

AKÜ FEMÜBİD 22 (2022) 051201 (979-988)

AKU J. Sci. Eng. 22 (2022) 051201 (979-988)

DOI: 10.35414/akufemubid.1126047

Araştırma Makalesi / Research Article

## Bazı Selektif Serotonin Geri Alım İnhibitörlerinin Termodinamik Protonasyon Sabitlerinin Su-Asetonitril İkili Karışımlarında Belirlenmesi

Yaşar Doğan DALDAL<sup>1\*</sup>, Ebru ÇUBUK DEMİRALAY<sup>2</sup><sup>1</sup> Kahramanmaraş İstiklal Üniversitesi, Elbistan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu, Eczane Hizmetleri Bölümü, Kahramanmaraş<sup>2</sup> Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, IspartaSorumlu Yazar <sup>1</sup>e-posta: yasardogan.daldal@istiklal.edu.tr\* ORCID ID: <https://orcid.org/0000-0003-1211-2686><sup>2</sup>e-posta: ebrucubuk@sdu.edu.trORCID ID: <https://orcid.org/0000-0002-6270-7509>

Geliş Tarihi: 04.06.2022

Kabul Tarihi: 24.10.2022

### Öz

#### Anahtar kelimeler

Selektif serotonin geri alım inhibitörü;  
Termodinamik protonasyon sabiti;  
Alıkonma davranışı;  
Su-asetonitril ikili karışımı

Bu çalışmada, trisiklik antidepresanlara alternatif olarak kullanılan selektif serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI)'nden sitalopram, fluvoksamin ve sertralinin su-asetonitril ikili karışımında, ters faz sıvı kromatografik (RPLC) yöntemle alıkonma davranışı incelenmiştir. Kromatografik analizler, mobil faz pH'sı 6,5 ila 10,5 arasında değişen, %45-%55 (h/h) arasında asetonitril içeren asetonitril-su ikili karışımlarında gerçekleştirilmiştir. Çalışma boyunca, kolon sıcaklığı ve akış hızı sırasıyla, 30 °C ve 0,8 mL/dakika'da sabitlenmiştir. Bu çalışmada, mobil faz pH değerlerine karşı bileşiklerin alıkonma değerlerinin lineer solvasyon enerjisi ilişkisi (LSER) yaklaşımıyla değerlendirilmesiyle teorik alıkonma değerleri hesaplanmıştır. Ayrıca farklı pH değerlerindeki mobil fazların aktivite katsayıları değerleri hesaba katılarak doğrusal olmayan regresyon programıyla bileşiklerin termodinamik protonasyon sabitleri ( $\log K_a$ ) belirlenmiştir. Hidrofobik özellikteki bileşiklerin  $\log K_a$  değerleri kullanılarak iki farklı yaklaşımla su ortamındaki protonasyon sabiti değerleri hesaplanmıştır. Çalışma sonunda her iki ekstrapolasyon yönteminden elde edilen sonuçların birbiriyle uyumlu olduğu görülmüştür.

## Determination of Thermodynamic Protonation Constants of Some Selective Serotonin Reuptake Inhibitors in Water-Acetonitrile Binary Mixtures

### Abstract

#### Keywords

Selective serotonin reuptake inhibitor;  
Thermodynamic protonation constant;  
Retention behaviour;  
Binary mixture of water-acetonitrile

In this study, the retention behaviour of citalopram, fluvoxamine, and sertraline, selective serotonin reuptake inhibitors (SSRIs) used as alternatives to tricyclic antidepressants, was investigated in a binary water-acetonitrile mixture by reverse-phase liquid chromatographic (RPLC) method. Chromatographic analyzes were performed in binary acetonitrile-water mixtures with mobile phase pH ranging from 6.5 to 10.5 and acetonitrile content between 45% and 55% (v/v). Throughout the study, the column temperature and flow rate were fixed at 30 °C and 0.8 mL/min, respectively. In this study, the theoretical retention values were calculated by evaluating the retention values of the compounds against the pH values of the mobile phase using the linear solvation energy relationship (LSER) approach. In addition, the thermodynamic protonation constants ( $\log K_a$ ) of the compounds were determined with a nonlinear regression program, considering the activity coefficients of the mobile phases at different pH values. Using the  $\log K_a$  values of the hydrophobic compounds, the values of the protonation constants in the water medium were calculated using two different approaches. At the end of the study, it was found that the results obtained by both extrapolation methods were compatible with each other.

## 1. Giriş

Selektif serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI'ler), depresyon ve duygu durum bozuklukları, anksiyete, bazı kişilik bozuklukları ve yeme bozuklukları gibi psikiyatrik hastalıkların tedavisinde, trisiklik antidepressanlara alternatif olarak kullanılan önemli antidepressanlardır (Jacobsen *et al.* 2015, Bermel *et al.* 2015). SSRI'ler, daha az belirgin antikolinergik yan etki göstermeleri ve şiddetli kardiyotoksositeye sahip olmamaları gibi önemli avantajlarından dolayı, trisiklik antidepressanlara alternatif olarak tercih edilirler (Aronson 2015). Bu grup ilaçlar spesifik organellerde depolanmadan önce, plazma zarı boyunca serotonin alımını engellerler ve bu sayede, histaminerjik, adrenerjik, serotonerjik, dopaminerjik ve kolinerjik reseptörler üzerinde çok az inhibitör etkisi vardır veya hiç yoktur. Sitalopram, fluvoksamin ve sertralin bu grubun önemli ilaçlarındandır (Aronson 2015, Hoirsch-Clapauch *et al.* 2014).

İlaçların hücre zarlarından geçişi ve dokularda absorpsiyonu ve dağılımı, pasif difüzyon ile ilacın moleküler halde olduğu formda gerçekleşir. Bir ilacın iyonlaşmamış formu, iyonize formuna kıyasla lipidlerde daha fazla çözünür olduğundan, ilacın hücre zarından geçişi ve dokularda absorpsiyonu ve dağılımı bu formda gerçekleşir. Bundan dolayı, ilaçların absorpsiyon, dağılım, metabolizma ve atılım (ADME) özelliklerinin belirlenmesinde iyonlaşma, büyük bir etkiye sahiptir. Asidik veya bazik özelliklere sahip bir molekülün iyonlaşma/protonasyon sabiti ( $pK_a$ ) değerinin bilinmesi, o molekülün belirli bir pH'da iyonlaşma derecesini tahmin etmeye yardımcı olur.

$pK_a$  değeri, ters faz sıvı kromatografik (RPLC), potansiyometrik, UV-VIS spektrometrik ve kapiler elektroforetik (CE) (Daldal vd. 2014, Beltran *et al.* 2003, Barbosa *et al.* 2001) gibi çeşitli analitik yöntemlerle belirlenebilmektedir. Bu yöntemler arasında RPLC, diğer tekniklere kıyasla, hızlılığı, spesifikliği, doğruluk ve kesinliğinin yüksekliği ve kullanımının kolaylığı gibi birçok avantajından dolayı, ilaç keşif, geliştirme ve üretiminin tüm aşamalarında kullanılan önemli bir analitik yöntemdir. (Lunn 2005, Kazakevich and LoBrutto,

2007, Meyer 2010). RPLC yöntem ile  $pK_a$  sabitinin belirlenmesi, yapısında iyonlaşabilir fonksiyonel grup içeren bileşikler için mobil fazın pH'sı ile bu pH' da elde edilen alıkonma değerleri ( $t_R$ ) arasındaki ilişkiye dayanır. Bu ilişki, lineer solvasyon enerjisi (LSER) yaklaşımıyla mobil faz pH'sı, mobil faz derişimi ve  $pK_a$ 'nın bir fonksiyonu olarak ifade edilebildiğinden, bu metot kullanılarak bileşiklerin mobil fazdaki iyonlaşma/protonasyon sabiti ( ${}^s pK_a$ ) değerleri kolaylıkla belirlenebilir (Barbosa *et al.* 1996, Nikitas *et al.* 2002, Ortak and Demiralay 2019, Nane and Demiralay 2021, Daldal and Demiralay 2022). Suda çözünürlüğü yetersiz bileşiklerin su ortamındaki  $pK_a$  değerleri ( ${}^w pK_a$ ), su ve organik çözücü ortamlarında elde edilen  ${}^s pK_a$  değerleri ve bu hidro-organik karışımlardaki çözücünün mol kesri, dielektrik sabiti vb. gibi makroskopik parametreleri ile ilişkisi kullanılarak hesaplanır. Bu ekstrapolasyon metotlarını uygulayabilmek için en az 3 farklı su-organik çözücü ikili karışımında elde edilen  ${}^s pK_a$  değerlerine ihtiyaç duyulur (Herrero-Martínez *et al.* 2008).

Yapılan literatür taramasına göre, sertralin dışında, sitalopram ve fluvoksamin için su-organik çözücü ikili karışımlarında  $pK_a$  değeri ile ilgili herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır (Völgyi *et al.* 2007, Deák *et al.* 2006, Sun and Avdeef 2011, Avdeef and Sun 2011). Ayrıca, bu üç bileşiğin termodinamik protonasyon sabitlerinin tayiniyle alakalı herhangi bir analitik yöntemle yapılmış çalışma da bulunmamaktadır. Bu çalışma ile LSER metoduyla bileşiklerin mobil faz pH'sı ve alıkonma ilişkilerinin değerlendirilmesi, tayini gerçekleştirilen su-organik çözücü ikili karışımlarında hesaplanan aktivite katsayıları kullanılarak doğrusal olmayan regresyon (NLREG) programıyla termodinamik  ${}^s pK_a$  değerlerinin belirlenmesi ve su ortamındaki  $pK_a$  ( ${}^w pK_a$ ) değerlerinin hesaplanması amaçlanmıştır.

## 2. Materyal ve Metot

### 2.1. Deneyde Kullanılan Kimyasal Maddeler

Çalışmada kullanılan ilaç etken maddeleri (safılık  $\geq$  %99) Sigma-Aldrich'ten (St. Louis, MO, ABD) tedarik edilmiştir. Mobil faz hazırlamasında kullanılan asetonitril (MeCN), sodyum hidroksit, potasyum asit

ftalat ve amonyum klorür Merck firmasından (Darmstadt, Almanya), o-fosforik asit ve amonyak (HPLC grade) Riedel-de Haen firmasından (Almanya) temin edilmiştir.

## **2.2. Deneide Kullanılan Cihazlar**

İncelenen bileşiklerin sıvı kromatografik davranışlarını araştırmak ve  $pK_a$  değerlerini belirlemek için Shimadzu marka yüksek performanslı sıvı kromatografi cihazı kullanılmıştır. Sistem pompa (LC -20AD), UV dedektörü (SPD-20A), kolon fırını (CTO -20A) ve gaz giderme ünitesinden (DGPU-20A3) oluşmaktadır.

HPLC mobil fazının pH ölçümleri için Mettler Toledo MA 235 pH/iyon metre (Schwerzenbach, İsviçre) ve Mettler Toledo InLab 413 Ag/AgCl (Schwerzenbach, İsviçre) kombine cam elektrodu kullanılmıştır. IUPAC kurallarına göre, asetonitril-su ikili karışımlarında elektrot kalibrasyonu için referans standart çözelti olarak potasyum asit ftalat (0,05 mol/kg) seçilmiştir (Rondinini *et al.* 1987). Mobil fazın pH'sının ayarlanması sırasında kolon sıcaklığı  $25 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,1 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de sabit tutulmuştur. Çalışmada kullanılan ultra saf su, Direct-Q<sup>®</sup>3 UV su arıtma sisteminden (Millipore, Bedford, MA, ABD) temin edilmiştir.

## **2.3. Standart Çözeltilerin ve Mobil Fazın Hazırlanması**

Sıvı kromatografik çalışma için her ilaçtan 0,0010 g tartılmış, 10 mL çalışılan mobil fazda çözülmüştür ve 100  $\mu\text{g/mL}$ 'lik standart madde çözeltileri elde edilmiştir. Bu çalışmada, mobil fazlardaki asetonitril (MeCN) miktarının değişiminin bileşiklerin alıkonmasına etkisi %45, %47,5, %50, %52,5 ve %55 (h/h) MeCN olmak üzere, su-MeCN ikili karışımlarında analiz edilmiştir. Hazırlanan mobil fazların tampon derişimi 30 mM olacak şekilde ve pH değerleri 6,0 ila 10,5 arasında değişen mobil fazlar hazırlanmıştır. 30 mM o-fosforik asit içeren mobil fazların pH'sı 6,0 ila 8,0 aralığında, 1 M sodyum hidroksit eklenerek, 30 mM amonyum klorür içeren mobil fazların pH'sı 8,5 ile 10,5 aralığında, derişik amonyak eklenerek ayarlanmıştır. Çalışmada kullanılan tüm çözeltiler günlük taze hazırlanıp, kullanımına kadar  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de saklanmıştır.

## **2.4. Yöntem**

Bu çalışmada, sitalopram, fluvoksamin ve sertralinin sıvı kromatografik tayini Gemini NX C18 (250x3,0 mm I.D., 5  $\mu\text{m}$ , Phenomenex<sup>®</sup>, ABD) kolonda gerçekleştirilmiştir. Çalışma için seçilen bu kolon, geniş çalışma pH'sı aralığına sahip, bazik özellikteki bileşiklerin analizine uygun ve tekrarlanabilirliği yüksek yeni nesil bir kolondur.

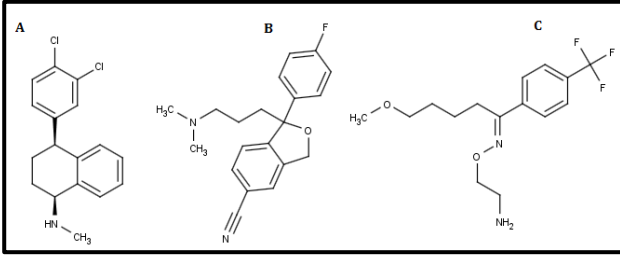
Hazırlanan standart ilaç çözeltilerinden 20  $\mu\text{L}$  sıvı kromatografi cihazına enjekte edilmiş, her bileşik için üç enjeksiyon yapıp, ortalama alıkonma süreleri ( $t_R$ ) belirlenmiştir. Hesaplanan  $t_R$  değerlerinin bağıl standart sapması (%RSD) % 1,0'in altında hesaplanmıştır. Sıvı kromatografik ölçümler, 0,8 mL/dakika akış hızında,  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de gerçekleştirilmiştir. Çalışılan bileşikler 210 nm'de belirlenmiştir.

## **3. Bulgular**

### **3.1. LSER Metodolojisi Alıkonma Davranışının ve Termodinamik $pK_a$ Değerlerinin Belirlenmesi**

SSRI grubuna ait antidepresanlardan olan sertralin, sitalopram ve fluvoksamin, kimyasal yapılarındaki amin gruplardan dolayı bazik özellik gösteren, lipofilite sabiti ( $\log P$ ) değerleri sırasıyla 5,76; 3,76; 2,80 ve suda çözünürlüğü zayıf olan apolar özellikteki bileşiklerdir (Şekil 1) (Int Kyn. 1). Genellikle, RPLC yöntemde bazik bileşiklerin analizi, bileşiğin özellikle iyonlaşmış formunun, kolonun dolgu materyalindeki silanol kalıntılarıyla reaksiyona girmesi sonucu, sıvı kromatografik analizlerde istenmeyen pik simetrisinin oluşmasından dolayı zordur. Ayrıca, klasik silika gruplarını içeren kromatografik kolonların çalışma pH aralıkları, 2 ila 7 arasında kısıtlıdır. Bu nedenlerden dolayı, bazik bileşiklerin sıvı kromatografik analizinde, modifiye edilmiş pH aralıkları geniş, kolonlar tercih edilmektedir (Miguel and Barbas 2003, Volná *et al.* 2017). Bu çalışmada, çalışılan bileşiklerin kimyasal özelliklerine uygun, geniş bir pH aralığında çalışma imkanı sunan (pH 1-12) yeni nesil kolonlardan Gemini NX C18 kolonu seçilmiştir. Ayrıca, sıvı kromatografik çalışma boyunca elde edilen piklerin

simetrisi ve tekrarlanabilirliği, seçilen kolonun bu çalışma için uygun olduğunu göstermektedir.



**Şekil 1.** A) Sertralin, B) sitalopram ve C) fluvoksaminin kimyasal yapısı

Bu çalışmada, sertralin, sitalopram ve fluvoksaminin  $t_R$  değerleri, %45, %47,5, %50, %52,5 ve %55 (h/h) MeCN içeren su-MeCN ikili karışımlarında analiz edilmiştir. Mobil faz pH aralığı 6,0 ila 10,5 olan, bileşiklerin iyonik ve moleküler formlarda olduğu pH aralıklarında çalışma gerçekleştirilmiştir. Çalışmada, bileşiklerin 3 tekrarlı olarak elde edilen  $t_R$  değerlerinin ortalaması alınarak, LSER modeliyle değerlendirilmiştir. LSER modelinde bazik fonksiyonel gruplara sahip iyonlaşabilir bir bileşiğin  $t_R$  değeri, aşağıdaki denklem ile matematiksel olarak ifade edilebilir: (Li 2002)

$$\log t_R = \log t_{R_{HA}} + \frac{U}{1 + V \cdot 10^{\pm(pH - pK_a)}} \quad (1)$$

Eşitlik 1'de U ve V değerleri, ayarlama (fitting) katsayılarıdır. Bu denklemde U,  $\log f$  değeriyle açıklanır.  $f$  değeri, bileşiğin iyonlaşmış formunun alıkonma değerinin, bileşiğin moleküler formuna oranını ifade etmektedir (Eşitlik 2).

$$\left( f = \left( \frac{t_{R_{A^-}}}{t_{R_{HA}}} \right) \right) \quad (2)$$

V ise yapısında organik çözücü içeren mobil fazın  $pH - pK_a$  değişimini ifade eder. Başlangıç değeri olarak U ve V değerleri sırasıyla, -1 ve 4 olarak alınır (Li 2002).

RPLC yöntem kullanılarak belirlenen bileşiklerin deneysel ortalama  $t_R$  değerleri kullanılarak, Eşitlik 1 ile çalışılan her mobil faz pH değerinde ve su- MeCN ortamı için teorik  $t_R$  hesaplanmıştır. Teorik alıkonma zamanlarının logaritması ( $\log t_{R_{teo.}}$ ) ve deneysel olarak elde edilen alıkonma değerlerinin logaritması ( $\log t_{R_{den.}}$ ) arasındaki farklar alınarak ve hesaplanan artık kareler toplamı (RSS) değerleri minimize

edilerek sonuçlar elde edilmiştir. %45 MeCN-su ortamı için LSER yöntemiyle hesaplanmış  $\log t_{R_{den.}}$  ve  $\log t_{R_{teo.}}$  değerleri Çizelge 1'de verilmiştir.

Çizelge 1'deki artık kareler toplamı (RSS) değerleri incelendiğinde, bu değerlerin oldukça küçük olduğu görülmektedir. Ayrıca, LSER yaklaşımının bileşiklerin  $pK_a$  değerlerinin tayininde kullanılabilmesi için, teorik  $t_R$  ve deneysel  $t_R$  değerleri arasında çizilen grafiğin doğrusal olması (korelasyon katsayısı en az 0,99) ve eğimi kesim değerlerinin sırasıyla 1 ve 0'a yakın olması gereklidir (Şekil 2).

Yapılarında iyonlaşabilen gruplar içeren bileşikler, farklı pH değerlerinde farklı alıkonma değerlerine sahiptir (Kazakevich and LoBrutto, 2007). Çalışılan bileşikler bazik özellikte olduğu için pH 6'da iyonlaşmış, pH 10,5'da da moleküler formda bulunur. Bileşiklerin %50 (h/h) MeCN içeren MeCN-su ikili karışımda elde edilen alıkonmalarını gösteren kromatogramlar Şekil 3'de verilmiştir.

Çalışılan mobil faz pH (6,0-10,5 aralığında) değerlerine karşın analizlenen  $t_R$  değerleri grafiğe geçirildiğinde sigmoidal davranış gözlenmiştir (Şekil 4). Bileşiklerin termodinamik  $\xi pK_a$  değerleri hesaplanan aktivite katsayıları ( $\gamma$ ) kullanılarak doğrusal olmayan regresyon (NLREG) programı ile belirlenmiştir. Sonuçlar standart sapma değerleriyle birlikte, Çizelge 2'de verilmiştir.

Sertralin ve sitalopram tek bir  $pK_a$  değerine sahiptir. Sertralin ve sitalopram için hesaplanan  $\xi pK_a$  değerleri sırasıyla bileşiklerin yapısındaki sekonder ve tersiyer amine aittir. Fluvoksaminin yapısında iki bazik fonksiyonel grup bulunmaktadır. Fluvoksaminin birinci iyonlaşması, benzen halkasına 1 nolu yerden bağlanmış N-(2-aminoetoksi)-5-metoksipentanimidoil yapısındaki birinci azota ait olduğundan ve bu iyonlaşmaya ait  $pK_a$  değerinin teorik olarak 1,52 olarak hesaplanmasından (Int Kyn. 1) ve ayrıca çalışmada kullanılan kolonun pH değeri 1'in altında çalışmaya uygun olmadığından, bileşiğin  $pK_{a1}$  değeri belirlenememiştir. Bu yapıda bulunan primer amine ait  $pK_{a2}$  değeri ise kullanılan kromatografik kolonun geniş pH aralığına sahip olması nedeniyle belirlenebilmiştir. Çizelge 2'de görüldüğü gibi MeCN derişimi arttıkça bileşiklerin

$s_pK_a$  değerinin azalmaktadır. Bu bazik bileşiklerde beklenen sıvı kromatografik davranıştır.

**Çizelge 1.** %45, %50 ve %55 (h/h) MeCN içeren MeCN-H<sub>2</sub>O ikili karışımlarında bileşiklerin LSER yaklaşımıyla hesaplanan  $\log t_{R_{teo.}}$  ve  $\log t_{R_{den.}}$  değerleri

pH	Sitalopram			Fluvoksamin			Sertralin		
	$\log t_{R_{den.}}$ (den.)	$\log t_{R_{teo.}}$ (teo.)	$(\log t_{R_{den.}} - \log t_{R_{teo.}})^2$	$\log t_{R_{den.}}$ (den.)	$\log t_{R_{teo.}}$ (teo.)	$(\log t_{R_{den.}} - \log t_{R_{teo.}})^2$	$\log t_{R_{den.}}$ (den.)	$\log t_{R_{teo.}}$ (teo.)	$(\log t_{R_{den.}} - \log t_{R_{teo.}})^2$
<b>%45 MeCN-H<sub>2</sub>O (h/h)</b>									
6	0.652	0.657	3.049x10 <sup>-05</sup>	0.608	0.611	1.183x10 <sup>-05</sup>	0.773	0.836	4.040x10 <sup>-03</sup>
6.5	0.668	0.660	6.248x10 <sup>-05</sup>	0.624	0.616	7.214x10 <sup>-05</sup>	0.872	0.847	6.070x10 <sup>-04</sup>
7	0.668	0.670	3.056x10 <sup>-06</sup>	0.624	0.631	3.768x10 <sup>-05</sup>	0.872	0.881	7.927x10 <sup>-05</sup>
7.5	0.707	0.699	6.107x10 <sup>-05</sup>	0.667	0.673	3.332x10 <sup>-05</sup>	1.030	0.974	3.138x10 <sup>-03</sup>
8	0.780	0.776	1.250x10 <sup>-05</sup>	0.786	0.773	1.687x10 <sup>-04</sup>	1.209	1.183	6.849x10 <sup>-04</sup>
8.5	0.907	0.935	7.882x10 <sup>-04</sup>	0.932	0.938	3.730x10 <sup>-05</sup>	1.443	1.483	1.633x10 <sup>-03</sup>
9	1.131	1.135	1.535x10 <sup>-05</sup>	1.085	1.090	2.074x10 <sup>-05</sup>	1.705	1.724	3.806x10 <sup>-04</sup>
9.5	1.320	1.275	2.085x10 <sup>-03</sup>	1.177	1.173	1.527x10 <sup>-05</sup>	1.848	1.843	2.593x10 <sup>-05</sup>
10	1.362	1.338	6.069x10 <sup>-04</sup>	1.208	1.205	7.120x10 <sup>-06</sup>	1.898	1.887	1.141x10 <sup>-04</sup>
10.5	1.372	1.361	1.211x10 <sup>-04</sup>	1.221	1.216	2.744x10 <sup>-05</sup>	1.909	1.902	4.888x10 <sup>-05</sup>
	RSS*			RSS*			RSS*		
	3.787x10 <sup>-03</sup>			4.315x10 <sup>-04</sup>			1.075x10 <sup>-02</sup>		
<b>%50 MeCN-H<sub>2</sub>O (h/h)</b>									
6	0.639	0.637	7.596x10 <sup>-06</sup>	0.602	0.600	3.953x10 <sup>-06</sup>	0.755	0.804	2.383x10 <sup>-03</sup>
6.5	0.634	0.639	1.890x10 <sup>-05</sup>	0.605	0.603	7.302x10 <sup>-06</sup>	0.814	0.811	6.610x10 <sup>-06</sup>
7	0.655	0.646	8.186x10 <sup>-05</sup>	0.616	0.611	2.348x10 <sup>-05</sup>	0.867	0.835	1.015x10 <sup>-03</sup>
7.5	0.660	0.666	2.770x10 <sup>-05</sup>	0.632	0.635	7.861x10 <sup>-06</sup>	0.914	0.902	1.467x10 <sup>-04</sup>
8	0.714	0.718	1.644x10 <sup>-05</sup>	0.695	0.700	1.902x10 <sup>-05</sup>	1.077	1.061	2.756x10 <sup>-04</sup>
8.5	0.823	0.822	1.832x10 <sup>-06</sup>	0.816	0.829	1.660x10 <sup>-04</sup>	1.309	1.311	6.662x10 <sup>-06</sup>
9	0.936	0.942	2.965x10 <sup>-05</sup>	0.986	0.985	2.986x10 <sup>-06</sup>	1.508	1.535	7.245x10 <sup>-04</sup>
9.5	1.031	1.021	1.087x10 <sup>-04</sup>	1.115	1.090	6.294x10 <sup>-04</sup>	1.640	1.652	1.454x10 <sup>-04</sup>
10	1.066	1.055	1.174x10 <sup>-04</sup>	1.149	1.136	1.792x10 <sup>-04</sup>	1.705	1.698	5.451x10 <sup>-05</sup>
10.5	1.073	1.067	3.395x10 <sup>-05</sup>	1.160	1.152	6.370x10 <sup>-05</sup>	1.721	1.713	5.348x10 <sup>-05</sup>
	RSS*			RSS*			RSS*		
	4.441x10 <sup>-04</sup>			1.103x10 <sup>-03</sup>			4.812x10 <sup>-03</sup>		
<b>%55 MeCN-H<sub>2</sub>O (h/h)</b>									
6	0.630	0.626	1.488 x10 <sup>-05</sup>	0.599	0.599	9.609 x10 <sup>-08</sup>	0.755	0.804	2.383 x10 <sup>-03</sup>
6.5	0.632	0.627	2.390 x10 <sup>-05</sup>	0.605	0.604	1.838 x10 <sup>-06</sup>	0.814	0.811	6.610 x10 <sup>-06</sup>
7	0.632	0.630	1.428 x10 <sup>-06</sup>	0.622	0.618	1.861 x10 <sup>-05</sup>	0.867	0.835	1.015 x10 <sup>-03</sup>
7.5	0.633	0.640	4.415 x10 <sup>-05</sup>	0.656	0.657	1.103 x10 <sup>-06</sup>	0.914	0.902	1.467 x10 <sup>-04</sup>
8	0.661	0.664	1.195 x10 <sup>-05</sup>	0.737	0.748	1.220 x10 <sup>-04</sup>	1.077	1.061	2.756 x10 <sup>-04</sup>
8.5	0.708	0.714	3.133 x10 <sup>-05</sup>	0.889	0.887	2.774 x10 <sup>-06</sup>	1.309	1.311	6.662 x10 <sup>-06</sup>
9	0.778	0.776	5.693 x10 <sup>-06</sup>	1.014	1.006	6.505 x10 <sup>-05</sup>	1.508	1.535	7.245 x10 <sup>-04</sup>
9.5	0.829	0.819	1.053 x10 <sup>-04</sup>	1.074	1.066	6.030 x10 <sup>-05</sup>	1.640	1.652	1.454 x10 <sup>-04</sup>
10	0.847	0.838	8.304 x10 <sup>-05</sup>	1.093	1.089	1.417 x10 <sup>-05</sup>	1.705	1.698	5.451 x10 <sup>-05</sup>
10.5	0.848	0.845	1.114 x10 <sup>-05</sup>	1.101	1.097	1.351 x10 <sup>-05</sup>	1.721	1.713	5.348 x10 <sup>-05</sup>
	RSS*			RSS*			RSS*		
	4.441x10 <sup>-04</sup>			1.103x10 <sup>-03</sup>			4.812x10 <sup>-03</sup>		

\*RSS: Artık Kareler Toplamı

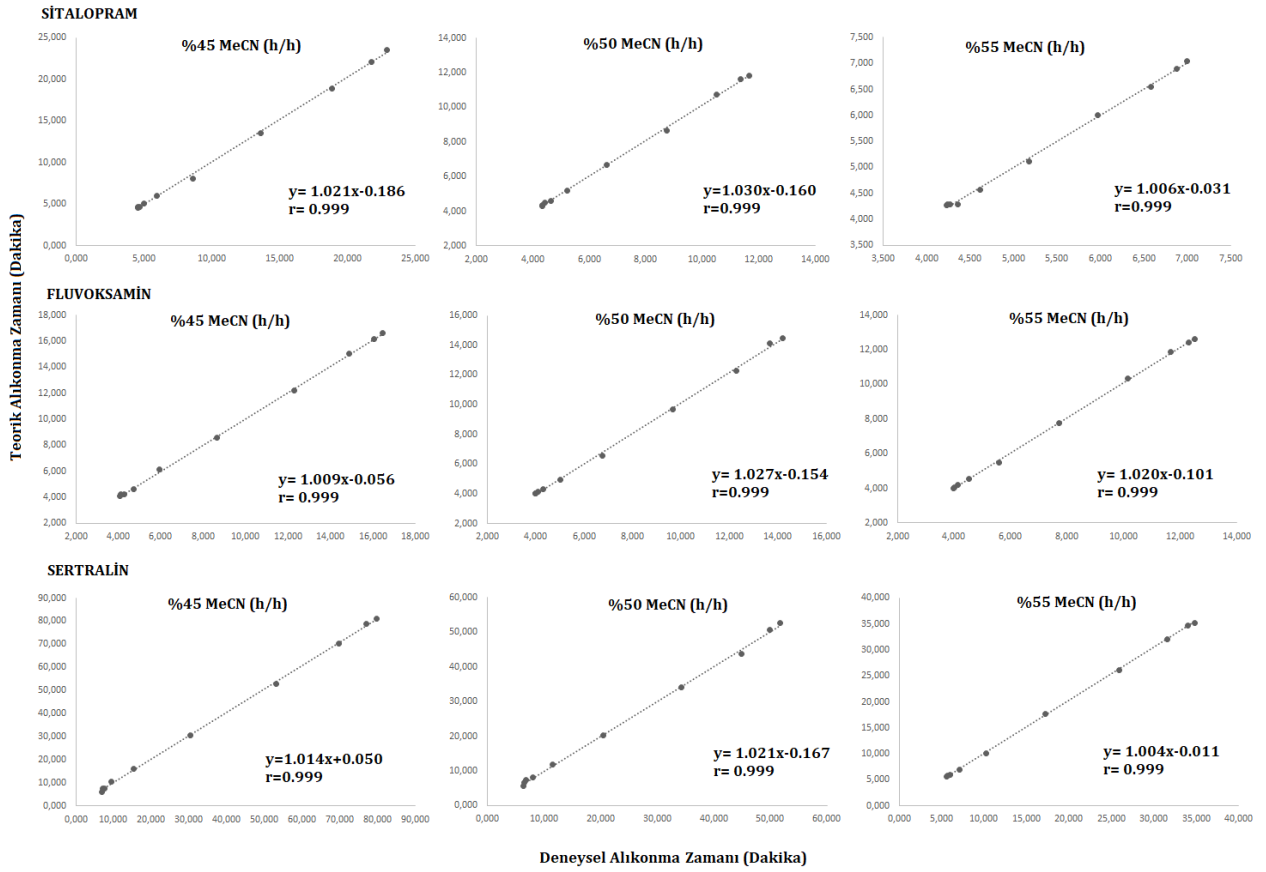
**Çizelge 2.** İncelenen bileşiklerin çalışılan asetonitril-su ortamlarında RPLC yöntemle elde edilen  $s_pK_a$  değerleri

Bil.	Param.	%45 (h/h)	%47.5 (h/h)	%50 (h/h)	%52.5 (h/h)	%55 (h/h)
Sit.	$s_pK_a$	8.464±	8.340±	8.209±	8.087±	7.957±
		0.024	0.023	0.025	0.015	0.027
Flu.	$s_pK_{a2}$	7.970±	7.865±	7.757±	7.648±	7.537±
		0.021	0.010	0.025	0.020	0.041
Sert.	$s_pK_a$	8.640±	8.580±	8.521±	8.459±	8.396±
		0.016	0.024	0.022	0.012	0.019

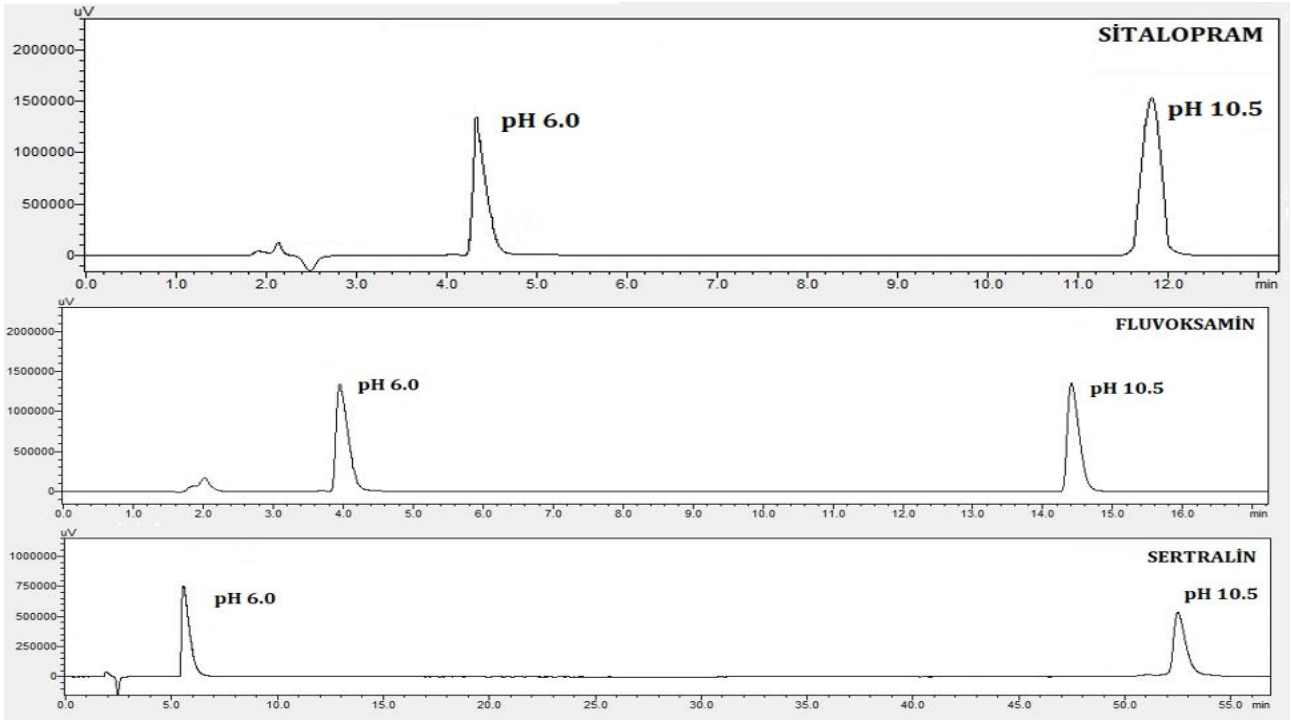
### 3.2. Çalışılan Bileşiklerin Su Ortamındaki Termodinamik Protonasyon Sabitinin ( $w_pK_a$ ) Belirlenmesi

Sitalopram, fluvoksamin ve sertralinin su ortamındaki termodinamik protonasyon sabiti değerleri ( $w_pK_a$ ), Yasuda-Shedlovsky eşitliği ve mol kesri- $s_pK_a$  ( $X_{MeCN}-s_pK_a$ ) doğrusal ilişki kullanılarak, bileşiklerin MeCN-su ortamlarında elde edilen  $s_pK_a$  değerlerinden hesaplanmıştır (Daldal and Demiralay 2022). Bileşiklerin  $w_pK_a$  değerlerini hesaplamak için bu çalışmada kullanılan ilk yaklaşım,  $X_{MeCN}-s_pK_a$ 'dır. Bu yaklaşım, bileşiklerin farklı ikili asetonitril-su karışımlarında elde edilen  $s_pK_a$  değerleri ile asetonitrilin mol kesri ( $X_{MeCN}$ ) arasındaki doğrusal ilişkiyi kullanır. Bu doğrusal ilişkiyle elde edilen

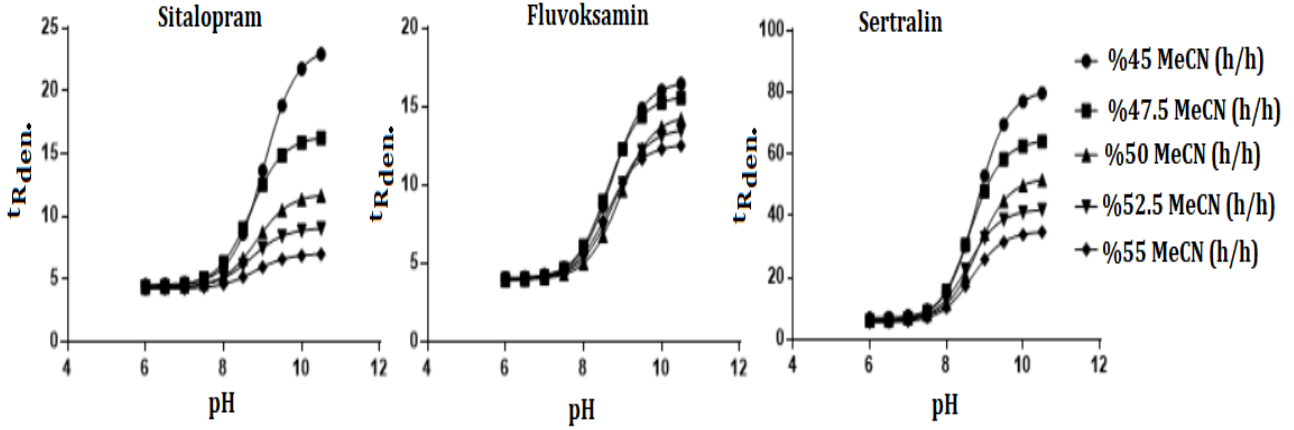
kesim değeri kullanılarak, bileşiğin  $w_pK_a$  değeri hesaplanır.



Şekil 2. Çalışılan bileşikler için deneysel alıkönma zamanlarına karşı teorik alıkönma zamanlarına göre çizilen grafikler



Şekil 3. Bileşiklerin %50 MeCN-su (h/h) ortamında elde edilen moleküler ve iyonik türlerine ait kromatogramlar



Şekil 4. Sitalopram, fluvoksamin ve sertralinin mobil faz pH'sı ve  $t_R$  değerleri arasındaki ilişki

Bileşiklerin  ${}^w pK_a$  değerlerini hesaplamada kullanılan ikinci yaklaşım olan Yasuda-Shedlovsky eşitliği, çalışılan mobil fazlardaki asetonitril dielektrik sabiti değerlerinin tersi ( $1/\epsilon$ ) ile bileşiklerin  ${}^s pK_a + \log [H_2O]$  değerleri arasındaki doğrusal ilişkiye dayanmaktadır. Bu ilişkiden elde edilen doğrusal denklemde, suyun molar derişim ve dielektrik sabiti değerlerinin yerine konulmasıyla bileşiklerin  ${}^w pK_a$  değerleri elde edilir.

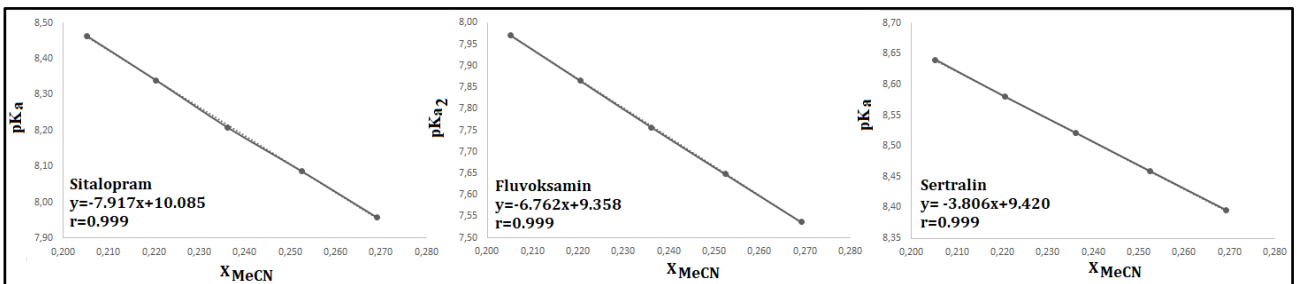
Her iki ekstrapolasyon metodunun bileşiklerin  ${}^w pK_a$  değerlerinin tayininde kullanılabilmesi için en az 3 farklı organik çözücü-su ikili karışımlarında elde edilen bileşiklerin  ${}^s pK_a$  değerlerine ihtiyaç vardır (Herrero-Martínez *et al.* 2008). Sitalopram, fluvoksamin ve sertralinin mol kesri- ${}^s pK_a$  yönteminden elde edilen doğrusal ilişki Şekil 5'de, Yasuda-Shedlovsky yaklaşımından elde edilen doğrusal ilişkisi ise Şekil 6'da verilmiştir. Ayrıca, bileşiklerin her iki yaklaşım kullanılarak hesaplanan  ${}^w pK_a$  değerleri Çizelge 3'de verilmiştir.

Çizelge 3. Çalışılan bileşiklerin farklı yaklaşımlarla hesaplanan  ${}^w pK_a$  değerleri

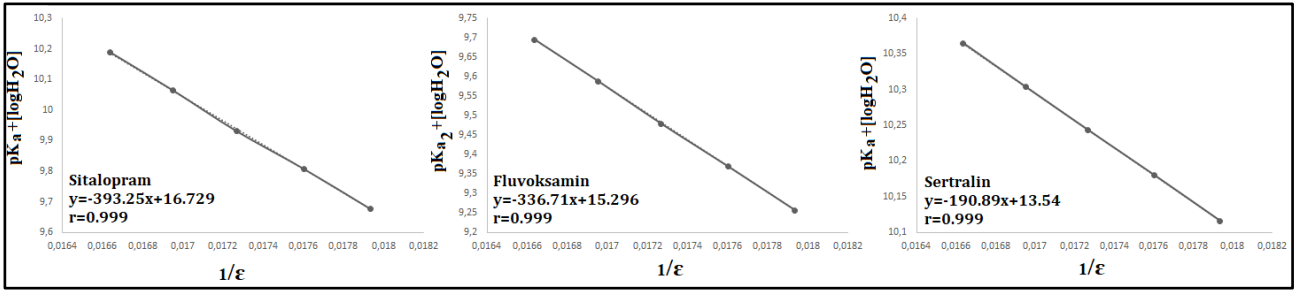
Bil.	Yasuda-Shed.	$X_{ACN}$ - ${}^s pK_a$	Chemicalize	Lit.
Flu.	${}^w pK_{a1}$	${}^w pK_{a1}$	${}^w pK_{a1}$	1.521
	${}^w pK_{a2}$	${}^w pK_{a2}$	${}^w pK_{a2}$	9.163
Sit.	9.963	10.085	9.785	9.38 <sup>1</sup> 9.07 <sup>2</sup>
Sert.	9.358	9.420	9.853	9.16 <sup>3</sup> 8.85 <sup>4</sup>

<sup>1</sup>Luan et al. 2005, <sup>2</sup>Sun and Avdeef 2011, <sup>3</sup>Deák et al. 2006, <sup>4</sup>Avdeef and Sun 2011

Şekil 5 ve Şekil 6'da verilen doğrusal grafiklerin denklemlerinde eğim değeri negatiftir. Bu negatif değer, bileşiklerin bazik fonksiyonel grup içerdiğini göstermektedir. Çizelge 3'de sunulan veriler incelenildiğinde, her iki metotla hesaplanan bileşiklerin  ${}^w pK_a$  değerleri arasında uyum görülmektedir. Literatürde, sertraline hariç, çalışılan diğer bileşiklerin  ${}^w pK_a$  değerlerine ait deneysel bir veri bulunamadığından, bileşiklerin  ${}^w pK_a$  değerleri kimyasal yapılarını temel alarak teorik olarak hesaplama yapan Chemicalize programından elde edilen verilerle karşılaştırılmıştır (Int Kyn. 1).



Şekil 5.  ${}^s pK_a$  ve MeCN'nin mol kesri arasındaki ilişki



Şekil 6. Çalışılan bileşikler için Yasuda-Shedlovsky yaklaşımıyla elde edilen grafikler

#### 4. Tartışma ve Sonuç

Fluvoksamin ve sitalopram için deneysel olarak elde edilen verilerden hesaplanan  $^w pK_a$  değerleri ile Chemicalize programı kullanılarak hesaplanan  $^w pK_a$  değerleri birbirine yakındır. Fluvoksamin ve sitalopramın  $pK_a$  değerinin deneysel olarak tayiniyle alakalı herhangi bir çalışma bulunmamakla birlikte, sitalopramın  $pK_a$  değerini teorik olarak hesaplayan bir çalışma mevcuttur (Luan et al. 2005).

Sertralin için Völgyi vd. (2007) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, metanol, dioksan ve asetonitril eşit hacimde karıştırılarak (MDM çözeltisi) farklı hacimlerde su ile (26-56,%a/a) ikili karışımlar oluşturulmuş ve potansiyometrik metotla titre edilmiştir. Titrasyon 25 °C’de sabit iyonik şiddette (I=0,15 M KCl) gerçekleştirilmiştir. Aynı çalışma koşullarında metanol-su ikili karışımlarında da sertralin titre edilmiştir. Bu su-organik çözücü karışımlarında hesaplanmış  $pK_a$  değerleri kullanılarak Yasuda-Shedlovsky metoduyla su ortamındaki  $pK_a$  değerleri hesaplanmıştır. Sertralinin su ortamındaki  $pK_a$  değeri MDM’den ekstrapole edilerek  $9,07 \pm 0,02$ ; metanolden ekstrapole edilerek olarak  $9,16 \pm 0,01$  hesaplanmıştır.

Deák vd. (2006) tarafından yapılan çalışmada, sertralin potansiyometrik yöntem kullanılarak %43.64-%63.97 (%a/a) derişim aralığında metanol-su ikili karışımlarında titre edilmiştir. Ortamın iyonik şiddeti 0.15 M KCl ile sabitlenmiştir. Bileşik 0.5 M KCl ile asitlendirilmiştir ve 0.5 M KOH ile azot atmosferinde, 25°C’de ve pH aralığı 1.8-12.2 aralığında titre edilmiştir. Çalışılan metanol-su ortamında hesaplanan  $pK_a$  değerleri Yasuda-Shedlovsky metodu kullanılarak ekstrapole edilmiş,

su ortamındaki  $pK_a$  değerleri 9.16 olarak hesaplanmıştır.

Sun ve Avdeef (2011) tarafından gerçekleştirilen çalışmada, sertralinin 25 °C’deki  $pK_a$  değeri 9.07 ve Abraham çözücü parametre (A,B,S,E,V) değerleri kullanılarak 37°C’deki  $pK_a$  değeri teorik olarak 9.03 olarak hesaplanmıştır.

Avdeef ve Sun (2011) tarafından yapılan çalışmada sertralinin 37 °C’deki  $pK_a$  değeri %15-31 (%a/a) derişim aralığında 1-propanol-su ikili karışımında titre edilmiştir. Ortamın iyonik şiddeti 0.15 M KCl ile sabit tutulmuştur. Çalışılan 1-propanol-su ortamında hesaplanan  $pK_a$  değerleri Yasuda Shedlovsky metodu kullanılarak ekstrapole edilmiş, su ortamındaki  $pK_a$  değeri  $8.85 \pm 0.09$  olarak hesaplanmıştır.

Sertralin için deneysel olarak yapılan bu çalışmalar potansiyometrik yöntemle gerçekleştirilmiştir. Bu yöntemle yapılan deneysel çalışmadan elde edilen sonuçlar ile gerçekleştirilen çalışma arasındaki küçük farklar, kullanılan farklı çözücü ortamından ve yöntem farklılığından kaynaklanmaktadır. Potansiyometrik yöntem uygulama pratikliği sayesinde, her ne kadar diğer analitik metotlara  $pK_a$  tayini için ön veri sağlaması açısından önemli olsa da, yöntemin  $pK_a$  tayininde uygulanmasında aşırı ve saf analit gereksinimleri, yüksek derişimden kaynaklanan analitin çözünme problemleri ortaya çıkarması gibi önemli dezavantajlara sahiptir. Ayrıca potansiyometrik metotta, titrasyonu gerçekleştirilen analitteki bulunması muhtemel iyonlaşabilen safsızlıklarında titrasyona dahil olmasından dolayı, eşdeğerlik noktası doğru bir şekilde belirlenememe ve bundan dolayı da tayini yapılacak maddenin  $pK_a$  değeri belirlenirken hatalı sonuçlar elde etme olasılığı yüksektir. (Kazakevich



and LoBrutto 2007, Yıldız *et al.* 1997). Bu dezavantajlarından dolayı, ilaç araştırma-geliştirme laboratuvarlarında ve ilaç endüstrisinde, geliştirilen yöntemin doğruluğu, seçiciliği, kesinliği, uygulama kolaylığı, tekrarlanabilirliği, az ve saf olmayan analitle çalışma imkânı sunması gibi önemli avantajlarından dolayı tercih edilen metot, ters faz sıvı kromatografi metodudur (Kazakevich and LoBrutto 2007, Meyer 2010). Bu nedenle gerçekleştirilen bu çalışmada, literatürdeki veri eksikliğini gidermek ve elde edilebilecek en doğru sonuçlara ulaşmak amacıyla, RPLC yöntemi kullanılarak su-MeCN ikili karışımlarında sitalopram, fluvoksamin ve sertralinin sıvı kromatografik davranışı belirlenmiştir. Bu çalışmada elde edilen veriler, RPLC yöntemiyle ve asetonitril-su ikili karışımlarında belirlenmiş ilk verilerdir.

## 5. Kaynaklar

- Aronson, J.K., 2016. *Meyler's Side Effects of Drugs*. Elsevier, 250-340.
- Avdeef, A., Sun, N., 2011. A New in situ brain perfusion flow correction method for lipophilic drugs based on the pH-dependent crone-renkin equation. *Pharmacological Research*, **28**, 517–530.
- 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.
- Barbosa, J., Sanz-Nebot, V., Toro, I., 1996. Solvatochromic parameter values and pH in acetonitrile-water mixtures Optimization of mobile phase for the separation of peptides by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, **725**, 249-260.
- Beltran, J.L., Sanli, N., Fonrodona, G., Barrón, D., Ozkan, G., Barbosa, J., 2003. Spectrophotometric, potentiometric and chromatographic pKa values of polyphenolic substances in water and acetonitrile-water media. *Analytica Chimica Acta*, **484**, 253–264.
- Bermel, R.A., Hashmonay, R., Meng, X., Randhawa, S., von Rosenstiel, P., Sfikas, N., Kantor, D., 2015. Fingolimod first-dose effects in patients with relapsing multiple sclerosis concomitantly receiving selective serotonin-reuptake inhibitors. *Multiple Sclerosis and Related Disorders*, **4**, 273–280.
- Daldal, Y.D., Çakır, C., Yılmaz, H., Demiralay, E.Ç., Özkan, S.A., Alsancak, G., 2014. Liquid Chromatographic, Spectrophotometric and Potentiometric pKa Determination of Ranitidine and Famotidine. *Current Drug Therapy*, **9**, 277-284.
- Daldal, Y.D., Demiralay, E.Ç., 2022. Development of liquid chromatographic and UV-visible spectrophotometric methods for determination of pKa values of folic acid antimetabolites. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **212**, 1-8.
- Deák, K., Takács-Novák, K., Tihanyi, K., Béla, N., 2006. Physico-Chemical profiling of antidepressive sertraline: solubility, ionisation, lipophilicity. *Medicinal Chemistry*, **2**, 1-6.
- Herrero-Martínez, J., M., Repollés, C., Bosch, E., Rosés, M., Ràfols, C., 2008. Potentiometric determination of aqueous dissociation constants of flavonols sparingly soluble in water. *Talanta*, **74**, 1008–1013.
- Hoirisch-Clapach, S., Nardi, A.E., Gris, J., Brenner, B., 2014. Are the antiplatelet and profibrinolytic properties of selective serotonin-reuptake inhibitors relevant to their brain effects?. *Thrombosis Research*, **134**, 11–16.
- Jacobsen, N.W., Hansen, C.H., Nellemann, C., Styrisshave, B., Halling-Sørensen, B., 2015. Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on three sex steroids in two versions of the aromatase enzyme inhibition assay and in the H295R cell assay. *Toxicology in Vitro*, **29**, 1729–1735.
- Kazakevich, Y., LoBrutto, Y., 2007. *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. Wiley-Interscience, 139-249.
- Li, J., 2002. Prediction of internal standards in reversed-phase liquid chromatography III. Evaluation of an alternative solvation parameter model to correlate and predict the retention of ionizable compounds. *Journal of Chromatography A*, **982**, 209–223.
- Luan, F., Ma, W., Zhang, H., Zhang, X., Liu, M., Hu, Z., Fan, B., 2005. Prediction of pKa for Neutral and Basic Drugs Based on Radial Basis Function Neural Networks and the Heuristic Method. *Pharmaceutical Research*, **22(9)**, 1454-1460.
- Lunn, G., 2005. *HPLC Methods For Recently Approved Pharmaceuticals*. John Wiley and Sons, 38-387.
- Meyer, V.R., 2010. *Practical High-Performance Liquid Chromatography*. John Wiley and Sons, 5-55.

- Miguel, L., Barbas, C., 2003. LC determination of impurities in azithromycin tablets. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **33(2)**, 211–217.
- Nane, I.D., Demiralay, E.C., 2021. Thermodynamic protonation constant values of meclizine and buclizine in acetonitrile-water binary mixtures, *Journal of Research in Pharmacy*, **25(1)**, 42–51.
- Nikitas, P., Pappa-Louisi, A., Agrafiotou, P., 2002. Effect of the organic modifier concentration on the retention in reversed-phase liquid chromatography II. Tests using various simplified models. *Journal of chromatography A*, **946(1–2)**, (2002) 33–45.
- Ortak, H.Y., Demiralay, E.C., 2019. Effect of temperature on the retention of Janus kinase 3 inhibitor in different mobile phase compositions using reversed-phase liquid chromatography, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **164**, 706–712.
- 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 and Applied Chemistry*, **59**, 1549–1560.
- Sun, N., Avdeef, A., 2011. Biorelevant pKa (37°C) predicted from the 2D structure of the molecule and its pKa at 25°C. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **56(2)**, 173–182.
- 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*, **583**, 418–428.
- Volná, T., Motyka, K., Hlaváč, J., 2017. RP-HPLC determination of dissociation constant using solely aqueous mobile phase. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **134**, 143–148.
- Yıldız, A., Genç, Ö., Bektaş, S., 1997. Enstrümental Analiz Yöntemleri. Hacettepe Üniversitesi Yayınları, 321-322.

#### **İnternet Kaynakları**

- 1- <http://www.chemicalize.org>, (01.06.2022)