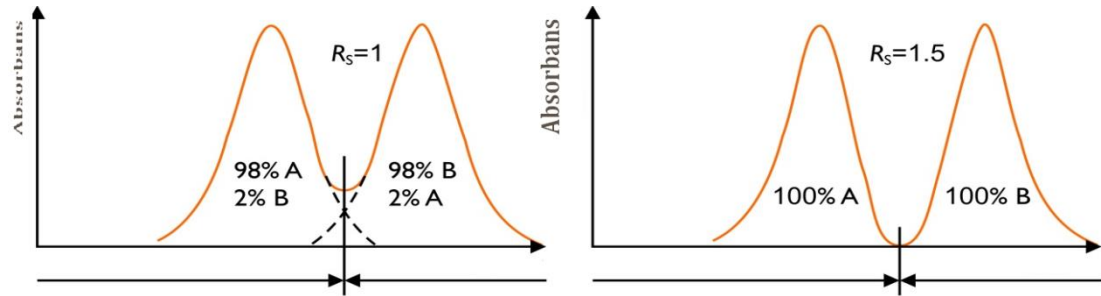
dir. Kolon verimliliği, kolona karakteristik olup kolonda pik dağılım derecesinin ölçümüdür. Tavsiye edilen değer, $N > 2000$ dir.

1.9.1.4. Ayırma gücü, R_s

Ayırım, kantitatif kromatografi çalışmalarının başlıca gerekliliğidir. Bir kolonun ayırma gücü, R_s değeri, kolonun iki analiti birbirinden ayırabilmesinin kantitatif bir ölçüsüdür. Ayırma gücünün hesaplanmasında, kapasite faktörü, tabaka sayısı ve seçicilik kullanılmaktadır. Birbirini takip eden iki pik için R değeri 1,5 iken tam ayırım olmakta, R , 1,325 iken maddelerden biri diğeri içine %0,3 oranında girmiş durumda, R , 1 iken, maddelerden biri diğeri içine %4 oranında girmiş durumdadır. R , 0,75 iken ayırım olmamaktadır (Şekil 1.6).

- Genel ayırımlarda $R_s > 2.0$
- Miktar Tayini çalışmalarında $R_s > 1.5$
- Biyolojik sıvılardan yapılan çalışmalarda $R_s > 1.2$

değerleri kabul edilebilir değerlerdir.



Şekil 1.6. Ayırma gücünün şematik gösterimi

Birbirini izleyen iki pik arasındaki ayırma gücü, R_s , için farklı hesaplama yöntemleri geliştirilmiştir. Purnell bağıntısı sıklıkla tercih edilen bağıntıdır.

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

Burada;

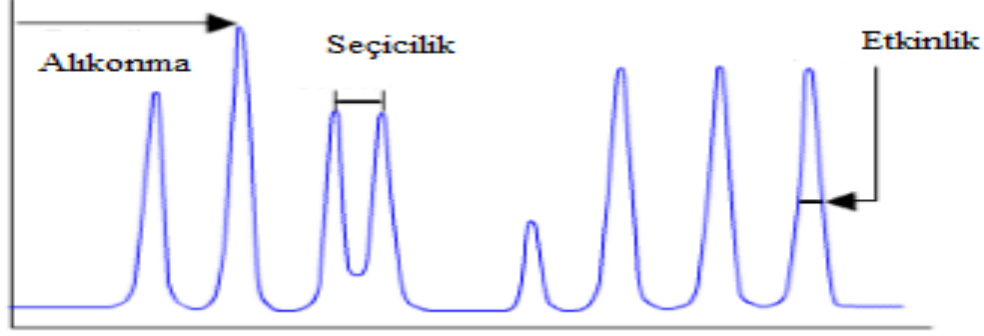
R_s : Pik çifti için ayırma gücü,

N : Etkin tabaka sayısı,

α : Seçicilik faktörü,

k : Kapasite faktörü

dür. Bu bağıntı sıvı kromatografik ayırmalarda optimizasyon için esas alınan bağıntıdır. Bir kromatografik ayırmada en az ayrılan pikler, kritik pik çifti olarak adlandırılır.



Şekil 1.7. Alıkonma, seçicilik, etkinlik parametrelerinin kromatogram üzerinde gösterimi

1.9.2. Sıvı Kromatografi Yöntemiyle İyonlaşma Sabiti Tayini

Sıvı kromatografik yöntemler, asitlerin ve bazların iyonlaşma sabitlerinin tayininde son yıllarda sıklıkla kullanılan metotlar arasındadır. Sıvı kromatografik yöntemle tayinde bileşiğin $pK_a \pm 2$ değerleri dikkate alınarak mobil fazın pH değerleri belirlenir ve pH' sı belli mobil fazlar kullanılarak bileşiklerin kapasite faktörleri tayin edilir. Kapasite faktörünün pH ile değişimi grafiğe geçirildiğinde sigmoidal davranış gözlenir. Bu sigmoidalin orta noktasındaki pH değeri, o bileşiğin çalışılan ortamdaki iyonlaşma sabitini verir. Yöntem az miktarda analit ile çalışma imkanı tanımaktadır. Safsızlıklar problem getirmemektedir. Matematiksel grafiklerle asidik veya bazik bileşiklerin iyonlaşma sabitlerinin tayini mümkündür. Bu tip tayinde ortamın iyonik şiddetini de dikkate alarak hesaplama yapabilen non-lineer regresyon programları da geliştirilmiştir. Sıvı kromatografik yöntemlerin en önemli dezavantajı, mobil fazın pH'sının kolon dolgu materyalinin belli bir pH aralığında kullanılabilmesinden dolayı sınırlı olmasıdır. Bu metotta kullanılan kolonun pH sınırları dikkate alınarak mobil fazın pH'sı ayarlanmalıdır. Düşük organik çözücü bileşimlerinde alıkonma zamanlarının uzun olmasından dolayı ve kolon ile olumsuz etkileşimlerinden dolayı iyonlaşma sabitlerinin yeterli

doğrulukta tayini mümkün olmamaktadır. Asidik bileşiklerde daha yeterli doğruluk ve kesinlikteki veriler, piklerin simetrik olmalarına bağlanmaktadır. Bazik bileşiklerin protonasyon sabitlerinin tayinlerinde pik kuyruklanmaları tayinde olumsuz etki yapmaktadır. Kolon seçiminde daha titiz davranılması gerekmektedir.

1.9.3. Kromatografide Horváth - Melander Bağlılıları

Bileşiklerin iyonlaşma sabitleri, bunların alıkonma davranışları ile mobil faz pH' sı arasındaki ilişkilerden yararlanılarak sıvı kromatografik yöntemle tayin edilebilir. Horváth-Melander'a ait çalışmalar; sıvı kromatografi ile pKa tayinindeki ilk çalışmalardır(Horváth vd., 1977). Çalışmacılar, ters faz sıvı kromatografide kolon dolgu materyali ile asidik-bazik fonksiyonel gruplu yapıların etkileşimlerini dikkate alarak gerekli bağılılıları hazırlamışlar ve monoprotik ve diprotik asitlerde, monofonksiyonlu bazlarda ve ikiz iyonlarda kapasite faktörü, mobil fazın hidronyum iyonu derişimi ve bileşiğin pK değerleri arasındaki bağılılıları türetmişlerdir. Bu bağılılılara göre kapasite faktörünün mobil faz pH'sı ile değişimini gösteren grafikleri de önermişlerdir.

Kromatografik ayırma, çözünen (S) ile ODS gibi hidrokarbon ligand (L) arasında oluşan kompleksin davranışıyla gerçekleşir (Horvath vd., 1977). Bu denge aşığıdaki bağılılı ile ifade edilir.



Bu dengeye ait denge sabiti 1.7 eşitliği ile verilir.

$$K = \frac{[SL]}{[S][L]} \quad (1.7)$$

Çözünen iyonlaşan fonksiyonel grup içerdiğinde bağılılı bileşiğin özelliğine bağlı olarak değişir. Zayıf bir monoprotik asit (HA) mobil fazda kısmen iyonlaşır.



Buna özgü denge sabiti, K_{am} , aşağıdaki bağıntı ile ifade edilir.

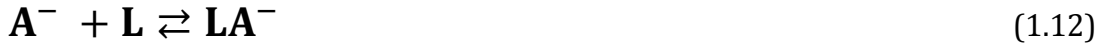
$$K_{am} = \frac{[H^+]_m [A^-]_m}{[HA]_m} \quad (1.9)$$

Bu bağıntıda $[H^+]_m$, $[A^-]_m$ ve $[HA]_m$ türlerin mobil fazdaki derişimleridir. Bir kromatografik ayırmada zayıf asitin sabit faz ile etkileşmesi ve buna özgü denge sabiti, K_{LHA} , aşağıdaki eşitlikler ile ifade edilir.



$$K_{LHA} = \frac{[LHA]_s}{[HA]_m [L]_s} \quad (1.11)$$

Burada $[LHA]_s$ ve $[L]_s$ oluşan kompleks ve sabit gazın derişimlerini göstermektedir. Oluşan anyonik tür ile kolondaki etkileşim ve buna özgü denge sabiti şu şekilde verilir.



$$K_{LA^-} = \frac{[LA^-]_s}{[A^-]_m [L]_s} \quad (1.13)$$

Bilindiği gibi bir çözünenin alıkonması, kapasite faktörü ile ifade edilir. Φ verilen bir kolonda sabit faz ve mobil fazın hacim oranlarıdır ve sabittir.

$$k = \Phi \frac{[LHA]_s + [LA^-]_s}{[HA]_m + [A^-]_m} \quad (1.14)$$

Bu son bağıntı aşağıdaki şekilde 1.11, 1.13, 1.15 bağıntılarından yararlanılarak ifade edilebilir.

$$k = \Phi \frac{K_{LHA} [L]_s + K_{LA^-} [L]_s \frac{K_{am}}{[H^+]_m}}{1 + \frac{K_{am}}{[H^+]_m}} \quad (1.15)$$

Moleküler formun kapasite faktörü ve iyonlaşan formun kapasite faktörü sırasıyla

$$k_0 = \Phi[L]_s K_{LHA} \quad \text{ve} \quad k_{-1} = \Phi[L]_s K_{LA^-}$$

olarak verilebilir. Bu bağıntılar genel eşitlikte (1.18) yerine yazılarak son denkleme son şekli verilir..

$$k = \frac{k_0 + k_{-1} \frac{K_{am}}{[H^+]_m}}{1 + \frac{K_{am}}{[H^+]_m}} \quad (1.16)$$

Bu bağıntı ile mobil faz pH'sı ve kapasite faktörleri kullanılarak bir zayıf asitin iyonlaşma sabiti hesaplanabilir.

Zayıf monoprotik bir bazın mobil fazda iyonlaşma dengesi ve bu denge için aynı yol izlenerek hazırlanan eşitlik aşağıdaki gibidir. Burada, k_0 nötral ve k_1 protonlanmış bazın kapasite faktörleridir.



$$k = \frac{k_0 + k_{-1} \frac{[H^+]_m}{K_{am}}}{1 + \frac{[H^+]_m}{K_{am}}} \quad (1.18)$$

1.9.4. Sıvı Kromatografide Mobil Faz Optimizasyonu

Sıvı kromatografik bir yöntemin geliştirilmesinde üzerinde durulacak en önemli husus, yeterli ayırmaya ulaşıldığının belirlenmesidir. Yüksek performans sıvı kromatografide ayırmanın optimizasyonu, seçiciliğin maksimum hale getirilmesini gerektirir. Kromatografik sistemin seçiciliği, kromatografik sistemde çözünen, mobil faz bileşenleri ve durgun faz arasındaki bütün etkileşimleri yansıtır. Bu etkileşimler, sıcaklık, mobil fazın yapısı, mobil faz pH'sı gibi deneysel koşullarında değiştirilmesiyle yönetilebilir. Bu faktörlerin ikisi sabit tutularak diğer değişkenin, analitin alıkonmasındaki etkisi incelenir. Seçicilik,

çözünenlerin dağılma katsayıları ile ilgilidir ve çözünenlerin kapasite faktörlerinin bir fonksiyonudur. Bu nedenle çözünenlerin alıkonma davranışlarını ve onların deneysel koşullara bağımlılığını anlamak, seçiciliğin ve devamında ayırmanın optimizasyonu için gereklidir.

Horvath ve Melander, analitik ayırmalarda ters faz sıvı kromatografi yönteminin (RPLC) sıklıkla tercih edildiğini belirtmişlerdir (Horvath ve Melander, 1977). Günümüzde LC ayırmalarının %90'ı ters faz sıvı kromatografi ile geliştirilmekte (RPLC) ve yaklaşık 600 farklı durgun faz çalışmalarda kullanılmaktadır.

Mobil faz olarak kullanılan su-organik çözücü karışımlarında polarite, mobil fazın bileşikleri elue etme gücünün bir ölçüsüdür ve çözünenin kolon ile etkileşimini belirleyen temel faktördür. RPLC'de alıkonma, mobil fazın polaritesinin artmasıyla yani su ilavesiyle artar. Bu güç çoğu kez organik çözücü-su karışımlarında organik fazın yüzdesi ile ifade edilir. SabitpH'da alıkonmanın çözücü bileşimi (ϕ) ile değişimini belirlemek üzere aşağıdaki doğrusal yaklaşım kullanılır (Schoenmakers vd., 1991).

$$\ln k_i = \ln k_0 - S\phi \quad (1.19)$$

Burada k_0 , $\phi = 0$ olduğunda (saf su veya sulu tampon çözelti mobil faz olarak kullanıldığında) ekstrapolasyonla bulunan kapasite faktörüdür. S ise eğimdir. Kapasite faktörü 1-10 arasında değilse $\ln k$ 'nın ϕ 'ye göre çizimi bir eğri verir. İkinci dereceden denklemi kullanmamak için kapasite faktörünün 1-10 arasında olması istenir.

Mobil faz, RPLC' de analitin alıkonmasının kontrolünde önemli rol oynar. Çözücü bileşiminin değişimi, organik modifiyerin tipi, pH, mobil faz katkıları (TEA ve TFA) ve tampon konsantrasyonu, kromatografik ayırmanın başarılı bir şekilde geliştirilmesi için kullanılan değişkenlerdir. Mobil faz pH' sı analitin iyonlaşmasını, hidrofobitesini ve alıkonmasını etkiler.

RPLC' de yaygın olarak kullanılan mobil fazlar su-organik çözücü ikili karışımlardır. En yaygın kullanılan organik çözücüler, metanol, THF ve asetonitrildir.

1.9.5. HPLC ayırmalarında mobil faz pH' sının etkisi

Sıvı kromatografik çalışmalarda mobil faz pH'sındaki değişimleri en az düzeyde tutabilmek ve pH'nın kapasite faktörü üzerinde etkisini incelemek için tamponlar kullanılır. Mobil faz pH'sı, çözünenlerin alıkonması üzerinde güçlü bir etkiye sahiptir ve ters faz sıvı kromatografisinde kontrol edilmelidir. Günümüzde kullanılan sıvı kromatografi kolonlarının bir kısmının pH aralıkları 1-12 arasındadır ve bu tip kolonlar mobil faz pH'sının geniş aralıkta kullanımını da sağlamaktadır. pH'nın analitin alıkonmasındaki etkileri, kullanılan tampona, derişimine, kapasitesine ve onun dedeksiyondaki etkilerine ve organik çözücüde çözünlüğüne bağlıdır. Tamponun etkin aralığında ($pK_a \pm 1$) kullanılması tercih edilir. Derişim, 10-100 mM düzeyindedir.

HPLC mobil fazında organik modifiyer olarak genellikle asetonitril, metanol ve tetrahidrofuran seçilir ve su ile ikili karışımları halinde kullanılır. Bu ortamlarda pH standardizasyonu ile ilgili çalışmalar mevcuttur (Rondinini et al. 1987). Bu ikili sistemlerde pH ayarının aynı çözücü ortamında hazırlanmış tamponla yapılması durumunda ilk seçilen tampon kimyasalı, potasyum asit fitalattır. pH iyon metrenin ayarı bu kimyasalla yapılır. Takiben tampon kimyasalı eklenmiş mobil fazın pH'sı istenen değere ayarlanır. Bilindiği gibi su-organik çözücü ikili karışımlarında hazırlanan tamponun pH'sı sudakinden farklıdır. Bu değişimin nedeni tampon kimyasalına özgü pK_a 'nın organik modifiyerin tipine ve derişimine bağlı olarak değişmesidir. Referans değer pH standard çözeltisi(RVS) olarak potasyum hidrojen fitalat çözeltisi düşünülür ve bu değer, 0,05 mol kg⁻¹ fitalat için belirlenmiştir (Rondinini et al.1987). Metanol-su ve asetonitril-su ortamında (%70'e kadar) potasyum hidrojen fitalat tamponu için çeşitli sıcaklıklarda standardpH değerleri belirlenmiştir. 0,05 m potasyum hidrojen fitalatın (KHP) su-metanol ve su asetonitril karışımlarında çeşitli sıcaklıklardaki pH değerleri çizelgelerde verilmiştir (Rondinini et al. 1987).

pH'nın sudaki pH yerine mobil fazdaki değerinin kullanılması, hem çözünenin tutulması ile pH arasındaki ilişkiye çok daha iyi uyum göstermesi hem de pH'nın sabit tutulabilme imkanını sağlamakta; bu da mobil faz polarite terimlerinin kullanılmasına imkan tanımaktadır.

Çizelge 1.1. Metanol-su karışımında 0,05 m KHP için pH_{RVS} değerleri

$t, ^\circ C$	Metanolünağırlıkça yüzdesi, %w/w ve mol kesri, x				
	10; 0,0588	20; 0,1232	50;0,3599	64;0,4999	84,2;0,7498
10	4,254	4,490	5,151	5,488	6,254
25	4,243	4,468	5,125	5,472	6,232
40	4,257	4,472	5,127	5,482	6,237

Çizelge 1.2. Asetonitril-su karışımında 0,05 m KHP için pH_{RVS} değerleri

$t, ^\circ C$	Asetonitrilin ağırlıkça yüzdesi, %w/w ve molkesri,x				
	5; 0,0226	15;0,0719	30;0,1583	50;0,3050	70; 0,5059
15	4,163	4,533	5,001	5,456	6,159
25	4,166	4,533	5,000	5,461	6,194
40	4,178	4,542	5,008	5,475	6,236

IUPAC kuralları ışığında farklı pH skalaları vardır.

Üç farklı pH skalası genellikle $^w_w pH$, $^s_w pH$ ve $^s_s pH$ olarak dikkate alınmaktadır.

- ✓ $^w_w pH$, elektrodun sulu tamponlarla kalibre edildiği bir skaladır. Bu tür skala kullanıldığında, mobil fazın sulu kısmının pH 'sı, organik modifiyerin eklenmesinden önce yapılır.
- ✓ $^s_w pH$, yine elektrodun sulu tamponlarla kalibre edildiği bir skaladır. Bu kez su-organik karışımı olan mobil fazın pH 'sı organik modifiyer eklendikten sonra ölçülür.
- ✓ $^s_s pH$ ise aynı bileşimdeki mobil fazda hazırlanmış tampon ile elektrodun kalibre edilmesidir. Mobil fazın pH 'sı sulu kısım ve organik çözücü karıştırıldıktan sonra ölçülür.

Günümüzde pH ölçümünü sulu tamponda yapmak yerine hidroorganik mobil fazda yapmak daha tercih edilmektedir. %60 (v/v)'a kadar asetonitril-su karışımlarında en sık kullanılan tampon çözeltiler için okunan s_p pH değerleri verilmiştir (Çizelge 1.3).

Çizelge 1.3. Asetonitril ortamındaki s_p pH değerleri

%MeCN Tampon	0	10	20	30	40	50	60
KH ₂ PO ₄ /Na ₂ HPO ₄	6,75	7,00	7,19	7,37	7,54	7,71	8,10
KHP/K ₂ P	5,01	5,34	5,69	6,09	6,48	6,86	7,24
KHCit. /KCit.	5,61	5,85	6,03	6,18	6,35	6,59	7,09

Fosfat ve asetat tamponları, UV bölgede HPLC için en yaygın kullanılan, 220 nm'nin altındaki dalga boylarında çalışma imkanı sağlayan kullanışlı tamponlardır. Fosfatın 3 pKa'sı vardır, bu da 3 tamponlama aralığı verir: 1,1<pH<3,1, 6,2<pH<8,2 ve 11,3<pH<13,3. Fosfat tamponu için pH 3,1 ve pH 6,2 aralığında tamponlamada bir kapasite eksikliği vardır; buna rağmen fosfatın pH'sını 5'e ayarlamak mümkündür. Bu tamponlama boşluğunu doldurmak için, asetat tamponu 3,8<pH<5,8 aralığında kapasitesi yeterli olduğu için kullanılır. Fosfat ve asetat tamponları, silika esaslı kolonlar için pH 2 <pH<8 aralığında kullanılabilir.

Fosforik asitin farklı pKa değerleri bize farklı pH aralıkları için tampon hazırlama imkanı vermektedir. Monohidrojen fosfat tamponu için s_p pH değerleri ACN(%10 - %60, v/v) Çizelge 1.4'de verilmiştir. %10 ACN (v/v) değişiminde 0,2-0,3pH birimi artış vardır.

Çizelge 1.4. Monohidrojen fosfat tamponu için farklı asetonitril derişimlerdeki s_p pH değerler

% ACN(v/v)	s_p pH						
0	2,09	3,11	4	5,12	6,11	7,01	8,9
10	2,3	3,28	4,34	5,47	6,48	7,24	9,06
20	2,48	3,46	4,56	5,69	6,69	7,46	9,26
30	2,65	3,64	4,74	5,87	6,87	7,64	9,48
40	2,96	3,91	4,92	6,12	7,12	7,89	975
50	3,24	4,18	5,32	6,34	7,33	8,15	

Tampon çözeltilerle ilgili olarak hesaplanan değerler, ağırlıkça yüzdeler için verilir. Çözeltide mol kesri veya yüzde hacimce gerekli olduğunda aşağıdaki bağıntılar kullanılarak gerekli değerler hesaplanır.

$$x_{ACN} = \frac{\left(\frac{\%W_{ACN}}{M_{ACN}}\right)}{\left(\frac{\%W_{ACN}}{M_{ACN}}\right) + \left(\frac{100 - \%W_{ACN}}{M_w}\right)} \quad (1.20)$$

x_{ACN} : ACN nin mol kesri

$\%W_{ACN}$: ACN nin yüzde ağırlığı

M_{ACN} : ACN nin molekül ağırlığı

M_w : Suyun molekül ağırlığı

HPLC de mobil faz pH'sı, özellikle iyonlaşabilen bileşiklerle çalışmada çok etkindir. Kolon seçiciliği, mobil faz pH'sının değişmesiyle alıkonma zamanının değişmesi sonucu etkilenir. Mobil faz pH'sının değişmesiyle α 'nın değişmesi esas alınarak kolon seçiciliği geliştirilir.

1.10. Yasuda-Shedlovsky Bağıntısı İle Su Ortamındaki pK_a Değerlerinin Belirlenmesi

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 yapılan hesaplama yöntemleri hakkında bilgi verilmiştir (Takacs-Novak vd., 1997; Avdeef vd., 1999; Babić, 2007). Hidroorganik çözeltilerde özellikle suca zengin bölgelerde elde edilmiş verilerden yararlanarak sudaki pK_a değerinin tahmininde çok kullanılan yöntemlerden biri, Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon yöntemidir. Mobil faz pK_a değerinden ($^s pK_a$) sudaki pK_a değerinin ($^w pK_a$) tayin edilebildiği bu yöntemde kullanılan eşitlik aşağıda verilmiştir (Yasuda, 1959; Shedlovsky, 1962).

$$^s pK_a + \log[H_2O] = a_\epsilon \epsilon^{-1} + b_\epsilon \quad (1.21)$$

Burada

$^s pK_a$: Mobil fazda analitin pK_a değeri,

ϵ : İkili karışımındaki organik çözücünün dielektrik sabiti,

a_ϵ : Lineer eşitlikten elde edilmiş eğim değeri,

b_ϵ : Lineer eşitlikten elde edilmiş kesim değeri.

Eşitlik 1.21 kullanılarak suda çözünmeyen bileşiklerin sudaki pK_a değerleri ($^w pK_a$) yeterli doğrulukta hesaplanabilir.

1.11. Mol kesri-pK_a İlişkisi İle Su Ortamındaki pK_a Değerlerinin Belirlenmesi

Mol kesri-pK_a yönteminde, mobil fazdaki organik çözücünün mol kesrine karşı mobil fazdaki pK_a ($^s pK_a$) değerleri grafiğe geçirilir ve lineer bir doğru elde edilir. Lineer doğrudan elde edilen fonksiyonun kesim noktası analitin sudaki pK_a değerini verir. Bu yöntemde mobil fazda kullanılan organik çözücünün hacimce kesrine karşılık mol kesri değerlerinin bilinmesi gereklidir (Roses ve Bosch, 2002).

Çizelge 1.5. 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 1.6. 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 1.7. 25 °C' THF-su ikili karışımı için bazı makroskopik veriler

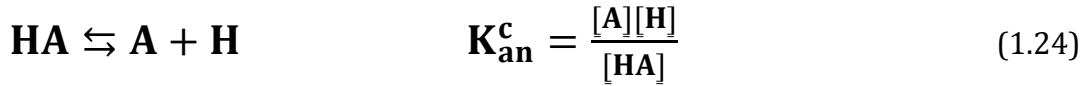
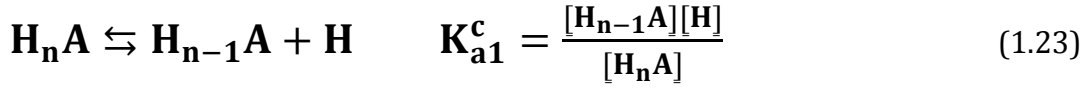
%THF (h/h)	Mol Kesri(X_{THF})	Yoğunluk (kg dm ⁻³)	pK _{Su}
0	0,000	0,991	14,00
10	0,024	0,993	14,12
20	0,053	0,989	14,31
30	0,087	0,983	14,52
40	0,129	0,974	14,79
50	0,182	0,964	15,13
60	0,250	0,950	15,56
70	0,342	0,937	16,14
80	0,471	0,921	-
90	0,667	0,903	-
100	1,000	0,882	34,70

1.12. n bar Yöntemi İle pK_a Değerlerinin Belirlenmesi

İyonlaşma sabitinin belirlenmesindeki yaklaşımlardan biri de n bar' dır.

$$nH = \frac{nc_{tot} - [Na^+] - [H_3O^+] + [OH^-]}{c_{tot}} \quad (1.22)$$

Burada c_{tot} asitin konsantrasyonu, n karboksilik asit sayısı Na^+ ilave edilen $NaOH$ konsantrasyonu H_3O^+ asit veya suyun iyonlaşmasından gelen serbest hidronyum iyonu konsantrasyonu suyun iyonlaşmasından gelen ve asidik ortamda ihmal edilebilir olan hidroksit konsantrasyonudur.



$$nH = \frac{2[H_2A] + [HA]}{[H_2A] + [HA] + [A]} \quad (1.25)$$

$$K_{a1}^c = \frac{[A][HA]}{[H_2]} \quad (1.26)$$

$$K_{a2}^c = \frac{[A][H]}{[HA]} \quad (1.27)$$

$$\frac{nH-1}{nH} [H_3O^+] = -K_{a2}^c + \frac{1}{K_{a1}^c} [H_3O^+]^2 \frac{2-nH}{nH} \quad (1.28)$$

Bu formül; H_2A türü bir dikarboksilik asit için türetilirse

$$nH = \frac{[H_2A] + [HA]}{[H_2A] + [HA]} \quad (1.29)$$

$$\frac{2-nH}{nH-1} = K_{a1}^c \frac{1}{[H_3O^+]} \quad (1.30)$$

$$\frac{1-nH}{nH} = K_{a2}^c \frac{1}{[H_3O^+]} \quad (1.31)$$

$$nH = \frac{[HA]}{[HA]+[A]} \quad (1.32)$$

$$\frac{1-nH}{nH} = K_{a2}^c \frac{1}{H_3O^+} \quad (1.33)$$

$\frac{1-nH}{nH}$ y ekseninde ve $\frac{1}{H_3O^+}$ x ekseninde olacak şekilde grafiğe geçirilerek iyonlaşma sabitleri belirlenir.

1.13 Henderson Hasselbalch Yöntemi İle pK_a Değerlerinin Belirlenmesi

Henderson Hasselbalch ifadesine dönüştürülerek kullanılır.

$$A_A - A$$

$$pK_a = pH + \log \text{-----}$$

$$A - A_{HA}$$

Log (A- A_{HA})/ (A_A -A) değerleri y ekseninde ve pH, x ekseninde kullanılarak hazırlanan doğrusal grafiğin x eksenini kestiği değer, -pK_a dır. Logaritmik değerler (-1) - (+ 1) aralığında düşünülür.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

Lara vd. (2005), promazin hidroklorür, prometazin hidroklorür ve tiazinamiyum metisülfatın kantitatif analizinde kapiler elektroforez yöntemiyle validasyonunu gerçekleştirmişlerdir. Kapiler elektroforetik ayırmada parametreler tampon pH'sı ve derişimi, asetonitril yüzdesi, kapiler sıcaklığı ve uygulanan voltaj olarak seçilmiş ve bileşiklerin ayırımı merkezî kompozit dizayn yaklaşımıyla incelenmiştir. Ayırma için optimum koşulda pH 8 de 100 mM tris tamponuyla %15 ACN ortamında 58,5 cm'lik kapilerle çalışılmış, 25⁰ C sıcaklıkta 30 kV voltaj uygulanmıştır ve bileşiklerin ayırımı bu koşulda 5 dakikada gerçekleştirilmiştir. Dalga boyu 254 nm olarak seçilen çalışmada yöntemin kesinliği RSD % 5,3 ve doğruluğu iç standart yöntemiyle elde edilen LOD değerleri TMS için 2.8 mg/ml prometazin ve promazin için 3.3 mg/ml olarak belirlenmiştir. Fenotiazinlerin pKa değerleri prometazin için 9,1 , promazin için 9,4 olarak bulunmuştur. Metot tablet formülasyona başarıyla uygulanmıştır.

Lin vd. (2003), çalışmalarında tampon pH'sının yapıca benzer 13 fenotiazinin elektroforetik davranışına etkisini incelemişler ve kapiler elektroforez yöntemiyle pKa değerini belirlemişlerdir. Sonuçlar çalışılan pH aralığında piperazin fenotiazinlerin , alifatik yan zincirli ve piperidin fenotiazinlerden oldukça farklı davrandığını ortaya koymuştur. Bu bileşiklerin ayırımında tampon, pH 2,5-3,5 aralığında tercihli olarak seçilebilir. Fenotiazinlerin pKa değerleri, fenotiazin halkasına 10 pozisyonunda farklı tip substituentler bağlanmasıyla belirlenmiştir.

Çizelge 2.1. Alkil yan zincirli ve piperidin fenotiazinlerin pKa değerleri

Fenotiazinler	Literatür pKa	pKa Değerleri	
Promazine	9,1	10	6,5
Etopropazin	9.6	10,30	6,0
Prometazin	9.4	10,30	6,35
Triflupromazin	9.2	10,22	6,45

Çizelge 2.1. Alkil yan zincirli ve piperidin fenotiazinlerin pKa değerleri (Devam)

Asepromazin	9,30	10,22	6,35
Trimeprazin	9,0	10,12	6,32
Klorpromazin	9,30	10,10	6,40
Metorimeprazin	9,2	10,05	6,50
Tioridazin	9,50	9,75	6,10

Saracino ve arkadaşları (2008), sıvı kromatografinin kulometrik dedeksiyonla kullanıldığı yeni bir analitik metot geliştirmişler ve seçtikleri dört fenotiazin bileşiğin (klorpromazin, promazin, flufenazin ve levomeprazon) insan kanında tayinini gerçekleştirmişlerdir. Tercih edilen kolon Discovery pentafluorofenil olup mobil faz % 32 ACN , pH 1,9 fosfat tamponu içermektedir. İç standart olarak prometazin seçilmiştir. Dedeksiyon oksidasyon potansiyeli + 0,500 V' da gerçekleştirilmiştir. Geri kazanım değerleri % 91 den büyüktür. Dedektör cevabı Klorpromazin, promazin ve levomeprazon için 0,5- 250 ng/ml , flufenazin için 0,2- 4 ng/ml plazma konsantrasyonunun üzerinde doğrusaldır. Çalışılan bileşiklerin alıkonma zamanları promazin için 13,4 mL/dakika, flufenazin için 14,0 mL/dakika, levomepromazin için 20,3 mL/dakika ve klorpromazin için 25,8 mL/dakika şeklindedir.

Tanaka vd. (2007), çalışmalarında 12 fenotiazinin (klorpromazin ,flufenazin, levomepromazin, perazin, perfenazin, proklorperazin, profenamin, prometazin,propeisiyazin , tiyoproperazin, tioridazin ve trifluperazinin) insan kanında eş zamanlı analizinde metot geliştirmişlerdir. Ayırma C18 Inertsil ODS-SP (250 mm X 4.6 mm I.D., parçacık boyutu 5 mm) kolonda gerçekleştirilmiştir. Mobil faz bileşimi ACN-metanol-30mM NaH₂PO₄(300:200:500 v/v/v) olup pH:5,6 'da 0,9 mL/dakika akış hızında ve 250 nm' de gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin serum örneklerindeki geri kazanımı % 87,6-99,8' dir. Regresyon eşitlikleri lineer olup dedeksiyon limiti 3.2-5.5 ng/mL'dir.

Domańska vd. (2011), yapıca benzer 6 fenotiazinin su,etanol ve 1-oktanol deki çözünürlüğünü (klorpromazin, promazin, flufenazin, tioridazin, trifluperazin,

triflupromazin) 290K-350 K sıcaklık aralığında, sabit pH' da dinamik metot ve UV-vis metotla belirlemiştirlerdir. Bileşiklerin iyonlaşma sabitleri Bates-Schwarzenbach metoduyla 298,15 K sıcaklıkta tampon çözeltide belirlenmiştir. Çalışmadan elde edilen pKa değerleri klorpromazin için 9,15; flufenazin için 10,01; promazin için 9,37; tioridazin için 8,39, trifluperazin için 8,97; triflupromazin için 9,03' dür. pKa ölçümleri Bates-Schwarzenbach metoduyla UV spektrofotometresiyle gerçekleştirilmiştir. Bileşiklerin çözünürlükleri su, etanol,1-oktanol içerisinde gerçekleştirilmiştir. Çalışmada aynı zamanda bileşiklerin temel termal özellikler ientalpi erime vs.' de belirlenmiştir.

Lara vd. (2006), fenotiazinlerin tayinini tablet farmasotik formda ve idrarda kemilüminesansla birlikte kapiler elektroforez yöntemi kullanarak gerçekleştirmişlerdir. Çalışmalar elektroforetik ayırmanın optimizasyonu için öncelikle tampon bileşiminin etkisini incelemiştirlerdir. Fenotiazin türevlerinin pKa değerlerinin 9 civarında olduğundan yola çıkarak 20 mM sodyum tetraborat, 100 mM Tris, 20 mM sodyum karbonat, and 50 mM amonyum asetat pH 8.5' de çalışmışlardır. pH değerleri 8-10 aralığında olduğunda alıkonmanın 1,5'den yüksek olduğu görülmüş, pH 9'un üzerinde pik şekillerinde bozulma olduğundan optimum pH olarak 8,5 seçilmiştir.

Madaj vd. (2005), fenotiazin türevlerinden promazin, klorpromazin, levomepromazin kan ve idrar numunelerinde karşılaştırmalı tayinlerini ters faz sıvı kromatografi ve non-aqueous kapiler elektroforez yöntemleriyle gerçekleştirmişlerdir. HPLC ile tayinde LichroCART (125X4 mm) kolon seçilmiştir. Gradient çalışmada mobil faz başlangıçta % 80, 0,01 M fosforik asit (pH:2,3) ve % 20 ACN iken 10 dakika içinde akış hızı 1ml/dakika olup dalga boyu 254 nm' de gerçekleştirilmiştir.

Sanlı S. (2013), çalışmasında tipik antipsikotik ilaçlardan yapıca benzer sertindol, olanzapin, flufenazin, tioridazin, pimozid, mesoridazon ve ziprosidonun iyonlaşma sabitlerini suda, % 10, 20, 30, 40, 50 ACN-su ikili karışımlarında tayin etmiştir. UV-pH titrasyonu, 298,15 K sıcaklıkta gerçekleştirilmiş ve Kamlet Taft solvatokromik parametreleri; α , β , π^* ile korele

edilmiştir. Çalışılan bileşiklerin absorpsiyon spektrumu pH 2-12 arasında çeşitli pH'larda 210-350 nm' de kaydedilmiştir. Elektrot sisteminin kalibrasyonu GRAN metoduyla gerçekleştirilmiştir. Deneyler sonucunda elde edilen veriler STAR programı ile değerlendirilmiştir.

Çizelge 2.2. Bileşikler için belirlenen eşitlikler ve regresyon katsayıları

Bileşik	Eşitlik	Regresyon Katsayısı
Sertindol	$y=-1,7x(0,10)+8,53(0,02)$	R=0,996
Olanzapin (pK _{a1})	$y=-2,10x(0,15)+5,52(0,02)$	R=0,991
Olanzapin (pK _{a2})	$y=-1,91x(0,11)+8,78(0,02)$	R=0,994
Flufenazin (pK _{a1})	$y=-1,59x(0,23)+3,30(0,04)$	R=0,980
Flufenazin (pK _{a2})	$y=-1,25x(0,06)+8,04(0,01)$	R=0,998
ziprosidon	$y=-1,7x(0,10)+6,94(0,02)$	R=0,995
mesoridazon	$y=-2,92x(0,26)+9,71(0,04)$	R=0,985
Tioridazin	$y=-3,66x(0,45)+9,91(0,08)$	R=0,985

Çizelge 2.3. Bileşikler için belirlenen Kamlet-Taft eşitlikleri

Bileşik	Kamlet-Taft Eşitlikleri
Sertindol	$pK_a=5,72 (0,13)+ 2,52 (0,13) \pi^*$
Olanzapin	$pK_a=2,14 (0,01)+ 2,44 (0,15) \pi^*+ 0,61 (0,09)\alpha$
Flufenazin	$pK_a=5,97 (0,20)- 2,40 (0,13) \pi^*$
Tioridazin	$pK_a=3,78 (0,33)+ 5,48 (0,33) \pi^*$
Pimozid	ND
mesoridazon	$pK_a=5,05 (0,12)+ 3,19 (0,18) \pi^*+ 1,01 (0,11)\alpha$
ziprosidon	$pK_a=4,32 (0,18)+ 2,32 (0,18) \pi^*$

Shetti vd. (2011), antipsikotik ilaçlardan klorpromazin, trifluoperazin ve triheksifenidil hidroklorürün LC-MS/MS yöntemiyle kan plazmasında tayinini geliştirmiş ve valide etmişlerdir. İç standart olarak ornidazol seçilmiştir. İlaçların ve iç standardın plazmadan ekstraksiyonu sıvı sıvı ekstraksiyonu ile gerçekleştirilmiştir. Ayırma HYPERSIL Hypurity C18 (50X4.6)mm 5 M kolonla gerçekleştirilmiş mobil faz içeriği % 70 asetonitril % 30 amonyum asetat tamponu olacak şekilde hazırlanmıştır. Akış hızı 0,4 mL/dakikadır. Bileşik kütle

spektroskopisinin elektro spray iyonizasyonu ile iyonlaştırılmıştır. Her üç ilaç için cevap lineer olup 0,1-100 ng/mL ve LC-MS/MS yöntemiyle elde edilen LOQ değerleri 0,1 ng/mL olarak belirlenmiştir. Gün içi günler arası % 10 un altında ve yöntemin doğruluğu %+ 5,0 - %-5,0 arasındadır.

Zhang vd. (2007) Antipsikotik ilaçlardan klorpromazin, olanzapin ziprosidon, haloperidol, risperidon ve onun aktif metaboliti 9-hidroksirisperidonun sıvı kromatografi ile rat plazmasında tayininde yöntem geliştirmiş ve valide etmişlerdir. İmipraminin iç standart olarak kullanıldığı çalışmada analitler rat plazmasından sıvı sıvı asit çözeltisi geri ekstraksiyon tekniğiyle ekstrakte edilmiş ve bileşikler Agilent Eclipse XDB C8 (150 mm X 4.6 mm i.d., 5mm) kolonla, mobil faz olarak %0.05 trietilamin asetik asitle (pH 5,86' ya ayarlanmış) asetonitril/30 mm amonyum asetat gradient elüsyonla ayrılmıştır. Sistem uygunluk parametreleri açısından LOQ değeri 2.0 ng/mL olup korelasyon katsayısı her analit için 0,9982 den büyüktür. Gün içi günler arası kesinlik ve doğruluk % 7.44 den büyüktür.. Geri kazanım her analit için % 74.8' in üzerindedir.

Dhabab (2011), çalışmasında klorpromazin ve trifluperazinin tablet formülasyonunda eş zamanlı tayinini HPLC yöntemi ile gerçekleştirmiştir. Çalışmada mobil faz içeriği sikloheksan: metanol: dimetilamin (5: 1: 1) olacak şekilde hazırlanmış, akış hızı 1,5 mL/dakika ve dalga boyu 254 nm olarak seçilmiştir. Deneysel çalışmalar Polaris 5 µ C 18 A (50X 2mm) kolonla gerçekleştirilmiştir. Seçilen yöntemde bileşiklerin alıkonma zamanları klorpromazin için 7, 18, triflupreazin için 9,62'dir. Yöntemde geri kazanım % 98,6 - % 96,8 ; RSD değerleri % 1,19- % 1,95 olarak bulunmuştur. Bu sonuçlar deneysel çalışmanın ve yöntemin uygun olduğunu göstermiştir.

Franke vd. (1998), fenotiazin bileşiklerden prometazin, promazin, klorpromazin, triflupromazin, levomepromazin, tioridazin, proklorperazin, trifliperazin, tietilperazin, perfenazin ve kalsiyum kanal antogonisti bileşiklerden verapamil, gallopamil, fendilin, amlodipin, nikardipinin iyonlaşma ve dağılma katsayılarını potansiyometrik metotla tayin etmişlerdir. Bileşiklerin pKa ve log P değerleri potansiyometrik titrasyonla 25°C de gerçekleştirilmiştir.

İyonik şiddet 0,15 M KCl kullanılmıştır. Log P ve pKa ölçümleri ayrı deneylerle gerçekleştirilmiş ve titre edilen ilaçların derişimleri 0,08 ve 0,15 mM aralığında tutulmuştur. Dioksanın derişimi % 15-40 ve fenotiazinler için ilaveten % 20-50 metanol kullanılmıştır

Çizelge 2.4. Ölçülen pKa değerleri ve literatürde verilen pKa değerleri

Bileşik	Dioksan ortamı	Metanol ortamı	Su ortamı	Literatür Değerleri
Prometazin	8,86±0,01	9,07±0,08	-	9,11 9,10
Promazin	9,00±0,05	8,92±0,09	-	9,28 9,40
Klorpromazin	9,15±0,09	9,22±0,13	-	9,39 9,30
Triflupromazin	8,95±0,03	9,07±0,19	-	9,20 9,20
Levomepromazin	9,03±0,09	9,07±0,16	-	9,19
Tioridazin	9,19±0,06	9,25±0,07	-	9,50
Proklorperazin	3,77±0,16 8,21±0,13	3,73±0,04 7,96±0,09	3,79±0,01	3,73 3,78 8,10
Trifluperazin	3,70±0,11 8,11±0,06	3,95±0,35 8,38±0,13	3,91±0,01	3,60, 3,90 8,10 8,10
Tietilperazin	3,65±0,02 8,00±0,09	3,81±0,27 8,06±0,06	3,80±0,01	8,12
Perfenazin	3,97±0,09 7,90±0,09	3,98±0,05 7,82±0,06	3,59±0,01	3,70 7,80
verapamil	8,68±0,09	-	-	8,60 8,92
Gallopamil	8,57±0,06	8,42±0,01	-	-
Fendilin	9,04±0,03	-	-	-
Amlodipin	9,31±0,10	-	-	9,02
Nikardipin	7,28±0,10	-	-	7,20 7,33

Pallicer (2011), organik bileşiklerin oktanol-su dağılma katsayılarını belirlemede kromatografik metot bazların hidrofobisitelerini tahmin etmede farklı kimyasal davranışı olan pKa değerleri 9'dan büyük kuvvetli bazik yapıllı başlıca ticari ilaçlarda mobil fazlar çözücülerin iyonlaşmasından kaçınmak için yüksek pH'da tamponlanmış ve üç farklı tipte kolonla çalışmışlardır. Bu kolonlar Gemini NX, XTerra RP-18 ve XTerra MS C18' dir. Deney sonuçları her üç kolonun da deneyde çalışılan bileşiklerin çoğu için başarılı log $P_{o/w}$ değerleri Çalışmacılar Deneyde çalışılmış bileşiklerden fenotiazin yapıllı klorpromazinin log $P_{o/w}$ değerini 5,35 ve pKa değerini ise 9,21 olarak vermişlerdir.

Karpińska vd. (1996), 2-10 disübstitüe fenotiazin türevlerinin analitik özelliklerini anlattıkları derlemelerinde bu ilaçların karakteristik yapılarından

dolayı birçok değerli özellik gösterdiğini belirtmişlerdir. Kolaylıkla oksitlenebilen bu bileşikler, 100 °C' ye kadar termal kararlılık göstermekte bu sıcaklığın üstünde bozunmaya uğradığını bildirmişlerdir. Çalışmacıların fenotiazin türevlerinden promazin, klorpromazin, triflupromazin, metopromazin ve metilpromazinin potansiyometrik ve 2. türev spektroskopik yöntemle elde edilen pKa değerleri Çizelge 2.5' de verilmiştir.

Çizelge 2.5. Fenotiazinlerin pKa değerleri

Bileşik	pKa	
	Potansiyometri	2. Türev spektroskopi
Promazin	9,42±0,02	9,40±0,02
Klorpromazin	9,36±0,05	9,35±0,02
Triflupromazin	9,21±0,03	9,21±0,02
Metopromazin	9,41±0,03	
Metilpromazin	9,36±0,03	

Chen vd. (2002), çalışmalarında yapıca benzer fenotiazinlerin ayrılma ve alıkonma davranışlarına tampon pH' sı ve β siklodekstrin konsantrasyonunun etkilerini siklodekstrin modifiyeli kapiler zone elektroforez yöntemiyle fosfat altyapılı elektrolitle düşük pH değerinde araştırmışlardır. Çalışmada seçilen fenotiazinlerin ayrımı şiral analitlerin enantiomerlerini de içerecek şekilde 8 mM dan düşük konsantrasyonlarda β siklodekstrin ve hidroksipropil β siklodekstrini elektrolit modifiyeri veya sinyal seçici olarak kullanarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçlar fenotiazinlerin β siklodekstrinle oldukça güçlü etkileştiğini ve bu bileşiklerin ayrımının etkili bir şekilde gerçekleştirilmesi için pH 3'de fosfat tamponuna 0,3 mM β siklodekstrin veya 0,5 mM hidroksipropil β siklodekstrin ilavesiyle sağlanabileceğini göstermiştir. Bütün kapiler elektroforez ayırmaları 240 nm' de uncoated fused 60.2 cmX 50 μ m I.D. kapilerle gerçekleştirilmiştir.

Venkatesh vd. (2010), klorpromazinin tayini için HPLC yöntemi geliştirilip valide etmişler ve tablet formda klorpromazin kararlılık çalışmalarını gerçekleştirmişlerdir. Kolon olarak Zorbax Extended C18 'in (250 X 4,6 mm X 5µm 10⁰ A) tercih edilen çalışmada yöntem , 25 °C' de ICH protokolüne uygun şekilde geliştirilmiştir. Linerlik için standart madde klorpromazin hidroklorür seçilmiş ve 1 ppm- 200 ppm aralığında çalışılmıştır. Korelasyon katsayısı 0,99 ve % RSD 0,10- 1,11 aralığındadır. Tampon çözelti 1 litrede 2,72 gr potasyum dihidrojen orto fosfat ve 5 mL trietilaminle pH 3,1 e ayarlanarak hazırlanmıştır. Mobil faz içeriği % 35 asetonitril, % 65 tampon şeklindedir.

3. MATERYAL VE YÖNTEM

Bu bölümde alifatik yan zincirli fenotiazin türevlerinden; prometazin, promazin klorpromazin, triflupromazinin iyonlaşma/protonasyon sabitlerinin, su-asetonitril ikili karışımlarında potansiyometrik, spektroskopik ve ters faz sıvı kromatografik yöntemlerle tayininde kullanılan cihazlar ve kimyasallar hakkında bilgi verilmiştir. Çözücü olarak asetonitril seçilmiştir.

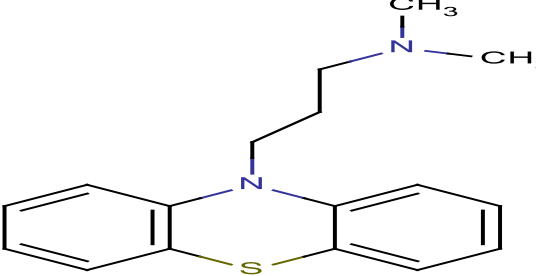
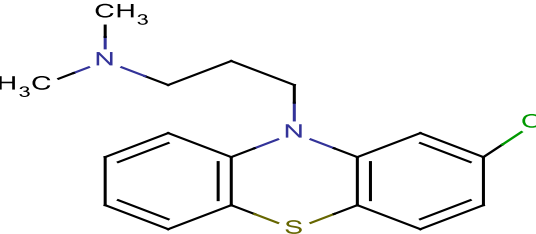
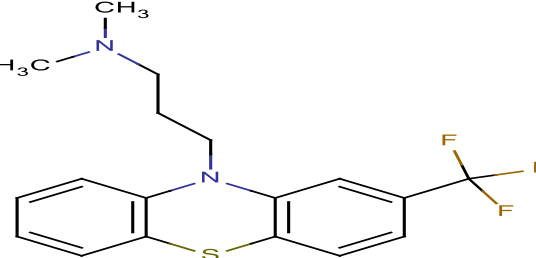
3.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Deneyleerde kullanılan bütün kimyasal maddeler, analitik veya HPLC saflıktadır. Bu tezde çalışılan fenotiazinler ve bunlar ile ilgili bilgiler, Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Çizelge 3.1. Potansiyometrik, spektroskopik ve kromatografik çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler

Adı	Kullanım amacı	Açıklama
Potasyum hidrojen fitalat	Elektrot kalibrasyonu için referans standart	Merck (Referans Değer Standardı)
Fosforik asit	Mobil faz pH'sının ayarlanması	Merck, Analitik saflıkta
Sodyum hidroksit	Mobil faz pH'sının ayarlanması	Merck, Analitik saflıkta
Urasil	Kolonda tutunmayan türün kolonu terk etme zamanını belirlemede	Merck, Analitik saflıkta
Potasyum hidroksit	Titrant (titrisol)	Merck, Analitik saflıkta
Potasyum klorür	İyonik şiddet ayarlayıcı	Merck, Analitik saflıkta
Hidroklorik Asit	Hücre potansiyelinin belirlenmesi	Merck, Ayarlıçözelti (titrisol)

Çizelge 3.2. Tezde çalışılan fenotiazin bileşiklerin kimyasal yapısı ve özellikleri

Bileşik Adı	Kimyasal Yapısı	Özellikler
Prometazin $C_{17}H_{20}N_2S$		CAS No 58-33-3 Sigma-Aldrich HPLC saflıkta > %99,8 UV@ 240 nm
Promazin $C_{17}H_{20}N_2S$		CAS No: 53-60-1 Sigma-Aldrich HPLC saflıkta > %99,8 UV@ 240 nm
Klorpromazin $C_{17}H_{19}ClN_2S$		CAS No: 69-09-0 Sigma-Aldrich HPLC saflıkta > %99,8 UV@ 250 nm
Triflupromazin $C_{18}H_{19}F_3N_2S$		CAS No:78439-06-2 Sigma-Aldrich HPLC saflıkta > %99,8 UV@ 250 nm

3.2. Potansiyometrik Titrasyonlar

3.2.1. Potansiyometrik titrasyonlarda kullanılan cihazlar

pH / iyon Metre

Potansiyometrik titrasyonlarda pH ölçümlerinde Mettler Toledo MA 235 pH/iyon analiz cihazı kullanılmıştır. Mettler Toledo In Lab 413 Ag/AgCl kombine cam elektrottan yararlanılmıştır. Asetonitril-su ikili karışımlarında primer standart referans çözeltilerin pH değerlerinin belirlenmesi, 0,05 mol/kg potasyum hidrojen fitalat çözeltisi kullanılarak ve 298,15 K referans alınarak kombine pH elektrodu ile yapılmıştır. Organik çözücünün derişimine ait başlangıç pH değeri teorik olarak hesaplanmıştır. Cihaz bu değer dikkate alınarak kalibre edilmiştir. pH ölçümlerinde sıcaklık $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ de sabit tutulmuştur.

Potansiyometrik yöntemle pK_a tayininde kullanılan çözeltiler

Potansiyometrik titrasyonlar, asetonitrilin dört farklı derişiminde gerçekleştirilmiştir.

%35 (v/v) Asetonitril-su İkili Karışımı

100 mL'lik stok ortam için 65 mL su alınmış ve üzerine 35 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir.

%40 (v/v) Asetonitril-su İkili Karışımı

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

%45 (v/v) Asetonitril-su İkili Karışımı

100 mL'lik stok ortam için 55 mL su alınmış ve üzerine 45 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril - su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir.

%50 (v/v) Asetonitril-su İkili Karışımı

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

İyonik Şiddet Ayarlayıcı

Her bir ortamda iyonik şiddeti ayarlamak üzere yukarıda hazırlanışı belirtilen çözücü karışımlarına 0,1 M derişimi sağlayacak şekilde KCl eklenmiş ve manyetik çalkalayıcı kullanılarak katının çözünmesi sağlanmıştır.

Asit Çözeltisi

1 M standart hidroklorik asit (Titrisol çözeltisi), ortamın organik modifiyer yüzdesine uygun olarak 0,1 M'a seyreltilmiştir.

Baz Çözeltisi

1 M standart KOH (Titrisol çözeltisi), çalışılan organik modifiyer-su ikili karışımında 0,050 M olacak şekilde seyreltilerek titrant olarak kullanılmıştır. Çözelti, $2 \cdot 10^{-3}$ M KHP çözeltisi kullanılarak ayarlanmıştır.

Fenotiazinlerin Çözeltileri

Promazin ve klorpromazinin standart çözeltileri, $2,0 \cdot 10^{-3}$ M derişiminde olacak şekilde asetonitril-su ikili karışımında hazırlanmış ve çözelti çift cidarlı hücreye alınarak potansiyometrik yöntemle titre edilmiştir.

Bileşiklerin protonasyon sabitlerinin tayininde, %35, %40, %45, %50 (v/v) derişimde su-asetonitril bulunan ortamlarda çalışılmış ve iyonik şiddet ayarlamak üzere 0,1 M derişiminde KCl kullanılmıştır. Fenotiazinlerin, titrasyonlarından önce titrant olarak kullanılacak KOH çözeltisi, 30 mL 0,05 M potasyum asit fitalat çözeltisinin KOH ile potansiyometrik yöntemle titrasyonu ile ayarlanmıştır. Asit, ayarlı baz ile titre edilerek ayarlanmış, karbonat hatasının olmadığı belirlenmiştir.

3.3. Spektroskopik Titrasyonlar

3.3.1. Spektroskopik titrasyonlarda kullanılan cihazlar

Spektrofotometrik ölçümler Perkin-Elmer LAMBDA 25 spektrofotometresiyle gerçekleştirilmiştir. Bütün spektrofotometrik titrasyonlar 25 ± 0.1 °C' de 80 mL kapasiteli titrasyon hücresinde gerçekleştirilmiştir.

Spektroskopik titrasyonlarda, pH ölçümlerinde Metleer Toledo MA 235 pH/iyon analiz cihazı kullanılmıştır. Metleer Toledo InLab 413 Ag/AgCl kombine cam elektrottan yararlanılmıştır. pH ölçümlerinde sabit sıcaklık banyosu (HETO CBN 8-30 ve HETO HMT 200 sıcaklık kontrol ünitesi) kullanılarak 25 °C \pm 0,1 sıcaklıkta çalışılmıştır. Potasyum asit fitalat çözeltisi kullanılarak KOH çözeltisinin ayarı, HCl çözeltisinin ayarlı baz ile titrasyonu ve böylece elektrodun E_0 ve eğim değerlerinin hesaplanması $1,0 \times 10^{-4}$ M' lık çalışılan bileşiklerin % 35 asetonitril-su ikili karışımında hazırlanan çözeltilerinin titrasyonu, titrasyonla ilgili verilerin değerlendirilmesi ve STAR programı (Beltran vd., 1993) ile pK_a değerinin tayini gerçekleştirilmiştir. Titrasyon verileri kullanılarak çeşitli yaklaşımlardan yaklaşık pK_a değerleri hesaplanmış ve bu değerler STAR programına tahmini pK_a olarak önerilerek ve bileşiklerin pK_a değerleri hesaplanmıştır. Değerler ayrıca absorbans-pH ilişkisi dikkate alınarak NLREG programı ile hesaplanmıştır.

3.3.2. Spektroskopik yöntemle pK_a tayininde kullanılan çözeltiler

Promazin, prometazin, klorpromazin ve triflupromazinin fonksiyonel grup sabitlerinin spektroskopik yöntemle tayini %35 ACN içeren asetonitril-su ikili karışımında gerçekleştirilmiştir.

% 35 (v/v) Asetonitril-Su İkili Karışımı

Bileşiklerin 2.10^{-3} M' lık stok çözeltisinden 1.10^{-4} M a seyreltilmiş ve 40 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı 0,05 M KOH ile titre edilmiştir.

İyonik şiddet ayarlayıcı

Her bir ortamda iyonik şiddeti ayarlamak üzere KCl kullanılmıştır. Bu amaçla su ortamında 0,1 M derişimi sağlayacak şekilde 1 M'lık KCl çözeltisinden ilave edilmiştir.

Asit çözeltisi

1 M standart hidroklorik asit (titrisol) çözeltisi, sulu ortamda 0,05 M' a seyreltilmiştir.

Baz çözeltisi

1 M standart KOH (titrisol) çözeltisi, su ortamında 0,05 M olacak şekilde seyreltilerek, asit çözeltisi ile ayarlanmış ve titrant olarak kullanılmıştır.

Potasyum Asit Fitalat çözeltisi (KHP)

2.10^{-3} M KHP çözeltisi çalışılan ortama uygun şekilde hazırlanmış ve KOH ayarında kullanılmıştır.

3.4. Kromatografik Çalışmalar

3.4.1. Yüksek performans sıvı kromatografisi cihazı

Tezde çalışılan bileşiklerin sıvı kromatografik davranışlarının incelenmesinde ve iyonlaşma sabitlerinin tayininde, Shimadzu marka HPLC cihazı kullanılmıştır. Sistemde, pompa (LC20 AD), dedektör (SPD-20A), kolon fırını (CTO-20AC) ve gaz giderme ünitesi (DGU-20A) bulunmaktadır. Bileşiklerin pik simetrisi ve alıkonma davranışları incelendiğinde, %30, %40, %45 (v/v) asetonitril-su ortamında Cogent Phenyl Hydrate (250 mm, 4,6 mm ID, S-4 μ m) kolon tercih edilmiştir. Enjeksiyon hacmi, 20 μ L; dalga boyu (λ) promazin ve prometazin için 250 nm; klorpromazin ve trifulpromazin için 254 nm'dir.

Çalışma akış hızı 1,0 mL/dakika olup kolon sıcaklığı 25°C'dir. Kapasite faktörlerinin hesaplanmasında kullanılacak t_0 değeri urasilin mobil fazdaki çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir; dalga boyu (λ) 210 nm olacak şekilde çalışılmıştır. Çalışılan mobil fazlara 100 mM fosforik asit olacak şekilde derişik fosforik asit ilave edilmiş ve NaOH ilavesi ile mobil fazın pH'sı 2,30; 2,50; 2,70;

2,90; 3,10; 3,50; 3,90 olacak şekilde ayarlanmıştır. Her bir bileşik ve urasil için iki tekrarlı enjeksiyonlarda elde edilen ortalama alıkonma zamanları ile kapasite faktörleri hesaplanmıştır. Kapasite faktörünün pH ile değişimi, sigmoidal davranış gösterir. Bu sigmoidalin orta noktasındaki pH değeri, o bileşiğin çalışılan ortamdaki iyonlaşma sabitini verir. Kapasite faktörü-pH ilişkisi NLREG programı ile değerlendirilerek bileşiklerin pK_a değerleri hesaplanmıştır.

3.4.2. 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. Potasyum hidrojen fitalat, IUPAC' a göre asetonitril-su ikili karışımlarında elektrot kalibrasyonu için önerilen kimyasaldır. Bu nedenle referans standart çözelti olarak seçilmiştir. Potasyum hidrojen fitalat çözeltisi ile ayarlanan 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. Mobil faz pH' sının ayarlanması esnasında sıcaklık 25°C ± 0,1°C' de sabit tutulmuştur.

3.4.3. Kullanılan çözeltiler

3.4.3.1. pK_a tayininde kullanılan fenotiazin çözeltileri

Kromatografik yöntemle pK_a değerlerinin tayini yapılan promazin prometazin klorpromazin ve trflupromazinin her biri 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. Enjeksiyonlar her bir bileşik için ikişer kez yapılarak ortalama alıkonma zamanları belirlenmiştir. Fenotiazinlerin iyonlaşma/protonasyon sabitlerinin tayini için % 30; 40 ve 45 (h/h) asetonitril-su ikili karışımlarında çalışılmıştır.

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

100 mL'lik stok ortam için 70 mL saf su alınmış ve üzerine 30 mL asetonitril ilave edilmiştir. Çözeltiyi bu şekilde hazırlayarak asetonitril-su ikili karışımlarında hacim büzülmesinden gelen olumsuz etki bertaraf edilmiştir. Mobil faza 100 mM derişimde olacak şekilde H₃PO₄ (% 85 (a/a) ; 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran su-asetonitril karışımında hazırlanmış 1 M NaOH' den ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerleri 2,30; 2,50; 2,70; 2,90; 3,10; 3,50; 3,90 olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Mobil fazlar ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

%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 100 mM derişimde olacak şekilde H₃PO₄ (% 85 (a/a) ; 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran su-asetonitril karışımında hazırlanmış 1 M NaOH' den ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerleri 2,30; 2,50; 2,70; 2,90; 3,10; 3,50; 3,90 olan mobil fazlar 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 100 mM derişimde olacak şekilde H₃PO₄ (% 85 (a/a) ; 98 g/mol; 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 100 mM derişimde olacak şekilde H₃PO₄ (% 85 (a/a) ; 98 g/mol; 1,71 g/mL) ilave

edilmiştir. Bu ortama aynı derişimde asetonitril bulunduran su-asetonitril karışımında hazırlanmış 1 M NaOH' den ilave edilerek çalışmada etkisi incelenmek istenen farklı pH değerleri 2,30; 2,50; 2,70; 2,90; 3,10; 3,50; 3,90 olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Mobil fazlar ultrasonik karıştırıcıda degaze edildikten sonra kullanılmıştır.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, fenotiazinlerden iyonlaşma/protonasyon sabiti tayin edilecek bileşikler, promazin, prometazin, klorpromazin ve triflupromazin olarak seçilmiştir. Yapılan literatür taramasında, bu tez çalışması için seçilen bileşiklerin, potansiyometrik, spektroskopik ve ters faz sıvı kromatografi yöntemiyle iyonlaşma/protonasyon sabitlerinin tayiniyle ilgili literatürlerde yeterli veri olmadığı görülmüştür. Bunun için bu bileşiklerin fonksiyonel gruplarına ait pK_a değerleri, öncelikle tahmini iyonlaşma/protonasyon sabiti hesaplayan programlarla tahmin edilmiştir. Bu amaçla **Marvin Sketch**, **ACD/Lab** ve **Pallas Programı** programı kullanılmıştır.

4.1. Alkilamino Fenotiazinlerin Lipinski Kurallarına Uygunlukları

İlaç aktif maddelerinin belirli kriterleri sağlaması için önerilen kurallar, Lipinski kurallarıdır (Lipinski vd. 1997; Lipinski vd. 2001; Lipinski vd. 2012). Bu kurallar, aktif maddelerin emilim ve biyoyararlanımları hakkında yardımcı olan kurallardır. Lipinski kuralına göre ilaç aktif maddelerinin

1. Moleküler ağırlıkları 500'den küçük olmalı (< 500),
2. Dağılma katsayıları 5'den küçük olmalı (log P < 5),
3. Bileşiklerin yapısındaki NH ve OH toplamı 5'den küçük olmalı (< 5 Hidrojen bağı donör sayısı)
4. N ve O atomlarının toplam sayısı 10' dan küçük olmalı (< 5 Hidrojen bağı akseptör sayısı)
5. Dönebilen bağı sayıları 10'dan az olmalıdır.

Çizelge 4.1. Tezde seçilen bileşiklerin Lipinski özellikleri

Lipinski parametreleri	Promazin	Prometazin	Klorpromazin	Triflurometazin	Önerilen değerler
Hidrojen Bağ Donörü	0	0	0	0	≤ 5
Hidrojen Bağ Akseptörü	2	2	2	2	≤ 10
Moleküler Ağırlığı	320,88	320,88	355,33	388,88	≤ 500
Log P	4,63	4,52	5,18	4,95	≤ 5
Dönebilir Bağ Sayısı	4	3	4	5	< 10

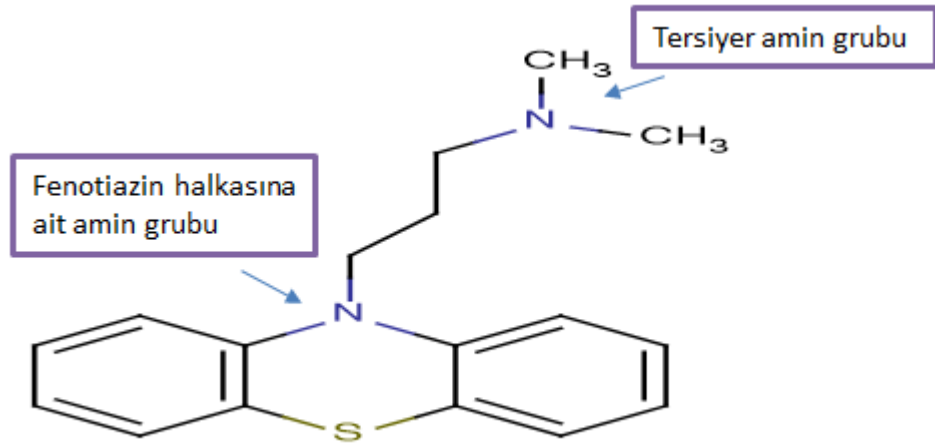
4.2. Fenotiazinlerin Marvin Sketch, ACD/Lab ve Pallas Programı ile Hesaplanan Protonasyon Sabitleri

Bu çalışmada Marvin Sketch, ACD/Lab ve Pallas bilgisayar programları ile çalışılan bileşiklerin protonasyon sabitleri hesaplanmıştır.

4.2.1. Promazinin protonasyon sabitleri

Marvin Sketch programı kullanılarak promazinin tersiyer amin grubuna ait protonasyon sabiti 9,70 olarak tahmin edilmiştir (Marvin Sketch, 2011). ACD/Lab programıyla fenotiazin halkasında tersiyer amine ait protonasyon sabiti 9,43(0,28) olarak tahmin edilmiştir (ACD/Lab, 2012). Pallas programı kullanılarak promazinin fenotiazin halkasında bulunan amin grubuna ait iyonlaşma sabiti değeri 4,75(1,40); tersiyer amine ait protonasyon sabiti 9,37(1,40) olarak tahmin edilmiştir.

Bu programlar kullanılarak yapılan hesaplamalarda promazinin yapısındaki fenotiazin halkasına ait azot ve tersiyer amin grubuna ait hesaplanmış değerler Çizelge 4.2'de verilmiştir.



Şekil 4.1. Promazinin kimyasal yapısı

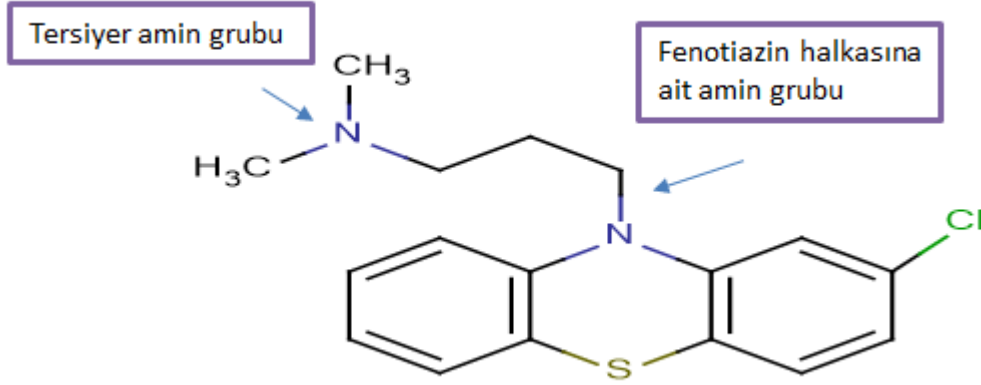
Çizelge 4.2. Promazinin Marvin Sketch, ACD/Lab ve Pallas programları ile hesaplanan protonasyon sabitleri

Paket Programlar	Fenotiazin halkasına ait azot	Tersiyer amin grubu
Marvin Skecth	-	9,70
ACD/Lab	-	9,43±(0,28)
Pallas	4,75±(1,40)	9,37±(1,40)

4.2.2. Prometazinin protonasyon sabitlerinin tayini

Marvin Skecth programı kullanılarak prometazinin tersiyer amine ait protonasyon sabiti 9,40 olarak tahmin edilmiştir (Marvin Sketch, 2011). ACD/Lab programıyla fenotiazin halkasında tersiyer amine ait protonasyon sabiti 8,98(0,50)olarak tahmin edilmiştir (ACD/Lab, 2012). Pallas programı kullanılarak prometazinin tersiyer amine ait protonasyon sabiti 8,98(1,53) olarak tahmin edilmiştir.

Bu programlar kullanılarak yapılan hesaplamalarda prometazinin yapısındaki fenotiazin halkasına ait azot ve tersiyer amin grubuna ait hesaplanmış değerler Çizelge 4.3’de verilmiştir.



Şekil 4.2. Prometazinin kimyasal yapısı

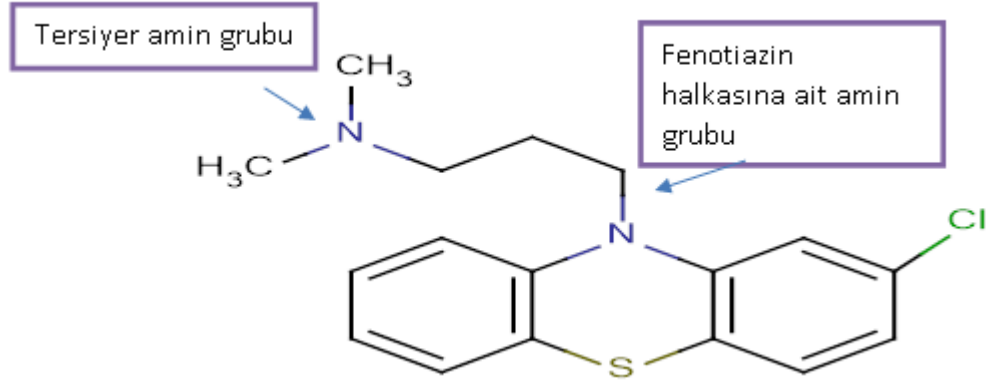
Çizelge 4.3. Prometazinin Marvin Sketch, ACD/Lab ve Pallas programları ile hesaplanan protonasyon sabitleri

Paket Programlar	Fenotiazin halkasına ait azot	Tersiyer amin grubu
MarvinSkecth	-	9,40
ACD/Lab	-	8,98±(0,50)
Pallas	4,75±(1,40)	8,98±(1,53)

4.2.3. Klorpromazinin protonasyon sabitlerinin tayini

Marvin Skecth programı kullanılarak klorpromazinin tersiyer amine ait protonasyon sabiti 9,70 olarak tahmin edilmiştir (Marvin Sketch, 2011). ACD/Lab programıyla fenotiazinhalkasında tersiyer amine ait protonasyon sabiti 9,41(0,28) olarak tahmin edilmiştir (ACD/Lab, 2012).Pallas programı kullanılarak klorpromazinin fenotiazin halkasında bulunan amin grubuna ait iyonlaşma sabiti değeri 4,06(1,40); tersiyer amine ait protonasyon sabiti 9,37(1,40) olarak tahmin edilmiştir.

Bu programlar kullanılarak yapılan hesaplamalarda promazinin yapısındaki fenotiazin halkasına ait azot ve tersiyer amin grubuna ait hesaplanmış değerler Çizelge 4.4’de verilmiştir.



Şekil 4.3. Klorpromazinin kimyasal yapısı

Çizelge 4.4. Klorpromazinin Marvin Sketch, ACD/Lab ve Pallas programları ile hesaplanan protonasyon sabitleri

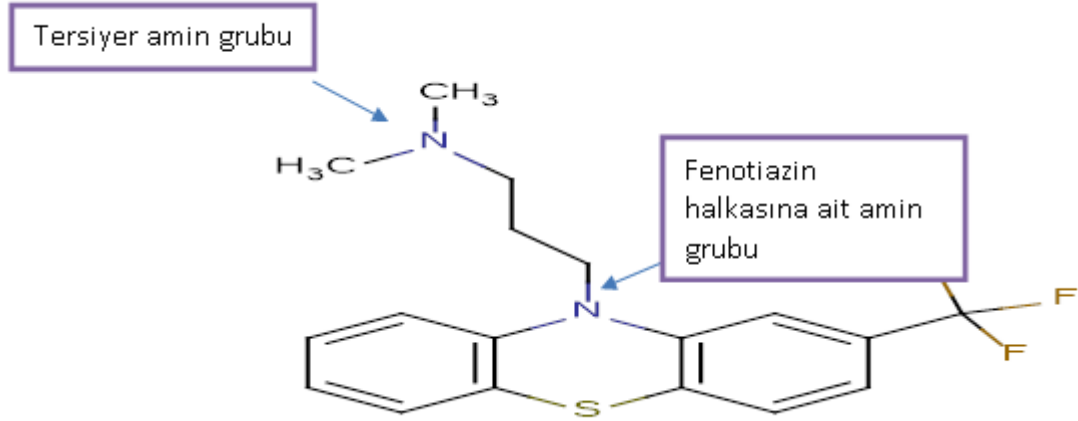
Paket Programlar	Fenotiazin halkasına ait azot	Tersiyer amin grubu
MarvinSketch	-	9,70
ACD/Lab	-	9,41±(0,28)
Pallas	4,06±(1,40)	9,37±(1,40)

4.2.4. Triflupromazinin protonasyon sabitlerinin tayini

Marvin Sketch programı kullanılarak triflupromazinin tersiyer amine ait protonasyon sabiti 9,70 olarak tahmin edilmiştir (Marvin Sketch, 2011). ACD/Lab programıyla fenotiazin halkasında tersiyer amine ait protonasyon sabiti 9,40(0,28) olarak tahmin edilmiştir (ACD/Lab, 2012). Pallas programı kullanılarak klorpromazinin fenotiazin halkasında bulunan amin grubuna ait

iyonlaşma sabiti değeri 3,59(1,40); tersiyer amine ait protonasyon sabiti 9,37(1,40) olarak tahmin edilmiştir.

Bu programlar kullanılarak yapılan hesaplamalarda promazinin yapısındaki fenotiazin halkasına ait azot ve tersiyer amin grubuna ait hesaplanmış değerler Çizelge 4.5’de verilmiştir.



Şekil 4.4. Triflupromazinin kimyasal yapısı

Çizelge 4.5. Triflupromazinin Marvin Sketch, ACD/Lab ve Pallas programları ile hesaplanan protonasyon sabitleri

Paket Programlar	Fenotiazin halkasına ait azot	Tersiyer amin grubu
MarvinSketch	-	9,70
ACD/Lab	-	9,40±(0,28)
Pallas	3,59±(1,40)	9,37±(1,40)

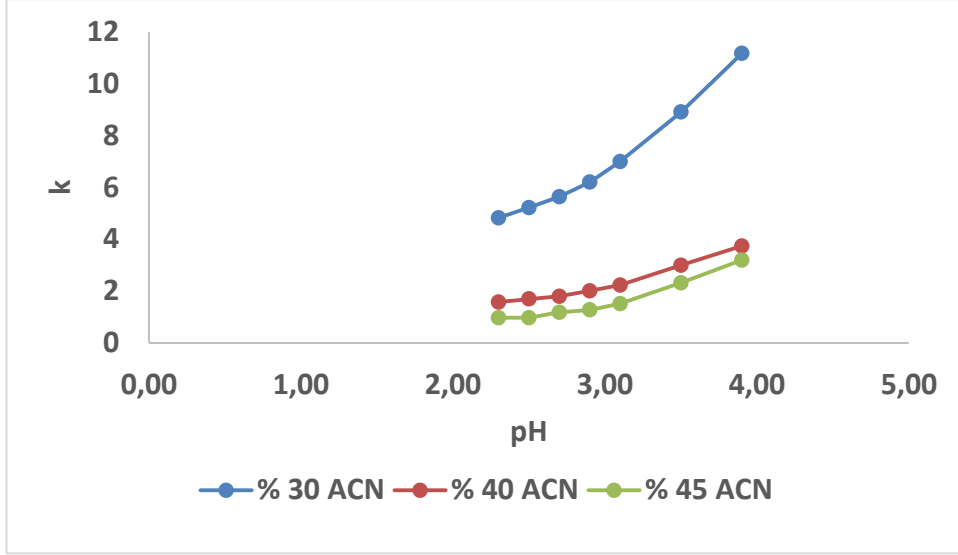
4.3. Fenotiazinlerin Sıvı Kromatografi Yöntemiyle İyonlaşma Sabiti Tayini

Bu projede fenotiazinlerin iyonlaşma sabitlerinin tayini amaçlanmıştır. Bileşiklerin alıkonma zamanları ve pik simetrisi göz önüne alınarak mobil faz organik modifiyeri olarak asetonitril tercih edilmiştir. Bileşiklerin pK_a tayinleri %30; 40 ve 45 (v/v) asetonitril-su ikili ortamında gerçekleştirilmiştir.

Asetonitril içeren hareketli fazların pH'ları 0,2 birim aralıklarla değiştirilerek bileşiklerin pK_a değerleri belirlenmeye çalışılmıştır. Bileşiklerin pik simetrisi ve alıkonma davranışları incelendiğinde Cogent Phenyl Hydride (250 mm, 4,6 mm IDS, -4 μ m), kolon tercih edilmiştir. pH'ın yeterince asidik değerlerde başlaması için hareketli fazda fosfat tamponu derişimi 100 mM olacak şekilde ilave edilmiş ve NaOH ilavesi ile mobil faz pH'sı, 1,90 - 3,90 arasında farklı değerlere ayarlanmıştır. İncelenen her asetonitril koşulu için başlangıç pH değeri belirlenmiş ve hareketli fazın pH değerleri literatürde önerildiği şekilde son derece dikkatle belirlenmiştir. Bu aşamada elde edilen veriler promazin, prometazin, klorpromazin ve triflupromazinin pH- kapasite faktörü ilişkilerini vermiştir. Çalışmada enjeksiyon hacmi 20 μ L, akış hızı 1 mL/dakika ve kolon sıcaklığı 25°C'dir.

4.3.1. Promazinin sıvı kromatografi yöntemiyle protonasyon sabiti tayini

Bu tez çalışmasında promazinin fenotiazin azotuna ait protonasyon sabiti tayinleri, 100 mM H_3PO_4 içeren % 30; 40; 45(v/v) asetonitril-su ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Her bir asetonitril-su ikili karışımında farklı pH değerleri (2,30; 2,50; 2,70; 2,90; 3,10; 3,50; 3,90) olan mobil fazlar hazırlanmış ve bileşiğe ait pK_a değeri, kapasite faktörü ile pH arasındaki ilişki kullanılarak doğrusal olmayan modeli esas alan NLREG programıyla hesaplanmıştır (NLREG, 2012). Her bir kapasite faktörünün hesaplanmasında kolonda tutunmayan türe özgü t_0 alıkonma zamanını belirlenmiştir.



Şekil 4.5. Promazinin üç farklı asetonitril-su ortamında elde edilen kapasite faktörü(k)-pH ilişkisi

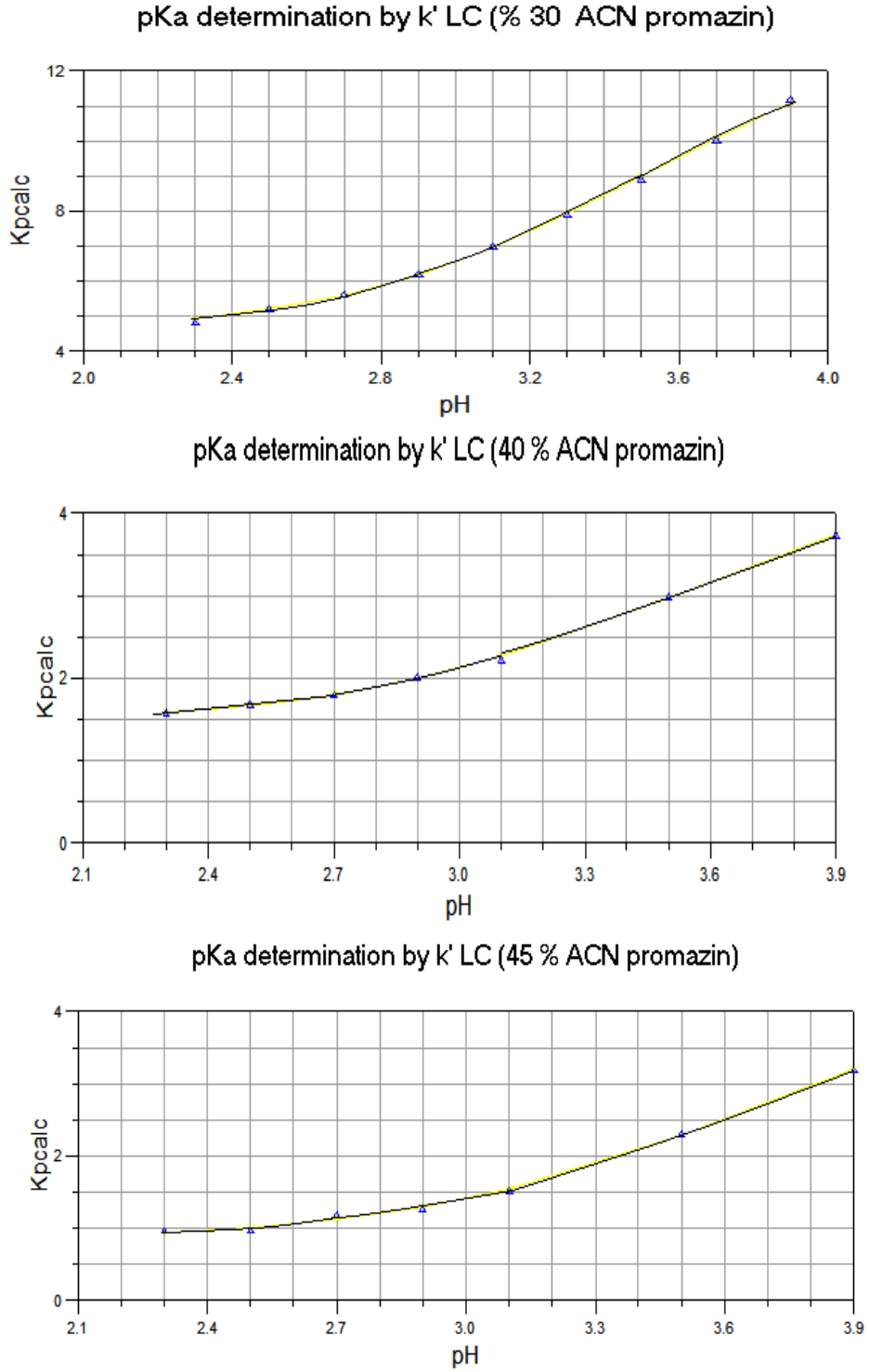
Promazin için farklı pH' larda ve üç farklı asetonitril derişiminde elde edilen kapasite faktörleri, Çizelge 4.6'da verilmiştir.

Çizelge 4.6. Promazinin % 30; 40; 45(v/v) asetonitril-su ortamına ait kapasite faktörleri

pH	%30	%40	%45
	Kapasite faktörü	Kapasite faktörü	Kapasite faktörü
2,30	4,824	1,575	0,966
2,50	5,22	1,691	0,969
2,70	5,643	1,795	1,180
2,90	6,200	2,008	1,269
3,10	7,001	2,226	1,514
3,50	8,908	2,994	2,313
3,90	11,169	3,736	3,19

Promazin için asetonitrilin üç farklı derişiminde fenotiazin azotuna ait pH-k ilişkisini gösteren grafikler non lineer regresyon (NLREG) programı kullanılarak

ve bu pKa değerleri yardımıyla değerlendirilmiştir (şekil 4.6). şekillerde çizgi, teorik davranışı göstermektedir. Noktalar ise deneysel sonuçlara aittir.

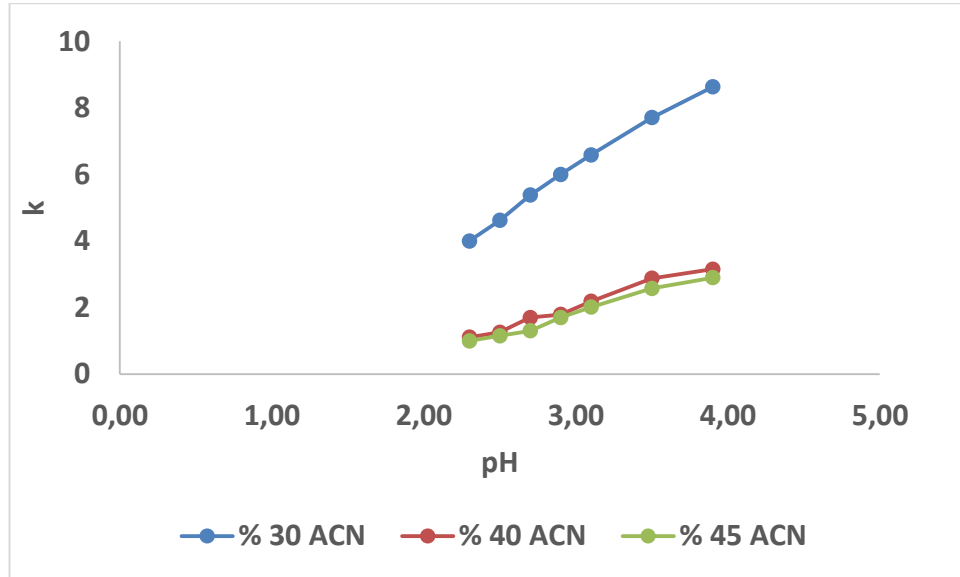


şekil 4.6. Promazin u farklı asetonitril ortamındaki protonasyon sabitine ait NLREG grafikleri

4.3.2. Prometazinin sıvı kromatografi yöntemiyle protonasyon sabiti tayini

Bu tez çalışmasında prometazinin fenotiazin azotuna ait protonasyon sabiti tayini, 100 mM H₃PO₄ içeren % 30; 40; 45(v/v) asetonitril-su ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Her bir asetonitril-su ikili karışımında farklı pH değerleri (2,30; 2,50; 2,70; 2,90; 3,10; 3,50; 3,90) olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Her bir kapasite faktörünün hesaplanmasında kolonda tutunmayan türe özgü t₀ alıkonma zamanının belirlenmesi için urasil kullanılmıştır.

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



Şekil 4.7. Prometazinin üç farklı asetonitril-su ortamında elde edilen kapasite faktörü(k)-pH ilişkisi

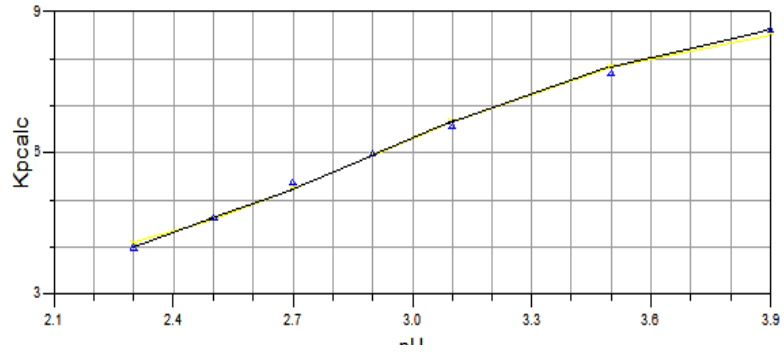
Prometazin için farklı pH' larda ve üç farklı asetonitril derişiminde elde edilen kapasite faktörleri, Çizelge 4.7.'de verilmiştir.

Çizelge 4.7. Prometazinin % 30; 40; 45(v/v) asetonitril-su ortamına ait kapasite faktörleri

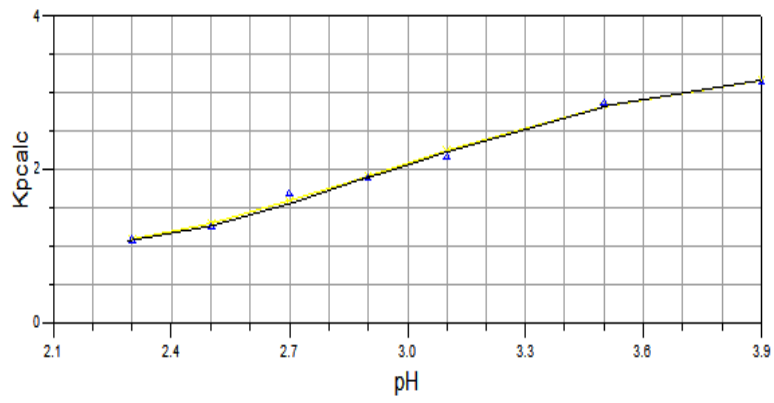
pH	%30	%40	%45
	Kapasite faktörü	Kapasite faktörü	Kapasite faktörü
2,30	4,00	1,107	1,00
2,50	4,618	1,259	1,152
2,70	5,377	1,700	1,30
2,90	6,00	1,900	1,50
3,10	6,583	2,186	2,014
3,50	7,705	2,880	2,575
3,90	8,63	3,152	2,90

Prometazin için asetonitrilin üç farklı derişiminde fenotiazin azotuna ait pH-k ilişkisini gösteren grafikler non lineer regresyon (NLREG) programı kullanılarak ve bu pKa değerleri yardımıyla değerlendirilmiştir (Şekil 4.8). Şekillerde çizgi, teorik davranışı göstermektedir. Noktalar ise deneysel sonuçlara aittir.

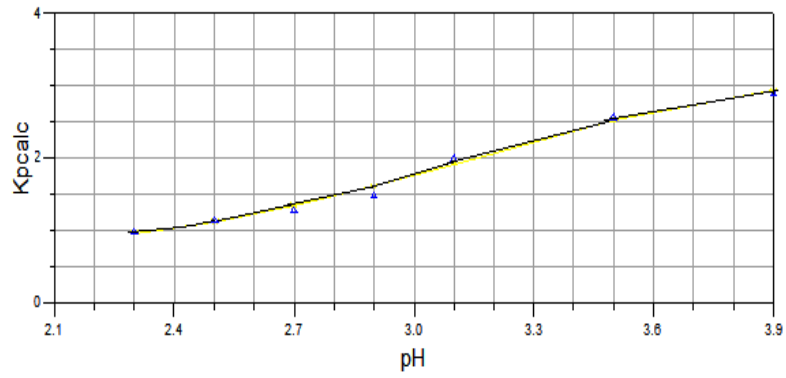
pKa determination by k' (% 30 ACN prometazin)



pKa determination by k' LC (40 % ACN prometazin)



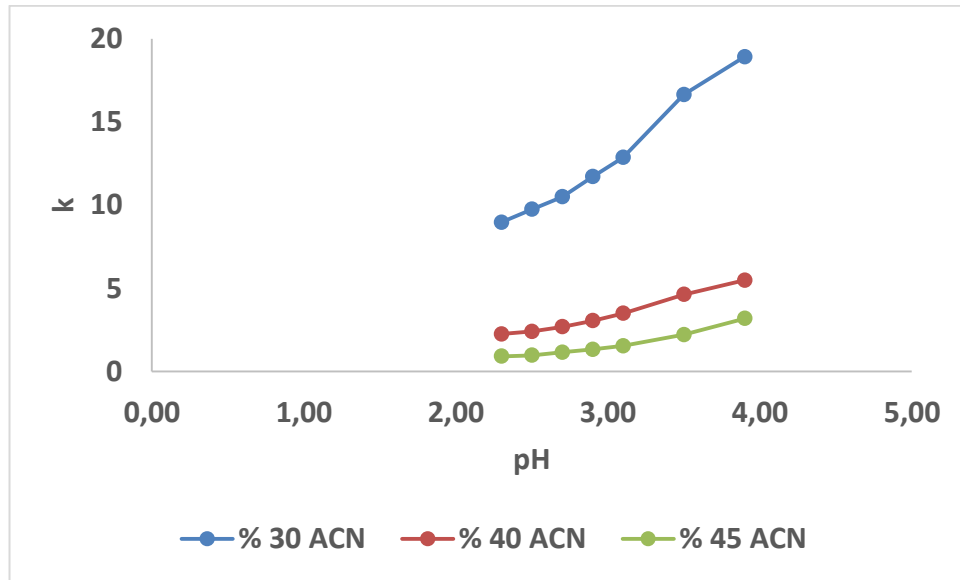
pKa determination by k' LC (45 % ACN prometazin)



Şekil 4.8. Prometazin üç farklı asetonitril ortamındaki protonasyon sabitine ait NLREG grafikleri

4.3.3. Klorpromazinin sıvı kromatografi yöntemiyle protonasyon sabiti tayini

Bu tez çalışmasında klorpromazinin fenotiazin halkasına ait protonasyon sabiti tayini, 100 mM H₃PO₄ içeren % 30; 40; 45(v/v) asetonitril-su ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Her bir asetonitril-su ikili karışımında farklı pH değerleri (2,30; 2,50; 2,70; 2,90; 3,10; 3,50; 3,90) olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Bileşiğe ait pK_a değeri, kapasite faktörü ile pH arasındaki ilişki kullanılarak doğrusal olmayan modeli esas alan NLREG programıyla hesaplanmıştır (NLREG, 2012). Her bir kapasite faktörünün hesaplanmasında kolonda tutunmayan türe özgü t₀ alıkonma zamanının belirlenmesi için urasil kullanılmıştır.



Şekil 4.9. Klorpromazinin üç farklı asetonitril-su ortamında elde edilen kapasite faktörü(k)-pH ilişkisi

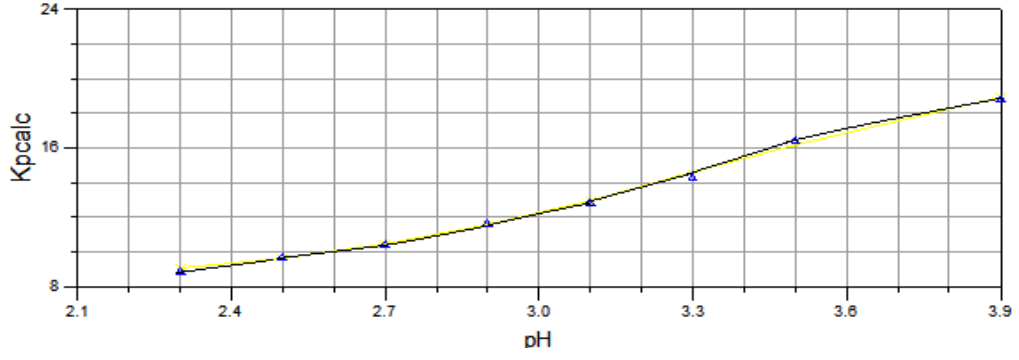
Klorpromazin için farklı pH' larda ve üç farklı koşulda elde edilen fenotiazine ait kapasite faktörleri, Çizelge 4.8'de verilmiştir.

Çizelge 4.8. Klorpromazinin % 30; 40; 45(v/v) asetonitril-su ortamına ait kapasite faktörleri

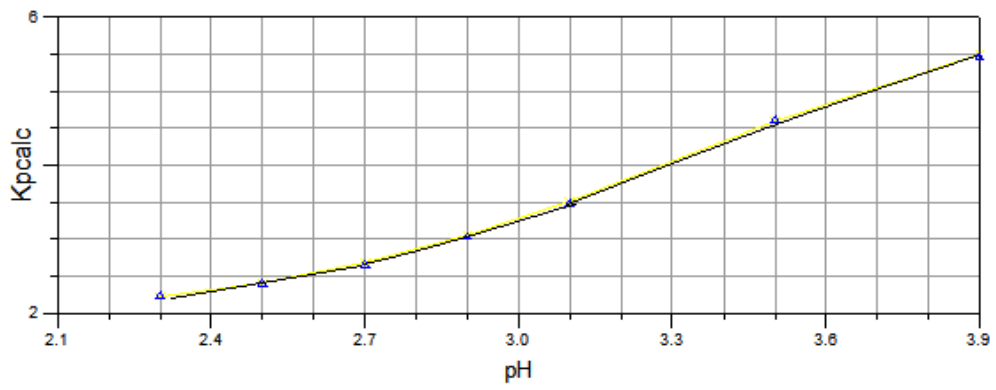
pH	%30	%40	%45
	Kapasite faktörü	Kapasite faktörü	Kapasite faktörü
2,3	8,963	2,25	0,916
2,5	9,744	2,410	0,969
2,7	10,496	2,681	1,157
2,9	11,712	3,05	1,331
3,1	12,859	3,493	1,540
3,5	16,649	4,629	2,217
3,9	18,91	5,482	3,188

Klorpromazin için asetonitrilin üç farklı derişiminde fenotiazin azotuna ait pH-k ilişkisini gösteren grafikler non lineer regresyon (NLREG) programı kullanılarak ve bu pKa değerleri yardımıyla değerlendirilmiştir (Şekil 4.10). Şekillerde çizgi, teorik davranışı göstermektedir. Noktalar ise deneysel sonuçlara aittir.

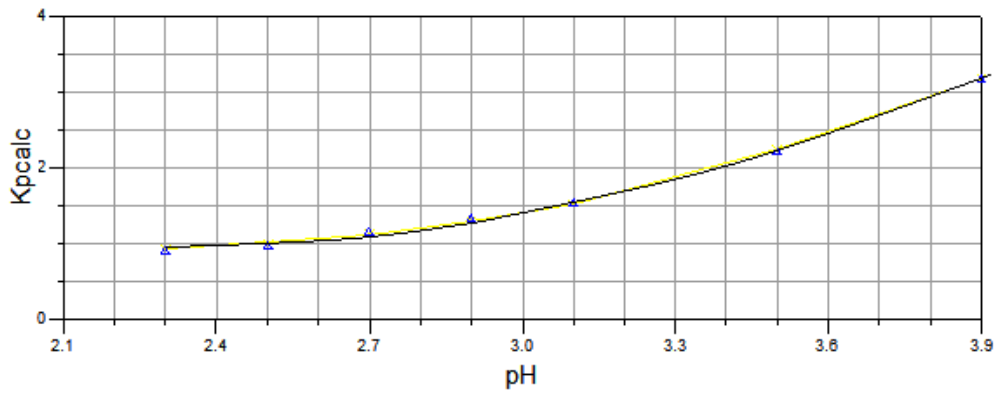
pKa determination by k' LC (% 30 ACN klorpromazin)



pKa determination by k' LC (% 40 ACN klorpromazin)



pKa determination by k' LC (45 % ACN klorpromazin)

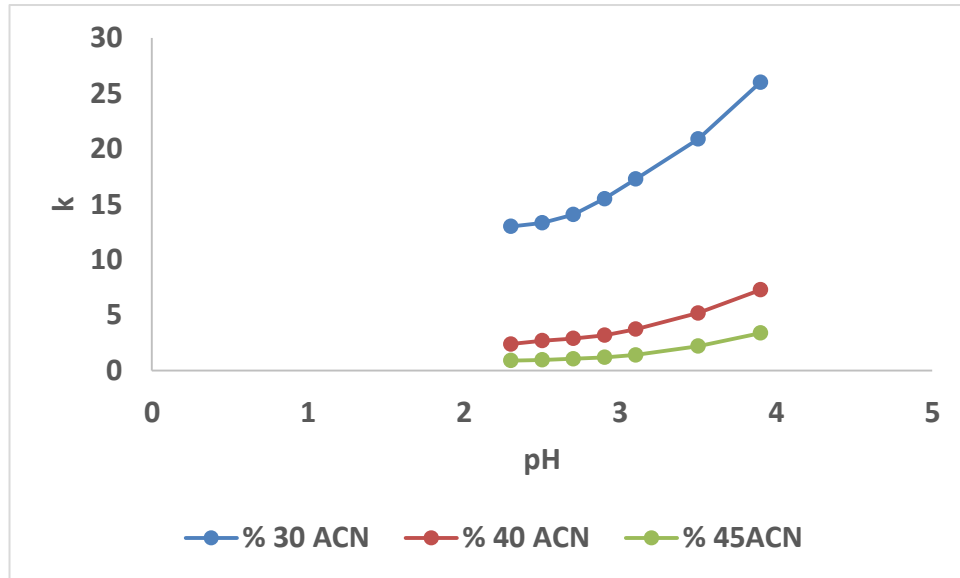


Şekil 4.10. Klorpromazinin üç farklı asetonitril ortamındaki protonasyon basamağına ait NLREG grafikleri

4.3.4. Triflupromazinin sıvı kromatografi yöntemiyle protonasyon sabiti tayini

Bu tez çalışmasında triflupromazinin fenotiazin halkasına ait protonasyon sabiti tayini, 100 mM H₃PO₄ içeren % 30; 40; 45(v/v) asetonitril-su ortamlarında gerçekleştirilmiştir. Her bir asetonitril-su ikili karışımında farklı pH değerleri (2,30; 2,50; 2,70; 2,90; 3,10; 3,50; 3,90) olan mobil fazlar hazırlanmıştır. Bileşiğe ait pK_a değeri, kapasite faktörü ile pH arasındaki ilişki kullanılarak doğrusal olmayan modeli esas alan NLREG programıyla hesaplanmıştır (NLREG, 2012).

Her bir kapasite faktörünün hesaplanmasında kolonda tutunmayan türe özgü t₀ alıkonma zamanının belirlenmesi için urasil kullanılmıştır.



Şekil 4.11. Triflupromazinin üç farklı asetonitril-su ortamında elde edilen kapasite faktörü(k)-pH ilişkisi

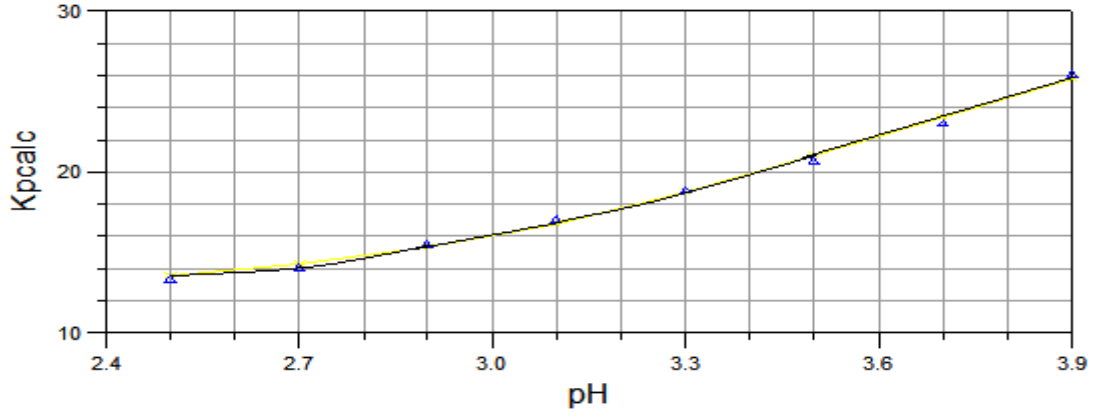
Triflupromazin için farklı pH' larda ve üç farklı koşulda elde edilen fenotiazine ait kapasite faktörleri, Çizelge 4.9'da verilmiştir.

Çizelge 4.9. Triflupromazinin % 30; 40; 45(v/v) asetonitril-su ortamına ait kapasite faktörleri

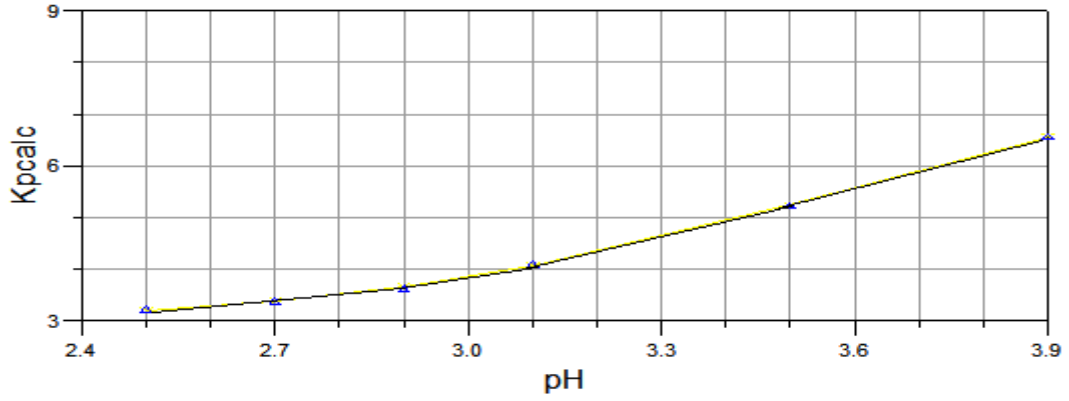
pH	%30	%40	%45
	Kapasite faktörü	Kapasite faktörü	Kapasite faktörü
2,3	12,996	2,399	0,916
2,5	13,313	2,699	0,969
2,7	14,066	2,901	1,077
2,9	15,50	3,188	1,199
3,1	17,277	3,733	1,410
3,5	20,873	5,19	2,217
3,9	25,996	7,29	3,39

Triflupromazin için asetonitrilin üç farklı derişiminde fenotiazin amin grubuna ait pH-k ilişkisini gösteren grafikler non lineer regresyon (NLREG) programı kullanılarak ve bu pKa değerleri yardımıyla değerlendirilmiştir. (Şekil 4.12). Şekillerde çizgi, teorik davranışı göstermektedir. Noktalar ise deneysel sonuçlara aittir.

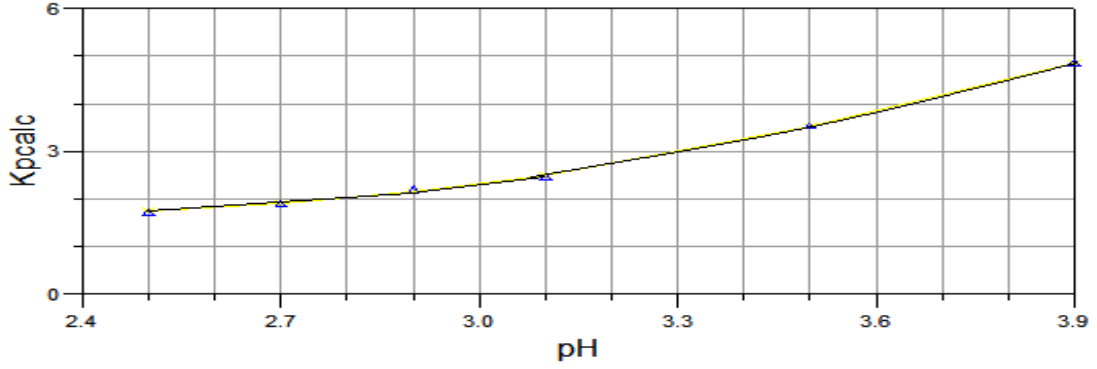
pKa determination by k' LC (% 30 ACN triflupromazin)



pKa determination by k' LC (% 40 ACN triflupromazin)



pKa determination by k' LC (45 % ACN triflupromazin)



Şekil 4.12. Triflupromazinin üç farklı asetonitril ortamındaki protonasyon basamağına ait NLREG grafikleri

4.4. Fenotiazinlerin Protonasyon Sabitlerinin Potansiyometrik Yöntemle Tayini

Bu çalışmada, promazin ve klorpromazinin tersiyer amin gruplarına ait protonasyon sabitleri potansiyometrik yöntemle tayin edilmiştir. Ortam olarak %35, 40, 45, 50 (v/v) su-asetonitril ikili karışımları kullanılmıştır. Bileşiklerin su-asetonitril ikili karışımında çözünürlüklerinin uygun geldiği koşuldaki çözeltileri hazırlanmış ve ayarlı titrisol çözeltilisinden hazırlanan ve ayarlanan KOH ile titre edilmiştir. Titrasyon verileri, pKa hesaplamalarında kullanılan bilgisayar programı PKPOT ile değerlendirilmiştir. Bu programda tahmini pKa değerleri olarak titrasyon grafiklerinin yarı nötralizasyonlarındaki pKa değerleri kullanılmıştır. Her iki bileşik için de %35, 40, 45, 50 (v/v) su-asetonitril ortamlarında titrasyonlar yapılmış ve değerler çizelgelerde verilmiştir.

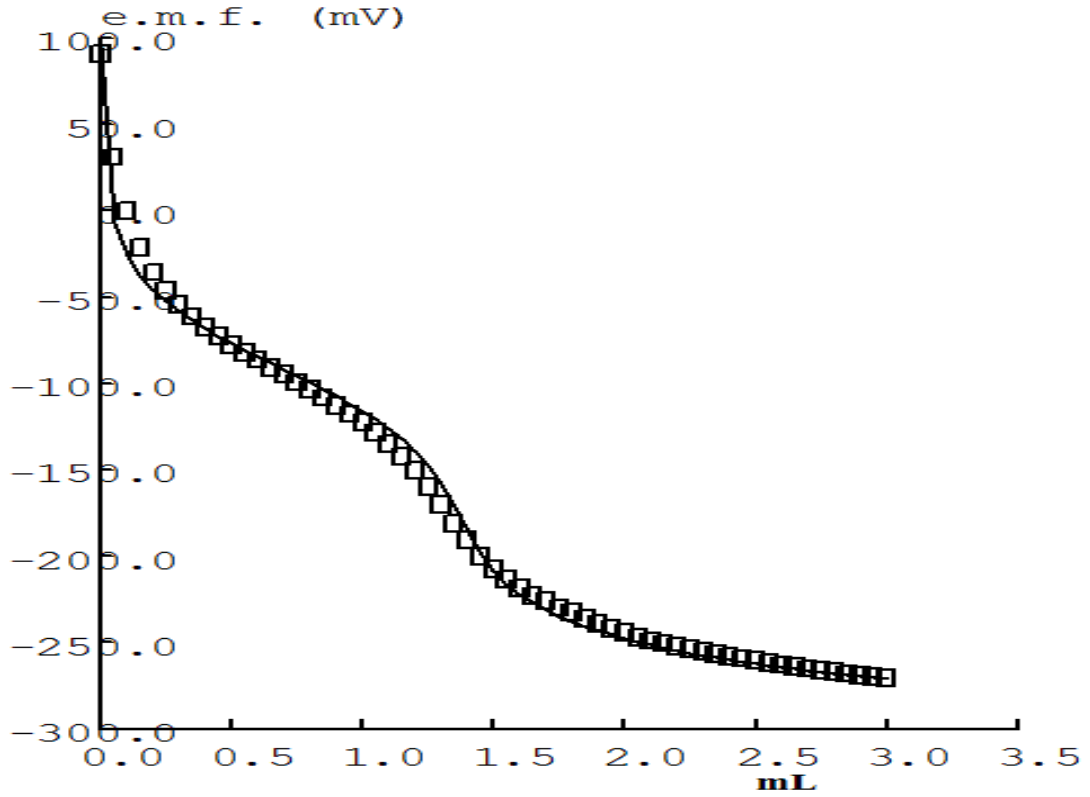
4.4.1. Promazinin %35 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon verileri ve grafikleri

Bu bileşiğin 2.10^{-3} M lık çözeltilisinden 30 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı 0,05 M KOH ile titre edilmiştir. Veriler, Çizelge 4.10'da verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi mV değerleri E^0 değeri kullanılarak pH olarak da ifade edilmiştir. Bileşiğe ait pKa değeri, mL ile mV değerleri arasındaki ilişki kullanılarak PKPOT programıyla hesaplanmıştır.

Çizelge 4.10. Promazinin % 35(v/v) ACN – H₂O ortamında potansiyometrik titrasyon verileri

mL	mV	pH	mL	mV	pH
0,00	90,8	5,863	1,55	-213,4	11,005
0,05	31,2	6,871	1,60	-218,5	11,091
0,10	-0,2	7,401	1,65	-222,9	11,166
0,15	-21,6	7,763	1,70	-225,9	11,216
0,20	-35,7	8,001	1,75	-229,9	11,284
0,25	-46,1	8,177	1,80	-232,5	11,328
0,30	-54,4	8,317	1,85	-235,9	11,385
0,35	-61,3	8,434	1,90	-239,1	11,439
0,40	-67,4	8,537	1,95	-241,8	11,485
0,45	-72,7	8,627	2,00	-244,4	11,529
0,50	-77,6	8,710	2,05	-246,8	11,570
0,55	-82,1	8,786	2,10	-248,9	11,605
0,60	-86,3	8,857	2,15	-250,4	11,630
0,65	-90,7	8,931	2,20	-252	11,658
0,70	-94,9	9,002	2,25	-253,6	11,685
0,75	-99,3	9,076	2,30	-255,3	11,713
0,80	-103,7	9,151	2,35	-256,7	11,737
0,85	-108,1	9,225	2,40	-258	11,759
0,90	-112,8	9,305	2,45	-259,2	11,779
0,95	-117,6	9,386	2,50	-260,5	11,801
1,00	-122,6	9,470	2,55	-261,6	11,820
1,05	-128,3	9,567	2,60	-262,9	11,842
1,10	-134,8	9,676	2,65	-264	11,860
1,15	-142,1	9,800	2,70	-265,1	11,879
1,20	-150,3	9,938	2,75	-266	11,894
1,25	-159,9	10,101	2,80	-266,9	11,909
1,30	-170	10,271	2,85	-267,9	11,926
1,35	-180,9	10,456	2,90	-268,8	11,942
1,40	-190,8	10,623	2,95	-269,7	11,957
1,45	-199,9	10,777	3,00	-270,8	11,975
1,50	-207,2	10,900	3,10	-271,6	11,991

Bu bileşğin titrasyonuna ait PKPOT grafiği, Şekil 4.13' de verilmiştir. Şekil 4.13' den görüldüğü gibi bileşik tek dönüm noktalı titrasyon grafiği vermektedir.



Şekil 4.13. % 35 ACN ortamında promazin için PKPOT grafiği

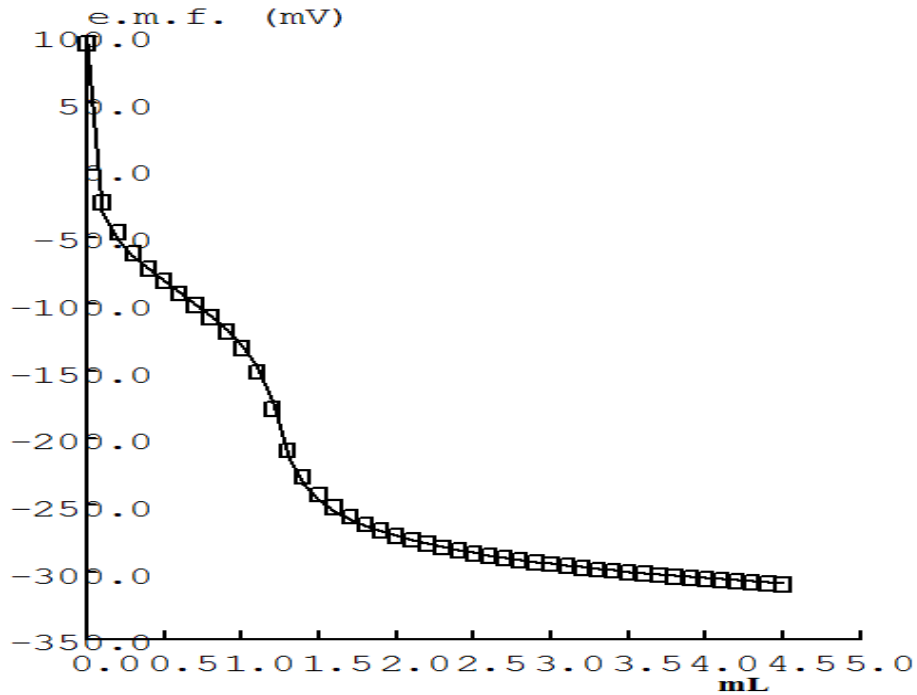
4.4.2. Promazinin % 40 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon verileri ve grafikleri

Bu bileşğin $2 \cdot 10^{-3}$ M lık çözeltisinden 30 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı 0,05 M KOH ile titre edilmiştir. Veriler, Çizelge 4.11'de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi mV değerleri E^0 değeri kullanılarak pH olarak da ifade edilmiştir. Bileşiğe ait pK_a değeri, mL ile mV değerleri arasındaki ilişki kullanılarak PKPOT programıyla hesaplanmıştır.

Çizelge 4.11. Promazinin % 40(v/v) ACN - H₂O ortamında potansiyometrik titrasyon verileri

mL	mV	pH	mL	mV	pH
0,00	94,3	5,717	1,60	-251,7	11,565
0,10	-24,3	7,721	1,70	-258,7	11,684
0,20	-46,6	8,098	1,80	-264,6	11,783
0,30	-61,8	8,355	1,90	-269,1	11,859
0,40	-73,5	8,553	2,00	-273,2	11,929
0,50	-82,8	8,710	2,10	-276	11,976
0,60	-92,1	8,867	2,20	-279,1	12,028
0,70	-100,9	9,016	2,30	-281,7	12,072
0,80	-110,2	9,173	2,40	-284,1	12,113
0,90	-120,8	9,353	2,50	-286,1	12,147
1,00	-133,4	9,566	2,60	-288,2	12,182
1,10	-150,7	9,858	2,70	-289,9	12,211
1,20	-178,5	10,328	2,80	-291,4	12,236
1,30	-209,3	10,849	2,90	-292,9	12,262
1,40	-229,1	11,183	3,00	-294,2	12,284
1,50	-242,2	11,405	3,10	-295,7	12,309

Bu bileşiğin titrasyonuna ait PKPOT grafiği, Şekil 4.14' de verilmiştir. Şekil 4.14' den görüldüğü gibi bileşik tek dönüm noktalı titrasyon grafiği vermektedir.



Şekil 4.14. % 40 ACN ortamında promazinin için PKPOT grafiği

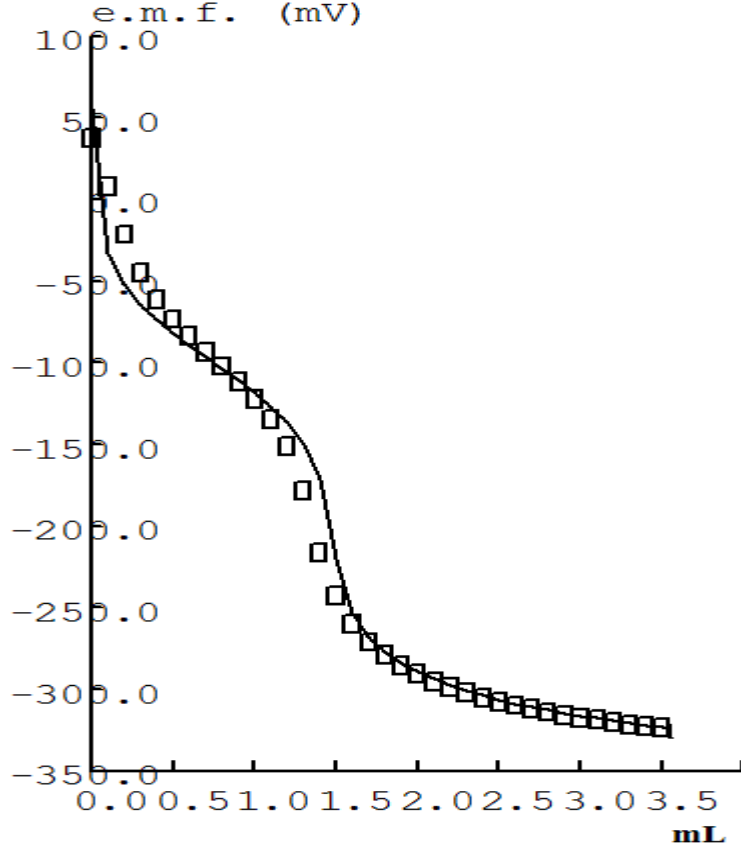
4.4.3. Promazinin % 45 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon verileri ve grafikleri

Bu bileşiğin 2.10^{-3} M lık çözeltisinden 30 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı 0,05 M KOH ile titre edilmiştir. Veriler, Çizelge 4.12’de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi mV değerleri E^0 değeri kullanılarak pH olarak da ifade edilmiştir. Bileşiğe ait pK_a değeri, mL ile mV değerleri arasındaki ilişki kullanılarak PKPOT programıyla hesaplanmıştır.

Çizelge 4.12. Promazinin % 45(v/v) ACN - H₂O ortamında potansiyometrik titrasyon verileri

mL	mV	pH	mL	mV	pH
0,00	64,6	6,329	1,60	-240,8	11,491
0,10	-27,2	7,880	1,70	-249,4	11,636
0,20	-48,9	8,247	1,80	-256,3	11,753
0,30	-63	8,485	1,90	-262,3	11,854
0,40	-74,6	8,682	2,00	-266,9	11,932
0,50	-84,4	8,847	2,10	-270,7	11,996
0,60	-93,3	8,998	2,20	-274,1	12,054
0,70	-101,9	9,143	2,30	-277,2	12,106
0,80	-110,5	9,288	2,40	-279,9	12,152
0,90	-120,3	9,454	2,50	-282,2	12,191
1,00	-131,8	9,648	2,60	-284,3	12,226
1,10	-146	9,888	2,70	-286,3	12,260
1,20	-167,2	10,247	2,80	-288,2	12,292
1,30	-192,6	10,676	2,90	-289,9	12,321
1,40	-213,8	11,034	3,00	-291,5	12,348
1,50	-229,3	11,296	3,10	-292,9	12,372

Bu bileşiğin titrasyonuna ait PKPOT grafiği, Şekil 4.15’ de verilmiştir. Şekil 4.15’ den görüldüğü gibi bileşik tek dönüm noktalı titrasyon grafiği vermektedir.



Şekil 4.15. % 45 ACN ortamında promazin için PKPOT grafiği

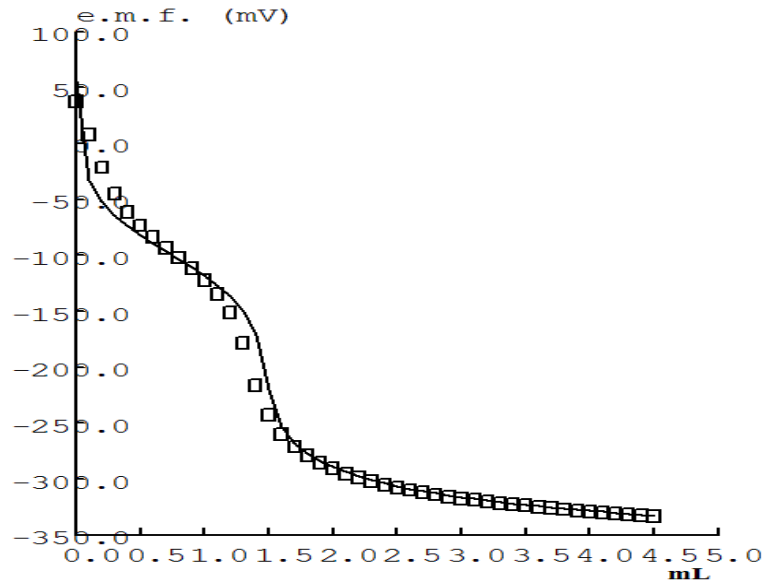
4.4.4. Promazinin % 50 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon verileri ve grafikleri

Bu bileşiğin $2 \cdot 10^{-3}$ M lık çözeltisinden 30 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı 0,05 M KOH ile titre edilmiştir. Veriler, Çizelge 4.13'de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi mV değerleri E^0 değeri kullanılarak pH olarak da ifade edilmiştir. Bileşiğe ait pK_a değeri, mL ile mV değerleri arasındaki ilişki kullanılarak PKPOT programıyla hesaplanmıştır.

Çizelge 4.13. Promazinin % 50 (v/v) ACN – H₂O ortamında potansiyometrik titrasyon verileri

mL	mv	pH	mL	mv	pH
0,00	37,4	6,402	1,60	-259,7	11,424
0,10	7,8	6,902	1,70	-271	11,615
0,20	-21,3	7,394	1,80	-278,9	11,748
0,30	-44,6	7,788	1,90	-285,5	11,860
0,40	-61	8,065	2,00	-290,7	11,948
0,50	-73,2	8,271	2,10	-295,2	12,024
0,60	-83,7	8,449	2,20	-298,8	12,085
0,70	-93,2	8,609	2,30	-302,1	12,140
0,80	-102,3	8,763	2,40	-305	12,189
0,90	-111,7	8,922	2,50	-307,6	12,233
1,00	-122,3	9,101	2,60	-309,9	12,272
1,10	-134,7	9,311	2,70	-312,1	12,309
1,20	-151	9,586	2,80	-314	12,341
1,30	-178,4	10,049	2,90	-315,7	12,370
1,40	-216	10,685	3,00	-317,4	12,399
1,50	-242,8	11,138	3,10	-318,7	12,421

Bu bileşiğin titrasyonuna ait PKPOT grafiği, Şekil 4.16' de verilmiştir. Şekil 4.16' den görüldüğü gibi bileşik tek dönüm noktalı titrasyon grafiği vermektedir.



Şekil 4.16. % 50 ACN ortamında promazinin için PKPOT grafiği

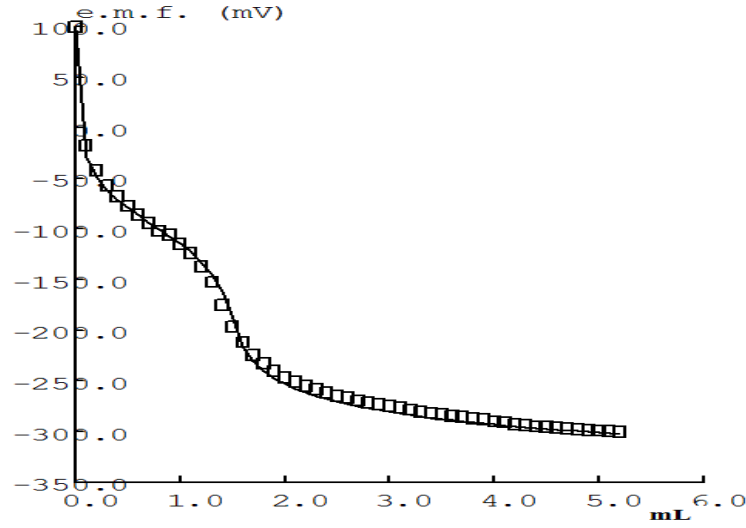
4.4.5. Klorpromazinin % 35 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon verileri ve grafikleri

Bu bileşiğin 2.10^{-3} M lık çözeltisinden 30 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı 0,05 M KOH ile titre edilmiştir. Veriler, Çizelge 4.14'de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi mV değerleri E^0 değeri kullanılarak pH olarak da ifade edilmiştir. Bileşiğe ait pK_a değeri, mL ile mV değerleri arasındaki ilişki kullanılarak PKPOT programıyla hesaplanmıştır.

Çizelge 4.14. Klorpromazinin % 35 (v/v) ACN - H₂O ortamında potansiyometrik titrasyon verileri

mL	mV	pH	mL	mV	pH
0	99,5	5,696	1,60	-211,7	10,957
0,10	-17,8	7,679	1,70	-224,4	11,171
0,20	-42,1	8,090	1,80	-232,8	11,313
0,30	-57,1	8,343	1,90	-240,3	11,440
0,40	-67,8	8,524	2,00	-246,4	11,543
0,50	-77,3	8,685	2,10	-251,1	11,623
0,60	-85,8	8,829	2,20	-255,1	11,690
0,70	-94,1	8,969	2,30	-258,5	11,748
0,80	-102,1	9,104	2,40	-261,6	11,800
0,90	-105,9	9,168	2,50	-264,7	11,853
1,00	-115,1	9,324	2,60	-266,9	11,890
1,10	-124	9,474	2,70	-269,3	11,930
1,20	-137	9,694	2,80	-271,4	11,966
1,30	-152,5	9,956	2,90	-273,4	12,000
1,40	-175,1	10,338	3,00	-275,1	12,028
1,50	-196,2	10,695	3,10	-276,7	12,055

Bu bileşiğin titrasyonuna ait PKPOT grafiği, Şekil 4.17' de verilmiştir. Şekil 4.17' den görüldüğü gibi bileşik tek dönüm noktalı titrasyon grafiği vermektedir.



Şekil 4.17. % 35 ACN ortamında klorpromazin için PKPOT grafiği

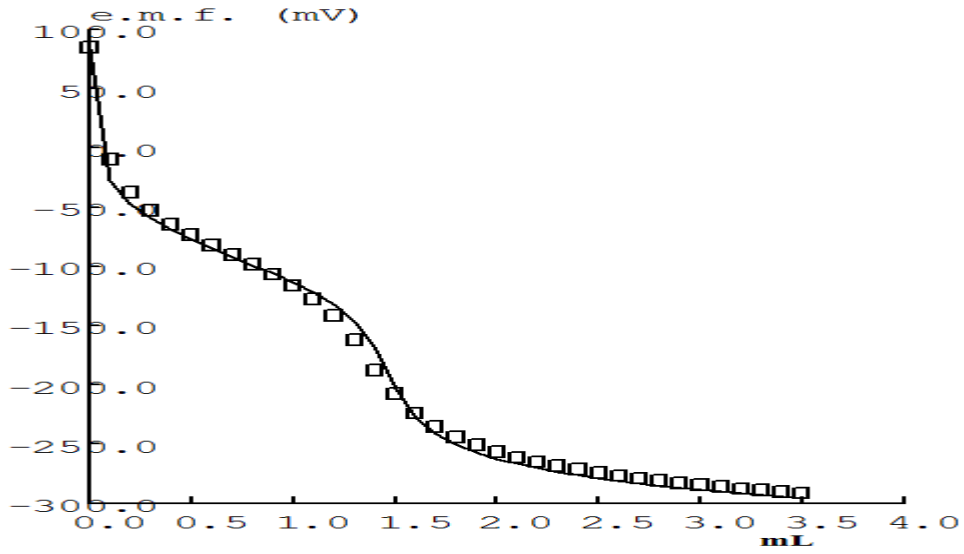
4.4.6. Klorpromazinin % 40 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon verileri ve grafikleri

Bu bileşiğin 2.10^{-3} M lık çözeltisinden 30 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı 0,05 M KOH ile titre edilmiştir. Veriler, Çizelge 4.15'de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi mV değerleri E^0 değeri kullanılarak pH olarak da ifade edilmiştir. Bileşiğe ait pK_a değeri, mL ile mV değerleri arasındaki ilişki kullanılarak PKPOT programıyla hesaplanmıştır.

Çizelge 4.15. Klorpromazinin % 40 (v/v) ACN - H₂O ortamında potansiyometrik titrasyon verileri

mL	mV	pH	mL	mV	pH
0	84,8	5,936	1,6	-224	11,155
0,1	-9,5	7,530	1,7	-235,5	11,350
0,2	-37,5	8,003	1,8	-244,2	11,497
0,3	-53	8,265	1,9	-250,8	11,608
0,4	-64,4	8,458	2	-256,7	11,708
0,5	-73,5	8,611	2,1	-261,3	11,786
0,6	-82,1	8,757	2,2	-265,1	11,850
0,7	-90,4	8,897	2,3	-268,4	11,906
0,8	-98,4	9,032	2,4	-271,3	11,955
0,9	-106,7	9,173	2,5	-274,2	12,004
1	-116,3	9,335	2,6	-276,6	12,044
1,1	-127,5	9,524	2,7	-279	12,085
1,2	-141,6	9,763	2,8	-281	12,119
1,3	-161,8	10,104	2,9	-282,9	12,151
1,4	-187,5	10,538	3	-284,7	12,181
1,5	-207,6	10,878	3,1	-286,1	12,205

Bu bileşğin titrasyonuna ait PKPOT grafiği, Şekil 4.18' de verilmiştir. Şekil 4.18' den görüldüğü gibi bileşik tek dönüm noktalı titrasyon grafiği vermektedir.



Şekil 4.18. % 40 ACN ortamında klorpromazin için PKPOT grafiği

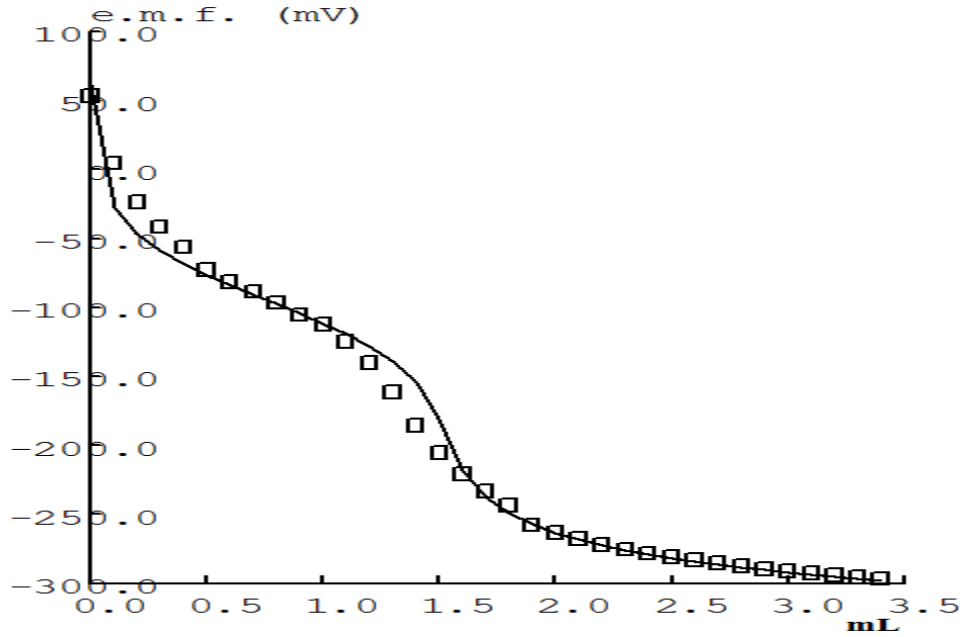
4.4.7. Klorpromazinin % 45 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon verileri ve grafikleri

Bu bileşğin $2 \cdot 10^{-3}$ M lık çözeltisinden 30 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı 0,05 M KOH ile titre edilmiştir. Veriler, Çizelge 4.16'da verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi mV değerleri E^0 değeri kullanılarak pH olarak da ifade edilmiştir. Bileşiğe ait pK_a değeri, mL ile mV değerleri arasındaki ilişki kullanılarak PKPOT programıyla hesaplanmıştır.

Çizelge 4.16. Klorpromazinin % 45 (v/v) ACN – H₂O ortamında potansiyometrik titrasyon verileri

mL	mV	pH	mL	mV	pH
0	53,6	6,540	1,6	-220,8	11,178
0,1	4,7	7,366	1,7	-233,1	11,386
0,2	-23,3	7,840	1,8	-243,3	11,558
0,3	-41,4	8,146	1,9	-257,6	11,800
0,4	-56,2	8,396	2	-263,1	11,893
0,5	-72,8	8,676	2,1	-267,8	11,973
0,6	-81,5	8,823	2,2	-272,1	12,045
0,7	-88,4	8,940	2,3	-275,4	12,101
0,8	-96,3	9,074	2,4	-278,2	12,148
0,9	-105,3	9,226	2,5	-280,8	12,192
1	-112,2	9,342	2,6	-283,3	12,235
1,1	-124,6	9,552	2,7	-285,4	12,270
1,2	-139,9	9,811	2,8	-287,5	12,306
1,3	-161,3	10,172	2,9	-289,4	12,338
1,4	-185,4	10,580	3	-291,1	12,366
1,5	-205,4	10,918	3,1	-292,3	12,387

Bu bileşğin titrasyonuna ait PKPOT grafiği, Şekil 4.19' da verilmiştir. Şekil 4.19' dan görüldüğü gibi bileşik tek dönüm noktalı titrasyon grafiği vermektedir.



Şekil 4.19. % 45 ACN ortamında klorpromazin için PKPOT grafiği

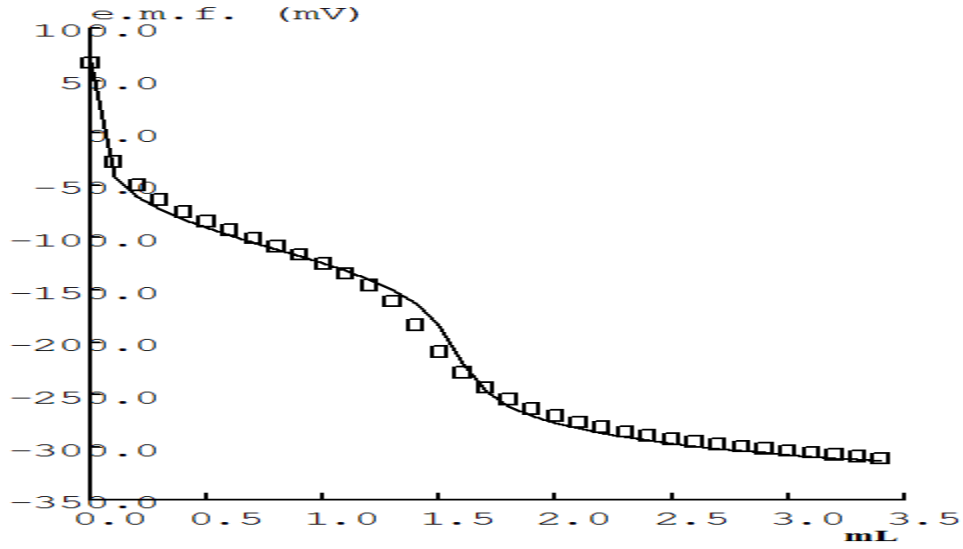
4.4.8. Klorpromazinin % 50 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki potansiyometrik titrasyon verileri ve grafikleri

Bu bileşiğin $2 \cdot 10^{-3}$ M lık çözeltisinden 30 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı 0,05 M KOH ile titre edilmiştir. Veriler, Çizelge 4.17’de verilmiştir. Çizelgeden görüldüğü gibi mV değerleri E^0 değeri kullanılarak pH olarak da ifade edilmiştir. Bileşiğe ait pK_a değeri, mL ile mV değerleri arasındaki ilişki kullanılarak PKPOT programıyla hesaplanmıştır.

Çizelge 4.17. Klorpromazinin % 50 (v/v) ACN - H₂O ortamında potansiyometrik titrasyon verileri

mL	mV	pH	mL	mV	pH
0	67,1	5,804	1,6	-228,5	10,800
0,1	-27,7	7,406	1,7	-243,2	11,049
0,2	-49,7	7,778	1,8	-254,2	11,238
0,3	-64	8,020	1,9	-263	11,384
0,4	-75,1	8,207	2	-270,1	11,504
0,5	-84,3	8,363	2,1	-276	11,603
0,6	-92,6	8,503	2,2	-280,8	11,684
0,7	-100,3	8,633	2,3	-285,1	11,757
0,8	-108,2	8,767	2,4	-288,9	11,821
0,9	-116	8,899	2,5	-292,1	11,875
1	-124,4	9,041	2,6	-294,5	11,9160
1,1	-134,1	9,205	2,7	-296,9	11,957
1,2	-145,2	9,392	2,8	-299,3	11,997
1,3	-160,6	9,653	2,9	-301,4	12,032
1,4	-183,1	10,033	3	-303,2	12,063
1,5	-208,8	10,467	3,1	-304,9	12,092

Bu bileşğin titrasyonuna ait PKPOT grafiği, Şekil 4.20' de verilmiştir. Şekil 4.20' den görüldüğü gibi bileşik tek dönüm noktalı titrasyon grafiği vermektedir.



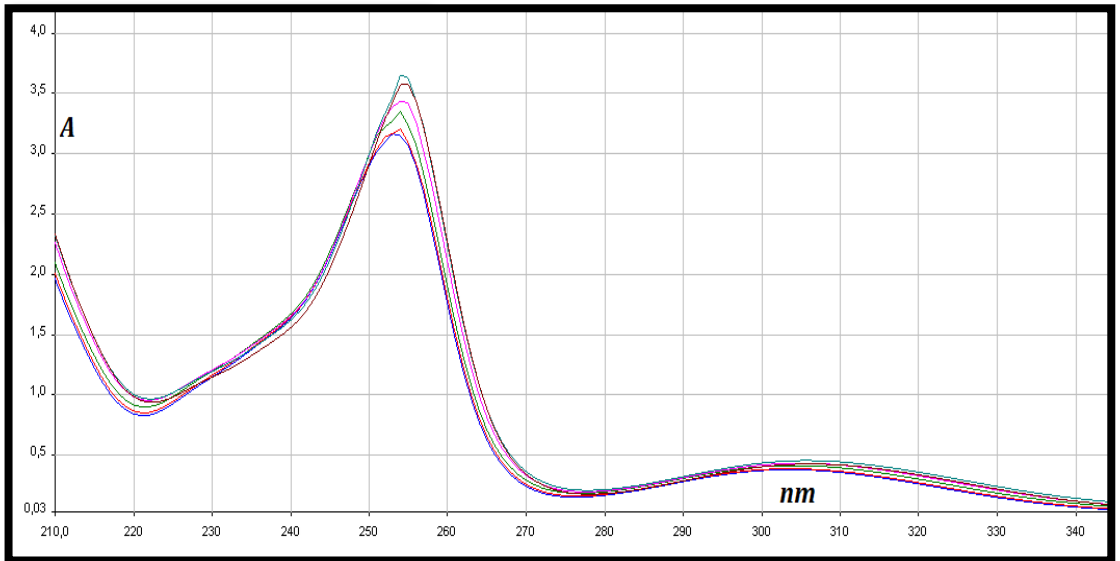
Şekil 4.20. % 50 ACN ortamında klorpromazin için PKPOT grafiği

4.5. Fenotiazinlerin Protonasyon Sabitlerinin Spektroskopik Yöntemle Tayini

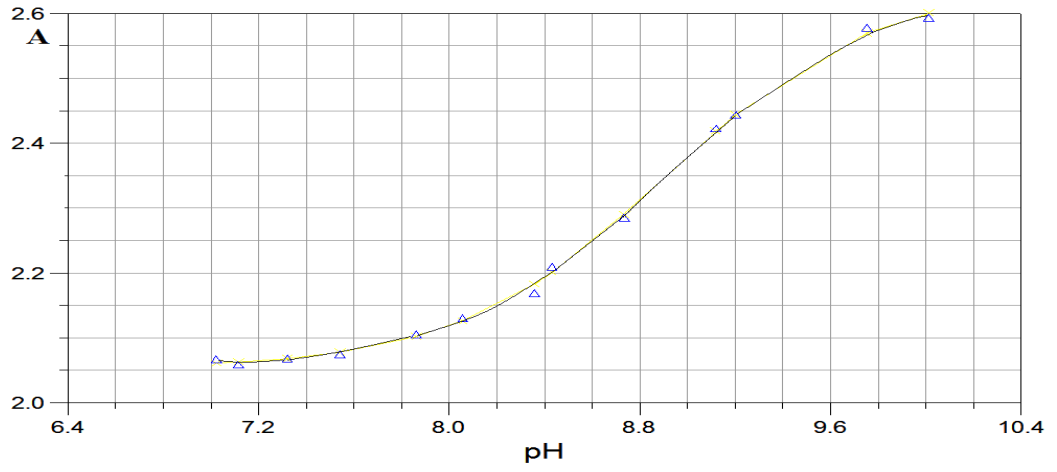
Promazin, prometazin, klorpromazin ve triflupromazinin asetonitril-su ikili karışımında spektroskopik titrasyonları yapılarak amin gruplarına ait protonasyon sabitleri tayin edilmiştir. Spektroskopik yöntemle tayinde 10^{-4} – 10^{-6} M derişim, pH etkisinde absorbandsdaki farklılığı belirleyebilmemizi sağlar. Elde edilen sonuçların güvenilirliği için geniş pH aralığında spektrum taraması alınır. Bu tez çalışmasında seçilen bileşiklerin, %35 (h/h) asetonitril-su ikili karışımında, yaklaşık 0,2 pH birimi aralığı ile tersiyer amin grubuna ait protonasyon sabitleri için pH 6,00 - 12,00 arası spektrum taraması alınmıştır. Sonuçların değerlendirilmesi, bu amaç için hazırlanmış bilgisayar programı STAR ile gerçekleştirilmiştir. Bu program, her bir spektrum ve dalga boyu için deneysel ve hesaplanan absorbands değerleri arasında minimum farkı elde edene kadar protonasyon sabitlerini hesaplar.

4.5.1. Promazinin % 35 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki spektrofotometrik titrasyon grafikleri

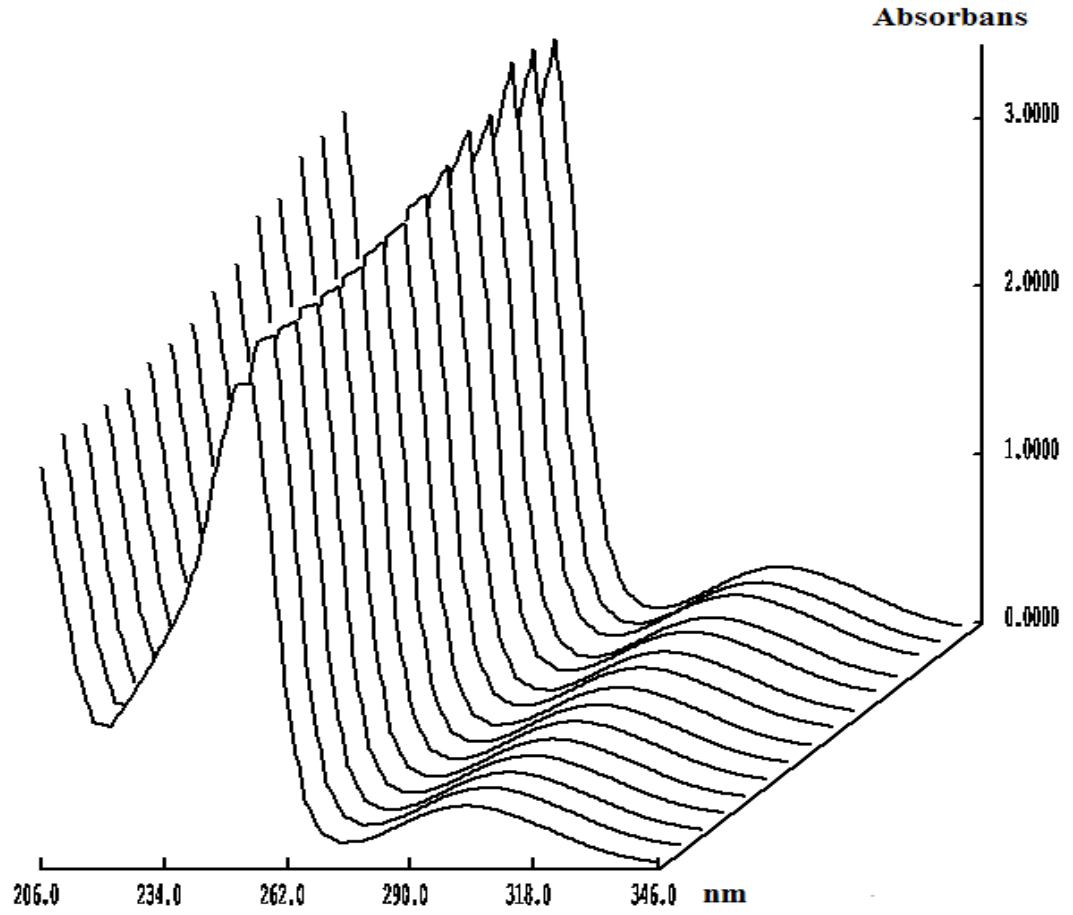
Bu bileşiğin 1.10^{-4} M lık çözeltisinden 40 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı 0,05 M KOH ile titre edilmiştir. Promazinin % 35 asetonitril-su ikili karışımında yapılan spektrum taramasında spektrofotometre cihazından alınan absorbans- dalga boyu grafiği Şekil 4.21' de verilmiştir. Bileşiğin spektrum taramasından elde edilen verilerle tersiyer amin grubunun protonasyon sabitine ait pH - absorbans ilişkisini gösteren non lineer regresyon (NLREG) programı kullanılmıştır(Şekil 4.22). NLREG programından elde edilen pKa değeri bileşiğin STAR programındaki verilerinin değerlendirilmesi aşamasında tahmini pKa değeri olarak kullanılmış ve STAR grafiği Şekil 4.23' de verilmiştir.



Şekil 4.21. Promazinin %35 ACN-H₂O ortamında spektral davranışı



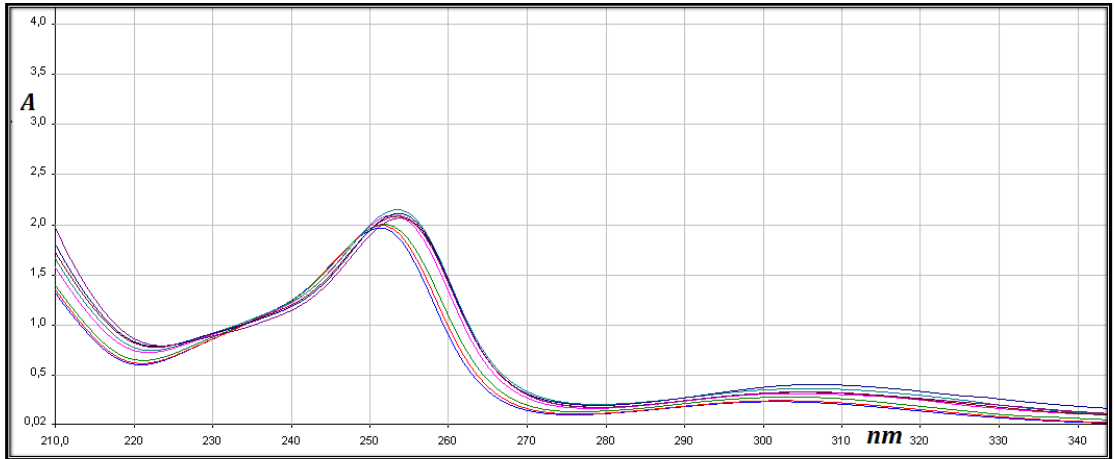
Şekil 4.22. %35 (h/h) ACN - H₂O ikili karışımında promazinin pH - absorbans verilerinden yararlanarak elde edilen NLREG grafiği



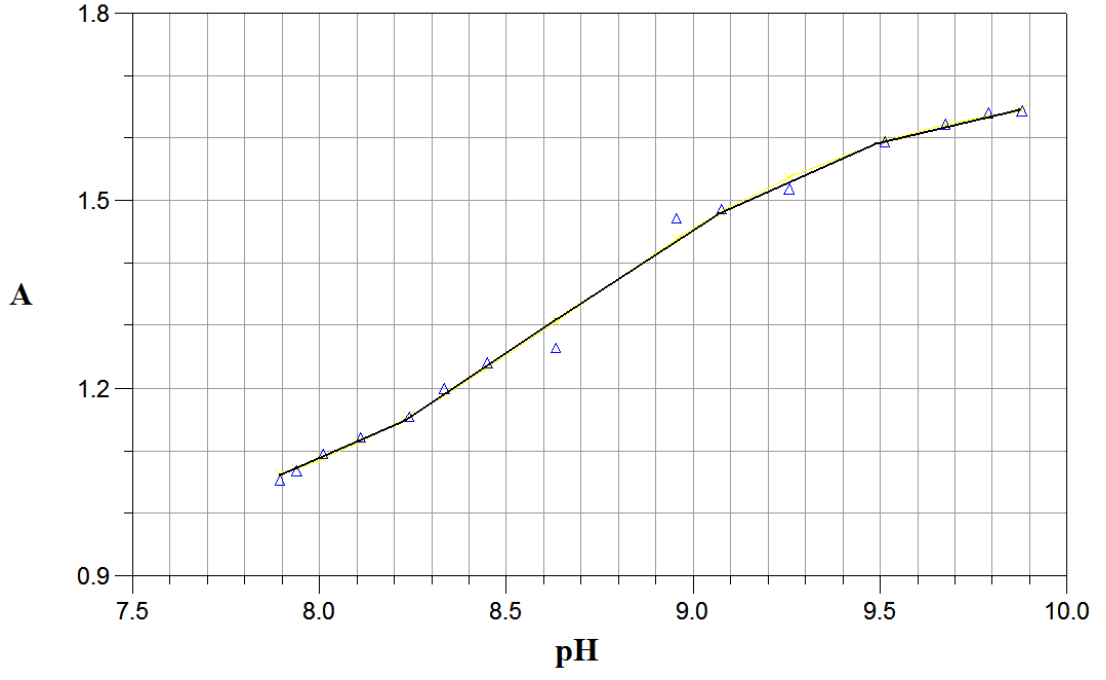
Şekil 4.23. % 35 ACN - H₂O ikili karışımında promazin için elde edilen STAR grafiği

4.5.2. Prometazinin % 35 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki spektrofotometrik titrasyon grafikleri

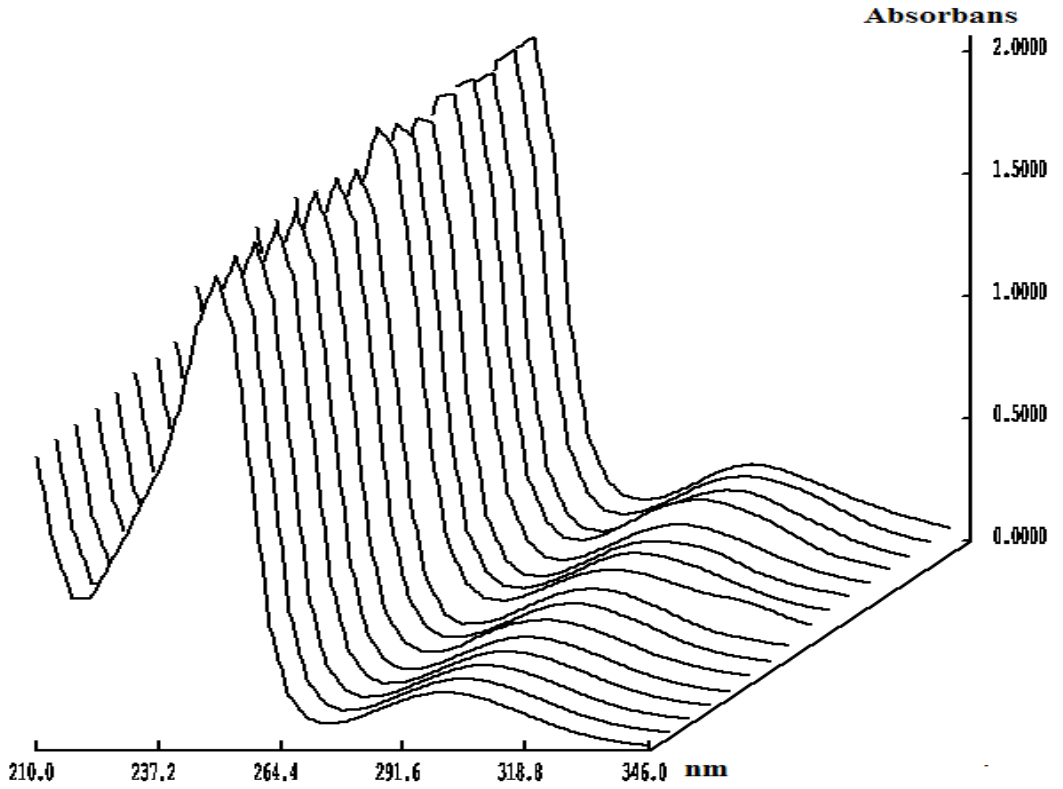
Bu bileşiğin 1.10^{-4} M lık çözeltisinden 40 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı 0,05 M KOH ile titre edilmiştir. Prometazinin % 35 asetonitril-su ikili karışımında yapılan spektrum taramasında spektrofotometre cihazından alınan absorbans- dalga boyu grafiği Şekil 4.24' de verilmiştir. Bileşiğin spektrum taramasından elde edilen verilerle tersiyer amin grubunun protonasyon sabitine ait pH - absorbans ilişkisini gösteren non lineer regresyon (NLREG) programı kullanılmıştır (Şekil 4.25). NLREG programından elde edilen pKa değeri bileşiğin STAR programındaki verilerinin değerlendirilmesi aşamasında tahmini pKa değeri olarak kullanılmış ve STAR grafiği Şekil 4.26' da verilmiştir.



Şekil 4.24. Prometazinin %35 ACN-H₂O ortamında spektral davranışı



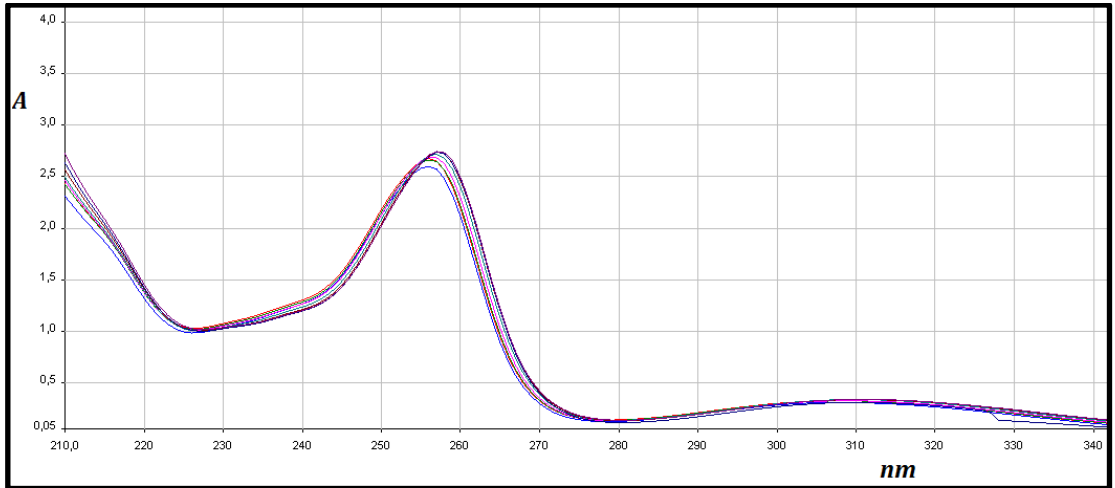
Şekil 4.25. %35 (h/h) ACN – H₂O ikili karışımında prometazinin pH - absorbans verilerinden yararlanarak elde edilen NLREG grafiği



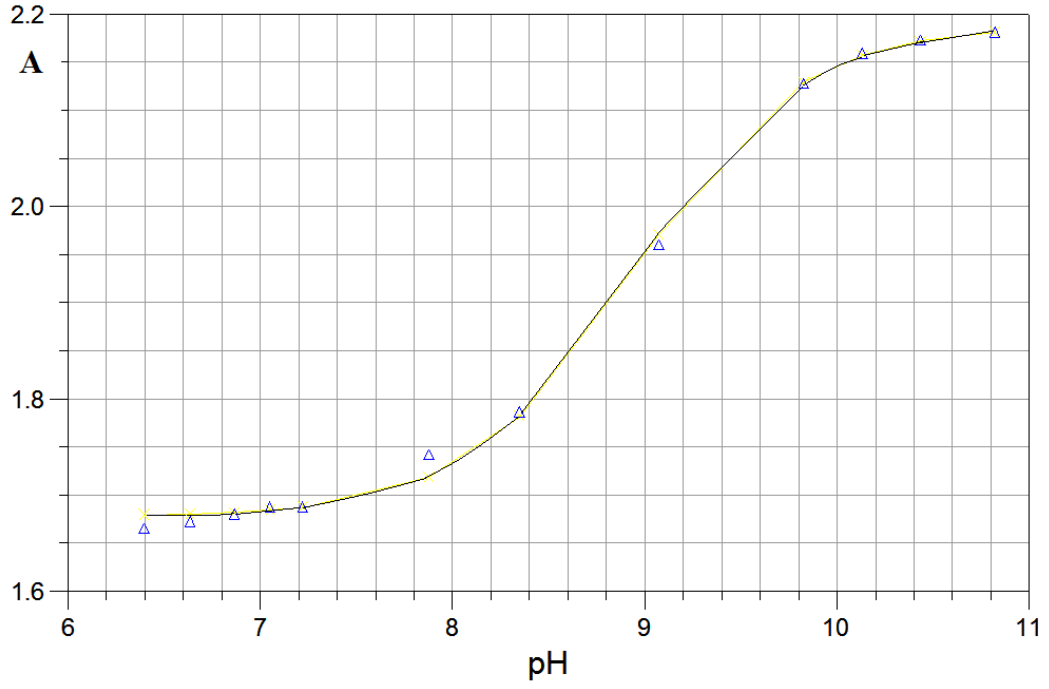
Şekil 4.26. %35 (h/h) ACN – H₂O ikili karışımında prometazin için elde edilen STAR grafiği

4.5.3. Klorpromazinin % 35 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki spektrofotometrik titrasyon grafikleri

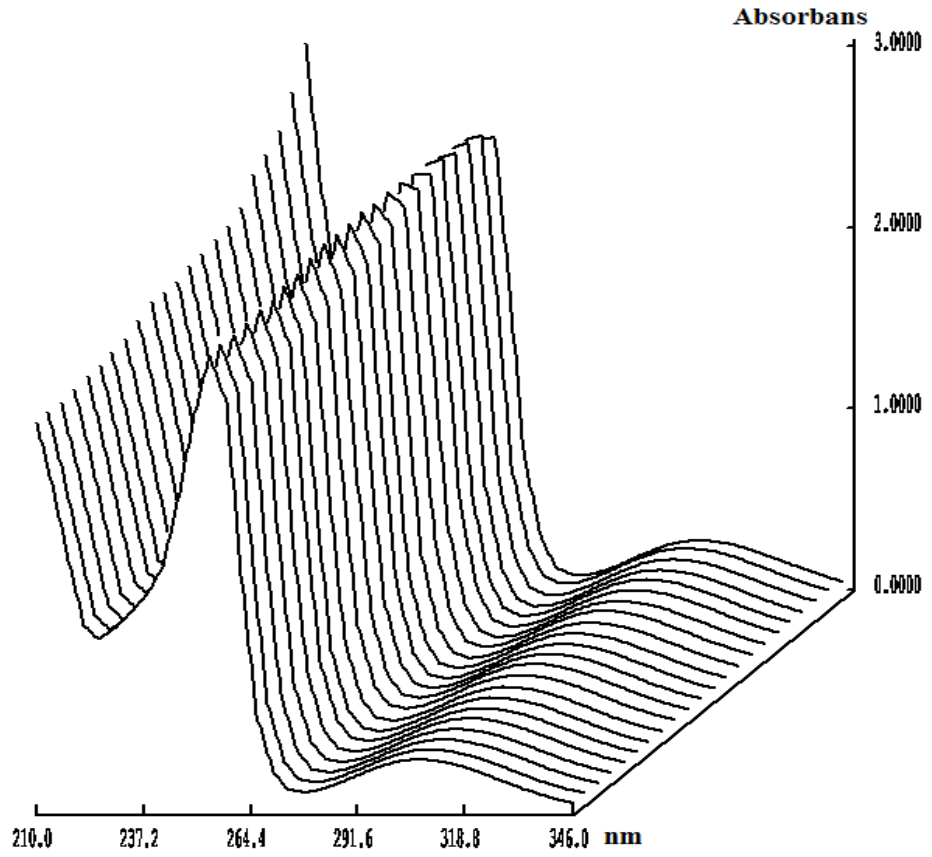
Bu bileşiğin 1.10^{-4} M lık çözeltisinden 40 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı 0,05 M KOH ile titre edilmiştir. Klorpromazinin % 35 asetonitril-su ikili karışımında yapılan spektrum taramasında spektrofotometre cihazından alınan absorbans- dalga boyu grafiği Şekil 4.27' de verilmiştir. Bileşiğin spektrum taramasından elde edilen verilerle tersiyer amin grubunun protonasyon sabitine ait pH - absorbans ilişkisini gösteren non lineer regresyon (NLREG) programı kullanılmıştır(Şekil 4.28). NLREG programından elde edilen pKa değeri bileşiğin STAR programındaki verilerinin değerlendirilmesi aşamasında tahmini pKa değeri olarak kullanılmış ve STAR grafiği Şekil 4.29' da verilmiştir.



Şekil 4.27. Klorpromazinin %35 ACN-H₂O ortamında spektral davranışı



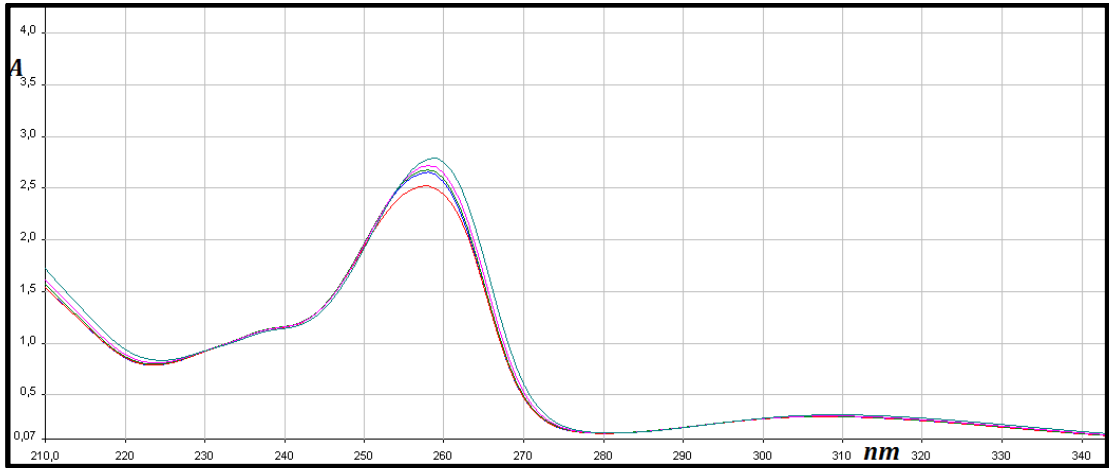
Şekil 4.28. %35 (h/h) ACN - H₂O ikili karışımında klorpromazinin pH - absorbans verilerinden yararlanarak elde edilen NLREG grafiği



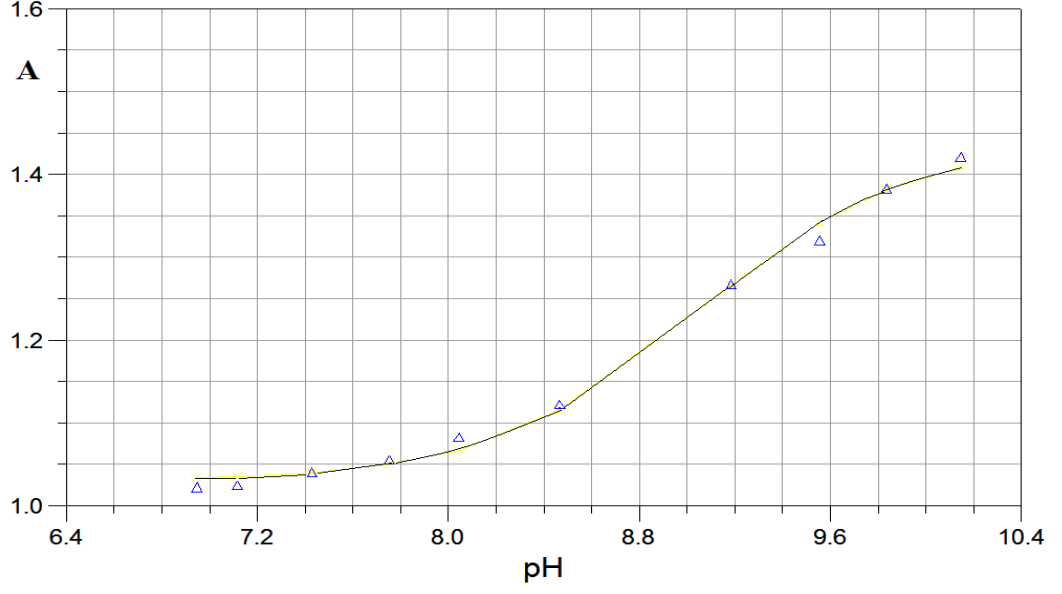
Şekil 4.29. %35 (h/h) ACN - H₂O ikili karışımında klorpromazin için elde edilen STAR grafiği

4.5.4. Triflupromazinin % 35 (v/v) asetonitril-su ikili karışımındaki spektrofotometrik titrasyon grafikleri

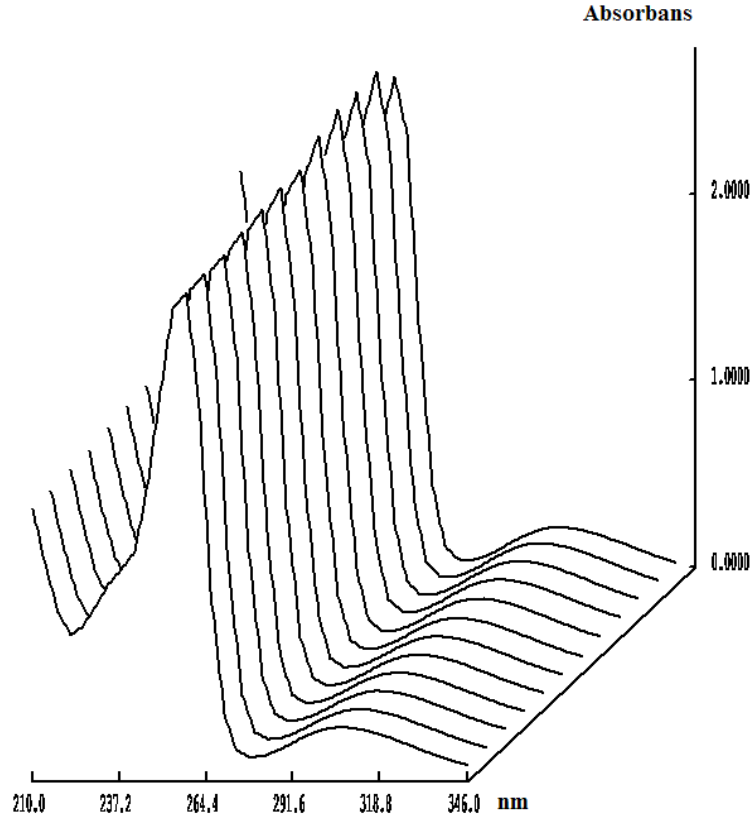
Bu bileşiğin 1.10^{-4} M lık çözeltisinden 40 mL, çift cidarlı hücrede 0,1 M KCl içeren ortamda ayarlı 0,05 M KOH ile titre edilmiştir. Klorpromazinin % 35 asetonitril-su ikili karışımında yapılan spektrum taramasında spektrofotometre cihazından alınan absorbans- dalga boyu grafiği Şekil 4.30' da verilmiştir. Bileşiğin spektrum taramasından elde edilen verilerle tersiyer amin grubunun protonasyon sabitine ait pH - absorbans ilişkisini gösteren non lineer regresyon (NLREG) programı kullanılmıştır(Şekil 4.31). NLREG programından elde edilen pKa değeri bileşiğin STAR programındaki verilerinin değerlendirilmesi aşamasında tahmini pKa değeri olarak kullanılmış ve STAR grafiği Şekil 4.32' de verilmiştir.



Şekil 4.30. Triflupromazinin %35 ACN-H₂O ortamında spektral davranışı



Şekil 4.31. %35 (h/h) ACN - H₂O ikili karışımında triflupromazinin pH - absorbans verilerinden yararlanarak elde edilen NLREG grafiği



Şekil 4.32. %35 (h/h) ACN - H₂O ikili karışımında triflupromazin için elde edilen STAR grafiği

5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu tez çalışmasında fenotiazin grubu bileşiklerden promazin, prometazin, klorpromazin ve triflupromazinin pK_a sabitleri potansiyometrik, spektroskopik ve ters faz sıvı kromatografik yöntemler kullanılarak tayin edilmiştir. Yapılan literatür araştırması, bu grup bileşiklerin pK_a tayini için çok az çalışma bulunduğunu göstermiştir. Bu nedenle bu konudaki önemli eksikliği gidermek için, bu çalışmada bileşiklerin pK_a değerleri üç yöntemle belirlenmiştir.

5.1.Fenotiazinlerin Bilgisayar Programlarıyla Hesaplanan İyonlaşma Sabitleri

Çalışma prensipleri farklı çeşitli bilgisayar programları, iyonlaşma/protonasyon sabitlerinin hesaplanmasında kullanılmaktadır. Bu çalışmada Marvin Sketch, ACD/Lab ve Pallas bilgisayar programları ile çalışılan fenotiazinlerin protonasyon sabitleri hesaplanmıştır (Çizelge 5.1).

Çizelge 5.1. Fenotiazinlerin paket programlarıyla hesaplanan protonasyon sabitleri

Bileşik				
Program	Promazin	Klorpromazin	Triflupromazin	Prometazin
Marvin Sketch	9,70	9,70	9,70	9,40
ACD/Lab	9,43±0,28	9,41±0,28	9,40±0,28	8,98±0,50
Pallas	4,75±1,40 9,37±1,40	4,06±1,40 9,37±1,40	3,59±1,40 9,37±1,40	- 8,98±1,53

5.2. Fenotiazinlerin Çeşitli Yöntemlerle Hesaplanan Protonasyon Sabitleri

Protonasyon sabitleri, bileşiklerin en önemli fizikokimyasal özelliklerinden biridir. Bileşiğin iyonlaşma özelliğini belirleyen temel parametredir. Günümüzde su-organik çözücü ikili karışımlarında protonasyon sabitlerinin tayininde potansiyometrik titrasyonlar, spektrofotometrik yöntemler, kapiler elektroforez ve sıvı kromatografik yöntemler sıklıkla kullanılmaktadır. Yapılan literatür taramasında çalışmacıların farklı yöntemler kullanarak bazı fenotiazinlerin iyon iyonlaşma/protonasyon sabitlerini hesaplamışlardır (Çizelge 5.2).

Çizelge 5.2. Fenotiazinlerin farklı analitik yöntemler kullanılarak hesaplanan iyonlaşma/protonasyon sabitleri

Bileşik	Yöntem	pKa	Literatür
Promazin	Potansiyometri	9,42(0,02)	Karpínska J., vd., (1996)
	Türev spektrofotometri	9,40(0,01)	
Klorpromazin	Potansiyometri	9,36(0,01)	Domańska U., vd., (2011)
	Türev spektrofotometri	9,35(0,01)	
Klorpromazin	UV-visible metot-dinamik metot	9,15	Domańska U., vd., (2011)
Flufenazin		10,01	
Promazin		9,37	
Tioridazin		8,89	
Trifluperazin		8,97	
Triflupromazin		9,03	

5.3. Sıvı Kromatografik Yöntem Veriler Kullanılarak Hesaplanan Protonasyon Sabitleri

Tezde çalışılan bileşiklerin sıvı kromatografik davranışlarının incelenmesinde ve protonasyon sabitlerinin %35, %40, %45 (v/v) asetonitril-su ortamında Cogent Phenyl Hydride (250 mm, 4.6 mm ID. S-4 μ m) kolon tercih edilmiştir. Enjeksiyon hacmi 20 μ L; dalga boyu (λ) promazin ve prometazin için 250 nm; klorpromazin ve triflupromazin için 254 nm'dir. Çalışma akış hızı 1,0 mL/dakika olup kolon sıcaklığı 25°C'dir. Kapasite faktörlerinin hesaplanmasında kullanılacak t_0 değeri urasilin mobil fazdaki çözeltisi kullanılarak belirlenmiştir; dalga boyu (λ) 210 nm olacak şekilde çalışılmıştır. Çalışılan mobil fazlara 100 mM fosforik asit olacak şekilde derişik fosforik asit ilave edilmiş ve NaOH ilavesi ile mobil fazın pH'sı (2,30; 2,50; 2,70; 2,90; 3,10; 3,50; 3,90) olacak şekilde ayarlanmıştır. Her bir bileşik ve urasil için iki tekrarlı enjeksiyonlarda elde edilen ortalama alıkonma zamanları ile kapasite faktörleri hesaplanmıştır. Kapasite faktörü-pH ilişkisi NLREG programı ile değerlendirilerek bileşiklerin pK_a değerleri hesaplanmıştır.

Promazin için farklı asetonitril oranlarında NLREG programıyla hesaplanan fenotiazin halkasına ait aminin protonasyon sabiti (pK_a) ve türlere ait kapasite faktörü değerleri (k_{BH} , k_B) standart sapmalarıyla birlikte verilmiştir (Çizelge 5.3).

Çizelge 5.3. Promazinin fenotiazin halkasına ait protonasyon sabitinin NLREG ile elde edilen pK_a değerleri

Promazin	% 30 ACN	% 40 ACN	% 45 ACN
pK_a	3,670 (0,038)	3,713(0,031)	3,856(0,064)
k_{BH}	4,460(0,080)	1,437(0,021)	0,816(0,038)
k_B	14,032(0,306)	4,818(0,090)	4,756(0,259)

Prometazin için farklı asetonitril oranlarında. NLREG programıyla hesaplanan fenotiazin halkasına ait aminin iyonlaşma sabiti (pK_a) ve türlere ait kapasite

faktörü değerleri (k_{BH}, k_B) standart sapmalarıyla birlikte verilmiştir (Çizelge 5.3).

Çizelge 5.4. Prometazinin fenotiazin halkasına ait protonasyon sabitinin NLREG ile elde edilen pK_a değerleri

Prometazin	% 30 ACN	% 40 ACN	% 45 ACN
pKa	3,026(0,070)	3,093(0,085)	3,250(0,100)
k_{BH}	2,972(0,260)	0,658(0,132)	0,665(0,118)
k_B	9,064(0,175)	3,452(0,108)	3,305(0,142)

Klorpromazin için, farklı asetonitril oranlarında NLREG programıyla hesaplanan fenotiazin halkasına ait aminin protonasyon sabiti (pK_a) ve türlere ait kapasite faktörü değerleri (k_{BH}, k_B) standart sapmalarıyla birlikte verilmiştir (Çizelge 5.5).

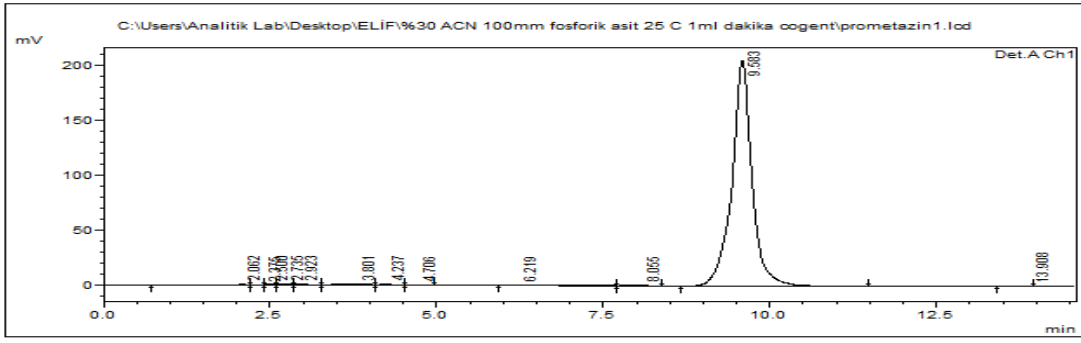
Çizelge 5.5. Klorpromazin fenotiazin halkasına ait protonasyon sabitinin NLREG ile elde edilen pK_a değerleri

Klorpromazin	% 30 ACN	% 40 ACN	% 45 ACN
pKa	3,449(0,040)	3,482(0,020)	3,876(0,063)
k_{BH}	7,955(0,184)	1,190(0,027)	0,821(0,036)
k_B	21,848(0,373)	6,485(0,063)	4,790(0,261)

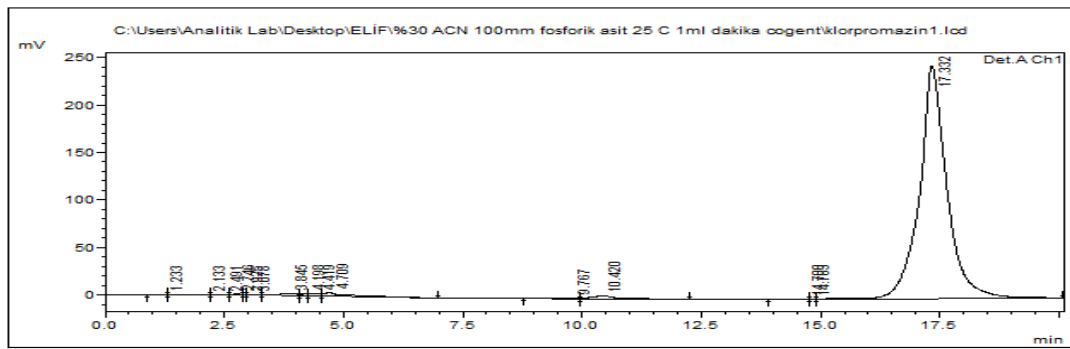
Triflupromazin için, farklı asetonitril oranlarında NLREG programıyla hesaplanan fenotiazin halkasına ait aminin protonasyon sabiti (pK_a) ve türlere ait kapasite faktörü değerleri (k_{BH}, k_B) standart sapmalarıyla birlikte verilmiştir (Çizelge 5.6).

Çizelge 5.6. Triflupromazin fenotiazin halkasına ait protonasyon sabitinin NLREG ile elde edilen pK_a değerleri

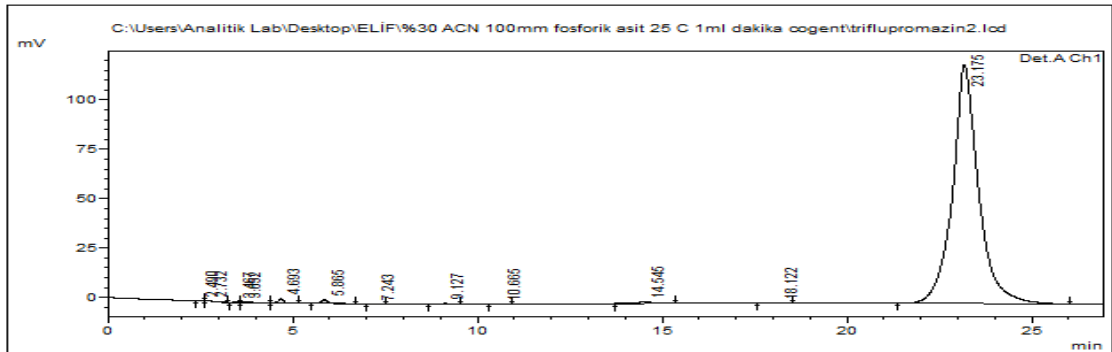
Triflupromazin	% 30 ACN	% 40 ACN	% 45 ACN
pKa	3,779(0,081)	3,795(0,054)	3,861(0,105)
k_{BH}	12,242(0,373)	2,859(0,031)	1,294(0,937)
k_B	33,365(0,731)	8,656(0,144)	6,484(0,531)



Şekil 5.1. Prometazinin cogent fenil hidrür kolonla yapılan deneyle elde edilen kromatogramı



Şekil 5.2. Klorpromazinin cogent fenil hidrür kolonla yapılan deneyle elde edilen kromatogramı



Şekil 5.3. Triflupromazinin cogent fenil hidrür kolonla yapılan deneyle elde edilen kromatogramı

5.4. Potansiyometrik Yöntemle İyonlaşma Sabitlerinin Tayini

Bu çalışmada analitik yöntemlerden birisi olan potansiyometri ile promazin ve klorpromazin pK_a sabiti tayini yapılmıştır. Protonasyon sabitinin belirlenmesi için yapılan deneylerde çözücü ortamı olarak asetonitril-su seçilmiştir. Potansiyometrik titrasyonlar % 35, % 40, %45, %50 ACN-su ortamı olmak

üzere 4 farklı ortamda çalışılmıştır. $2 \cdot 10^{-3}$ M, 30 mL çözeltide sıcaklık 25°C ' de sabit tutularak gerçekleştirilmiştir. İyonik şiddeti ayarlamak için 0,1 M KCl çözeltisi kullanılmıştır. Protonasyon sabitlerinin değerlendirilmesinde PKPOT programı kullanılmıştır. PKPOT programı, pK_a hesaplamalarında kullanılan bir bilgisayar programıdır. Bu programda tahmini pK_a değerleri olarak titrasyon grafiklerinin yarı nötralizasyonlarındaki pK_a değerleri kullanılmıştır. Promazin ve klorpromazinin pK_a değerleri PKPOT programı ile elde edilen pK_a değerleri Çizelge 5.7.' de verilmiştir.

Çizelge 5.7. Fenotiazinlerin PKPOT ile elde edilen pK_a değerleri

% ACN	Promazin	Prometazin	Klorpromazin	Triflupromazin
35	8,86(0,04)	8,46(0,05)	9,40(0,02)	8,78(0,04)
40	8,86(0,02)	8,36(0,06)	9,19(0,03)	8,71(0,03)
45	8,63(0,06)	8,25(0,04)	8,85(0,06)	8,55(0,07)
50	8,61(0,09)	8,17(0,07)	8,65(0,04)	8,49(0,06)

5.5. Spektroskopik Yöntemle Protonasyon Sabitlerinin Tayini

Promazin, prometazin, klorpromazin ve triflupromazinin %35 (v/v) su-asetonitril ikili karışımlarında tersiyer amin grubunun protonasyon sabitlerinin spektroskopik yöntemle tayini %35 ACN içeren asetonitril-su ikili karışımında gerçekleştirilmiştir. İyonik şiddet 0,1 M KCl ilavesiyle sağlanmıştır. Bileşiklerin $2.0 \cdot 10^{-3}$ M'lık çözeltileri asetonitril-su karışımında hazırlanmış ve $1.0 \cdot 10^{-4}$ M olacak şekilde seyreltilen çözelti çift cidarlı hücreye alınmış ve titrasyonlar gerçekleştirilmiştir. Titrasyon verileri NLREG programı kullanılarak değerlendirilmiştir. NLREG programından hesaplanan pK_a değerleri, spektroskopik titrasyon verilerinin hesaplanmasında kullanılan STAR programına tahmini pK_a olarak önerilmiştir. Bileşiğin bu program ile hesaplanan pK_a değerleri, standart sapmalarıyla birlikte Çizelge 5.10' da verilmiştir. Çizelgede ayrıca protonlanmış ve protonlanmamış türlerin absorpsiyon değerleri verilmiştir.

Çizelge 5.8. Fenotiazinlerin % 35 ACN-H₂O ikili karışımında pH-absorpsiyon verileri kullanılarak elde edilen NLREG pK_a değerleri

Bileşik	pK_a	A_{BH}	A_B
Promazin	8.909 (0.020)	2.054 (0.004)	2.643 (0.007)
Klorpromazin	8.943 (0.0690)	1.678 (0.006)	2.188 (0.0139)
Triflupromazin	9.049 (0.0690)	1.031 (0.006)	1.439 (0.0139)
Prometazin	8.667 (0.0499)	0.956 (0.0196)	1.687 (0.0128)

Çizelge 5.9. % 35 ACN-H₂O ikili karışımında fenotiazinlere ait STAR pK_a verileri

Bileşikler	% 35 ACN- H ₂ O
Promazin	8,842(0,021)
Klorpromazin	9,196(0,034)
Triflupromazin	9,225(0,039)
Prometazin	8,646(0,022)

5.6. Sonuç

İlaç etken maddelerinin analizlerinin güvenilir yöntemlerle yapılması, giderek zorunlu hale gelmektedir. Tezin konusu, halen yeterli bilgi birikimi olmayan alkil fenotiazin grubu bileşikler ile ilgilidir. Konu, kimya alanında çalışan araştırmacılar olduğu kadar tıp ve eczacılık alanlarına yönelik çalışmalar yapan araştırmacıların da ilgisini çekecektir. Yapılan literatür araştırması sonucu promazin, klorpromazin, triflupromazin ve prometazinin protonasyon sabitlerinin tayinini kapsayan yeterli çalışma bulunamamıştır. Bu bileşiklerin protonasyon sabitlerinin tayininde tercih edilen yöntem, sıvı kromatografidir ve bu bileşiklerin sıvı kromatografik yöntemle tayininde su-organik çözücü ikili karışımlarındaki iyonlaşma sabitlerine ihtiyaç duyulmaktadır. Bu tez çalışmasının fenotiazinlerin yapı özelliklerinden biri olan protonasyon sabitlerinin tayinine yönelik kapsamlı bir çalışma olduğu kanısındayız. Önerilen bu tez projesindealkilamino yan zincirli fenotiazin türevlerinin protonasyon sabitleri, ters faz sıvı kromatografik yöntem spektroskopik ve potansiyometrik yöntemler kullanılarak tayin edilmiştir. Su-organik çözücü ikili karışımında IUPAC tarafından önerilen pH standardizasyonuna uyulmuştur. Bunun için bu çalışma ile elde edilen veriler önemlidir. Tez çalışması kapsamında üç yöntemle elde edilen veriler birbirini desteklemiştir ve verilerin güvenilirliğini arttırmıştır.

6. KAYNAKLAR

ACD Lab. Program, 2012. Erişim Tarihi: 13.08.2012. <http://www.acdlabs.com>.

Allen, R., I., Box, K., J., Comer, J., E., A., Peake, C., Tam, K., Y., 1998. Multiwavelength Spectrophotometric Determination of Acid Dissociation Constants of Ionizable Drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17, 699–712.

Andrasi, M., Buglyo, P., Zekany, L., Gaspar, A., 2007. A Comparative Study of Capillary Zone Electrophoresis and pH-Potentiometry for Determination of Dissociation Constants. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 44, 1040–1047.

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., Macan, M.K., 2007. Determination of pK_a Values of Active Pharmaceutical Ingredients. *Trends in Analytical Chemistry*, 26(11), 1043-1061.

Barbosa, J., Berge's, R., Sanz-Nebot, V., 1998. Retention Behaviour of Quinolone Derivatives in High-Performance Liquid Chromatography Effect of pH and Evaluation of Ionization Constants. *Journal of Chromatography A*, 823, 411–422.

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

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

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.

Barbosa, J., Toro, I., Berge's, R., Sanz-Nebot, V., 2001. Retention Behaviour of Peptides, Quinolones, Diuretics and Peptide Hormones in Liquid

Chromatography Influence of Ionic Strength and pH on Chromatographic Retention. *Journal of Chromatography A*, 915, 85–96.

Barbosa, J., Barrón, D., Jiménez-Lozano, E., Sanz-Nebot, V., 2001. Comparison Between Capillary Electrophoresis, Liquid Chromatography, Potentiometric and Spectrophotometric Techniques for Evaluation of pKa Values of Zwitterionic Drugs in Acetonitrile–Water Mixtures. *Analytica Chimica Acta*, 437, 309–321.

Başat, D., 2013. Sülfonilüre Ve Tiyazolidindion Tipi Oral Antidiyabetiklerin İyonlaşma Sabitlerinin Potansiyometrik Yöntem ve Sıvı Kromatografik Yöntem İle Ölçümü. *Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi*, 127s, Isparta.

Barwick, V. J., 1997. Strategies for Solvent Selection – a Literature Review. *Trends in Analytical Chemistry*, 16-6, 293-308.

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.

Berge's, R., Sanz-Nebot, V., Barbosa, J., 2000. Modelling Retention in Liquid Chromatography as a Function of Solvent Composition and pH of The Mobile Phase. *Journal of Chromatography A*, 869, 27–39.

Bidlingmeyer, B.A., 1992. *Practical HPLC Methodology and Applications*. John Wiley & Sons, Inc., 452p, New York.

Bharathi, C., Prasad, Ch.S., Bharathi, D.V., Shankar, R., Rao, V.J., Dandala, R., Naidu, A., 2007. Structural Identification and Characterization of Impurities in Cefprozil Sodium. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 43, 733–740.

Blanco S.E., Almandoz M.C., Ferretti F.H., 2005. Determination of the overlapping pKa values of resorcinol using UV-visible spectroscopy and DFT methods. *Spectrochimica Acta Part A*, 61, 93–102.

Canbay, H.S., Demiralay, E.C., Alsancak, G., Ozkan, S.A., 2011. Chromatographic Determination of pKa Values of Some Water-Insoluble Arylpropionic Acids and Arylacetic Acids In Acetonitrile–Water Media. *Journal of Chemical Engineering Data*, 56(5), 2071-2076.

Çubuk-Demiralay, E., Koç, D., Daldal, Y.D., Çakır, C., 2012. Determination of Chromatographic and Spectrophotometric Dissociation Constants of Some Beta Lactam Antibiotics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 71, 139-143.

Demiralay, E. C., Alsancak, G., Ozkan, S.A., 2009. Determination of pKa 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. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 53, 475-482.

Dolan, J. W., Gant, J. R., Synyder .R., 1979. Gradient Elution in High Performance Liquid Chromatography. II: Practical Application to Reversed- Phase Systems. *Journal of Chromatography*, 165, 31-58.

Domanska U., Pelczarska A., Pobudkowska A., 2011. Solubility and pKa determination of six structurally related phenothiazines. *International Journal of Pharmaceutics*, 421, 135-144.

Franke U., Munk A., Wiese M., 1999. Ionization Constants and Distribution Coefficients of Phenothiazines and Calcium Channel Antagonists Determined by a pH-Metric Method and Correlation with Calculated Partition Coefficients. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 88, 89-95.

Goodman&Gilman A., 1996. *The Pharmacological Basis Of Therapeutics*. Ninth Ed., The McGraw-Hill Comp., 1143-1150.

Gündüz, T., 2002. *İnstrümental Analiz*. Gazi Kitabevi, 1357s, Ankara.

Hamilton, R.J., Sewel, P.A., 1982. *Introduction To High Performance Liquid Chromatography*. Chapman and Hall, 248p, New York.

Harang, V., Karlsson, A., Josefson, M., 2001. Liquid Chromatography Method Development and Optimization By Statistical Experimental Design and Chromatogram Simulations. *Chromatographia*, 54, 703-709.

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

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

Huber, L., 2007. *Validation and Qualification in Analytical Laboratories*. 2 nd ed. Informa Health Care, 318p, NewYork.

Jaszczyszyn A., Gasiorowski K, Swiatek P., Malinka W., Cieslik-Boczula K., Petrus J., Czarnic-Matuszewicz B., 2012. Chemical structure of phenothiazines and their biological activity. *Pharmacological Reports*, 64, 16-23.

- Karpinska J., Starczewska B., Puzanowska-Tarasiewicz H., 1996. Analytical Properties of 2- and 10 Disubstitued Phenothiazine Derivatives. *Analytical Sciences*, 12, 161-170.
- Kazakevich, Y., Lobrutto, Y., 2007. HPLC for Pharmaceutical Scientists. Wiley-Interscience, 1135p, Canada, USA.
- Kayaalp, S.O., 2005. Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji. Pelikan Yayıncılık, 188-200, Ankara.
- Lara J.F., Garcia-Campana M. A., Alés-Barrero F., Bosque-Sendra M. J., (2005) Determination of tiazinamiyum, promazin ve prometazin in pharmaceutical formulations using a CZE method. *Analytica Chimica Acta*, 535, 101-108.
- Lara J.F., Garcia-Campana M. A., Alés-Barrero F., Bosque-Sendra M. J. (2006) Determination of phenothiazines in pharmaceutical formulations and human urine using capillary electrophoresis with chemiluminescence detection. *Electrophoresis*, 27, 23-48.
- Lin, C., Liao W., Chen K., Lin W., 2003. Influence of pH on electrophoretic behavior of phenothiazines and determination of pKa values by capillary zone electrophoresis. *Electrophoresis*, 24, 3154-3159.
- Lipinski A. C., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney J. P., 1997. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 23, 3-25.
- Lipinski A. C., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney J. P., 2001. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 46, 3-26.
- Lipinski A. C., Lombardo F., Dominy B. W., Feeney J. P., 2012. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64, 4-17.
- Madej, K., Kala, M., Wozniakiewicz M., 2005. LC and Non-Aqueous CE Determination of Phenothiazines in Autopsy Samples. *Chromatographia*, 62, 533-538.
- Marvin Sketch Program, 2011. Chemaxon. Erişim Tarihi: 26.06.2011. <http://www.chemaxon.com>
- 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., 2012. Sherrod. Erişim Tarihi: 08.01.2012.
<http://www.sandh.com/Sherrod>.
- Pallicer M. J., Sales J., Rosés M., Rafols., Bosch E., 2011. Lipophilicity assessment of basic drugs (log P_{o/w} determination) by a chromatographic method. *Journal of Chromatography A*, 1218, 6356-6368.
- Polster J., Lachmann H., 1989. Spectrometric titrations: Analysis of chemical equilibria. VCH, Weinheim, pp 433, Germany.
- Poole, C.F., 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, Review. *Journal of Chromatography A*, 1037, 445-454.
- Rondinini, S., Mussini, P. R., Mussini, T., 1987. Reference Value Standard and Primary Standard for pH Measurements in Organic Solvents and Water-Organic Solvent Mixtures of Moderate to High Permittivities. *Pure & Applied Chemistry*, 59 (11), 1549-1560.
- Rondinini, S., Nese, A., 1987. Standard pH Values for Potassium Hydrogenphthalate Reference Buffer Solutions in Acetonitrile-Water Mixtures up to 70 wt % at Various Temperatures. *Electrochimica Acta*, 2(10), 1499-1505.
- Schoenmakers, P. J., Van Molle, S., Hayes, C. M. G., Uunk, L. G. M., 1991. Effects of pH in Reversed Phase Liquid Chromatography. *Analitica Chimica Acta*, 250,1-19.
- Shetti P., Venkatachalam A., 2010. Stability Indicating HPLC Method for Simultaneous Quantification of Trihexyphenidyl Hydrochloride, Trifluoperazine Hydrochloride and Chlorpromazine Hydrochloride from Tablet Formulation. *E-Journal of Chemistry*, 7, 299-313.
- Swartz, M.E., Krull, I.S., 1997. *Analytical Method Development and Validation*, Marcel Dekker, 96p, New York.
- Şanlı, S., 2013. UV Spectroscopic Method for Determining pKa Values of Some Antipsychotic Drugs in Water and Acetonitrile-Water Binary Mixtures. *J Solution Chem*, 42,967-978.
- Şanlı, N., 2007. Bazı Sülfonamidlerin Sıvı Kromatografi Yöntemi İle Tayini. Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Doktora Tezi, 125s, Isparta.
- Şanlı, 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, Journal of Brazillian Chemistry Society, 20, 939-946.

- Şanlı, S., Şanlı, N., Gümüştaş, M., Özkan, S.A., Karadaş, N., Aboul-Enein, H.Y., 2011. Simultaneous Estimation Of Ceftazidime And Ceftizoxime In Pharmaceutical Formulations By HPLC Method. *Chromatographia*, 74, 549-558.
- Şanlı, N., Şanlı, S., Sızır, U., Gümüştaş, M., Ozkan, S.A., 2011. Determination Of pKa Values Of Cefdinir And Cefixime By LC And Spectrophotometric Methods And Their Analysis In Pharmaceutical Dosage Forms. *Chromatographia*, 73, 1171-1176.
- Takács-Novák, K., Box, K.S., Avdeef, A., 1997. Potentiometric pK_a Determination of Water-Insoluble Compounds. Validation Study in Methanol/Water Mixtures. *International Journal of Pharmaceutics*, 151, 235-248.
- Takács-Novák, K., Tam, K.Y., 2000. Multiwavelength Spectrophotometric Determination of Acid Dissociation Constants Part V: Microconstants and Tautomeric Ratios of Diprotic Amphoteric Drugs. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 21, 1171-1182.
- Tanaka E., Nakamura T., Terada M., Shinozuka T., Hashimoto C., Kurihara K., Honda K., 2007. Simple and simultaneous determination for 12 phenothiazines in human serum by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B*, 854, 116- 120.
- Völgyi G., Ruiz R., Box K., Comer J., Bosch E., Takács-Novák K., 2007. Potentiometric and spectrophotometric pKa determination of water insoluble compounds: Validation study in a new cosolvent system. *Analytica Chimica Acta* 538, 418-428.
- Wiczling, P., Waszczuk-Jankowska, M., Markuszewski, M.J., Kaliszan, R., 2008. The Application of Gradient Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography to The p_{ka} and Log K_w Determination of Polyprotic Analytes. *Journal of Chromatography A*, 1214, 109-114.
- Yıldız, A., Genc, O., Bektaş, S., 1997. Enstrümental Analiz Yöntemleri. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, A64, 506s, Ankara.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Elif SEKMEN
Doğum Yeri ve Yılı : Antalya, 1990
Medeni Hali :Bekar
Yabancı Dili : İngilizce
E-posta : elif_unique_life@hotmail.com.tr

Eğitim Durumu

Lise : Saime Salih Konca Lisesi , 2008
Lisans :Süleyman Demirel Üniversitesi, Kimya Bölümü, 2012

Bildiriler(Ulusal/Uluslararası)

Sekmen, E., Söğüt, O., Daldal, Y.D., Alsancak, G., Özkan, S.A., Amlodipin ve valsartanın ikili karışımında kantitatif tayinleri için ters faz sıvı kromatografik yöntemin deneysel tasarım yaklaşımıyla optimizasyonu, VI. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 2012 .

Caceres, E.F., Çakır, C., **Sekmen, E.** , Recamales, M.A.F., Alsancak, G., 2013. Optimization and Validation of a HPLC Method for Simultaneous Determination of Chlortalidone and Atenolol Using an Experimental Design. 6th Black Sea Basin Conference on Analytical Chemistry, 10-14 September 2013, Trabzon/Turkey.

Sekmen E., Alsancak G., 2014. Promazin ve Prometazinin Protonasyon Sabitlerinin ACN-Su İkili Karışımında Ters Faz Sıvı Kromatografik ve Spektroskopik Yöntemlerle Tayini. 7. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 1-5 Eylül 2014, Kahramanmaraş.

Sekmen E., Çakır C., Alsancak G., Demiralay. Ç E., Özkan S., Alkilamino Yan Zincirli Fenotiazin Türevlerinin Protonasyon Sabitlerinin Potansiyometrik Yöntemle Tayini. 7. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 1-5 Eylül 2014, Kahramanmaraş.

Çakır., C., **Sekmen E.** Budak S., Alsancak G., Özkan S. Kalıcı Zwitter İyonik Yapılı Sefalasporinlerin İyonlaşma/Protanasyon Sabitlerinin Su -Organik Çözücü İkili Karışımlarında Spektroskopik Yöntemle Tayinleri. 7. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 1-5 Eylül 2014, Kahramanmaraş.

G. Alsancak, **Sekmen E.**, Çakır., C, , O.Bahşi, G. Koyuöz Hidroklorotiyazit ve Lisinopril İkili Karışımının Ters Faz Sıvı Kromatografik Yöntemle Ayrılmalarının Optimizasyonu. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 1-5 Eylül 2014, Kahramanmaraş.

Budak S., **Sekmen.** Imızoğlu N., Elgömuş G., Canbay H. Farmasötik Formülasyonda Lisinopril ve Hidroklorotiyazitin Ters Faz Sıvı Kromatografi Yöntemi ile Tayini. Ulusal Analitik Kimya Kongresi, 1-5 Eylül 2014, Kahramanmaraş.