



POPÜLER DİÜRETİK İLAÇ HİDROKLOROTİAZİDİN KROMATOĞRAFİK İYONLAŞMA SABİTİ DEĞERİNİN BELİRLENMESİ

DETERMINATION OF THE CHROMATOGRAPHIC IONIZATION CONSTANT VALUE OF THE POPULAR DIURETIC DRUG HYDROCHLOROTHIAZIDE

Yaşar Doğan DALDAL^{1*} , Ebru ÇUBUK DEMİRALAY² 

¹Kahramanmaraş İstiklal Üniversitesi, Elbistan Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksek Okulu 46300,
Kahramanmaraş, Türkiye

²Süleyman Demirel Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, 32200, Isparta, Türkiye

ÖZ

Amaç: Hidroklorotiazid, idrar çıkışının hızını ve hacmini arttırırken, Na⁺ ve Cl⁻ içeriğini azaltarak kan basıncını düşüren bir ilaçtır. Bu ilaç, tek başına ya da diğer hipertansif ilaçlarla beraber kullanılmaktadır. Ancak, bu kadar önem arz eden bir ilacın etki mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, bileşiğin hidro-organik sistemlerdeki iyonlaşma sabiti değeriyle alakalı literatürde sadece bir çalışma ve bileşiğin sudaki iyonlaşma sabiti değeriyle alakalı hiç çalışma yoktur. Bu nedenle bu çalışmada, farklı asetonitril-su ikili karışımlarında hidroklorotiazidin iyonlaşma sabiti değerlerinin tayini ve bu değerler kullanılarak çeşitli ekstrapolasyon yöntemleriyle hidroklorotiazidin su ortamındaki iyonlaşma sabiti değerinin tayini amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Hidroklorotiazidin iyonlaşma sabiti tayini %11, %13 ve %15 (h/h) asetonitril-su ikili karışımında 30°C'de, 1 ml/dakika akış hızında ve X Terra C18 kolonda gerçekleştirilmiştir. Hidroklorotiazidin iyonlaşma sabitinin belirlenmesi için pH-alıkonma ilişkisi, lineer solvasyon enerjisi ilişkisi (LSER) modeliyle değerlendirilmiştir. Sudaki iyonlaşma sabiti değerlerinin tayini için LSER modelinden elde edilen veriler, Yasuda-Shedlovsky ve mol kesri- ξ pK_a yöntemiyle değerlendirilmiştir.

Sonuç ve Tartışma: Her iki metotla hesaplanan termodinamik w pK_a değerlerinin birbiriyle uyumu dikkat çekicidir ve literatürdeki organik çözücü-su ortamında elde edilen değerle uyumludur. Bu bilgiler ışığında, hidroklorotiazidin tayin edilen w pK_a değerinin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği açıkça görülmektedir. Ayrıca, tayin edilen değerler hidroklorotiazidin herhangi bir analitik yöntemle tayin edilen literatürdeki ilk termodinamik w pK_a verileridir.

Anahtar Kelimeler: Hidroklorotiazid, iyonlaşma sabiti tayini, LSER modeli, RPLC

ABSTRACT

Objective: Hydrochlorothiazide is a drug that lowers blood pressure by decreasing Na⁺ and Cl⁻ levels while increasing the rate and volume of urine excretion. This drug is used alone or in combination with other antihypertensive medications. However, the action mechanism of such an important drug is unknown, and in the literature, there is only one study on the value of the ionization constant of the compound in hydroorganic systems and no study on the value of the ionization constant of the compound in water. Therefore, in this study, an attempt was made to determine the

* Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Yaşar Doğan Daldal
e-posta / e-mail: daldal.dogan@gmail.com, Tel. / Phone: +903444002685

Gönderilme / Submitted : 20.08.2023

Kabul / Accepted : 30.11.2023

Yayınlanma / Published : 20.01.2024

ionization constant of hydrochlorothiazide in various binary acetonitrile-water mixtures and to determine the ionization constant of hydrochlorothiazide in water by using these values through various extrapolation methods.

Material and Method: The ionization constant of hydrochlorothiazide was determined in a binary mixture of 11%, 13%, and 15% (v/v) acetonitrile and water at 30°C, a flow rate of 1 ml/min, and an X Terra C18 column. To determine the ionization constant of hydrochlorothiazide, the pH retention relationship was evaluated using the linear solvation energy relationship (LSER) model. To determine the ionization constant values in water, the data obtained from the LSER model were evaluated using the Yasuda-Shedlowsky method and the mole fraction- $^s pK_a$ method.

Result and Discussion: The agreement between the thermodynamic $^w pK_{a1}$ values calculated by the two methods is remarkable and consistent with those found in the literature for the organic solvent-water environment. Considering this information, the accuracy and reproducibility of the determined $^w pK_{a1}$ value of hydrochlorothiazide becomes clear. Moreover, the determined values are the first thermodynamic $^w pK_{a1}$ data in the literature obtained by any analytical method for hydrochlorothiazide.

Keywords: Hydrochlorothiazide, LSER model, RPLC, the determination of the ionization constant

GİRİŞ

Hidroklorotiazid (6-kloro-3,4-dihidro-2H-1,2,4- benzotiazidin-7-sülfonamid 1,1-dioksit) tiazid diüretikleri grubuna ait bir prototipik ilaç etken maddesidir [1,2]. Tiazid diüretikleri, benzenisülfonamid moleküllerinden bir halka oluşması sonucunda meydana gelmiş bileşiklerdir [1]. Bu bileşiklerin diüretik etki gösterebilmeleri için, yapılarında serbest bir sülfonamid grubunun bulunması gereklidir. Tiazid diüretikler, idrar çıkışının hacmini ve hızını artırırken, distal kıvrımlı tübülün ilk kısımlarında (Henle kısmına yakın yerde) Na^+ ve Cl^- içeriğini azaltarak, hücre dışı sıvı hacmini azaltıp (hipovolemi) kan basıncını düşüren ilaçlardır [1,3]. Ancak, hidroklorotiazid ve diğer tiazidlerin etki mekanizmaları tam olarak henüz belirlenememiştir. Bu ilaçlar, hafif derecede hipertansiyon olgularının tedavisinde tek başına kullanılırken, orta ve ileri olgularda diğer hipertansif ilaçlar ile kullanılırlar [1,3]. Hidroklorotiazid, suda zayıf çözünen, etil ve metil alkolde çözünürlüğü sudakinden daha da az olan bir bileşiktir.

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 [4-7]. Ayrıca, fizyolojik pH değerinde (pH 7.4) bir ilacın iyonlaşma durumunu belirleyebilmek, ilacın kimyasal yapısı ve onun biyolojik aktivitesi arasındaki ilişkinin belirlenmesine imkân sağladığından, enzim aktif bölgeleriyle ilacın etkileşimi hakkında da bilgi verebilir [4,6]. Bir molekülün iyonlaşma durumunun belirlenmesinde kullanılan fizikokimyasal değere iyonlaşma/protonasyon sabiti (pK_a) adı verilir [7,8].

İyonlaşma/protonasyon sabitinin belirlenmesinde potansiyometrik, kapiler elektroforez, spektrofotometre ve sıvı kromatografi gibi birçok analitik yöntem kullanılmasına rağmen [9-15] ters faz sıvı kromatografi yöntemi (RPLC), uygulama kolaylığı, tekrarlanabilirliği, yüksek doğruluk ve kesinlik değerlerine sahip olması, ayrıca, az kimyasal tüketimi ve analiz edilecek maddenin saf olmasının zorunlu olmaması gibi avantajlarından dolayı çoğunlukla tercih edilmektedir [9,10].

RPLC yöntemle bileşiklerin pK_a değerlerinin tayininde, yapısında iyonlaşabilen fonksiyonel grup bulunduran bileşiklerin sabit kolon sıcaklığı ve mobil faz derişiminde, farklı mobil faz pH değerleri için elde edilen alıkonma değerleri arasındaki değişim incelenir. Buna göre; bileşiklerin farklı mobil faz pH değerlerinde elde edilen alıkonma değerleri, pH değerlerine karşı grafiğe geçirilirse bir sigmoidal ilişki elde edilir [7,8,16]. Bu sigmoidal ilişkiyi matematiksel olarak ifade etmek için zaman içinde birçok model ileri sürülmüşse de içlerinde en çok rağbet gören model, lineer solvasyon enerji ilişkisi (LSER) modelidir [17,18]. Bu model, bileşiklerin alıkonma değerini (t_R) mobil faz pH değeri ve çalışılan mobil faz derişiminde elde edilen bileşiğin pK_a değerinin ($^s pK_a$) bir fonksiyonu olarak matematiksel bir eşitlikle ifade edebilmekte ve bu sayede, bileşiğin $^s pK_a$ değeri kolaylıkla belirlenebilmektedir [7,8].

Gerçekleştirilen çalışmada hidroklorotiazid için yapılan literatür taramasında, bileşiğin çeşitli

analitik yöntemlerle tablet formülasyonlarında ve birkaç bileşikle beraber eş zamanlı tayiniyle alakalı çalışmaların literatürde mevcut olduğu görülmüştür [19-22]. Ancak, hidroklorotiazidin bir çalışma dışında iyonlaşma sabiti değeriyle alakalı bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışmada hidroklorotiazidin ve yapısında asidik, bazik ve hem asidik hem de bazik fonksiyonel grubu bulunduran (zwitteriyonik) diğer bileşiklerin iyonlaşma sabitleri potansiyometrik yöntemle tayin edilmiştir. İyonlaşma sabiti tayini sadece %80 metanol-su ortamında gerçekleştirilmiştir [23]. Literatürde hidroklorotiazidin su ortamındaki pK_a ($^w pK_a$) tayiniyle ilgili hiçbir çalışma olmamakla birlikte, organik çözücü su karışımlarındaki pK_a ($^s pK_a$) değerleriyle alakalı da veri eksikliği bulunmaktadır. Bundan dolayı, bu çalışma hidroklorotiazidin çeşitli asetonitril-su ikili karışımlarında $^s pK_a$ değerinin RPLC yöntemle tayinine ve bu veriler kullanılarak, bileşiğin $^w pK_a$ değerinin tayinine odaklanmıştır. Ayrıca, bu çalışmayla elde edilen pK_a verisi bileşiğin farmakokinetik çalışmalarına ışık tutacağı gibi, aynı zamanda bileşiğin asetonitril-su ikili karışımlarında gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarında da yararlı olabilecektir.

GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmada Kullanılan Kimyasallar

Çalışmada pK_a tayininde incelenecek bileşik olan hidroklorotiazid, Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, ABD)'den temin edilmiştir. Mobil faz hazırlamada kullanılan asetonitril (ACN), *o*-fosforik asit (*o*-H₃PO₄), sodyum hidroksit (NaOH), amonyum klorür (NH₄Cl), amonyak (NH₃) ve mobil faz pH ayarlamasında kullanılan elektronun kalibrasyonu için kullanılan potasyum hidrojen ftalat, (KHP) Merck (Darmstadt, Germany)'den tedarik edilmiştir.

Kullanılan Cihazlar

Hidroklorotiazidin pK_a tayini için gerçekleştirilen deneyler, bir pompa (LC -20AD), bir UV dedektör (SPD-20A), bir kolon fırını (CTO -20A) ve bir gaz giderme ünitesinden (DGU-20A3) oluşan Shimadzu yüksek performans sıvı kromatografi cihazında gerçekleştirilmiştir. Analizi yapılacak bileşiğin tüm sıvı kromatografik çalışmaları X Terra C18 (250 mm × 4.6 mm i.d., 5 µm) kolonda gerçekleştirilmiştir. Bu kolon, özellikle bazik bileşiklerin analizi için geliştirilmiş ve geniş pH aralığında (pH 1-12) çalışma imkanı sunan bir kolondur. Mobil faz pH ayarlamalarında Mettler Toledo InLab 413 Ag/AgCl cam elektrotla birlikte Metleer Toledo MA 235 pH/ion analiz cihazı kullanılmıştır. Çalışmada mobil faz hazırlamada kullanılan saf su, Direct-Q[®]3 UV su saflaştırma ünitesi kullanılarak günlük olarak tedarik edilmiştir.

Ters Faz Sıvı Kromatografi (RPLC) Yöntemi

Bu çalışmada, hidroklorotiazidin pK_a değerlerinin tayini için asetonitril-su ikili karışımlarında çalışılmıştır. İlk olarak, incelenen bileşikten 0.0010 g tartılıp 10 ml mobil fazda çözülerek hidroklorotiazidin 100 ppm'lik çözeltisi elde edilmiştir. Bu çözelti, günlük olarak hazırlanmış, kullanımına kadar güneş ışığından korunarak +4°C'de saklanmıştır. Sıvı kromatografik çalışmaya başlamadan önce bileşiğin maksimum absorptans gösterdiği dalga boyunu belirleyebilmek amacıyla, 190-400 nm aralığında UV-Vis spektrofotometre cihazıyla spektral davranışı belirlenmiştir. Bu inceleme neticesinde, hidroklorotiazidin maksimum absorptans gösterdiği dalga boyu 270 nm olarak belirlenmiş ve sıvı kromatografik cihazın dedektörü bu dalga boyuna ayarlanmıştır.

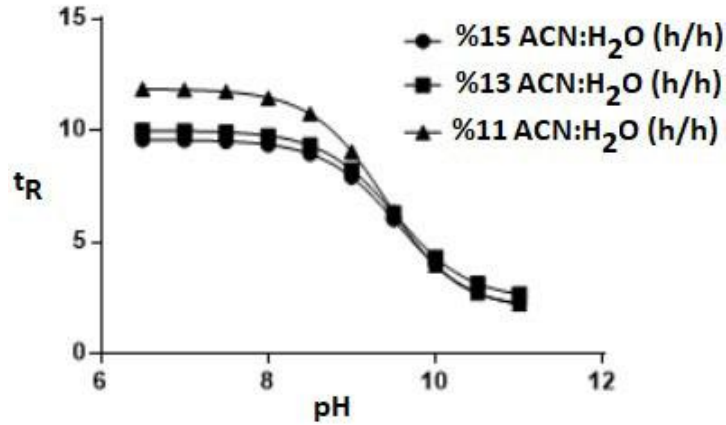
Çalışma, pH 6.5-11 aralığında ve yapısında %11, %13 ve %15 (h/h) asetonitril içeren ACN-su hidroorganik-su karışımlarında gerçekleştirilmiştir. pH 6.5 ila 8.0 aralığında hazırlanan mobil fazlarda 50 mM *o*-fosforik asit kullanılmış ve istenilen pH değerine mobil fazı getirebilmek için saf su kullanılarak 1 M derişimde hazırlanmış NaOH çözeltisi kullanılmıştır. pH 8.5 ila 11 aralığında hazırlanan mobil fazlarda 50 mM NH₄Cl kullanılmış ve istenilen pH değerine mobil faza derişik NH₃ ilave edilerek getirilmiştir. Hazırlanan hidroklorotiazid çözeltisi, her çalışmada RPLC sisteme 20 µl hacminde enjekte edilmiş ve bu prosedür üç kez tekrar edilerek ortalama alikonma zamanı değeri elde edilmiştir. Bileşiğin RPLC tayini için belirlenen sıvı kromatografik çalışma koşulları 30°C ve 1 ml/dakika akış hızında sabitlenmiştir.

SONUÇ VE TARTIŞMA

Bir bileşiğin RPLC ya da herhangi bir analitik yöntemle iyonlaşma/protonasyon sabiti tayinini gerçekleştirebilmek için, öncelikle bileşiğin protik ya da aprotik bir çözücüde çözünmesi gereklidir. Çalışılacak bileşiğin çözeltisinin hazırlanmasında birçok araştırmacının ilk tercih ettiği çözücü, çevreye en az toksik özelliklerinden dolayı sudur [9,10]. Ancak, günümüzde geliştirilen birçok bileşiğin daha çok lipofilik özellikte olması ve bundan dolayı sudaki çözünürlüklerinin yetersiz olması, bu bileşiklerin herhangi bir analitik yöntemle analizini zorlaştırmaktadır. Bu handikap, sudaki çözünürlüğü yetersiz bileşiklerin su-organik çözücü ikili karışımlarında çalışılmasıyla aşılmaktadır [24,25]. Başta RPLC olmak üzere, analitik çalışmalarda iyonik numuneleri ve tamponları çözme yeteneği, düşük toksisiteye sahip olma gibi sahip olma özellikleri sayesinde sudan sonra araştırmacılar tarafından en çok tercih edilen hidro-organik ikili karışımları asetonitril-su ve metanol-sudur [9,10]. Bu hidro-organik çözücü sistemleri içerisinde de asetonitril, çoğu organik asiti çözebilmesinin yanı sıra, nispeten yüksek dielektrik sabiti ($\epsilon=36$) ve düşük otoproliz sabiti ($pK_s=33.9$) sayesinde iyonlaşma/protonasyon sabiti tayini için daha uygun bir çözücüdür [26]. Bu sebeplerden dolayı gerçekleştirilen bu çalışmada, asetonitril-su ikili karışımı hidroklorotiazidin iyonlaşma sabiti tayininde tercih edilmiştir.

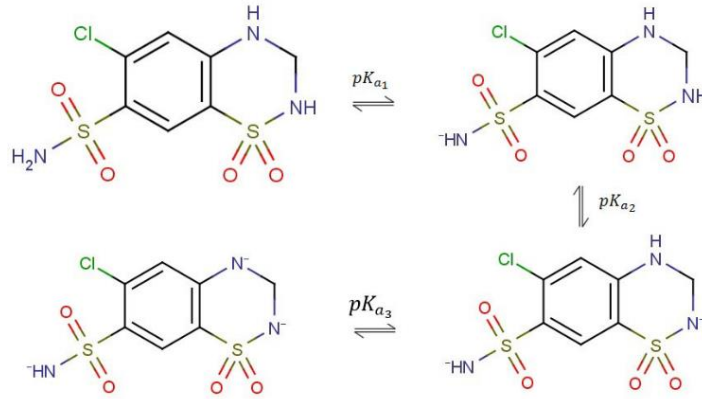
Gerçekleştirilen bu çalışmada hidroklorotiazidin yapısındaki sülfonamid gruplarından dolayı polar özellikte olması dolayısıyla ($\log P=-0.58$) kolonda bileşiğin yeterli tutunumunu sağlamak ve gerçekleştirilen analiz süresini kontrol altında tutmak amacıyla çalışılan mobil faz organik modifiyer derişimi %11-%15 (h/h) aralığında seçilmiştir. Ayrıca, mobil faz pH'ları bileşiğin tamamen moleküler ve tamamen iyonik formlarda olduğu pH aralığı olarak seçilmiştir.

Hidroklorotiazidin çalışılan asetonitril ve su hidro-organik sisteminde farklı mobil faz pH'larına karşı elde edilen alıkonma değerleri (t_R) grafiğe geçirildiğinde, asidik fonksiyonel gruba özgü bir sigmoidal davranış gözlemlenmiştir (Şekil 1). Ancak, bileşiğin iyonlaşma dengesi incelenildiğinde, bileşiğin asidik merkezlerinden biri yapısındaki benzotiazidin halkasına bağlı sülfonamid grubundan, bir diğeri de yapısındaki benzotiazidin halkasındaki azottan kaynaklanmaktadır (Şekil 2). Bu durumda bileşiğin yapısındaki iki asidik merkezden dolayı, asidik fonksiyonel gruba özgü 2 sigmoidal davranış gözlemlenmesi beklenirdi. Bu durum, bileşiğin asidik merkezlerinin iyonlaşma sabiti değerlerinin (pK_{a_1} ve pK_{a_2}) arasında 2 birimden daha az fark olmasından dolayı asidik merkezlerin iyonlaşmalarının birbirinden ayrılamamasından kaynaklanmaktadır [7,9].



Şekil 1. Hidroklorotiazidin çalışılan asetonitril:su ikili karışımlarındaki pH- t_R ilişkisi

Şekil 2'de görülen bir diğere denge, benzotiazidin halkasındaki bazik azotun protonasyonundan (pK_{a_3}) kaynaklanmaktadır. Bu fonksiyonel grubun protonasyonunu ifade eden kromatografik veriyi elde edebilmek için, çalışılan sıvı kromatografik kolonun sınırları dışında çalışmak gerektiğinden, bu fonksiyonel grubun ilişkili olduğu pK_{a_3} değeri, bu çalışma kapsamı dışında bırakılmıştır.



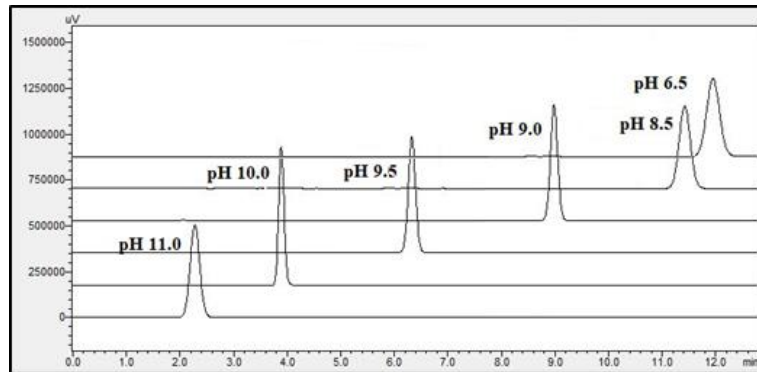
Şekil 2. Hidroklortiazidin iyonlaşma ve protonasyon davranışı

RPLC yöntemle iyonlaşma sabiti tayini (pK_a), yapısında iyonlaşabilen fonksiyonel grup bulunduran bileşiğin farklı pH değerlerinde farklı alıkonma değerlerine (t_R) sahip olması temeline dayanır (Şekil 3). Bu pH- t_R ilişkisi sigmoidal bir davranış sergiler ve LSER modeliyle aşağıdaki eşitliğe göre matematiksel olarak ifade edilebilir (Eşitlik 1).

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

Bu eşitlikte U ve V ayarlama katsayıları, γ ise molar aktivite katsayısını ifade eder. Bu katsayılardan U, $\log(f)$ 'yi ifade ederken ($f = \frac{t_{R_{A^-}}}{t_{R_{HA}}}$), V ise yapısında organik modifiyer içeren bir mobil fazda $\mp(pH - pK_a)$ değişimini ifade etmektedir.

Bu denklemde teorik $\log t_R$ değerleri, bir başlangıç pK_a değeri için U ve V değerleri sırasıyla 1 ve -4 alınarak hesaplanır [27]. Daha sonra, deneysel t_R değerlerinin logaritması ($\log t_{R_{den.}}$) ve teorik olarak hesaplanan t_R değerlerinin logaritması ($\log t_{R_{teo.}}$) kullanılarak artık değerler hesaplanır. LSER modeli, çalışılan her hidro-organik çözücü sistemi ve çalışılan tüm pH değerlerinde elde edilen deneysel t_R değerleri için tekrarlanır. En uygun $\log t_R$ değerleri, Microsoft Excel SOLVER programı kullanılarak artık kareler toplamının (RSS) en aza indirilmesiyle elde edilir. Tüm $\log t_{R_{den.}}$ ve $\log t_{R_{teo.}}$ değerleri için RSS değerini en aza indiren pK_a değeri, bileşiğin çalışılan mobil fazı için iyonlaşma sabitinin değeri olarak belirlenir [7,8].

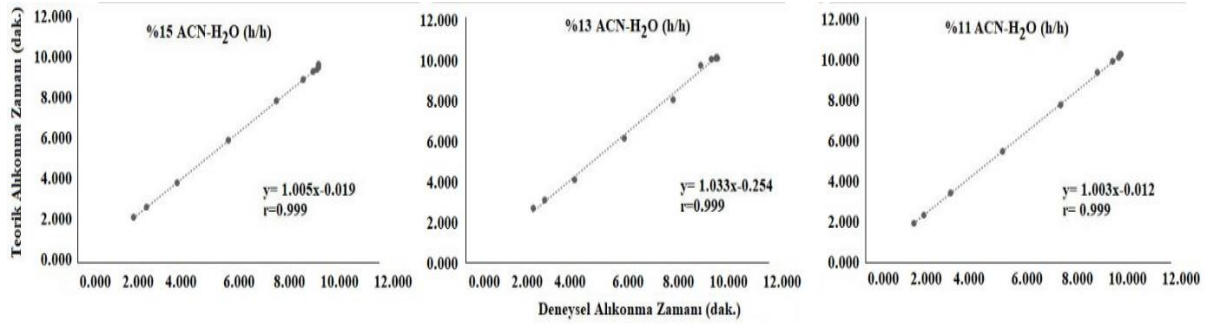


Şekil 3. Hidroklortiazidin %11 ACN-Su ortamında (h/h) farklı pH değerlerinde elde edilen alıkonma değerlerini gösteren üst üste bindirilmiş kromatogram

LSER modelinde kullanılan formüle, mobil fazın her pH'sı için hesaplanan molar aktivite katsayılarının eklenmesiyle bileşiğin termodinamik iyonlaşma sabitinin değeri elde edilir. [7,8,16,24]. Asetonitril-su ortamlarında bu yöntem kullanılarak belirlenen $\log t_{R_{den}}$ ve $\log t_{R_{teo}}$ değerleri Tablo 1'de hidroklorotiazid için verilmiştir. Tablo 1'deki veriler incelendiğinde, RSS değerlerinin çok düşük olduğu görülmektedir. Ayrıca, çalışılan her asetonitril-su ortamı için deneysel t_R ve teorik t_R değerlerine göre çizilen grafiklerin eğim ve kesişim değerlerinin sırasıyla 1 ve 0'a yakın olması ve grafiklerin korelasyon katsayılarının en az 0.99 olması, doğrusal bir ilişkinin varlığını göstermektedir (Şekil 4). Bu kriterler, LSER modelinin deneysel verilerle tutarlı olduğunu ve hidroklorotiazidin iyonlaşma sabitini hesaplamak için kullanılabilceğini açıkça göstermektedir.

Tablo 1. Çalışılan tüm mobil fazlar için LSER modelinde kullanılan deneysel ve hesaplanan veriler

%15 ACN-H ₂ O (h/h)										
pH	Hidroklorotiazid									
	t_R (den.)	t_R (teo.)	U=-0.687; V=4.001 f=0.242	Molar Aktivite Katsayısı (γ)	$\log t_R$ (den.)	$\log t_R$ (teo.)	$(\log t_{R_{den}} - \log t_{R_{teo}})^2$			
6.5	9.578	9.571		0.784	0.981	0.981	1.014×10^{-07}			
7	9.688	9.555		0.769	0.986	0.980	3.582×10^{-05}			
7.5	9.479	9.505		0.747	0.977	0.978	1.409×10^{-06}			
8	9.368	9.346		0.730	0.972	0.971	1.054×10^{-06}			
8.5	8.953	8.948		0.808	0.952	0.952	6.837×10^{-08}			
9	7.931	7.901		0.830	0.899	0.898	2.731×10^{-06}			
9.5	6.012	6.001		0.866	0.779	0.778	6.292×10^{-07}			
10	3.930	3.959		0.908	0.594	0.598	9.900×10^{-06}			
10.5	2.747	2.728		0.942	0.439	0.436	8.936×10^{-06}			
11.0	2.221	2.227		0.966	0.347	0.348	1.386×10^{-06}			
RSS: Artık Kareler Toplamı				RSS		6.203×10^{-05}				
%13 ACN-H ₂ O (h/h)										
pH	t_R (den.)	t_R (teo.)	U=-0.614; V=4.000 f=0.265	Molar Aktivite Katsayısı (γ)	$\log t_R$ (den.)	$\log t_R$ (teo.)	$(\log t_{R_{den}} - \log t_{R_{teo}})^2$			
				6.5	10.000	9.992	0.788	1.000	1.000	1.076×10^{-07}
				7	10.059	9.976	0.772	1.003	0.999	1.305×10^{-05}
				7.5	10.018	9.921	0.751	1.001	0.997	1.769×10^{-05}
				8	9.969	9.751	0.734	0.999	0.989	9.197×10^{-05}
				8.5	9.629	9.327	0.813	0.984	0.970	1.913×10^{-04}
				9	7.975	8.231	0.834	0.912	0.915	8.672×10^{-06}
				9.5	6.099	6.305	0.870	0.792	0.800	5.379×10^{-05}
				10	4.078	4.317	0.911	0.638	0.635	5.594×10^{-06}
				10.5	3.089	3.149	0.944	0.504	0.498	2.944×10^{-05}
				11.0	2.649	2.675	0.967	0.423	0.427	1.772×10^{-05}
RSS: Artık Kareler Toplamı				RSS		4.293×10^{-04}				
%11 ACN-H ₂ O (h/h)										
pH	t_R (den.)	t_R (teo.)	U=-0.768; V=4.000 f=0.198	Molar Aktivite Katsayısı (γ)	$\log t_R$ (den.)	$\log t_R$ (teo.)	$(\log t_{R_{den}} - \log t_{R_{teo}})^2$			
				6.5	11.858	11.845	0.791	1.074	1.074	2.192×10^{-07}
				7	11.884	11.817	0.775	1.075	1.073	6.054×10^{-06}
				7.5	11.680	11.725	0.754	1.067	1.069	2.836×10^{-06}
				8	11.463	11.441	0.738	1.059	1.058	7.023×10^{-07}
				8.5	10.851	10.749	0.821	1.035	1.031	1.690×10^{-05}
				9	8.995	9.048	0.845	0.954	0.957	6.585×10^{-06}
				9.5	6.346	6.348	0.883	0.803	0.803	1.601×10^{-08}
				10	3.948	3.938	0.922	0.596	0.595	1.291×10^{-06}
				10.5	2.700	2.707	0.952	0.431	0.432	1.285×10^{-06}
				11.0	2.251	2.249	0.972	0.352	0.352	2.213×10^{-07}
RSS: Artık Kareler Toplamı				RSS		2.044×10^{-05}				



Şekil 4. 6.5-11.0 pH aralığında teorik alıkonna zamanı ve deneysel alıkonna zamanı değerlerine göre çizilen grafik

Asetonitril-su ikili karışımlarında LSER modeli kullanılarak hesaplanan mobil faz termodinamik iyonlaşma sabiti değerleri (${}^s pK_a$), Tablo 2’de verilmiştir. Tablo 2’de farklı asetonitril-su ikili karışımları için elde edilmiş termodinamik ${}^s pK_a$ değerleri, bileşiğin yapısındaki benzotiazidin halkasındaki azotun ve benzotiazidin halkasına bağlı sülfonamid grubundaki azotun iyonlaşmasından kaynaklanmaktadır. Yukarıda da ifade edildiği gibi, bileşiğin asidik merkezlerinin pK_a değerleri arasındaki farkın 2 pH biriminden düşük olmasından dolayı bu merkezler birlikte iyonlaşmaktadır. Bu durumun en önemli kanıtı, farklı asetonitril-su ikili karışımlarında bileşiğin pH- t_R ilişkilerine göre elde edilen tek sigmoidal davranıştır [7,9].

Tablo 2. Hidroklorotiazidin farklı asetonitril-su ikili karışımlarında elde edilen mobil faz termodinamik iyonlaşma sabiti değerleri

Parametre	%11 ACN-H ₂ O (h/h)	%13 ACN-H ₂ O (h/h)	%15 ACN-H ₂ O (h/h)	Literatür
${}^s pK_{a1}$	9.214	9.274	9.337	9.97 (27°C) [23] 9.93 (37°C) [23]

Tablo 2’deki ${}^s pK_a$ değerleri incelenildiğinde, asetonitril-su ikili karışımlarının organik modifiyer derişimi arttıkça ${}^s pK_a$ değerlerinin de bir miktar arttığı görülmektedir. Bu durum, asidik fonksiyonel gruba sahip bileşikler için beklenen bir durumdur [9,25,26]. Asetonitril-su ve diğer su-organik çözücü karışımlarında organik çözücü ilavesiyle suyun yapısı bozulduğundan analit solvasyonu azalır. Bu durumda denge kinetiği de azalacağından, analitin iyonlaşması da azalır. Sonuç olarak, bileşiğin iyonlaşma sabiti değeri artar [9,26]. Bu durum düşünüldüğünde, potansiyometrik olarak tek %80 (h/h) metanol içeren metanol-su ortamında iki farklı sıcaklıkta elde edilen ${}^s pK_a$ değerlerinin de bu çalışmada belirlenen değere yakınlığı görülmektedir [23]. Bu bilgiler ışığında, hesaplanan ${}^s pK_{a1}$ değerlerinin literatür verisiyle yakınlığı açıkça görülmektedir. Hidroklorotiazidin termodinamik ${}^s pK_{a1}$ değerlerini hesaplamada kullanılan molar aktivite katsayıları (γ), her mobil faz ve mobil faz pH değeri için klasik Debye-Hückel bağıntısı kullanılarak hesaplanmıştır [7,8,24,26].

Vücut ortamı su ortamı olduğundan, ilaçların vücuttaki iyonlaşma durumunu belirlemek adına, su ortamındaki iyonlaşma sabiti (${}^w pK_a$) tayini ilaç araştırma ve geliştirme aşamasında mutlaka gereklidir. Su ortamında çözünürlüğü yetersiz bileşikler için ilk olarak bir su-organik çözücü ikili karışımında bileşiğin ${}^s pK_a$ değeri hesaplanır. Daha sonra, elde edilen ${}^s pK_a$ değerleri kullanılarak $E_T^N - {}^s pK_a$, $X_{\text{çözücü}} - {}^s pK_a$ ya da Yasuda-Shedlovsky yöntemi gibi çeşitli makroskopik çözücü parametreleri ile bileşiğin ${}^s pK_a$ değeri arasındaki ilişkiyi kullanan ekstrapolasyon metotlarıyla bileşiğin ${}^w pK_a$ değerleri hesaplanabilir [27].

Bu çalışmada elde edilen ${}^s pK_a$ değerleri, Yasuda-Shedlovsky ve $X_{ACN} - {}^s pK_a$ metotları ile değerlendirilerek hidroklorotiazidin ${}^w pK_{a1}$ değeri hesaplanmıştır. Bu metotlardan $X_{ACN} - {}^s pK_a$ ilişkisi, asetonitril-su ikili karışımlarındaki asetonitrilin mol kesri değeri (X_{ACN}) ile bileşiğin bu hidro-

organik ortamda elde edilen ${}^s pK_a$ değerleri arasındaki doğrusal ilişkiyi temel alır. Bu elde edilen doğrusal ilişkinin kesim noktası bileşiğin termodinamik ${}^w pK_a$ değerini vermektedir.

Bu çalışmada tercih edilen bir diğer metod olan Yasuda-Shedlovsky ekstrapolasyon metodu, suca zengin bölgelerde yapılan çalışmalarda çok tercih edilmektedir. Bu metotta bileşiğin ${}^w pK_a$ değeri, çalışılan asetonitril-su ikili karışımının dielektrik sabitinin tersinin ($1/\epsilon$), ${}^s pK_a + \log[H_2O]$ değerine karşı grafiğe geçirilmesiyle elde edilen doğrusal eşitlikten hesaplanır. Elde edilen bu doğrusal eşitlikte, ilgili yerlere saf suyun dielektrik sabiti ($\epsilon=78.3$) ve derişim değeri ($\log [H_2O]=\log 55.5$) yerlerine konularak bileşiğin ${}^w pK_{a_1}$ değeri elde edilir. Her iki metodun uygulanabilmesi için en az üç farklı derişimde asetonitril içeren asetonitril-su ortamında elde edilmiş ${}^s pK_a$ değerlerine ihtiyaç vardır [27,28]. Bu çalışmada $X_{ACN} - {}^s pK_{a_1}$ metodundan elde edilen doğrusal eşitliğin verileri Tablo 3'te, Yasuda-Shedlovsky metodundan elde edilen doğrusal eşitliğin verileri Tablo 4'te standard sapma değerleriyle birlikte verilmiştir. Ayrıca her iki yöntemden elde edilmiş ${}^w pK_a$ değerleri, Tablo 5'de verilmiştir.

Tablo 3. $X_{ACN} - {}^s pK_a$ yönteminden elde edilen doğrusal eşitlik ile ilgili veriler

Bileşik	%ACN(h/h)	Eşitlik	r	N
Hidroklorotiazid	11-15	${}^s pK_{a_1} = 7.693.X_{ACN} (0.044) + 8.904 (0.002)$	0.999	3

Tablo 4. Yasuda-Shedlovsky yönteminden elde edilen doğrusal eşitlikle ilgili veriler

Bileşik	%ACN (v/v)	ϵ	${}^s pK_{a_1} + \log[H_2O] = a_e \epsilon^{-1} + b_e$		r	N
			a (eğim)	B (kesim)		
Hidroklorotiazid	11-15	74.655-73.101	425.4 (0.048)	5.256 (0.001)	0.999	3

Tablo 5. Hidroklorotiazidi iki farklı yöntemle hesaplanan termodinamik ${}^w pK_{a_1}$ değerleri

Bileşik	Parametre	$X_{ACN} - {}^s pK_a$	Yasuda-Shedlovsky metod
Hidroklorotiazid	${}^w pK_{a_1}$	8.904	8.945

Tablo 5'de deneysel olarak belirlenen ${}^s pK_{a_1}$ değerlerinin farklı ekstrapolasyon yöntemleriyle değerlendirilerek hesaplanan termodinamik ${}^w pK_{a_1}$ değerleri arasındaki uyum dikkat çekicidir. Bu bilgiler ışığında, hesaplanan ${}^s pK_{a_1}$ değerlerinin doğruluğu ve tekrarlanabilirliği açıkça görülmektedir. Ayrıca, Tablo 5'de sunulan değerler hidroklorotiazidin herhangi bir analitik yöntemle tayin edilen literatürdeki ilk termodinamik ${}^w pK_{a_1}$ verileridir. Bu çalışmayla elde edilen sonuçlar bileşiğin farmakokinetik çalışmalarına ışık tutacağı gibi, aynı zamanda bileşiğin asetonitril-su ikili karışımlarında gerçekleştirilen optimizasyon çalışmalarında da yararlı olabilecektir.

YAZAR KATKILARI

Kavram: Y.D.D., E.Ç.D.; Tasarım: Y.D.D., E.Ç.D.; Denetim: Y.D.D., E.Ç.D.; Kaynaklar: Y.D.D., E.Ç.D.; Malzemeler: Y.D.D., E.Ç.D.; Veri Toplama ve/veya İşleme: Y.D.D., E.Ç.D.; Analiz ve/veya Yorumlama: Y.D.D., E.Ç.D.; Literatür Taraması: Y.D.D., E.Ç.D.; Makalenin Yazılması: Y.D.D., E.Ç.D.; Kritik İnceleme Y.D.D., E.Ç.D.; Diğer:-

ÇIKAR ÇATIŞMASI BEYANI

Yazarlar bu makale için gerçek, potansiyel veya algılanan çıkar çatışması olmadığını beyan ederler.

ETİK KURUL ONAYI

Yazarlar bu çalışma için etik kurul onayının zorunlu olmadığını beyan etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Kayaalp, O., (2000). Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji, Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti, Ankara, p.880.
2. Katzung, B.G., (2011). Basic & Clinical Pharmacology, The McGraw-Hill Companies, San Francisco, p.1245.
3. Laurence, L.B. (2009). Goodman & Gillman Tedavinin Farmakolojik Temeli, Nobel Tıp Kitabevi, Ankara, p.2017.
4. Manallack, D.T., Prankerd, R.J., Yuriev, E., Oprea, T.I., Chalmers, D.K. (2013). The significance of acid/base properties in drug discovery. *Chemical Society Reviews*, 42(2), 485-496. [\[CrossRef\]](#)
5. Manallack, D.T. (2007). The pKa distribution of drugs: Application to drug discovery. *Perspectives in Medicinal Chemistry*, 1, 25-38. [\[CrossRef\]](#)
6. Gaohua, L., Miao, X., Dou, L. (2021). Crosstalk of physiological pH and chemical pKa under the umbrella of physiologically based pharmacokinetic modeling of drug absorption, distribution, metabolism, excretion, and toxicity. *Expert Opinion On Drug Metabolism & Toxicology*, 17(9), 1103-1124. [\[CrossRef\]](#)
7. 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. [\[CrossRef\]](#)
8. Daldal, Y.D., Demiralay, E.Ç. (2020). Chromatographic and UV-visible spectrophotometric pKa determination of some purine antimetabolites. *Journal of Molecular Liquids*, 317, 1-8. [\[CrossRef\]](#)
9. Kazakevich, Y., Lobrutto, Y. (2007). HPLC for Pharmaceutical Scientists, Wiley-Interscience, Canada, p.1135.
10. Meyer, V.R. (2010). Practical High-Performance Liquid Chromatography, John Wiley and Sons, Ltd., United Kingdom, p.428.
11. Babić, S., Horvat, A.J.M., Pavlović, D.M., Kaštelan-Macan, M. (2007). Determination of pKa values of active pharmaceutical ingredients. *Trends in Analytical Chemistry*, 26(11), 1043-1061. [\[CrossRef\]](#)
12. Beltrán, J.L., Sanli, N., Fonrodona, G., Barrón, D., Özkan, G., Barbosa, J. (2003). Spectrophotometric, potentiometric and chromatographic pKa values of polyphenolic acids in water and acetonitrile-water media. *Analytica Chimica Acta*, 484, 253-264. [\[CrossRef\]](#)
13. 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. [\[CrossRef\]](#)
14. Jiménez-Lozano, E., Marqués, I., Barrón, D., Beltrán, J.L., Barbosa, J. (2002). Determination of pKa values of quinolones from mobility and spectroscopic data obtained by capillary electrophoresis and a diode array detector. *Analytica Chimica Acta*, 464, 37-45. [\[CrossRef\]](#)
15. 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. [\[CrossRef\]](#)
16. Bosch, E., Espinosa, S., Rosés, M. (1998). Retention of ionizable compounds on high-performance liquid chromatography III. variation of pK values of acids and pH values of buffers in acetonitrile-water mobile phases. *Journal of Chromatography A*, 824, 137-146. [\[CrossRef\]](#)
17. Rosés, M., Bolliet, D., Poole, C.F. (1998). Comparison of solute descriptors for predicting retention of ionic compounds (phenols) in reversed-phase liquid chromatography using the solvation parameter model. *Journal of Chromatography A*, 829, 29-40. [\[CrossRef\]](#)
18. 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. [\[CrossRef\]](#)
19. Haque, S.K.M. (2022). Box-Behnken experimental design for optimizing the HPLC method to determine hydrochlorothiazide in pharmaceutical formulations and biological fluid. *Journal of Molecular Liquids*, 352, 1-12. [\[CrossRef\]](#)
20. Tiris, G., Mehmandoust, M., Lotfy, H.M. Erk, N., Joo, S.W., Dragoi, E.N., Vasseghian, Y. (2022). Simultaneous determination of hydrochlorothiazide, amlodipine, and telmisartan with spectrophotometric and HPLC green chemistry applications. *Chemosphere*, 303, 1-9. [\[CrossRef\]](#)

21. Shah, K. (2022). Simultaneous estimation of nebivolol hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets. *International Journal of Pharmaceutical Research & Allied Sciences*, 11(3), 34-39. [\[CrossRef\]](#)
22. Raut, P.V., Padwal, S.L., Bachute, M.T., Polshettiwar, S.A. (2021). Development and validation of RP-HPLC chromatographic dissolution method for the simultaneous estimation of ramipril and hydrochlorothiazide from solid dosage formulation. *Journal of Pharmaceutical Research International*, 33(42B), 203-217. [\[CrossRef\]](#)
23. Baek, K., Jeon, S.B., Kim, B.K., Kang, N.S. (2018). Method validation for equilibrium solubility and determination of temperature effect on the ionization constant and intrinsic solubility of drugs. *Journal of Pharmaceutical Sciences & Emerging Drugs*, 6(1), 1-6. [\[CrossRef\]](#)
24. Barbosa, J., Barrón, D., Jiménez-Lozano, E., Sanz-Nebot, V. (2001). Comparison between capillary electrophoresis, liquid chromatography, potentiometric and spectrophotometric techniques for evaluation of pK_a values of zwitterionic drugs in acetonitrile-water mixtures. *Analytica Chimica Acta*, 437, 309–321. [\[CrossRef\]](#)
25. Sanli, S., Sanli, N., Alsancak, G. (2009). Determination of protonation constants of some tetracycline antibiotics by potentiometry and LC methods in water and acetonitrile- water binary mixtures. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 20, 939-946. [\[CrossRef\]](#)
26. Espinosa, S., Bosch, E., Rosés, M. (2002). Acid-base constants of neutral bases in acetonitrile–water mixtures. *Analytica Chimica Acta*, 454, 157-166. [\[CrossRef\]](#)
27. Rosés, M., Bosch, E. (2002). Influence of mobile phase acid-base equilibria on the chromatographic behaviour of protolytic compounds. *Journal of Chromatography A*, 982, 1-30. [\[CrossRef\]](#)
28. 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. [\[CrossRef\]](#)