

T.C.  
BİTLİS EREN ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

AMBRİSENTAN İLAÇ ETKEN MADDESİNİN  $pK_a$   
DEĞERİNİN HPLC METODU İLE TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERKAN TÜTÜNCÜ

DANIŞMAN  
DR. ÖĞR. ÜYESİ DİLARA BAŞAT DERELİ

TEMMUZ 2025

BİTLİS

T.C.  
BİTLİS EREN ÜNİVERSİTESİ  
LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENTİTÜSÜ  
KİMYA ANABİLİM DALI

AMBRİSENTAN İLAÇ ETKEN MADDESİNİN  $pK_a$   
DEĞERİNİN HPLC METODU İLE TAYİNİ

YÜKSEK LİSANS TEZİ

ERKAN TÜTÜNCÜ  
ORCID: 0009-0007-6014-7943

DANIŞMAN  
DR. ÖĞR. ÜYESİ DİLARA BAŞAT DERELİ

TEMMUZ 2025

BİTLİS

**T.C.**  
**BİTLİS EREN ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**  
**YÜKSEK LİSANS TEZ ÇALIŞMASI**  
**ETİK BEYANI**

Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Kimya Anabilim Dalı Yüksek Lisans öğrencisiyim. Hazırlamış olduğum “Ambrisentan İlaç Etken Maddesinin pK<sub>a</sub> Değerinin HPLC Metodu İle Tayini” başlıklı yüksek lisans tezinde sunduğum verileri, bilgileri ve dokümanları akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi; tüm bilgi, belge, değerlendirme ve sonuçları bilimsel etik ve ahlak kurallarına uygun olarak sunduğumu; tez çalışmasında yararlandığım eserlerin tümüne uygun atıfta bulunarak kaynak gösterdiğimi; kullanılan verilerde herhangi bir değişiklik yapmadığımı; bu yüksek lisans tezinde sunduğum çalışmanın özgün olduğunu bildirir, aksi bir durumda aleyhime doğabilecek tüm hak kayıplarını kabullendiğimi beyan ederim. ....../...../2025

**Erkan TÜTÜNCÜ**

**T.C.**  
**BİTLİS EREN ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**  
**TEZ YAZIM KILAVUZU UYGUNLUK BEYANI**

“Ambrisentan İlaç Etken Maddesinin  $pK_a$  Değerinin HPLC Metodu İle Tayini”  
başlıklı tez Bitlis Eren Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Tez Yazım Kılavuzuna  
uygun olarak hazırlanmıştır /.../2025

**Tezi Hazırlayan**

Erkan TÜTÜNCÜ

**Danışman**

Dr. Öğr. Üyesi DİLARA BAŞAT DERELİ

**Kimya Anabilim Dalı Başkanı**

Prof. Dr. Fatih Çağlar ÇELİKEZEN

**T.C.**  
**BİTLİS EREN ÜNİVERSİTESİ**  
**LİSANSÜSTÜ EĞİTİM ENSTİTÜSÜ**  
**TEZ ONAY SAYFASI**

Bitlis Eren Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Kimya Anabilim Dalı öğrencisi Erkan TÛTÛNCÛ tarafından hazırlanan “Ambrisentan İlaç Etken Maddesinin pK<sub>a</sub> Değeri nin HPLC Metodu İle Tayini” adlı Yüksek Lisans ile ilgili tez savunma sınavı, ....../....../2025 tarihinde yapılmış ve tezin oy birliği ile kabul edilmesine karar verilmiştir.

**JÛRİ:**

**İMZA**

**Danışman:** Dr. Öğr. Üyesi DİLARA BAŞAT DERELİ  
(Bitlis Eren Üniversitesi)

.....

**Üye:**  
(Bitlis Eren Üniversitesi)

.....

**Üye:**  
( ..... Üniversitesi)

.....

Bitlis Eren Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü Yönetim Kurulunun ..... tarih ve ..... sayılı kararıyla jüri tarafından kabul edilmiş bu çalışmanın yüksek lisans olarak kabulü onaylanmıştır.

...../...../2025

**Prof. Dr. Mehmet Bakır ŞENGÛL**

**Enstitü Müdürü**

T.C

Bitlis Eren Üniversitesi Lisansüstü Eğitim Enstitüsü

Kimya Anabilim Dalı

**AMBRİSENTAN İLAÇ ETKEN MADDESİNİN  $pK_a$  DEĞERİNİN HPLC  
METODU İLE TAYİNİ**

**Yüksek Lisans Tezi**

**Erkan TÜTÜNCÜ**

**Danışman: Dr. Öğr. Üyesi Dilara BAŞAT DERELİ**

**Temmuz 2025**

**ÖZET**

Günümüzde farmasötik etkin maddelerin iyonlaşma davranışlarının belirlenmesi, biyoyararlanım, farmakokinetik ve formülasyon geliştirme çalışmaları açısından büyük önem taşımaktadır. Özellikle zayıf asidik ve bazik karakterdeki ilaç bileşiklerinin iyonlaşma sabiti ( $pK_a$ ) değerleri, ilacın çözünürlük, stabilite ve biyolojik membranlardan geçiş kapasitesini doğrudan etkileyen kritik parametreler arasında yer almaktadır. Bu kapsamda, endotelin reseptör antagonisti grubunda yer alan Ambrisentan, kardiyovasküler hastalıklarda kullanılan lipofilik bir ilaç olması nedeniyle iyonlaşma davranışının detaylı olarak incelenmesi gereken bileşiklerden biridir.

Bu tez çalışmasında, Ambrisentan bileşiğinin  $pK_a$  değerinin belirlenmesi amacıyla ters faz yüksek performanslı sıvı kromatografisi (RP-HPLC) yöntemi uygulanmış; çözünürlük ve iyonlaşma davranışının çözücü sistemindeki değişimlere bağlı olarak incelenebilmesi için farklı asetonitril-su oranlarında  $pK_a$  tayinleri gerçekleştirilmiştir. Elde edilen veriler,  $1/\epsilon-pK_a$  ve  $X_{ACN}-pK_a$  ilişkileri doğrultusunda değerlendirilerek ve Ambrisentan'ın su ortamındaki  $pK_a$  değerleri belirlenmiştir. Bu çalışmadan elde edilen verilerin ve geliştirilen yöntemin farmasötik analizlerde kullanım potansiyeli göstermesi bakımından literatüre katkı sağlayacağı düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Ambrisentan,  $pK_a$ , HPLC.

**Republic of Türkiye**  
**Bitlis Eren University Graduate School**  
**Department of Chemistry**  
**DETERMINATION OF pK<sub>a</sub> VALUE OF AMBRISENTAN**  
**PHARMACEUTICAL ACTIVE INGREDIENT BY HPLC METHOD**  
**Master's Thesis**  
**Erkan TÖTÜNCÜ**

**Supervisor: Asst. Prof. PhD. Dilara BAŞAT DERELİ**

**July 2025**

**ABSTRACT**

Nowadays, determining the ionization behavior of pharmaceutical active substances is of great importance in terms of bioavailability, pharmacokinetics and formulation development studies. Especially the ionization constant (pK<sub>a</sub>) values of weakly acidic and basic drug compounds are among the critical parameters that directly affect the solubility, stability and permeation capacity of the drug through biological membranes.

In this thesis, Ambrisentan, which is in the endothelin receptor antagonist group, is one of the compounds whose ionization behavior should be examined in detail due to being a lipophilic drug used in cardiovascular diseases. In this study, reverse phase high performance liquid chromatography (RP-HPLC) method was applied to determine the pK<sub>a</sub> value of Ambrisentan compound; pK<sub>a</sub> determinations were carried out at different acetonitrile-water ratios in order to examine the solubility and ionization behavior depending on the changes in the solvent system. The obtained data were evaluated based on the  $1/\epsilon$ -pK<sub>a</sub> and X<sub>ACN</sub>-pK<sub>a</sub> relationships and the pK<sub>a</sub> values of Ambrisentan in water media were determined. It is believed that the data obtained from this study and the developed method will contribute to the literature by demonstrating potential use in pharmaceutical analyses.

**Keywords:** Ambrisentan, pK<sub>a</sub>, HPLC.

## TEŐEKKÖR

Bu alıőmanın gerekleőtirilmesinde desteğini hibir zaman benden esirgemeyen, bilgi birikimiyle her daim yanımda olup, bana yol gōsterip ve yōnlendiren değerli hocam, Dr. Őęr. Őyesi Dilara Başat DERELİ'ye, Bitlis Eren Őniversitesi Kimya Anabilim Dalındaki değerli hocalarıma, Bu yolda bana destek olan ve her zaman yanımda olduğunu hissettiğim eőim Ahsen TÖTÖNCÖ'ye, Bitlis Eren Őniversitesi Bilimsel Araőtırma Projeleri Koordinatōrlüęü tarafından BEBAP 2024-07 nolu proje ile desteklerinden dolayı, Sonsuz teőekkōrlerimi sunarım.

Erkan TÖTÖNCÖ

## İÇİNDEKİLER

|                                                                                      |           |
|--------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| ÖZET.....                                                                            | I         |
| ABSTRACT .....                                                                       | II        |
| TEŞEKKÜR.....                                                                        | III       |
| İÇİNDEKİLER .....                                                                    | IV        |
| ÇİZELGELER DİZİNİ .....                                                              | VI        |
| ŞEKİLLER DİZİNİ .....                                                                | VII       |
| KISALTMALAR.....                                                                     | VIII      |
| <b>1 GİRİŞ.....</b>                                                                  | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon (PAH) Tanımı .....</b>                       | <b>1</b>  |
| <b>1.2 Endotelin Reseptör Antagonisti İlaçlar .....</b>                              | <b>2</b>  |
| 1.2.1 Endotelin Reseptör Antagonisti grubu ilaçların Tarihçesi.....                  | 3         |
| 1.2.2 Endotelin Reseptör Antagonisti grubu ilaçların etki mekanizmaları .....        | 4         |
| 1.2.3 Endotelin Reseptör Antagonisti (ERA) İlaçların Farmakokinetik Özellikleri..... | 5         |
| <b>1.3 Ambrisentan .....</b>                                                         | <b>7</b>  |
| 1.3.1 Ambrisentanın Kimyasal ve Farmasötik Özellikleri .....                         | 7         |
| 1.3.2 Klinik Kullanımı.....                                                          | 8         |
| <b>1.4 Kromatografi.....</b>                                                         | <b>8</b>  |
| 1.4.1 Kromatografinin Temel Prensipleri .....                                        | 9         |
| 1.4.2 Kromatografi Türleri.....                                                      | 9         |
| 1.4.3 Uygulama Alanları .....                                                        | 9         |
| 1.4.4 Avantajları ve Sınırlamaları.....                                              | 10        |
| 1.4.5 Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması .....                              | 10        |
| <b>1.5 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi ve Prensipleri.....</b>                 | <b>11</b> |
| 1.5.1 HPLC’de Kullanılan Temel Kavramlar ve İlgili Formüller.....                    | 12        |

|       |                                                                                                                 |    |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.6   | Su-Organik Çözücü Karışımlarında pH.....                                                                        | 14 |
| 1.7   | Su –Organik Çözücü İkili Karışımlarında pK <sub>a</sub> Tayini .....                                            | 15 |
| 1.8   | Ortamın Asitlik Derecesi (pH) ile Asidin asitlik sabitinin negatif logaritması (pK <sub>a</sub> ) ilişkisi..... | 15 |
| 1.9   | pK <sub>a</sub> Tayini Yöntemleri.....                                                                          | 16 |
| 1.10  | Literatür Özetleri .....                                                                                        | 18 |
| 2     | MATERYAL VE YÖNTEM.....                                                                                         | 24 |
| 2.1   | Kullanılan Kimyasal Malzemeler .....                                                                            | 24 |
| 2.2   | Kullanılan Cihazlar.....                                                                                        | 24 |
| 2.2.1 | Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi Cihazı .....                                                              | 24 |
| 2.2.2 | pH/İyon Metre.....                                                                                              | 24 |
| 2.2.3 | HPLC’de Kullanılan Kolon Seçimi.....                                                                            | 25 |
| 2.2.4 | Çözeltilerin Hazırlanması .....                                                                                 | 25 |
| 2.3   | Yöntem .....                                                                                                    | 26 |
| 3     | BULGULAR VE TARTIŞMA.....                                                                                       | 28 |
| 3.1   | Ambrisentan Bileşiği İçin Elde Edilen Kromatografik Veriler .....                                               | 28 |
| 3.2   | Ambrisentan Bileşiğinin Su Ortamındaki pK <sub>a</sub> Değerinin Hesaplanması..                                 | 30 |
| 3.2.1 | Mol Kesri- pK <sub>a</sub> Metodu .....                                                                         | 31 |
| 3.2.2 | Dielektrik Sabiti- pK <sub>a</sub> Metodu .....                                                                 | 31 |
| 4     | SONUÇ VE ÖNERİLER.....                                                                                          | 33 |
|       | KAYNAKLAR.....                                                                                                  | 35 |

## ÇİZELGELER DİZİNİ

|                                                                                                                                                             |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| <b>Çizelge 1.1</b> Endotelin Reseptör Antagonisti Grubu İlaçların sınıflandırılmasını.....                                                                  | 3  |
| <b>Çizelge 1.2.</b> HPLC’de Kullanılan Temel Kavramlar ve İlgili Formüller.....                                                                             | 13 |
| <b>Çizelge 1.3.</b> Ambrisentan bileşiğinin HPLC metodu ile analizlerine ilişkin parametreler .....                                                         | 22 |
| <b>Çizelge 2.1.</b> Kromatografik Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Kullanım Amaçları .....                                                       | 24 |
| <b>Çizelge 3.1.</b> Ambrisentan bileşiğinin %40, %45 ve %50 (v/v) asetonytril içeren asetonytril-su ikili karışımlarındaki alıkonma zamanı değerleri.....   | 28 |
| <b>Çizelge 3.2.</b> Ambrisentan bileşiğinin %40, %45 ve %50 (v/v) asetonytril içeren asetonytril-su ikili karışımlarındaki kapasite faktörü değerleri ..... | 28 |

## ŞEKİLLER DİZİNİ

|                                                                                                                                                                  |    |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Şekil 1.1. Ambrisentan molekülünün kimyasal yapısı .....                                                                                                         | 8  |
| Şekil 3.1. Ambrisentan bileşiğinin A) %40, B) %45, C) %50 asetonitril içeren asetonitril- su karışımlarındaki tR-pH ilişkilerini gösteren NLREG grafikleri ..... | 29 |
| Şekil 3.2. Ambrisentan bileşiği için XACN-pK <sub>a</sub> ilişkisi .....                                                                                         | 31 |
| Şekil 3.3. Ambrisentan bileşiği için 1/ε-pK <sub>a</sub> ilişkisi .....                                                                                          | 32 |



## KISALTMALAR

|            |                                                                                         |
|------------|-----------------------------------------------------------------------------------------|
| A          | :Ayırma Faktörü                                                                         |
| ACT-132577 | :Actelion Pharmaceuticals 132577                                                        |
| ALS        | :Otomatik Sıvı Numuneleyici                                                             |
| ARIES      | :Ambrisentan'ın egzersiz kapasitesi bozulmuş hastalardaki etkinliğini araştıran çalışma |
| BQ-123     | :Cyclo(-D-Trp-D-Asp-Pro-D-Val-Leu-)                                                     |
| BQ-788     | :N-cis-2,6-dimetilpiperidinokarboksil-L- $\gamma$ -metilleusin                          |
| C18        | :Oktadesilsilan                                                                         |
| C8         | :Oktilsilan                                                                             |
| cDNA       | :Tamamlayıcı DNA                                                                        |
| CE         | :Kapiler Elektroforez                                                                   |
| CYP        | :Sitokrom P450 Monooksijenaz Sistemi                                                    |
| CYP2C9     | :Sitokrom P450, 2. aile, C alt ailesi, 9. Üye                                           |
| CYP3A4     | :Sitokrom P450, 3. aile, A alt ailesi, 4. Üye                                           |
| CYP450     | :Sitokrom P450 Enzimleri                                                                |
| DNA        | :Deoksiribonükleik Asit                                                                 |
| EMA        | :Avrupa İlaç Ajansı                                                                     |
| EPAR       | :Avrupa Kamu Değerlendirme Raporu                                                       |
| ERA        | :Endotelin Reseptör Antagonisti                                                         |
| ERS        | :Avrupa Solunum Derneği                                                                 |
| ESC        | :Avrupa Kardiyoloji Derneği                                                             |
| ET-1       | :Endotelin-1                                                                            |
| ETA        | :Endotelin A Reseptörü                                                                  |
| ETB        | :Endotelin B Reseptörü                                                                  |
| $\epsilon$ | :Dielektrik Sabiti                                                                      |

|                 |                                                                           |
|-----------------|---------------------------------------------------------------------------|
| GC              | :Gaz Kromatografisi                                                       |
| GLC             | :Gaz–Sıvı Kromatografisi                                                  |
| GSC             | :Gaz–Katı Kromatografisi                                                  |
| H <sup>+</sup>  | :Hidrojen İyonu                                                           |
| HPLC            | :Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi                                  |
| K <sub>a</sub>  | :Asidlik Sabiti                                                           |
| LLC             | :Sıvı–Sıvı Kromatografisi                                                 |
| LOD             | :Tespit Sınırı (Limit of Detection)                                       |
| Log P           | :Oktanöl–su sisteminde lipofiliklik ölçüsü (bölme katsayısı :logaritması) |
| Log S           | :Logaritmik Çözünürlük                                                    |
| LOQ             | :Tayin Sınırı (Limit of Quantification)                                   |
| LSC             | :Sıvı–Katı Kromatografisi                                                 |
| mPAP            | :Ortalama Pulmoner Arter Basıncı                                          |
| MS              | :Kütle Spektrometresi                                                     |
| N               | :Teorik Plaka Sayısı                                                      |
| NLREG           | :Doğrusal Olmayan Regresyon                                               |
| PAH             | :Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon                                         |
| PCWP            | :Pulmoner Kapiller Kama Basıncı                                           |
| PH              | :Pulmoner Hipertansiyon                                                   |
| pH              | :Hidrojen İyonu Derişimi                                                  |
| pK <sub>a</sub> | :Asit İyonlaşma Sabiti                                                    |
| PMDA            | :Japonya İlaç ve Tıbbi Cihazlar Ajansı                                    |
| PVR             | :Pulmoner Vasküler Direnç                                                 |
| REMS            | :Risk Değerlendirme ve Azaltma Stratejileri                               |
| RI              | :Kırılma İndisi                                                           |
| RP-HPLC         | :Ters Faz Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi                           |

|            |                                                       |
|------------|-------------------------------------------------------|
| Rs         | :Çözünürlük                                           |
| SWISS ADME | :İsviçre Emilim, Dağılım, Metabolizma ve Atılım Aracı |
| THF        | :Tetrahidrofuran                                      |
| TLC        | :İnce Tabaka Kromatografisi                           |
| Tmax       | :Maksimum Plazma Konsantrasyonuna Ulaşma Süresi       |
| tR         | :Alıkonma Süresi                                      |
| U.S. FDA   | :Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi     |
| UGT        | :Uridin 5'-difosfo-glukuronosiltransferaz             |
| UGT1A9     | :Uridin 5'-difosfo-glukuronosiltransferaz 1A9         |
| UGT2B7     | :Uridin 5'-difosfo-glukuronosiltransferaz 2B7         |
| UV         | :Ultraviyole                                          |
| WHO        | :Dünya Sağlık Örgütü                                  |
| XACN       | :Mol Kesri                                            |

# 1 GİRİŞ

## 1.1 Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon (PAH) Tanımı

Pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH), damarların içinden kanın geçişine karşı gösterdiği direncin artması ve damar iç duvarlarında yeniden şekillenme ile meydana gelen değişiklikler, istirahatte ortalama pulmoner arter basıncının (mPAP) kalbin sağ tarafındaki boşluklara ve akciğer damarlarına ince, esnek bir tüp (kateter) yerleştirilerek yapılan işlemle kalbin sağ tarafının ve akciğer dolaşımının içindeki kan basınçları ölçülüp, kalbin pompalama işlevi değerlendirilmesi ile  $\geq 25$  mmHg olarak ölçüldüğü, zamanla kötüleşen ve kalp ile damar sistemini giderek daha fazla etkileyen bir hastalıktır (Galiè vd., 2015).

McLaughlin ve arkadaşlarına göre PAH, pulmoner kapiller kama basıncının (kalbin sol tarafındaki dolum basıncını dolaylı olarak ölçmek için kullanılan değer) (PCWP)  $\leq 15$  mmHg ve pulmoner vasküler direncin (PVR) (kalbin sağ tarafından pompalanan kirli kanın akciğer atar damarlarından geçerken karşılaştığı zorluk)  $> 3$  Wood birimi (PVR birimi) olmasıyla tanımlanır (McLaughlin vd., 2013).

Thenappan ve arkadaşlarına göre ise pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH), akciğer atardamarlarında kan basıncının yükselmesiyle ortaya çıkan, ileri derecede bir kalp ve damar hastalığıdır. Bu durum, damar duvarlarında kalınlaşma ve damar direncinin yükselmesiyle nitelendirilmiştir (Thenappan vd., 2018).

Hastalık, nedeni bilinmeyen, kalıtsal veya bağ dokusu hastalıkları, doğuştan gelen kalp hastalıkları gibi altta yatan nedenlerle ilişkili olabilir. Tanı, klinik değerlendirme ve damar içinden yapılan basınç ölçümleriyle kesinleştirilir (Simonneau vd., 2019).

PAH, bazı durumlarda sebepsiz olarak ortaya çıkabilir. Bazen de doğuştan gelebilir ki buda kalıcıdır (Humbert vd., 2022).

Pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH), akciğer atardamarlarında görülen nadir fakat ilerleyici bir hastalıktır. Dünya Sağlık Örgütü (WHO) tarafından Pulmoner Hipertansiyon'un (PH) 5 grubu arasında Grup 1 olarak sınıflandırılmıştır (Galiè vd., 2015). PAH farklı bölgelerde farklı oranlarda yaygınlık göstermekle birlikte, genel olarak PAH'nin bir milyonda 15 ile 50 kişi de görüldüğü tespit edilmiştir (Thenappan vd., 2007). Bir yılda tespit edilen yeni vaka sayıları ise yaklaşık olarak bir milyonda 2 ile 10 kişi arasındadır (Hoepfer vd., 2006). Bu sayısal veriler bize PAH'nin nadir hastalıklar arasında yer aldığını gösterir.

Lakin PAH hastalığının teşhisi çoğu zaman erken konulmadığı için ve belirtileri (nefes darlığı, yorgunluk, göğüs ağrısı gibi) başka hastalıklarla karıştırılabildiğinden, gerçek vaka sayısının bildirilenden daha fazla olduğu düşünülmektedir (Galiè vd., 2015). PAH, her yaşta görülebilmekle beraber, daha çok 30 ile 60 yaş aralığındaki kadınlarda görülür. Hatta kadınlarda erkeklerden yaklaşık olarak iki kat daha fazla görüldüğü tespit edilmiştir (Humbert vd., 2006).

PAH, dünyada olduğu gibi Türkiye’de de nadir hastalıklar arasında yer alır. Türkiye’de PAH’nin görülme sıklığı tam olarak bilinmemekle beraber, dünya verilerine (bir milyonda 15–50 kişi) kıyas edildiğinde görülme sıklığı, Türkiye nüfusuna (Türkiye nüfusu yaklaşık 85 milyon) oranla 1.200 ile 4.000 arasında PAH hastası olduğu söylenebilir (Thenappan vd., 2007).

Daha somut veriler ise ulusal hasta kayıtları ve klinik çalışmalarla elde edilmiştir. 2013 yılında Kaymaz ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada, 27 merkezde takip edilen 1.150 PAH hastasının verileri analiz edilmiştir. Bu hastaların %72 sine yakını kadınlardan meydana geldiği ve bu kadın hastalarının yaş ortalamalarının ise 44 olarak kayıtlara geçtiği görülmüştür. Bu da dünyada olduğu gibi Türkiye’de de tanının genellikle ileri evrede konduğunu göstermektedir (Kaymaz vd., 2013).

## **1.2 Endotelin Reseptör Antagonisti İlaçlar**

Endotelin reseptör antagonistleri (ERA), endotelin hormonunun damar duvarındaki Endotelin Reseptör Tip A (ETA) ve Endotelin Reseptör Tip B (ETB) olarak isimlendirilen alıcılara bağlanmasını önleyerek damarların daralmasını azaltarak damarların geniş kalmasına yardımcı olurlar ve kan akışını iyileştirirler. Özellikle pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) gibi kanın vücuttaki damarlarda serbestçe dolaşmasını engelleyen; daha çok kalp, beyin, böbrekler ve bacaklar gibi organlara yeterli kan gitmemesine neden olan hastalıklarda tercih edilirler. Endotelin-1 bileşiği, güçlü bir damar daraltıcıdır. Damar duvarındaki düz kaslarda bulunan ETA alıcılarına bağlanarak damarların daralmasına ve kan basıncının yükselmesine neden olur. Buna karşılık ETB reseptörleri damarların iç yüzeyini kaplayan endotel hücrelerinde yer alır ve endotelin-1 bu reseptörlere bağlandığında nitrik oksit salınımını başlatarak kan basıncını azaltır (Beghetti, M., vd., 2020).

Öne çıkan ERA ilaçları arasında ambrisentan önemli bir yer tutar. Ambrisentan 2007’de onaylanmış ve daha seçici bir ETA antagonisti olarak öne çıkmıştır. Bu ve buna

benzer ilaçlar, yüksek tansiyon (hipertansiyon), damar sertliği ve kalp yetmezliği gibi hallerde endotelin sisteminin organize edilmesinde yardımcı olarak tedavi maksadıyla kullanılırlar (Beghetti, M., vd.,2020).

**Çizelge 1.1** Endotelin Reseptör Antagonisti Grubu İlaçların sınıflandırılmasını

| NO | Grup                                                     | Bileşikler  | Klinik Kullanım                    |
|----|----------------------------------------------------------|-------------|------------------------------------|
| 1. | Selektif ETA Reseptör Antagonisti                        | Ambrisentan | PAH                                |
| 2. | Non-Selektif Endotelin Reseptör Antagonistleri (ETA/ETB) | Bosentan    | PAH                                |
| 3. | Selektif ETA Reseptör Antagonisti                        | Sitaxentan  | PAH (Piyasadan çekildi)            |
| 4. | Non-Selektif Endotelin Reseptör Antagonistleri (ETA/ETB) | Macitentan  | PAH                                |
| 5. | Selektif ETB Reseptör Antagonistleri (Deneysel)          | BQ-788      | Deneysel çalışmalarda kullanılıyor |
| 6. | Selektif ETB Reseptör Antagonistleri (Deneysel)          | BQ-123      | Deneysel çalışmalarda kullanılıyor |

### 1.2.1 Endotelin Reseptör Antagonisti gurubu ilaçların Tarihçesi

Endotelin reseptör antagonistleri (ERA) grubu ilaçları çeşitli gelişimler gösterip ve belirli aşamalardan geçerek günümüze kadar olan gelişim süreci şöyledir: Endotelin reseptör antagonistleri (ERA) grubu ilaçların gelişimi, endotelin sisteminin keşfiyle başlamış ve çeşitli aşamalardan geçen bir süreçtir. Endotelin-1 (ET-1), kuvvetli bir damar daraltıcı peptit şeklinde ilk olarak 1988 de tanımlanmıştır. Ardından Japonya’da yapılan çalışmalarla, bilim insanları bu peptidiendotel hücrelerinden izole etmiş ve damar tonusu üzerindeki etkilerini detaylı biçimde ortaya koymuşlardır. Bu gelişme, endotelin reseptörlerini hedef alan ilaçların geliştirilmesi için bir temel oluşturmuştur (Yanagisawa vd., 2019).

1990’lı yılların başında, endotelin reseptör alt tipleri olan ETA ve ETB’nin yapısal ve fonksiyonel özellikleri daha detaylı bir şekilde nitelendirilmiştir. Aynı dönemde, bu reseptörlere ait; genlerin aktif olup olmadığını analiz eden ve protein üreten cDNA dizileri klonlama aşamasına gelmiştir. Yapılan çalışmalar, ETA alıcılarının damar duvarındaki kas hücrelerinde damarların daralmasına sebep olduğunu, ETB reseptörlerinin ise damarların iç yüzeyindeki hücrelerden nitrik oksit salgılanmasını sağlayarak damarların genişlemesine yardımcı olduğunu ortaya koymuştur. Bu ilerlemeler sayesinde, endotelin hormonunun çeşitli hastalıkların oluşum ve gelişim süreçlerinde önemli bir rol oynayabileceği üzerinde çeşitli araştırmalar ve çalışmalar yapılmaya başlanmıştır (Kohan vd., 2020).

ETA-selektif antagonistler ilk olarak 1993-1994 yıllarında geliştirilmiştir. BQ-123 (peptid yapılı) ve FR-139317 gibi maddeler, yapılan laboratuvar çalışmalarında endotelin ETA reseptörüne bağlanıp etkisini yok ettiği görülmüştür. Öte yandan, ETB reseptörüne has BQ-788 antagonisti anlam kazanmıştır. Bu çalışmalar neticesinde ortaya çıkan antagonistler, istenilen neticeyi tam olarak verememiş; kan- beyin sınırını geçememeleri sebebiyle tıbbi kullanımlarda pek kullanılamamışlardır (Sakamoto vd., 1993).

Ambrisentan, ETA-selektif bir ERA olarak Amerika Birleşik Devletleri Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından PAH tedavisi için 2007 de onaylanmıştır. Ambrisentan, diğer endotelin reseptör antagonisti ilaçlarına göre karaciğere daha az yan etkisi olduğu ve karaciğerin madde ile etkileşiminin daha düşük seviyede kaldığı görülmüştür (Hoeper vd., 2006).

2020'li yıllara gelindiğinde ERA'lar, PAH tedavisinde vazgeçilmezler arasında yerini almıştır. Ambrisentanın, bu yıllarda tıbbi müdahalelerde çokça tavsiye edildiği görülür. Öte yandan, göz tansiyonu gibi bazı hastalıkların tedavisinde ERA'ların potansiyel kullanımı için çalışmalar devam etmekte, fakat peptid yapısında olmayan ERA'ların bazı yan etkilerinden dolayı bu bölümdeki ilerlemelerin yavaşlamasına neden olmaktadır (Kohan vd., 2020).

### **1.2.2 Endotelin Reseptör Antagonisti grubu ilaçların etki mekanizmaları**

ERA'ların temel etki mekanizması, ET-1'in reseptörlere bağlanmasını engellemek amacıyla damarlarda oluşan olumsuz etkileri azaltmaktır. Mekanizma dört temel yolla çalışır.

Bu etkilerden ilki, damarların genişlemesini sağlayarak kanın daha rahat dolaşmasına yardımcı olmasıdır. ETA reseptörleri bloke edilince ET-1, damar düz kaslarını uyarmaz ve damar gevşemesi sağlanır. Bu durum pulmoner arter basıncını düşürür ve sağ kalp üzerindeki yükü azaltır (Galiè vd., 2015).

İkinci mekanizma hücrelerin gereksiz yere çoğalmasını ve organlarda sertleşmeye yol açan zararlı doku oluşumunu engellemesidir. ET-1, damarlardaki kas hücrelerinin hem büyümesine hem de çoğalmasına neden olur. ERA'lar bu etkiyi durdurarak damar duvarı kalınlaşmasını ve organlarda sert ve sağlıklı dokuların oluşmasını engeller (McLaughlin VV vd., 2006).

İltihabı azaltıcı ve kan pıhtılaşmasını önleyici etki de üçüncü mekanizma olarak değerlendirilir. ERA'lar endotelin sisteminin neden olduğu iltihaplanmayı ve pıhtılaşmayı da azaltabilir. Bu etki dolaylıdır ancak PAH'ın ilerlemesini yavaşlatabilir (Humbert M vd., 2004).

Son mekanizma basamağında ise endotel fonksiyonlarını düzeltmesidir. ET-1, endotel disfonksiyonuna neden olur. ERA kullanımı, endotelin dengesini yeniden sağlayarak endotel hücrelerinin normal çalışmasına katkı sağlar. Bu durum damar bütünlüğünü ve kan akışını olumlu yönde etkiler (Rubin LJ vd., 1997).

PAH tedavisinde ERA'lar, hastalığın temel nedenlerinden biri olan damar daralması ve damar yapısındaki bozulmaları hedef alarak etkili bir tedavi sunar. Özellikle erken dönemde başlanırsa hastalığın ilerlemesini yavaşlatabilir, semptomları hafifletebilir ve yaşam kalitesini artırabilir (Galiè vd., 2015; McLaughlin VV, McGoon MD., 2006).

### **1.2.3 Endotelin Reseptör Antagonisti (ERA) İlaçların Farmakokinetik Özellikleri**

Endotelin reseptör antagonistleri (ERA'lar), Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon (PAH) tedavisinde sık kullanılan ve endotelin-1'in ETA ve ETB alıcıları üzerindeki etkilerini bloke eden ilaçlardır. ERA'ların klinik etkinliklerinin yanı sıra farmakokinetik özellikleri de tedavi yönteminin seçiminde önemli bir role sahiptir. Farmakokinetik özellik, bir ilacın vücutta nasıl emildiği, nasıl dağıldığı, nasıl metabolize edildiği ve nasıl elimine edildiğini açıklayan süreci kapsar.

#### **1.2.3.1 Emilim**

ERA'lar çoğunlukla ağız yoluyla alınan ilaçlardır. Emilim hızları ilaca göre değişiklik göstermekle beraber bağırsaklardan iyi derecede emilir. Ambrisentan oral yolla alındığında ilacın %80'ine yakını kana karışır. Bu emilim de yaklaşık olarak 1,5-2 saat içinde gerçekleşir ve kandaki en yüksek seviyeye (Tmax) ulaşır. Bosentan ağız yoluyla alındığında emilimi hızlıdır; yüksek seviyede plazma konsantrasyonuna (Tmax) yaklaşık olarak 3-5 saat gibi kısa zamanda %50-%70 seviyesine ulaşır. Macitentanin emilimi biraz yavaştır fakat çok etkilidir; kandaki yüksek seviyeye yaklaşık olarak 8 saatte ulaşır. Yiyecekler ERA'ların emiliminde ciddi manada bir değişiklik meydana getirmediğinden ve bu klinik açıdan çok anlam ifade etmediğinden istenilen zamanda, yemeklerden önce ya da sonra alınabilir (Galie vd., 2015).

### **1.2.3.2 Dağılım**

ERA'lar yüksek oranda plazma proteinlerine, özellikle kandaki protein olan albumine bağlanır. Ambrisentanin hemen hemen tamamına yakını plazma proteinlerine bağlanır. Öyle ki bu oran %98'in üzerine çıkabilir. Diğer ERA antagonistlerinden bazıları olan bosentan ve macitentanin da plazma proteinlerine bağlanma oranları yüksektir. Bu özellik, ilacın vücut dokularında nasıl dağıldığını ve etkisinin ne kadar sürdüğünü belirler. Öte yandan beyin kan bariyerini geçme potansiyelleri düşüktür; bu nedenden dolayı merkezi sinir sistemi üzerindeki doğrudan etkileri de düşüktür (Vatter & Seifert, 2006).

### **1.2.3.3 Metabolizma**

ERA'lar karaciğerde yoğun şekilde işlenerek metabolize edilir. Burada özellikle ilaçların ve toksinlerin parçalanmasında görevli olan ve karaciğerde bulunan sitokrom P450 enzimleri görev alır. Ambrisentan, karaciğerdeki glukuronoziltransferaz 1A9 (UGT1A9) ve glukuronoziltransferaz 2B7 (UGT2B7) isimli glukuronidasyon enzimleriyle metabolize edilir. sitokrom P450 (CYP) enzimleriyle çok az etkileşime girdiğinden, ilaç etkileşimi riski daha sınırlıdır. Bosentan, karaciğerde sitokrom P450 3.aile, A alt ailesi, 4 numaralı üye (CYP3A4) ve sitokrom P450 2.aile, C alt ailesi 9 numaralı üye (CYP2C9) adlı enzimler tarafından parçalanır. Bu enzimlerin çalışmasını hızlandırabileceği için, diğer ilaçlarla birlikte kullanıldığında etkileşim riski artabilir. Macitentan, karaciğerde CYP3A4 enzimi tarafından parçalanır ve ACT-132577 adlı aktif bir metabolite dönüşür. Bu metabolit, ilacın etkisinin daha uzun sürmesini sağlar.

### **1.2.3.4 Atılım**

ERA'ların atılım yolları da birbirlerine göre farklılık gösterir. Bosentan ve Macitentan, esas olarak karaciğerden safra yoluyla atılırlar. Bosentan yaklaşık olarak 6 saat içinde yarısına yakını vücuttan atılır. Macitentan ise yaklaşık olarak 15-16 saatte yarısını vücut dışarı atar. Macitentanın etkisi daha uzun sürelidir. Ambrisentan ise hem karaciğerden safra vasıtasıyla hem de böbrekler yardımıyla atılır, ancak böbrekler yoluyla eliminasyonu daha sınırlıdır. Burada vücut ambrisentanın yarısını ortalama olarak 12-13 saatte dışarı atar (Olschewski vd., 2007).

### **1.2.3.5 Özel Durumlarda Farmakokinetik**

Böbrek yetmezliği olan hastalarda ambrisentan haricindeki ERA'lar çoğunlukla böbreklerden atılmadığı için hafif ve orta dereceli böbrek yetmezliğinde doz ayarlamasına gerek yoktur. Karaciğer yetmezliği olan hastalarda ERA'ların çoğu karaciğerde

metabolize edildiğinden, karaciğer işlev yetersizliği olan hastaların bu ilaçları daha dikkatli kullanmaları gerekir. Özellikle bosentan, karaciğere zarar verebilme riski taşıdığı için hastaların düzenli karaciğer fonksiyon testleri yaptırmaları önem arz etmektedir. Endotelin reseptör antagonistlerinin farmakokinetik özellikleri, tedavi süreçleri ve güvenliği üzerinde önemli etkilere sahiptir. Her ERA'nın emilim, dağılım, metabolizma ve eliminasyon süreçleri birbirinden farklı olduğundan, hastanın özelliklerine göre ilaç seçiminde göz önünde bulundurulmalıdır. Özellikle karaciğer fonksiyonları, ilaç etkileşim potansiyeli ve yarı ömür gibi unsurlar, tedavi süreçlerinin tasarlanmasında belirleyici olmaktadır.

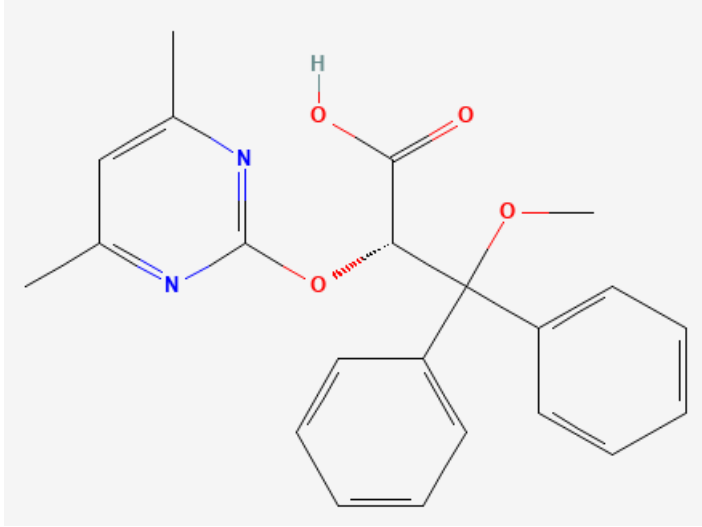
### **1.3 Ambrisentan**

Pulmoner Arteriyel Hipertansiyon (PAH), damarlarla ilgili ilerleyici bir hastalık olup, sağ kalp yetmezliğine sebep olabilen ciddi bir durumdur. Endotelin-1 (ET-1) adlı bileşik güçlü bir damar daraltıcı ve bu rahatsızlıkta önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Endotelin Reseptör Antagonistleri (ERA) ise bu etken maddeyi hedef alarak hastalığın tedavisinde önemli yer tutmaktadır. Ambrisentan, bu grup içinde ETA reseptörlerine seçici bağlanan bir ilaç olup, endotelin-1'in damar düz kas hücreleri üzerindeki daraltıcı ve hücrelerin çoğalmasını engeller. Bu sayede pulmoner arter basıncı hafifler, sağ kalp üzerindeki yük azalır ve hastanın fonksiyonel kapasitesi artar (Galiè vd., 2015).

Ambrisentan, Gilead Sciences tarafından geliştirilmiş ve 2007 yılında Amerika Birleşik Devletleri'nde FDA tarafından onaylanmıştır. Avrupa İlaç Ajansı (EMA) tarafından ise 2008 yılında onaylanmıştır. Geliştirilmesi, endotelin sisteminin PAH'daki rolünün anlaşılmasıyla mümkün olmuştur. İlk klinik çalışmalarında ambrisentan, hem etkinliği hem de güvenlik profili nedeniyle dikkat çekmiştir (Galiè vd., 2008).

#### **1.3.1 Ambrisentanın Kimyasal ve Farmasötik Özellikleri**

Ambrisentan'ın kimyasal formülü  $C_{22}H_{22}N_2O_5S$ , molekül ağırlığı yaklaşık 406.49 g/mol'dür. Kristal yapıda beyaz toz şeklindedir ve ağız yoluyla alınmak üzere tablet şeklinde bulunur. Ambrisentan vücuda alındıktan sonra kana geçip etki gösterebilen kısmı %80'nin üzerindedir. Plazma proteinlerine bağlanma oranı da çok yüksek olup yaklaşık olarak %99 civarındadır. Kandaki en yüksek plazma düzeyine ulaşma süresi yaklaşık olarak 1.5–2 saat civarındadır. Yarı ömrü ortalama 12 saattir. Vücut tarafından işlenmesi ve dönüştürülmesi karaciğerde, daha çok UGT1A9 ve UGT2B7 enzimleriyle olur. Vücut dışına atılımı hem safra hem de idrar yoluyla gerçekleşir, ancak böbrekler tarafından atılımı yavaştır (Vatter & Seifert, 2006 ; Lemiere vd., 2014).



**Şekil 1.1.** Ambrisentan molekülünün kimyasal yapısı

### 1.3.2 Klinik Kullanımı

Ambrisentan, WHO Grup 1 PAH hastalarında semptomları azaltmak, fiziksel kapasiteyi artırmak ve fonksiyonel sınıfı iyileştirmek amacıyla kullanılır. Genellikle günde bir defa 5 mg veya 10 mg dozlarında alınır. Karaciğer toksisitesi açısından ambrisentanın diğer ERA'lara göre daha güvenli bir profil sergilemesi, uzun süreli kullanımda tercih edilmesini sağlamaktadır (Vachiéry et al., 2011 :1938). Avrupa Kardiyoloji Derneği (ESC) ve Avrupa Solunum Derneği (ERS) tarafından yayımlanan 2022 kılavuzlarında, ambrisentan birinci basamak oral tedavi seçenekleri arasında Önerilmektedir. Ancak gebe hastalarda kullanılmamalıdır (Humbert vd., 2022).

Ambrisentan, PAH tedavisinde seçici ETA uyarıcıları antagonizmasıyla etkili olan, biyoyararlanımı oldukça iyi ve güvenliği görece iyi olan bir ilaçtır. Klinik veriler, hem tek başına hem de kombine tedavilerde etkili olduğunu göstermektedir. Diğer ERA'lara göre karaciğer üzerindeki olumsuz etkileri daha düşüktür, bu da onu tercih edilebilir kılmaktadır.

### 1.4 Kromatografi

Kromatografi, bir karışımdaki bileşenlerin ayrılması, tanımlanması ve miktarlarının belirlenmesi amacıyla kullanılan güçlü bir analitik tekniktir. İlk olarak 1906 yılında Rus botanikçi Mikhail Tsvet tarafından bitki pigmentlerinin ayrılması için geliştirilmiş ve bu yönetime de kromatografi adını vermiştir. Zamanla bu yöntem geliştirilmiş ve bugün hem kimya hem de biyoloji alanlarında vazgeçilmez bir analiz

yöntemi haline gelmiştir (Snyder & Kirkland, 1979).

#### **1.4.1 Kromatografinin Temel Prensibi**

Kromatografik tekniklerde iki temel faz bulunur: sabit faz ve hareketli faz. Karışımdaki bileşenler, bu iki faz arasında farklı hızlarda hareket ederek ayrılırlar. Bu ayırım, bileşenlerin sabit ve hareketli fazlara olan iki madde arasındaki çekim gücüne göre gerçekleşir (Poole, 2012). Sabit faz genellikle bir katı veya sıvı tabaka iken, hareketli faz sıvı veya gaz olabilir. Bu duruma göre kromatografi türleri de sınıflandırılır (Skoog vd., 2013).

#### **1.4.2 Kromatografi Türleri**

Kromatografinin birçok alt türü vardır. Bunlardan biri olan kağıt kromatografisi özellikle biyolojik örneklerde pigment analizleri için kullanılır. Filtre kağıdı sabit faz olarak kullanılır. Amino asit ve şeker analizinde yaygındır (Block vd., 1958). Kromatografinin bir diğer alt türü olan ince tabaka kromatografisi (TLC) katı bir destek üzerinde ince yüzeyine başka maddeleri çeken ve onları tutan tabaka kullanılır. Genellikle kalitatif analizlerde tercih edilir. İlaç ve gıda analizinde hızlı bir yöntemdir (Stahl, 1969). Gaz kromatografisi (GC) türünde uçucu bileşiklerin analizinde yaygındır. Hareketli faz olarak, başka maddelerle kimyasal reaksiyona girmeyen bir gaz (genellikle helyum veya azot) kullanılır (McNair & Miller, 2009). Yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) türünde ise karmaşık karışımların yüksek çözünürlükle ayrılmasını sağlar. Hassas analizler için tercih edilir. Hareketli faz sıvı olup yüksek basınç altında gönderilir (Snyder vd., 2010). İyon değişim kromatografisi türünde yüklü iyonların ayrılmasında kullanılır. Su arıtma ve biyolojik örnek analizlerinde önemli yer tutar (Fritz & Gjerde, 2008). Boyut dışlama kromatografisi ise molekül boyutuna göre ayırım yapar (Striegel vd., 2009).

#### **1.4.3 Uygulama Alanları**

Kromatografi; ilaç geliştirme, çevre analizleri, gıda güvenliği, adli tıp ve biyoteknoloji gibi çok çeşitli alanlarda yaygın olarak kullanılmaktadır. Özellikle ilaçların keşfi, geliştirilmesi, üretimi ve pazarlanması, ilaç saflığı ve stabilitesini kontrol etmek için HPLC kullanımı standart hale gelmiştir. Ayrıca biyomoleküllerin saflaştırılmasında molekülleri boyutlarına göre ayıran ve molekülleri, sadece tanıdığı “anahtar”a tutunmasına göre ayıran özel yöntemler kullanılır (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

#### 1.4.4 Avantajları ve Sınırlamaları

Kromatografinin başlıca avantajı, çok karmaşık karışımları yüksek hassasiyet ve doğru bir şekilde ayırabilme özelliğine sahiptir. Çeşitli numune türlerine uyarlanabilir. Ayrıca nicel ve nitel analizlere olanak tanır. Ancak cihaz maliyetleri, analiz süresi ve teknik uzmanlık ihtiyacı gibi dezavantajları da vardır. Özellikle GC ve HPLC gibi sistemlerin kurulumu ve bakımı maliyetli olabilir (Skoog vd., 2013).

Kromatografi, analitik kimyanın vazgeçilmez bir aracıdır ve tıp, biyoloji, kimya, eczacılık, mühendislik gibi çok çeşitli bilim alanlarında kullanılır (Dettmer vd.,2007). Farklı kromatografi türleri, spesifik analizlere göre uyarlanabilir ve yüksek sıcaklıklar sunar (Snyder vd.,2011). Bu teknik, karışımlardaki bileşenlerin ayrılması, tanımlanması ve nicel analizinde büyük hassasiyet sağlar. Özellikle gaz kromatografisi (GC) ve sıvı kromatografisi (LC), farmasötik ürünlerin saflık analizinden çevresel numunelerdeki kirleticilerin tespitine kadar geniş bir uygulama yelpazesi sunar (Poole vd., 2012). Modern kromatografi sistemleri, gelişmiş dedektörlerle entegre edilerek düşük konsantrasyonlardaki maddelerin bile tespitini mümkün kılar (Niessen vd., 2006). Ayrıca, yöntem geliştirme olanakları sayesinde, analiz süresi kısaltılabilir, çözünürlük artırılabilir ve tekrarlanabilirlik sağlanabilir (Miller vd., 2010). Bu nedenle kromatografi, hem rutin laboratuvar çalışmalarında hem de ileri düzey araştırmalarda kritik bir rol oynamaktadır.

#### 1.4.5 Kromatografik Yöntemlerin Sınıflandırılması

Kromatografi, bir karışımı oluşturan bileşenlerin birbirinden ayrılması amacıyla kullanılan ve çok sayıda farklı türe ayrılabilen bir ayırma yöntemidir. Bu yöntemler; kullanılan fazların türüne, ayrılma mekanizmasına ve uygulama biçimine göre sınıflandırılır. Bu sınıflandırma, yöntemin hangi amaçla ve hangi örnek türleri için uygun olduğunu belirlemede büyük önem taşır (Skoog, Holler & Crouch, 2013).

Faz türüne göre sınıflandırmada kromatografi yöntemleri, sabit faz ve hareketli fazın fiziksel durumuna göre sınıflandırılabilir. Gaz–Sıvı Kromatografisi (GLC) yönteminde sabit faz sıvıdır, hareketli faz gazdır. Gaz–Katı Kromatografisi (GSC) yönteminde sabit faz katıdır, hareketli faz gazdır. Sıvı–Sıvı Kromatografisi (LLC) yönteminde her iki faz da sıvıdır. Sıvı–Katı Kromatografisi (LSC) yönteminde sabit faz katı, hareketli faz sıvıdır. Bu ayırım özellikle gaz kromatografisi (GC) ve yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) sistemlerinin temelini oluşturur (Poole, 2012).

Ayrılma mekanizmasına göre sınıflandırmada kromatografik ayırma yöntemleri,

moleküllerin sabit fazla olan etkileşim türüne göre sınıflandırılır. Yüzeye tutunma kromatografisinde bileşenler katı sabit fazın yüzeyine tutunur. Dağılma kromatografisinde bileşenler sıvı sabit faz ile dağılım dengesine girer. İyon değişim kromatografisinde İyonik bileşikler, yüklü sabit fazla iyon alışverişi yaparak ayrılır. Moleküler elek kromatografisinde moleküller boyutlarına göre ayrılır; büyük moleküller önce seçilmiş olur. Afinite kromatografisinde bir molekülün sadece kendine özgü olarak bağlanabildiği başka bir molekülle geçici olarak tutulmasını sağlayan ayırma yöntemidir. Bu yöntemde maddeler, anahtar-kilit uyumu gibi tutunarak ayrılır. Bu mekanizmalar sayesinde kromatografi, yalnızca kimyasal yapıya değil, aynı zamanda biyolojik işlevlere göre de ayırma yapabilmektedir (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

Kromatografi, uygulama şekline göre de iki ana gruba ayrılır. Bunlardan ilki kolon kromatografisidir. Burada sabit faz bir kolon içine doldurulur. Örnek, bu kolondan hareketli fazla birlikte geçirilir (GC, HPLC). Bir diğeri düzlemsel kromatografidir. Sabit faz düz bir yüzeye (örneğin cam plaka, kağıt) uygulanır. Hareketli faz yüzey boyunca yayılır. Bu sınıflama, yöntemlerin hem laboratuvar düzeyinde hem de endüstriyel ölçekte nasıl kullanılacağını belirlemede önemlidir (Stahl, 1969).

## **1.5 Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi ve Prensipleri**

Yüksek performanslı sıvı kromatografi (HPLC), analitik kimya alanında bileşenlerin ayrıştırılması, tanımlanması ve miktarının belirlenmesi amacıyla kullanılan güçlü bir analiz yöntemidir. Sıvı kromatografi prensiplerine dayanan HPLC, yüksek hassasiyet, doğruluk ve tekrarlanabilirlik gibi avantajlar sunar. Bu nedenle özellikle karmaşık karışımların analizinde tercih edilen bir yöntemdir. Kimya, biyokimya, ilaç bilimi, çevre bilimi ve gıda bilimi gibi birçok alanda yaygın olarak kullanılmaktadır (Güçlü, 2015).

HPLC yöntemi, bir karışımın bileşenlerini ayırmak için bir sabit faz (genellikle bir kolon içindeki katı bir malzeme) ve bir hareketli faz (sıvı çözücü) kullanır. Analitler, hareketli faz ile birlikte kolon boyunca ilerlerken sabit faz ile farklı etkileşimlere girer. Bu etkileşimler, bileşenlerin kimyasal ve fiziksel özelliklerine bağlı olarak farklı hızlarda ilerlemesine neden olur ve böylece bileşenler kolonda ayrılarak dedektör tarafından tespit edilir.

Hareketli faz, örnek bileşenlerini kolonda taşıyan sıvı fazdır. Genellikle su, metanol, asetonitril veya bu çözücülerin karışımları kullanılır. Hareketli fazın pH değeri,

polaritesi ve iyonik kuvveti, ayrılmanın başarısını doğrudan etkileyen önemli parametrelerdir. Ters faz HPLC sistemlerinde hareketli faz genellikle daha polar özellikte bir çözücüdür ve bu durum apolar bileşenlerin kolondan daha geç elüe olmasına neden olur (Snyder vd., 2013).

Sabit faz ise HPLC kolonunun içinde bulunan ve ayrımı gerçekleştiren yüzeydir. Genellikle silika bazlı partiküller üzerine bağlanmış fonksiyonel gruplardan oluşur. Ters faz (RP-HPLC) sistemlerinde, oktadesilsilan (C18) ve oktilsilan (C8) gibi uzun zincirli alkil gruplar tercih edilir. Sabit fazın yüzey alanı, partikül boyutu ve gözenek yapısı, ayırım kapasitesini belirleyen temel faktörlerdir (Niessen vd., 2006).

HPLC sistemleri birkaç temel bileşenden oluşur. Bunlar arasında hareketli fazı sabit bir akış hızıyla kolona gönderen pompa, örnek karışımını kolona enjekte eden enjeksiyon sistemi, bileşenleri algılayarak sinyal üreten dedektörler ve bu sinyalleri işleyerek kromatogram oluşturan veri sistemi yer alır. En sık kullanılan dedektörler UV/Vis dedektörleridir. Bununla birlikte floresans, kütle spektrometre (MS), kırılma indisi (RI) gibi farklı dedektör türleri de uygulama alanına göre tercih edilmektedir (Dettmer vd.,2007). Dedektör seçimi, analiz edilen bileşiğin fiziksel ve kimyasal özelliklerine uygun şekilde yapılmalıdır.

Ters faz HPLC, en yaygın kullanılan kromatografik moddur ve temel olarak hidrofobik etkileşimlere dayanır. Sabit faz olarak hidrofobik özellikteki maddeler kullanılırken, hareketli faz daha polar özellik gösterir. Kullanılan çözücüler genellikle su ve organik çözücü karışımlarıdır. Sistematik ve doğru bir şekilde yürütülen HPLC analizleri, yüksek çözünürlük, kısa analiz süresi ve tekrarlanabilir sonuçlar sağlar (Miller vd.,2010).

Yüksek performans sıvı kromatografisi, modern analitik kimyanın temel tekniklerinden biri olarak, özellikle kompleks karışımların bileşenlerinin ayrılması, tanımlanması ve miktar tayini açısından büyük önem taşır. Bu yöntemde kullanılan temel kavramların anlaşılması, analizlerin doğru ve güvenilir bir şekilde gerçekleştirilmesi açısından hayati önem taşımaktadır.

### **1.5.1 HPLC’de Kullanılan Temel Kavramlar ve İlgili Formüller**

Alıkonma süresi, bir bileşiğin kolondan dedektöre ulaşması için geçen zamandır ve  $t_R$  sembolü ile gösterilir. Her bileşiğin kolondaki etkileşimine göre farklı bir  $t_R$  değeri vardır. Bu süre, sabit ve taşıyıcı faz arasındaki etkileşimin bir sonucudur ve analiz edilen

bileşenin tanımlanmasında kullanılır (Dettmer vd.,2007).

Kromatogram üzerinde elde edilen her pik, bir bileşiği temsil eder. Pik alanı, genellikle bileşiğin miktarıyla doğru orantılıdır. Kalitatif analizlerde tepe yüksekliği de kullanılabilir, ancak kantitatif analizlerde daha güvenilir sonuçlar için tepe alanı tercih edilir (Miller vd.,2010).

Kolonun ayırma gücü, teorik plaka sayısı (N) ile ifade edilir. Yüksek teorik plaka sayısı (HETP), daha iyi çözünürlük anlamına gelir. Kolonun ayırma gücü; teorik plaka sayısı, pik genişliği(W) ve alıkonma süresine bağlı olarak hesaplanır (Çizelge 1.2) (Poole vd.,2013).

Ayrırma faktörü ( $\alpha$ ), iki bileşiğin alıkonma sürelerinin oranı olup, ayırımın ne kadar etkili olduğunu gösterir.  $\alpha > 1$  olduğunda bileşenler birbirinden ayrılmış demektir.

Seçicilik ise sabit fazın, analiz edilen bileşiklerle olan özgül etkileşim kabiliyetini ifade eder (Snyder vd., 2011).

İki pik arasındaki çözünürlük, analizin doğruluğu açısından önemlidir.  $R_s > 1.5$  olduğunda iki bileşik tam olarak ayrılmış sayılır. Çözünürlük, teorik plaka sayısı, ayırma faktörü ve kapasite faktörü gibi parametrelerden etkilenir (Çizelge 1-2) (Niessen vd., 2006).

**Çizelge 1.2. HPLC’de Kullanılan Temel Kavramlar ve İlgili Formüller**

| Kavram                        | Simgesi  | Açıklama                                                                        | Formül                                               |
|-------------------------------|----------|---------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|
| Alıkonma Süresi               | $t_R$    | Bileşiğin kolondan geçip dedektöre ulaşma süresi                                | —                                                    |
| Ölü Zaman                     | $t^o$    | Tutunmayan maddenin dedektöre ulaşma süresi (tutunmayan madde süresi)           | —                                                    |
| Kapasite Faktörü              | $k'$     | Bileşiğin sabit faza karşı ne kadar tutulduğunu gösterir                        | $k' = (t_r - t_o) / t_o$                             |
| Ayrılma Faktörü (Seçicilik)   | $\alpha$ | İki bileşiğin birbirinden ayrılma oranı                                         | $\alpha = k'_2 / k'_1 (\alpha > 1)$                  |
| Çözünürlük                    | $R_s$    | İki pik arasındaki ayırım kalitesi                                              | $R_s = 2(t_{r2} - t_{r1}) / (w_1 + w_2)$             |
| Teorik Plaka Sayısı           | $N$      | Kolonun ayırma gücünü gösterir ( $w_{1/2}$ : Pik yarı yüksekliğindeki genişlik) | $N = 16(t_r / w)^2$ veya $N = 5.54(t_r / w_{1/2})^2$ |
| Plaka Yüksekliği (Verimlilik) | HETP     | Kolon verimliliğinin değerlendirilmesinde kullanılır (L: Kolon uzunluğu)        | $HETP = L / N$                                       |

## 1.6 Su-Organik Çözücü Karışımlarında pH

Yüksek performans sıvı kromatografisi (HPLC) uygulamalarında mobil faz olarak sıklıkla su-organik çözücü karışımları kullanılır. Bu çözücü sistemlerinde pH kavramı, yalnızca sulu sistemlerdeki tanımıyla sınırlı kalmayıp, çözeltinin bileşimi ve iyonlaşma davranışı açısından daha karmaşık bir hale gelir. Çünkü organik çözücüler, suya göre farklı dielektrik sabitlere, iyonlaşma sabitlerine ve asit-baz etkileşimlerine sahiptir (Rubinson vd., 2000).

Klasik pH tanımı, sulu çözeltilerdeki  $H^+$  iyonu aktivitesinin negatif logaritması olarak verilir. Ancak HPLC’de kullanılan mobil fazlar genellikle su-metanol, su-asetonitril veya su-THF gibi karışımlardır. Bu ortamlar, iyonlaşmayı etkileyen faktörler nedeniyle etkin pH ile gerçek pH arasında farklara yol açabilir (Snyder vd., 2011).

Organik çözücüler, ortamın dielektrik sabitini düşürerek zayıf asitlerin veya bazların iyonlaşmasını azaltabilir. Örneğin, metanol veya asetonitril varlığında asetik asit gibi zayıf asitler daha az iyonlaşır. Bu da çözeltinin ölçülen pH’nın gerçek iyonik özelliklerini tam olarak yansıtmamasını engeller (Poole vd., 2013).

Su-organik çözücü karışımlarında pH ölçümü, geleneksel pH metrelerle yapılabilir ancak bu ölçümler mutlak değil, görecelidir. Elektrotlar, özellikle organik çözücü oranı yüksek çözeltilerde doğru çalışmayabilir. Bunun temel nedeni, cam elektrotların yalnızca su ortamında kalibre edilmiş olmasıdır. Bu nedenle ölçülen pH değeri genellikle "görelî pH" olarak ifade edilir (Bakshi, M., & Singh, 2002).

Bu tür ortamlarda pH ölçümleri yapılırken bazı önlemler alınmalıdır. Kalibrasyon, çözücü içeren benzer tamponlarla yapılmalıdır. Ölçüm için düşük oranda organik çözücü (%20–30) içeren tamponlar tercih edilmelidir. İdeal olarak, pH sulu çözeltide ayarlanmalı ve ardından organik çözücü eklenmelidir (ICH Q2(R1) Guidelines, 2005).

Metanol ve asetonitril gibi organik çözücüler yalnızca pH’ı değil, aynı zamanda çözeltideki asit-baz çiftlerinin  $pK_a$  değerlerini de etkiler. Örneğin, asetik asidin  $pK_a$  değeri suda 4.75 iken, %50 metanol içeren bir ortamda bu değer yaklaşık 5.3’e kadar çıkabilir. Bu kayma, iyonlaşma dengesini değiştirerek HPLC’de pik şekli ve retansiyon süresini etkileyebilir (Snyder vd., 2011). Ayrıca, organik çözücü oranı arttıkça tampon kapasitesi azalır. pH değişimlerine karşı tamponlama gücü zayıflar. Sabit pH sağlamak daha zor hale gelir (Poole vd., 2013).

### 1.7 Su –Organik Çözücü İkili Karışımlarında $pK_a$ Tayini

Zayıf asit ve bazların iyonlaşma özelliklerinin belirlenmesinde  $pK_a$  değeri, çözeltinin iyonik yapısını anlamak açısından temel bir parametredir.  $pK_a$ , bir maddenin çözeltide ne kadar iyonlaştığını, dolayısıyla ne kadar güçlü bir asit veya baz olduğunu gösterir. Bu değer, çoğunlukla sulu çözeltilerde belirlenmesine rağmen, birçok analitik ve farmasötik uygulamada maddeler su–organik çözücü karışımlarında çözünür. Bu nedenle, bu tür ikili çözücü sistemlerinde  $pK_a$  tayini büyük önem taşır (Avdeef vd., 2012).

Organik çözücüler (örneğin metanol, etanol, asetonitril veya dimetilformamid gibi), suyla karıştığında çözeltinin dielektrik sabitini, viskozitesini ve hidrojen bağ kapasitesini değiştirir. Bu durum, çözeltideki asit-baz çiftlerinin iyonlaşma dengesini etkileyerek,  $pK_a$  değerlerinde kaymalara neden olur. Özellikle düşük dielektrik sabite sahip çözücüler, iyonların stabilize edilmesini zorlaştırarak iyonlaşmayı baskılar; bu da  $pK_a$ 'nın daha yüksek görünmesine neden olur (Rubinson vd., 2000).

Organik çözücünün türü ve miktarı arttıkça  $pK_a$  değerleri genellikle yükselir. Örneğin, asetik asidin  $pK_a$ 'sı suda 4.75 iken, %50 metanol içeren bir karışımda bu değer yaklaşık 5.3 olabilir (Poole vd., 2013). Bunun nedeni, metanolün suya göre daha az polar olması ve iyonik türleri daha az stabilize etmesidir. Ayrıca, organik çözücüler çözücü–çözünen etkileşimlerini değiştirerek hem iyonlaşma hem de çözünürlük üzerinde etkili olur. Bu, özellikle zayıf asitler ve zayıf bazlar için  $pK_a$  tayininde göz önünde bulundurulmalıdır (Ràfols, C., & Bosch, E. 2012).

### 1.8 Ortamın Asitlik Derecesi (pH) ile Asidin asitlik sabitinin negatif logaritması ( $pK_a$ ) İlişkisi

İkili çözücü karışımlarında  $pK_a$ –pH ilişkisi, klasik Henderson-Hasselbalch denklemi ile açıklanabilir. Bu denklem asit-baz dengesinde çözelti pH'ını hesaplamak için kullanılan basit ama çok önemli bir denklemdir. Ancak bu denklem organik çözücüler eklendiğinde bazı düzeltmelere ihtiyaç duyar. Çünkü iyonlaşma davranışı sadece  $H^+$  konsantrasyonuna değil, çözeltinin çözgen karakterine de bağlıdır. Bu nedenle su–organik çözücü karışımlarında yapılan  $pK_a$  ölçümlerinde; elektrot tipi ve kalibrasyonu dikkatle seçilmeli, tampon kapasitesi ve iyon kuvveti kontrol altında tutulmalı, çözücü oranı mutlaka raporlanmalıdır (Albert, A., & Serjeant vd., 1984).

Henderson-Hasselbalch denklemi:

$$\text{pH} = \text{pK}_a + \log \left( \frac{[\text{A}^-]}{[\text{HA}]} \right)$$

Burada:

pH: Çözeltinin asitlik derecesi

pK<sub>a</sub>: Asidin iyonlaşma sabitinin negatif logaritması

[A<sup>-</sup>]: Asidin konjuge baz formunun derişimi

[HA]: Asidin zayıf asit formunun derişimi

### 1.9 pK<sub>a</sub> Tayini Yöntemleri

İkili çözücü ortamlarında pK<sub>a</sub> tayini çeşitli analitik yöntemlerle gerçekleştirilebilir. Burada yaygın olarak kullanılan yöntemlerden olan potansiyometrik titrasyon yönteminde pH metre ile yapılan titrasyonlar, su-organik karışımlarda en sık kullanılan yöntemdir. Ancak, pH elektrotlarının doğruluğu çözücü türüne bağlı olarak değişebilir. Bu nedenle ölçüm yapılacak ortamda kalibrasyon yapılması önerilir (Perrin vd., 1981).

Spektrofotometrik yöntemlerde asidik ve bazik türlerin ultraviyole (UV) ışığını farklı şekilde soğurması, bu türlerin ayırt edilmesinde veya analizinde kullanılabilir. Su-organik çözücü ortamlarında bu farklar daha belirgin hale gelebilir (Avdeef vd., 1993).

Nükleer manyetik rezonans (NMR) spektroskopisi, maddelerin ışık veya elektromanyetik dalgalar ile olan etkileşimlerini inceler. Maddenin üzerine UV ışınları, radyo dalgaları gibi elektromanyetik ışınlar gönderildiğinde bu maddenin ışını nasıl emdiğini, nasıl yaydığını ve nasıl kıldığını inceleyerek madde hakkında bize bilgi verir. pK<sub>a</sub> tayini için oldukça hassas bir tekniktir ve özellikle çözünürlüğün düşük olduğu durumlarda tercih edilebilir (Avdeef vd., 1993).

Kapiler elektroforez (CE), iyonik türlerin elektriksel alan altında ayrılmasını sağlayan bir ayırma tekniğidir. Bu yöntemde maddelerin elektroforetik hareketliliği, çözeltinin pH değerine bağlı olarak değişir. Özellikle asidik ya da bazik gruplar içeren moleküller, pH değiştikçe farklı iyonlaşma formlarına geçer ve bu uygulanan elektriksel alan altında hızlarını etkiler. Bu durumdan yararlanılarak pK<sub>a</sub> tayini yapılabilir. CE ile pK<sub>a</sub> tayini yapılırken, farklı pH'lara sahip tampon çözeltileri hazırlanır ve bu çözeltilerde bulunan analit maddenin, uygulanan elektriksel alan altında ne kadar hızlı hareket ettiği

ölçülür. Mobilite ile pH arasında bir grafik çizilerek, eğrinin dönüm noktası  $pK_a$  değerine karşılık gelir. Bu yöntem özellikle çok az miktarda örnekle çalışılması gereken durumlar için idealdir. Yüksek ayırma gücüne sahip olması ve hızlı sonuç vermesi önemli avantajları arasındadır. Ancak CE yöntemi özel cihaz ve uzmanlık gerektirir. Ayrıca, iyonik olmayan bileşiklerde kullanımı sınırlıdır (Ràfols vd., 2012).

İletkenlik titrasyonu, çözeltideki iyon derişimi değişimlerine dayalı olarak  $pK_a$  tayini yapılmasına olanak tanır. Bir asit ya da baz içeren çözeltinin kuvvetli baz veya asitle titrasyonu sırasında, iyon sayısında ve türünde meydana gelen değişimler çözelti iletkenliğini etkiler. Bu iletkenlik değişimleri, uygun elektrotlarla kayıt altına alınır. Titrasyon grafiğı, iletkenlik ile titrant hacmi (veya pH) arasındaki ilişkiyi gösterir. Eğrideki kırılma noktaları, asidik ya da bazik türlerin nötralizasyon noktalarını belirler. Bu noktaların analiziyle  $pK_a$  değeri hesaplanabilir. Yöntem, iyonik bileşiklerin analizinde oldukça kullanışlıdır ve özel dedektörlere gerek kalmadan uygulanabilir. Ancak, zayıf iyonlaşan maddelerde hassasiyeti düşüktür ve sıcaklık gibi çevresel faktörler sonucu etkileyebilir (Perrin vd., 1981).

Günümüzde yaygınlaşan bilgisayar destekli yöntemlerle yapılan hesaplamalar, moleküllerin yapısal özelliklerinden yararlanarak  $pK_a$  tahmini yapılmasını mümkün kılar. Bu yöntemler, moleküllerin üçboyutlu yapıları, elektron yoğunluğu dağılımı, dipol momentleri gibi kuantum kimyasal verileri dikkate alarak hesaplamalar yapar. Özellikle yeni ilaç adaylarının ön taramasında kullanılan bu yöntem, deneysel çalışma gerektirmeden çok sayıda bileşiğın değerlendirilmesine olanak tanır. Yazılımlar genellikle deneysel verilere dayalı veri tabanlarıyla desteklenir. Avantajları arasında hızlı sonuç verme, zaman ve maliyet tasarrufu yer alır. Ancak, sonuçlar deneysel verilerle mutlaka karşılaştırılmalı ve doğrulanmalıdır. Çünkü teorik modeller gerçek çözeltideki tüm etkileşimleri her zaman tam olarak yansıtamayabilir (Avdeef vd., 2012). HPLC yönteminde  $pK_a$  tayini esas olarak bileşiğın hareketli fazdaki iyonlaşma durumuna bağılı olarak sabit fazla etkileşiminin değişmesine dayanır. Hareketli fazın pH'sı değiştirildiğinde, analit molekülünün iyonik durumu değişir ve bu durum, sabit fazla olan etkileşimi etkileyerek alıkonma süresinde kaymalara neden olur. Bu alıkonma süresindeki değişiklikler kullanılarak, bileşiğın  $pK_a$  değeri dolaylı olarak hesaplanabilir (Wiese vd., 2002). Bu yöntemin uygulanmasında en yaygın yaklaşım, pH'ya bağılı alıkonma süresi eğrileri oluşturarak eğrinin dönüm noktasını belirlemektir. Bu dönüm noktası genellikle bileşiğın  $pK_a$  değerine karşılık gelir. Bu yaklaşım hem zayıf asitler hem de zayıf bazlar

için uygulanabilir (Poole vd.,2003).

Sıvı kromatografi ile  $pK_a$  tayini yapılırken genellikle ters faz kolonlar (örneğin C18 kolonlar) kullanılır. Hareketli faz olarak ise su ve organik çözücü (metanol veya asetonitril gibi) karışımları kullanılır. pH ayarı için uygun tampon sistemleri (örneğin asetat, fosfat veya sitrat tamponları) tercih edilir (Snyder vd., 2010).

Ayrıca, HPLC'nin  $pK_a$  tayininde kullanımı, özellikle zayıf suda çözünür bileşiklerin analizi açısından büyük avantaj sağlar. Suda çözünürlüğü düşük olan ilaç adayları, organik çözücülerle desteklenmiş mobil fazlarda analiz edilerek daha güvenilir sonuçlar elde edilebilir. Bu da yöntemi farmasötik analizler için oldukça uygun hale getirir (Bosch vd.,1998).

Sıvı kromatografi ile  $pK_a$  tayini ayrıca otomasyona uygunluk, çoklu bileşik analizi, yüksek tekrarlanabilirlik gibi önemli avantajlar sunar. Bununla birlikte, yöntemin dezavantajları arasında, pH stabilitesi düşük olan mobil fazların zamanla değişebilmesi ve kolonun pH tolerans aralığına dikkat edilmesi gerekliliği yer alır (Carr vd., 1996).

Sonuç olarak, sıvı kromatografi yöntemiyle  $pK_a$  tayini, özellikle modern farmasötik analizlerde güvenilir, hassas ve hızlı bir alternatif yöntem olarak öne çıkmaktadır. Bu yöntem, analitlerin iyonlaşma davranışını etkileyen birçok faktörü eş zamanlı değerlendirebildiği için, yalnızca  $pK_a$  belirlemekle kalmaz, aynı zamanda madde-faz etkileşimleri hakkında da önemli bilgiler sağlar. Bu tür  $pK_a$  tayinleri, özellikle ilaç geliştirme, farmasötik formülasyonlar, biyoanalitik yöntemler ve çevresel analizler gibi birçok alanda kritik öneme sahiptir. Çünkü bu ortamlarda çalışan bileşiklerin çözünürlüğü, absorpsiyonu ve biyoyararlanımı gibi özellikleri doğrudan iyonlaşma özelliklerine bağlıdır (Avdeef vd., 2012). Su-organik çözücü karışımlarında  $pK_a$  tayini, klasik sulu çözelti  $pK_a$  analizine kıyasla daha karmaşık ama bir o kadar da önemlidir. Organik çözücüler, hem çözeltinin fiziksel-kimyasal özelliklerini hem de iyonlaşma dengesini değiştirerek  $pK_a$  üzerinde belirgin etkiler gösterir. Bu nedenle doğru yöntem seçimi, çözücü oranının kontrolü ve uygun ölçüm tekniklerinin kullanılması, güvenilir  $pK_a$  tayini için temel gerekliliklerdir.

### 1.10 Literatür Özetleri

Ambrisentan, endotelin A reseptörünü seçici olarak durduran oral bir ilaçtır ve pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilmiştir.

Geliştirilmesinden günümüze kadar olan süreçte birçok bilimsel ve düzenleyici aşamadan geçerek pazarlanmıştır. Ambrisentan, ilk olarak Abbott Laboratories tarafından keşfedilmiş ve daha sonra 2000 yılında Myogen firmasına PAH tedavisi için lisanslanmıştır. Myogen, 2006 yılında Gilead Sciences tarafından satın alınmıştır. Ayrıca GlaxoSmithKline, bazı bölgelerde ilacın pazarlama haklarını elde etmiştir (Gilead, 2006).

Ambrisentan'ın etkili ve güvenli bir ilaç olduğu, ARIES-1 ve ARIES-2 isimli iki ayrı Faz III klinik çalışmada kanıtlanmıştır. Bu çalışmalar, hem hastaların hem de araştırmacıların hangi tedaviyi aldığını bilmediği (çift kör) ve bazı hastalara sahte ilaç (plasebo) verilerek yapılan kontrollü araştırmalarda kanıtlanmıştır. Gilead, 2006 yılında FDA'ye yeni ilaç başvurusunda bulunmuş ve ilaç 2007 yılında öncelikli inceleme statüsü ile değerlendirildikten sonra Haziran 2007'de onay almıştır (U.S. FDA, NDA 022081, Letairis Approval, 2007).

Avrupa İlaç Ajansı (EMA), Nisan 2008'de Ambrisentan'ı onaylamıştır. Japonya'da ise PMDA tarafından yürütülen değerlendirme süreçlerinin ardından 2010 yılı itibarıyla pazara girişi gerçekleşmiştir (European Medicines Agency (EMA), EPAR Summary for Letairis, 2008).

2019 yılında FDA, etkin maddeyi, aynı dozaj formunda, aynı etki gücünde ve aynı uygulama yoluyla içeren ambrisentan formülasyonunu onaylamıştır. Aynı zamanda, ilacın potansiyel yan etkilerine karşı Risk Azaltma Stratejileri (REMS) uygulamaya alınmıştır. Bu gelişme, ilacın daha geniş bir hasta grubuna ulaşmasını sağlamış ve tedaviye erişimi kolaylaştırmıştır (U.S. FDA, Generic Drug Approvals for Ambrisentan, 2019).

Ambrisentan, zaman içinde yalnız başına veya tadalafil gibi diğer PAH ilaçlarıyla kombine şekilde kullanılmaya başlanmıştır. Yapılan çalışmalar, kombinasyon tedavisinin etkinliğini artırabileceğini ve yaşam kalitesini iyileştirebileceğini göstermiştir (Galie vd., 2015).

Ambrisentan, endotelin A (ETA) reseptörlerine çok güçlü bir şekilde bağlanma isteği gösteren ve özellikle pulmoner arteriyel hipertansiyon (PAH) tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. İlaçların ne kadar etkili, güvenli ve kaliteli olduğunu belirleyebilmek için miktarlarının doğru bir şekilde ölçülmesi yani kantitatif analizlerin yapılması oldukça önemlidir. Bu bağlamda ambrisentanın tayini için çeşitli analitik yöntemler geliştirilmiştir. En yaygın kullanılan yöntemlerin başında yüksek performanslı sıvı kromatografisi (HPLC) gelmektedir.

HPLC yöntemi, ambrisentanin tayininde en çok tercih edilen yöntemlerden biridir. Bu yöntemde genellikle ters faz (RP-HPLC) sistemler tercih edilir. C18 kolonlar yaygın olarak kullanılır ve hareketli faz olarak genellikle asidik pH'ta hazırlanmış su– organik çözücü (metanol veya asetonitril) karışımları kullanılır. Ambrisentanin analitik tayini sırasında, UV dedektörler kullanılarak 245–260 nm dalga boyu aralığında maksimum ışık soğurma gösterdiği için bu özellikten yararlanılarak miktar tayini gerçekleştirilir.

Ayrıca HPLC yöntemi, sadece saf etkin madde analizinde değil, formülasyon ürünlerinin kontrolünde, stabilite çalışmalarında ve farmakokinetik analizlerde de yaygın şekilde kullanılmaktadır. Validasyon parametreleri (doğrusallık, hassasiyet, tekrarlanabilirlik, özgüllük) açısından oldukça güvenilir sonuçlar verir (Ravi vd., 2013).

Ambrisentanin biyolojik örneklerdeki (plazma, serum, idrar gibi) miktarının doğru ve hassas şekilde belirlenmesi amacıyla sıklıkla sıvı kromatografi ile kütle spektrometrisinin birlikte kullanıldığı sıvı kromatografi–tandem kütle spektrometrisi (LC-MS/MS) yöntemi tercih edilmektedir. Bu yöntem, çok düşük konsantrasyonlarda bile ambrisentanin yüksek hassasiyetle saptanmasını sağlar. Özellikle farmakokinetik çalışmalar, ilaç düzeyi takibi ve toksisite değerlendirmeleri gibi hassas analizlerin gerektiği durumlarda LC-MS/MS yöntemi vazgeçilmez bir yöntem olarak tercih edilmektedir (Kaur vd., 2012).

Spektrofotometrik yöntemlerde ambrisentanin UV-spektral özellikleri nedeniyle, bazı çalışmalarda basit spektrofotometrik yöntemlerle de tayini gerçekleştirilmiştir. Özellikle saf madde analizlerinde veya hızlı tarama gerektiğinde bu yöntemler ekonomik ve pratik çözümler sunabilir. Ancak kompleks matrislerde (örneğin biyolojik sıvılar veya formülasyonlar) HPLC veya LC-MS/MS kadar seçici değildir (European Medicines Agency(EMA), 2017).

Kapiler Elektroforez (CE) yöntemi daha az yaygın olmakla birlikte, bazı literatürlerde ambrisentanin kapiler elektroforez (CE) ile tayin edilebildiği bilinmektedir. Bu yöntem, düşük çözücü tüketimi ve hızlı analiz süresi avantajlarına sahiptir. Özellikle çevresel analizlerde veya ileri düzey farmasötik kalite kontrol çalışmalarında tercih edilebilir (U.S. Food and Drug Administration (FDA), 2015).

Stabilite göstergeli tayin yöntemlerinde stabilite çalışmaları sırasında, ambrisentanin bozunma ürünlerinin de tespit edilmesi gerektiğinden, stabilite göstergeli doğruluğu, tekrarlanabilirliği, özgüllüğü, doğrusal aralığı gibi özelliklerinin uluslararası

kılavuzlara uygun şekilde test edilip onaylandığı HPLC yöntemleri geliştirilmiştir. Bu yöntemlerde, ilaç çeşitli stres koşullarına (ışık, sıcaklık, asit, baz, oksidan) maruz bırakılarak olası bozunma ürünleri analiz edilir. Bu analizler sayesinde ilacın raf ömrü ve uygun saklama koşulları belirlenebilir (Ravi vd., 2013).

Ambrisentan bileşiğinin  $pK_a$  analizlerine ilişkin literatür çalışmaları incelendiğinde bu değerin nasıl elde edildiğiyle ilgili bir literatür olmadığı ancak sadece literatür içinde verilen değerleri incelenmiştir. Bununla ilgili çalışmalar aşağıda verilmiştir.

Angus ve arkadaşları yaptıkları çalışmada bosentan, masitentan ve ambrisentanın organ banyolarında insan pulmoner ve radial arterlerinin izole halka segmentlerinde (cerrahi işlemlerden atılan) fonksiyonel  $K_b$  değerlerini belirlemiş ve bu  $K_b$  değerlerini literatürde bildirilen bu ilaçların plazma düzeyleriyle karşılaştırmışlardır. Bu çalışmada bosentan için  $pK_b$  değeri radial aterde  $6,04 \pm 0,10$ , pulmoner aterde  $6,28 \pm 0,13$  olarak hesaplanmıştır. Ambrisentan için  $pK_b$  değeri radial aterde  $6,96 \pm 0,10$ , pulmoner aterde  $7,38 \pm 0,13$  olarak hesaplanmıştır. Bu çalışmada bilgisayar tabanlı nonlinear bir regresyon programı ile hesap yapılarak bu sonuçlara ulaşılmıştır (Angus vd., 2017).

Iglarz ve arkadaşları masitentanın farmakolojisi üzerine yaptıkları araştırmada masitentanın  $pK_a$  değerini spektrofotometrik yöntemle 6,2 olarak bulmuşlardır. Bu çalışmada bosentan için  $pK_a$  değerini 5,1; ambrisentan için  $pK_a$  değerini 3,5 olarak vermiştir (Iglarz vd., 2008).

Bu literatür çalışmalarından ambrisentan için  $pK_a$  değeri 3,5 ile 6,96 aralığında olduğu görülmektedir. Ancak  $pK_a$  değerinin tayinine ilişkin herhangi bir veri bulunmamaktadır. Dolayısıyla bu ilaç bileşiklerinin ilaç tabletlerinden HPLC yöntemi kullanılarak yapılan analizleri incelenmiş böylece yapılacak olan bu çalışma için uygun mobil faz ve kolon seçenekleri detaylı bir şekilde incelenmiştir. Bu literatürler Çizelge 1.3'te çalışma koşullarının kolon, mobil faz, akış hızı, dedektör gibi parametreleri dikkate alınarak özetlenmiştir. Ambrisentan bileşiğinin HPLC metodu ile tayinine ilişkin çalışmalar Çizelge 1.3'te verilmiştir.

**Çizelge 1.3.** Ambrisentan bileşiğinin HPLC metodu ile analizlerine ilişkin parametreler

| Çalışılan Bileşik | Kolon                                                                            | Mobil faz                                                                                                                                                                                                                                        | Akış Hızı | Dedektör      | Referans                  |
|-------------------|----------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|---------------|---------------------------|
| Ambrisentan       | Fortis C18, 250 mm × 4.6 mm, 5 µm                                                | Mobil faz A: 32% MeCN ve 68% suda KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (0.02 mol/L, pH 3.0 e ayarlı),<br>Mobil faz B: MeCN.<br>Gradient program: (zaman (dk))% B: 0/0, 10/0, 20/50, 35/50 ve 45/0).<br>Kolon sıcaklığı 30°C, analiz süresi 45 dk'dır. | 1 mL/dk   | UV 220 nm     | (Feng vd., 2019)          |
| Ambrisentan       | SunFire C18 150 mm x 4.6 mm ID, 3.5 µm                                           | Mobil faz A: 10 mM potasyum dihidrojen fosfat (pH 2.5'a ayarlı orto-fosforik asit ile),<br>Mobil faz B: ACN:MeOH (95:5, v/v)<br>Gradient program: Zaman (dk)% çözücü B, 0/20, 17/80, 20/80, 25/90, 30/90, 31/20.<br>Kolon sıcaklığı 30°C.        |           | UV 225 nm     | (Narayana vd., 2014).     |
| Ambrisentan       | Kromasil C18 250x4.6 mm, 5 mm                                                    | Mobil faz A: 0.02 M sulu amonyum fosfat (pH 3'e formik asitle ayarlı)<br>Mobil Faz B: ACN.<br>Gradient program: Zaman (dk)% çözücü B: 0/20, 5/40, 20/85, 30/20<br>Kolon sıcaklığı 25°C, enjeksiyon hacmi 20 µLdir.                               | 1 mL/dk   | UV 262 nm     | (Satheeshkumar vd., 2014) |
| Ambrisentan       | Agilent Zorbax C18 (250 mm × 4.6 mm I.D., 5 µm)                                  | Mobil Faz A: 0.1M Potasyum dihidrojen fosfat tamponu (pH 4.4 Ortofosforik asit)<br>Mobil Faz B: Metanol (30:70 v/v)                                                                                                                              | 1 mL/dk   | PDA 210 nm    | Venkata vd., 2014).       |
| Ambrisentan       | Phenomenex C18 (250 × 4.6mm, 5µm)                                                | Mobil Faz A: Ortofosforik asit (0.05 %v/v):<br>Mobil Faz B: Metanol (20:80 %v/v)                                                                                                                                                                 | 1 mL/dk   | PDA 262 nm    | Balakrishna vd.,2013).    |
| Ambrisentan       | Sun Fire C18 (150 mm x 4.6 mm ID 3.5 mm)                                         | Mobil Faz A: 10 mM Potasyum dihidrojen fosfat tamponu (pH 2.5 Ortofosforik asit,<br>Mobil Faz B: Metanol (95:5, v/v)                                                                                                                             | 1 mL/dk   | PDA 225 nm    | Narayana vd., 2014).      |
| Ambrisentan       | WELCHROM C-18 (4.6 x 250 mm, 5 µm)                                               | 10mM Fosfat tamponu (pH 6.0): Asetonitril (50:50, v/v)                                                                                                                                                                                           | 1.2 mL/dk | UV 226 nm     | Karthikeyan vd.,2015).    |
| Ambrisentan       | Phenomenex Luna C18 (250 × 4.6 mm, 5 µm)                                         | 0.02 M Amonyum asetat tamponu (pH = 4.2), ve Asetonitril 52:48 (v/v)                                                                                                                                                                             | 1.0 mL/dk | PDA 215 nm    | Nazeerunnisa vd., 2015).  |
| Ambrisentan       | Phenomenex C18 (150 × 4.6 mm, 5 µm)                                              | 10mM Amonyum asetat: Asetonitril (65:35% V/V)                                                                                                                                                                                                    | 1.0 mL/dk | UV 262 nm     | Sai vd., 2016).           |
| Ambrisentan       | Agilent XDB-C18 (150 × 4.5mm, 5µ)                                                | 10 mM Amonyum ethanol (pH-5.2 asetik asitle ayarlanmış): Asetonitril                                                                                                                                                                             | 1.0 mL/dk | 289 nm        | Kondila vd., 2015).       |
| Ambrisentan       | C18 inertsil column (250 mm × 4.6 mm, 5 µm)                                      | Su:ACN (30:70)                                                                                                                                                                                                                                   | 1.2 mL/dk | PDA 264 nm    | Singla vd., 2014).        |
| Ambrisentan       | Hypersil GOLD C18 column (150 mm × 4.6 mm internal diameter, 5 µm particle size) | Metanol: Su: Asetonitril 40:40:20 (v/v/v)                                                                                                                                                                                                        | 0.5 mL/dk | UV/Vis 260 nm | Patel vd., 2014).         |

Literatür verilerinden kolon olarak genellikle C18 kolonlarının tercih edildiği ve mobil faz olarak asetonitril/metanolle çalışıldığı görölmektedir.

Özetle, ambrisentanın tayininde en yaygın kullanılan yöntem HPLC olup, biyolojik örneklerde LC-MS/MS yöntemi tercih edilmektedir. Bunun yanında, spektrofotometrik ve elektroforetik yöntemler de çeşitli durumlarda kullanılabilir. Geliştirilen bu analitik yöntemler, ilacın kalite kontrolü, biyoyararlanımı ve stabilite analizleri açısından büyük önem taşır.



## 2 MATERYAL VE YÖNTEM

Bu bölümde, yapılan deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasallar ve yöntem hakkında bilgi verilmiştir.

### 2.1 Kullanılan Kimyasal Malzemeler

Deneysel çalışmalarda kullanılan kimyasal maddeler, analitik veya HPLC saflıktadır. Bu tezde çalışılan ambrisentan bileşiğin kimyasal formülü  $C_{22}H_{22}N_2O_4$  olup molekül ağırlığı 378,42 g/mol'dür. CAS No'su 177036-94-1 ve IUPAC adı (2S)-2-(4,6-dimetilpirimidin-2-yl) oksi-3-metoksi-3,3-difenilpropanoik asittir.

Kromatografik çalışmada kullanılan kimyasal malzemeler ve bunların kullanım amaçları Çizelge 2.1'de listelenmiştir.

**Çizelge 2.1.** Kromatografik Çalışmada Kullanılan Kimyasal Malzemeler ve Kullanım Amaçları

| Adı                                     | Kullanım Amacı                           | Temin Edildiği Firma              |
|-----------------------------------------|------------------------------------------|-----------------------------------|
| Ambrisentan                             | HPLC ile $pK_a$ tayini yapılan bileşik   | Sigma-Aldrich                     |
| Asetonitril                             | Mobil faz için kullanılan organik çözücü | Sigma-Aldrich                     |
| Sodyum hidroksit                        | Mobil faz pH'sının ayarlanmasında        | Merck                             |
| Urasil                                  | Kolonda tutunmayan tür                   | Sigma-Aldrich                     |
| Fosforik asit                           | Mobil faz pH'sının ayarlanmasında        | Riedel-de Haën                    |
| pH 4,01; 7,01; 10,01 tampon çözeltileri | Elektrot kalibrasyonunda                 | Hanna HI 221 (carrollton, Teksas) |

### 2.2 Kullanılan Cihazlar

#### 2.2.1 Yüksek Performans Sıvı Kromatografisi Cihazı

Bu tez çalışmasında, Agilent 1260 Infinity marka Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografi cihazı kullanılmıştır. Sistemde, 1260 Quat Pump VL pompa, 1260 DAD VL dedektör, 1260 ALS otomatik numune enjeksiyon kısmı bulunmaktadır.

#### 2.2.2 pH/İyon Metre

Bu tez çalışmasında kullanılacak mobil fazın pH ölçümlerinde Hanna HI 1131 cam elektrodu ile Hanna HI 221 pH metre cihazından yararlanılmıştır. Elektrot günlük

olarak kullanılmadan önce pH 4,01; 7,01 ve 10,01 değerlerine kalibre edilerek pH ayarlaması yapıldı. Mobil faz pH'ının ayarlanması esnasında sıcaklık  $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ 'de sabit tutulmuştur.

### 2.2.3 HPLC'de Kullanılan Kolon Seçimi

Kolon seçimi HPLC analizlerinde hem ayırma işleminde hem de alıkonma zamanının belirlenmesinde en kritik bileşenlerinden biridir. Analiz sonuçlarının tekrarlanabilirliği, hassasiyeti ve doğruluğu doğru kolon seçimi ile ilgili bir bileşendir.

Kolonun doğru seçilmesi için öncelikle çalışılacak bileşiğin polar ya da apolar olup olmadığı, molekül ağırlığı, iyonik ya da nötr olup olmadığı, hangi çözücülerde çözündüğü gibi kimyasal özelliklerinin iyi analiz edilmesi gerekir. Apolar bileşikler için C18 ve C8 gibi ters faz kolonlar, polar bileşikler için Hidrofilik Etkileşim (HILIC) veya Normal Faz (Silika, Amin, CN) kolonlar tercih edilmektedir. Kolonun partikül boyutu, gözenek çapı, kolon boyutu gibi fiziksel özelliklerde iyi bir ayırım ve analiz süresi için incelenmesi gereken özellikler arasında yer alır.

Kolonun pH dayanıklılığı da çalışılacak ortamın pH'ına göre değişmektedir. Standart C18 kolon (pH 2-8) ile düşük pH'lı mobil fazla, özel stabilize edilmiş C18 kolonlar (pH 1-12) ile yüksek pH'lı mobil fazla çalışılabilmektedir. Çalışılacak mobil fazın kolon ile uyumu da oldukça önemlidir. Örneğin su ile karışabilen çözücülerle hazırlanan mobil fazla çalışırken C18 ve C8 kolon gibi ters faz kolonlar uygundur. Kolonun dayanıklılığı ve ömrü, çalışılan bileşiğin kimyasal özellikleri, pH, sıcaklık ve yöntemdeki akış hızı gibi faktörlere bağlıdır.

Tüm bu özellikler değerlendirildiğinde bu çalışmada YMC Triart C18 ( $15 \times 0,46$  cm I.D.,  $3 \mu\text{m}$ ) ters faz sıvı kromatografi kolonu kullanılmıştır. Bu kolon yüksek stabiliteye sahip hibrit silika bazlı bir kolon olması, pH aralığının geniş olması, %100 su ortamında çalışmaya imkan verebilmesi, mükemmel pik şekli verebilen asidik ve bazik fonksiyonel gruba sahip bileşiklerin analizleri için uygun olduğundan tercih edilmiştir.

### 2.2.4 Çözeltilerin Hazırlanması

#### 2.2.4.1 Mobil Fazların Hazırlanması

**%40 (h/h) Asetonitril-Su İkili Karışımı:** %40 Asetonitril-su karışımında hacim büzülmesini önlemek için 60 mL saf su üzerine 40 mL asetonitril eklenerek 100 mL'lik stok çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltiye, 25 mM fosforik asit (%85 (a/a); 98 g/mol; 1,71

g/mL) eklenmiş ve 1 M NaOH ilavesiyle pH değeri 2,5 ila 7,5 arasında değişen mobil faz çözeltileri hazırlanmıştır.

**%45 (h/h) Asetonitril-Su İkili Karışımı:** %45 Asetonitril-su karışımında hacim büzülmesini önlemek için 55 mL saf su üzerine 45 mL asetonitril eklenerek 100 mL'lik stok çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltiye, 25 mM fosforik asit (%85 (a/a); 98 g/mol; 1,71 g/mL) eklenmiş ve 1 M NaOH ilavesiyle pH değeri 2,5 ila 7,5 arasında değişen mobil faz çözeltileri hazırlanmıştır.

**%50 (h/h) Asetonitril-Su İkili Karışımı:** %50 Asetonitril-su karışımında hacim büzülmesini önlemek için 50 mL saf su üzerine 50 mL asetonitril eklenerek 100 mL'lik stok çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltiye, 25 mM fosforik asit (%85 (a/a); 98 g/mol; 1,71 g/mL) eklenmiş ve 1 M NaOH ilavesiyle pH değeri 2,5 ila 7,5 arasında değişen mobil faz çözeltileri hazırlanmıştır.

#### 2.2.4.2 İlaç Çözeltilisinin Hazırlanması

Kromatografik analiz kapsamında, ambrisentan saf standardından 0,0010 g tartılarak 10 mL mobil fazda çözölmüş ve böylece 100 ppm derişiminde stok çözeltisi hazırlanmıştır. Hazırlanan stok çözeltiden 20 µL hacminde enjeksiyonlar sıvı kromatografi cihazına uygulanmış ve iki tekrar yapılarak alıkonma zamanlarının ortalaması hesaplanmıştır.

#### 2.2.4.3 Urasil Çözeltilisinin Hazırlanması

Kapasite faktörünün belirlenmesi için %0,01 (a/h) derişimli urasil çözeltisi mobil fazda hazırlanmış ve sıvı kromatografi cihazına 20 µL enjekte edilmiştir. Kolonda tutunmayan bileşik için alıkonma zamanı (tR) kaydedilmiş ve analizler 254 nm dalga boyunda gerçekleştirilmiştir.

### 2.3 Yöntem

Analitik saflıkta temin edilen ambrisentan bileşiginden 0,0010 g tartılarak, 10 mL mobil fazda çözölmüş ve 100 ppm'lik stok çözelti hazırlanmıştır. Bu çözeltiden 20 µL sıvı kromatografi cihazına enjekte edilerek bileşik için iki kez enjeksiyon yapılmış ve elde edilen verilerin ortalaması alınarak alıkonma zamanları belirlenmiştir.

Ambrisentan'ın iyonlaşma sabitlerinin tayini, asetonitril-su ikili karışımı kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Analizler 37°C kolon sıcaklığı ve 1 mL/dakika akış hızı koşullarında yürütölmüştür. Ambrisentan için 260 nm, urasil için 254 nm dalga boyunda

ölçümler yapılmıştır. İyonlaşma sabiti hesaplamalarında, %40, %45 ve %50 (h/h) asetonitril-su ikili karışımları kullanılmıştır.

HPLC yöntemiyle iyonlaşma sabitlerinin belirlenmesi çalışmasında, üç farklı asetonitril-su ikili karışımı kullanılmıştır. Elektrot pH ölçümleri için, pH 4,01; 7,01 ve 10,01 tampon çözeltileri ile kalibre edilmiştir. Okunan değerlerin kararlılığını sağlamak için, elektrot su-organik çözücü karışımında bekletilmiştir. Mobil fazın pH ayarlamaları, her bir ortam için 2,5 ile 7,5 arasında olacak şekilde gerçekleştirilmiştir. Bu işlemde, tampon aralığı dikkate alınarak 25 mM o-fosforik asit kullanılmıştır.

HPLC analizinde kapasite faktörlerinin belirlenmesi için  $t_0$  değeri, urasilin sudaki %0,01 (a/h) derişimindeki çözeltisi kullanılarak hesaplanmıştır. Çalışma kapsamında hem urasilin hem de ambrisentan bileşığının alıkonma zamanları, ikişer enjeksiyon yapılarak belirlenmiş ve elde edilen verilerin ortalaması alınarak kapasite faktörleri (k) hesaplanmıştır.

### 3 BULGULAR VE TARTIŞMA

Bu çalışmada, ambrisentan bileşiğinin  $pK_a$  değerleri %40, %45 ve %50 (v/v) asetonitril-su karışımlarında HPLC yöntemiyle belirlenmiştir. Çalışmalar 37°C’de yürütülmüş ve alıkonma zamanı – pH ilişkisini gösteren tablolar oluşturulmuştur. Elde edilen veriler, NLREG programı ile analiz edilerek  $t_R$ -pH grafikleri oluşturulmuştur.

#### 3.1 Ambrisentan Bileşiği İçin Elde Edilen Kromatografik Veriler

Ambrisentan bileşiğinin analizi için, %40, %45 ve %50 (v/v) asetonitril içeren asetonitril-su ikili karışımları kullanılarak farklı mobil fazlar hazırlanmıştır. Mobil fazların pH değerleri 2,5-7,5 olarak ayarlanmış ve analiz sonucunda elde edilen alıkonma zamanı değerleri Çizelge 3.1’de sunulmuştur.

**Çizelge 3.1.** Ambrisentan bileşiğinin %40, %45 ve %50 (v/v) asetonitril içeren asetonitril-su ikili karışımlarındaki alıkonma zamanı değerleri

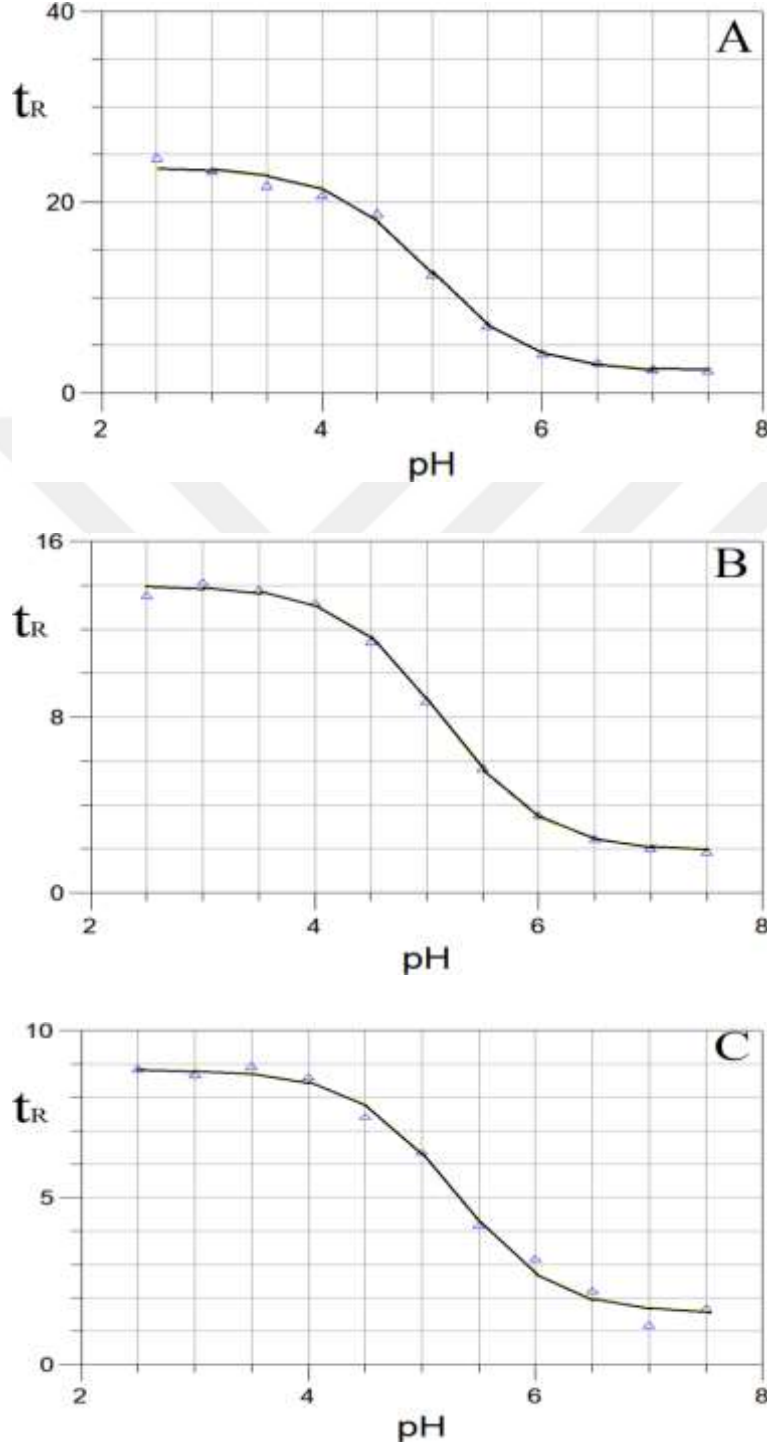
|     | %40 (v/v) ACN | %45 (v/v) ACN | %50 (v/v) ACN |
|-----|---------------|---------------|---------------|
| pH  | $t_R$         | $t_R$         | $t_R$         |
| 2,5 | 24,663        | 13,545        | 8,865         |
| 3,0 | 23,303        | 14,139        | 8,691         |
| 3,5 | 21,809        | 13,805        | 8,9495        |
| 4,0 | 20,747        | 13,216        | 8,607         |
| 4,5 | 18,863        | 11,432        | 7,432         |
| 5,0 | 12,454        | 8,750         | 6,363         |
| 5,5 | 7,118         | 5,674         | 4,185         |
| 6,0 | 4,215         | 3,540         | 3,175         |
| 6,5 | 3,215         | 2,487         | 2,210         |
| 7,0 | 2,513         | 2,056         | 1,812         |
| 7,5 | 2,341         | 1,887         | 1,671         |

Kapasite faktörleri (k) kolondan etkilenmeden çıkan urasil kullanılarak hesaplanmış ve Çizelge 3.2’de verilmiştir.

**Çizelge 3.2.** Ambrisentan bileşiğinin %40, %45 ve %50 (v/v) asetonitril içeren asetonitril-su ikili karışımlarındaki kapasite faktörü değerleri

|     | %40 (v/v) ACN | %45 (v/v) ACN | %50 (v/v) ACN |
|-----|---------------|---------------|---------------|
| pH  | k             | k             | k             |
| 2,5 | 16,794        | 8,858         | 5,495         |
| 3,0 | 15,645        | 9,268         | 5,362         |
| 3,5 | 14,735        | 9,025         | 5,547         |
| 4,0 | 13,904        | 8,612         | 5,301         |
| 4,5 | 12,522        | 7,308         | 4,437         |
| 5,0 | 7,455         | 4,794         | 3,655         |
| 5,5 | 3,103         | 3,136         | 2,061         |
| 6,0 | 2,036         | 1,569         | 1,323         |
| 6,5 | 1,316         | 0,807         | 0,614         |
| 7,0 | 0,799         | 0,493         | 0,327         |
| 7,5 | 0,681         | 0,374         | 0,222         |

%40, %45 ve %50 (v/v) asetonitril içeren asetonitril-su karışımları için pH- $t_R$  ilişkisini gösteren grafikler, non-lineer regresyon (NLREG) programı kullanılarak oluşturulmuş ve Şekil 3.1’de sunulmuştur.



**Şekil 3.1.** Ambrisentan bileşiğinin A) %40, B) %45, C) %50 asetonitril içeren asetonitril- su karışımlarındaki  $t_R$ -pH ilişkilerini gösteren NLREG grafikleri

Şekil 3.1, Çizelge 3.1 ve Çizelge 3.2’de görüldüğü gibi, mobil fazdaki asetonitril yüzdesinin artışı, bileşiğin alıkonma zamanında azalmaya neden olmuştur. Bu durum, ambrisentan bileşiğinin asidik fonksiyonel grubunun artan organik faz oranına karşı gösterdiği etkileşim değişimini yansıtmaktadır.

### 3.2 Ambrisentan Bileşiğinin Su Ortamındaki $pK_a$ Değerinin Hesaplanması

SWISS ADME programından elde edilen verilere göre, ambrisentan’ın Log S değeri -4,69 olup, sulu ortamda düşük çözünürlüğe sahip olduğunu gösterir. Ayrıca, Log P değeri 3,80 olup bileşiğin yüksek derecede lipofilik olduğunu, membran geçişinin iyi olabileceğini, ancak çözünürlük düşük olduğu için absorpsiyon sınırlı olabileceğini göstermektedir. Bu verilerin doğrultusunda, bileşiğin çözünürlüğü asetonitril-su karışımında sağlanmıştır. Ambrisentan’ın sulu ortamda  $pK_a$  değerinin belirlenmesi için, kullanılan asetonitril çözücüsünün çözeltideki dielektrik sabiti ( $\epsilon$ ) ve mol kesri ( $X_{ACN}$ ) değerleri dikkate alınmıştır.

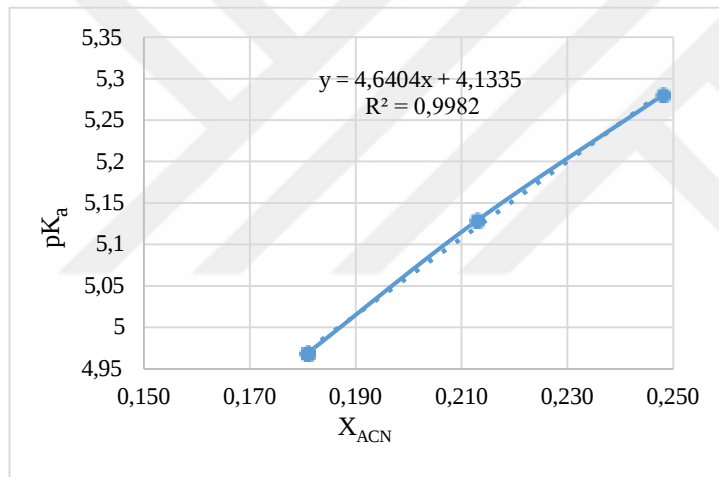
SWISS ADME bilgisayar üzerinde hesaplamalı simülasyon ve öngörü modelleri programı kullanılarak yapılan değerlendirmeler sonucunda, Ambrisentan bileşiğinin Log S (suda çözünürlük) değeri -4,69 olarak hesaplanmıştır. Bu değer, Ambrisentan’ın sulu ortamda düşük çözünürlük profiline sahip olduğunu ve biyoyararlanım açısından çözünürlüğe bağlı sınırlayıcı bir faktör oluşturabileceğini göstermektedir. Bunun yanı sıra, bileşiğin Log P (oktanol-sıvı su sisteminde lipofiliklik) değeri 3,80 olarak bulunmuştur. Bu yüksek lipofilik değer, ambrisentan’ın biyomembranlardan pasif difüzyon yoluyla geçişinin yüksek olabileceğini işaret etmekte, ancak suda düşük çözünürlük nedeniyle absorpsiyonun çözünürlükle sınırlanabileceği riskini ortaya koymaktadır.

Bu veriler doğrultusunda, analitik çalışmalar sırasında bileşiğin çözünürlüğünün artırılması ve  $pK_a$  tayininin daha sağlıklı yapılabilmesi amacıyla asetonitril-su ikili çözücü sistemi tercih edilmiştir. Kullanılan çözücü karışımlarında asetonitrilin dielektrik sabiti ( $\epsilon$ ) ve mol kesri ( $X_{ACN}$ ) değerleri dikkate alınarak, ortamın iyonlaşma dengesine etkisi kontrol altında tutulmuştur. Böylece, asetonitril içeriği arttıkça ortamın polaritesi ve iyonlaşabilirlik dengesi değiştiğinden, elde edilen  $pK_a$  değerleri bu çözücü sisteminin özelliklerine bağlı olarak değerlendirilmiştir. Çalışmada, elde edilen  $pK_a$  değerleri  $1/\epsilon - pK_a$  ve  $X_{ACN} - pK_a$  ilişkileri üzerinden incelenmiş, ortamın polaritesinin ve çözücü bileşiminin bileşiğin iyonlaşma davranışı üzerindeki etkisi detaylı olarak analiz edilmiştir.

### 3.2.1 Mol Kesri- pK<sub>a</sub> Metodu

Çözücünün mol kesri ( $X_{ACN}$ ) ile bileşiğin pK<sub>a</sub> değerinden elde edilen grafik, mikroyapı etkileri ve ortamın dielektrik özelliklerinin bileşiğin iyonlaşma dengesi üzerindeki etkisini analiz etmeye yardımcı olur. pK<sub>a</sub> değeri çözücüye bağlı olarak değiştiği için farklı çözücü oranlarında ölçülen pK<sub>a</sub> değerlerinden yola çıkarak saf su ortamındaki gerçek pK<sub>a</sub> değeri tahmin edilebilir. Ekstrapolasyon yöntemiyle,  $X_{ACN} \rightarrow 0$  olacak şekilde saf su ortamındaki pK<sub>a</sub> belirlenir.

Ambrisentan için, 37°C'de %45, %50 ve %55 (v/v) asetonitril derişimlerine sahip mobil fazlarda yapılan çalışmalarda, asetonitrilin mol kesri ( $X_{ACN}$ ) ile hesaplanan pK<sub>a</sub> değerlerinin doğrusal ilişkisi Şekil 3.2'de gösterilmiştir. Elde edilen doğrusal fonksiyonun kesim noktası, bileşiğin yapısındaki asidik fonksiyonel gruba ait su ortamındaki pK<sub>a</sub> değerlerini ortaya koymuştur.



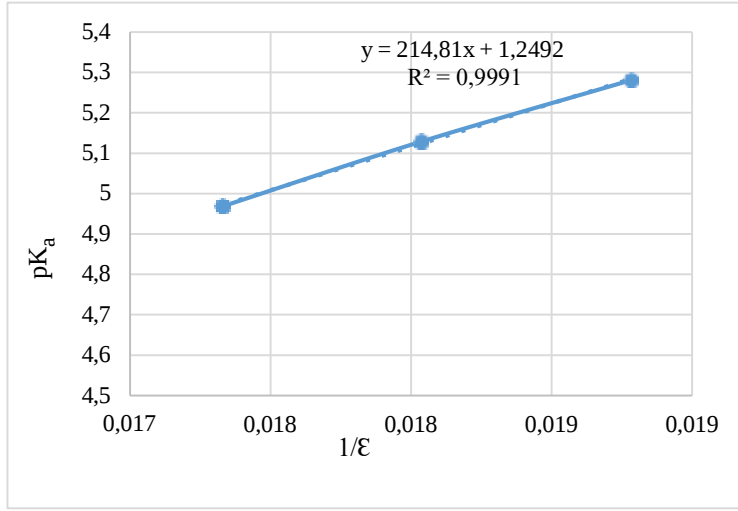
Şekil 3.2. Ambrisentan bileşiği için  $X_{ACN}$ -pK<sub>a</sub> ilişkisi

Asidik fonksiyonel grubu içeren bileşikler için bu doğrusal ilişki de eğim değerinin pozitif olması beklenmektedir. Ayrıca, elde edilen doğrusal fonksiyonun kesim noktası, bileşiğin su ortamındaki pK<sub>a</sub> değerini belirlemektedir.

### 3.2.2 Dielektrik Sabiti- pK<sub>a</sub> Metodu

Ambrisentan'ın 37°C'de %40, %45 ve %50 (v/v) derişimindeki asetonitril için  $1/\epsilon$  değerlerine karşı yapılan çalışmalarda sonucunda hesaplanan pK<sub>a</sub> değerleri Şekil 3.3'te sunulmuştur. Elde edilen doğrusal fonksiyonlarda, su ortamındaki  $1/\epsilon$  değeri yerine konularak ambrisentan'ın su ortamındaki pK<sub>a</sub> değeri hesaplanmıştır. Asetonitrilin dielektrik sabiti ( $\epsilon$ ) değerleri Barbosa ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmadan

hesaplanmıştır (Barbosa vd., 1997).



Şekil 3.3. Ambrisentan bileşiği için  $1/\epsilon$ - $pK_a$  ilişkisi

#### 4 SONUÇ VE ÖNERİLER

$pK_a$  değeri, bir bileşiğin asidik veya bazik özelliklerini belirler.

Ambrisentan gibi ilaçların  $pK_a$  değerini belirlemek, bileşiğin çözünürlük ve stabilite özelliklerini anlamak için önemlidir. Bu bilgi, bileşiğin biyolojik ortamda nasıl davranacağına dair ipuçları verir.  $pK_a$  değeri, bileşiğin çözünürlük özelliklerini etkiler. Bir bileşiğin çözünürlük davranışı, pH değiştikçe değişebilir, çünkü asidik veya bazik formu farklı çözünürlük özelliklerine sahip olabilir. Ambrisentan'ın  $pK_a$  değerini belirlemek, ilaç formülasyonlarında çözünürlük optimizasyonu yapılmasına olanak tanır ve böylece ilaç biyoyararlanımını artırabilir.

İlaçların farmasötik formülasyonları,  $pK_a$  değerlerine göre optimize edilir.  $pK_a$  değeri, hangi pH aralığında stabil olacağını ve hangi ortamda en iyi çözünürlüğe sahip olacağını belirler. RP-HPLC ile  $pK_a$  tayini, formülasyon aşamasında hangi stabilite koşullarının gerektiğini belirlemeye yardımcı olur.

$pK_a$ , bir bileşiğin farmakokinetik özelliklerini (örneğin, emilim, dağılım, metabolizma ve atılım) etkileyebilir.  $pK_a$  değerine göre ambrisentan'ın biyolojik ortamda hangi formunun baskın olduğu belirlenebilir. Bu da ilacın etkisini, biyolojik yarı ömrünü ve hedef bölgeye ulaşma oranını etkileyebilir.

RP-HPLC, özellikle bileşiklerin farklı pH ortamlarındaki ayrımını sağlayarak, asidik ve bazik formların farklı çözünürlük davranışlarını analiz etmekte çok etkilidir. RP-HPLC ile yapılan  $pK_a$  tayini, ambrisentan gibi bileşiklerin farklı formlarının ayrılması ve bu formların her birinin tayin edilmesi için kullanılır. Bu, doğru dozaj formülasyonları ve kalite kontrol testleri için gereklidir. RP-HPLC, yüksek doğruluk ve hassasiyetle bileşenlerin ayrılmasını sağlayan bir tekniktir. Ambrisentan'ın  $pK_a$  değeri, RP-HPLC ile kesin bir şekilde tayin edildiğinde, ilaç üretiminde kalite kontrol süreçleri için önemli bir parametre olarak kullanılabilir. Bu, ilaçların tutarlı ve güvenli bir şekilde üretilmesini sağlar. Ambrisentan bileşiğinin  $pK_a$  değerinin RP-HPLC ile tayini, ilaç formülasyonunun optimize edilmesine, biyoyararlanımının artırılmasına, stabilite çalışmalarına ve farmasötik kalite kontrolüne önemli katkılar sağlar. Bu yöntem, ambrisentan'ın pH'a bağlı olarak farklı iyonize formlarının tespit edilmesi ve bu formasyonların ayrılmasında etkili bir araçtır.

Bu çalışmada Ambrisentan yapısında bulunan karboksilik asitin  $pK_a$  değeri tayin edilmiştir. Bu grup zayıf bir asittir ve fizyolojik pH ( $\sim 7.4$ ) seviyesinde deprotonlanmış (anyon formda) halde bulunur. Ambrisentan bileşiği için  $1/\epsilon$ - $pK_a$  ilişkisinden elde edilen  $pK_a$  değeri 4,145;  $X_{ACN}$ - $pK_a$  ilişkisinden elde edilen  $pK_a$  değeri ise 4,134 olarak hesaplanmıştır. Her iki yöntemden elde edilen değerlerin farkı yalnızca 0,011 birimdir, bu da bu yaklaşımların birbirini desteklediğini göstermektedir. Teorik  $pK_a \approx 4,14$ , deneysel  $pK_a \approx 4,4$  olduğu düşünüldüğünde, bu hesaplamalar oldukça başarılı ve güvenilir kabul edilebilir. Sonuçlar, bu yaklaşımların benzer bileşikler için kullanılabilirliğini desteklemektedir. Ambrisentan'ın yapısında bazik özellik gösterebilecek azot atomları bulunsun da, bu atomlar genellikle aromatik sistemlerle konjuge olduğu için bazikliği düşüktür dolayısıyla bu yöntemle tayin edilememiştir. Teorik değerlerin deneysel veriye göre hafif düşük kalması; çözücü etkisi, rezonans ve indüktif etkilerin modellemelerde tam olarak yansıtılamamasından kaynaklanabilir. Sonuç olarak, her iki yaklaşım da Ambrisentan'ın karboksilik asit grubunun asidik karakterini başarılı şekilde öngörebilmektedir.

## KAYNAKLAR

- Albert, A., & Serjeant, E. P. (1984). *The Determination of Ionization Constants*. Springer.
- Angus, J.A., Soeding, P.F., Hughes, R.J.A., Wright, C.E. (2017). Functional estimation of endothelin-1 receptor antagonism by bosentan, macitentan and ambrisentan in human pulmonary and radial arteries in vitro. *European Journal of Pharmacology*, 804,111-116.
- Avdeef, A. (2003). *Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State*. Wiley-Interscience.
- Avdeef, A. (2012). *Absorption and Drug Development: Solubility, Permeability, and Charge State*. Wiley.
- Avdeef, A., Comer, J. E. A., & Thomson, S. J. (1993). pH-metric log P. 3. Glass electrode calibration in methanol-water, applied to pKa determination of water-insoluble substances. *Analytical Chemistry*, 65(1), 42–49.
- Bakshi, M., & Singh, S. (2002). Development of validated stability-indicating assay methods—critical review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 28(6), 1011–1040.
- Balakrishna, M., Unnisa, A., Reddy, P., Suma, C.H. (2013). RP-HPLC-PDA method for the analysis of ambrisentan in bulk drug and pharmaceutical dosage forms. *International Journal of Chemical and Pharmaceutical Sciences*, 4(4), 45-50.
- Barbosa, J., Toro, I., Sanz-Nebot, V. 1997. Acid-Base Behaviour of Tripeptides in Solvents Used in Liquid Chromatography. Correlation Between pK Values and Solvatochromic Parameters of Acetonitrile-Water Mixtures. *Analytica Chimica Acta*, 347(3), 295-304.
- Beghetti, M., et al. (2020). Safety and efficacy of the endothelin receptor antagonist macitentan in pediatric pulmonary hypertension. *Pediatric Pulmonology*, 55(12), 3406–3414.
- Block, R. J., Durrum, E. L., & Zweig, G. (1958). *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*. Academic Press.

- Bosch, E., Rosés, M., & Ràfols, C. (1998). Determination of the  $pK_a$  of water-insoluble drugs in organic solvent–water mixtures by a chromatographic method. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 17(3), 423–428.
- Carr, R. A., & Felder, C. C. (1996). Chromatographic techniques for the determination of acid dissociation constants. *Analytical Chemistry*, 68(17), 302A–309A.
- Dettmer, K., Aronov, P. A., & Hammock, B. D. (2007). *Mass spectrometry-based metabolomics*. *Mass Spectrometry Reviews*, 26(1), 51–78. <https://doi.org/10.1002/mas.20108>
- Drugs.com. (2025, Mart). *Letairis (ambrisentan) FDA Approval History*. <https://www.drugs.com/history/letairis.html>
- Feng, F.W., Zhuo, S.M., Zhang, F.L., (2019). Isolation, identification, characterization, synthesis and quality control strategy of new process-related impurities in ambrisentan, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 165, 325-337.
- Galiè N, (2008). Ambrisentan for the treatment of pulmonary arterial hypertension: results of the ARIES studies. *Circulation*. 117(23):3010-3019.
- Galiè, N., Humbert, M., Vachieri, J. L., Gibbs, S., Lang, I., Torbicki, A., & Hoeper, M. (2015). 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *European Heart Journal*, 37(1), 67–119.
- Galie, N. et al. (2015). *Initial Use of Ambrisentan plus Tadalafil in Pulmonary Arterial Hypertension*. NEJM.
- Galiè, N., Humbert, M., Vachieri, J. L., et al. (2015). 2015 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *European Heart Journal*, 37(1), 67–119.
- Gilead (2006,). *Gilead Submits New Drug Application To U.S. FDA for Ambrisentan for the Treatment of Pulmonary Arterial Hypertension*. <https://www.gilead.com/news/news-details/2006/gilead-submits-new-drug-application-to-us-fda-for-ambrisentan-for-the-treatment-of-pulmonary-arterial-hypertension>.
- Güçlü, K. (2015). *Enstrümantal Analiz Yöntemleri*. Palme Yayıncılık.

- Hoeper, M. M., Bogaard, H. J., Condliffe, R., Frantz, R., Khanna, D., Kurzyna, M., ... & Badesch, D. (2013). Definitions and diagnosis of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(25 Suppl), D42–D50.
- Hoeper, M. M., et al. (2006). Incidence and prevalence of pulmonary arterial hypertension: a systematic review. *European Respiratory Journal*, 30(6), 1047–1057.
- Humbert M, et al. (2004). Endothelin receptor antagonists in pulmonary arterial hypertension. *European Respiratory Journal*, 23(3), 358–363.
- Humbert M, Sitbon O, Simonneau G. (2004). Treatment of pulmonary arterial hypertension. *The New England Journal of Medicine*, 351(14), 1425–1436.
- Humbert, M., Kovacs, G., Hoeper, M. M., Badagliacca, R., Berger, R. M. F., Brida, M., ... & Rosenkranz, S. (2022). 2022 ESC/ERS Guidelines for the diagnosis and treatment of pulmonary hypertension. *European Heart Journal*, 43(38), 3618–3731.
- Humbert, M., Sitbon, O., Chaouat, A., et al. (2006). Pulmonary arterial hypertension in France: results from a national registry. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173(9), 1023–1030.
- ICH Q2(R1) Guidelines (2005). *Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology*. International Council for Harmonisation.
- ICH Q3C (R6) (2016). *Guidelines. Impurities: Guideline for Residual Solvents*. International Council for Harmonisation,
- Iglarz, M., Binkert, C., Morrison, K., Fischli, W., Gatfield, J., Treiber, A., Weller, T., Bolli, M.H., Boss, C., Buchmann, S., Capeleto, B., Hess, P., Qiu, C., Clozel, M. (2008). Pharmacology of Macitentan, an Orally Active Tissue-Targeting Dual Endothelin Receptor Antagonist. *American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 327 (3), 736-745.
- Karthikeyan, R., Koushik, O.S., Babu, P.S. (2015). Simple validated RP-HPLC method for estimation of ambrisentan in pharmaceutical dosage forms. *International Bulletin of Drug Research*, 5(9), 1-18.
- Kaur, H., et al. (2012). Validated LC–MS/MS method for the quantification of ambrisentan in human plasma and its application to a pharmacokinetic study. *Biomedical Chromatography*, 26(3), 333–339.

- Kaymaz, C., Mutlu, B., Pınarbaşı, E., et al. (2013). Turkish nationwide registry on pulmonary arterial hypertension: First results. *Anatolian Journal of Cardiology*, 13(6), 523–530. <https://doi.org/10.5152/akd.2013.163>
- Kazakevich, Y., & Lobrutto, R. (2007). *HPLC for Pharmaceutical Scientists*. Wiley-Interscience.
- Kohan, D. E., et al. (2020). *Endothelin Receptor Antagonists: Status Quo and Future Perspectives*. *Kidney International*, 97(5), 861–873.
- Kondila, S.K., Sujana, K., Prameela, R.A. (2015). Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for estimation of ambrisentan and its process-related impurities in bulk and pharmaceutical dosage forms. *Indian Drugs*. 52(12), 34-41.
- Lemiere, F., Meune, C., Chabi, M. L., Gressin, V., Le Hello, C., & Ménard, J. (2014). Pharmacokinetics and safety of ambrisentan in healthy subjects: Results of a phase I, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Clinical Pharmacokinetics*, 53(3), 229–238.
- McLaughlin VV, McGoon MD. (2006). Pulmonary arterial hypertension: clinical evaluation and management. *Circulation*, 114(13), 1417–1431.
- McLaughlin, V. V., Gaine, S. P., Howard, L. S., Leuchte, H. H., Mathier, M. A., Mehta, S., ... & Sitbon, O. (2013). Treatment goals of pulmonary hypertension. *Journal of the American College of Cardiology*, 62(25 Suppl), D73–D81.
- Miller, J. N., & Miller, J. C. (2010). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*. Pearson Education.
- Narayana, M.B.V., Chandrasekhar, K.B., Rao, B.M. (2014). A validated specific stability-indicating RP-HPLC assay method for ambrisentan and its related substances. *Journal of Chromatographic Science*, 52(8), 818-825.
- Nazeerunnisa, M., Garikapati, L., Bethanabhatla, S.S. (2015). Development and validation of a stability-indicating RP-HPLC method for determination of ambrisentan in bulk drugs. *Malaysian Journal of Analytical Sciences*. 19(3), 595-602.

- Niessen, W. M. A. (2006). *Liquid Chromatography–Mass Spectrometry*. CRC Press.
- Olschewski H, Simonneau G, Galie N, et al. (2007). Inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension. *Pharmacology & Therapeutics*, 117(2), 241–258.
- Patel, J.K., Patel, N.K. (2014). Stability-indicating RP-HPLC method for the determination of ambrisentan and tadalafil in pharmaceutical dosage form. *Scientia pharmaceutica*. 82(4), 749-764.
- Perrin, D. D., Dempsey, B., & Serjeant, E. P. (1981). *pK<sub>a</sub> Prediction for Organic Acids and Bases*. Chapman and Hall.
- Poole, C. F. (2003). *The Essence of Chromatography*. Elsevier.
- Ràfols, C., & Bosch, E. (2012). Determination of pK<sub>a</sub> by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography*, 1267, 1–18.
- Ràfols, C., & Bosch, E. (2012). pK<sub>a</sub> determination of ionizable compounds in organic solvent–water mixtures. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 37, 34–51.
- Ravi, P. R., Ganga, S., & Saha, R. N. (2013). Development and validation of stability indicating RP-HPLC method for estimation of ambrisentan in bulk and pharmaceutical formulation. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5(4), 674–678.
- Rubin LJ. (1997). Therapy of pulmonary hypertension: the role of endothelin receptor antagonists. *European Respiratory Review*, 7(45), 383–386.
- Rubinson, K. A., & Robinson, J. F. (2000). *Contemporary Instrumental Analysis*. Prentice Hall.
- Sai, S.M., Yasawini, P., Nazma, S.K., Sai, S.M., Lakshmi, S.G., Vijaya, L.M., Nalluri,(2016). Development and validation of RP-HPLC-PDA method for the estimation of ambrisentan in bulk and tablet dosage forms. *Indian Drugs*. 53(5), 43-47.
- Sakamoto, A., et al. (1993). *Distinct subdomains of human endothelin receptors determine their selectivity to endothelin A-selective antagonist and endothelin B-selective agonists*. *Journal of Biological Chemistry*, 268(11), 8547–8553.
- Satheeshkumar, N., Naveenkumar, G.A. (2014). Stability-indicating reversed-phase high-performance liquid chromatography method for Ambrisentan: an endothelin

- receptor antagonist. *J Chromatogr Sci.*, 52(8), 894-898.
- Simonneau, G., Montani, D., Celermajer, D. S., Denton, C. P., Gatzoulis, M. A., Krowka, M., ... & Souza, R. (2019). Haemodynamic definitions and updated clinical classification of pulmonary hypertension. *European Respiratory Journal*, 53(1), 1801913.
- Singla, R.K., Chandu, B.R. (2014). Design of experiment assisted UV-visible spectrophotometric and RP-HPLC method development for ambrisentan estimation in bulk and formulations. *World Journal of Analytical Chemistry*. 2(2), 23-30.
- Skoog, D. A., Holler, F. J., & Crouch, S. R. (2013). *Principles of Instrumental Analysis*. Belmont, CA: Cengage Learning.
- Snyder, L. R., & Kirkland, J. J. (1979). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Wiley-Interscience.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2010). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Wiley.
- Snyder, L. R., Kirkland, J. J., & Dolan, J. W. (2011). *Introduction to Modern Liquid Chromatography*. Wiley.
- Stahl, E. (Ed.). (1969). *Thin-Layer Chromatography: A Laboratory Handbook*. Springer-Verlag.
- Thenappan, T., Ormiston, M. L., Ryan, J. J., & Archer, S. L. (2018). Pulmonary arterial hypertension: Pathogenesis and clinical management. *BMJ*, 360, 5492. <https://doi.org/10.1136/bmj.j5492>
- Thenappan, T., Shah, S. J., Rich, S., & Gomberg-Maitland, M. (2007). A USA-based registry study on pulmonary arterial hypertension: Survival in pulmonary arterial hypertension: A comparison of the REVEAL registry and historical cohorts. *Chest*, 132(2), 410–417.
- U.S. FDA, (2019). Generic Drug Approvals for Ambrisentan,
- U.S. FDA, (2007). Drug Approval Package [https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/nda/2007/022081s000TOC.cfm](https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/nda/2007/022081s000TOC.cfm)
- U.S. Food and Drug Administration (FDA). (2015). Analytical Procedures and Methods

## Validation for Drugs and Biologics.

- Vachiéry, J. L., Gaine, S., Galiè, N., Barst, R. J., Grünig, E., Torres, F., ... & Rubin, L. J. (2011). Long-term safety and efficacy of ambrisentan in pulmonary arterial hypertension: results from the ARIES-Extension study. *Journal of the American College of Cardiology*, 58(17), 1937–1945.
- Vatter H, Seifert V. (2006). Ambrisentan, bosentan and macitentan: pharmacokinetics and clinical use. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 2(2), 265–274.
- Vatter, H., & Seifert, V. (2006). Ambrisentan, a non-peptide endothelin receptor antagonist. *Cardiovascular Drug Reviews*, 24(1), 63–76.
- Venkata, S.B.S., Venkata, S.P.V., Sekaran, C.B. (2014). Validated stability indicating high performance liquid chromatographic method for the determination of ambrisentan in pharmaceutical dosage form. *Pharmaceutical Sciences*. 9 (4), 109-115.
- Wiese, M., & Gutschow, M. (2002). Liquid chromatographic methods for the determination of pK<sub>a</sub> values. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 27(5), 867–873.
- Yanagisawa, M., & Masaki, T. (2019). Endothelin: 30 Years From Discovery to Therapy. *Hypertension*, 74(6), 1232–1245.