

T.C
DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**BAZI İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN TAYİNİ İÇİN
SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

Figen EREK

DOKTORA TEZİ

KİMYA ANABİLİM DALI

DIYARBAKIR
Şubat-2020

T.C
DİCLE UNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ MÜDÜRLÜĞÜ
DİYARBAKIR

Figen EREK tarafından yapılan “Bazı İlaç Etken Maddelerinin Tayini için Spektrofotometrik Yöntem Geliştirilmesi” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Kimya Anabilim Dalında DOKTORA tezi olarak kabul edilmiştir

Jüri Üyesinin

<u>Ünvanı</u>	<u>Adı Soyadı</u>
---------------	-------------------

Başkan: Prof. Dr. Ömer YAVUZ

Üye : Prof. Dr. Habibe ÖZMEN

Üye : Prof. Dr. Işıl AYDIN

Üye: Prof. Dr. Abdulkadir LEVENT

Üye: Doç. Dr. Abdulselam ERTAŞ

Tez Savunma Sınavı Tarihi: 14/02/2020

Yukarıdaki bilgilerin doğruluğunu onaylarım.

.../.../2020

Prof. Dr. Sevtap SÜMER EKER

ENSTİTÜ MÜDÜRÜ

(MÜHÜR)

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam sırasında ve tezimin hazırlanmasında yardımcı olan, bilgisini, tecrübesini, hoşgörüsünü esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Işıl AYDIN'a en içten teşekkür ve saygılarımı sunarım.

Tez konusu belirlememizde yardımcı olan ve laboratuvarında çalışma imkanı sunan Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Kimya Bölümü Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Habibe ÖZMEN'e teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımın birçok aşamasında özellikle istatistik deneylerimde bilgisini, tecrübesini esirgemeyen hocam Sayın Prof. Dr. Fırat AYDIN'a en içten teşekkürlerimi sunarım.

Biyokimya Araştırma Laboratuvarındaki tüm imkanları sunan ve destek olan Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Zübeyde BAYSAL'a teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin birçok aşamasında yardımcı olan bilgi ve tecrübesini hiçbir zaman esirgemeyen Doç. Dr. Murat YAVUZ'a teşekkürlerimi sunarım.

Anorganik Kimya Araştırma Laboratuvarındaki tüm imkanları sunan ve destek olan Anorganik Kimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Murat AYDEMİR'e ve çalışma ekibine teşekkürlerimi sunarım.

Çalıştığım ilaçların referans maddelerini gönderen Bilim İlaç San. Tic. A. Ş.'ye, Ali Raif İlaç San. Tic. A. Ş.'ye ve Abdi İbrahim İlaç A.Ş.'ye teşekkür ederim.

ECZACILIK.19.001 No'lu Proje ile çalışmama maddi destek sağlayan DUBAP'a teşekkür ederim.

Fırat Üniversitesi Fen Fakültesi Analitik Kimya Araştırma Laboratuvarında birlikte çalıştığım Basheer SHAWKAT'a, Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi ve Eczacılık Fakültesi Araştırma Laboratuvarlarında desteklerini esirgemeyen bütün arkadaşlarıma teşekkürü bir borç bilirim.

Hayatımın her döneminde yanımda olan sevgili aileme, destekleri, sabırları ve göstermiş oldukları anlayışları için sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR.....	I
İÇİNDEKİLER.....	II
ÖZET.....	IX
ABSTRACT.....	X
ÇİZELGE LİSTESİ	XI
ŞEKİL LİSTESİ	XIII
KISALMA VE SİMGELER.....	XV
1.GİRİŞ.....	1
1.1. Hipertansiyon.....	2
1.2. Antihipertansif İlaçlar.....	2
1.3. Karvedilol (KRV).....	5
1.4. Nebivolol Hidroklorür (NBV).....	6
1.5. Depresyon.....	7
1.6. Serotonin Mekanizması.....	7
1.7. Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörleri (SSRI'lar).....	9
1.8. Paroksetin HCl (PRK).....	9
1.9. İlaç Analizlerinin Önemi	10
1.10. Spektroskopi.....	12
1.11. Absorpsiyon Spektroskopisi.....	12
1.12. Lambert-Beer Eşitliği.....	13
1.12.1. Lambert-Beer yasasından sapmalar.....	14

1.12.1.1. Kimyasal sapmalar.....	14
1.12.1.2. Enstrumantal sapmalar.....	14
1.13. Mor Ötesi ve Görünür Bölge Spektroskopisi.....	15
1.13.1. σ , π ve n Molekül Orbitalindeki Elektron Geçişleri.....	15
1.13.2. d ve f Elektronları ile İlgili Geçişler.....	17
1.13.3. Yük Aktarım Geçişleri.....	18
1.14. Mor Ötesi ve Görünür Bölge Spektroskopisinde Kalitatif Analiz	18
1.14.1. Spektral Verilerin Grafiğe Alınması.....	18
1.14.2. Çözücülerin Etkisi.....	18
1.14.3. Fonksiyonel Grupların Tespiti.....	19
1.15. Mor Ötesi ve Görünür Bölge Spektroskopisinde Kantitatif Analiz	19
1.16. UV-Görünür Bölge Spektrofotometreleri.....	22
1.16.1. Tek Işın Yollu Spektrofotometre.....	23
1.16.2. Çift Işın Yollu Spektrofotometreler.....	23
1.17. Organik Maddeler Arasındaki Yük Aktarım Kompleksleri.....	24
1.18. Kuinalizarin.....	25
1.19. Ditiyokarbamik Asit Türevleri	26
1.20. Analitik Metotların Validasyonu.....	27
1.20.1. Analitik Prosedür.....	27
1.20.2. Spesifiklik.....	27
1.20.3. Doğrusallık.....	28
1.20.4. Aralık.....	28
1.20.5. Doğruluk.....	28
1.20.6. Kesinlik.....	29
1.20.6.1. Tekrarlanabilirlik.....	30

1.20.6.2. Orta (Ara) Hassasiyet.....	30
1.20.6.3. Tekrar Elde Edilebilirlik.....	30
1.20.7. Dedeksiyon (Gözlenebilme) Sınırı (LOD).....	30
1.20.8. Tayin Sınırı (LOQ).....	30
1.20.9. Sağlamlık.....	31
2. ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR.....	33
2.1. Karvedilol ile Yapılan Çalışmalar.....	33
2.2. Nebivolol ile Yapılan Çalışmalar	38
2.3. Paroksetin ile Yapılan Çalışmalar.....	42
3. MATERYAL VE METOT	47
3.1. Materyal.....	47
3.1.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar.....	47
3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	47
3.1.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması.....	48
3.1.3.1. Standart KRV Çözeltileri.....	48
3.1.3.2. Standart NBV Çözeltisi.....	49
3.1.3.3. Standart PRK Çözeltisi.....	49
3.1.4. KUİN (1,2,5,8-tetrahidroksiantrakinon) Çözeltilerinin Hazırlanması.....	49
3.1.5. NH ₃ Çözeltilerinin Hazırlanması.....	49
3.1.6. Cu ²⁺ Çözeltilisinin Hazırlanması	49
3.1.7. MIBK İçinde CS ₂ Hazırlanması	50
3.1.8. Asetik Asit Çözeltilisinin Hazırlanması	50
3.2. Yük Transfer Kompleksi Oluşturma Yöntemi	50
3.2.1. KRV Tayini için Geliştirilen Yük Transfer Kompleksi Yönteminde Optimum Koşulların Belirlenmesi.....	50
3.2.1.1. Çözücünün Etkisi	50

3.2.1.2. KUİN Konsantrasyonunun Belirlenmesi	51
3.2.1.3. Süre ve Sıcaklığın Etkisi	51
3.2.1.4. KRV-KUİN Yük Transfer Kompleksinin Mol Oranı	51
3.2.1.5. KRV-KUİN Yük Transfer Kompleksi için Molar Absorptivite Katsayısının (E) Belirlenmesi.....	51
3.3. Cu-ilaç-ditiyokarbamat Kompleksi Oluşturma Yöntemi	52
3.3.1. NBV ve PRK için Geliştirilen Cu-ilaç-ditiyokarbamat Kompleksi Yönteminde Optimum Koşulların Belirlenmesi.....	52
3.3.1.1. Çözücünün Etkisi.....	52
3.3.1.2. NH ₃ Konsantrasyonunun ve Hacminin Belirlenmesi	53
3.3.1.3. Cu ²⁺ Miktarının Belirlenmesi	53
3.3.1.4. CS ₂ Konsantrasyonunun ve Hacminin Belirlenmesi	54
3.3.1.5. Sürenin Etkisi	54
3.3.1.6. %0.5'lik Asetik Asit Derişiminin Etkisi	55
3.4. Geliştirilen Yöntemlerin Validasyon.....	56
3.4.1 Kalibrasyon Eğrisinin Çizimi	56
3.4.2. Doğrusallık.....	57
3.4.3. LOD ve LOQ Hesaplanması.....	57
3.4.4. Seçicilik	57
3.4.5 Doğruluk	58
3.4.5.1. Saf İlaçlardan % Geri Kazanım	58
3.4.5.2. Standart Ekleme Yöntemi.....	59
3.4.5.3. t-Testi için Geliştirilen Yöntemlerin Tabletlere Uygulanması Yöntemi.....	59
3.4.6. Dayanıklılık	60
3.4.7. Kesinlik	61
3.4.7.1. Tekrarlanabilirlik	61

3.4.7.2. Tekrar Elde Edilebilirlik	61
3.4.7.3. Ara kesinlik	62
3.4.8. Sağlamlık	62
4. ARAŞTIRMA BULGULARI.....	63
4.1. KRV için Geliştirilen Yönteme Ait Bulgular	63
4.1.1. Çözücünün Etkisi.....	63
4.1.2. Kuinalizarin Miktarının Etkisi.....	67
4.1.3. Sıcaklık ve Süre Etkisi.....	67
4.1.4. KRV-KUİN Kompleksinin Mol Oranının Belirlenmesi	69
4.1.5. KRV-KUİN Yük Transfer Kompleksinin Molar Absorptivite Katsayısının Belirlenmesi.....	71
4.1.6. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu.....	71
4.1.6.1. Kalibrasyon Eğrisi.....	71
4.1.6.2. Doğruluk	73
4.1.6.3. Dayanıklılık Testi	75
4.1.6.4. Tekrarlanabilirlik.....	76
4.1.6.5. Tekrar Elde Edilebilirlik.....	76
4.1.6.6. Ara Kesinlik.....	76
4.1.6.7. Karvedilolün Tablet Formülasyonunda Bulunan İnterfer Maddelerin Absorbansa Etkisi.....	77
4.1.6.8. Geliştirilen Yöntemin Sağlamlığı.....	78
4.2. NBV için Geliştirilen Yönteme Ait Bulgular	80
4.2.1. Çözücünün Etkisi.....	80
4.2.2. NH ₃ Konsantrasyonunun ve Hacminin Belirlenmesi.....	81
4.2.3. Cu ²⁺ Miktarının Etkisi	83
4.2.4. CS ₂ Miktarının Etkisi	83

4.2.5. Sürenin Etkisi.....	84
4.2.6. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu.....	84
4.2.6.1. Kalibrasyon Eğrisi.....	84
4.2.6.2. Doğruluk.....	86
4.2.6.3. Dayanıklılık Testi.....	88
4.2.6.4. Tekrarlanabilirlik	88
4.2.6.5. Tekrar Elde Edilebilirlik.....	89
4.2.6.6. Ara Kesinlik	89
4.2.6.7. NBV Tablet Formülasyonunda Bulunan İnterfer Maddelerin Absorbansa Etkisi...	90
4.2.6.8. Geliştirilen Yöntemin Sağlamlığı.....	91
4.3. PRK için Geliştirilen Yönteme Ait Bulgular	94
4.3.1. Çözücünün Etkisi.....	94
4.3.2. NH ₃ Konsantrasyonunun ve Hacminin Belirlenmesi.....	95
4.3.3. Cu ²⁺ Miktarının Etkisi.....	97
4.3.4. CS ₂ Miktarının Etkisi.....	98
4.3.5. Reaksiyon Süresinin İncelenmesi	99
4.3.6. % 0.5'lik CH ₃ COOH Miktarının Etkisi	100
4.3.7. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu	102
4.3.7.1. Kalibrasyon Eğrisi	102
4.3.7.2. Doğruluk	104
4.3.7.3. Dayanıklılık Testi	105
4.3.7.4. Tekrarlanabilirlik.....	106
4.3.7.5. Tekrar Elde Edilebilirlik	107
4.3.7.6. Ara Kesinlik	107
4.3.7.7. PRK Tablet Formülasyonunda Bulunan İnterfer Maddelerin Absorbansa Etkisi...	108

4.3.7.8. Yöntemin Sağlamlığı.....	109
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	111
6. KAYNAKLAR.....	121
ÖZGEÇMİŞ.....	135



ÖZET

BAZI İLAÇ ETKEN MADDELERİNİN TAYİNİ İÇİN SPEKTROFOTOMETRİK YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ

DOKTORA TEZİ

Figen EREK

DİCLE ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
KİMYA ANABİLİM DALI

2020

Bu çalışmada, Karvedilol, Nebivolol HCl ve Paroksetin HCl'i tablet formülasyonlarından tayin edebilmek amacıyla hassas, kolay ve seçici spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir.

Karvedilol için geliştirilen yöntem, bu ilacın 1,2,5,8-tetrahidroksiantrakinon (kuinalizarin) ile renkli bir yük transfer kompleksi oluşturmaya dayanmaktadır. Yük transfer kompleksinin absorbansı üzerine çözücü cinsinin, kuinalizarin miktarının, süre ve sıcaklığın etkisi incelenerek yöntem optimize edilmiştir. Yük transfer kompleksinin stokiyometrik oranı Job metodu ile belirlenmiştir. Optimum koşullar belirlendikten sonra yöntemin validasyonu yapılmış ve geliştirilen yöntem ilacın tablet formülasyonuna başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Nebivolol HCl ile Paroksetin HCl için geliştirilen yöntemler, her iki ilacın da kimyasal yapısında bulunan sekonder amin grubu üzerinden renkli Cu-ilâç-ditiyokarbamat kompleksinin oluşturulmasına dayanmaktadır. Çalışmanın ilk aşamasında ilâç maddeleri bazik ortamda CS₂ ile ditiyokarbamat türevine dönüştürülmüş ve daha sonra ortama eklenen Cu²⁺ ile ditiyokarbamat türevinden renkli kompleks oluşturulmuştur. İkinci aşamada ise oluşturulan kahverengi Cu-ilâç-ditiyokarbamat kompleksi su fazından uygun bir organik çözücü ile ekstrakte edilmiş ve organik çözücü içinde kompleksin absorbansı ölçülmüştür. Her iki ilâç için de bu yöntem, absorbansa çözücü cinsinin, NH₃ derişiminin, CS₂ derişiminin, Cu²⁺ derişiminin ve sürenin etkisi incelenerek optimize edilmiştir. Optimum koşullar belirlendikten sonra yöntemin validasyonu yapılmış ve geliştirilen yöntem ilâçların tablet formülasyonlarına başarılı bir şekilde uygulanmıştır.

Anahtar Kelimeler: Karvedilol, Nebivolol HCl, Paroksetin HCl, Spektrofotometrik tayin

ABSTRACT

DEVELOPMENT SPECTROPHOTOMETRIC METHODS FOR DETERMINATION OF SOME DRUG ACTIVE SUBSTANCES

PhD THESIS

Figen EREK

DICLE UNIVERSITY
INSTITUTE OF NATURAL AND APPLIED SCIENCES
DEPARTMENT OF CHEMISTRY

2020

In this study, sensitive, easy and selective spectrophotometric methods for the determination of Carvedilol, Nebivolol HCl and Paroxetine HCl from tablet dosage forms were developed.

The method developed for carvedilol is based on a charge transfer reaction with 1,2,5,8-tetrahydroxythraquinone (quinalizarin). The method was optimized by examining the effect of type of solvent, Quinalizarin concentration, reaction of time and temperature on the absorbance. The stoichiometric ratio of the charge transfer complex was determined by the Job method.

The methods developed for Nebivolol HCl and Paroxetine HCl are based on the formation of a colored Cu-drug-dithiocarbamate complexes on the basis of the secondary amine group in the structures of both drugs. In the first stage of the study, the drug substances were converted into dithiocarbamate derivatives with CS₂ in basic medium. Then, brown complexes from the dithiocarbamate derivatives were formed by adding Cu²⁺ to the medium. In the second step the complexes formed were extracted into an organic solvent phase from water phase. The methods were optimized by examining effect of type of solvent, NH₃ concentration, CS₂ concentration, Cu²⁺ concentration on the absorption for both drugs.

After optimum conditions were determined for three drugs, the methods were statistically validated and the developed methods were successfully applied to the tablet formulations of the drugs.

Key Words: Carvedilol, Nebivolol HCl, Paroxetine HCl, Spectrophotometric determination

ÇİZELGE LİSTESİ

	Sayfa	
Çizelge 3.1.	Tablet ilaçlarda bulunan yardımcı maddeler	58
Çizelge 3.2.	t-dağılım değerleri	60
Çizelge 4.1.	KRV-KUİN kompleksinin absorbensı üzerine çözücünün etkisi	63
Çizelge 4.2.	Karvedilol çalışmasında kullanılan çözücülerin dielektrik sabiti	64
Çizelge 4.3.	Molar Absorptivite değeri için elde edilen sonuçlar (KRV ve KUİN 3.0 mmol.L ⁻¹)	71
Çizelge 4.4.	KRV için geliştirilen yöntemde kalibrasyon eğrisine ait sonuçlar	72
Çizelge 4.5.	KRV için geliştirilen yöntemde gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)	73
Çizelge 4.6.	KRV için geliştirilen yöntemde % geri kazanım	73
Çizelge 4.7.	KRV için geliştirilen yöntemde standart ekleme yöntemi ile tabletten geri kazanım	74
Çizelge 4.8.	KRV'nin tablet formülasyonu için t-testi	75
Çizelge 4.9.	KRV için geliştirilen yöntemin dayanıklılığı	75
Çizelge 4.10.	KRV için geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliği (µg/mL)	76
Çizelge 4.11.	KRV için geliştirilen yöntemin tekrar elde edilebilirliği (µg/mL)	76
Çizelge 4.12.	KRV için geliştirilen yöntemin ara kesinliği (AK: 45 µg/mL ve 15 µg/mL)	77
Çizelge 4.13.	KRV için geliştirilen yöntemde tablette bulunan yardımcı maddelerin interfer etkisi	78
Çizelge 4.14.	KUİN hacmi ve reaksiyon sıcaklığındaki küçük değişimin absorbens üzerine etkisi	78
Çizelge 4.15.	KRV ile daha önce yapılan spektrofotometrik çalışmaların karşılaştırılması	79
Çizelge 4.16.	Absorbens üzerine çözücünün etkisi (0.2 mmol.L ⁻¹ NBV, N=3)	80
Çizelge 4.17.	NBV için geliştirilen yöntemde kalibrasyon eğrisine ait sonuçlar	85
Çizelge 4.18.	NBV için geliştirilen yöntemde gözlenebilme sınırı(LOD) ve tayin sınırı (LOQ)	86
Çizelge 4.19.	NBV için geliştirilen yöntemde % geri kazanım	86
Çizelge 4.20.	NBV için geliştirilen yöntemde standart ekleme yöntemi ile tabletten geri kazanım	87
Çizelge 4.21.	Nebivolol HCl'nin tablet formu için t-testi sonuçları	87
Çizelge 4.22.	NBV için geliştirilen yöntemin dayanıklılığı	88

Çizelge 4.23.	NBV için geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliği	88
Çizelge 4.24.	NBV için geliştirilen yöntemin tekrar elde edilebilirliği	89
Çizelge 4.25.	NBV için geliştirilen yöntemin ara kesinliği	90
Çizelge 4.26.	NBV için geliştirilen yöntemde tablette bulunan yardımcı maddelerin interfer etkisi	91
Çizelge 4.27.	Reaktif hacmindeki küçük değişimin absorbansa etkisi	91
Çizelge 4.28.	NBV ile daha önce yapılan spektrofotometrik çalışmaların karşılaştırılması	93
Çizelge 4.29.	Çözücünün Etkisi	94
Çizelge 4.30.	PRK için geliştirilen yöntemde kalibrasyon eğrisine ait sonuçlar	103
Çizelge 4.31.	PRK için geliştirilen yöntemde gözlenebilme sınırı(LOD) ve tayin sınırı (LOQ)	103
Çizelge 4.32.	PRK için geliştirilen yöntemde % geri kazanımı	104
Çizelge 4.33.	PRK için geliştirilen yöntemde standart ekleme yöntemi ile tabletten geri kazanım	104
Çizelge 4.34.	PRK'nin tablet formu için t-testi	105
Çizelge 4.35.	PRK için geliştirilen yöntemin dayanıklılığı	106
Çizelge 4.36.	PRK için geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliği(mmol.L^{-1})	106
Çizelge 4.37.	PRK için geliştirilen yöntemin tekrar elde edilebilirliği	107
Çizelge 4.38.	PRK için geliştirilen yöntemin ara kesinliği	108
Çizelge 4.39.	PRK için geliştirilen yöntemde tablet formülasyonunda bulunan yardımcı maddelerin interfer etkisi	109
Çizelge 4.40.	PRK için geliştirilen yöntemin sağlamlığı	109
Çizelge 4.41.	PRK ile daha önce yapılan spektrofotometrik yöntemlere ait değerler	110

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa	
Şekil 1.1.	Karvedilol molekül yapısı	5
Şekil 1.2.	Nebivolol molekül yapısı	6
Şekil 1.3.	Serotonin üretim, depolanma ve yıkım mekanizması	8
Şekil 1.4.	Paroksetin HCl molekül yapısı	10
Şekil 1.5.	Elektromanyetik spektrum	12
Şekil 1.6.	Numune üzerine gönderilen ve numuneden geçen ışığın şiddeti	13
Şekil 1.7.	Elektronik geçiş seviyeleri	16
Şekil 1.8.	Bir spektrofotometrenin genel olarak sahip olduğu bileşenler	20
Şekil 1.9.	Tek ışın yollu spektrofotometrenin bileşenleri.	23
Şekil 1.10.	Çift ışın yollu spektrofotometrenin bileşenleri	23
Şekil 1.11.	Kuinalizarin molekül yapısı	25
Şekil 1.12.	Ditiyokarbamatların metallerle oluşturduğu bağ türleri	26
Şekil 4.1.	40 µg.mL ⁻¹ KRV'nin referans metanole karşı alınan UV spektrumu	65
Şekil 4.2.	Kuinalizarin'in referans metanole karşı alınan UV spektrumu	65
Şekil 4.3.	KUİN-KRV yük transfer kompleksinin UV spektrumu	66
Şekil 4.4	KUİN ile KUİN-KRV yük transfer kompleksinin UV spektrumlarının karşılaştırılması	66
Şekil 4.5.	3.0 mmol.L ⁻¹ KUİN reaktifinin konsantrasyonunun absorbans üzerine etkisi	67
Şekil 4.6.	KUİN (3.0 mmol.L ⁻¹) ve KRV (30 µg.mL ⁻¹) arasında oluşan yük transfer kompleksi üzerine sıcaklık ve sürenin etkisi ((a):15 °C, (b):20 °C, (c):27, (d):35 °C, (e): 40 °C, (f): 45 °C, (g):50 °C, (h):55 °C, (ı):60 °C)	68
Şekil 4.7.	KUİN (2.5*10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹) ve KRV (2.5*10 ⁻⁴ mol.L ⁻¹) arasında oluşan yük transfer kompleksinin stokiometrik oranının Job metodu ile belirlenmesi	69
Şekil 4.8.	KRV-KUİN kompleksinin oluşumu için önerilen mekanizma	70
Şekil 4.9.	KRV tayini için geliştirilen yöntem ile bulunan kalibrasyon eğrisi	72
Şekil 4.10.	Kloroform çözücüsü içinde NEBİ-Cu-ditiyokarbamat kompleksinin UV-	

	GB spektrumu	81
Şekil 4.11.	Kloroform çözücüsü içinde % 25'lik NH_3 miktarının etkisi	81
Şekil 4.12.	Kloroform çözücüsü içinde % 10'luk NH_3 miktarının etkisi	82
Şekil 4.13.	Kloroform çözücüsü içinde % 1'lik NH_3 miktarının etkisi	82
Şekil 4.14.	Absorbansa Cu^{2+} miktarının etkisi ($2 \cdot 10^{-3}$ M)	83
Şekil 4.15.	Absorbansa CS_2 miktarının etkisi	83
Şekil 4.16.	Reaksiyon süresinin absorbans üzerine etkisi	84
Şekil 4.17.	NBV'nin geliştirilen yöntemle göre kalibrasyon eğrisi	85
Şekil 4.18.	MIBK çözücüsü içinde PRK-Cu-ditiyokarbamat kompleksinin UV-GB spektrumu	95
Şekil 4.19.	% 25'lik NH_3 hacminin absorbansa etkisi	95
Şekil 4.20.	% 10'luk NH_3 hacminin absorbansa etkisi	96
Şekil 4.21.	% 1'lik NH_3 hacminin absorbansa etkisi	96
Şekil 4.22.	% 0.1'lik NH_3 hacminin absorbansa etkisi (N=3)	97
Şekil 4.23.	Absorbansa Cu^{2+} miktarının etkisi	97
Şekil 4.24.	CS_2 Hacminin absorbansa etkisi	98
Şekil 4.25.	MIBK içinde hazırlanan % 10'luk CS_2 Hacminin absorbansa etkisi	98
Şekil 4.26.	MIBK içinde hazırlanan % 1'lik CS_2 Hacminin absorbansa etkisi	99
Şekil 4.27.	Reaksiyon Süresinin Absorbans Üzerine Etkisi	99
Şekil 4.28.	Kompleksin dayanıklılığına % 0.5'lik asetik asit miktarının etkisi	101
Şekil 4.29.	PRK'nin geliştirilen yöntemle göre kalibrasyon eğrisi	102

KISALTMA VE SİMGELER

5-HIAA	: 5- hidroksiindolasetikasit
5-HT	: 5-hidroksitriptamin (serotonin)
ACE	: Anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri
ARB	: Anjiyotensin II (A-II) reseptör blokerleri
MAO	: Monoaminoksidaz
SNRI	: Seçici norepinefrin geri alım inhibitörleri
SSRI	: Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörleri
ARP	: Aripiprazol
BIS	: Bisoprolol
HCTZ	: Hidroklorotiazid
KRV	: Karvedilol
NBV	: Nebivolol Hidroklorür
PRK	: Paroksetin Hidroklorür
PRO	: Propranolol
SER	: Sertralin
TEL	: Telmisartan
TRD	: Trandolapril
BFM	: Bromfenol mavisi
BKY	: Bromkrezol yeşili
BNF	: 7-kloro-4-nitrobenzofurazon
BTM	: Bromtimol mavisi
DDK	: 2,3-dikloro-5,6-disiyano-1,4-benzokuinone
DNF	: 2,4-dinitrofenol
DNFB	: 2,4-dinitrofluorobenzen
KUİN	: 1,2,5,8-tetrahidroksiantrakinon (Kuinalizarin)
NKS	: 1,2-naftokinon-4-sulfonat
PA	: 2,4,6-trinitrofenol (pikrik asit)

PDAB	: p-dimetilaminobenzaldehit
TCNK	: 7,7,8,8-tetrasianokuinodimetan
UV-GB (UV/VIS)	: Ultraviyole-Görünür Bölge
HCl	: Hidroklorik asit
KCl	: Potasyum Klorür
NH ₃	: Amonyak
CS ₂	: Karbondisülfür
LMH	: Laktozmonohidrat
HPMS	: Hidroksipropilmetilselüloz
Mg Str	: Magnezyum Stearat
MKS	: Mikrokristalinselüloz
GA	: Göreceli Absorbans
GK	: Geri Kazanım
AK	: Alınan Konsantrasyon
OBK	: Ortalama Bulunan Konsantrasyon
SS	: Standart Sapma
BSS	: Bağlı Standart Sapma
BH	: Bağlı Hata
Kons	: Konsantrasyon
rpm	: Revolution Per Minute (Dakikadaki Devir Sayısı)
M	: Molar (mol/L)
mM	: Milimolar (mmol/L)
L	: Litre
mL	: Mililitre
ppm	: Milyonda bir birim
g	: Gram
mg	: Miligram
µg	: Mikrogram

1.GİRİŞ

Hastalıkların teşhisi, iyileştirilmesi, hastalık sürecinde rahatsızlık veren semptomların azaltılması veya hastalıktan korunma amacıyla kullanılan ilaçların en iyi etkiyi verebilmesi için ilaç endüstrisi kuruluşlarında ve ayrıca akademik kuruluşlarda, sürekli araştırma geliştirme çalışmaları yapılmaktadır (wikipedia, Merey 2016).

İlaç araştırma ve geliştirme çalışmalarında, hammaddelerin ve son ürünlerin kalitesini artırmak, kullanılabilirliğini ve güvenilirliğini sağlamak için enstrümantal ve kimyasal analizler temel gereksinimlerdir. Bu analizler genel olarak spektroskopik, elektroanalitik, kromatografik yöntemlerle yapılmaktadır (Anonim).

Spektrofotometrik ve spektrofluorometrik yöntemler farmasötik preparatların tayin analizlerinde çokça kullanılan ekonomik, kolay ve hızlı spektroskopik yöntemlerdir (Kirtimaya ve ark 2016). Özellikle ultraviyole görünür bölge yöntemleri en sık kullanılan spektrofotometrik yöntemlerden biridir (Siladitya ve ark 2012).

Bu çalışmada, şuanda tedavide kullanılmakta olan antihipertansif Karvedilol (KRV) ve Nebivolol HCl (NBV) ile antidepresan Paroksetin HCl (PRK) etken maddelerinin farmasötik preparatlarından tayini için spektrofotometrik yöntem geliştirilmesi amaçlandı.

KRV etken maddesi için geliştirilen yöntem, bu maddenin π -akseptörü olan 1,2,5,8-tetrahidroksiantrakinon (KUİN) boyarmaddesi ile uygun bir çözücü ortamında oluşturduğu renkli yük transfer kompleksinin uygun bir dalgaboyunda ölçülmesi esasına dayanmaktadır (Paula ve ark 2010, Ragaa ve ark 2013, De Paul ve ark 2010, Gouda ve Kassem 2012, Swamby ve Basavaiah 2014, Elqudaby ve ark 2014,).

NBV ve PRK etken maddeleri için geliştirilen yöntem ilaçların Cu-ditiyokarbamat türevlerinin UV-görünür bölgede tayin edilmesi esasına dayanmaktadır. Yöntem iki aşamadan oluşmaktadır: Birinci aşamada, bu iki maddenin yapısında bulunan sekonder amin grubunun CS₂ ile bazik ortamda ditiyokarbamat türevine dönüştürülerek Cu²⁺ ile kompleks oluşturması sağlanır. İkinci aşamada ise oluşan sarı renkli kompleks, su fazından su ile karışmayan bir organik çözücüye alınarak UV-görünür bölgede uygun dalgaboyunda analiz edilir (Alpdoğan ve Sungur 1991, Gölcü ve ark 2001, Gölcü ve Yavuz 2008).

1.1 .Hipertansiyon

Kan basıncı, kanın damar çeperine yaptığı itici kuvvetin bir ölçüsüdür (Alpman 2005). Hipertansiyon, kan basıncının insan sağlığını olumsuz etkileyecek şekilde yükselmesidir. Kan basıncının kontrolü merkezi sinir sistemi, periferik sinir sistemi, böbrek, damar endoteli ve endokrin sistemin karmaşık etkileşimi ile sağlandığından hipertansiyondan sorumlu tek bir etiyoloji veya patofizyolojik mekanizma yoktur (Alpman 2005, Keleş ve Ağaç 2005, Babalık 2005). Nedeni bilinmeyen hipertansiyona esansiyel hipertansiyon, nedeni bilinen hipertansiyona ise non-esansiyel hipertansiyon denilmektedir (Kıral 2012).

Esansiyel hipertansiyonun sık görülmesi, mortalite ve morbidite oranının yüksek olması nedeni ile ciddi bir sağlık problemidir (Dağlı ve Karaca 2006). Epidemiyolojik veriler, koroner arter hastalığı ile hipertansiyon arasında sıkı bir ilişki olduğunu ortaya koymuştur (Erdoğan 2015). 115/75 mmHg düzeyinin üzerindeki her 20 mmHg'lık sistolik ve her 10 mmHg'lık diyastolik basınç artışı kardiyovasküler hastalık riskini iki kat artırmaktadır (Öngen 2005).

Kan basıncı yüksekliğinin tedavi ile düşürülmesi, hipertansiyonun yol açtığı yıkıcı sonuçlarının bir oranda önlenebileceğini göstermiştir (Öngen 2005). Modern antihipertansif tedavisinin uygulanmasındaki esas amaç, kan basıncının etkin bir şekilde kontrol edilmesi, mortalite ve morbidite nedeni olan hedef organların korunmasıdır (Dağlı ve Karaca 2006).

Hipertansiyonu olan kişilerde, antihipertansif ilaçlar kullandıkları zaman, ölüme neden olan ya da ölüme neden olmayan inme riskinin % 40'tan fazla azaldığı gözlemlenmiştir. Koroner arter hastalıkları açısından değerlendirildiğinde antihipertansif tedavinin ölüme yol açmayan ya da ölümle sonuçlanan olaylarda % 20'ye yakın azalma sağladığı vurgulanmaktadır. Hipertansiyonun neden olduğu kalp damar hastalıklarına bağlı tüm ölümler değerlendirildiğinde, kan basıncını düşürücü tedavi ile % 25 düzeyinde bir azalma elde edildiği görülmektedir (Öngen 2005).

1.2. Antihipertansif İlaçlar

Antihipertansif ilaçlar, kan damarlarını genişleterek başka deyişle daralmasını, büzülmesini önleyerek veya kalbin iş yükünü azaltarak kan basıncını düşürürler. Hipertansiyon tedavisinde kullanılan başlıca ilaç grupları aşağıda yer almaktadır:

Diüretikler: Sıvı hacmini ve sodyum seviyesini düşürerek, kan damarlarının genişlemesini, kan akımının artmasını ve kan basıncının azalmasını sağlayan ilaçlardır.

Alfa blokerler: Kan damarlarındaki düz kasların gevşemesiyle ve kalpteki alfa reseptörlere bazı kimyasalların bağlanmasını bloke ederek kalbin iş yükünü hafifleten ilaçlardır.

Kalsiyum antagonistleri: Kan damarlarının kasılmasına veya daralmasına neden olan kalsiyum iyonlarını bloke ederek kalbin iş yükünü azaltan vazodilatör ilaçlardır.

Anjiyotensin dönüştürücü enzim (ACE) inhibitörleri: Kan damarlarının daralmasına yol açan anjiyotensin-2 üretimini bloke eden ilaçlardır. Bu olay, kanın damarlarda hacmini düşürerek akışını kolaylaştırır. Günümüzde oldukça sık kullanılmaktadır.

Anjiyotensin II (A-II) reseptör blokerleri (ARB): ACE inhibitörleriyle aynı etkiyi farklı bir mekanizmayla gerçekleştiren vazodilatör ilaçlardır. Anjiyotensin-2 maddesinin vücuttaki kendi reseptörlerine girişini bloke ederek etkilerini engellerler (Alpman 2005).

Direkt vazodilatörler: Günümüzde yaygın olarak kullanılmayan bu ilaçlar direkt olarak arteriolar vazodilatasyon yaparak kan basıncını düşürürler (İlerigelen 2005).

Merkezi sinir sistemi yoluyla etkili ilaçlar: Bu ilaçlar merkezi sinir sistemi yoluyla sempatik aktiviteyi azaltarak kan basıncını düşürürler (İlerigelen 2005).

Beta blokerler: Kalpteki beta reseptörlere bağlanan belli kimyasalları serbestleştiren sempatik sinir sisteminin bazı etkilerini bloke ederek kalbin iş yükünü azaltan ilaçlardır (Alpman 2005).

Beta blokerler beta-1 ve beta-2 reseptörlerine olan affinitelerine, intrinsik semptomimetik aktivitesi olup olmamasına, alfa blokaj yapıp yapmamasına, yağda çözünürlüğüne ve vasodilatasyon oluşturabilme kapasitelerine göre ayrılmaktadırlar. Beta blokerler farklı dokulardaki farklı reseptörleri etkileyerek farklı cevaplar oluşturması nedeniyle antihipertansif etkinliklerinde çeşitli mekanizmaların rol oynadığı söylenebilir. Bu bulgular ışığında beta blokerlerin antihipertansif etki mekanizmaları şu şekilde özetlenebilir:

1. Kalp hızında, miyokard kontraktilitesinde ve kalp debisinde azalma: Kullanımdan sonra ortaya çıkan akut etkilerdir. Pindolol gibi intrensek semptomimetik aktivitesi yüksek olanların dışında kalp debisi akut olarak düştükten sonra uzun dönemde de düşük kalmaktadır

2. Periferik dirençte azalma: Çoğu zaman başlangıçta yüksek kalsa bile zaman içinde toplam periferik direnç azalmaktadır. Alfa adrenoreseptörlerin aktivasyonu periferik dirençte artışa, iskelet kası damarlarında ise beta 2 reseptörlerin aktivasyonu vasodilatasyona yol açtığından bu yönüyle tercih edilecek ilaın kardiyoselektif veya beta bloker etkisinin yanı sıra alfa bloker özelliğine sahip olması beklenmelidir

3. Kavşak bölgesinde noradrenalin salınımında azalma: Presinaptik beta reseptör blokajı ile postganglionik sempatik liflerden noradrenalin salınımı azalmaktadır. Böylece periferik dirençte azalma ve vasodilatasyon oluşması beklenir

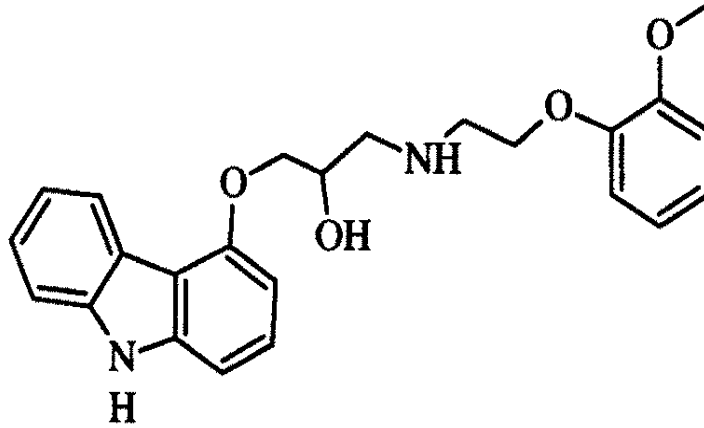
4. Santral sinir sistem üzerine etki: Özellikle lipofilik olanlarda daha fazla olmak üzere beyin sapındaki sempatik merkezlerin baskılanması ile sempatik deşarj azalmaktadır.

5. Renin salınımında inhibisyon: Böbrekte jukstaglomerüler hücrelerinde beta reseptörlerin blokajı renin salgılanmasının inhibisyonuna neden olur. Böylece anjiyotensin II ve aldosteron oluşumu azalır (Ertem 2008).

6. Beta bloker kullanımı ile egzersiz veya stress sırasında katekolaminlerin pressör etkisinde azalma: Esansiyel hipertansiyon, esas olarak azotmonoksit (NO) yok edebilen ve damar duvarı üzerindeki faydalı ve koruyucu etkilerini zayıflatabilecek oksijensiz radikallerin üretilmesinin neden olduğu endotel disfonksiyonuyla ilişkilidir. (Taddei ve ark 2002). NO biyoaktivitesinde bozulma ve rezistans damarlarda endotel disfonksiyonu kan basıncında yükselmeye yol açar. Bu nedenle hipertansiyonda endotel fonksiyonunu normale döndürme çabaları son yıllarda oldukça ilgi duyulan bir konu olmuştur. Bu amaçla selektif ve vasodilatatör özelliği olan bir beta bloker olan nebivolol ile yapılan hayvan deneylerinde ve gönüllü insanlar üzerinde yapılan çalışmalarda fosfolipaz-C ile NO biyoaktivitesini arttırdığı gösterilmiştir. NO salınımında arttırarak damar düz kaslarını gevşetip kan basıncında düşüşe neden olur. Böylece NBV'nin, hipertansiyon tedavisinde ilave olarak vasküler protektif etki gösterdiği ileri sürülmektedir (Ertem 2008).

1.3. Karvedilol (KRV)

Kimyasal adı [(6)-1-(karbazol-4-iloksi)-3-((2-(o- metoksifenoksi)etil) amino)2-propanol] olan Karvedilol'ün kapalı formülü $C_{24}H_{26}N_2O_4$ şeklindedir. Ticari karvedilol preparatları R(+) ve S(-) enantiomerinin rasemik karışımı şeklindedir. Molekül ağırlığı 406.5 g/mol'dür (Abshangen 1987, Streim ve ark 1987, Üncüoğlu 2009).



Şekil 1.1. Karvedilol molekül yapısı (Önal 2011)

Karvedilol beyaz renkte bir tozudur. Erime noktası 114–115°C'dir. Dimetilsülfoksitte serbestçe çözünür; metilen klorür ve metanolde çözünür; etanol ve izopropanolde az çözünür; suda çözünmez (Moffat ve ark 2004).

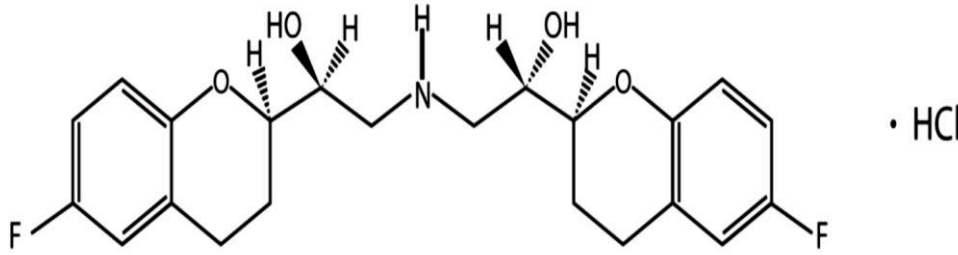
Karvedilol, nonselektif β_1 -adrenoreseptör blokajı, vazodilatasyon, antioksidan aktivitelerine sahip 3. kuşak bir β -bloker ajandır. İki (R ve S) enantiyomerinin oluşmasını sağlayan bir asimetrik karbon atomuna sahiptir. (S)- enantiyomerinin β_1 -adrenoreseptör blokajından sorumlu olduğu buna karşın hem (R)- ve hem (S)-enantiyomerlerinin her ikisinin de α_1 -adrenoreseptör blokajından sorumlu olduğu bilinmektedir (Dulin ve Abraham 2004).

Karvedilol ciddi, ileri derecede kalp yetmezliği olan hastalarda ((Newyork Kalp Cemiyeti) Sınıf IV) mortaliteyi azalttığı ispatlanmış tek ilaçtır (Packer ve ark 2001).

Karvedilolün farmakokinetiği, oral bir dozdan sonra hızla emilir ve 1-2 saat içinde maksimum plazma konsantrasyonlarına ulaşır. Maksimum plazma konsantrasyonu doz ile birlikte artar ve emilim oranı tekrarlanan dozlarla değişmez. Karvedilol, hızlı ve kapsamlı bir şekilde metabolize edilir, büyük bir kısmı sadece karaciğer tarafından metabolize edilir; bazı metabolitler farmakolojik olarak aktiftir, idrarda ilacın % 2'si geri kazanılır (Dulin ve Abraham 2004).

1.4. Nebivolol Hidroklorür (NBV)

Kimyasal olarak $(\pm)$ [2 – R – R – R – (S)] α, α' - [iminobis(metilen)] bis [6- floro-3,4-dihidro-2-H-1-benzopiran-2-metanol] hidroklorür şeklinde adlandırılır. Molekül ağırlığı 441.9 g/mol'dür. Kapalı formülü $C_{22}H_{26}NO_4F_2Cl$ şeklindedir. Antihipertansif ilaç olarak kullanılan Nebivolol HCl, 3. kuşak β_1 -selektif adrenerjik reseptör bloker ajandır. (Sirisha ve ark 2013, Arunadevi ve ark 2011, Meyyanathan ve ark 2010, Sachin ve William 2006, Vijayanand ve ark 2016, Rxlist 2019)



Şekil 1.2. Nebivolol molekül yapısı (Kıral 2012)

Nebivolol HCl beyaz renkte tozudur. Suda çok düşük oranda çözünür (Sirisha ve ark 2013). Metanol, dimetilsülfoksit ve N,N-dimetilformamitte çözünürlüğü oldukça iyidir. Etanol, propilen glikol ve polietilen glikolde az çözünür, hekzan, diklorometan ve metilbenzende ise çözünürlüğü çok düşüktür (Rxlist 2019).

Nebivolol HCl d- ve l-enantiyomerlerinin oluşturduğu bir rasermik karışımdır. d-enantiyomeri β_1 -adrenerjik reseptör bloker özelliğini daha çok gösterirken l-enantiyomeri endotel bağımlı vazodilatasyon özelliği gösterir. Deneysel bir çalışmada endotel hücrelerden β -adrenerjik reseptör yardımıyla NO üretimi ya da salınımınıyla vazodilatasyona etki ettiği gösterilmiştir. Arter çeperlerinde üretilen NO damar düz kasları üzerinde gevşetici etkiye sahiptir. Aynı zamanda trombosit birikimini inhibe eder ve damar düz kas hücrelerinin çoğalması ile lökosit aktivasyonunu inhibe ederek damarlarda oluşabilecek hasara karşı koruyucu özellik göstermektedir.

Nebivolol HCl oral alımdan sonra çok iyi emilir, alınan besinlerden etkilenmez ve doz alımından sonra 30 dk ile 4 saat içinde maksimum plazma konsantrasyonlarına ulaşır. Nebivolol, öncelikle sitokrom P450(CYP)2D6 enzimleri yoluyla karaciğer metabolizmasına maruz kalır. Karaciğer oksidatif metabolizması CYP2D6 ile, debrisoquin benzeri genetik polimorfizmine bağlıdır. Bu nedenle, tek bir hasta ilacın

normal veya zayıf bir metabolizörü olabilir. İlacın % 1 den daha azı idrarla değişmeden atılır. Hidroksi metabolitlerinin aktif olduğu ve ciddi böbrek hasarına yol açabileceği bildirilmiştir. (Sachin ve William 2006, Kırıl 2012, Broeders ve ark 2000)

1.5. Depresyon

Depresyon, dünya çapında 264 milyondan fazla insanı etkileyen en yaygın hastalıklardan biridir. Kalıcı, yoğun bir hüznü hissiyatına ve ilgi kaybına sebep olan bir duygu durum bozukluğudur. Uzun süreli olan depresyon kişide ciddi sağlık sorunu haline gelebilir. En kötüsü de intihara meyili artırmasıdır. Her yıl 800 000'e yakın insan intihar etmektedir. (WHO 2019, Legg ve Goldman 2019)

Depresyonun sebebi tam olarak bilinmese de bazı faktörlerin hastalığa sebep olduğu bilinmektedir. Genetik özellikler, beyin nörotransmitter seviyelerindeki değişiklikler, çevresel faktörler, bazı hastalıklar (bipolar bozukluk gibi) gibi faktörler depresyonda yüksek olasılıkla rol oynamaktadır. Tedavisinde antidepresan ilaçlar yaygın bir şekilde kullanılmaktadır. Bir nörotransmitter veya nörotransmitter kombinasyonu üzerine etki ederek orta ile şiddetli depresyonu tedavi etmede kullanılan birkaç antidepresan grubu mevcuttur. B:u gruplardan bazıları şunlardır: seçici serotonin geri alım inhibitörleri (SSRI'lar); monoamin oksidaz inhibitörleri (MAOI'ler); trisiklik antidepresanlar; atipik antidepresanlar; selektif serotonin ve norepinefrin geri alım inhibitörleri (SNRI) (Legg ve Goldman 2019).

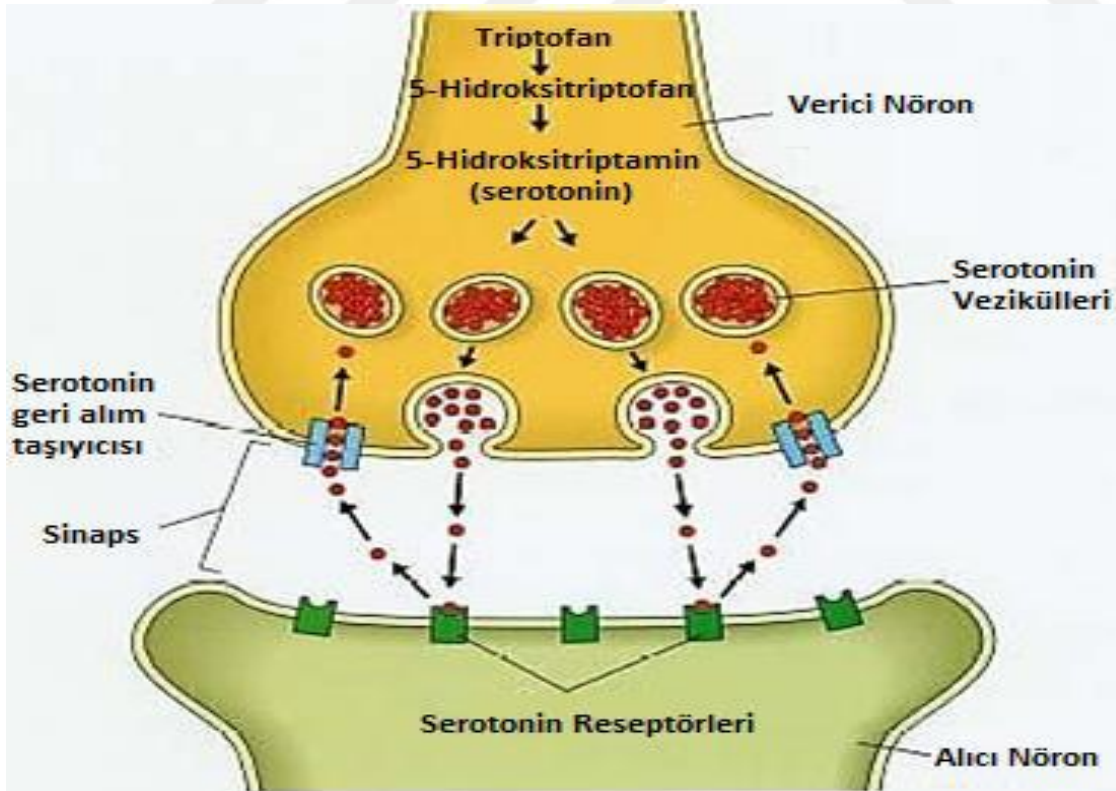
1.6. Serotonin Mekanizması

İlk olarak Page ve arkadaşları tarafından pıhtılaşmış kandaki trombositlerden salınmış halde bulunan bu vazokonstriktör madde izole edilerek kimyasal olarak tanımlanmıştır ve maddeye **serotonin** (5-Hidroksitriptamin, 5-HT) adı verilmiştir (Aydurmuş 2016).

Serotoninin üretilmesi için esansiyel bir aminoasit olan triptofana ihtiyaç vardır. Triptofandan serotonin oluşması sırasında triptofan hidroksilaz, aromatik L-amino asit dekarboksilaz gibi önemli enzimler görev alır. Hidroksilasyon tepki aşaması, serotonin üretim hızını sınırlayıcı bir basamaktır (Kırıl 2012).

Serotonerjik nöronda triptofan için özel bir aktif taşıma pompası, serotonin için özel bir geri-alım pompası, enzimler ve üretilen nörotransmitterin depolanması için veziküller vardır. Üretilen serotonin salınmaya hazır durumda veziküllerde depolanır.

Serotonin bir sinir uyarısı ile sinaptik aralığa ekzozitoz yolu ile salınır ve presinaptik ve postsinaptik zarlarda bulunan alıcılara bağlanarak normal işlevini yerine getirir. Serotonin sinap öncesi terminallerinin üzerinde, kendilerine özel taşıyıcı madde ile bağlantılı geri alım pompaları vardır. Bu pompaların işlevi, sinaptik aralığa boşalan serotoninin bir kısmını, işlevini gördükten sonra tekrar kendine özel sinaps öncesi terminale emmektir. Bu süreç aktif bir süreçtir ve üretilen kimyasal ileticinin daha ekonomik olarak kullanılmasını sağlar. Bu geri alınmadan sonra yıkım, monoaminoksidaz enzimi ile etkileşim sonucu gerçekleşir. Serotonin yıkımında monoaminoksidaz (MAO), aldehitdehidrogenaz enzimleri görev alır. Nöron içine alınan serotoninin önemli bir kısmı MAO enzimi aracılığıyla yıkıma uğrar. Serotoninin MAO-A enzimi ile etkileşmesinin sonucu olarak 5-hidroksiindolasetaldehit oluşur ve bu metabolit aldehit dehidrogenaz aracılığıyla aldehitlenerek ana metaboliti olan 5-hidroksiindolasetikasite (5-HIAA) dönüşüp önce beyin omurilik sıvısına (BOS), sonra kan ve idrara geçerek atılır. Hücreye geri alınan moleküllerin bir kısmı bu yolla metabolize olmalarına rağmen tümü bir kerede yıkıma uğramaz. Diğer nörotransmitterlerde olduğu gibi kalan serotonin de veziküllerde depolanır ve bir sonraki uyarı ile tekrar kullanılmak üzere bekletilir (Tamam ve Zeren 2002).



Şekil 1.3. Serotonin üretim, depolanma ve yıkım mekanizması (Aydurmuş)

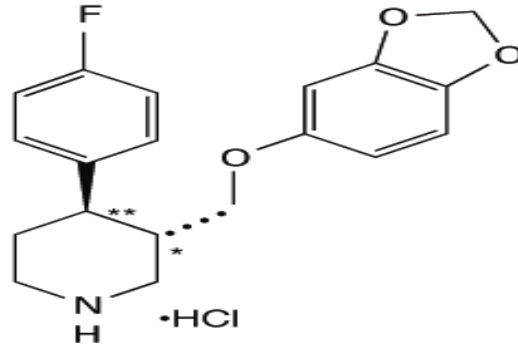
1.7. Seçici Serotonin Geri Alım İnhibitörleri (SSRI'lar)

SSRI'lar, psikiyatride rasyonel olarak tasarlanmış terapötik ilaçların birinci sınıfıdır. Reseptör antagonizmasının olmayışı nedeniyle, SSRI'lar kardiyotoksisite ve santral sinir sistemi toksisitesi gibi yaşamı tehdit edici yan etkilerden neredeyse yoksundur ve güvenilirdir.(Hiemke ve Hatter 2000). SSRI'lar, 5-hidroksitriptamin (5-HT) geri alımının blokajı yoluyla, seçici olarak serotonin iletimini artırır ve post sinaptik reseptörlerin sayı ve duyarlılığında azalmaya yol açarlar. (Fındıklı 2009)

Filogenetik açıdan 5-HT, en eski nörotransmitterlerden biridir. İnsan beyinde, 5-HT-içeren nöronlar, beyin sapı ve omurilikteki belirli kümelerde oldukça fazla lokalizedir. Bu bölgelerden, hücreler, beyindeki çeşitli bölgelere zarar veren 5-HT içeren terminallerde biten aksonlar gönderir, yani 5-HT nöronlarının fonksiyonları bozulur. Bunlar göz önüne alındığında, 5-HT nöronlarının fonksiyon bozukluğu, majör depresyon da dahil olmak üzere çok çeşitli hastalıklara neden olmaktadır. Örnek olarak, 5-HT-aktif ilaçlar, birçok farklı klinik etkiye sahip olabilir. Majör depresyon, anksiyete bozuklukları, ağrı bozuklukları ve erken boşalma gibi çeşitli bozukluklarda faydalı olabildiği kanıtlanmıştır. SSRI'lar 5-HT için nöronal geri alım pompasını etkileme yönünden seçicidir. Bu da çok sayıda spesifik sinaptik 5-HT reseptörü (örneğin, 5-HT1A, 5-HT1D, 5-HT2A, 5-HT2C ve 5-HT3) etkileyerek sırayla sinir sistemini etkiler (Meera ve ark 2003).

1.8. Paroksetin HCl (PRK)

Paroksetin hidroklorürün, (-)-*trans*-4*R*-(4'-florofenil)-3*S*-[(3',4'-metilendioksi fenoksi)metil] piperidin hidroklorür kimyasal adıdır. Kapalı formülü $C_{19}H_{20}FNO_3 \cdot HCl \cdot 1/2H_2O$ şeklindedir. Molekül ağırlığı 374,8 g/mol'dür. Majör depresif bozukluk, sosyal anksiyete bozukluğu, obsesif kompulsif bozukluk, panik atak, genel anksiyete bozukluğu, posttravmatik stres bozukluğu tedavisinde kullanılan serotonin geri alım inhibitörüdür (FDA).



Şekil 1.4. Paroksetin HCl molekül yapısı (FDA)

Kokusuz beyaz bir toz olan Paroksetin HCl'nin erime noktası 120-138 °C'dir. Sudaki çözünürlüğü 5.4 mg/mL'dir (FDA). Paroksetin, rasemik bir karışım değildir. Saf enantiyomerdir. Bu onun farmakokinetiğinin diğer bazı SSRI ilaçlara göre daha uniform olmasını sağlar (Yüksel 2007)

Paroksetin, nöronal zardaki nörotransmitter için aktif transfer mekanizması ile etkileşime girerek serotoninin sinaptosomal yeniden alımını etkili ve seçici bir şekilde önler. Bu inhibisyon, sinaptik yarıktaki serotonin birikmesine ve dolayısıyla serotoninergik iletimin kolaylaştırılmasına neden olmaktadır. Böylece postsinaptik reseptör bölgelerindeki serotoninin aktivitesi uzatılır (Dechant ve Clissold 1991).

Paroksetin hidroklorür, oral dozajından sonra tamamen emilir ve doz alımından sonra 5 saat içinde maksimum plazma düzeyine ulaşır. Paroksetin, yoğun şekilde metabolize edilir ve metabolitlerin aktif olmadığı kabul edilir, metabolitler öncelikle idrarla ve bir miktar feçesle atılır. Büyük oranda CYP2D6 (sitokrom p450IID6) tarafından metabolize edildiğinden bu enzimi yavaş çalışan kişiler tarafından dikkatli kullanılması gerekmektedir (Dechant ve Clissold 1991, Aydurmuş 2016, FDA).

1.9. İlaç Analizlerinin Önemi

Etkisiz, zararlı veya düşük kaliteli ilaçların kullanılması sağlık risklerine ve fon israfına neden olacaktır. Bu konudaki sorun, olumsuz iklim koşulları ve ilaç temin sisteminin (depolama ve nakliye dahil) zayıf olması nedeni ile daha da ağırlaşmaktadır. Bunlar ilaç kalitesinin bozulmasına, aktivite kaybına ve zararlı bozunma ürünlerinin oluşmasına neden olabilir. Bütün bunlar, herhangi bir farmasötik

ürünün, etkinliğini ve güvenliğini sağlamak için farklı analitik prosedürlere tabi tutulmasını zorunlu kılmıştır. Bu nedenle, etkili bir ilaç kalite güvence ve değerlendirme sistemi geliştirilmeli ve sürdürülmelidir.

Saf etken madde ve yardımcı maddelerden oluşan ilacın analizleri için uygulanan yöntemleri; kalitatif analizler ve kantitatif analizler diye ikiye ayırabiliriz. Ayrıca ilacın kararlılığı da bu analiz teknikleriyle yapılmaktadır. Hidroliz, oksidasyon, fotokimyasal reaksiyonlar vs. gibi ilacın bozulmasına neden olan reaksiyonların da kimyasal ölçümlerinin yapılması son derece önemlidir. İstatistiksel metodlarla da İyi İmalat Uygulamaları (GMP) standartlarına uygunluk sağlanmaktadır (Shantier 2019).

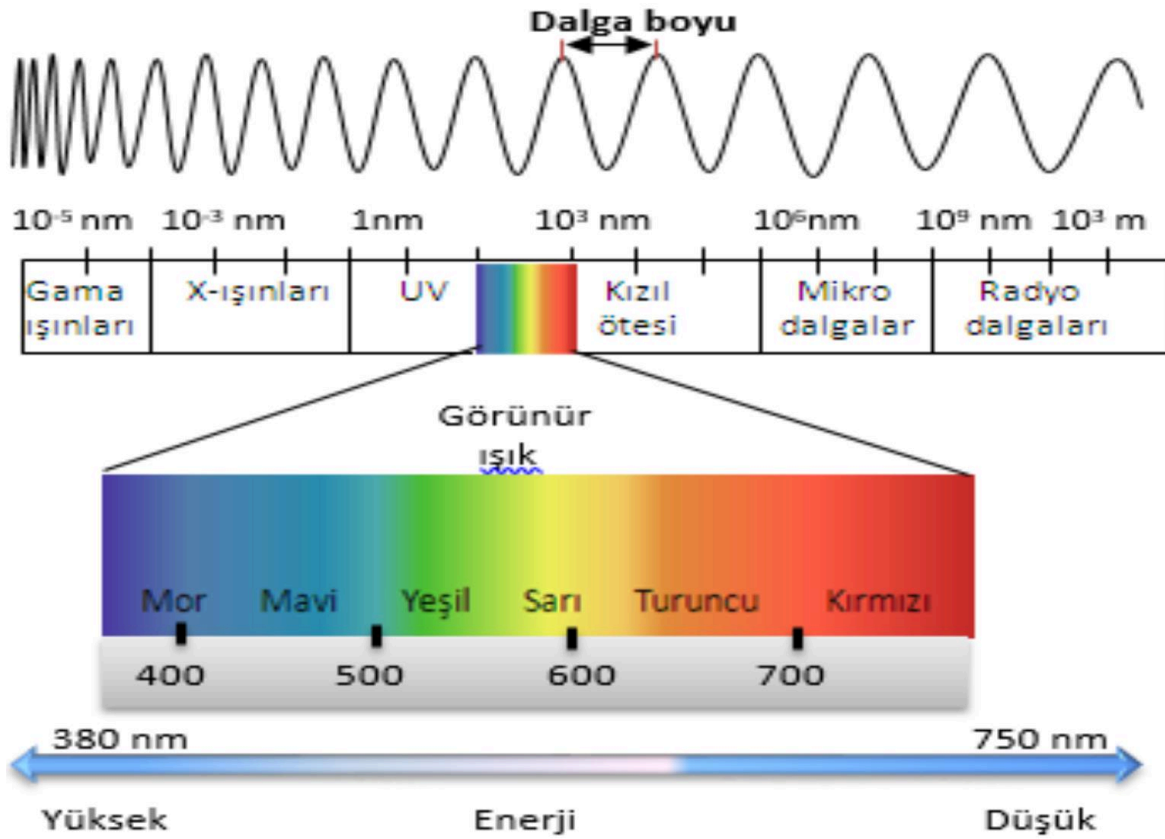
"Farmasötik kimyasallar" ve bunlardan hazırlanan dozaj formlarının standardizasyonu hayati bir rol oynar; bu sayede hasta "ilacı" izin verilen etki ve tolerans sınırları dahilinde alır. (Kar 2005)

Bilim ve teknolojiye ilerleme, sentetik ilaç üretimini oldukça artırmıştır. Bu ilaçların farmasötik formülasyonlarının kalite kontrol üretim safhasında ve insan vücudunda tayinlerine yönelik analitik yöntemlerin geliştirilmesi zorunludur. Atomik absorpsiyon spektrometresi, kapiler elektroforez, akış enjeksiyonu analizi, spektrofotometri, sıvı kromatografisi, kütle spektrometresi, tandem kütle spektrometresi, lüminesans, voltametri, polarografi, termal ve titrimetrik yöntemler farmasötik bileşiklerin tayin edilmesi için kullanılan yöntemlerdir. Kromatografik yöntemler daha yaygın olarak önerilmekte ve kullanılmaktadır. Bununla birlikte, bu yöntemler genellikle daha karışık ve pahalı ekipmanlar, solventlerin kullanımı ve imha edilmesi için provizyon, örnek hazırlama prosedürleri ve kişisel tecrübe gerektirirler. (Rojas ve Ojeda, 2009).

Spektrofotometrik ve spektrofotometrik yöntemler (özellikle UV-Görünür spektrofotometrik yöntemler) farmasötik preparatların tayin analizlerinde çokça kullanılan ekonomik, kolay, orta derecede spesifik, hassas ve hızlı yöntemlerdir (Kitimaya ve ark 2016; Palak ve ark 2016; Siladitya ve ark 2012).

1.10. Spektroskopi

Bir maddenin yapısını belirleme ve maddeyi karakterize etme amacı ile elektromanyetik dalganın madde ile etkileşimini (absorpsiyon, emisyon, saçılma gibi olayları) inceleyen bilim dalı spektroskopidir (Yavaş 2019; Anonim 2006). Dalgaboyu, frekans veya enerjinin bir fonksiyonu olarak bu elektromanyetik ışımanın şiddeti (gücü veya yoğunluğu) spektrum olarak adlandırılır (Anonim 2006).



Şekil 1.5. Elektromanyetik spektrum (Demir 2017)

1.11. Absorpsiyon Spektroskopisi

Absorpsiyon spektroskopisinde, atomlar, moleküller tarafından absorbe edilen ışın incelenmektedir. Absorbans ölçümlerinde beyaz ışın numune içinden geçirilir. Numune içindeki atomlar veya moleküllerin elektronları ışını absorplayarak enerji seviyelerini yükseltirler. Sonuç itibarıyla ışıında elektronların ilk ve son enerji düzeyi arasındaki farka denk gelen enerjiye sahip dalgaboyunun kaybı söz konusudur. Bu esnada atom veya molekül uyarılmış haldedir. Atom veya molekülün ışın absorplayarak temel halden yüksek enerjili düzeylere ulaşmalarına ait geçişler absorpsiyon

spektrumunu oluşturur. Yüksek enerjili kararsız halden temel hale geçmek için enerjilerinin fazlasını yayarlar. Bu olaya da emisyon adı verilir (Anonim 2017; Yaman 2005).

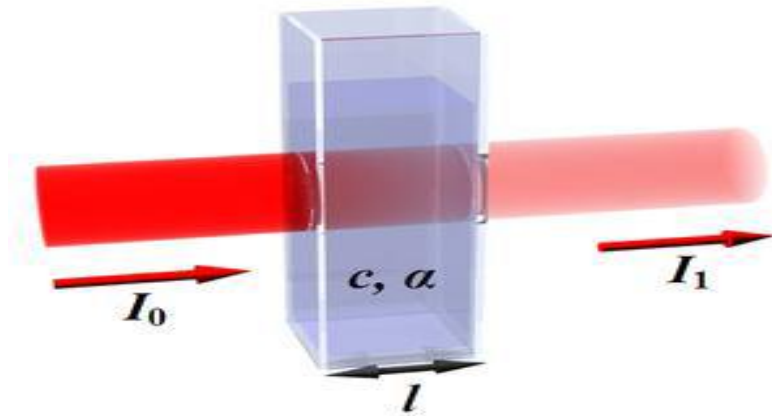
Çözelti içindeki madde miktarını çözülden geçen veya çözeltinin tuttuğu ışın miktarından faydalanarak ölçme işlemine **fotometri**, bu tip ölçümde kullanılan cihazlara da **fotometre** denir. Fotometrik ölçümde, renksiz çözümlerin konsantrasyonu da ölçülebilir.

Analiz edilen örnek üzerine ışın demetinin bir kısmını filtreler kullanarak ayıran ve gönderen aletler **fotometre** olarak adlandırılırken, yarıklar ya da prizmalar aracılığı ile bu seçiciliği yapan aletler **spektrofotometre** olarak adlandırılır.

Spektrofotometrelerde konsantrasyonu bilinen bir standart çözeltinin absorpladığı ışın miktarı (absorbans, optik dansite) ile konsantrasyonu bilinmeyen çözeltinin absorpladığı ışın miktarı karşılaştırılır. Ölçülen numune sıvı ya da gaz olabilir. Işın geçirgenliğine sahip katılarda da ölçüm yapılabilir (Megep 2011)

1.12. Lambert-Beer Eşitliği

Bir çözeltiden monokromatik ışın geçirildiğinde çözeltinin absorbansı, çözelti içindeki soğurucu maddenin konsantrasyonuna ve optik yoldaki çözelti kalınlığına bağlıdır (Anonim4; Erdik 2005).



Şekil 1.6. Numune üzerine gönderilen ve numuneden geçen ışığın şiddeti (l = ışığın numune içinde aldığı yoldur)(Yaman 2005)

Absorpsiyon olayında, absorplanan ışının şiddeti **Lambert-Beer** eşitliği ile verilir. Buna göre;

$$A = \log (I_0 / I) = \epsilon \cdot b \cdot C$$

ϵ = Molar Absorpsiyon katsayısı ($L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$), b = Işının etkileştiği yol (cm),

C =Konsantrasyon ($mol \cdot L^{-1}$)

I/I_0 oranına geçirgenlik denir ve T ile gösterilir.

$$I/I_0 = T = 10^{-\epsilon b C}$$

Absorbans ile geçirgenlik arasında

$$A = -\log (T) = 2 - \log (\%T)$$

bağlantısı vardır. $\%T$, $\%$ Geçirgenlik adını alır.

Çözeltide veya örnekte uygulanan dalgaboyunda ışığı absorplayacak birbirini etkilemeyen birden fazla atom veya molekül varsa absorbansın toplanabilme özelliğinden yararlanılır ve toplam absorbans;

$$A_T = A_1 + A_2 + \dots + A_n = \epsilon_1 \cdot b \cdot C_1 + \epsilon_2 \cdot b \cdot C_2 + \dots + \epsilon_n \cdot b \cdot C_n$$

şeklinde hesaplanır. (Erdik 2005; Skoog ve ark 1998)

1.12.1. Lambert-Beer yasasından sapmalar:

Lambert-Beer eşitliğine göre çözelti kalınlığı sabit iken A - C eğrisi homojen pek çok madde için geniş bir konsantrasyon aralığında doğrusallık göstermektedir (Erdik 2005). Ayrıca absorplayıcı analit konsantrasyonunun genellikle $0.01 \text{ mol} \cdot L^{-1}$ 'den düşük olması gerekmektedir (Skoog ve ark 1998).

Işın yolu sabit tutulurken konsantrasyon ile ölçülen absorbans arasındaki doğrusal ilişkiden sapmalar ile karşılaşılır (Skoog ve ark 1998).

1.12.1.1. Kimyasal sapmalar

Analizi yapılacak maddenin çözelti içinde disosyasyona, asosyasyona uğraması veya çözücü ile farklı bir absorpsiyon spektrumu olan bir tür oluşturmak üzere reaksiyona girmesi absorpsiyon-konsantrasyon eğrisinde sapmalara neden olmaktadır (Skoog ve ark 1998, Yavaş 2019).

1.12.1.2. Enstrumantal sapmalar

-Işının polikromatik olması: $\% 100$ oranında tek bir dalgaboyuna sahip ışın elde edilemez. Monokromatörden çıkan ışın belli bir dalgaboyu aralığındaki ışındır.

Çalışılan dalga boyundaki ışın yanında iç yüzeylerde saçılma ve yansıma nedeniyle oluşan bazı ışınlar da çıkış slitinden geçip detektöre ulaştığında Beer yasasından sapmalara neden olurlar.

Aletsel sapmalar her zaman analitin absorbansının düşük okunmasına sebep olur (Skoog ve ark 1998, Yavaş 2019).

1.13. Mor Ötesi ve Görünür Bölge Spektroskopisi

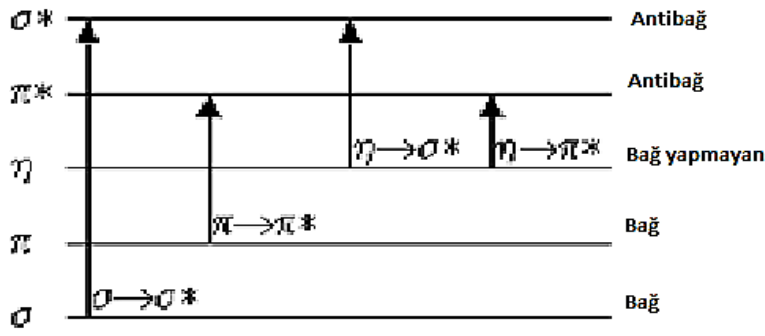
Lambert-Beer eşitliğine göre moleküllerin monokromatik ışınları absorplayarak uyarılmasına dayanmaktadır (Yaman 2005). Moleküllerdeki mor ötesi ve görünür bölge ışınlarının soğurulması elektronik uyarılmaya neden olur. Bu uyarılma yanında titreşim ve dönme uyarılmaları da olduğu için mor ötesi spektrumunda hem karışık hem de geniş bir absorpsiyon bandı elde edilir. (Yaman 2005, Erdik 2005, Yavaş 2019).

1.13.1. σ , π ve n Molekül Orbitallerindeki Elektron Geçişleri

Moleküldeki elektronik uyarılma ve geçişlerin anlaşılabilmesi için molekül orbitallerinin bilinmesi gerekmektedir. Bu orbitaller; bağ (bonding), karşı bağ (anti bonding), bağ dışı (non bonding) molekül orbitalleridir.

Bir molekülde bağ molekül orbitalleri düşük enerjiye, karşı bağ molekül orbitalleri ise yüksek enerjiye sahiptir. Tek bağ bulunduran bir molekülde bağ molekül orbitalleri sigma (σ) şeklinde, karşı bağ molekül orbitalleri ise σ^* şeklinde gösterilmektedir. Bu orbitallerde bulunan elektronlar σ ve σ^* elektronları olarak adlandırılmaktadır. Çift bağlı moleküllerde iki tür molekül orbital vardır. Bunlar σ ve π (π) türü molekül orbitalleridir. π ile gösterilen molekül orbitaller, bağ ve karşı bağ molekül orbitaller şeklinde olup, bunlar da sırasıyla π ve π^* şeklinde gösterilmektedir. Bu orbitallerde bulunan elektronlar π ve π^* elektronları olarak adlandırılmaktadır. Bu orbitaller dışında bazı moleküllerde n ile gösterilen bağ yapmayan bağ dışı orbitaller de mevcuttur. Bu orbitalde bulunan ortaklanmamış elektronlar n elektronları olarak adlandırılır(Skoog ve ark 1998, Yavaş 2019).

σ , π ve n molekül orbitallerindeki elektron geçişleri birçok organik molekül ve iyonlarda ayrıca bazı inorganik anyonlarda da görülmektedir. Işınlardan soğurulması ile $\sigma \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \sigma^*$, $n \rightarrow \pi^*$ ve $\pi \rightarrow \pi^*$ geçişleri olabilir (Skoog ve ark).



Şekil.1.7. Elektronik geçiş seviyeleri (Skoog ve ark 1998)

σ- σ* Geçişleri: σ - molekül orbitalinde bulunan bir elektron, ışın absorplayarak σ* molekül orbital düzeyine çıkarılarak uyarılır. Diğer geçişlere oranla bu geçişler için daha büyük enerji gereklidir ve bu enerji vakum UV bölgesi ışınları ile sağlanmaktadır.

n-σ* Geçişleri : Bazı doymuş organik bileşiklerde ortaklanmamış e- çifti bulunabilir. σ- σ* geçişlerine göre daha düşük enerji gerektirirler. n-σ* geçişi 150 – 250 nm aralığındaki dalgalaboylarına sahip ışınlarla sağlanmaktadır. Bu türdeki geçişler için enerji gereksiniminin bağ türüne ve daha az ölçüde molekül yapısına bağlı olduğu bilinmektedir. n-σ* geçişlerine özgü molar absorptivite katsayıları genellikle 100-3000 L.mol⁻¹.cm⁻¹ aralığında yer almaktadır (Skoog ve ark 1998).

n- π* ve π- π*: π ve n orbitallerindeki elektron 200 – 700 nm aralığındaki dalgalaboylarına sahip ışınları absorplayarak π* molekül orbitali düzeyine uyarılır. Her iki geçiş de, molekülde π-elektronlarına sahip doymamış fonksiyonel grupların yani kromoforların olduğunu gösterir. n-π* geçişlerinin molar absorptivite katsayısı 10 –100 L.cm⁻¹.mol⁻¹ aralığında yer almaktadır.

π- π* geçişlerinde ise molar absorptivite katsayısı 1000 – 10000 Lcm⁻¹ mol⁻¹ arasındadır. n-π* geçişlerine ait pikler çözücünün polarlığı arttıkça kısa dalgalaboyuna kayarlar. Buna maviye kayma ya da hipsokromik kayma denir. π-π* geçişlerinde ise ters bir eğilim yani kırmızıya kayma gerçekleşir. Buna batokromik kayma denir.

n-π* ve π-π* geçişleri için enerji sistemi çözücü etkisinden başka, doymamış bağ sayısına, fonksiyonel grupların cinsine, doymamış bağların konjuge olup olmamasına, konjugasyon varsa bunun sayısına da bağlıdır. Konjugasyon olayında molekül çok daha kararlı hale geldiğinden molekül orbitallerinin enerjisinde düşmeye neden olmakta ve absorpsiyon daha uzun dalgalaboyuna doğru kaymaktadır.

Ultraviyole bölgede absorpsiyon yapmayan fakat kromoforların absorpsiyonuna etki eden gruplara oksokrom gruplar denilmektedir. Oksokromların varlığı kromoforların absorpsiyon bantlarını daha uzun dalga kaydırabilir ve ayrıca şiddetlerini de arttırabilir (Skoog ve ark 1998).

1.13.2. d ve f Elektronları ile İlgili Geçişler

Çoğu geçiş metal iyonları spektrumun mor ötesi veya görünür bölgesinde absorpsiyon yapmaktadırlar.

Lantanit serisi metallerde absorpsiyon 4f ve aktinit serisi metallerde absorpsiyon 5f elektronlarının geçişleri ile gerçekleşmektedir; birinci ve ikinci geçiş-metalleri serisi için ise absorpsiyondan 3d ve 4d elektronları sorumludur.

Lantanit ve aktinit iyonlarının çoğu ultraviyole ve görünür bölgede absorpsiyon yapmaktadırlar. Birçok organik ve inorganik moleküllerin absorblama davranışlarının aksine bu iyonların spektrumları dar, iyi tanımlanmış ve karakteristik absorpsiyon pikleri içerirler; bunlar metal iyonuna bağlanan ligand türlerinden az etkilenirler.

İlk iki geçiş serisindeki 18 elementin iyon ve kompleksleri bu elementlerin tüm yükseltgenme basamaklarında olmasa bile birinde görünür bölge ışınını absorplama eğilimindedirler. Ancak lantanit ve aktinit elementlerinin aksine bunlarda absorpsiyon banları geniştir ve kimyasal çevre faktörlerinden çok fazla etkilenirler.

Geçiş metallerinin her biri birer elektron çifti barındırabilen beş adet kısmen dolu d orbitaline sahip olmalarıyla (birinci seride 3d ve ikinci seride 4d orbitalleri) nitelenirler.

Geçiş metal iyonlarının renklerini ve bu renkler üzerinde kimyasal çevrenin etkisini açıklamak amacıyla iki teori geliştirilmiştir.

-kristal alan teorisi

-molekül orbital yaklaşımı

Her iki kuram da çözültideki geçiş-metal iyonlarının d orbitallerinin eşit enerjide kalamayacağı ve ışının absorpsiyonunun düşük enerjili d orbitallerinden yüksek enerjili d orbitallerine elektronların geçişiyle ilişkili olduğu önerisine dayanmaktadır (Skoog ve ark 1998).

1.13.3. Yük Aktarım Geçişleri

Analitik amaçlar doğrultusunda yük-aktarım geçişi yapan moleküller molar absorptiviteyi çok yüksek olduğundan oldukça önemlidir ($\epsilon_{\text{maks}} > 10000 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$)

Yük aktarım geçişinin gerçekleşebilmesi için bir türün elektron akseptörü diğer bir türün ise elektron donörü olması gerekmektedir. Böyle bir durumda ışın absorplanarak bir elektron donörden akseptör ile ilişkili olan bir orbitale geçer. Uyarılmış haldeki ürün bir nevi iç reaksiyon sonucu oluşmaktadır.

Metal-ligant komplekslerinde yük-aktarım geçişi yaygın olarak görülmektedir. Metalden ligaanta geçişlerde metalin bir yörüngesindeki bir elektronun ligantın bir yörüngesine aktarılması veya metalin bir yörüngesi boş ise ligantın bir yörüngesindeki elektronun metalin boş yörüngesine aktarımı yapılır (Skoog ve ark 1998., Anonims).

Organik maddelerin kendi aralarında yaptıkları yük aktarım geçişleri ile ilgili bilgi Bölüm 1.17’de verilmiştir.

1.14. Mor Ötesi ve Görünür Bölge Spektroskopisinde Kalitatif Analiz

Kalitatif analizler için ultraviyole ve görünür bölge spektrofotometri sınırlı bir uygulamaya sahiptir(Skoog ve ark 1998.). Kromoforların absorpsiyon bantlarının oldukça geniş olması ve diğer kromoforların absorpsiyon bantları ile örtüşmesi gibi durumlar nedeniyle ultraviyole ve görünür bölge spektrofotometri nitel analiz açısından uygun değildir (Yıldız ve ark 1997).

1.14.1. Spektral Verilerin Grafiğe Alınması

Dikey eksen çoğu kez absorbans, yüzde geçirgenlik, log absorbans, veya molar absorptivitedir. Yatay eksen ise genellikle dakga sayısı, dalgaboyu veya frekans olabilir.

1.14.2. Çözücülerin Etkisi

Bir çözücü seçerken geçirgenlik özelliği dışında absorplayıcı sistem üzerindeki etkileri de göz önünde bulundurulmalıdır. Su, esterler, alkoller, ketonlar gibi polar çözücüler titreşim etkilerinden ileri gelen spektral ince yapıyı bozma yönelimindedirler. Hidrokarbon gibi apolar çözücülerde ise maddenin gaz fazındakine benzeyen ince yapının çok fazla bozulmadığı spektrum alınabilir. Maddelerin

absorpsiyon maksimumlarının konumu çözücünün özelliğinden etkilendiği için kalitatif amaçla absorpsiyon spektrumları kıyaslanırken her defasında aynı çözücünün kullanılması gerekmektedir (Skoog ve ark 1998).

1.14.3. Fonksiyonel Grupların Tespiti

Bir organik bileşiğin kesin biçimde yapısını belirleyemese de ultraviyole-görünür alan spektrumları kromofor olarak davranan bazı fonksiyonel grupların varlığını belirtmek için yararlıdır. Örneğin yapıda karbonil grubu varsa çözücünün artan polarlığı ile küçük dalgalı boylarına kayan 280-290 nm de zayıf bir absorpsiyon piki görülür (Skoog ve ark 1998).

1.15. Mor Ötesi ve Görünür Bölge Spektroskopisinde Kantitatif Analiz

UV-Görünür bölge spektroskopisi kantitatif analiz için en yaygın kullanılan yöntemlerden biridir (Skoog ve ark 1998).

Sağlık alanındaki nicel analizlerin % 95'inin ultraviyole görünür bölge spektrofotometrisi ile yapıldığı tahmin edilmektedir (Birke ve Mavrodineanu 1983).

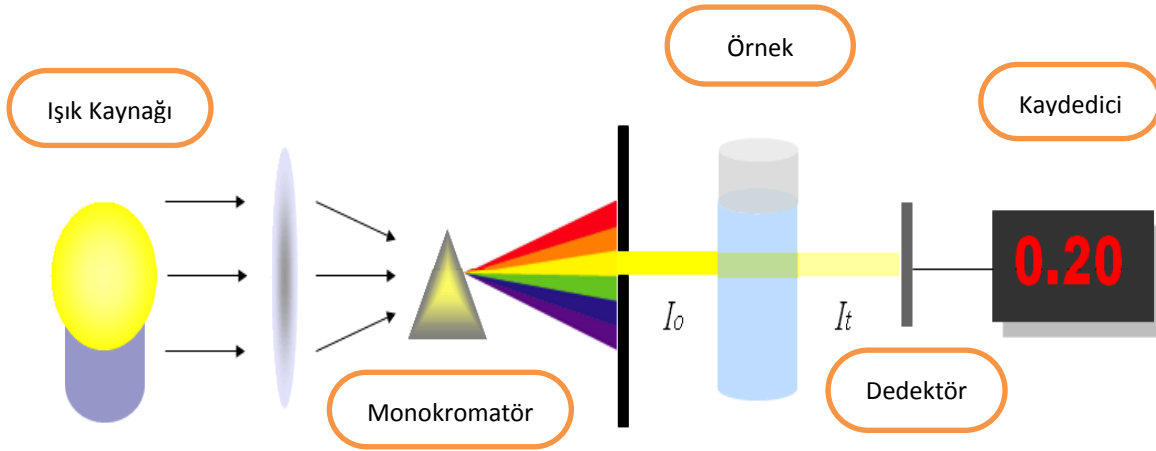
UV-Görünür bölgede ışın absorplayan organik ve inorganik türlerin nicel analizleri doğrudan yapılmaya elverişlidir. Ancak bu bölgelerde ışın absorplamayan türler çeşitli reaktiflerle muamele edilerek ışın absorplayan ürünlere dönüştürülürler (Skoog ve ark 1998).

Genel olarak maksimum duyarlılığı sağlamak amacıyla analizler bir absorpsiyon pikine karşılık gelen bir dalgalı boyunda yapılmaktadır.

UV-Görünür bölge spektrofotometrisi ile kantitatif analiz yapılırken ilk olarak dalgalı boyu seçilmelidir. Belirlenen dalga boyunda, farklı derişimlerde hazırlanan

maddenin bir seri standart çözeltisinin absorbansları okunur. Derişime karşılık absorbans grafiği oluşturulur ve kalibrasyon eğrisi çizilir. Lambert-Beer yasasına uygunluk var ise kalibrasyon eğrisi kullanılarak bilinmeyen maddenin derişimi bulunur (Skoog ve ark 1998., Demir 2017).

Genel olarak bir UV-Vis spektrofotometresinin sahip olduğu bileşenler Şekil 1.8’de gösterilmiştir:



Şekil 1.8. Bir spektrofotometrenin genel olarak sahip olduğu bileşenler (Anonim5)

Işın Kaynağı: D₂ (Döteryum), W (Tungsten), H₂ ve Xe (Ksenon) gibi sürekli ışın kaynakları kullanılır. Yaygın olarak Tungsten ve Döteryum lambaları kullanılmaktadır.

Hidrojen ve Döteryum ark lambalarında düşük basınçtaki Hidrojen veya Döteryumun elektriksel uyarılması sonucu 160-375 nm aralığında sürekli ışın yayarlar. Döteryum lambası Hidrojen lambasına göre daha şiddetli ışın toplu oluşturduğu için daha yaygın kullanılmaktadır (Skoog ve ark 1998). Günümüz Döteryum ark lambaları düşük gürültüye sahip olsa da genel olarak cihazın gürültü performansını lambanın gürültüsü sınırlandırmaktadır (Owen 1996).

Tungsten telli lamba, görünür bölge ve yakın infrared bölge için kullanılan lambadır. Bu lambada Tungstenin elektrik akımıyla ısıtılması sonucu yaydığı ışın, 350-2500 nm spektrum aralığında kullanılmaktadır. W lambasına iyot veya brom katılırsa, bu halojenler lambanın ömrünü iki kat artırır (Skoog ve ark 1998). Tungsten/halojen lambaları düşük gürültüye sahiptir (Owen 1996).

Ksenon ark lambası, ksenon gazından geçirilen elektrik akımı şiddetli bir sürekli ışın oluşturur. Bu ışın 200-1000 nm spektrum aralığında kullanılmaktadır (Skoog ve ark 1998). Fakat gürültüsü Döteryum ve tungsten lambalardan çok daha fazla olduğundan

sadece yüksek yoğunluğun önemli olduğu durumlarda difüz reflektans ölçümlerinde kullanılmaktadır (Owen 1996).

Kuvars 200-320 nm arasında UV ışını geçirdiğinden; bu bölgede çalışmak için lambaların pencereleri, mercekler, örnek kaplarının çeperleri ve dedektörün giriş penceresi kuvarstan yapılır. 320-700 nm arasında ise cam kullanılabilir (Yıldız ve ark 1997).

Monokromatör: Polikromatik ışın demetinden monokromatik ışın elde edilmesini sağlayan düzeneğe denir. Prizmalar veya optik ağılar monokromatör amacıyla kullanılmaktadırlar.

Prizmalarda çalışılması gereken monokromatik ışının seçilmesi farklı λ 'daki ışığın prizmaya girişte ve çıkışta farklı miktarlarda kırılması prensibine dayanmaktadır. Monokromatik ışın prizmanın ışın kaynağına göre döndürülüp, belirli bir λ 'daki ışının bir aralıktan geçirilmesiyle elde edilir. Görünür bölgede cam prizmanın ayırımı kuvars prizmadan çok daha iyidir (Yıldız ve ark 1997).

Optik Ağ: Günümüzdeki monokromatörlerin tamamına yakını optik ağıdır (Skoog ve ark 1998). Paralel ve birbirine yakın yivlerin bulunduğu bir yüzeyle etkileşen polikromatik ışın bu yüzeyden geçtikten veya yansıdıktan sonra da kırınımına uğrar. Bu tür parçalar geçirgen optik ağ veya yansıtan optik ağ adını alır. Ultraviyole görünür bölgedeki optik ağılar mm de 300-2000 yiv içerirler (Skoog ve ark 1998, Yıldız ve ark 1997).

Dedektörler: Işın kaynağından gelen ışının şiddetini ölçen cihaz bileşenidir. Ultraviyole görünür bölgede kullanılabilen 3 tür dedektör vardır.

–Fotovoltaik Dedektör: üzeri selenyum veya silisyum gibi bir yarıiletken madde ile kaplanmış bakır veya demir elektrot içermektedir. İkinci elektrot olarak çalışan yarıiletkenin dış yüzeyi altın veya gümüş ile kaplıdır. Işın yarıiletken tarafından absorplandığında iletkenlik bandına geçen e- lar nedeniyle bu yarıiletkenle temasta olan Ag veya Au metal filmi arasında bir gerilim farkı oluşur. Yarıiletken üzerine düşen fotonların sayısı ile oluşan elektrik akımının şiddeti doğru orantılıdır.

Fotoiletken dedektörlerde ise PbS, CdSe, ve CdS gibi yarıiletkenler tarafından ışık absorplandığında iletkenlik bandına çıkan elektronlar ışık şiddeti ile orantılı bir elektrik akımı oluşturur (Skoog ve ark 1998, Yıldız ve ark 1997).

–Fototüp: yarı silindir şeklinde bir katot ve tel şeklinde anot içermektedir. Alkali metal oksit filmlerden yapılan fotokatotlar üzerine düşen fotonlar bu yüzeyden e-koparır ve e-‘lar bir anotta toplanarak elektrik akımına çevrilir.

–Fotoçoğaltıcı Tüp: Fotokatod yüzeyinden foton çarpması ile fırlatılan elektronlar dinot denilen yüzeylere doğru elektriksel alanda hızlandırılır ve dinoda çarpan her elektron dinot yüzeyinden 3-5 elektron daha koparır. Böylece sayıları giderek artan elektronlar sonunda bir anotta toplanarak elektrik akımına çevrilir. Fotoçoğaltıcılar ultraviyole ve görünür bölge ışınlarına çok duyarlı ve hızlı yanıt vermektedirler (Skoog ve ark 1998, Yıldız ve ark 1997).

Fotodiyot dizisi ile birçok dalgaboyunda aynı zamanda ve çok hızlı bir biçimde ölçüm yapılabilir (Yıldız ve ark 1997). Sinya/gürültü oranı, duyarlık gibi parametrelerde fotoçoğaltıcı tüpler kadar iyi değildir (Skoog ve ark 1998).

Örnek kapları: Bir absorpsiyon cihazının diğer parçalarında olduğu gibi numune kabı veya hücreleri ilgilenilen dalga boyu bölgesinde ışığı geçiren materyallerden yapılmış olmalıdır. Kuvarz 350 nm infrared bölgede 3 µm dalga boyuna kadar geçirgendirler. Silikat camlar 350-2000 nm arasında kullanılabilirler. Plastik kaplar görünür bölgede uygulama alanı bulmuştur. Kuvarz prizmalar ise ultraviyole ışınlarını, görünür ışığı ve IR yakın bölge ışınlarını geçirdiği için bu bölgelerde çalışmaya en uygun numune kaplarıdır. Kuvartz prizmalar cam prizmalarla karşılaştırıldığında daha pahalıdır.

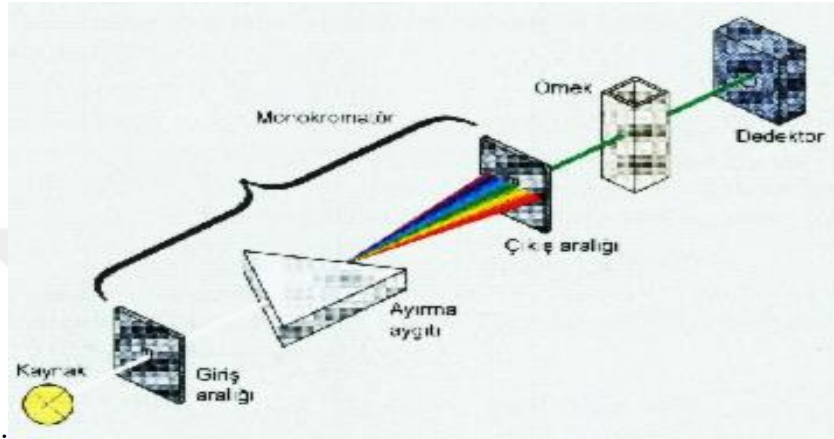
Küvetler dikdörtgen prizma şeklinde olup, genişlikleri 0,1-10 cm arasında değişir. En çok kullanılan küvetler ise genişliği 1 cm olanlardır (Yavaş 2019, Skoog ve ark 1998).

1.16. UV-Görünür Bölge Spektrofotometreleri

İki tür spektrofotometre kullanılmaktadır. Aşağıda iki spektrofotometre ile ilgili bilgiler verilmiştir.

1.16.1. Tek Işın Yollu Spektrofotometre

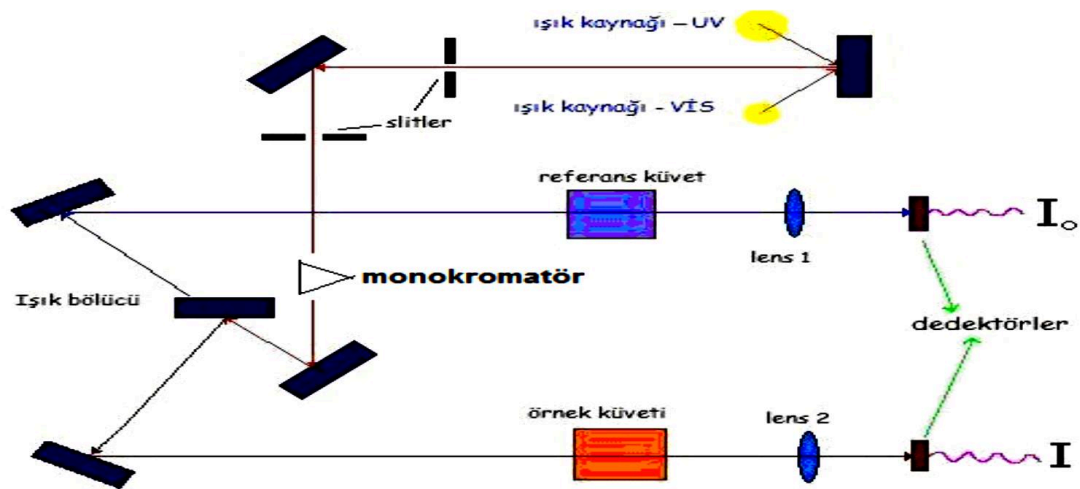
Kaynaktan çıkan ışın bir mercek ile toplanarak monokromatöre gönderilir, dalgaboyu seçiminden sonra örnekle etkileştirilir. Örneğin ışığı absorplama miktarı uygun bir dedektörle ölçülür, bu sinyal çoğaltılır ve galvanometrede okunur. Böyle her bir bileşenin aynı ışın yoluna koyulduğu cihazlara tek ışık yollu spektrofotometre denir (Yıldız ve ark 1997).



Şekil 1.9. Tek ışın yollu spektrofotometrenin bileşenleri (Gümüştaş)

1.16.2. Çift Işın Yollu Spektrofotometreler

İki ışın demetiyle çalışan spektrofotometrelerde monokromatörlerden çıkan ışınlar, iki demete ayrılır ve bunlar örnekten ve referans çözeltiden aynı anda geçirilir. Böylece referans ve örneğin absorpsiyonu sürekli karşılaştırılarak analiz yapılır (Skoog ve ark 1998; Yıldız ve ark 1997).



Şekil 1.10. Çift ışın yollu spektrofotometrenin bileşenleri (Yaman 2005)

1.17. Organik Maddeler Arasındaki Yük Aktarım Kompleksleri

Organik maddeler de kendi aralarında yük aktarım kompleksleri vermektedirler. Bu komplekslerin tam yapıları ve bağ türleri çok iyi anlaşılamamış olup bazı açıklamalar yapılmıştır. Örneğin antrasenle tetrasiyano etilen yeşil renkli bir kompleks oluştururlar. Tetrasiyanoetilende bulunan siyano gruplar pi elektronlarını çekerek karbon-karbon bağı üzerinde kısmi pozitifliğe sebep olurlar. Antrasendeki pi elektronları yoğun negatiflik nedeniyle tetrasiyanoetilenle doğru aktarılırlar ve bu aktarılan elektronlar rezonans sistemin her yerine dağılırlar. Böylece yük aktarım kompleksini oluştururlar (Gündüz 2012).

Yük transfer kompleksleri, iki rezonans yapısının bir hibriti olarak karakterize edilirler. Yük-transfer komplekslerinin genellikle yoğun renkli olması, bir elektronik geçiş ile birlikte olur, burada bir elektronun önemli bir fraksiyonu, vericiden alıcıya transfer edilir (Bayraktar 2009). Elektronun bu aktarımına iç redoks olayı da denilmektedir (Ökten ve ark 2003).



Bu ikinci yapı, 'yük-transfer yapısı' toplam elektronik yapıya sadece küçük bir katkıda bulunur; yani , bu ikinci yapı , birkaç kcal/mol'lük bağ ile iki bileşenin bir arada bulunduğu yapıdır (Bayraktar 2009).

Literatürde ilaçlarla oluşturulan yük transfer kompleksleriyle ilgili çok sayıda çalışma bulunmaktadır:

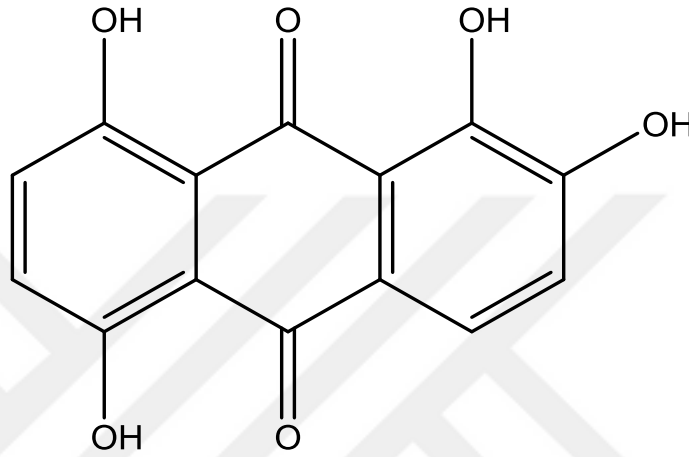
Kel ve Ulu (2011) π akseptörü olan 7,7,8,8-tetrasiyankinodimetan (TCNK) ve 2,3-dikloro-5,6-disiyano-1,4 benzkuinon (DDK) ile bisoprolol ilacının yük transfer reaksiyonunu çalışmışlardır.

Alzoman ve ark (2013) Rosuvastatin kalsiyum ilacı ile π akseptörü olan tetrasiyanoetilen, *p*-kloranilik asit, 2,3-dikloro-5,6-disiyano-1,4-benzokuinon (DDK), 2,3,5,6-tetrabromo-1,4-benzokinon, 1,3,5-trinitrobenzen, 2,3,5,6-tetrakloro-1,4-benzokinon, 7,7,8,8-tetrasiyano-kinodimetan (TCNK) ve 2,4,7-trinitro-9-florenon'un oluşturduğu yük transfer komplekslerini çalışmışlardır.

Sameer ve ark (2016)) π akseptörü olan pikrik asit ve iyodin ile lansoprazol ilacının oluşturduğu yük transfer kompleksini çalışmışlardır

1.18. Kuinalizarin

Bir polifenolik boyar madde olan Kuinalizarin (1,2,5,8-tetrahidroksi-antrakinon) çözeltinin pH durumuna göre turuncudan maviye kadar renk değişimi gösterebilmektedir. Kuinalizarin, kromojenik özelliği sayesinde metallerle renkli şelatlar oluşturduğu için. 1950'lerden beri metal iyonlarının konsantrasyonunu tayin etmek amacıyla kullanılmaktadır (Shewkat 2017).



Şekil 1.11. Kuinalizarin molekül yapısı (Temel 2019)

Farmasötik analizlerde de kuinalizarin sıklıkla analitik bir reaktif olarak kullanılmaktadır ve literatürde çok sayıda çalışma yer almaktadır.

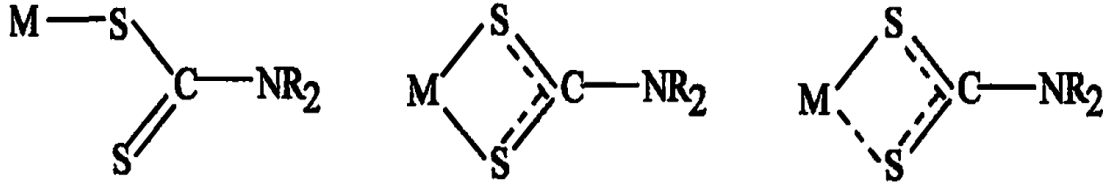
Piroksicam, tenoksicam, albendazol, azitromisin, sefalekssin, sumatriptan süksinat gibi ilaç etken maddelerinin spektrofotometrik tayininde kromojenik reaktif olarak kullanılmıştır. Bu ilaç tayinlerinin metodları daha çok yük transfer reaksiyonuna dayanmaktadır (Al-Neaimy ve Al-Delymi 2013).

Belal ve ark (2016) valproat sodyum ilacının spektrofotometrik tayini için kuinalizarinle oluşturduğu yük transfer kompleksiyle yeni bir metot geliştirmişlerdir.

Gouda ve Malah (2013) pregabalin ve gabapentin ilaçlarının kuinalizarin ile oluşturdukları yük transfer kompleksi üzerinden spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir.

1.19. Ditiyokarbamik Asit Türevleri

Ditiyokarbamik asit tuzlarının, yüksek nükleofilik özelliğinden dolayı bazı radyofarmasötik ajanları ve redoks reaksiyonları için potansiyel metal komplekslerinin elde edilmesinde ligant olarak kullanıldığı literatürde belirtilmektedir (Usanmaz 2008). Ditiyokarbamik asit tuzlarının aşağıda metallerle oluşturdukları bağ türleri gösterilmiştir:



Şekil 1.12. Ditiyokarbamatların metallerle oluşturduğu bağ türleri (Subaşı 2003)

Ditiyokarbamatların metallerle selasyon yapma özelliklerinden analitik kimyada, atık suların arıtılmasında, seker ve kagıt üretiminde, tarımda, kauçuğun vulkanizasyonunda yararlanılmaktadır (Usanmaz 2008, Subaşı 2003).

Ditiyokarbamat komplekslerinin antibakteriyel, antitüberküloz, antifungal ve antioksidan özelliklerine sahip olmaları biyolojik açıdan önemli hale gelmelerini sağlamıştır (Kanchi ve ark 2014). Bazı sentezlenmiş metal ditiyokarbamatlar radyofarmasötikler ve teşhis kiti bileşenleri olarak tıbbi amaçlı kullanılmaktadır (Kalia ve ark 2009).

Watanabe ve ark (1978) Mangani 35 idrar numunesinden amonyum pirolidin ditiyokarbamat ve sodyum dietilditiyokarbamat ile ekstrakte etmişlerdir.

Iturbide-Casas ve ark (2018) mangani enteral beslenme ürünlerinden bulut noktası ekstraksiyonu yöntemini kullanarak amonyum pirolidin ditiyokarbamat ile ekstrakte etmişlerdir.

Alpdoğan ve Sungur (1999) metoprolol tartaratın tabletlerden tayini için spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemde ilaç maddesi bazik ortamda CS₂ ile ditiyokarbamat türevine dönüştürülerek Cu²⁺ ile sarı renkli kompleks oluşturma sağlanmıştır.

El-Ries ve ark (2000) propranolol HCl ve metoprolol tartaratın tabletlerden tayini için spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. . Bu yöntemde ilaç maddesi bazik ortamda CS₂ ile ditiyokarbamat türevine dönüştürülerek Cu²⁺ ile sarı renkli kompleks oluşturma sağlanmıştır. Alpdoğan ve Sungur'un çalışmasından farklı olarak

oluşan kompleksi MIBK çözücüsüne ekstrakte ederek bu çözücü içinde AAS ile direkt analiz yoluna gitmiştir.

Gölcü ve Ark (2001) propranolol ilacından Cu^{2+} , Ni^{2+} , Co^{2+} ditiyokarbamat türevi oluşturarak ilacın tayini için spektrofotometrik bir yöntem geliştirmiştir.

1.20. Analitik Metotların Validasyonu

1.20.1. Analitik Prosedür

Bir analitik işlemin belirlenen sınırlar içerisinde gerçekleştirilme şeklini ifade etmektedir. Her bir analitik işlemi işletebilmek için gerekli her basamağı ayrıntılı bir şekilde açıklamalıdır (ICH-Q2, Harris 2015).

Bir analitik yöntemin planlanan amaç için kabul edilebilir olduğunun kanıtlanması yani yöntemin geçerli kılınması gerekmektedir. Yöntemin geçerli kılınması için gerekli mevzuat aşağıdaki çalışmaları içermektedir:

- Spesifiklik
- Doğrusallık
- Aralık
- Doğruluk
- Kesinlik
- Gözlenebilme ve tayin sınırı
- Sağlamlık (Harris 2015)

1.20.2. Spesifiklik

Bir analitik metodun validasyonunda mevcut bileşenler (ortamda bulunan safsızlıklar, indirgenler, matris) içinde analit maddenin kesin olarak değerlendirilebilirliğini yani ayırt edilebilirliğini ifade etmektedir.

Analitik bir prosedürün belirli bir analit için spesifik olduğunu kanıtlamak her zaman mümkün değildir. Bu durumda, gerekli ayırt etme seviyesine ulaşmak için iki veya daha fazla analitik prosedürün bir kombinasyonu önerilmektedir (ICH-Q2).

Bir tayin yöntemi geliştirilirken spesiflik için analiti içeren numuneye hangi safsızlığın kasıtlı olarak ilave edilmesine karar verilmesi gerekmektedir. Bir ilaç

formulasyonunun analizinde mümkün olan bütün ara ve yan ürünler, katkı maddeleri, bozunma ürünleri ortama eklenerek karşılaştırma yapılmaktadır (Harris 2015).

1.20.3. Doğrusallık

Doğrusallık, bir analit konsantrasyonunu ölçülen bir parametrenin fonksiyonu olarak gösteren kalibrasyon eğrisinin oluşturduğu hattın ölçüsünün değerlendirilmesidir.

Doğrusallığın oluşturulması için en az 5 konsantrasyon önerilmektedir. Korelasyon katsayısı (r^2), y-kesişme noktası, regresyon çizgisinin eğimi sunularak doğrusallık hakkında bilgi verilmektedir (ICH-Q2, Harris 2015).

1.20.4. Aralık

Bir analitik prosedürün uygun bir doğrusallık, doğruluk ve hassasiyet seviyesine sahip olduğu kanıtlanmış olan üst ve alt konsantrasyonlar (bunlar da dahil olmak üzere) arasındaki aralıktır (ICH-Q2, Harris 2015). Bu aralıkta metot kabul edilebilir bir belirsizlikle sonuç sağlamaktadır. (Eurachem)

1.20.5. Doğruluk

Doğruluk, bir analitik yöntem ile elde edilen sonuçların gerçek kabul edilen sonuca yakınlığını ifade eder.

Analitik prosedürün bilinen saflıktaki bir analite uygulanması, önerilen analitik prosedürün sonuçlarının doğruluğu belirtilmiş ikinci bir iyi bilinen prosedürün sonuçlarıyla karşılaştırılması veya standart ilavesi gibi çeşitli yöntemlerle belirlenebilir.

Doğruluk, gerçek değer ile bulunan değer kıyaslanırken belirli bir güven aralığında % geri kazanım, mutlak hata ya da bağıl hata terimleri ile açıklanır (Merey 2019, ICH-Q2, Harris 2015).

Mutlak Hata: $\varepsilon_m = I y_g - y_y I$

Bağıl Hata: $\varepsilon_b = I y_g - y_y I / y_g$

y_g :Gerçek Değer; y_y :Yaklaşık Değer (Ortakçı 2019)

Analitik yöntemler, bağıl hatalarının büyüklüğüne bağlı olarak üç gruba ayrılabilir:

Deneyssel bir sonuç doğru sonucun % 1'i içinde olduğunda, analitik yöntem oldukça doğrudur.

% 1 ile % 5 arasında bağıl hatalara neden olan yöntemler orta derecede doğrudur.

Ancak %5'ten daha büyük göreceli hatalar, düşük doğrulukta yöntemler üretmektedir (Yiğit 2019).

1.20.6. Kesinlik

Kesinlik, geliştirilen bir yöntem ile tekrarlanan ölçümlerin birbirine olan yakınlığını ifade eder (ICH-Q2, Harris 2015)

Varyans, standart sapma, bağıl standart sapma (varyasyon katsayısı) ile belirli bir güven aralığında verilmelidir. (Skoog ve ark 1996)

Bağıl Standart Sapma (BSS): Standart sapmanın ortalama değere bölünmesi ile hesaplanmaktadır.

$$BSS = s / \mu \quad (\mu : \text{Örneklem ortalaması})$$

Varyans:.. Standart sapmanın karesi (s^2) olarak bilinmektedir.

Varyasyon Katsayısı (VK): Bağıl standart sapmanın 100 ile çarpımıdır.

$$VK = BSS \times 100$$

Güven Aralığı, gerçek olarak kabul edilen ortalamanın ölçülen ortalama olan uzaklığını gösteren bir sayıdır (Özcan 2019).

Kesinlik: tekrarlanabilirlik, ara kesinlik ve tekrar elde edilebilirlik olmak üzere üç düzeyde incelenmektedir. (ICH-Q2)

1.20.6.1. Tekrarlanabilirlik

Test içi kesinlik olarak adlandırılmaktadır. Bir numunenin aynı koşullarda kısa zaman aralıklarıyla aynı kişi tarafından yapılan ölçümlerinin yakınlığı ile açıklanmaktadır (ICH-Q2).

Cihaz kesinliği olarak da bilinmektedir. Ölçüm sonuçlarındaki değişkenlik, cihaz yanıtının değişkenliğinden kaynaklanabilir (Harris 2015).

1.20.6.2. Orta (Ara) Hassasiyet

Laboratuvar içi farklılığı ifade eder. Rastgele olayların analitik prosedürün kesinliği üzerindeki etkilerinin belirlenmesi amacı ile aynı laboratuvar da farklı günler, farklı analistler, farklı ekipmanlar gibi varyasyonları içermektedir (ICH-Q2). Her bir analiz taze reaktifler ile yapılabilir (Harris 2015).

1.20.6.3. Tekrar Elde Edilebilirlik

Laboratuvarlar arası bir çalışma ile değerlendirilir (ICH-Q2). Aynı numuneden alınan örnek kısımlarının farklı laboratuvarlarda farklı kişiler tarafından analiz edildiğinde gözlenen tekrarlanabilirliğin en genel ölçüsüdür (Harris 2015).

1.20.7. Dedeksiyon (Gözlenebilme) Sınırı (LOD)

Analitik prosedürün dedeksiyon sınırı, bir numunede analit maddenin belirli bir güven seviyesinde tespit edilebilebilen düşük miktarıdır (ICH-Q2, Gündüz 2010).

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

(m; kalibrasyon eğrisinin eğimi iken, SS; korelasyon doğrusunun y ekseninden standart sapmasıdır) (ICH-Q2, Yılmaz 2019, Harris 2015).

1.20.8. Tayin Sınırı (LOQ)

Analitik prosedürün kantitatif sınırı, bir numunede uygun hassasiyet ve doğrulukla niceliksel olarak belirlenebilen en düşük analit miktarını ifade etmektedir.

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

(m; kalibrasyon eğrisinin eğimi iken, SS; korelasyon doğrusunun y ekseninin standart sapmasıdır) (ICH-Q2, Yılmaz 2019, Harris 2015).

1.20.9. Sağlamlık

Analitik bir prosedürün sağlamlığı, çalışma parametrelerinde küçük, kasıtlı olarak yapılan değişikliklerden etkilenmeme kapasitesinin bir ölçüsüdür ve normal kullanım sırasında güvenilirliğinin bir göstergesidir. Ölçümler analitik koşulların değiştirilmesine duyarlı ise analitik koşullar kontrol edilmelidir. Değiştirilebilir parametreler:

- Üretim tarihi farklı olan kimyasallar,
- pH,
- Ekstraksiyon süresi,
- Sıcaklık,
- Basınç,
- Akış hızı,
- Uçuculuk,
- Kolon sıcaklığı
- Reaktif konsantrasyonu

gibi faktörler tanımlandıktan sonra, her bir faktör üzerinde çok az değişiklikler yapılır

Metodun sağlam olduğu parametrelerdeki küçük değişikliklerin analiz sonucuna etkisinin düşük olmasından anlaşılır (Yılmaz 2019, ICH-Q2)

.



2.ÖNCEKİ ÇALIŞMALAR

2.1. Karvedilol ile Yapılan Çalışmalar

Afaf ve Eman (2018) KRV ve Aripiprazol'ün (ARP) saf formda ve farmasötik formülasyonlarından tayini için basit, hızlı, hassas ve ekonomik spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Önerdikleri yöntem, bu ilaçların borik asit ortamında hematoksilen ile reaksiyonuna dayanmaktadır. Reaksiyon sonucu oluşan kompleksin 560 nm'de maksimum absorbands verdiğini tespit etmişlerdir. Geri kazanım yüzdesini, KRV ve ARP için sırasıyla 3-16 µg /mL ve 8-32 µg/mL konsantrasyon aralığında % 99.78 ±1.10 ve % 99.97±1.2 bulmuşlardır. KRV ve ARP için LOD değerlerinin sırasıyla 0.63 ve 1.79 µg/mL'lik ve LOQ değerlerinin ise sırasıyla 1.91 ve 5.42 µg/mL olduğunu bulmuşlardır. Yöntemin istatistiki sonuçlarının kabul edilir düzeyde olduğunu ve hem saf hem de farmasötik preparatlara uygulandığında iyi sonuçlar elde edildiğini tespit etmişlerdir.

El-Didamony ve ark (2015) tabletlerden ve biyolojik sıvılardan Telmisartan (TEL), propranolol (PRO), bisoprolol (BIS) ve karvedilol (KRV) ilaçlarının bromokresol yeşili (BKY) ve bromotimol mavisi (BTM) ile spektrofotometrik taynini yapmışlardır. Yöntemde pH ve tampon cinsi, reaktif konsantrasyonunu, ekstraksiyon çözücüsünü, çalkalama süresini incelemişler ve Job metodu ile iyon çifti komplekslerinin stokiyometrisini belirlemişlerdir. KRV için BKY ve BTM ile geliştirdikleri yöntemde; pH 2, tampon hacmini ve türünü 2 mL KCl-HCl, BKY ve BTM konsantrasyonunu 2 mL 1.0 mmol.L⁻¹, ekstraksiyon çözücüsünü diklormetan, çalkalama süresini 2 dk optimal koşullar olarak belirlemişlerdir. İyon çiftlerinin stokiyometrisini 1:1 bulmuşlardır. KRV-BTM iyon çifti için molar absorptivite katsayısını 5.86*10⁴ L mol⁻¹cm⁻¹, çalışma aralığını 1.0-11 µg /mL, LOD değerini 0.4980 µg /mL, LOQ değerini 1.6583 µg /mL; KRV-BKY iyon çifti için molar absorptivite katsayısını 5.02*10⁴ L mol⁻¹cm⁻¹, çalışma aralığını 1.0-12 µg /mL, LOD değerini 0.6675 µg /mL, LOQ değerini 2.2229 µg /mL bulmuşlardır. Tablet ilaçlar, idrar ve kan serumunda ort % geri kazanımı % 99.99 elde etmişlerdir. Yöntemin bu örneklerin her birine başarılı bir şekilde uygulanacağını göstermişlerdir.

Rani ve ark (2013) KRV'nin tayini için basit, hassas ve spesifik spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Kloroformda ilacın çözünürlüğü ve

maksimum duyarlılığı olduğunu tespit etmişlerdir. İlacın kloroform içinde maksimum dalgaboyunun $\lambda_{\max}$ 286 nm olduğunu bulmuşlardır. Kalibrasyon eğrisini 1 – 50 µg/mL arasında incelenmiş ve korelasyon katsayısını 0,998 olarak bulunmuşlardır. Tablet formülasyonundan karvedilolün geri kazanımını %96,02 bulmuşlardır. Seçilen dalga boyunda yardımcı maddelerin analizde herhangi bir etkileşimi olmadığını bildirmişlerdir. Geliştirilen yöntem doğrusallık, doğruluk, kesinlik ve özgüllük açısından doğrulanmıştır.

Nishpa (2012) toz hammadde ve tablet formülasyonundan KRV nin kantitatif olarak belirlenmesi için basit, doğru ve hızlı spektrofotometrik bir analitik yöntem geliştirmiştir. Geliştirdiği spektrofotometrik yöntemde çözünürlük parametresi çalışmıştır. Maksimum absorbans ve iyi bir spektrum verdiği için metanolü çözücü olarak seçmiştir. 242 nm maksimum absorbansta 1-5 µg/mL aralığında korelasyon katsayısını 0.998 bulmuştur. Geliştirdiği yöntemi KRV'nin farmasötik formülasyonlarına uygulamış ve % 100.2-100.6 aralığında tatmin edici bir yüzde geri kazanım elde etmiştir.

Shetty ve Narayana (2012) karvedilolün tayini için iki spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemlere Metot A ve Metot B adını vermişlerdir. Metot A, KRV ile p-dimetilaminobenzaldehit (PDAB) arasındaki kondesasyon reaksiyonuna dayanmaktadır ve oluşan renkli kompleks 601 nm'de maksimum absorbans vermektedir. Bu yöntemin optimum koşullarında çözücünün etil alkol, pH'nın 4, reaktif konsantrasyonunun % 3 lük 2 mL PDAB, sürenin 15 dk, reaksiyon sıcaklığının 60 °C olduğunu belirlemişlerdir. Metot B ise KRV ile p-kloranil arasındaki yük transfer kompleksi oluşumuna dayanmaktadır. Renkli kompleks 662 nm'de maksimum absorbans vermektedir. Bu yöntemin optimum koşullarında çözücünün aseton, reaktif konsantrasyonunun % 5 lik 1mL p-kloranil olduğunu belirlemişlerdir. Her iki yöntem için de kalibrasyon grafiği sırasıyla 50.00–250.00 ve 20.00–100.0 µg mL⁻¹ aralığında lineer olduğunu bulmuşlardır. Molar absorptivite değerlerinin ise sırasıyla 0.92×10^3 ve 0.257×10^4 L.mol⁻¹cm⁻¹ olduğunu saptamışlardır. Sonuçların istatistiksel karşılaştırmasını F testi ve Student t-testi ile % 95 güven aralığında yapmışlardır. KRV'nin farmasötik preparatlarına her iki yöntemi de başarılı bir şekilde uygulamışlardır.

Abdelwahab (2011) KRV ve hidroklorotiazidin hem dozaj formlarında hem de toz hallerinde eşzamanlı spektrofotometrik tayinleri için iki yöntem geliştirmiştir. Birinci yöntemde çift dalgaboyu analizi, ikinci yöntemde ise Q-analizi (grafiksel absorbans oranı) metodunu uygulamıştır. Her iki ilaç için de iki yöntemin validasyon çalışmalarında tabletten geri kazanım sonuçlarını yüksek bir verimle elde etmiştir.

Önal (2011) Pramipeksol, NBV, KRV, Eletriptan ilaç etken maddelerinin farmasötik preparatlardaki tayini için kolay, ucuz, hızlı, hassas ve seçici bir spektrofotometrik ve spektrofotometrik yöntem geliştirmiştir. Bu metot 7-Kloro-4-Nitrobenzofurazonun (NBF) borat tamponu ortamında ilaç etken maddeleri ile reaksiyonuna dayanmaktadır. Elde edilen kompleksin kararlılığına çözücü, pH, süre, sıcaklık etkisini incelemiştir. KRV için kloroform çözücüsünde 0.3 mL % 0.5 lik NBF ile pH 8 borat tamponu ortamında 20 dk'da 80 °C'de, 480 nm de maksimum absorbansı elde etmiştir. KRV için 7-60 µg/mL çalışma aralığında 0,055mg/L LOD ve 0,185 mg/L LOQ değerlerini bulmuştur.

Jat ve ark (2010) KRV'nin tablet ve bulk formulasından tayini için spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem, kloroform içinde 0.1 N HCl ortamında KRV ve BFM arasındaki iyon çifti kompleksinin oluşumuna dayanmaktadır. %0.05 BFM çözeltisinden 3 mL kullanmışlardır. Oluşan kompleks 414 nm'de maksimum absorbans vermektedir. Kompleksin 12 saat boyunca absorbansının değişmediğini belirlemişlerdir. Geliştirdikleri bu yöntemde 0.9995 korelasyon katsayısı ile çalışma aralığının 5-20 µg/mL olduğunu tespit etmişlerdir. Analiz sonuçlarının istatistiksel olarak validasyonunu yapmışlardır. Geliştirdikleri yeni, basit, tekrarlanabilir ve kesin yöntemi başarılı bir şekilde KRV nin tablet ve bulk formuna başarılı bir şekilde uygulamışlardır.

Laila ve ark (2010) KRV'nin insan plazmasından ve ticari farmasötik preparatlardan tayini için spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntem karvedilol ile 1-dimetilaminonaftalen-5-sülfonil klorürün (dansil klorür) 0,5M sodyum karbonat ve aseton (2:3) ortamında reaksiyonuna dayanmaktadır. Çalışmada kompleksin kararlılığına çözücü, pH, sıcaklık, süre ve Dansil klorürün etkisini incelemişlerdir. Daha sonra yöntemin validasyonunu çalışmışlardır. pH 10 da, 0.5 mL % 0.1 lik dansil klorür ve 3:2aseton:0.5 mol.L⁻¹sodyum karbonat içinde maksimum absorbansı elde

etmişlerdir. Job metoduna göre kompleksin 1:1 stokiyometrik orana sahip olduğunu saptamışlardır. 5-80 ng/mL çalışma aralığında LOD 1,90ng/mL ve LOQ 5,15ng/mL olarak bulmuşlardır. Bu metodu ticari farmasötik tabletlere başarılı bir şekilde uygulamışlardır. İnsan plazmasına uyguladıkları bu yöntemde 97.82 ± 0.373 geri kazanım değerini elde etmişlerdir.

Verma ve ark (2010) KRV'nin dozaj formlarından tayini için hızlı, ekonomik, hassas, seçici ve kolay bir yöntem geliştirmişlerdir. Bu metotları KRV'nin 285 nm dalgaboyundaki absorbansının ölçümüne dayanmaktadır. KRV'nin metanol içinde 0.9966 korelasyon katsayısına sahip 4-36 µg/mL konsantrasyon aralığında molar absorptivitesini 12.6×10^3 L/mol.cm olduğunu bulmuşlardır. Geliştirdikleri yöntemi iki farklı marka tablete uygulamışlar ve geri kazanım çalışmasında sırasıyla 99.18 ± 0.15 , 99.33 ± 0.22 değerlerini elde etmişlerdir.

Sreevidya ve Narayana (2009) KRV'nin tayini için spektrofotometrik iki yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemlerden biri bazik ortamda 402 nm'de maksimum absorbans veren iminyum tuzunu oluşturan ninhidrin ile karvedilolün reaksiyonuna diğeri ise bazik ortamda 558 nm'de maksimum absorbans veren bir kompleks oluşturan sodyum nitroprussid ve asetaldehit ile karvedilolün reaksiyonuna dayanmaktadır. Kalibrasyon grafiklerinin karvedilol-ninhidrin ve KRV-asetaldehit-nitroprussid yöntemleri için sırasıyla 0.2-1.20 ve 0.6-2.0 µg.mL⁻¹ lineer aralığında olduğunu belirlemişlerdir. Bu çalışma aralıklarında LOD nin sırasıyla 0.139, 0.418 µg.mL⁻¹ ve LOQ nun sırasıyla 0.157, 0.222 µg.mL⁻¹, molar absorptivite değerlerinin de sırasıyla 2.571×10^4 ve 1.617×10^4 L.mol⁻¹cm⁻¹ olduğunu tespit etmişlerdir. Bu yöntemleri karvedilolün tayininde farmasötik formülasyonlara başarılı bir şekilde uygulamışlardır.

Cardoso ve ark (2007) KRV'nin spektrofotometrik tayini için asetonitrilde iyot ile yük transfer reaksiyonuna, kloroformda da BKY ve BTM boyar maddeleri ile iyon çifti reaksiyonuna dayanan metot geliştirmişlerdir. KRV'nin İyot ile oluşturduğu kompleksin 363 nm'de, BTM ile oluşturduğu kompleksin 411 nm'de BKY ile oluşturduğu kompleksin 414 nm'de maksimum absorbans verdiğini tespit etmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemlerde çalışma aralıklarını sırasıyla İyot-KRV kopmpleksi için 2-7 µg.mL⁻¹, BTM-KRV ve BKY-KRV kompleksleri için 2.5-15 µg.mL⁻¹ bulmuşlardır. Bu çalışma aralıklarında korelasyon katsayılarını sırasıyla 0.9989, 0.9999, 0.9998 molar

absorptiviteyi sırasıyla 24733, 19161, 19323 $\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ bulmuşlardır., İyot, BTM, BKY ile tabletten geri kazanım çalışmasında üç farklı tableti incelemişler ve sırasıyla % 96.7-100.00, 98.8-100.9, 97.5-100.6 aralığında sonuçlar elde etmişlerdir.

Verma ve Syed (2007) farmasötik formulasyonlarda KRV'nin tayini için ekstraktif spektrofotometrik metod geliştirmişlerdir. Bu yöntem asidik ortamda kloroform içinde çözülebilen BKY ile KRV arasındaki iyon çifti kompleksinin oluşumuna dayanmaktadır. 0.1 N HCl çözeltisi içinde % 0.05 lik 3 mL BKY ile 415 nm'de maksimum absorbans elde etmişlerdir. Molar absorptiviteyi $1.8 \times 10^4 \text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ bulmuşlardır. Bu yöntemde KRV için çalışma aralığının 0.9995 korelasyon katsayısı ile 5.0-25.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olduğunu tespit etmişlerdir. Bu yöntemin geri kazanım çalışması ve istatistikle validasyonunu yapmışlardır.

Jain ve ark (2005) KRV'nin bulk ve farmasötik formulasyonlarda spektrofotometrik tayini için yöntem geliştirmişlerdir. KRV metanol içinde $15.4 \times 10^3 \text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ molar absorptivite katsayısıyla 285 nm'de maksimum absorbans verdiğini tespit etmişlerdir. Geliştirdikleri yöntemde KRV 4-36 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ çalışma aralığında tayin edilmektedir. Elde ettikleri sonuçların geri kazanım ve istatistik çalışmalarıyla validasyonunu yapmışlardır.

Gita ve ark (2005) metanol ve polietilen glikol (PEG) 400-su (2:1) karışımını kullanarak tabletlerde saf halde KRV tayini için UV spektrofotometrik yöntemler geliştirmiştir. Karvedilolün UV spektrumu, metanol ve PEG 400-su (2:1)'de sırasıyla 242 nm ve 245 nm'de maksimum absorbans göstermiştir. Geliştirdikleri yöntemde karvedilolü metanol içinde 2.0-20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ve PEG 400-su (2:1) için 1.0 – 10.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ çalışma aralığında tayin etmişlerdir.

Wang ve ark (2005) KRV ve dopaminin eşzamanlı tayini için metot geliştirmişlerdir. KRV ve dopaminin birinci türev piki sırasıyla 336 ve 302 nm'dir. Geliştirdikleri yöntemde KRV için lineer çalışma aralığını 0.002 -0.02 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dopamin için ise bu aralık 0.05 -0.6 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olarak tayin etmişlerdir. LOD değerlerini KRV için 1 ng mL^{-1} , dopamin için 0.04 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bulmuşlardır. % Bağıl standart sapmayı KRV için % 4.38, dopamin için % 4.35 hesaplamışlardır. Geri kazanım çalışmasında KRV'yi insan serumunda ve idrarında sırasıyla % 95.0-106.7 ve % 97.50-105.0,

dopamini insan serumunda ve idrarında sırasıyla %100.0-102.5 ve %97.5-105.0 kadar tespit etmişlerdir.

Legglie ve ark (2005) KRV'nin farmasötik formülasyonlarında tayini için UV spektrofotometrik ve susuz volumetrik yöntem geliştirmişlerdir. UV spektrofotometrik yöntemi KRV'yi etanol içinde çözerek 244 nm'de uygulamışlardır. 0.9999 korelasyon katsayısıyla 2.0-7.0 µg/mL aralığında iyi bir lineerlik elde etmişlerdir. Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmasında sonuçların % 2'nin altında olduğunu ve doğruluk çalışmasında da geri kazanımın % 97.5 ve 102.2 arasında olduğunu tespit etmişlerdir. Diğer yöntem ise % 1'lik violet kristal indikatörü yanında susuz 0.01 M perklorik asitle karvedilolün volumetrik tayinine dayanmaktadır. 0.999 korelasyon katsayısıyla iyi bir lineerlik elde etmişlerdir. Gün içi ve günler arası kesinlik çalışmasında bağıl standart sapma sonuçlarının % 2'nin altında olduğunu ve doğruluk çalışmasında da geri kazanımın % 96.4 ve 102.4 arasında olduğunu tespit etmişlerdir. Her iki yöntemi de kapsül ve tablet formülasyonlarına başarılı bir şekilde uygulamışlardır.

Patel (S) ve Patel (N) (2011) tablet formülasyonunda KRV tayini için UV spektrofotometrik yöntem geliştirmiştir. Basit UV spektrofotometrik yöntem, 241.2 nm'de 0.1 N HCl'deki KRV belirlenmesine dayanır. 1-12 µg / ml konsantrasyon aralığında doğrusallık elde edildi.

Imran ve Singh (2006) ezetimib ve KRV saf formda ve farmasötik formülasyonlarından tayini için yeni ve hızlı ultraviyole spektroskopik yöntem geliştirmişlerdir. Ezetimib ve karvedilol için doğrusallık aralığını, sırasıyla 2-50 µg/mL ve 2-20 µg/mL olarak elde etmişlerdir.

2.2. Nebivolol ile Yapılan Çalışmalar

Kumar ve ark (2018) NBV ve hidroklorotiazid (HCTZ) içeren kombine tabletten her iki etken maddenin tayini için iki basit ve kesin yöntem geliştirmişlerdir. Birinci yöntemde birinci türev spektrofotometresini ikinci yöntemde ise ters faz sıvı kromatografisini (LC) kullanmışlardır. NBV ve HCTZ kombine dozaj formlarından (tabletlerinden) bu ilaçların metanolde sırasıyla 294.6 ve 334.6 nm'deki birinci türev absorbansları ile kantitatif analizlerini yapmışlardır. NBV ve HCTZ için sırasıyla 8-40 µg/mL ve 10-60 µg/mL çalışma aralığının lineer olduğunu tespit etmişlerdir. LC

yönteminde ise Phenomenex Gemini C18 kolonunu (250 x 4.6 mm çapında, 5 µm partikül büyüklüğü) izokratik modda 1mL/dk akış hızında 0.05 M potasyumdihidrojenfosfat-asetonitril-metanol (30+20+50 v/v/v; pH:4) mobil fazını kullanarak analizi yapmışlardır. Dedeksiyon 220 nm’de yapılmıştır. NBV, HCTZ ve iç standart (ezetimib) sırasıyla 5.1 dk, 2.9 dk, 8.2 dk tutulma süresi ile çözmüşlerdir. Kalibrasyon eğrsini NBV için 1.0-14.0 µg/mL, HCTZ için 0.30-28.0 µg/mL olarak tespit etmişlerdir. Her iki metodun da validasyonunu yapmışlardır.

Alhemiary (2017) NBV’in farmasötik formülasyonundan tayini için hızlı, hassas ve basit bir spektrofotometrik yöntem geliştirmiştir. Geliştirdiği bu yöntem π -akseptörü olan 2,3-dikloro-5,6-disiyano-1,4-benzokuinone (DDK) ile asetonitril ortamında, 2,4-dinitrofenol (DNF) ve 2,4,6-trinitrofenol (pikrik asit; PA) ile diklormetan ortamında n-elektron donörü olan NBV’in yük transfer kompleksleşme reaksiyonuna dayanmaktadır. NBV 620 nm’de (1mL 0.1%) DDK (method A) ile, 525 nm’de (1mL %1) DNF (method B) ile ve 500 nm’de (1 mL %0.05) PA (method C) ile absorbands veren renkli yük transfer kompleksi oluşturmuştur. Optimize ettiği deneysel koşullar altında her üç yöntem için çalışma aralığını sırasıyla 4.0-40, 2-25 ve 1.0-35 µg/mL, korelasyon katsayısını sırasıyla 0.9983, 9945 ve 0.9985, molar absorptivite katsayısını sırasıyla $1.48 \cdot 10^4$, $1.76 \cdot 10^4$, $1.21 \cdot 10^4$ L.mol⁻¹.cm⁻¹ olarak tespit etmiştir. Diğer validasyon parametrelerini incelediğinde (kesinlik, doğruluk, sağlamlık, dayanıklılık, seçicilik) sonuçların oldukça iyi olduğunu gözlemlemiştir. Geliştirdiği bu üç yöntemi NBV’nin tablet formülasyonlarına başarılı bir şekilde uygulamış ve iyi geri kazanım sonuçları elde etmiştir. Tablet formülasyonlarda yardımcı maddelerin interfer etkisinin olmadığını gözlemlenmiştir.

Manohar ve ark (2013) NBV bulk ve farmasötik formülasyonundan tayini için basit, hassas ve yüksek kesinliği olan spektrofotometrik bir yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri bu yöntem metanol-pH 6.8 fosfat tamponunda (10:90) 282 nm’de NBV’nin absorbandsının ölçümüne dayanmaktadır. Çalışma aralığının Beer yasasına göre 10-50 µg/mL olduğunu tespit etmişlerdir. Korelasyon katsayısını 0.993, LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 0.677 µg/mL, 2.05 µg/mL olarak tespit etmişlerdir. Geliştirdikleri bu yöntemi NBV hammadde toz ve farmasötik formülasyonuna başarılı bir şekilde uygulamışlardır.

Murali ve ark (2013) NBV'in farmasötik ve saf formülasyonları için iki basit, hızlı, hassas ve kesin yöntem geliştirmişlerdir. Bu yöntemlerden biri bazik ortamda 1,2-naftakinon-4-sulfonat (NKS) ile NBV nin nükleofilik yer değiştirme reaksiyonuna diğeri ise kobalt tiyosiyanat ile koordinasyon kompleksi oluşturmaya dayanmaktadır. Her iki yöntemde de sırasıyla 460 nm ve 630 nm'de maksimum absorbands almışlardır. Çalışma aralığını ilk yöntemde 0.9986 korelasyon katsayısı ile 10-60 µg/mL, ikinci yöntemde 0.9984 korelasyon katsayısı ile 8.0-20.0 µg/mL bulmuşlardır. Her iki yöntemin de istatistiksel parametrelerle validasyonunu yapmışlardır.

Önal (2011) Pramipeksol, NBV, KRV, Eletriptan ilaç etken maddelerinin farmasötik preparatlardaki tayini için kolay, ucuz, hızlı, hassas ve seçici bir spektrofotometrik ve spektroflorometrik yöntem geliştirmiştir. Bu metot 7-Kloro-4-Nitrobenzofurazonun (NBF) borat tamponu ortamında ilaç etken maddeleri ile reaksiyonuna dayanmaktadır. Elde edilen kompleksin kararlılığına çözücü, pH, süre, sıcaklık etkisini incelemiştir. NBV nin spektroflorimetrik tayini için diklormetan çözücüsünde 0.8 mL % 0.5 lik NBF ile pH 8.5 borat tamponu ortamında 30 dk'da 70 °C'de, 473 nm uyarma dalgaboyunda maksimum absorbandsı elde etmiştir. NBV için 0.1-1.2 µg/mL çalışma aralığında 0,01mg/L LOD ve 0,033 mg/L LOQ değerlerini bulmuştur. Aynı optimum koşullarda spektrofotometrik çalışma da yapmıştır. 484 nm'de 2.0-40 µg/mL çalışma aralığında 0,11mg/L LOD ve 0,36 mg/L LOQ değerlerini elde etmiştir..

Parambi ve ark (2010) NBV'in tablet dozaj formundan tayini için basit, hassas, spesifik bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri bu yöntemde NBV, tetrahidrofuran çözücüsü içinde 301 nm'de 0.9999 korelasyon katsayısıyla 5-60 µg/mL aralığında lineerlik göstermiştir. LOD ve LOQ değerlerinin sırasıyla 0.82 µg/mL ve 2.76 µg/mL olduğunu tespit etmişlerdir. Geri kazanım çalışmasında % 99.3 değerini bulmuşlardır.

Rao ve ark (2010) NBV farmasötik formülasyonlarında tayini için kolay, hassas ve kesinliği yüksek olan spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. NBV, destillenmiş suda 281 nm dalgaboyunda $5.37208 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ molar absorptivite katsayısı ile maksimum absorbands vermektedir. Lineer çalışma aralığını 4.0-60.0 µg/mL olarak tespit etmişlerdir. Geliştirdikleri metodu ilacın saf ve tablet dozaj formlarına başarılı bir

şekilde uygulamışlardır. Geri kazanım çalışmalarında NBV' ün bulk ve tablet formu için sırasıyla % 98.75 ve 99.02 sonuçlarını elde etmişlerdir.

Subbayamma ve Rambabu (2009) NBV ve TRD (trandolapril) için oksidatif bağlanma reaksiyonuna dayanan kolay ve hassas 3 tane spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Metot 1, NBV'in periyodatlarda 2,3-dimetoksistrisisridin-10-on ile reaksiyonunda 520 nm de, Metot 2 ise 3-metil-2-benzotiozolinon hidrazon ile 620 nm de maksimum absorbans veren kompleks oluşumuna dayanmaktadır. Metot 3 ise periyodat ortamında TRD nin 2,3-dimetoksistrisisridin-10-on ile 520 nm'de maksimum absorbans veren kompleks oluşumuna dayanmaktadır. Metot 1, 2 ve 3 için çalışma aralığını sırasıyla 6.0-36.0 µg/mL, $0,073.10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$, 2.0-12.0 µg/mL, 6.0-36.0 µg/mL, olarak tespit etmişlerdir.

Dhandapani ve ark (2008) NBV ve Hidroklorotiyazid (HCTZ) nin kombine dozaj formundan eşzamanlı tayini için iki basit, doğru ve kesin yöntem geliştirmişlerdir. İlk yöntemde Q-Absorbans Eşitliği'nin 275 nm ve 282.5 nm'deki (NBV mak. dalgaboyunda) oluşturulması ve çözümü kullanıldı. İkinci yöntem ise 282.5 ve 271.5 nm de (HCTZ'nin maks. dalgaboyunda) eşzamanlı denkleminin oluşturulmasını ve çözümünü içermektedir. Analiz sonuçlarını istatistiksel olarak doğrulamışlar ve geri kazanım çalışmalarında standart sapmayı % 1.0'ın altında olduğunu tespit etmişlerdir. Geliştirdikleri metodu her iki etken maddeyi bulunduran kombine dozaj formuna başarılı bir şekilde uygulamışlardır.

Kamila ve ark (2007) NBV nin hammadde ve tabletten tayini için basit, hassas ve kesin bir UV spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. NBV tablet çözeltisi için 282 nm'de absorbans ölçümü almışlardır. Çalışma aralığının 0.9995 korelasyon katsayısı ile 5-50 µg/mL arasında lineer olduğunu tespit etmişlerdir. Yöntemin validasyonunda iyi kesinlik, doğruluk ve lineerlik elde etmişlerdir. İlacın ticari formülasyonlarında yardımcı maddelerin interfer etkisinin olmadığını gözlemlemişlerdir.

Mishra ve ark (2007) NBV nin hammadde toz ve farmasötik formülasyonundan tayini için üç basit, ucuz ve etkili yöntem geliştirmişlerdir. İlk yöntemde NBV 283.5 nm'de maksimum absorbans göstermektedir. Absorbans-Konsantrasyon grafiğinin 10-65 µg/mL aralığında lineerlik gösterdiğini tespit etmişlerdir. Molar absorptivite

katsayısını $6.4959 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ ve korelasyon katsayısını 0.999 bulmuşlardır. İki kolorimetrik yöntem ise suda çözünebilen Bromkrezol yeşili ve Solokrom Black T'nin NBV ile kloroformda sırasıyla 414.7 ve 515.2 nm'de maksimum absorbans kompleks oluşturmaya dayanmaktadır. Absorbans grafiğinde her iki boyar madde için lineer aralığın sırasıyla 1-11 ve 10-90 $\mu\text{g/ml-L}$ olduğunu ve korelasyon katsayısını da 0.9991 ve 0.9917 olduğunu tespit etmişlerdir. Molar absorptivite katsayısını sırasıyla 3.6677×10^5 ve $4.994 \times 10^3 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ bulmuşlardır. Geliştirdikleri bu üç yöntemi de tabletlerde başarılı bir şekilde uygulamışlardır.

2.3. Paroksetin ile Yapılan Çalışmalar

Temel (2019) PRK nin tablet dozaj formlarından tayini için basit ve ekonomik spektrofotometrik bir yöntem geliştirmiştir. Geliştirdiği yöntem PRK nin KUİN ile yük transfer kompleksi oluşturmaya dayanmaktadır. İlk olarak çalışmasında metanol, etanol, aseton, asetonitril, distile su ve kloroform çözücüleri içinde 294 nm'de 0,139 absorbans değeri ile metanolün optimum çözücü olduğunu belirlemiştir. Daha sonra süre deneyinde 180 dk'yı optimum süre olarak belirlemiştir. 294 nm'de 0,489 maksimum absorbans değerini veren $0,5 \times 10^{-3} \text{ M}$ kuinalizarin çözeltisinin optimum konsantrasyon olduğunu tespit etmiştir. 294 nm'de 0,348 maksimum absorbans değeri ile optimum sıcaklığın 25°C olduğunu bulmuştur. pH 5'in 0,348 maksimum absorbans değeri ile optimum pH olduğunu belirlemiştir. Kompleksin karakterizasyonunu IR ile stokiyometrisini Job metodu ile tespit etmiştir. Bunların sonucunda ilaç ile KUİN in oluşturduğu kompleksin 1-1 oranında reaksiyona girdiği yönünde bir mekanizma önerisinde bulunmuştur.

Nwodo ve Ibezim (2013) PRK-kloranilik asit kompleksini spektrofotometrik olarak incelemişlerdir. Kompleks 540 nm'de maksimum absorbans vermektedir. Job metoduyla kompleksin stokiyometrisinin 2:1 (ilaç:reaktif) olduğunu tespit etmişlerdir. Kompleksin 10 dk sonra sabit absorbans verdiğini ve 2 saat boyunca kararlı kaldığını gözlemlemişlerdir. Konsantrasyon aralığının 5 – 40 $\mu\text{g/mL}$ olduğunu, LOD ve LOQ değerlerinin sırasıyla 0.24 ve 0.91 $\mu\text{g/mL}$ ve Bağlı standart sapmanın % 2'nin altında olduğunu belirlemişlerdir. Geliştirdikleri yöntemi PRK'nin saf ve farmasötik dozaj formlara uyguladıklarında başarılı sonuçlar (kesinlik, doğruluk ve tekrarlanabilirlik)

elde etmişlerdir. Dozaj formlarda bulunan yardımcı maddelerin interfer etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir.

Elqudaby ve ark (2012) Klomipramin ve PRK anti-depresan ilaçlarının belirlenmesi için iki spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Yöntemler, bu ilaçlar ile molibden (V) tiyosiyanat ve demir (III) tiyosiyanat arasında oluşan iyon çifti komplekslerinin 1,2-dikloreten ile ekstraksiyonuna dayanmaktadır. PRK nin birinci yöntemde Mo(V) tiyosiyanat ile oluşturduğu kompleks 470 nm de, ikinci yöntemde Fe (III) tiyosiyanat ile oluşturduğu kompleks 500 nm de maksimum absorbands vermektedir. Birinci yöntemde PRK için lineer çalışma aralığını 10-250 $\mu\text{g mL}^{-1}$, LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 0.177 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 0.53 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ikinci yöntemde ise çalışma aralığını 10-200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 0.113 $\mu\text{g mL}^{-1}$, 0.34 $\mu\text{g mL}^{-1}$ bulmuşlardır. Geliştirdikleri yöntemi tablet formülasyonlarına başarılı bir şekilde uygulamışlardır.

Arshiya ve ark (2011) PRK, Famotidin, Kuetiapin, Dekstrometorfan, Levofloksasin, Irbesartan and Itrakonazol ilaçlarının DDK ile yük transfer reaksiyonuna dayanan bir tayin yöntemi geliştirmişlerdir. PRK'nin DDK ile 545 nm'de maksimum absorbands verdiğini tespit etmişler. Korelasyon katsayısı 5-70 $\mu\text{g/mL}$ aralığında korelasyon katsayısının 0.09973 olduğunu bulmuşlardır. Bu aralıkta LOD'nin 1.01 $\mu\text{g/mL}$, LOQ'nun ise 3.03 $\mu\text{g/mL}$ olduğunu saptamışlardır.

Walash ve ark (2010) dozaj formlardan sertralin (SER) ve PRK'nin tayini için basit ve hassas bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri metot PRK ve SER'in 2,4-dinitrofluorobenzen (DNFB) ile reaksiyonuna dayanmaktadır. SER ve PRK için elde ettikleri kompleksler sırasıyla 375 ve 390 nm'de maksimum absorbands vermektedir. SER ve PRK için çalışma aralığını sırasıyla 1-10 ve 2-20 $\mu\text{g/mL}$, LOD değerlerini 0.11 ve 0.28 $\mu\text{g/mL}$, LOQ değerlerini 0.32 ve 0.85 $\mu\text{g/mL}$ bulmuşlardır. Geliştirdikleri yöntemi SER ve PRK'in dozaj formlarına başarılı bir şekilde uygulamışlardır. Tabletlerdeki yardımcı maddelerin interfer etkisinin olmadığını tespit etmişlerdir. Elde ettikleri sonuçları referans metot ile F testi ve Student-t testini uygulayarak kıyasladıklarında önemli farklılıkların olmadığını tespit etmişlerdir.

Darwish ve ark (2009) tabletten PRK'in tayini için basit ve hızlı bir spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. Geliştirdikleri metot PRK ile 1,2-

naftokinon-4-sulfonat (NKS) arasındaki nükleofilik süstitüsyon reaksiyonuna dayanmaktadır. Oluşan turuncu renkli kompleks 488 nm’de maksimum absorbans vermektedir. Reaksiyonun kinetiğini ve stokiyometrisini çalışmışlar ve reaksiyon mekanizması önermişlerdir. Reaksiyonun optimize edildiği koşullar altında çalışma aralığının 1.0–8.0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ olduğunu bulmuşlardır. Regresyon eşitliğini 0.9992 korelasyon katsayısı ile $A = 0.0031 + 0.1609 C$ şeklinde elde etmişlerdir. Molar absorptivite katsayısını $5.9 \times 10^5 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ bulmuşlardır. LOD ve LOQ değerlerini sırasıyla 0.3 ve 0.8 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ bulmuşlardır. Bağlı standart sapmayı % 2’nin altında bulmuşlardır. Tabletten geri kazanım çalışmasında % 97.17 $\pm$ 1.06 sonucunu elde etmişlerdir.

Darwish (2005) PRK, Fluokssetin HCl, Sertralin HCl etken maddelerinin farmasötik dozaj formlarından tayini için üç farklı, basit ve hassas yöntem geliştirmiştir. Bu üç yöntem de bu ilaçların serbest sekonder amin grubunun kloranil, bromanil ve 2-3-diklorinaftokinon (asetaldehit grubu) ile etkileşimi sonucu oluşan N-alkilvinilamin reaksiyonuna dayanmaktadır. Kloranil ile oluşan kompleks 665 nm’de, bromanil ile oluşan kompleks 655 nm’de, 2-3-diklorinaftokinon ile oluşan kompleks 580 nm’de maksimum absorbans vermektedir. Reaksiyona etki eden faktörler optimize edilmiş ve optimum koşullar altında korelasyon katsayısını 0.9986–0.9999 aralığında ve LOD değerlerini 1.19 - 2.98 $\mu\text{g/mL}$ aralığında bulmuştur. Her üç ilacın farmasötik formülasyonlarından geri kazanımı 1.15-1.92 elde ettiği standart sapma ile % 99.1 - 101.3 aralığında bulmuştur.

Önal ve ark (2005) tabletlerdeki PRK tayini için basit, hassas, doğru spektrofotometrik yöntem geliştirmişlerdir. İlk üç yöntem PRK ile bromtimol mavisi (BTM), bromfenol mavisi (BFM), bromkrezol yeşili (BKY)’nin asidik tamponda iyon çifti oluşturma reaksiyonuna dayanmaktadır. Kloroforma ekstrakte edilen komplekslerin maksimum absorbans ölçümleri BTM ve BKY için 414 nm’de, BFM için 412’de yapılmıştır. Çalışma konsantrasyon aralığının sırasıyla 2–20 $\mu\text{g/mL}$, 2–16 $\mu\text{g/mL}$ ve 2–16 $\mu\text{g/mL}$ olduğunu bulmuşlardır. Dördüncü metot ise PRK’in 7-kloro-4-nitro benzofurazon ile pH 8.5 tamponundaki kenetlenme reaksiyonuna dayanmaktadır. Oluşan kompleks 478 nm’de maksimum absorbans vermektedir. Bu metot için ise lineer aralığın 2–10 $\mu\text{g/mL}$ olduğunu tespit etmişlerdir. Geliştirdikleri beşinci metot ise n-elektron donörü olan PRK ile π -akseptörü olan 7,7,8,8-tetrasiyanoquinodimetan

(TCNK) asetonitril içinde 750 ve 845 nm’de maksimum absorbands veren kompleksin oluşumuna dayanmaktadır. 845 nm’de yapılan ölçümlerde çalışma aralığının 1.5–15 µg/mL olduğunu bulmuşlardır. Bu yeni metodları PRK’in tablet formlarına uyguladıklarında başarılı sonuçlar elde etmişler ve tabletlerdeki yardımcı maddelerin interfer etkisinin olmadığını da tespit etmişlerdir.





3. MATERYAL VE METOT

3.1. Materyal

3.1.1. Kullanılan Alet ve Cihazlar

T80+ UV/VIS Spectrometer (PG Instruments Ltd)

Perkinelmer Lambda 25 UV/VIS spektrofotometresi

Varian Cary 100 Bio UV/VIS spektrofotometresi

Uni Bloc ve Gec Avery marka hassas terazileri

Hot Stirrer MS300HS marka magnetik karıştırıcı

Thermo Scientific Heraeus Fresco 21 marka santrifüj

Fisons Whirli Mixer marka vorteks

Eppendorf marka mikropipetler

Julabo SW23 marka çalkalayıcı

3.1.2. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Metanol: Merck

Etanol : Merck

Asetonitril: Merck

Metilizobutylketon : Merck

Kloroform : Merck

Aseton : Merck

KUİN : Sigma Aldrich

Etil Asetat : Merck

Diklormetan : Merck

N,N-Dimetilformamit (DMF) : Merck

1-propanol : Merck

2-propanol : Merck

Karbondisülfür : Merck

$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: Merck

NH_3 : Sigma Aldrich

NaOH : Sigma Aldrich

KOH : Merck

Asetik Asit : Merck (Glasiyel)

Laktozmonohidrat (LMH) : Glentham Life Sciences

Magnezyum Stearat (Mg Str) : Glentham Life Sciences

Mikrokristalin Selüloz (MKS) : Merck

Hidroksimetilpropilselüloz (HMPS) : Sigma Aldrich

Nişasta : Merck

Povidon K25 : Glentham Life Sciences

Sükroz : Glentham Life Sciences

Çalışmada kullanılan Karvedilol referans standardı, Bilim İlaç San. ve Tic. A. Ş. 'den ve Coronis marka (Bilim İlaç A. Ş.) 25 mg KRV içeren tablet yerel eczaneden temin edildi.

Çalışmada kullanılan NBV referans standardı, Abdi İbrahim İlaç San. ve Tic. A. Ş. 'den ve Nexivol marka 5.45 mg NBV içeren (Abdi İbrahim İlaç A. Ş.) tablet yerel eczaneden temin edildi.

Çalışmada kullanılan PRK referans standardı, Ali Raif İlaç San. Tic. A. Ş. 'den ve Paxera marka 20 mg PRK içeren (Ali Raif İlaç A. Ş.) tablet yerel eczaneden temin edildi.

3.1.3. Standart Çözeltilerin Hazırlanması

3.1.3.1. Standart KRV Çözeltileri

1000 mg.L⁻¹: 0.01 g KRV hassas terazide tartıldı ve 10 mL'lik balon jojeye aktarıldı. 5 mL metanolde çözüldü daha sonra 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi. KRV için standart çözeltiler günlük hazırlandı.

500 mg.L⁻¹: 0.005 g KRV hassas terazide tartıldı ve 10 mL'lik balon jojeye

aktarıldı. 5 mL metanolde çözüldü daha sonra 10 mL'ye aynı çözücü ile seyreltildi. KRV için standart çözeltiler günlük hazırlandı.

3.1.3.2. Standart NBV Çözeltisi

1.0 mmol.L⁻¹: 0.0443 g hassas terazide tartılan NBV, 100 mL %10 Metanol-Su içerisinde çözülerek hazırlandı. Üç günde bir yeni çözelti hazırlandı.

3.1.3.3 Standart PRK Çözeltisi

1.0 mmol.L⁻¹ : 0.0377 g hassas terazide tartılan PRK, 100 mL saf su içerisinde çözülerek hazırlandı. Üç günde bir yeni çözelti hazırlandı.

3.1.4. KUİN (1,2,5,8-tetrahidroksiantrakinon) Çözeltilerinin Hazırlanması

0.25 mmol.L⁻¹ : 0.0068 g KUİN hassas terazide tartıldı ve 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. 20 mL metanol eklendi ve katı kalmayıncaya kadar çözüldü. İyice çözüldükten sonra aynı çözücü ile 100 mL'ye kadar seyreltildi.

0.50 mmol.L⁻¹ : 0.0136 g KUİN hassas terazide tartıldı ve 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. 20 mL metanol eklendi ve katı kalmayıncaya kadar çözüldü. İyice çözüldükten sonra aynı çözücü ile 100 mL'ye kadar seyreltildi.

3.0 mmol.L⁻¹ : 0.0816 g KUİN hassas terazide tartıldı ve 100 mL'lik balon jojeye aktarıldı. 4 mL N,N-Dimetilformamit (DMF) eklendi ve katı kalmayıncaya kadar çözüldü. İyice çözüldükten sonra metanol ile 100 mL'ye kadar seyreltildi.

3.1.5. NH₃ Çözeltilerinin Hazırlanması

% 0.1'lik NH₃ : Yoğunluğu 0.91 g.mL⁻¹ olan % 25'lik NH₃ stok çözeltisinden 421 µL alınarak 100 mL'ye saf su ile seyreltildi.

% 1'lik NH₃ : Yoğunluğu 0.91 g.mL⁻¹ olan % 25'lik NH₃ stok çözeltisinden 4.21 mL alınarak 100 mL'ye saf su ile seyreltildi.

% 10'luk NH₃ : Yoğunluğu 0.91 g.mL⁻¹ olan % 25'lik NH₃ stok çözeltisinden 42.1 mL alınarak 100 mL'ye saf su ile seyreltildi.

3.1.6. Cu²⁺ Çözeltisinin Hazırlanması

2.0 mmol.L⁻¹ : Hassas terazide tartılan 0.0341 g CuCl₂.2H₂O tuzu 100 ml saf suda çözülerek 2.0 mmol.L⁻¹ Cu²⁺ çözeltisi hazırlandı.

3.1.7. MIBK İçinde CS₂ Hazırlanması

% 1’lik CS₂: 1 mL CS₂ 10 mL kadar MIBK içeren bir balon joje içine alınarak 100 mL’ye MIBK ile tamamlandı.

% 10’luk CS₂: 10 mL CS₂ 10 mL kadar MIBK içeren bir balon joje içine alınarak 100 mL’ye MIBK ile tamamlandı.

3.1.8. Asetik Asit özeltisinin Hazırlanması

% 0.5’lik Asetik Asit: Yoğunluğu 1.05 g/mL olan glasiyel asetik asitten 500 µL alınarak 100 mL’ye saf su ile seyreltili.

3.2. Yük Transfer Kompleksi Oluşturma Yöntemi

KRV ile 1,2,5,8-tetrahidroksiantrakınon (KUİN) arasında oluşan mor renkli yük transfer kompleksinin absorbansının ölçümüne dayanmaktadır. Bu alıőmada, KRV - KUİN yük transfer kompleksinin maksimum absorbans verdiği optimum koşullar belirlendi. Bunun için ilk olarak absorbansa çözücünün etkisi incelendi. Çözücü belirlendikten sonra KUİN reaktifinin konsantrasyonunun, sıcaklık ve sürenin absorbans üzerine etkisi tespit edildi. Daha sonra kompleksin stokiyometrisi Job metodu ile belirlendi. Son aşamada yöntemin yöntemin validasyonu yapıldı (De Paul ve ark 2010, Gouda ve Kassem 2012, Gouda ve Malah 2013, Alzoman ve ark. 2013, Ragaa ve ark 2013, Swamby ve Basavaiah 2014, Elqudaby ve ark 2014, Mohamed ve ark 2018).

3.2.1. KRV Tayini için Geliştirilen Yük Transfer Kompleksi Yönteminde Optimum Koşulların Belirlenmesi

3.2.1.1. Çözücünün Etkisi

İlk aşamada KRV ile KUİN’in oluşturduğu yük transfer kompleksinin en yüksek absorbansı verdiği çözücü belirlendi. Çalışmada özücü olarak metanol, etanol, 1-propanol, 2-propanol, DMF, kloroform, asetonitril, aseton kullanıldı. 1000 mg/L KRV ve 0.50 mmol.L⁻¹ KUİN stok çözeltileri her bir çözücü içinde ayrı ayrı hazırlandı. 40 mg.L⁻¹ KRV için hazırlanan 1000 mg.L⁻¹ stok çözeltiden 0.2 mL alındı ve reaksiyon kabına konup üzerine 3 mL KUİN özeltisi eklendi. 5 dakika kadar karıştırıldı. Çözeltinin hacmi 5 mL’ye çalışılan çözücü ile tamamlandı ve 10 dk daha karıştırıldı. Daha sonra hazırlanan kompleks çözeltilerinin absorbans ölçümü alındı.

3.2.1.2. KUİN Konsantrasyonunun Belirlenmesi

30 mg.L⁻¹ KRV için, 1000 mg.L⁻¹ stok çözeltisinden 0.3 mL alınarak erlenlere aktarıldı. 0.3 mL KRV içeren erlenlere 3.0 mmol.L⁻¹ KUİN çözeltisinden 0.25 – 2.25 mL aralığında olacak şekilde eklemeler yapıldı. Son hacimleri 10 mL'ye metanol ile tamamlandı. Her bir çözeltinin, kendi referans KUİN çözeltisine karşı 560 nm'de absorbans ölçümü alındı. Elde edilen sonuçlar absorbansa karşı KUİN çözeltisinin hacmi olarak grafiğe geçirildi.

3.2.1.3. Süre ve Sıcaklığın Etkisi

30 mg.L⁻¹ KRV için, 1000 mg.L⁻¹ stok çözeltisinden 0.3 mL alınarak bir erlene aktarıldı. KRV çözeltisi üzerine 3.0 mM kuinalizarin çözeltisinden 1.25 mL eklendi ve metanol ile 10 mL'ye tamamlandı. 15, 20, 27, 35, 40, 45, 50, 55, 60 °C için ayrı ayrı hazırlanan çözeltilerin absorbansları maksimum 120 dk ya kadar 560 nm'de kinetik olarak ölçüldü. Elde edilen sonuçlar her bir sıcaklık için absorbansa karşı süre olarak grafiğe geçirildi.

3.2.1.4. KRV-KUİN Yük Transfer Kompleksinin Mol Oranı

KRV'nin KUİN ile reaksiyonunda stokiyometriyi saptamak için Job'un sürekli değişim yönteminden yararlanıldı (Vyas ve ark 2016, Yıldız ve ark 1997, Likussar ve Boltz 1971). Bu amaçla KRV ve KUİN'in metanol ile hazırlanan 0.25 mmol.L⁻¹ çözeltileri toplam hacim aynı kalacak şekilde değişen oranlarda karıştırıldı ve sonra hazırlanan çözeltilerin absorbansları referans KUİN çözeltilerine karşı ölçüldü. Elde edilen sonuçlar absorbansa karşı KRV mol kesri olacak şekilde grafiğe geçirildi.

3.2.1.5. KRV-KUİN Yük Transfer Kompleksi için Molar Absorptivite Katsayısının (ε) Belirlenmesi

Bu çalışmada Lambert-Beer eşitliğinden molar absorptiviteyi hesaplama yöntemi kullanıldı. KRV ve KUİN çözeltileri eşit konsantrasyonda (3.0 mmol.L⁻¹), 100 mL metanol içinde hazırlandı. 5 ayrı erlene 5 mL 3.0³ mmol.L⁻¹ KUİN çözeltisinden aktarıldı. Erlenlere sırasıyla 50, 60, 70, 80, 90 µL hazırlanan 3.0 mmol.L⁻¹ KRV çözeltisi eklendi. Bu çözeltiler iyice karıştırıldıktan sonra her bir çözeltinin 560 nm'de absorbans ölçümleri alındı.

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C$$

Formülüne göre her bir çözelti için molar absorptivite katsayısı hesaplandı. Daha sonra hesaplanan molar absorptivite katsayılarının ortalaması alındı (wikihow).

3.3. Cu-ilaç-ditiyokarbamat Kompleksi Oluşturma Yöntemi

PRK ve NBV etken maddelerinin kimyasal yapılarında sekonder amin grubu bulunmaktadır. Bu çalışmada, iki ilaca ait sekonder amin gruplarının, NH_3 varlığında CS_2 ile ditiyokarbamat türevine dönüştürülerek Cu^{2+} kompleksi oluşturması sağlandı. Oluşan sarı renkli kompleks, su fazından su ile karışmayan organik bir çözücüye alınarak UV-GB de tayin edildi. Yöntemde optimal koşulların kesinleştirilmesi için absorbans üzerine çözücü cinsinin, NH_3 , CS_2 ve Cu^{2+} konsantrasyonlarının ve reaksiyon süresinin etkisi incelendi. Optimizasyon çalışmaları 0.16 mmol.L^{-1} PRK ve 0.2 mmol.L^{-1} NBV ile yapıldı. Optimal koşullar belirlendikten sonra yöntemin validasyonu yapıldı (Alpdoğan ve Sungur 1999, El-Ries ve ark 2000).

3.3.1. NBV ve PRK için Geliştirilen Cu-ilaç-ditiyokarbamat Kompleksi Yönteminde Optimum Koşulların Belirlenmesi

3.3.1.1. Çözücünün Etkisi

Bu çalışmada, su ile karışmayan Metilizobutylketon (MIBK), Etilasetat, Kloroform, Diklormetan, Hekzan çözücüleri ekstraksiyon amaçlı kullanıldı. PRK ve NBV ilaçlarının 1.0 mmol.L^{-1} 'lik çözeltilerinden (3 tekrarlı olmak üzere) NBV için 1'er mL, PRK için 0.8'er mL cam tüplere alındı. Bu çözeltiler üzerine 0.1 mL NH_3 çözeltisi eklendi ve 1 dk kadar vortekslendi. Hazırlanan bu çözeltiler üzerine hızlı bir şekilde 0.1 mL Cu^{2+} (2.0 mmol.L^{-1}) ve 0.1 mL CS_2 eklendi. Daha sonra çözeltiler yaklaşık 1 dk kadar vorteksle karıştırıldı. CS_2 fazı kahverengiye dönüştükten sonra çözeltiler üzerine 5 mL su ile karışmayan ekstraksiyon çözücüsü eklendi. Her bir çözelti su fazı berraklaşınca kadar (yaklaşık 2 dk) vortekslendi. Faz ayrımı için 1 dk kadar beklendi. Fazlar ayrıldıktan sonra ekstraksiyon çözücüsü fazından alınan 2 mL çözelti, susuz MgSO_4 içeren santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüplerin kapakları kapatılarak iyice karıştırıldı. Daha sonra çözeltiler 4 dk 14000 rpm de santrifüjlendi ve her bir çözeltinin 0.7 mL'lik UV kuvvetlerinde referans çözeltilerine karşı absorbans ölçümleri alındı. Bu

deneyler her bir çözücü için ayrı ayrı yapıldı. En yüksek absorbandsın alındığı çözücü optimum çözücü olarak belirlendi (Alpdoğan ve Sungur 1999 , El-Ries ve ark 2000).

3.3.1.2. NH₃ Konsantrasyonunun ve Hacminin Belirlenmesi

1.0 mmol.L⁻¹'lik PRK çözeltisinden 0.8'er mL ve 1.0 mmol.L⁻¹'lik NBV çözeltisinden 1'er mL (3 tekrarlı olmak üzere) cam tüplere alındı. Hazırlanan ilaç çözeltisi üzerine NH₃ çözeltisi eklendi. Bu çalışmada NBV çözeltilerine %25'lik NH₃ ve %10'luk NH₃ çözeltisinden 0.025-0.3 mL; %1'lik NH₃ çözeltisinden 0.05-0.6 mL arasında eklemeler yapıldı. PRK çözeltilerine %25'lik NH₃ çözeltisinden 0.025-0.3 mL; %10'luk NH₃ çözeltisinden 0.025-0.2 mL; %1'lik NH₃ çözeltisinden 0.025-0.2 mL; %0.1'lik NH₃ çözeltisinden 0.1-0.8 mL arasında eklemeler yapıldı ve 1 dk kadar vortekslendi. Karıştırılan bu çözeltiler üzerine hızlı bir şekilde sırasıyla 0.1 mL Cu²⁺ (2.0 mmol.L⁻¹) ve 0.1 mL CS₂ eklendi. Daha sonra çözeltiler yaklaşık 1 dk kadar vorteksle karıştırıldı. CS₂ fazı kahverengiye dönüştükten sonra çözeltiler üzerine NBV için 5 mL kloroform, PRK için 5 mL MIBK çözücüsü eklendi. Her bir çözelti su fazı berraklaşınca kadar (yaklaşık 2 dk) vortekslendi. Faz ayrımı için 1 dk kadar beklendi. Fazlar ayrıldıktan sonra ekstraksiyon çözücüsü fazından alınan 2 mL çözelti, susuz MgSO₄ içeren santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüplerin kapakları kapatılarak iyice karıştırıldı. Daha sonra 4 dk 14000 rpm de santrifüjlendi ve her bir çözeltinin 0.7 mL'lik UV küvetlerinde referans çözeltilerine karşı absorbands ölçümleri alındı. Alınan absorbandslar, her bir ilaç için NH₃ hacmine karşı grafiğe geçirildi (Alpdoğan ve Sungur 1999 , El-Ries ve ark 2000).

3.3.1.3. Cu²⁺ Miktarının Belirlenmesi

1.0 mmol.L⁻¹'lik PRK çözeltisinden 0.8'er mL ve 1.0 mmol.L⁻¹'lik NBV çözeltisinden 1'er mL (3 tekrarlı olmak üzere) cam tüplere alındı. Bu çözeltiler üzerine NBV için %1'lik NH₃ çözeltisinden 0.2 mL, PRK için %0.1'lik NH₃ çözeltisinden 0.4 mL eklendi ve 1 dk kadar vortekslendi. Karıştırılan bu çözeltiler üzerine Cu²⁺ çözeltisi eklendi. Bu çalışmada NBV için 0.025-0.5 mL; PRK için 0.01-0.5 mL arasında Cu²⁺ (2.10⁻³ mol.L⁻¹) çözeltisi eklendi. Daha sonra 0.1 mL CS₂ eklendi. Çözeltiler yaklaşık 1 dk kadar vorteksle karıştırıldı. CS₂ fazı kahverengiye dönüştükten sonra çözeltiler üzerine NBV için 5 mL kloroform, PRK için 5 mL MIBK çözücüsü eklendi. Her bir çözelti su fazı berraklaşınca kadar (yaklaşık 2 dk) vortekslendi. Faz ayrımı için 1 dk

kadar beklendi. Fazlar ayrıldıktan sonra ekstraksiyon çözücüsü fazından alınan 2 mL çözelti, susuz MgSO₄ içeren santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüplerin kapakları kapatılarak iyice karıştırıldı. Daha sonra 4 dk 14000 rpm de santrifüjlendi ve her bir çözeltinin 0.7 mL'lik UV küvetlerinde referans çözeltilerine karşı absorbands ölçümleri alındı. Alınan absorbandslar, her bir ilaç için eklenen Cu²⁺ hacmine karşı grafiğe geçirildi (Alpdoğan ve Sungur 1999 , El-Ries ve ark 2000).

3.3.1.4. CS₂ Konsantrasyonunun ve Hacminin Belirlenmesi

1.0 mmol.L⁻¹'lik PRK çözeltisinden 0.8'er mL ve 1.0 mmol.L⁻¹'lik NBV çözeltisinden 1'er mL (3 tekrarlı olmak üzere) cam tüplere alındı. NBV için %1'lik NH₃ çözeltisinden 0.2 mL, PRK için %0.1'lik NH₃ çözeltisinden 0.4 mL eklendi ve 1 dk kadar vorteksleildi. Karıştırılan bu çözeltiler üzerine NBV için 0.15 mL Cu²⁺ (2.0 mmol.L⁻¹) çözeltisi ve saf CS₂ 0.05-0.5 mL arasında eklendi. Optimal bazik ortamda bulunan PRK çözeltilerine 0.2 mL Cu²⁺ (2.0 mmol.L⁻¹) çözeltisi eklendikten hemen sonra saf CS₂; MIBK içinde hazırlanmış %10'luk ve %1'lik CS₂ çözeltisinden 0.01-0.5 mL arasında ekleme yapıldı. Daha sonra çözeltiler yaklaşık 1 dk kadar vorteksle karıştırıldı. CS₂ fazı kahverengiye dönüştükten sonra çözeltiler üzerine NBV için 5 mL kloroform, PRK için 5 mL MIBK çözücüsü eklendi. Her bir çözelti su fazı berraklaşınca kadar (yaklaşık 2 dk) vorteksleildi. Faz ayrımı için 1 dk kadar beklendi. Fazlar ayrıldıktan sonra ekstraksiyon çözücüsü fazından alınan 2 mL çözelti, susuz MgSO₄ içeren santrifüj tüplerine aktarıldı. Tüplerin kapakları kapatılarak iyice karıştırıldı. Daha sonra 4 dk 14000 rpm de santrifüjlendi ve her bir çözeltinin 0.7 mL'lik UV küvetlerinde referans çözeltilerine karşı absorbands ölçümleri alındı. Her bir ilaç için ölçülen absorbandslar, CS₂ hacmine karşı grafiğe geçirilir (Alpdoğan ve Sungur 1999 , El-Ries ve ark 2000).

3.3.1.5. Sürenin Etkisi

0.2 mmol.L⁻¹ NBV çözeltisine %1'lik NH₃ çözeltisinden 0.2 mL, 2.0 mmol.L⁻¹ Cu²⁺ çözeltisinden 0.15 mL ve 0.1 mL CS₂ eklendi. Daha sonra çözelti yaklaşık 1 dk kadar vorteksle karıştırıldı. CS₂ fazı kahverengiye dönüştükten sonra çözeltiler üzerine 5 mL Kloroform çözücüsü eklendi. Hazırlanan çözelti su fazı berraklaşınca kadar (yaklaşık 2 dk) vorteksleildi. Faz ayrımı için 1 dk kadar beklendi. Fazlar ayrıldıktan sonra ekstraksiyon çözücüsü fazından alınan 2 mL çözelti, susuz MgSO₄ içeren santrifüj

tüpüne alındı. Tüpün kapağı kapatılarak iyice karıştırıldı. Daha sonra 4 dk 14000 rpm de santrifüjlendi ve çözeltinin 0.7 mL'lik UV kuvvetlerinde referans çözeltisine karşı absorbansı başlangıçta, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 300. dk'da ölçüldü. Alınan absorbanslar süreye karşı grafiğe geçirildi.

0.16 mmol.L⁻¹ PRK çözeltisine % 0.1'lik NH₃ çözeltisinden 0.4 mL, 2.0 mmol.L⁻¹ Cu²⁺ çözeltisinden 0.2 mL ve % 1'lik MIBK içinde hazırlanan CS₂ çözeltisinden 0.05 mL eklendi. Daha sonra çözelti yaklaşık 1 dk kadar vorteksle karıştırıldı. CS₂ fazı kahverengiye dönüştükten sonra çözeltiler üzerine 5 mL MIBK çözücüsü eklendi. Hazırlanan çözelti su fazı berraklaşınca kadar (yaklaşık 2 dk) vorteksle karıştırıldı. Faz ayrımı için 1 dk kadar beklendi. Fazlar ayrıldıktan sonra ekstraksiyon çözücüsü fazından alınan 2 mL çözelti, susuz MgSO₄ içeren santrifüj tüpüne alındı. Tüpün kapağı kapatılarak iyice karıştırıldı. Daha sonra 4 dk 14000 rpm de santrifüjlendi ve çözeltinin 0.7 mL'lik UV kuvvetlerinde referans çözeltisine karşı başlangıçta, 30, 60, 90, 120, 240, 300. dk'da absorbans ölçümleri alındı. Alınan absorbanslar süreye karşı grafiğe geçirildi (Alpdoğan ve Sungur 1999 , El-Ries ve ark 2000).

3.3.1.6. %0.5'lik Asetik Asit Derişiminin Etkisi

0.16 mmol.L⁻¹ PRK çözeltisine % 0.1'lik NH₃ çözeltisinden 0.4 mL, 2.0 mmol.L⁻¹ Cu²⁺ çözeltisinden 0.2 mL ve %1'lik MIBK içinde hazırlanan CS₂ çözeltisinden 0.05 mL eklendi. Daha sonra çözelti yaklaşık 1 dk kadar vorteksle karıştırıldı. Su fazında bulunan CS₂ kahverengiye dönüştükten sonra % 0.5'lik asetik asit çözeltisinden 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 mL eklendi. Daha sonra çözeltilere 5 mL MIBK eklenerek yaklaşık 2 dk kadar vorteksle karıştırıldı. Faz ayrımı için 1 dk kadar beklendi. Fazlar ayrıldıktan sonra ekstraksiyon çözücüsü fazından 2 mL (susuz MgSO₄ içeren) santrifüj tüplerine alındı. Tüplerin kapakları kapatılarak iyice karıştırıldı. Daha sonra 4 dk 14000 rpm de santrifüjlenir ve her bir çözeltinin 0.7 mL'lik UV kuvvetlerinde referans çözeltilerine karşı başlangıçta, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360.dk'da absorbans ölçümleri alındı. Absorbanslar her bir % 0.5'lik asetik asit hacmine göre süreye karşı grafiğe geçirildi (El-Ries ve ark 2000).

3.4. Geliştirilen Yöntemlerin Validasyonu

3.4.1. Kalibrasyon Eğrisinin Çizimi

Her üç ilacın, absorbands ve ilaç konsantrasyonu arasındaki ilişkinin doğrusal olduğu çalışma aralığı belirlendi (ICH-Q2).

500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ konsantrasyonda hazırlanan KRV stok çözeltisinden 0.01-1.2 mL aralığında alınan hacimler kapaklı erlenlere aktarıldı (27 °C’de). Bu çözeltiler üzerine 3.0 mmol.L^{-1} KUİN çözeltisinden 1.25 mL eklendi ve metanol ile hacimleri 10 mL’ye tamamlandı. Böylece 0.5-60 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ aralığında KRV içeren kompleks çözeltileri hazırlandı. Her bir çözelti 3 tekrarla çalışıldı. Hazırlanan çözeltilerin absorbandsları 560 nm’de ölçüldü. Son olarak KRV’nin konsantrasyonuna karşı ölçülen absorbandslar grafiğe geçirildi.

1.0 mmol.L^{-1} konsantrasyonunda hazırlanan NBV stok çözeltisinden 0.05-1 mL aralığında alınan hacimler kapaklı tüplere aktarıldı. Bu çözeltiler üzerine %1’lik NH_3 çözeltisinden 0.2 mL, 2.0 mmol.L^{-1} Cu^{2+} çözeltisinden 0.15 mL ve saf CS_2 den 0.1 mL eklendi. Daha sonra hazırlanan çözeltiler yaklaşık 1 dk kadar vorteksle karıştırıldı. CS_2 fazı kahverengiye dönüştükten sonra çözelti üzerine 5 mL kloroform çözücüsü eklendi. Hazırlanan çözelti su fazı berraklaşınca kadar (yaklaşık 2 dk) vortekslendi. Faz ayrımı için 1 dk kadar beklendi. Fazlar ayrıldıktan sonra ekstraksiyon çözücüsü fazından alınan 2 mL çözelti, susuz MgSO_4 içeren santrifüj tüpüne alındı. Tüplerin kapakları kapatılarak iyice karıştırıldı. Daha sonra 4 dk 14000 rpm de santrifüjlendi ve çözelti 30 dk bekletildi. Her bir çözelti 3 tekrarla çalışıldı. 0.01-0.2 mmol.L^{-1} aralığında NBV içeren çözeltilerin absorbandsı 437 nm’de ölçüldü. Son olarak NBV’nin konsantrasyonuna karşı ölçülen absorbandslar grafiğe geçirildi.

1.0 mmol.L^{-1} konsantrasyonundaki PRK stok çözeltisinden 0.025-0.8 mL’lik hacimler kapaklı tüplere alındı. Bu çözeltiler üzerine % 0.1’lik NH_3 çözeltisinden 0.4 mL, 2.10^{-3} mol.L^{-1} Cu^{2+} çözeltisinden 0.2 mL ve %1’lik MIBK içinde hazırlanan CS_2 çözeltisinden 0.05 mL eklendi. Daha sonra çözelti yaklaşık 1 dk kadar vorteksle karıştırıldı. Su fazında bulunan CS_2 kahverengiye dönüştükten sonra % 0.5’lik asetik asit çözeltisinden 0.03 mL eklendi. Vorteksle karıştırılan çözeltilere hemen 5 mL MIBK eklenerek yaklaşık 2 dk daha vortekslendi. Faz ayrımı için 1 dk kadar beklendi. Fazlar ayrıldıktan sonra ekstraksiyon çözücüsü fazından 2 mL (susuz MgSO_4 içeren) santrifüj tüplerine alındı. Tüplerin kapakları kapatılarak iyice karıştırıldı. Daha sonra 4 dk 14000 rpm de santrifüjlendi. Her bir çözelti 3 tekrarla çalışıldı. 0.005-0.16 mmol.L^{-1} aralığında

PRK içeren çözeltilerin absorpsiyonu 435 nm’de ölçüldü. Son olarak PRK’nin konsantrasyonuna karşı ölçülen absorpsiyonlar grafiğe geçirildi.

3.4.2. Doğrusallık

Çalışma aralığı belirlenirken Absorpsiyon-Konsantrasyon arasındaki lineerlik için kalibrasyon eğrisine ait korelasyon katsayısının (r^2) 1’e yakın olmasına dikkat edildi (ICH-Q2, Gündüz 2012).

3.4.3. LOD ve LOQ Hesaplanması

Her üç ilaç için de çalışma aralığında minimum konsantrasyonda hazırlanan 8 tane çözeltiye Bölüm 3.4.1’de anlatılan metot uygulandı ve absorpsiyonları ölçüldü. Elde edilen veriler sonucunda standart sapma, LOD ve LOQ aşağıdaki formüllerle hesaplandı.

$$SS = \sqrt{\left(\frac{\sum_{i=1}^N (x_i - \bar{x})^2}{N - 1} \right)}$$

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

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

formülü ile hesaplandı.

m; kalibrasyon eğrisinin eğimi iken, SS; korelasyon doğrusunun y ekseninden standart sapmasıdır (ICH-Q2, Yılmaz 2019, Harris 2015).

3.4.4. Seçicilik

Tablet ilaçlarda bulunan yardımcı maddelerin interfer etkileri ayrı ayrı incelendi. Her bir ilacın yerel eczaneden temin edilen CORONİS, NEXİVOL, PAXERA adlı tablet formülasyonlarındaki yardımcı maddeler Çizelge 3.1’de verildi.

Çizelge 3.1. Tablet ilaçlarda bulunan yardımcı maddeler

	NBV (NEXİVOL)	PRK (PAXERA)	KRV (CORONİS)
Laktozmonohidrat (LMH)	+	+	+
Magnezyumstearat (MgStr)	+	+	+
Nişasta	+	+	-
Hidroksipropilmetilselüloz(HPMS)	+	+	-
Mikrokristalinselüloz(MKS)	+	-	-
Sükroz	-	-	+
Povidon K25	-	-	+

+ : maddenin tablet içinde bulunduğunu gösterir

İlacın tablet formülasyonunda bulunan interfer maddenin absorbands üzerine etkisini incelemek için önce çalışma aralığı içinde herhangi bir konsantrasyon seçildi. Bu seçilen konsantrasyonda hazırlanan çözeltiye Bölüm 3.4.1 de anlatılan metot uygulanarak bu çözeltinin absorbandsı ölçüldü. Daha sonra ilaç ve interfer maddenin bir arada bulunduğu çözeltiler hazırlandı. Bunun için interfer maddenin konsantrasyonu, seçilen çözeltideki ilacın konsantrasyonunun 1, 10, ve 100 katı olacak şekilde ayrı ayrı hazırlandı. Hazırlanan bu çözeltilere Bölüm 3.4.1 de anlatılan metot uygulanarak her bir çözeltinin absorbandsı ölçüldü. Bu işlemler her üç ilaç için tablet formülasyonlarında bulunan interfer maddelerin her birine aynı şekilde uygulandı. İnterfer maddelerin her birinin absorbands üzerine etkisi % göreceli absorbands hesaplanarak verildi.

A_1 : İnterfer maddeyi içeren çözeltinin absorbandsı

A_2 : Seçilen ilaç çözeltisinin absorbandsı (interfer maddenin olmadığı)

$$\% \text{ Göreceli Absorbans (GA)} = \frac{A_1}{A_2} \times 100 \text{ (Korkmaz ve ark 2005)}$$

3.4.5. Doğruluk

Doğruluk ölçütü saf ilaçtan % geri kazanım, tablettten % geri kazanım (t-testi) ve standart ekleme yöntemleri ile hesaplandı (ICH-Q2, Yılmaz 2019, Harris 2015).

3.4.5.1. Saf İlaçlardan % Geri Kazanım

Saf ilaçtan % geri kazanım için her üç ilacın çalışma aralığı içinde seçilen konsantrasyonda çözeltileri hazırlandı. Hazırlanan çözeltilere Bölüm 3.4.1’de anlatılan metot uygulanarak geri kazanım yüzdesi saptandı.

$$\% \text{ Geri kazanım: } \frac{\text{AAAAA} \text{AAAA}}{\text{AAAAA} \text{AAAA}} \text{AAAA}$$

% geri kazanımın %95-105 ve % BSS’nin %2’den, %BH’nin %1’den küçük olması hedeflendi (ICH-Q2, Yılmaz 2019, Harris 2015).

3.4.5.2. Standart Ekleme Yöntemi

Her üç ilacın tablet dozaj formları yerel eczaneden temin edildi. İlaçların tabletlerinden rastgele alınan 10 tanesinin ağırlığı bağımsız olarak tartılarak ortalama tablet ağırlığı belirlendi. Daha sonra tabletler kuru ve temiz bir havanda öğütülerek toz haline getirildi. Toz haline getirilmiş örneklerden ilaçların bir tabletinin ağırlığına eşdeğer bir kısmı hassas terazide tartıldı ve bir balon jojeye aktarıldı. Üzerine her üç ilaç için geliştirilen yöntemde kullanılan çözücünden (NBV için % 10 metanol, PRK için saf su, KRV için metanol) bir miktar eklendi ve karışım magnetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı. Daha sonra 30 dakika ultrasonik banyoda iyice çözünmesi için bekletildi. Çözelti su trompu yardımıyla süzüldü. Süzülen çözelti bir balonjojeye aktararak her ilacın kendi çözücüsü ile 100 mL’ye tamamlandı. Çalışma aralığından herhangi bir konsantrasyon seçildi ve seçilen konsantrasyonda alınan tablet çözeltisi üzerine bu konsantrasyonun %40, 60, 80, 100, 120’si olacak şekilde ilacın saf standart çözeltisi eklendi. Hazırlanan her bir çözeltiye Bölüm 3.4.1 de anlatılan metot uygulandı. Çözeltilerin absorbanları ölçüldü. %BSS’nin %2’den küçük olması hedeflendi(ICH-Q2, Yılmaz 2019, Harris 2015).

3.4.5.3. t-Testi için Geliştirilen Yöntemlerin Tabletler Uygulanması Yöntemi

Her üç ilacın tablet dozaj formları yerel eczaneden temin edildi. İlaçların tabletlerinden rastgele alınan 10 tanesinin ağırlığı bağımsız olarak tartılarak ortalama tablet ağırlığı belirlendi. Daha sonra tabletler kuru ve temiz bir havanda öğütülerek toz haline getirildi. Toz haline getirilmiş örneklerden ilaçların bir tabletinin ağırlığına

eşdeğer bir kısmı hassas terazide tartıldı ve bir balon jojeye aktarıldı. Üzerine her üç ilaç için geliştirilen yöntemde kullanılan çözücünden (NBV için % 10 metanol, PRK için saf su, KRV için metanol) bir miktar eklendi ve karışım magnetik karıştırıcı ile 30 dakika karıştırıldı. Daha sonra 30 dakika ultrasonik banyoda iyice çözünmesi için bekletildi. Çözelti su trompu yardımıyla süzüldü. Süzülen çözelti bir balonjojeye aktarılarak her ilacın kendi çözücüsü ile 100 mL'ye tamamlandı.

Çözeltilerin absorbansında kalibrasyon denklemine göre tablet içeriği ve % geri kazanım hesabı yapıldı.

t-testi, % 95 güven seviyesinde 4 serbestlik derecesi için (t-dağılım tablosundan) t_t 'nin değeri 2.776 alınarak uygulandı.

$$\mu = \bar{x} \pm \frac{t_s}{\sqrt{N}} \quad (\text{Gündüz 2010})$$

Çizelge 3.2'de t-dağılım değerleri verildi.

Çizelge.3.2. t-dağılım değerleri (Yiğit 2019)

	$t_{.50}$	$t_{.75}$	$t_{.80}$	$t_{.85}$	$t_{.90}$	$t_{.95}$	$t_{.975}$	$t_{.99}$	$t_{.995}$	$t_{.999}$	$t_{.9995}$
	0.50	0.25	0.20	0.15	0.10	0.05	0.025	0.01	0.005	0.001	0.0005
	1.00	0.50	0.40	0.30	0.20	0.10	0.05	0.02	0.01	0.002	0.001
df											
1	0.000	1.000	1.376	1.963	3.078	6.314	12.71	31.82	63.66	318.31	636.62
2	0.000	0.816	1.061	1.386	1.886	2.920	4.303	6.965	9.925	22.327	31.599
3	0.000	0.765	0.978	1.250	1.638	2.353	3.182	4.541	5.841	10.215	12.924
4	0.000	0.741	0.941	1.190	1.533	2.132	2.776	3.747	4.604	7.173	8.610
5	0.000	0.727	0.920	1.156	1.476	2.015	2.571	3.365	4.032	5.893	6.869
6	0.000	0.718	0.906	1.134	1.440	1.943	2.447	3.143	3.707	5.208	5.959
7	0.000	0.711	0.896	1.119	1.415	1.895	2.365	2.998	3.499	4.785	5.408
8	0.000	0.706	0.889	1.108	1.397	1.860	2.306	2.896	3.355	4.501	5.041
9	0.000	0.703	0.883	1.100	1.383	1.833	2.262	2.821	3.250	4.297	4.781
10	0.000	0.700	0.879	1.093	1.372	1.812	2.228	2.764	3.169	4.144	4.587

3.4.6. Dayanıklılık

Her bir ilacın çalışma aralığı içinde birkaç konsantrasyon seçildi. Seçilen konsantrasyonlarda hazırlanan çözeltilere Bölüm 3.4.1 de anlatılan metot uygulandı. Bu

çözeltilerin belirli zaman aralıklarında absorbanları ölçülerek absorbanlarında değişim olup olmadığı incelendi (ICH-Q2).

KRV için; 15µg/mL, 45 µg/mL çözeltilerine Bölüm 3.4.1 de anlatılan metot uygulandıktan sonra her bir çözeltinin başlangıç anından itibaren 72 saat boyunca 24 saat aralıklarla absorban ölçümleri alındı. Daha sonra SS ve %BSS hesaplandı.

NBV için; 0.1 mmol.L⁻¹ ve 0.075 mmol.L⁻¹ çözeltilerine Bölüm 3.4.1 de anlatılan metot uygulandıktan sonra her bir çözeltinin 45.dk'dan itibaren 72 saat boyunca 24 saat aralıklarla absorban ölçümleri alındı. Daha sonra SS ve %BSS hesaplandı.

PRK için; 0.1 mmol.L⁻¹ ve 0.075 mmol.L⁻¹ çözeltilerine Bölüm 3.4.1 de anlatılan metot uygulandıktan sonra her bir çözeltinin 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24. saatte absorban ölçümleri alındı. Daha sonra SS ve %BSS hesaplandı.

3.4.7. Kesinlik

Her üç ilaç için geliştirilen yöntemde kesinlik ölçütü, tekrarlanabilirlik, tekrar elde edilebilirlik ve ara kesinlik ile incelendi (ICH-Q2, Harris 2015).

3.4.7.1.Tekrarlanabilirlik

Her bir ilaç için seçilen çalışma çözeltilerine Bölüm 3.4.1 de anlatılan metot uygulandıktan sonra 10 kez art arda absorbanı ölçülerek tekrarlanabilirlik ölçütüne bakıldı. % BSS'nin % 2'den küçük olması hedeflendi (ICH-Q2, Yılmaz 2019, Harris 2015)..

3.4.7.2.Tekrar Elde Edilebilirlik

Her bir ilaç için seçilen çalışma çözeltilerine Bölüm 3.4.1 de anlatılan metot farklı laboratuvarlarda uygulanarak farklı bir UV-VIS spektrofotometresiyle absorban ölçümleri alındı.

KRV ilacı için yöntem T80+ UV/VIS Spectrometer (PG Instruments Ltd) ile geliştirildi ve tekrar elde edilebilirlik çalışması Varian Cary 100 Bio UV/VIS spektrofotometresi ile yapıldı. % GK, %BSS'nin değerleri hesaplanarak sadece önceki sonuçlara yakın sonuçlar alınıp alınmadığı incelendi.

NBV ve PRK ilaçları için yöntem Perkinelmer Lambda 25 UV/VIS spektrofotometresi ile geliştirildi ve tekrar elde edilebilirlik çalışması Varian Cary 100 Bio UV/VIS spektrofotometresi ile yapıldı. % GK, %BSS'nin değerleri hesaplanarak sadece önceki sonuçlara yakın sonuçlar alınıp alınmadığı incelendi (ICH-Q2, Yılmaz 2019, Harris 2015, Gündüz 2010).

3.4.7.3.Ara kesinlik

Yöntemin ara kesinliğini ölçmek için çalışma aralığı içinde herhangi bir konsantrasyonda hazırlanan çözeltiler aynı gün içinde 3 farklı zamanda ve 3 ardışık günde analiz edilerek sonuçlar değerlendirildi. %BSS'nin %2'den, %BH'nin % 1'den küçük olması hedeflendi (ICH-Q2, Yılmaz 2019, Harris 2015).

3.4.8. Sağlamlık

Geliştirilen yöntemde sağlamlık ölçütü parametrelerde kasti olarak yapılan küçük değişimler ile belirlendi (ICH-Q2, Yılmaz 2019, Harris 2015). Her üç ilaç için geliştirilen yöntemde yapılan sağlamlık testi aşağıda yer almaktadır.

KRV için geliştirilen yöntemin sağlamlığı, eklenen KUİN reaktifinin hacminde (1.25 ± 0.05 mL) ve reaksiyon sıcaklığında ($27 \pm 2^\circ\text{C}$) küçük değişiklikler yapılarak değerlendirildi.

NBV için geliştirilen yöntemin sağlamlığı CS_2 için 0.1 ± 0.01 mL , %1 NH_3 çözeltisi için 0.2 ± 0.05 mL değişiklikler yapılarak değerlendirildi.

PRK için geliştirilen yöntemin sağlamlığı MIBK içinde % 1 CS_2 için 0.05 ± 0.01 mL, %0.1 NH_3 çözeltisi için 0.4 ± 0.05 mL değişiklikler yapılarak değerlendirildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. KRV için Geliştirilen Yönteme Ait Bulgular

Bu çalışma, KRV'nin 1,2,5,8-tetrahidroksiantrakinon (KUİN) ile oluşturduğu mor renkli yük transfer kompleksinin absorbansının ölçümüne dayanmaktadır. Mor renkli KRV-KUİN yük transfer kompleksinin UV-GB'deki absorbansı üzerine çözücünün, KUİN reaktifinin konsantrasyonunun, sıcaklık ve sürenin etkisi incelendi. Daha sonra kompleksin stokiometrisi Job metodu ile belirlendi. Son aşamada yöntemin doğruluğu ve kesinliği istatistiksel olarak incelendi.

4.1.1. Çözücünün Etkisi

Bu çalışmada, $40 \mu\text{g.mL}^{-1}$ KRV ile $3 \text{ mL } 0.5 \text{ mmol.L}^{-1}$ KUİN çözeltisi kullanılarak Bölüm 3.2.1.1'de anlatılan yöntem uygulandı. Her bir çözücü için elde edilen sonuçlar Çizelge 4.1'de verildi.

Çizelge 4.1. KRV-KUİN kompleksinin absorbansı üzerine çözücünün etkisi(N=3)

<u>Cözücü</u>	<u>A</u>	<u>±SS</u>
Metanol	0.501	0.014
DMF	0.264	0.015
1-propanol	0.142	0.023
Asetonitril	0.130	0.034
Etanol	0.123	0.028
2-propanol	0.112	0.016
Aseton	0.061	0.004
Kloroform	0.041	0.002

Farklı çözücülerde oluşturulan KRV-KUİN yük transfer kompleksinin spektrum taramasında en yüksek absorbans metanolde elde edildi. Metanol ile yapılan çalışmada maksimum dalgaboyunun 560 nm olduğu tespit edildi.

Yük transfer reaksiyonlarının kararlı bir şekilde gerçekleşmesi için kullanılan çözücülerde aranan özellikler, polar, dielektrik sabitinin ve hidrojen bağı yapma kapasitesinin yüksek olmasıdır (Kelani ve ark. 1997, Huang ve ark. 2006).

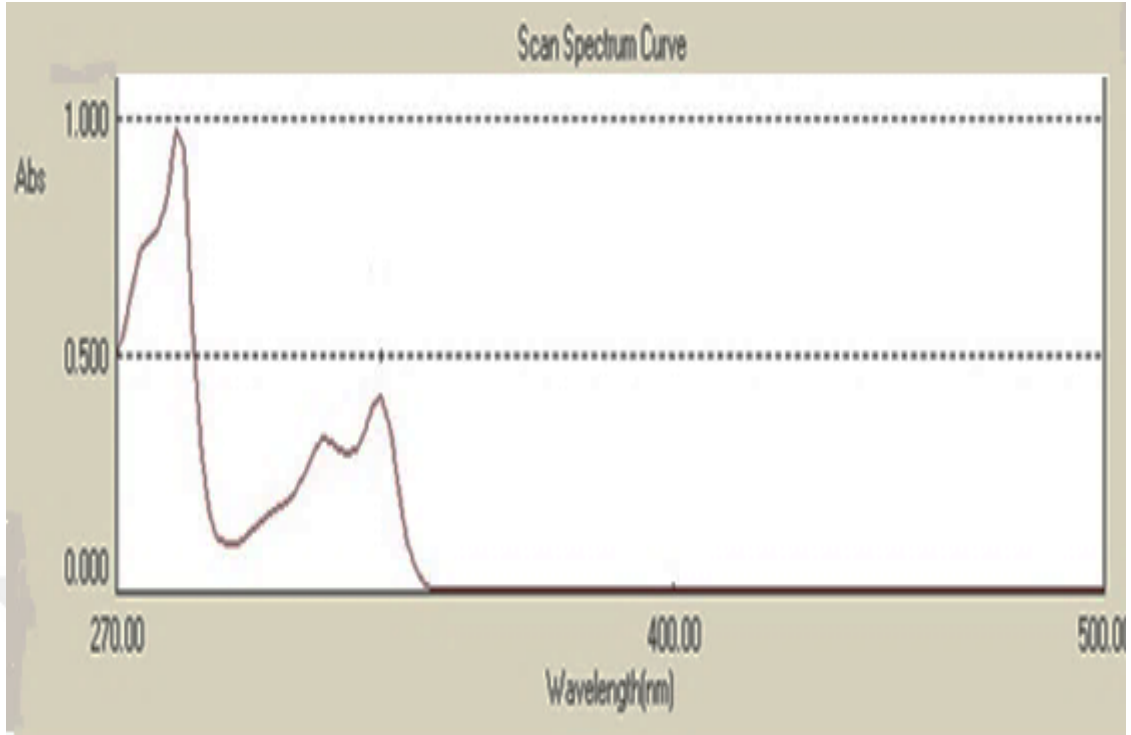
Çalışmada kullanılan çözücülerin dielektrik sabitleri Çizelge 4.2’de verildi. Çizelge 4.2’ye göre su, en yüksek dielektrik sabitine sahiptir. KRV ve KUİN suda çözünmediği için bu çalışmada su kullanılamadı. Asetonitrilde de kompleksin absorbansının düşük olduğu gözlemlendi. Bu nedenle optimum çözücü olarak metanole karar verildi. Bundan sonraki çalışmalar metanol ortamında yapıldı.

Çizelge 4.2. Karvedilol çalışmasında kullanılan çözücülerin dielektrik sabiti

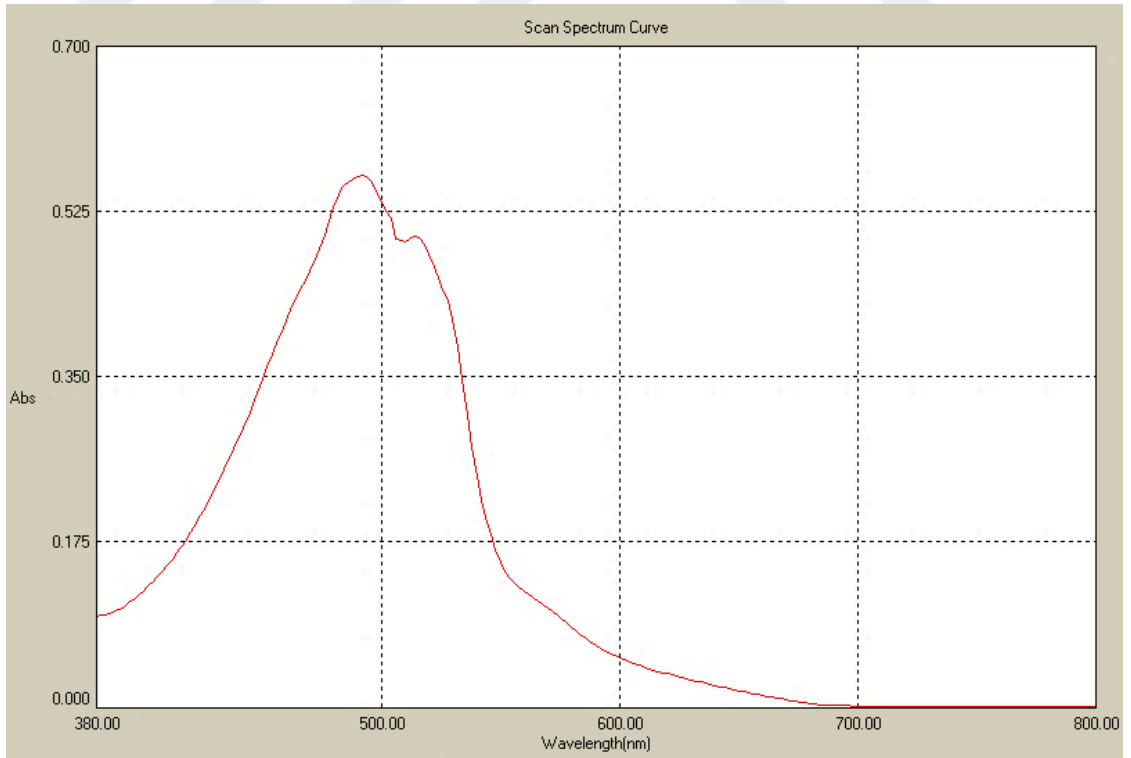
<u>Çözücüler</u>	<u>Dielektrik Sabiti, ϵ_r</u>
1-propanol	20.1
2-propanol	20.2
Aseton	21.4
Asetonitril	38.6
Etanol	24.6
Kloroform	4.8
Metanol	32.6
N,N-dimetilformamid	18
Su	80

KRV, KUİN ve KRV-KUİN yük transfer kompleksinin metanoldeki UV-GB spektrumları sırasıyla Şekil.4.1, Şekil.4.2 ve Şekil.4.3’te verildi .

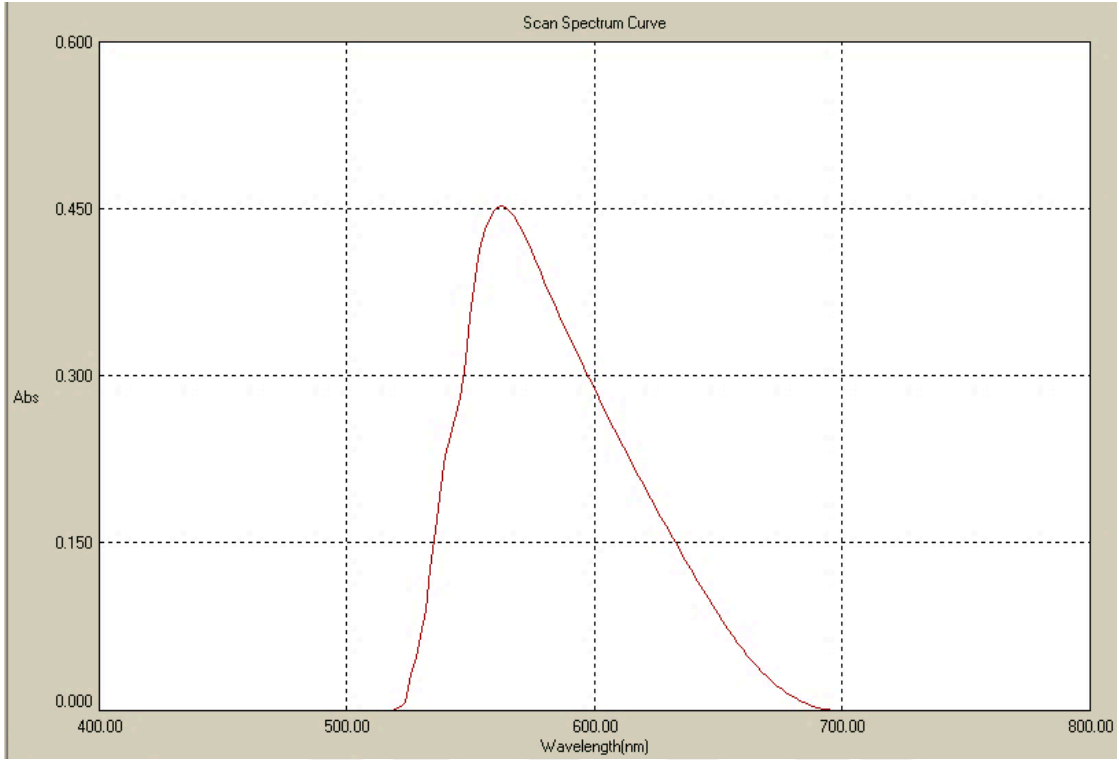
Şekil 4.4’te ise KUİN ile KRV-KUİN yük transfer kompleksinin absorpsiyon bantları karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlara göre KRV, KUİN ve KRV-KUİN yük transfer kompleksinin maksimum absorpsiyon bantları farklı dalgaboyundadır.



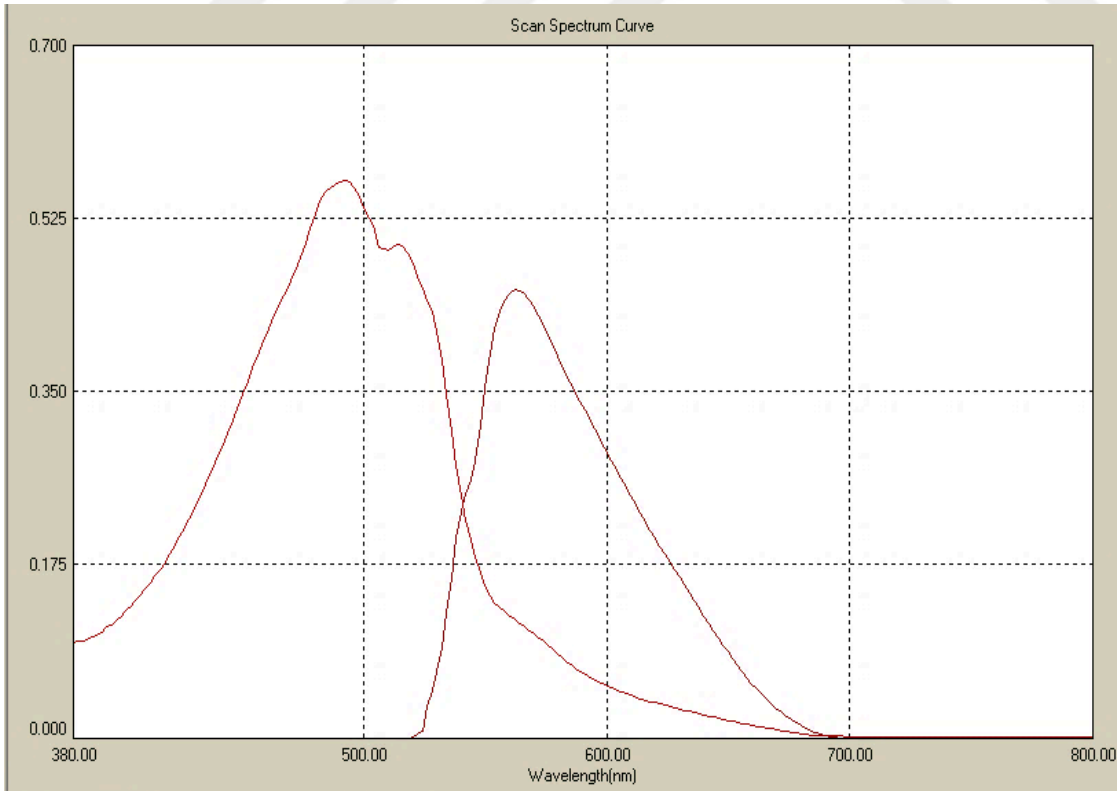
Şekil 4.1. 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ KRV'nin referans metanole karşı alınan UV spektrumu(332, 319, 280 nm'de maksimum absorbans vermiştir.)



Şekil 4.2. KUİN'in referans metanole karşı alınan UV spektrumu (0.5 mM)(Maksimum dalgaboyu 490.89)



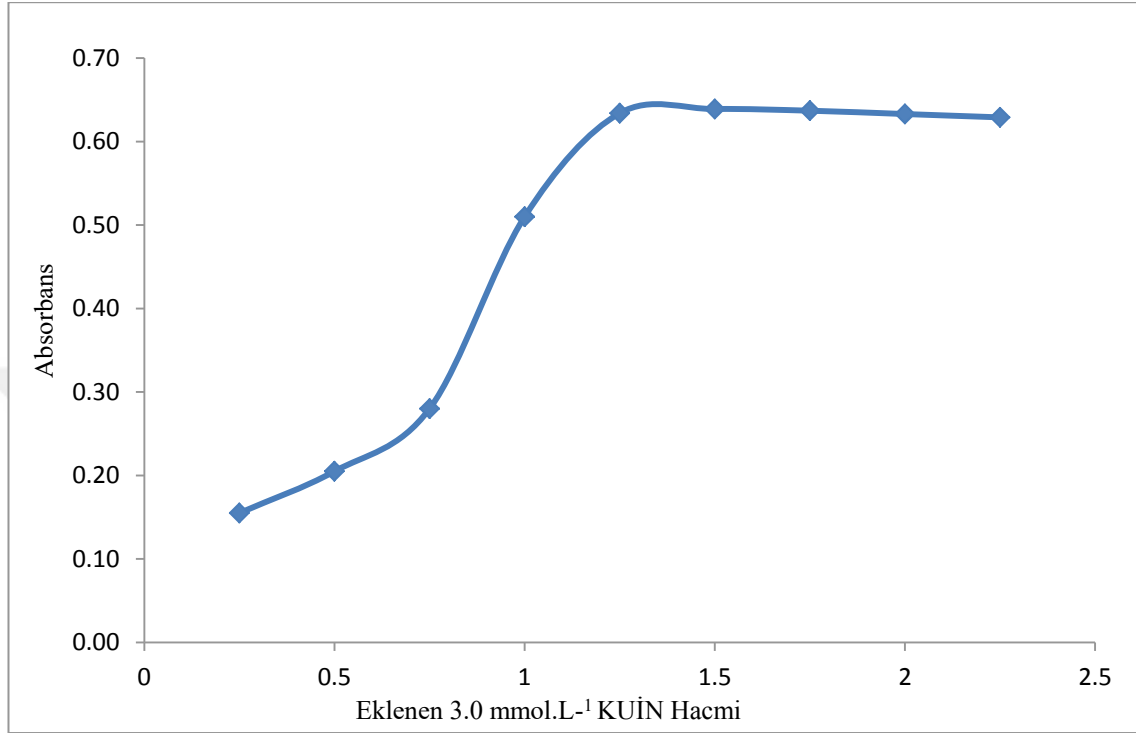
Şekil 4.3. KUİN-KRV yük transfer kompleksinin UV spektrumu (Maksimum absorbansın dalgaboyu 560 nm)



Şekil 4.4. KUİN ile KUİN-KRV yük transfer kompleksinin UV spektrumlarının karşılaştırılması

4.1.2. Kuinalizarin Miktarının Etkisi

Bu çalışmada, $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ KRV ile 3.0 mmol.L^{-1} KUİN çözeltisi kullanılarak Bölüm 3.2.1.2’de anlatılan yöntem uygulandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.5’te verildi.

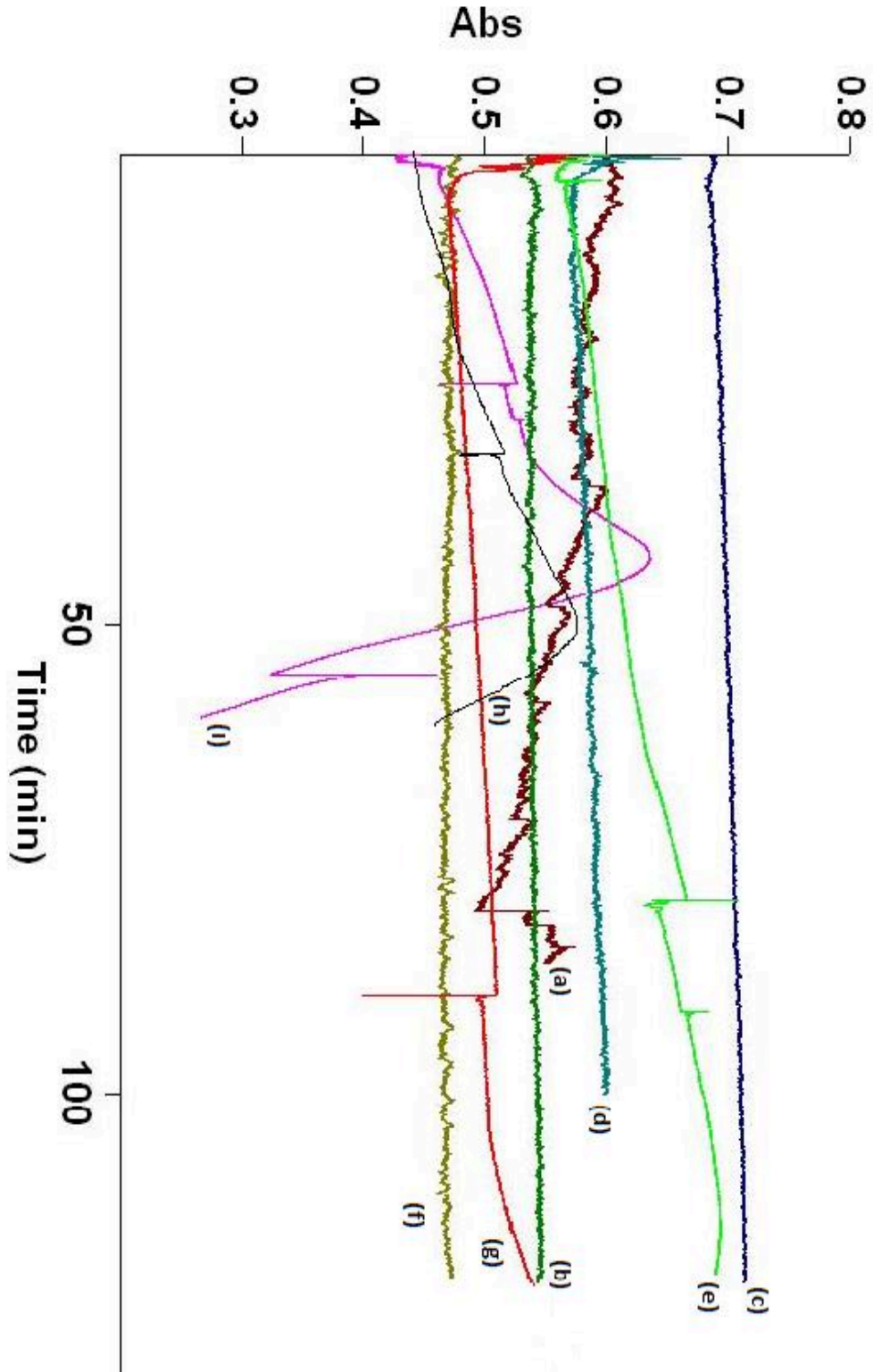


Şekil 4.5. 3.0 mmol.L^{-1} KUİN reaktifinin konsantrasyonunun absorbans üzerine etkisi (KRV $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$)

Şekil 4.5’te görüldüğü gibi 1.25 mL den sonra KUİN çözeltisinin hacmindeki artış absorbansta çok küçük değişimlere neden olduğu için optimum KUİN hacmi 1.25 mL alındı.

4.1.3. Sıcaklık ve Süre Etkisi

Bu çalışmada, $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ KRV ile 1.25 mL 3.0 mmol.L^{-1} KUİN çözeltisi kullanılarak Bölüm 3.2.1.3’te anlatılan yöntem uygulandı. 15°C , 20°C , 27°C , 35°C , 40°C , 45°C , 50°C , 55°C , 60°C sıcaklıklarda KRV-KUİN yük transfer kompleksinin absorbansındaki değişim incelendi. Şekil 4.6’da absorbansa karşı süre grafiği gösterildi.

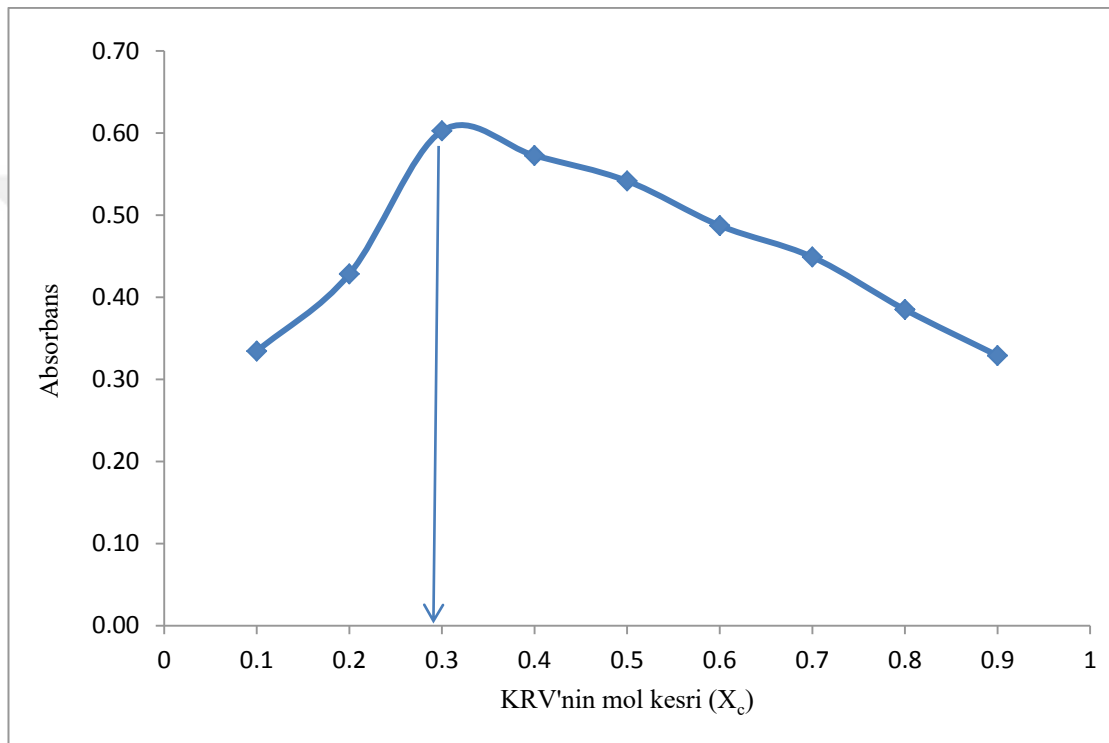


Şekil 4.6.KUİN (3.0 mmol.L^{-1}) ve KRV ($30 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) arasında oluşan yük transfer kompleksi üzerine sıcaklık ve sürenin etkisi ((a): $15 \text{ } ^\circ\text{C}$, (b): $20 \text{ } ^\circ\text{C}$, (c): $27 \text{ } ^\circ\text{C}$, (d): $35 \text{ } ^\circ\text{C}$, (e): $40 \text{ } ^\circ\text{C}$, (f): $45 \text{ } ^\circ\text{C}$, (g): $50 \text{ } ^\circ\text{C}$, (h): $55 \text{ } ^\circ\text{C}$, (i): $60 \text{ } ^\circ\text{C}$)

Şekil 4.6’da verilen sonuçlara göre KUİN-KRV kompleksinin absorbansının 27 °C’de (laboratuvar sıcaklığı) hem en kararlı hem de maksimum olduğu gözlemlendi. Bu sebeple optimum sıcaklığın 27 °C olduğuna karar verildi.

4.1.4. KRV-KUİN Kompleksinin Mol Oranının Belirlenmesi

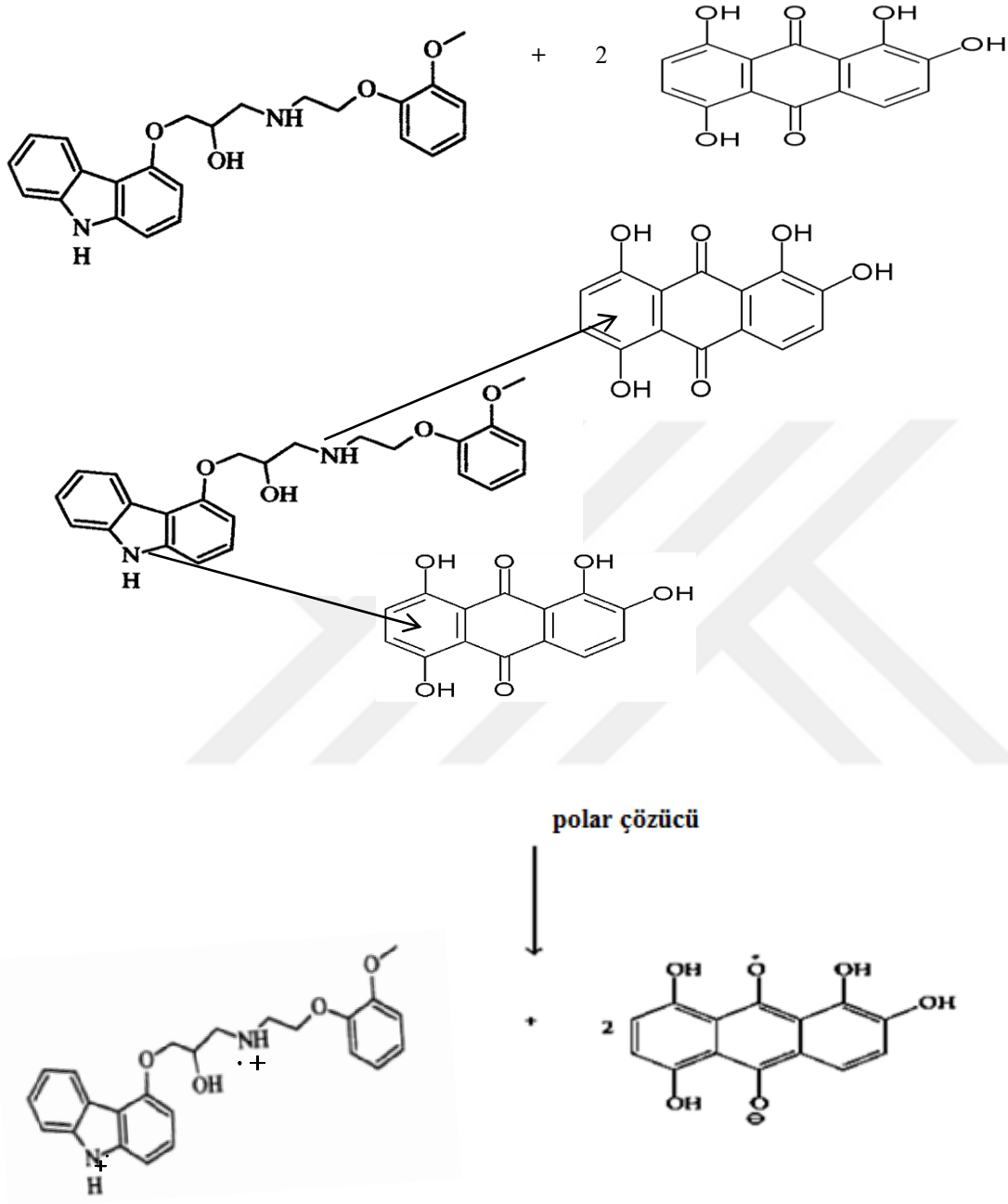
KUİN-KRV kompleksinin stokiyometrisinin belirlenmesi için Bölüm 3.2.1.4’te anlatılan Job metodu kullanıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.7’de verildi.



Şekil 4.7. KUİN (0.25 mmol.L⁻¹) ve KRV (0.25 mmol.L⁻¹) arasında oluşan yük transfer kompleksinin stokiyometrik oranının Job metodu ile belirlenmesi

Şekil 4.7’de verilen sonuçlara göre kompleksin stokiyometrisinin (KRV:KUİN) 1-2 oranına sahip olduğu tespit edildi.

Şekil 4.8’de yük transfer kompleksinin oluşumuna yönelik önerilen mekanizma yer almaktadır.



Şekil 4.8. KRV-KUIN kompleksinin oluşumu için önerilen mekanizma

4.1.5. KRV-KUİN Yük Transfer Kompleksinin Molar Absorptivite Katsayısının Belirlenmesi

KRV-KUİN yük transfer kompleksinin molar absorptivite katsayısını belirleme çalışması Bölüm 3.2.1.5'te anlatılan yol izlenerek yapıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.3'te verildi.

Çizelge 4.3. Molar Absorptivite değeri için elde edilen sonuçlar (KRV ve KUİN 3.0 mmol.L⁻¹, l=1cm)

ilaç	50µL	60µL	70µL	80µL	90µL
quinz	5mL	5mL	5mL	5mL	5mL
son hacim	5.05mL	5.06mL	5.07mL	5.08mL	5.09mL
ilaç son derişim	2.97*10 ⁻⁵	3.56*10 ⁻⁵	4.14*10 ⁻⁵	4.72*10 ⁻⁵	5.31*10 ⁻⁵
Abs.	0.081	0.098	0.113	0.127	0.148
$\epsilon(\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1})$	2727	2753	2729	2691	2787
$\epsilon_{\text{ORT}}: 2737 \text{ L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$					

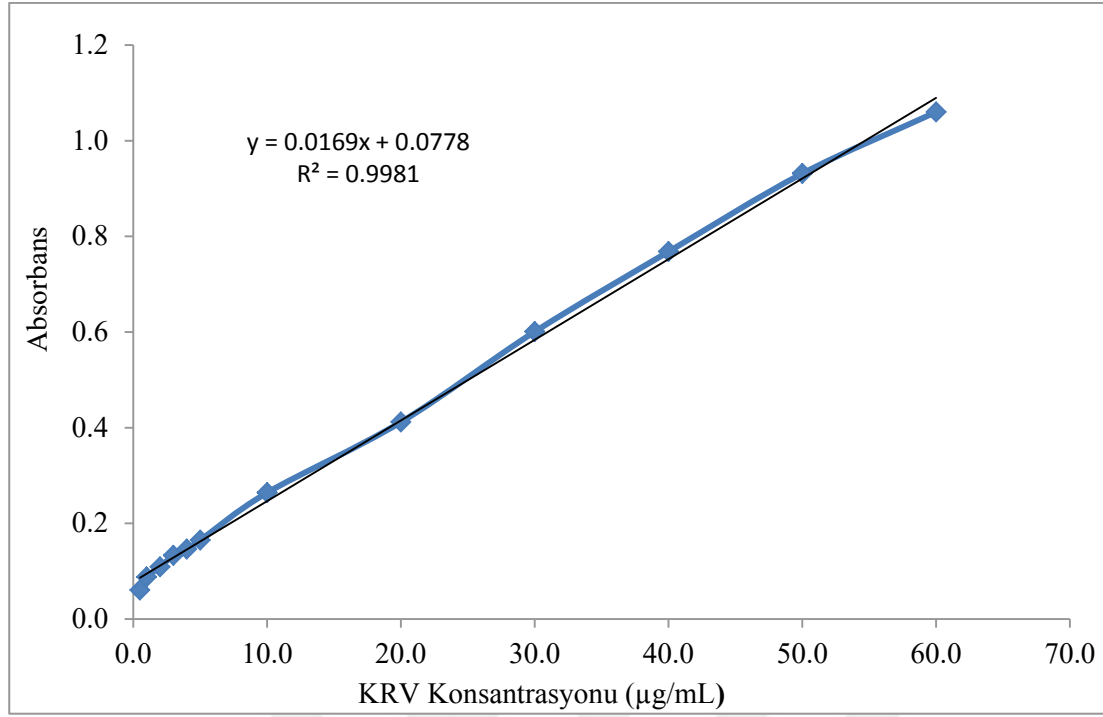
Çizelge 4.3'te verilen sonuçlara göre KRV-KUİN yük transfer kompleksinin ortalama molar absorptivite katsayısının 2737 L.mol⁻¹.cm⁻¹ olduğu bulundu.

4.1.6. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

4.1.6. 1 Kalibrasyon Eğrisi

Bu çalışmada Lambert-Beer yasasına uygun en iyi lineer aralık belirlendi. Bölüm 3.4.1' de anlatılan yol izlenerek elde edilen sonuçlar Çizelge 4.4 ve Şekil 4.9'da verildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI



Şekil 4.9. KRV tayini için geliştirilen yöntem ile bulunan kalibrasyon eğrisi

Çizelge 4.4. KRV için geliştirilen yöntemde kalibrasyon eğrisine ait sonuçlar

µg/mL	A ₁	A ₂	A ₃	ORT	±SS	%BSS
0.5	0.061	0.060	0.060	0.060	0.001	0.96
1.0	0.088	0.088	0.087	0.088	0.001	0.66
2.0	0.111	0.107	0.109	0.109	0.002	1.83
3.0	0.136	0.132	0.131	0.133	0.003	1.99
4.0	0.148	0.145	0.145	0.146	0.002	1.19
5.0	0.164	0.165	0.165	0.165	0.001	0.35
10.0	0.267	0.263	0.262	0.264	0.003	1.00
20.0	0.411	0.412	0.412	0.412	0.001	0.14
30.0	0.604	0.598	0.600	0.601	0.003	0.51
40.0	0.763	0.773	0.768	0.768	0.005	0.65
50.0	0.931	0.917	0.946	0.931	0.015	1.56
60.0	1.067	1.054	1.059	1.060	0.007	0.62

Şekil 4.9'daki sonuçlara göre KRV için geliştirilen yöntemde en iyi lineer aralığın 0.5-60 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ olduğu tespit edildi. Bu aralıkta korelasyon katsayısının 0.9981 olduğu saptandı.

Çizelge 4.5. KRV için geliştirilen yöntemde gözlenebilirlik sınırı(LOD) ve tayin sınırı (LOQ)

<u>Parametreler</u>	<u>Değer</u>
Dalgaboyu (λ_{maks})	560
Konsantrasyon aralığı ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.5-60
Korelasyon katsayısı (r^2)	0.9981
Korelasyon denklemi	$y=0.0169x+0.0778$
Eğim	0.0169
Kayma değeri	0.0778
LOD ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.147
LOQ ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	0.491

Çizelge 4.5'teki sonuçlara göre % 95 güven seviyesinde elde edilen LOD 0.147 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ve LOQ 0.491 $\mu\text{g}/\text{mL}$ değerleri, KRV için 0,5-60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aralığında geliştirilen yöntemin oldukça hassas olduğunu göstermektedir.

4.1.6.2. Doğruluk

15-60 $\mu\text{g}/\text{mL}$ aralığında hazırlanan KRV çözeltilerine Bölüm 3.4.5.1'de anlatılan yöntem uygulandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.6'da verildi.

Çizelge 4.6. KRV için geliştirilen yöntemde % geri kazanım

Alınan Kons.(AK) ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Ortalama Bulunan Kons.(OBK) ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	% GK	$\pm\text{SS}$	%BSS	%BH
15	14.82	98.83	0.07	0.46	1.17
25	25.20	100.80	0.38	1.49	0.80
30	29.79	99.32	0.4	1.35	0.68
45	44.57	99.04	0.43	0.96	0.96
55	54.41	98.93	0.12	0.23	1.07
60	59.87	99.79	0.5	0.84	0.21

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.6'daki sonuçlara göre geri kazanım çalışmasında en düşük %98.8, en yüksek %100.8 değer elde edildi. Sonuçların %95-105 arasında olması, % BSS'nin % 2'den, ve % BH'nin %1.2'den düşük çıkması yöntemin doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir.

Ayrıca geliştirilen yöntemin doğruluğunu göstermek amacıyla tabletten geri kazanım çalışması da yapıldı. Bu çalışmada, Bölüm 3.4.5.2'de anlatılan standart ekleme yöntemi uygulandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.7'de verildi.

Çizelge 4.7. KRV için geliştirilen yöntemde standart ekleme yöntemi ile tabletten geri kazanım

20µg/mL	AK (µg/mL)	OBK (µg/mL)	%GK	SS	%BSS	%BH
40%	28	27.61	98.6	0.19	0.69	1.41
60%	32	31.81	99.4	0.33	1.02	0.57
80%	36	35.65	99.1	0.39	1.11	0.93
100%	40	39.36	98.4	0.53	1.34	1.57
120%	44	43.50	99.0	0.39	0.89	0.97

Çizelge 4.7'deki sonuçlara göre standart ekleme yönteminde % geri kazanım en düşük %98.4, en yüksek %99.4'tür. Bağlı standart sapmanın %2'den bağlı hatanın genel olarak % 1.5'ten küçük olması yöntemin doğruluğunun ve tablet numunelere uygulanabilirliğinin iyi olduğunu göstermektedir.

t-testi için Bölüm 3.4.5.3'te anlatılan yol izlenerek yapılan çalışmada % 95 güven seviyesinde ve 4 serbestlik derecesinde aşağıdaki istatistiksel değerler elde edildi.

Çizelge 4.8. KRV'nin tablet formülasyonu için t-testi

<u>Ticari Marka</u>	<u>Tablet Değeri</u>	<u>Bulunan Değer ±SS</u>
Coronis	25 mg	25.17 ± 0.19
	$H_0: \mu=25\text{mg}, v=n-1=4$	$t_t = 2.77$
	$H_0: \mu \neq 25\text{mg } \alpha/2=0.05/2=0.025$	$t_d = 1.97$
% Geri Kazanım = % 100.68		

Çizelge 4.8'de verilen sonuçlara göre t_d (t deneysel) değerinin t_t (t teorik) değerinden küçük çıkması geliştirilen yöntemin, güvenilir ve doğru olduğunu göstermektedir.

4.1.6.3. Dayanıklılık Testi

Bu çalışmada, 15 µg/mL ve 45 µg/mL KRV içeren çözeltilere Bölüm 3.4.6'da anlatılan yöntem uygulandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.9'da verildi.

Çizelge 4.9. KRV için geliştirilen yöntemin dayanıklılığı

	<u>Başlangıç</u>	<u>24.Saat</u>	<u>48.Saat</u>	<u>72.Saat</u>
15 µg/mL	14.69	14.57	14.45	14.69
	14.86	14.69	14.51	14.75
	14.80	14.39	14.69	14.75
ORT	14.79	14.55	14.55	14.73
SS	0.09	0.15	0.12	0.03
%BSS	0.61	1.02	0.85	0.23
45 µg/mL	44.45	44.15	43.86	43.56
	44.33	44.09	43.74	44.09
	44.39	43.98	43.38	43.38
ORT	44.39	44.07	43.66	43.68
SS	0.06	0.09	0.25	0.37
% BSS	0.13	0.21	0.56	0.85

Çizelge 4.9'daki sonuçlara göre 72 saat boyunca çözeltilerin absorbanlarındaki değişim oldukça düşük düzeydedir. Bu sonuçlar kompleksin kararlılığının iyi olduğunu göstermektedir.

4.1.6.4. Tekrarlanabilirlik

Aynı cihazda 45 µg/mL KRV içeren çözeltinin absorbansı 10 kez ard arda ölçüldü. Absorbanslara karşılık gelen konsantrasyonlar kalibrasyon doğrusunun denkleminde bulundu. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.10’da verildi.

Çizelge 4.10. KRV için geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliği (µg/mL)

44.80	44.57	44.69	44.45	44.57	44.57	44.63	44.57	44.45	44.51
ORT	44.58	±SS	0.11	% BSS	0.24	% BH	0.93		

Çizelge 4.10’daki sonuçlara göre %BSS ve %BH %1 den düşük elde edildi. Bu çalışmada tekrarlanabilir sonuç alınabileceği görülmektedir.

4.1.6.5. Tekrar Elde Edilebilirlik

Bu çalışmada, Bölüm 3.4.7.2’de anlatılan yol izlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.11’de verildi.

Çizelge 4.11. KRV için geliştirilen yöntemin tekrar elde edilebilirliği (µg/mL)

AK (µg/mL)	OBK (µg/mL)	%GK	±SS	%BSS	%BH
15	14.88	99.3	0.28	1.88	0.70
30	29.72	99.1	0.18	0.60	0.91
45	45.50	101.1	0.43	0.94	1.13
55	54.71	99.5	1.07	1.96	0.51

Çizelge 4.11’deki sonuçlara göre %BSS’nin %2 den % BH’nin genel olarak % 1 düşük çıkması yöntemin tekrar elde edilebilirliğinin iyi olduğunu göstermektedir.

4.1.6.6. Ara Kesinlik

45 µg/mL ve 15 µg/mL KRV içeren iki farklı konsantrasyondaki çözeltiye Bölüm 3.4.7.3’te anlatılan yöntem uygulandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.12’de verildi.

Çizelge 4.12. KRV için geliştirilen yöntemin ara kesinliği (AK: 45 µg/mL ve 15 µg/mL)

	OBK		OBK
	44.86		15.04
1.Gün	44.75	1. Gün	14.86
	<u>44.75</u>		<u>15.10</u>
	44.39		14.57
2.Gün	44.39	2.Gün	14.69
	<u>44.45</u>		<u>15.04</u>
	44.51		15.16
3.Gün	44.39	3.Gün	15.16
	<u>44.63</u>		<u>14.98</u>
ORT	44.57		14.96
SS	0.18		0.21
%BSS	0.41		1.40

Çizelge 4.12’deki sonuçlara göre KRV’nin iki farklı konsantrasyonda gün içinde ve günler arası hazırlanan çözeltilerine geliştirilen yöntem uygulandığında absorbanslar arasındaki farkın çok fazla olmadığı görülmektedir. % BSS %2’den düşüktür.

4.1.6.7. Karvedilolün Tablet Formülasyonunda Bulunan İnterfer Maddelerin Absorbansa Etkisi

Yerel eczaneden temin edilen Coronis (Bilim İlaç A.Ş.) 25 mg KRV içeren tabletlerde bulunan yardımcı maddelerin absorbansa etkisi incelendi.

Bu çalışma, Bölüm 3.4.4’te anlatılan yol izlenerek yapıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.13’te verildi.

Çizelge 4.13. KRV için geliştirilen yöntemde tablette bulunan yardımcı maddelerin interfer etkisi

$\bar{I}_1/\bar{I}_2$ ($\mu\text{g/mL}$)	LMH %GA	Sukroz %GA	Povidon K25 %GA	Mg Str %GA
0/45	100	100	100	100
45/45	98.6	99.8	100.1	95.2
450/45	98.8	100	100.2	103.0
4500/45	100.6	99.8	96.6	103.2

$\bar{I}_1$:interfer madde konsantrasyonu, $\bar{I}_2$:Karvedilol konsantrasyonu

Çizelge 4.13'teki sonuçlara göre interfer maddelerin çok yüksek konsantrasyonlarda bile absorbans üzerine etkilerinin olmadığı gözlemlendi.

4.1.6.8. Geliştirilen Yöntemin Sağlamlığı

Geliştirilen yöntemin sağlamlığı Bölüm 3.4.8'de anlatıldığı gibi eklenen reaktif hacminde (1.25 ± 0.05 mL) ve sıcaklıkta (27 ± 2 °C) küçük değişikliklerin etkisinin değerlendirilmesi için optimize şartlar korunarak çalışıldı. Çizelge 4.14'te elde edilen sonuçlar verildi.

Çizelge 4.14. KUİN hacmi ve reaksiyon sıcaklığındaki küçük değişimin absorbans üzerine etkisi

		%GK	$\pm$ SS	%BSS	%BH
KUİN Hacmi	$1.25 + 0.05$	99.00	0.36	0.80	1.05
(mL)	$1.25 - 0.05$	100.22	0.21	0.47	0.22
Sıcaklık	$27 + 2$	99.04	0.37	0.83	0.96
(°C)	$27 - 2$	99.22	0.15	0.33	0.78

Çizelge 4.14'te verilen sonuçlara göre KUİN hacminde ve reaksiyon sıcaklığında yapılan küçük değişimin kompleksin absorbansını önemli derecede etkilemediği tespit edildi.

Çizelge 4.15'te daha önce KRV ile yapılan spektrofotometrik çalışmalar tezde geliştirilen yöntem ile karşılaştırıldı. Bu çizelge ile ilgili sonuçlar 5.Tartışma ve Sonuç Bölümünde verildi.

Çizelge 4.15. KRV ile daha önce yapılan spektrofotometrik çalışmaların karşılaştırılması

<u>Referans</u>	<u>Reaktif</u>	<u>Reaksiyon</u>	<u>Çözücü</u>	<u>Kons.</u>	<u>λ (nm)</u>
El-Didamony ve ark 2015	BKY	İyon çifti	Diklormetan	1.0-12 µg/mL	402
El-Didamony ve ark 2015	BTM	İyon çifti	Diklormetan	1.0-11 µg/mL	402
Shetty ve Narayana 2012	p-kloranil	Yük transferi		20-100 µg/mL	662
Shetty ve Narayana 2012	PDAB	Kondensasyon		50-250 µg/mL	601
Önal 2011	NFB	İyon çifti	Kloroform	7.0-60 µg/mL	480
Jat ve ark 2010	BFM	İyon çifti	Kloroform	5.0-20 µg/mL	414
Sreevidya ve Narayana 2009	Ninhidrin/Asetaldehit	Yük transferi		0.2-1.2 µg/mL	402
Sreevidya ve Narayana 2009	Sodyum nitroprussid	Yük transferi		0.6-2.0 µg/mL	558
Cardoso ve ark 2007	iyot	Yük transferi	Asetonitril	2.0-7.0 µg/mL	363
Laila ve ark 2010	Dansil Klorür	İyon çifti	Aseton/ Karbonat (3:2)	5.0-80 ng/mL	445
Afaf ve Eman 2018	Hematoksilen	İyon çifti	Su/borik asit	3.0-16 µg/mL	560
Tez yöntemi	KUİN*	Yük transferi	Metanol	0.5-60 µg/mL	560

4.2. NBV için Geliştirilen Yönteme Ait Bulgular

NBV nin kimyasal yapısında sekonder amin grubu bulunmaktadır. Bu çalışmada, ilaca ait sekonder amin grubunun, NH_3 varlığında CS_2 ile ditiyokarbamat türevine dönüştürülerek Cu^{2+} kompleksi oluşturması sağlandı. Oluşan sarı renkli kompleks, su fazından su ile karışmayan organik bir çözücüye alınarak UV-GB de tayin edildi. Yöntemde optimal koşulların kesinleştirilmesi için absorbans üzerine çözücü cinsinin, NH_3 , CS_2 ve Cu^{2+} miktarlarının ve reaksiyon süresinin etkisi incelendi. Optimal koşullar belirlendikten sonra yöntemin validasyonu yapıldı.

4.2.1. Çözücünün Etkisi

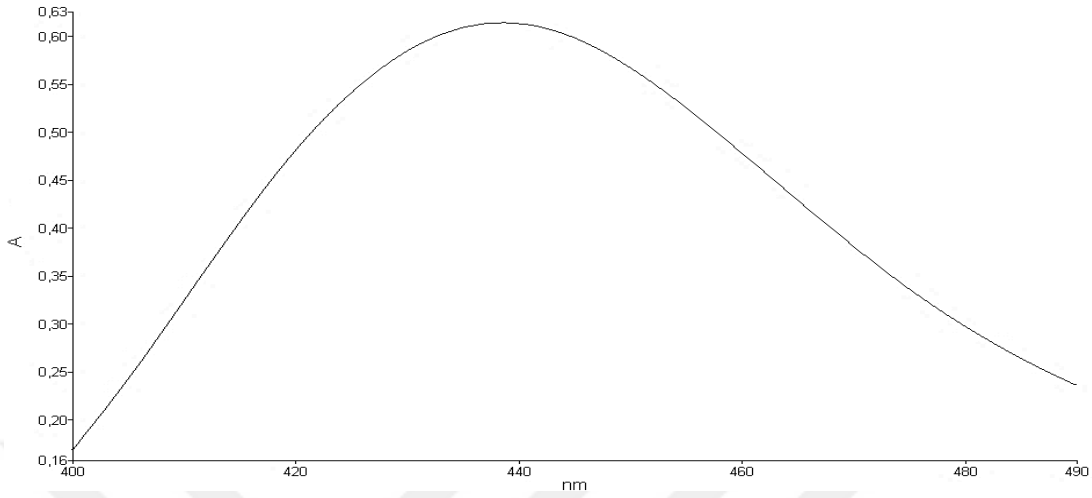
Bu çalışmada, Bölüm 3.3.1.1’de anlatılan yol izlenerek NBV-Cu-ditiyokarbamat kompleksinin en karalı olduğu ekstraksiyon çözücüsü incelendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.16’da verildi.

Çizelge 4.16. Absorbans üzerine çözücünün etkisi (0.2 mmol.L^{-1} NBV, $N=3$)

Çözücü Cinsi	A ₁	A ₂	A ₃	ORT	±SS
MIBK	0.748	0.719	0.644	0.704	0.044
Etil Asetat	0.703	0.704	0.688	0.696	0.008
Kloroform	0.626	0.618	0.556	0.600	0.031
Diklorometan	0.449	0.457	0.444	0.450	0.005
n-Hekzan	Çözücüye geçiş olmadığı için absorbans alınmadı				
n-Bütanol	Çözücüye geçiş oldu fakat ilk 10 dk da renk kayboldu				

En yüksek absorbans MIBK çözücüsünden alınsa da su fazında oluşan sarı kompleks MIBK’a ekstrakte edildikten sonra 60 dk içinde kompleksin sarı rengi kaybolduğu için çalışmalara bu çözücüyle devam edilemedi. Bu yüzden 2. en yüksek absorbansı veren Etilasetat çözücüsü denendi fakat bir sonraki aşamalarda (NH_3 ve CS_2 konsantrasyonlarının belirlenmesi) elde edilen grafiklerin anlamlı olmaması nedeniyle 3. en iyi çözücü olan kloroform ile çalışmaya devam edildi.

Şekil 4.10'da kloroform çözücüsü içinde NBV-Cu-ditiyokarbamat kompleksinin UV-GB spektrumu verildi.

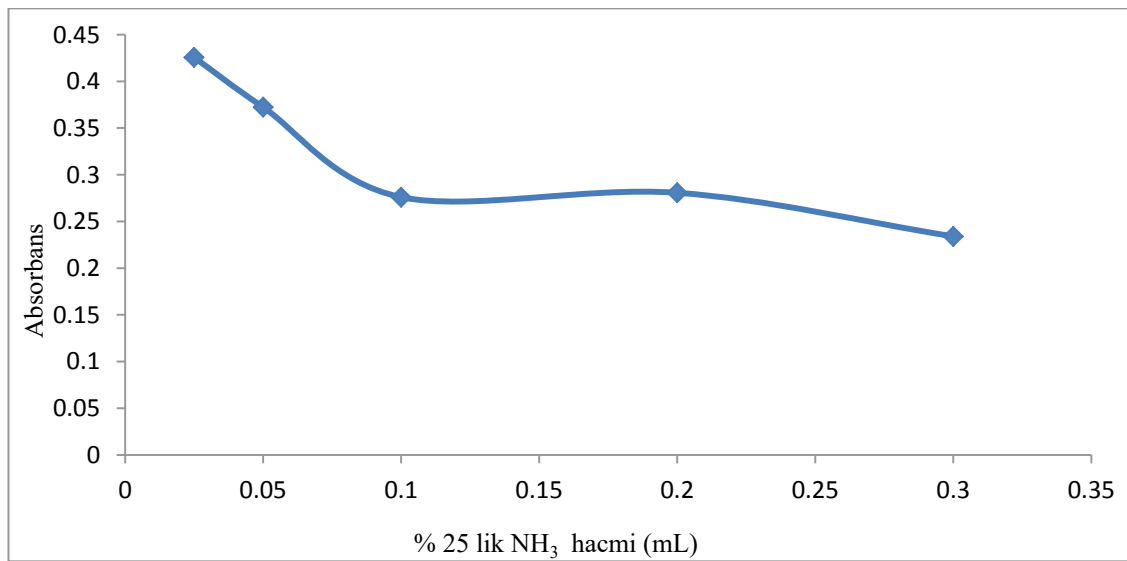


Şekil 4.10. Kloroform çözücüsü içinde NEBİ-Cu-ditiyokarbamat kompleksinin UV-GB spektrumu

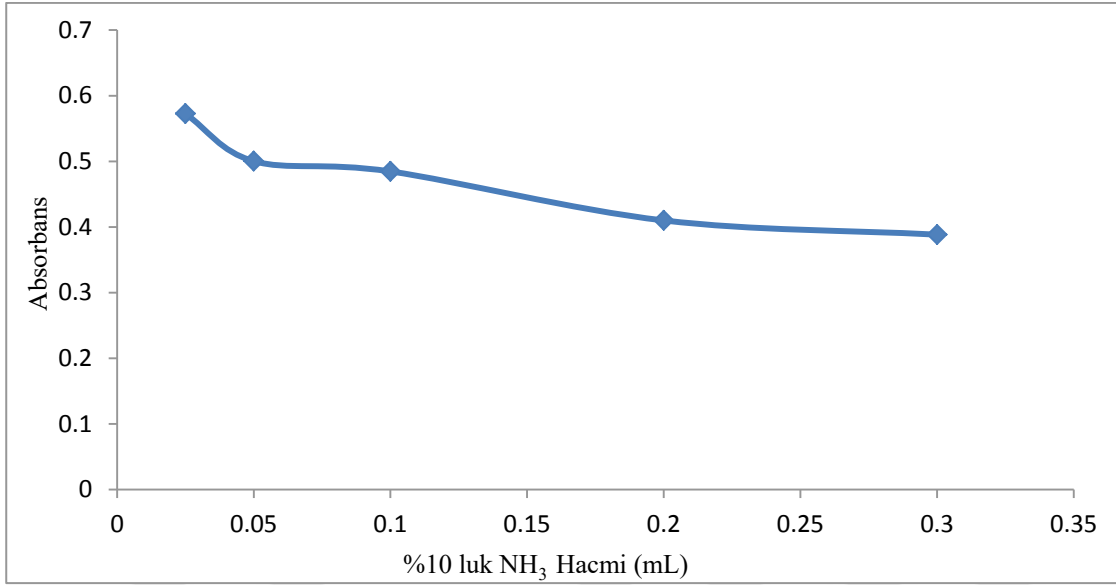
Şekil 4.10'da NBV-Cu-ditiyokarbamat kompleksinin 437 nm'de maksimum absorbans verdiği görülmektedir.

4.2.2. NH_3 Konsantrasyonunun ve Hacminin Belirlenmesi

Bu çalışmada, %25, %10 ve %1'lik NH_3 çözeltilerinin etkisi, 0.2 mmol.L^{-1} NBV çözeltilerine Bölüm 3.3.1.2'de anlatılan yol uygulanarak incelendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.11, Şekil 4.12 ve Şekil 4.13'te verildi.

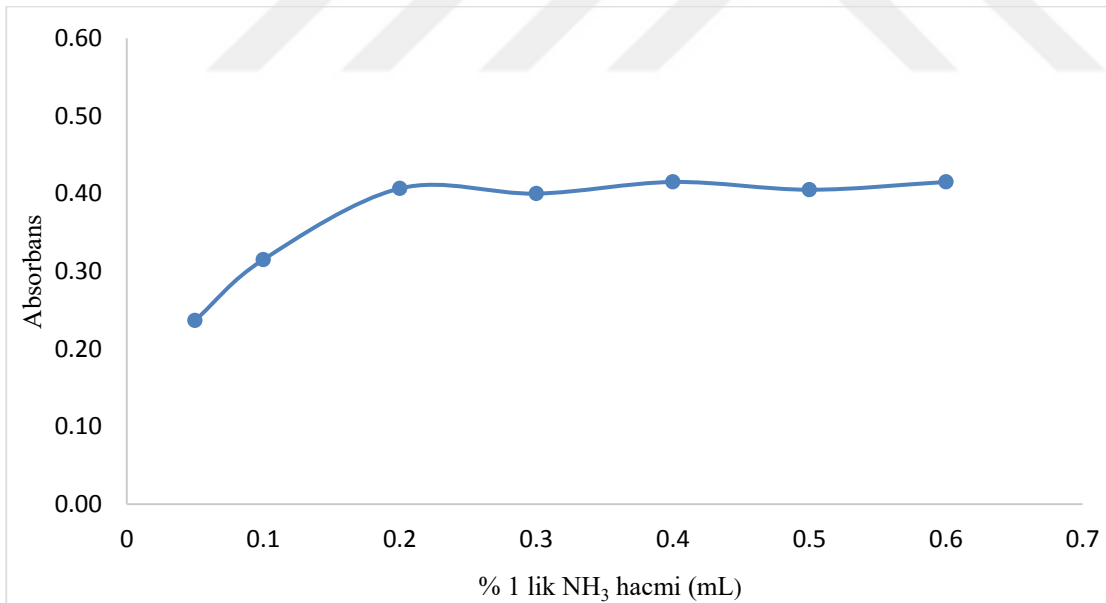


Şekil 4.11. Kloroform çözücüsü içinde % 25'lik NH_3 miktarının etkisi



Şekil 4.12. Kloroform çözücüsü içinde % 10'luk NH₃ miktarının etkisi

Şekil 4.11 ve Şekil 4.12'de verilen sonuçlara göre %25 ve %10 luk NH₃ ile yapılan çalışmalarda absorbansın NH₃ eklendikçe azaldığı gözlemlendi. Bu sonuçlara göre NH₃ konsantrasyonunun % 1'e düşürülmesine karar verildi.

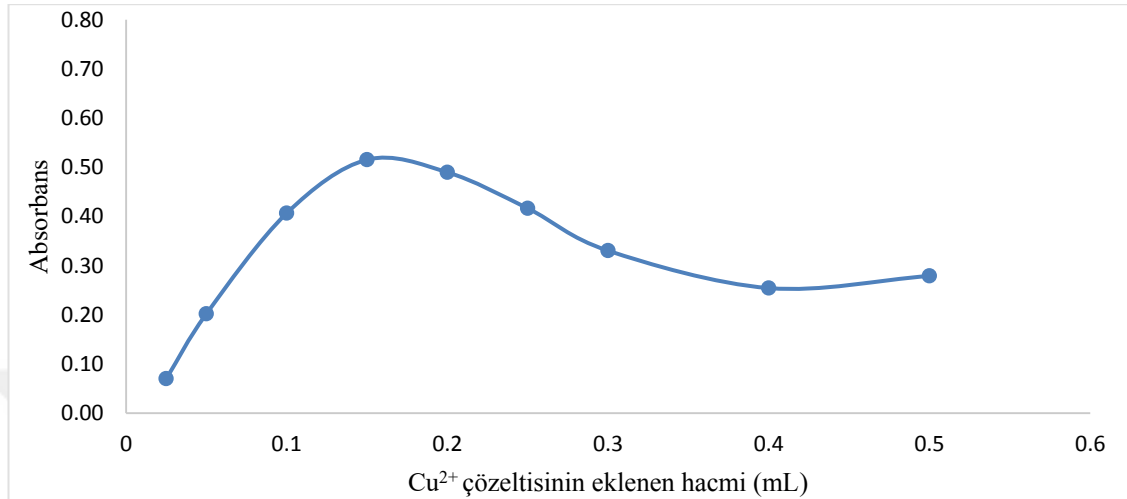


Şekil 4.13. Kloroform çözücüsü içinde % 1'lik NH₃ miktarının etkisi

Şekil 4.13'te verilen sonuçlara göre 0.2 mmol.L⁻¹ NBV çözeltilerine, %1'lik NH₃ çözeltisi 0.05-0.6 mL aralığında eklendi. 0.2 mL'den sonraki çalışmalarda absorbanstaki değişimin çok az olması nedeniyle optimum %1'lik NH₃ çözeltisinin hacminin 0.2 mL olmasına karar verildi.

4.2.3. Cu^{2+} Miktarının Etkisi

Bu çalışmada, Bölüm 3.3.1.3'te anlatılan yöntem 0.2 mmol.L^{-1} NBV çözeltilerine uygulandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.14'te verildi.

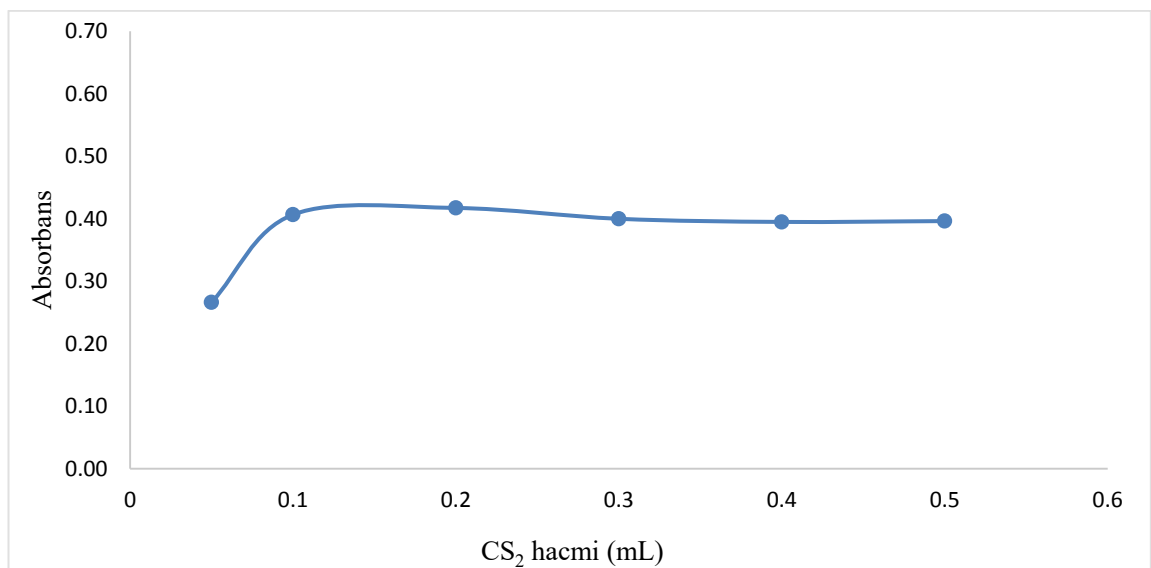


Şekil 4.14. Absorbansa Cu^{2+} miktarının etkisi ($2 \times 10^{-3} \text{ M}$)

Şekil 4.14'te verilen sonuçlara göre optimum Cu^{2+} (2.0 mmol.L^{-1}) miktarının 0.15 mL olmasına karar verildi.

4.2.4. CS_2 Miktarının Etkisi

Bu çalışmada, 0.2 mmol.L^{-1} NBV çözeltilerine Bölüm 3.3.1.4'te anlatılan yöntem uygulandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.15'te verildi.

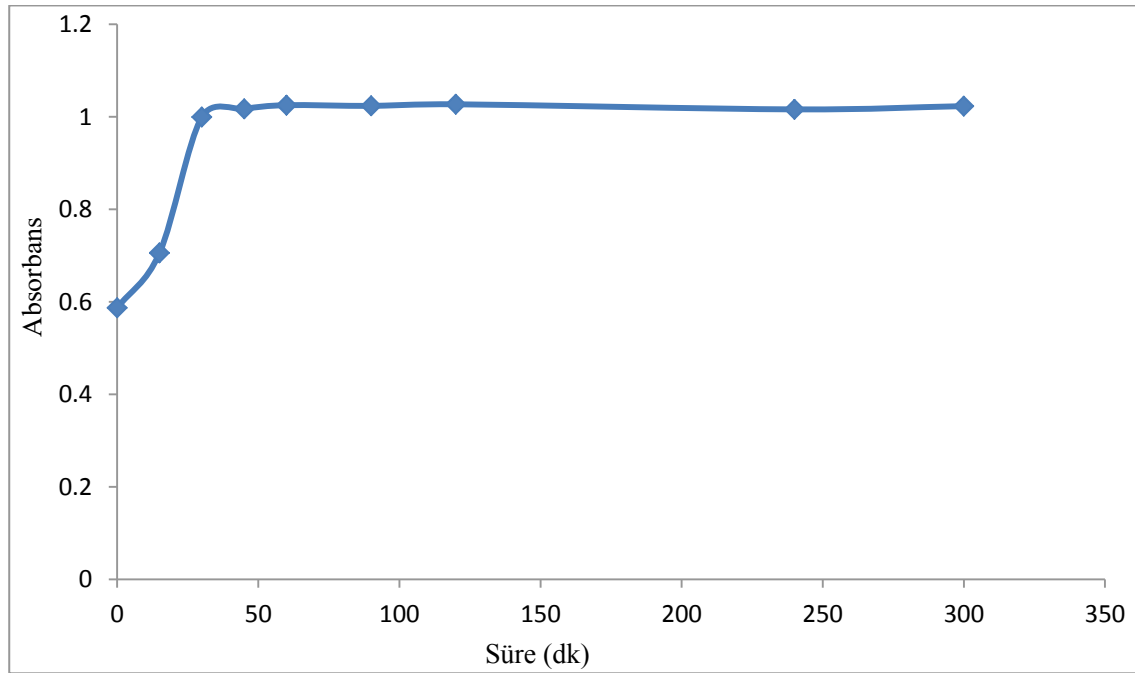


Şekil 4.15. Absorbansa CS_2 miktarının etkisi

Şekil 4.15'teki sonuçlara göre 0.1 mL'den sonraki çalışmalarda absorbanstaki değişimin çok az olması nedeniyle optimum CS₂ miktarının 0.1 mL olmasına karar verildi.

4.2.5. Sürenin Etkisi

Bu çalışmada reaktiflerin optimum koşulları belirlendikten sonra kompleksin absorbanasının zamanla değişimi Bölüm 3.3.1.5'te anlatılan yol izlenerek incelendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.16'da verildi.



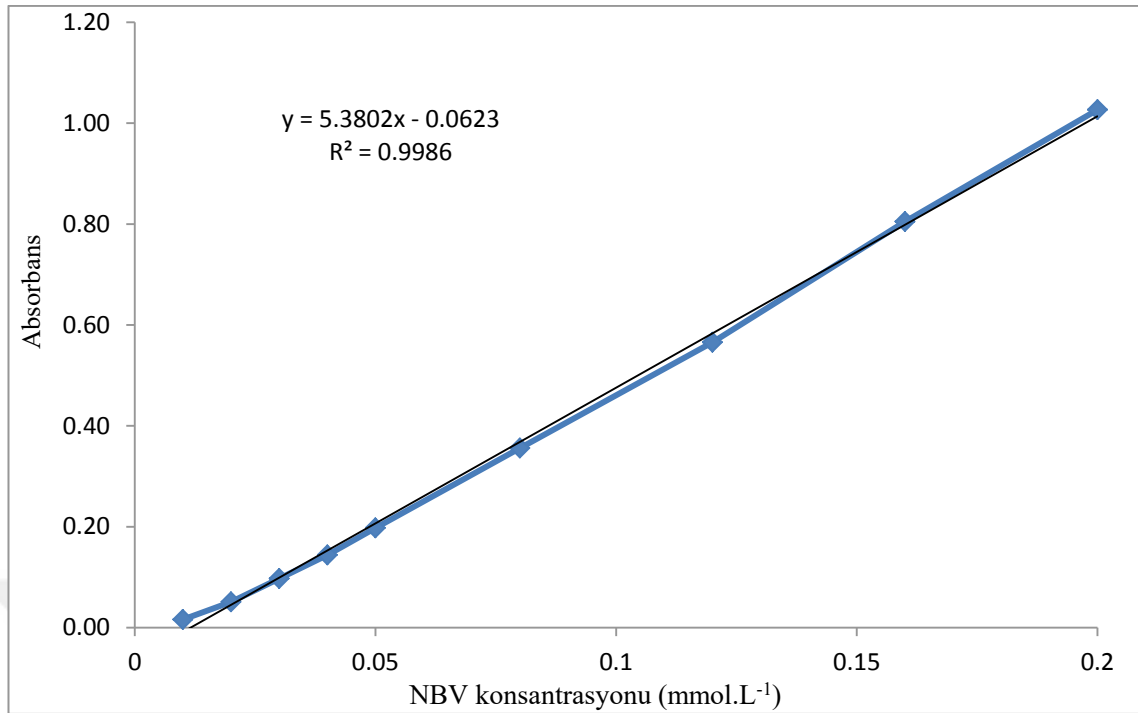
Şekil 4.16. Reaksiyon süresinin absorbanans üzerine etkisi

Şekil 4.16'daki sonuçlara göre optimum reaksiyon süresinin 30 dk olduğu belirlendi.

4.2.6. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

4.2.6.1. Kalibrasyon Eğrisi

Bu çalışmada Lambert-Beer yasasına uygun en iyi lineer aralık belirlendi. 0.01-0.20 mmol.L⁻¹ arasında hazırlanan NBV çözeltilerine Bölüm 3.4.1'de anlatılan metot uygulandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.17'de verildi



Şekil 4.17. NBV'nin geliştirilen yönteme göre kalibrasyon eğrisi

Çizelge 4.17. NBV için geliştirilen yöntemde kalibrasyon eğrisine ait sonuçlar

mmol.L ⁻¹	A ₁	A ₂	A ₃	ORT	±SS	%BSS
0.01	0.0161	0.0163	0.0158	0.016	0.0003	1.57
0.02	0.0512	0.0510	0.0504	0.051	0.0004	0.82
0.03	0.096	0.0990	0.0970	0.097	0.0015	1.57
0.04	0.144	0.1450	0.1430	0.144	0.0010	0.69
0.05	0.201	0.1980	0.1940	0.198	0.0035	1.78
0.08	0.358	0.3570	0.3530	0.356	0.0026	0.74
0.12	0.562	0.5670	0.5680	0.566	0.0032	0.57
0.16	0.806	0.8020	0.8060	0.805	0.0023	0.29
0.2	1.029	1.0310	1.0200	1.027	0.0059	0.57

Şekil 4.17'deki sonuçlara göre NBV için en iyi lineer aralığın 0.01-0.20 mmol.L⁻¹ olduğu tespit edildi. Bu aralıkta korelasyon katsayısının 0.9986 olduğu saptandı.

Çizelge 4.18. NBV için geliştirilen yöntemde gözlenebilme sınırı(LOD) ve tayin sınırı(LOQ)

<u>Parametreler</u>	<u>Değer</u>
Dalgaboyu (λ_{maks} , nm)	437
Konsantrasyon aralığı (mmol.L ⁻¹)	0.01-0.2
Korelasyon katsayısı (r^2)	0.9986
Korelasyon denklemi	$y=5.3802x+0.0623$
Eğim	5.3802
Kayma değeri	0.0623
LOD (mmol.L ⁻¹)	0.0025
LOQ (mmol.L ⁻¹)	0.0085

Çizelge 4.18'deki sonuçlara göre % 95 güven seviyesinde elde edilen LOD 0.0025 mmol.L⁻¹ ve LOQ 0.0085 mmol.L⁻¹ değerleri, NBV için 0.01-0.2 mmol.L⁻¹ aralığında geliştirilen yöntemin oldukça hassas olduğunu göstermektedir.

4.2.6.2. Doğruluk

0.025-0.1 mmol.L⁻¹ aralığında hazırlanan NBV çözeltilerine Bölüm 3.4.5.1'de anlatılan yöntem uygulandı ve elde edilen sonuçlar Çizelge 4.19'da verildi.

Çizelge 4.19. NBV için geliştirilen yöntemde % geri kazanım

AK (mmol.L ⁻¹)	OBK (mmol.L ⁻¹)	GK%	±SS	%BSS	%BH
0.025	0.0251	100.3	0.0001	0.4278	0.3432
0.05	0.0497	99.5	0.0006	1.1415	0.5118
0.075	0.0750	99.9	0.0002	0.2480	0.0533
0.10	0.1001	100.1	0.0001	0.1072	0.1140

Çizelge 4.19'daki sonuçlara göre geri kazanım çalışmasında en düşük %99.5 en yüksek %100.3 değer elde edildi. Geri kazanım sonuçlarının %95-105 aralığında, %BSS'nin %2'den ve %BH'nin %1'den düşük olması yöntemin doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir.

Ayrıca geliştirilen yöntemin doğruluğunu göstermek amacıyla tabletten geri kazanım çalışması da yapıldı. Bu çalışmada, Bölüm 3.4.5.2’de anlatılan standart ekleme yöntemi uygulandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.20’de verildi.

Çizelge 4.20. NBV için geliştirilen yöntemde standart ekleme yöntemi ile tabletten geri kazanım

0.05 (mmol.L ⁻¹)	AK (mmol.L ⁻¹)	OBK (mmol.L ⁻¹)	%GK	±SS	BSS	BH
40%	0.07	0.0706	100.9	0.0003	0.4020	0.8902
60%	0.08	0.0794	99.3	0.0005	0.6192	0.7240
80%	0.09	0.0891	99.1	0.0006	0.6370	0.9468
100%	0.1	0.0989	98.9	0.0011	1.1427	1.0632
120%	0.11	0.1088	99.0	0.0010	0.9404	1.0457

Çizelge 4.20’deki sonuçlara göre standart ekleme yönteminde geri kazanım en düşük %98.9 en yüksek %100.9’dur. % BSS’nin %2’den ve % BH’nin % 1’den küçük olması yöntemin doğruluğunun ve tablet numunelere uygulanabilirliğinin iyi olduğunu göstermektedir.

t-testi için Bölüm 3.4.5.3’te anlatılan yol izlenerek yapılan çalışmada % 95 güven seviyesinde ve 4 serbestlik derecesinde aşağıdaki istatistiksel değerler elde edildi.

Çizelge 4.21. Nebivolol HCl’nin tablet formu için t-testi sonuçları

Ticari Marka	Tablet Değeri	Bulunan Değer ±SS
Nexivol	5.45 mg	5.408 ± 0.0691
	Ho:μ=5.45mg, v=n-1=4	t _t = 2.776
	Ho:μ≠5.45mg α/2=0.05/2=0.025	t _h = 1.36
Geri Kazanım = % 99.2		

Çizelge 4.21’de verilen sonuçlara göre t_d (t deneysel) değerinin t_t (t teorik) değerinden küçük çıkması geliştirilen yöntemin, güvenilir ve doğru olduğunu göstermektedir.

4.2.6.3. Dayanıklılık Testi

Bu çalışmada, 0.1 mmol.L^{-1} ve $0.075 \text{ mmol.L}^{-1}$ NBV içeren çözeltilere Bölüm 3.4.6’da anlatılan yöntem uygulandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.22’de verildi.

Çizelge 4.22. NBV için geliştirilen yöntemin dayanıklılığı

	45.dk	24. saat	48.saat	72.saat
0.10 (mmol.L ⁻¹)	0.0989	0.0995	0.0997	0.0991
	0.0988	0.0996	0.0997	0.0991
	0.0991	0.0999	0.0992	0.0990
ORT	0.0989	0.0996	0.0995	0.0991
SS	0.0002	0.0002	0.0003	0.0001
%BSS	0.0019	0.0019	0.0027	0.0006
0.075 (mmol.L ⁻¹)	0.0753	0.0753	0.0746	0.0737
	0.0753	0.0750	0.0744	0.0737
	0.0750	0.0750	0.0740	0.0733
ORT	0.0752	0.0751	0.0743	0.0735
SS	0.0002	0.0002	0.0003	0.0002
%BSS	0.0029	0.0029	0.0038	0.0029

Çizelge 4.22’deki sonuçlara göre 72 saat boyunca çözeltilerin absorbanslarındaki değişim oldukça azdır. Bu sonuçlar kompleksin kararlılığının iyi olduğunu göstermektedir.

4.2.6.4. Tekrarlanabilirlik

Aynı cihazda 0.1 mmol.L^{-1} NBV içeren çözeltinin absorbansı 10 kez ard arda ölçüldü. Bulunan sonuçlar Çizelge 4.23’de verildi.

Çizelge 4.23. NBV için geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliği

0.0995	0.0993	0.0993	0.0988	0.0984	0.0995	0.0991	0.0999	0.0997	0.0999
ORT	0.0993	SS	0.0005	%BSS	0.48	%BH	0.67		

Çizelge 4.23'deki sonuçlara göre %BSS ve %BH %1 den düşük elde edildi. Bu çalışmada tekrarlanabilir sonuç alınabileceği görülmektedir.

4.2.6.5. Tekrar Elde Edilebilirlik

Bu çalışmada, 0.025-0.1 mmol.L⁻¹ aralığındaki çözeltilere Bölüm 3.4.7.2'de anlatılan yöntem uygulandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.24'de verildi.

Çizelge 4.24. NBV için geliştirilen yöntemin tekrar elde edilebilirliği

AK (mmol.L ⁻¹)	OBK (mmol.L ⁻¹)	%GK	±SS	BSS	BH
0.025	0.0248	99.3	0.0001	1.3961	0.7472
0.05	0.0503	100.6	0.0001	1.1478	0.6034
0.075	0.0741	98.8	0.0003	2.0616	1.2098
0.10	0.0992	99.2	0.0003	1.5401	0.8153

Çizelge 4.24'deki sonuçlara göre bağıl standart sapmanın genel olarak %2 den düşük çıkması yöntemin tekrar elde edilebilirliğini göstermektedir

4.2.6.6. Ara Kesinlik

0.075 mmol.L⁻¹ ve 0.1 mmol.L⁻¹ NBV içeren iki farklı konsantrasyondaki çözeltiye Bölüm 3.4.7.3'te anlatılan yöntem uygulandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.25'te verildi.

Çizelge 4.25. NBV için geliştirilen yöntemin ara kesinliği

	0.075 mM		0.1 mM
	0.0757		0.0993
1. GÜN	0.0764	1.GÜN	0.0995
	<u>0.0763</u>		<u>0.1001</u>
	0.0759		0.0987
2. GÜN	0.0746	2.GÜN	0.0986
	<u>0.0751</u>		<u>0.0993</u>
	0.0761		0.0991
3. GÜN	0.0753	3.GÜN	0.0997
	<u>0.0751</u>		<u>0.0995</u>
ORT	0.0756	ORT	0.0993
SS	0.0006	SS	0.0005
%BSS	0.81	%BSS	0.4584

Çizelge 4.25'teki sonuçlara göre NBV'nin iki farklı konsantrasyonda gün içinde ve günler arası hazırlanan çözeltilerine geliştirilen yöntem uygulandığında absorbanlar arasında farkın çok fazla olmadığı görülmektedir. % BSS %2'den düşüktür.

4.2.6.7. NBV Tablet Formülasyonunda Bulunan İnterfer Maddelerin Absorbansa Etkisi

Yerel eczaneden temin edilen NEXIVOL (Abdi İbrahim İlaç A.Ş.) 5,45 mg NBV içeren tabletlerde bulunan yardımcı maddelerin absorbansa etkisi incelendi.

Bu çalışma, Bölüm 3.4.4'te anlatılan yol izlenerek yapıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.26'te verildi.

Çizelge 4.26. NBV için geliştirilen yöntemde tablette bulunan yardımcı maddelerin interfer etkisi

$\dot{I}_1/\dot{I}_2$	LMH %GA	Nişasta %GA	MKS %GA	HPMS %GA	Mg Str %GA
0	100.0	100.0	100.0	100.0	100.0
1	83.7	97.4	101.0	99.3	92.9
10	67.9	96.8	84.5	99.4	92.1
100	52.1	98.0	96.5	99.5	90.8

$\dot{I}_1$: interfer madde konsantrasyonu, $\dot{I}_2$: Nebivolol HCl konsantrasyonu

Çizelge 4.26'daki sonuçlara göre LMH dışındaki interfer maddelerin çok yüksek konsantrasyonlarda bile absorbands üzerine etkilerinin olmadığı gözlemlendi

4.2.6.8. Geliştirilen Yöntemin Sağlamlığı

Geliştirilen yöntemin sağlamlığı Bölüm 3.4.8'de anlatıldığı gibi eklenen NH_3 hacminde (0.2 ± 0.05 mL) ve CS_2 hacminde (0.1 ± 0.01) küçük değişikliklerin etkisinin değerlendirilmesi için optimize şartlar korunarak çalışıldı. Çizelge 4.25'te elde edilen sonuçlar verildi.

Çözeltiler hazırlandıktan 30 dk sonra ölçüm alındı. Çizelge4.27'de elde edilen sonuçlar verilmiştir.

Çizelge 4.27. Reaktif hacmindeki küçük değişimin absorbandsa etkisi

		%GK	$\pm$ SS	%BSS	%BH
NH₃ Hacmi (mL)	0.2 + 0.05	99.2	0.001	0.506	0.768
	0.2 – 0.05	98.3	0.0004	0.392	1.697
CS₂ Hacmi (mL)	0.1 + 0.01	99.9	0.001	0.579	0.09
	0.1 – 0.01	98.6	0.0002	0.246	1.4

Çizelge 4.27’de verilen sonuçlara göre NH_3 hacminde (0.2 ± 0.05 mL) ve CS_2 hacminde (0.1 ± 0.01) yapılan küçük değişimin kompleksin absorbansını önemli derecede etkilemediği tespit edildi.

Aşağıdaki Çizelge 4.28’de NBV ile daha önce yapılan spektrofotometrik çalışmaların sonuçları ile tezde geliştirilen yöntemin sonuçları karşılaştırıldı. Bu çizelge ile ilgili açıklamalar Tartışma ve Sonuç bölümünde verildi.



Çizelge 4.28. NBV ile daha önce yapılan spektrofotometrik çalışmaların karşılaştırılması

Referans	Reaktif	Reaksiyon	Çözücü	Kons.	λ (nm)
Manohar ve ark 2013			Metanol/6.8 fosfat tamponu	10-50 $\mu\text{g/mL}$	282
Alhemiary 2017	DDK	Yük transfer	Asetonitril	4.0-40 $\mu\text{g/mL}$	620
Alhemiary 2017	DNF	Yük transfer	Diklormetan	2-25 $\mu\text{g/mL}$	525
Alhemiary 2017	PA	Yük transfer	Diklormetan	1.0-35 $\mu\text{g/mL}$	500
Mishra ve ark 2007	BKY	İyon çifti	Kloroform	1-11 $\mu\text{g/mL}$	414
Mishra ve ark 2007	Solokrom Black T	İyon çifti	Kloroform	10-90 $\mu\text{g/mL}$	515
Murali ve ark 2013	NKS	İyon çifti	0.1 M NaOH	10-60 $\mu\text{g/mL}$	460
Murali ve ark 2013	Co(SCN) ₂	Koordinasyon	Nitrobenzen	8-20 $\mu\text{g/mL}$	630
Tez yöntemi	*CS ₂ -Cu ²⁺	Koordinasyon	Kloroform	4.4-88 $\mu\text{g/mL}$	437

4.3. PRK için Geliştirilen Yönteme Ait Bulgular

PRK nin kimyasal yapısında sekonder amin grubu bulunmaktadır. Bu çalışmada, ilaca ait sekonder amin grubunun, NH_3 varlığında CS_2 ile ditiyokarbamat türevine dönüştürülerek Cu^{2+} kompleksi oluşturması sağlandı. Oluşan sarı renkli kompleks, su fazından su ile karışmayan organik bir çözücüye alınarak UV-GB de tayin edildi. Yöntemde optimal koşulların kesinleştirilmesi için absorbans üzerine çözücü cinsinin, NH_3 , CS_2 ve Cu^{2+} miktarlarının ve reaksiyon süresinin etkisi incelendi. Optimal koşullar belirlendikten sonra yöntemin validasyonu yapıldı.

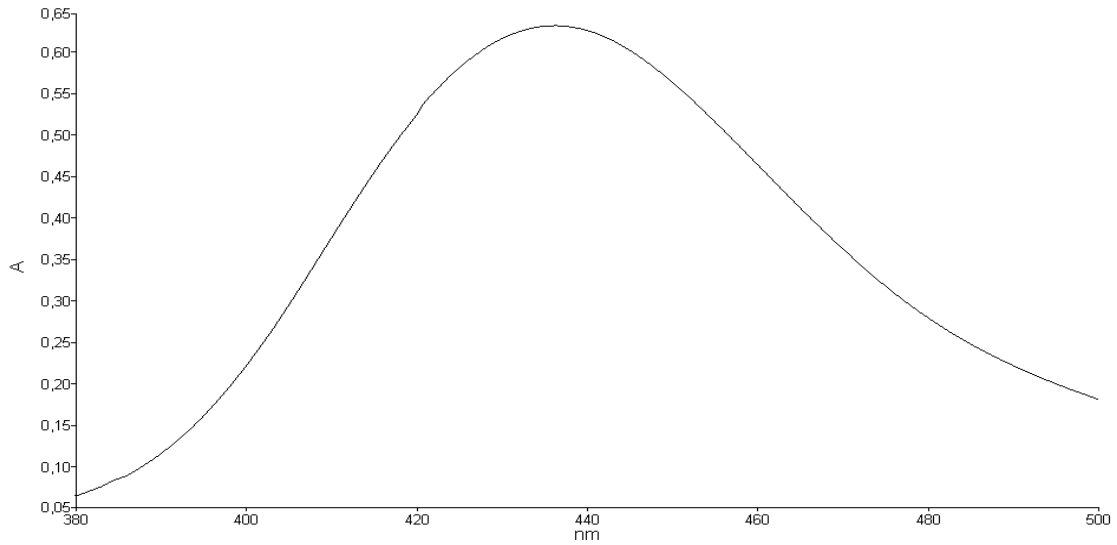
4.3.1.Çözücünün Etkisi

Bu çalışmada, Bölüm 3.3.1.1’de anlatılan yol izlenerek PRK-Cu-ditiyokarbamat kompleksinin en karalı olduğu ekstraksiyon çözücüsü incelendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.29’da verildi.

Çizelge 4.29. Çözücünün Etkisi

Çözücü Cinsi	A ₁	A ₂	A ₃	ORT	±SS
Kloroform	0.024	0.0290	0.0380	0.030	0.0058
Etil Asetat	0.54	0.5710	0.4340	0.515	0.0587
MIBK	0.583	0.5920	0.5930	0.589	0.006
Diklormetan	0.092	0.092	0.091	0.092	0.0010

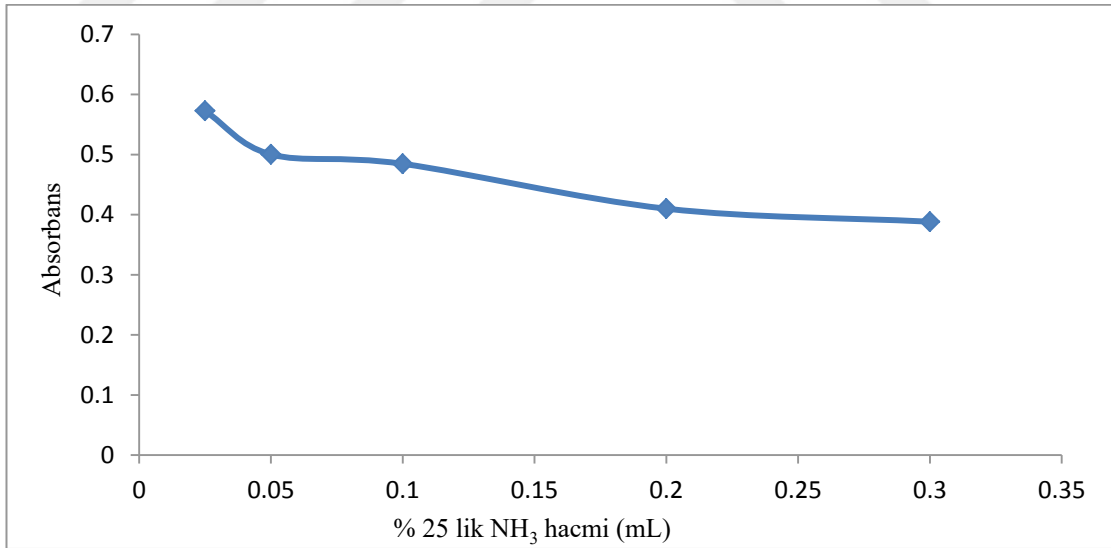
Çizelge.4.29’daki sonuçlara göre en yüksek absorbans MIBK çözücüsünde alındı. Optimum çözücünün maksimum absorbanstan dolayı MIBK olmasına karar verildi.



Şekil 4.18. MIBK çözücüsü içinde PRK-Cu-ditiyokarbamat kompleksinin UV-GB spektrumu

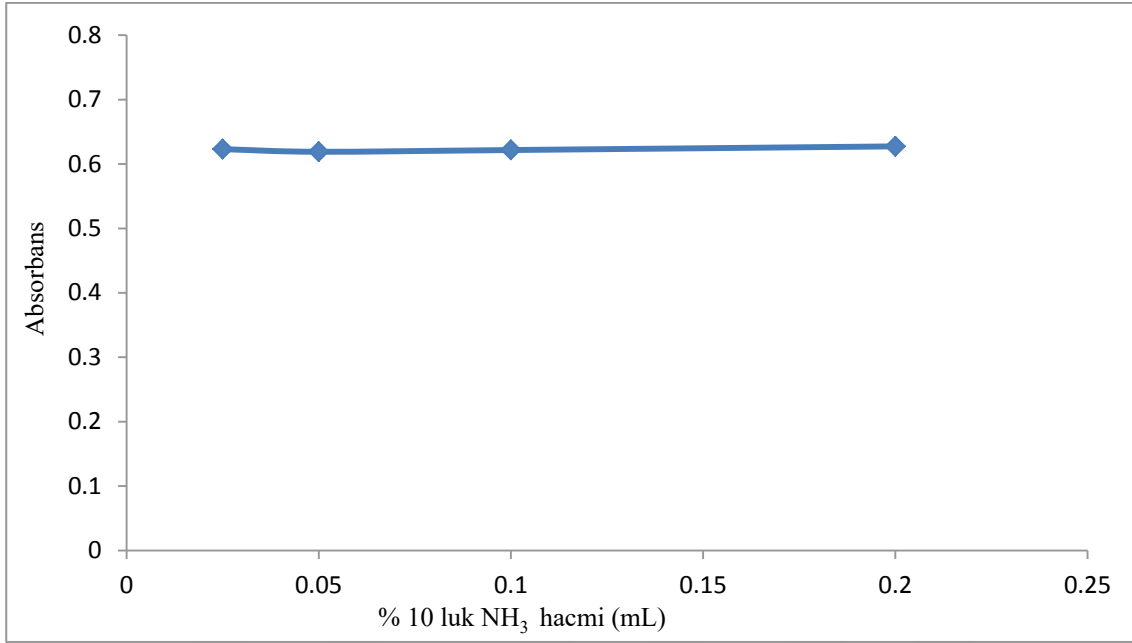
4.3.2. NH_3 Konsantrasyonunun ve Hacminin Belirlenmesi

Bu çalışmada, %25, %10, %1, %0.1'lik NH_3 çözeltilerinin etkisi, 0.16 mmol.L^{-1} PRK çözeltilerine Bölüm 3.3.1.2'de anlatılan yol uygulanarak incelendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.19, Şekil 4.20, Şekil 4.21, Şekil 4.22'de verildi.



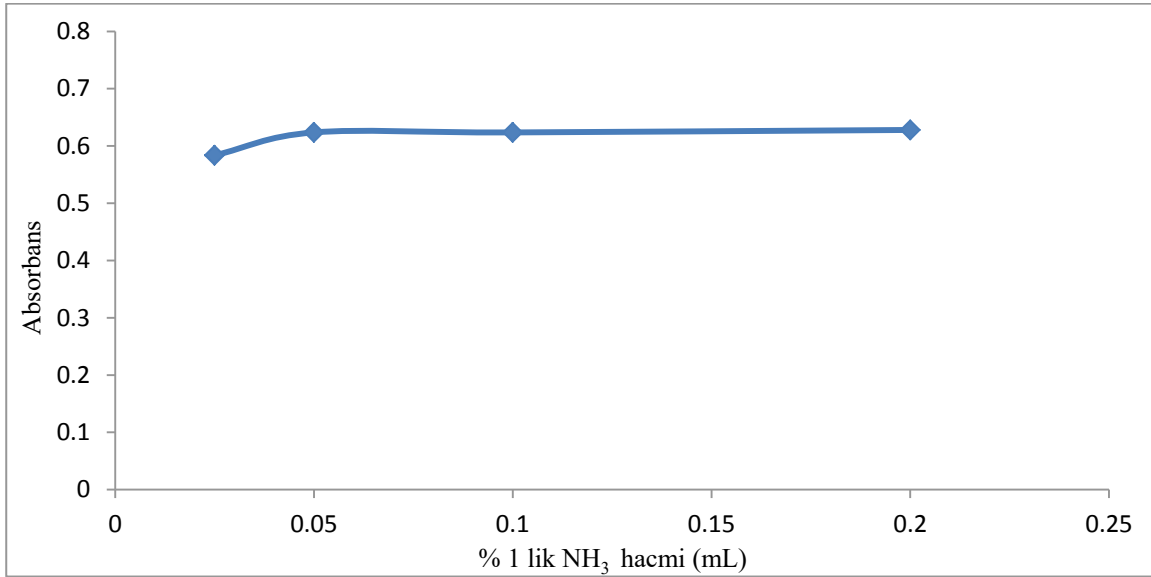
Şekil 4.19. % 25'lik NH_3 hacminin absorbansa etkisi

Şekil 4.19'da görüldüğü gibi % 25'lik NH_3 çözeltisi ile yapılan çalışmada absorbans 0.025-0.3 mL aralığında sürekli azaldığı için daha seyreltik NH_3 çözeltisinin kullanılmasına karar verildi.



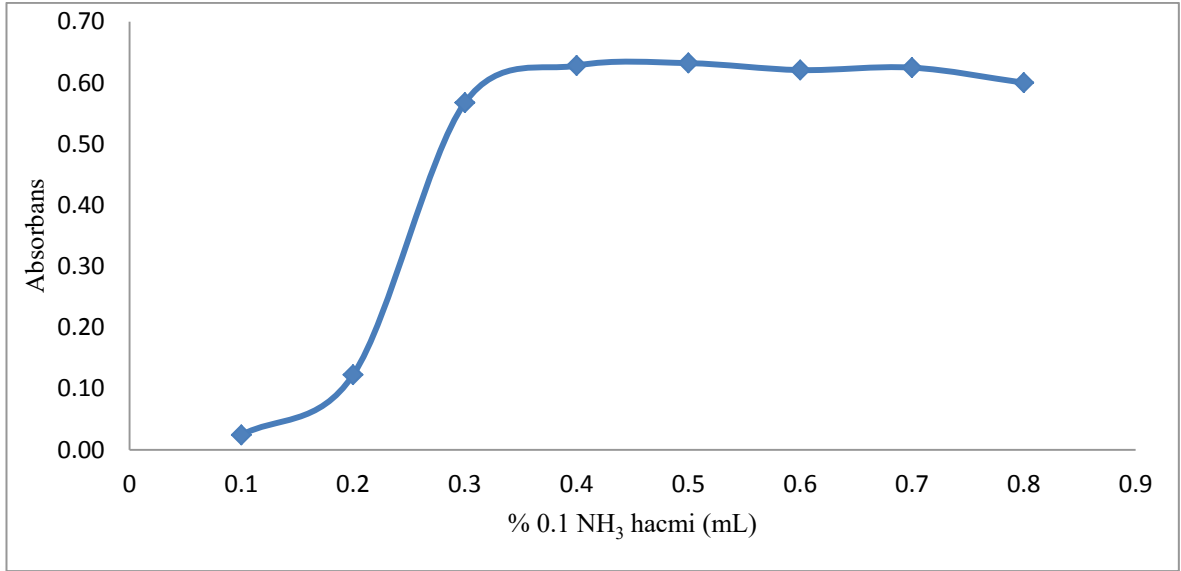
Şekil 4.20. % 10'luk NH₃ hacminin absorbansa etkisi

Şekil 4.20'de verilen sonuçlara göre % 10'luk NH₃ çözeltilerinden alınan sonuçlar % 25'lik NH₃ çözeltisine göre daha iyi ama absorbansın 0.025-0.2 mL arasında değişmediği gözlemlendi. Bu sonuçlara göre NH₃ derişiminin daha da azaltılmasına karar verildi.



Şekil 4.21. % 1'lik NH₃ hacminin absorbansa etkisi

Şekil 4.21'de verilen sonuçlara göre NH₃ derişiminin daha da azaltılması gerektiği görülmektedir.

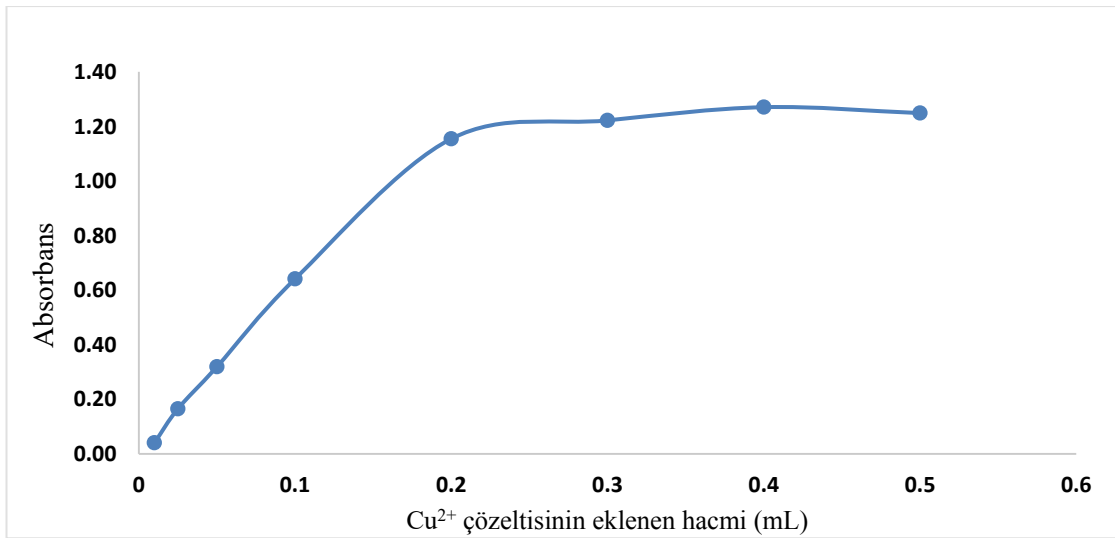


Şekil 4.22. % 0.1'lik NH₃ hacminin absorbansa etkisi (N=3)

En uygun sonuçların %0.1'lik NH₃ çözeltisi ile elde edildiği Şekil 4.22'de görülmektedir. Bu çalışmada 0.16 mmol.L⁻¹ PRK çözeltilerine, %0.1'lik NH₃ çözeltisi 0.1-0.8 mL aralığında eklendi. 0.4 mL'den sonraki çalışmalarda absorbanstaki değişimin çok az olması nedeniyle optimum %0.1'lik NH₃ hacminin 0.4 mL olmasına karar verildi.

4.3.3. Cu²⁺ Miktarının Etkisi

Bu çalışmada, Bölüm 3.3.1.3'te anlatılan yöntem 0.16 mmol.L⁻¹ PRK çözeltilerine uygulandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.23'te verildi.

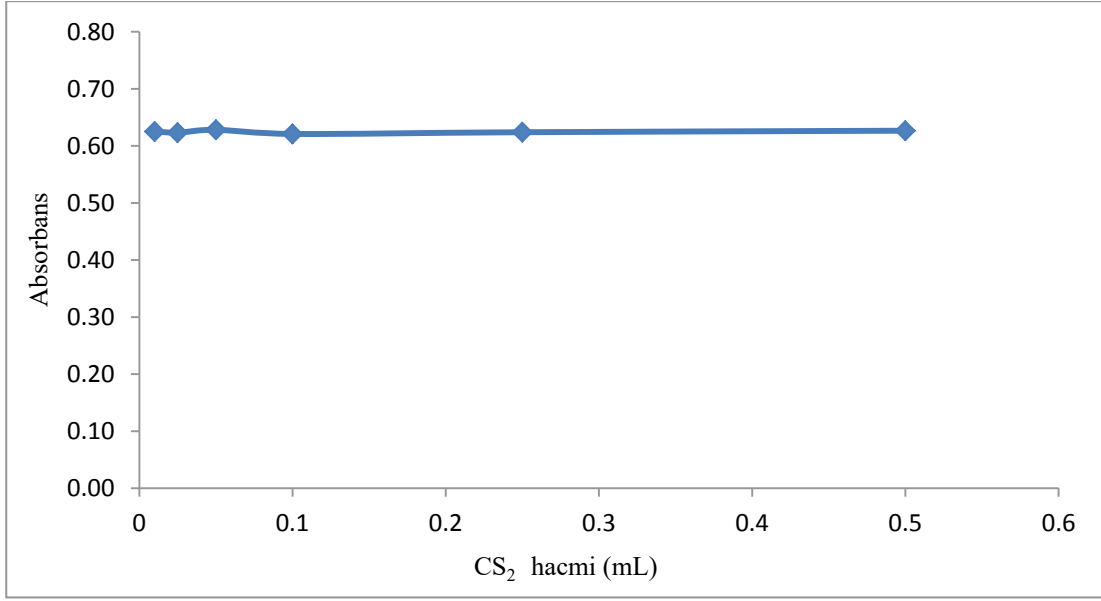


Şekil 4.23. Absorbansa Cu²⁺ miktarının etkisi (2*10⁻³ M)(N=3)

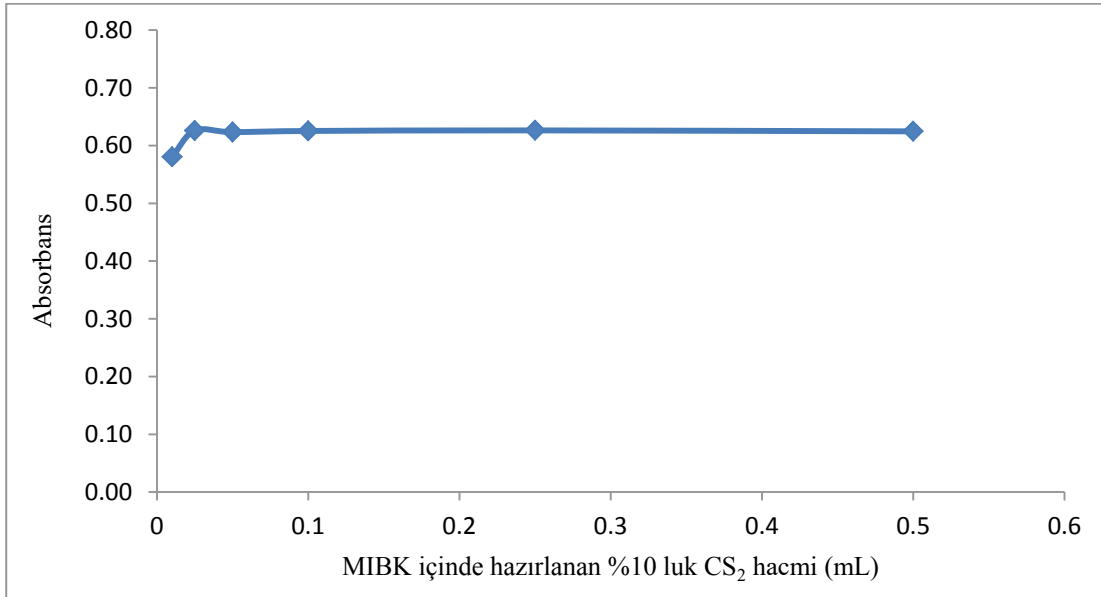
Şekil 4.23'te verilen sonuçlara göre Cu^{2+} ($2 \cdot 10^{-3}\text{M}$) çözeltisinin optimum hacminin 0.2 mL olmasına karar verildi.

4.3.4. CS_2 Miktarının Etkisi

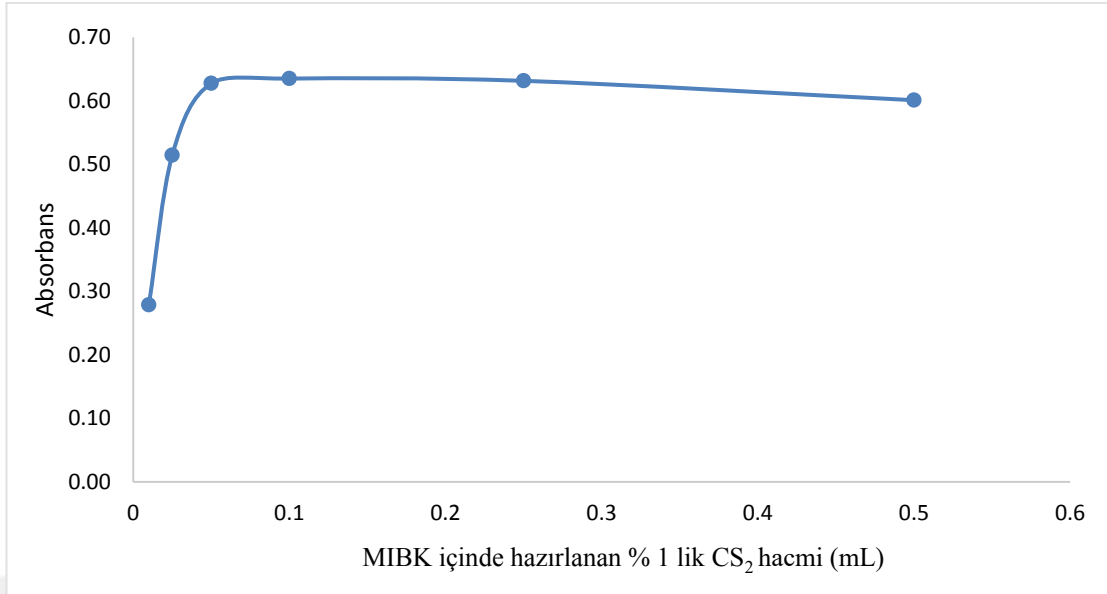
Bu çalışmada, 0.16 mmol.L^{-1} PRK çözeltilerine Bölüm 3.3.1.4'te anlatılan yöntem uygulandı. Elde edilen sonuçlar Elde edilen sonuçlar Şekil 4.24, Şekil 4.25 ve Şekil 4.26'da verildi.



Şekil 4.24. CS_2 Hacminin absorbansa etkisi



Şekil 4.25. MIBK içinde hazırlanan % 10'luk CS_2 Hacminin absorbansa etkisi

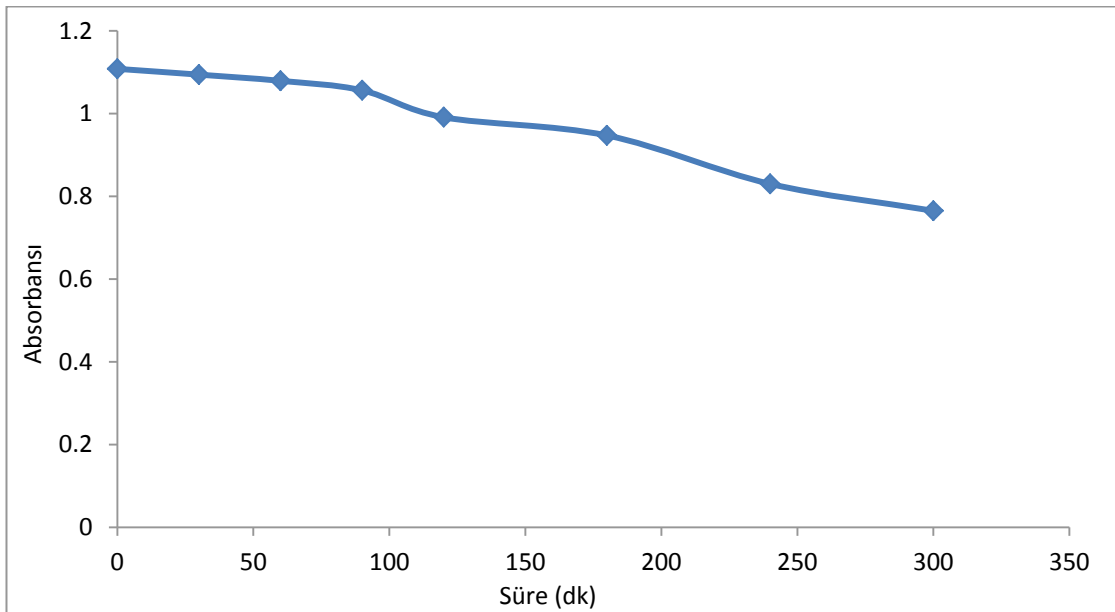


Şekil 4.26. MIBK içinde %1'lik CS₂ miktarının absorbansa etkisi (N=3)

MIBK içinde hazırlanan % 1 lik CS₂ miktarının absorbans üzerine etkisi çalışmasında optimum hacmin 0.05 mL olmasına karar verilmiştir.

4.3.5. Reaksiyon Süresinin İncelenmesi

Bu çalışmada reaktiflerin optimum koşulları belirlendikten sonra kompleksin absorbansının zamanla değişimi Bölüm 3.3.1.5'te anlatılan yol izlenerek incelendi. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.27'de verildi.



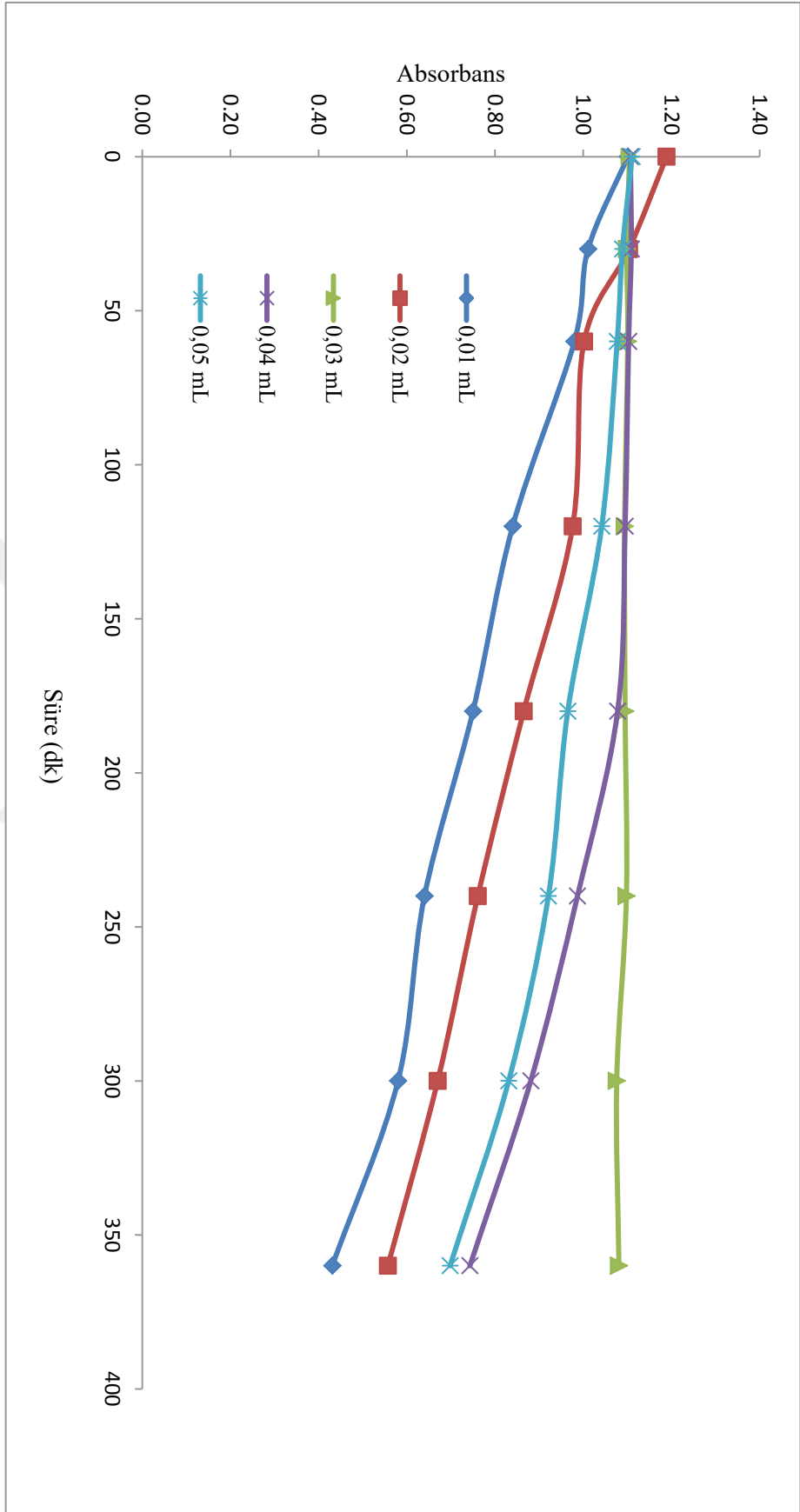
Şekil 4.27. Reaksiyon Süresinin Absorbans Üzerine Etkisi

Şekil 4.27’de görüldüğü üzere kompleksin absorbansının zamanla azaldığı gözlemlendi. Kompleksin kararlılığını arttırmak için su fazına asetik asit eklenerek çalışmaya devam edildi.

4.3.6. % 0.5’lik CH₃COOH Miktarının Etkisi

0.16 mmol.L⁻¹ PRK içeren çözeltilere Bölüm 3.3.1.6’da anlatılan metot uygulandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.28’de verildi.





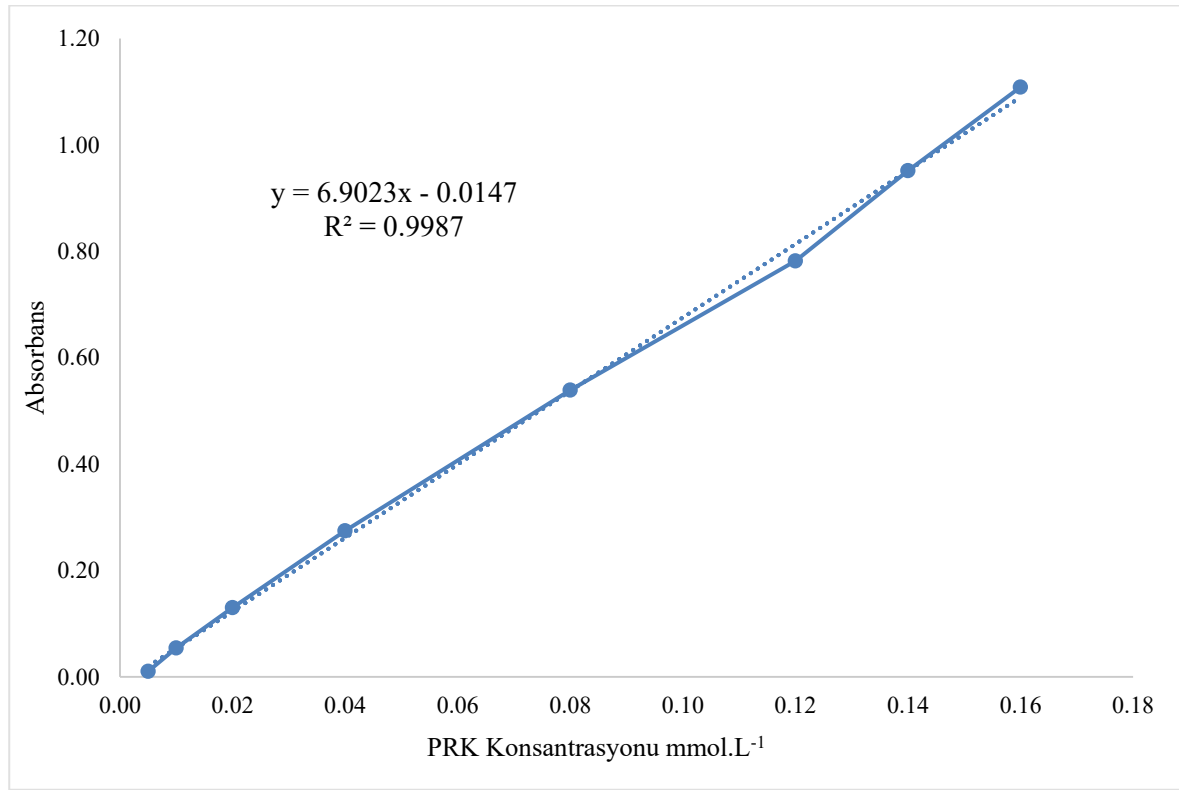
Şekil 4.28. Kompleksin dayanıklılığına % 0.5'lik asetik asit miktarının etkisi

Şekil 4.28’de verilen sonuçlara göre 0.03 mL % 0.5’lik CH₃COOH’in kompleksin absorbansını çok değiştirmeden onu kararlı hale getirdiği gözlemlendi.

4.3.7. Geliştirilen Yöntemin Validasyonu

4.3.7.1. Kalibrasyon Eğrisi

Bu çalışmada Lambert-Beer yasasına uygun en iyi lineer aralık belirlendi. 0.005-0.16 mmol.L⁻¹ arasında hazırlanan PRK çözeltilerine Bölüm 3.4.1’de anlatılan metot uygulandı. Elde edilen sonuçlar Şekil 4.29’da verildi



Şekil 4.29. PRK'nin geliştirilen yönteme göre kalibrasyon eğrisi

Çizelge 4.30. PRK için geliştirilen yöntemde kalibrasyon eğrisine ait sonuçlar

mmol.L ⁻¹	A ₁	A ₂	A ₃	ORT	±SS	%BSS
0.005	0.011	0.011	0.011	0.011	0.0002	1.44
0.01	0.054	0.054	0.055	0.054	0.0003	0.59
0.02	0.132	0.130	0.127	0.130	0.0025	1.94
0.04	0.278	0.277	0.269	0.275	0.0049	1.80
0.08	0.538	0.545	0.534	0.539	0.0056	1.03
0.12	0.770	0.778	0.800	0.783	0.0155	1.98
0.14	0.959	0.942	0.954	0.952	0.0087	0.92
0.16	1.115	1.121	1.090	1.109	0.0164	1.48

Çizelge 4.30'da verilen sonuçlara göre geliştirilen yöntemin kalibrasyon eğrisi için PRK'nin 0.005-0.16 mmol.L⁻¹ olduğu aralık incelendi. Bu aralıkta Lambert-Beer yasasına uygun lineerlik elde edildi. Bu çalışma aralığında korelasyon katsayısının 0.9986 olduğu bulundu.

LOD ve LOQ değerleri, çalışma aralığındaki en düşük konsantrasyonda (0.005 mmol.L⁻¹) hazırlanan 8 tane çözeltinin referans numuneye karşı absorbanlarının okutulmasıyla elde edildi. Çizelge 4.31'de elde edilen sonuçlar verildi.

Çizelge 4.31. PRK için geliştirilen yöntemde gözlenebilme sınırı (LOD) ve tayin sınırı (LOQ)

<u>Parametreler</u>	<u>Değer</u>
Dalgaboyu (λ_{maks} , nm)	435
Konsantrasyon aralığı ($\mu\text{g/mL}$)	0.005-0.16
Korelasyon katsayısı (r^2)	0.9987
Korelasyon denklemi	$y=6.9023x+0.0147$
Eğim	6.9023
Kayma değeri	0.0147
LOD (mmol.L ⁻¹)	0.0013
LOQ (mmol.L ⁻¹)	0.0045

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.31'deki sonuçlara göre LOD ve LOQ değerleri, PRK için elde edilen lineer kalibrasyon eğrisi aralığında geliştirilen yöntemin oldukça hassas olduğunu göstermektedir.

4.3.7.2. Doğruluk

Geliştirilen yöntemin doğruluğu için geri kazanım çalışması yapılmış ve 0.025-0.1 mmol.L⁻¹ aralığında hazırlanan saf PRK çözeltilerine 3.4.5.1'de anlatılan yöntem uygulandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.32'de verildi.

Çizelge 4.32. PRK için geliştirilen yöntemde % geri kazanımı

AK(mM)	OBK(mM)	% GK	±SS	%BSS	%BH
0.025	0.0249	99.7	0.0002	0.6699	0.1106
0.05	0.0502	100.4	0.0003	0.6010	0.3627
0.075	0.0752	100.3	0.0002	0.2943	0.2629
0.10	0.0999	99.9	0.0001	0.1450	0.0768

Çizelge 4.32'deki sonuçlara göre geri kazanım çalışmasında en düşük %99.7 en yüksek %100.4 değer elde edilmiştir. Geri kazanım sonuçlarının % 95-105 aralığında, % BH'nın %1'den düşük olması yöntemin doğruluğunun yüksek olduğunu göstermektedir.

Ayrıca geliştirilen yöntemin doğruluğunu göstermek amacıyla tabletten geri kazanım çalışması da yapıldı. Bu çalışmada, Bölüm 3.4.5.2'de anlatılan standart ekleme yöntemi uygulandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.33'te verildi.

Çizelge 4.33. PRK için geliştirilen yöntemde standart ekleme yöntemi ile tabletten % geri kazanım

0.05 (mmol.L ⁻¹)	AK. (mmol.L ⁻¹)	OBK (mmol.L ⁻¹)	%GK	±SS	%BSS	%BH
40%	0.07	0.0691	98.9	0.0009	1.2636	1.2682
60%	0.08	0.0794	99.5	0.0007	0.8996	0.6913
80%	0.09	0.0886	99.2	0.0008	0.9301	1.5841
100%	0.1	0.0988	99.1	0.0007	0.6722	1.2358
120%	0.11	0.1109	101.1	0.0007	0.6530	0.8491

Çizelge 4.33'teki sonuçlara göre standart ekleme yönteminde geri kazanım en düşük %98.9 en yüksek %101.1'dir. Bağlı standart sapmanın %2'den küçük olması yöntemin doğruluğunun ve tablet numunelere uygulanabilirliğinin iyi olduğunu göstermektedir.

t-testi için Bölüm 3.4.5.3'te anlatılan yol izlenerek yapılan çalışmada % 95 güven seviyesinde ve 4 serbestlik derecesinde aşağıdaki istatistiksel değerler elde edildi.

Çizelge 4.34. PRK'nin tablet formu için t-testi

Ticari Marka	Tablet Değeri	Bulunan Değer $\pm$ SS
Paxera	20 mg	19.84 ± 0.176
	$H_0: \mu = 20\text{mg}$, $v = n - 1 = 4$	$t_t = 2.776$
	$H_0: \mu \neq 20\text{mg}$ $\alpha/2 = 0,05/2 = 0,025$	$t_h = 2.062$
		Geri Kazanım = % 99.2

Çizelge 4.34'te verilen sonuçlara göre t_d (t deneysel) değerinin t_t (t teorik) değerinden küçük çıkması geliştirilen yöntemin, güvenilir ve doğru olduğunu göstermektedir.

4.3.7.3. Dayanıklılık Testi

Bu çalışmada, 0.1 mmol.L^{-1} ve $0.075 \text{ mmol.L}^{-1}$ PRK içeren çözeltilere Bölüm 3.4.6'da anlatılan yöntem uygulandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.35'te verildi.

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

Çizelge 4.35. PRK için geliştirilen yöntemin dayanıklılığı

	Başlangıç	2.Saat	4.Saat	6.Saat	8.Saat	12.Saat	24. saat
	0.1004	0.0993	0.0993	0.0991	0.0991	0.0940	0.0502
0.1 (mM)	0.1002	0.0995	0.0992	0.0992	0.0989	0.0938	0,0492
	0.0996	0.0998	0.0993	0.0991	0.0988	0.0937	0.0494
ORT	0.1001	0.0995	0.0993	0.0991	0.0989	0.0938	0.0496
SS	0.0004	0.0002	0.0001	0.0001	0.0001	0.0001	0.0005
	0.0759	0.0751	0.0740	0.0733	0.0731	0.0641	0.0330
0.075 (mM)	0.0759	0.0746	0.0740	0.0741	0.0730	0.0650	0.0343
	0.0756	0.0747	0.0737	0.0734	0.0730	0.0641	0.0327
ORT	0.0758	0.0748	0.0739	0.0736	0.0730	0.0644	0.0333
SS	0.0002	0.0003	0.0002	0.0005	0.0001	0.0005	0.0008

Çizelge 4.35'teki sonuçlara göre 24 saat boyunca incelenen çözeltilerin absorbanlarındaki değişim 12 saate kadar oldukça azdır.

4.3.7.4 Tekrarlanabilirlik

Aynı cihazda 0,1 mM PRK içeren çözeltinin absorbanı 10 kez ard arda ölçüldü. Bulunan sonuçlar Çizelge 4.36'da verildi

Çizelge 4.36. PRK için geliştirilen yöntemin tekrarlanabilirliği(mmol.L^{-1})

0.0985	0.1008	0.0998	0.0992	0.0995	0.0978	0.0993	0.1002	0.0995	0.0982
ORT:	0.099	$\pm$ SS:	0.001	%BSS:	0.93	%BH:	0.73		

Çizelge 4.36'daki ard arda alınan sonuçlara göre %BSS ve %BH %1 den düşük elde edildi.

4.3.7.5. Tekrar Elde Edilebilirlik

Bu çalışmada, Bölüm 3.4.7.2’de anlatılan yol izlendi. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.37’de verildi.

Çizelge 4.37. PRK için geliştirilen yöntemin tekrar elde edilebilirliği

AK (mM)	OBK (mM)	%GK	±SS	%BSS	%BH
0.025	0.0249	99.5	0.0001	0.5824	0.4969
0.05	0.0496	99.1	0.0002	0.4466	0.8929
0.075	0.0740	98.7	0.0004	0.5181	1.3469
0.10	0.0991	99.1	0.0001	0.1463	0.9461

Çizelge 4.37’deki sonuçlara göre bağıl standart sapmanın genel olarak %2 den düşük çıkması yöntemin tekrar elde edilebilirliğini göstermektedir.

4.3.7.6. Ara Kesinlik

0.075 mmol.L⁻¹ ve 0.1 mmol.L⁻¹ PRK içeren iki farklı konsantrasyondaki çözeltiye Bölüm 3.4.7.3’te anlatılan yöntem uygulandı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.38’de verildi.

Çizelge 4.38. PRK için geliştirilen yöntemin ara kesinliği

	OBK 0,075 mmol.L ⁻¹	OBK 0,1 mmol.L ⁻¹
	0.073	0.101
1. GÜN	0.073	0.100
	0.075	0.100
	0.074	0.101
2. GÜN	0.074	0.099
	0.074	0.100
	0.075	0.102
3. GÜN	0.075	0.099
	0.075	0.099
ORT	0.074	0.100
SS	0.0007	0.0011
%BSS	0.93	1.06

Çizelge 4.38'deki sonuçlara göre PRK iki farklı konsantrasyonda gün içinde ve günler arası hazırlanan çözeltilerine geliştirilen yöntem uygulandığında absorbanlar arasında farkın çok fazla olmadığı görülmektedir. % BSS %2'den düşüktür.

4.3.7.7. PRK Tablet Formülasyonunda Bulunan İnterfer Maddelerin Absorbansa Etkisi

Yerel eczaneden temin edilen PAXERA (Ali Raif İlaç A.Ş.) 20 mg PRK içeren tabletlerde bulunan yardımcı maddelerin absorbansa etkisi incelendi.

Bu çalışma, Bölüm 3.4.4'te anlatılan yol izlenerek yapıldı. Elde edilen sonuçlar Çizelge 4.39'da verildi

Çizelge 4.39. PRK için geliştirilen yöntemde tablet formülasyonunda bulunan yardımcı maddelerin interfer etkisi

$\dot{I}_1/\dot{I}_2$ (mmol.L ⁻¹)	LMH %GA	Nişasta %GA	HPMS %GA	Mg Str. %GA
0/0.1	100	100	100	100
0.1/0.1	81.95	93.4	97.3	91.5
1/0.1	70.76	86.0	73.2	91.0
10/0.1	54.24	81.7	71.9	91.3

$\dot{I}_1$: interfer madde konsantrasyonu, $\dot{I}_2$: Paroksetin HCl konsantrasyonu,

Çizelge 4.39'daki sonuçlara göre geliştirilen yöntem üzerinde interfer maddeler genel olarak absorbansı azaltan etki göstermektedirler.

4.3.7.8. Yöntemin Sağlamlığı

Geliştirilen yöntemin sağlamlığı Bölüm 3.4.8'de anlatıldığı gibi eklenen NH₃ hacminde (0.4 ± 0.05 mL) ve CS₂ hacminde (0.05 ± 0.01) küçük değişikliklerin etkisinin değerlendirilmesi için optimize şartlar korunarak çalışıldı. Çizelge 4.40'ta elde edilen sonuçlar verildi.

Çizelge 4.40. PRK için geliştirilen yöntemin sağlamlığı

		%GK	±SS	%BSS	%BH
NH ₃ Hacmi	0.4 + 0.05	99.55	0.001	0.827	0.453
(mL)	0.4 – 0.05	99.4	0.0013	1.3	0.598
CS ₂ Hacmi	0.05 + 0.01	100.5	0.001	0.91	0.47
(mL)	0.05 – 0.01	99.87	0.0004	0.442	0.135

Çizelge 4.40'ta verilen sonuçlara göre NH₃ ve CS₂ hacminde yapılan küçük değişimin kompleksin absorbansını önemli derecede etkilemediği tespit edildi

Aşağıda Çizelge 4.41'de daha önce PRK ile yapılan spektrofotometrik çalışmaların sonuçları ile tez çalışmasının sonuçları karşılaştırıldı.

Çizelge 4.41. PRK ile daha önce yapılan spektrofotometrik çalışmaların karşılaştırılması

Referans	Reaktif	Reaksiyon	Çözücü	Kons.	λ (nm)
Önal ve ark 2005	BTM	İyon Çifti	Kloroform	2-20 µg/mL	414
Önal ve ark 2005	BKY	İyon çifti	Kloroform	2-16 µg/mL	414
Önal ve ark 2005	BFM	İyon çifti	Kloroform	2-16 µg/mL	412
Önal ve ark 2005	BNF	Kenetleme		2-10 µg/mL	478
Darwish 2005	Kloranil	N-alkilvinilamin		4-45 µg/mL	665
Darwish 2005	Bromanil	N-alkilvinilamin		5-50 µg/mL	655
Darwish 2005	DCNK	Yük transferi		8-80 µg/mL	580
Nwodo ve Ibezim 2013	Kloranilik asit	Yük transferi	Dioksan	5-40 µg/mL	540
Arshiya ve ark 2011	DDK	Yük transferi		5-70 µg/mL	545
Walash ve ark 2010	DNFB	Yük transferi		2-20 µg/mL	390
Darwish ve ark 2009	NKS	Nükleofilik substitüsyon		1-8.0 µg/mL	488
Elqudaby ve ark 2012	Mo(V)tiyosiyanat	Koordinasyon	Diklormetan	10-250 µg/mL	470
Elqudaby ve ark 2012	Fe(III)tiyosiyanat	Koordinasyon	Diklormetan	10-250 µg/mL	500
Tez yöntemi	*CS ₂ -Cu ²⁺	Koordinasyon	MIBK	1.8-58.5 µg/mL	435

5.TARTIŞMA VE SONUÇ

Endüstriyel ve sağlık alanlarında ilaç analizleri; formülasyon, kalite kontrol, kararlılık çalışmaları, farmakolojik testler gibi farmasötik işlemlerin çeşitli aşamalarında önem kazanmaktadır. İlaç analiz çalışmaları, formülasyon ve biyolojik sıvı gibi karmaşık ortamlarda güvenilir ve geçerli bir analitik yöntem gerektirmektedir. Ayrıca gerekli çalışmalardan sonra üretime sunulan her etken madde için ayrı bir ekonomik, hassas, doğru, hızlı analiz yöntemine ihtiyaç duyulmaktadır. (Güven 2015)

Bu çalışmada, yaygın bir şekilde kullanılan KRV, NBV, PRK ilaç etken maddelerinin tayini için ekonomik, kolay, seçici ve hassas spektrofotometrik yöntem geliştirilmiştir.

Yük transfer reaksiyonları ilaç etken maddelerinin tayini için çok sık kullanılan bir UV-görünür bölge yöntemidir. Bu reaksiyonda bir π -akseptörü grubu içeren molekül ile bir donör grup içeren molekül arasında gerçekleşen reaksiyon sonucu renkli bir yük transfer kompleksi oluşmaktadır (Paula ve ark 2010, Ragaa ve ark 2013).

Literatüre göre yük transfer reaksiyonlarına dayanan spektrofotometrik ilaç analiz yöntemlerinde analitik prosedür, çözücü, reaktif konsantrasyonu, reaksiyon sıcaklığı ve süresi, stokiyometrik oran belirlenerek uygulanmıştır. Daha sonra yöntemin validasyonu yapılmıştır (De Paul ve ark 2010, Gouda ve Kassem 2012, Gouda ve Malah 2013, Alzoman ve ark. 2013, Ragaa ve ark 2013, Swamby ve Basavaiah 2014, Elqudaby ve ark 2014, Mohamed ve ark 2018).

KRV'nin, π -akseptörü olan 1,2,5,8-tetrahidroksiantrakinon (KUİN) ile renkli yük transfer kompleksi oluşturmaya dayanan spektrofotometrik tayini çalışmasında literatüre uygun olarak ilk önce çözücü belirlenmiştir. Yük transfer reaksiyonlarında çözücünün, toplam yük transferini ve radikal anyonun karmaşık ayrışmasını kolaylaştırması, kararlılığını artırması özelliklerine sahip olması beklenmektedir. Literatüre göre, yüksek dielektrik sabiti olan çözücüler bu görevleri yerine getirmede oldukça etkilidir (Mohamed ve ark 2018, Huang ve ark. 2006, Kelani ve ark. 1997).

Polar olmayan çözücülerde moleküler yük transfer kompleksleri oluşturulurken, radikal anyon türleri polar çözücülerde baskın ve karardır (Ayad ve ark 1984). Bunlar göz önünde bulundurulduğunda, su bu çalışmada mükemmel bir çözücü gibi

görülmektedir, fakat KRV ve KUİN'in sudaki zayıf çözünürlüğü deneyde suyun kullanılmasını imkansız hale getirmiştir. Bunun için Metanol, DMF, Etanol, Asetonitril, Kloroform, 1-propanol, 2-propanol ve Aseton çözücülerinde kompleksin absorpsiyon ölçülmüştür. Optimum çözücü olarak en yüksek absorpsiyon alındığı metanol seçilmiştir. Bölüm 4'teki Çizelge 4.2'de verilen bu çözücülerin (Metanol, DMF, Etanol, Asetonitril, Kloroform, 1-propanol, 2-propanol ve Aseton) dielektrik sabitleri incelendiğinde her ne kadar asetonitril, sudan sonra en yüksek dielektrik sabitine sahip olsa da en iyi hassasiyet metanol ile elde edilmiştir. Metanolün radikal anyon ile kararlı hidrojen bağları oluşturma kapasitesinin asetonitrile göre yüksek olduğu düşünülmüştür (Gouda ve Kassem 2012). KUİN, metanol içinde 491 nm'de maksimum absorpsiyon verirken KRV-KUİN kompleksi 560 nm'de maksimum absorpsiyon vermiştir. KUİN ile KRV-KUİN yük transfer kompleksinin UV-görünür bölgede farklı dalgalarda absorpsiyon yapmaları KRV'nin KUİN ile kolay ve kesin bir şekilde tayin edilebileceğini göstermiştir (Gouda ve Kassem 2012). Bu çalışmada bazı çözücülerdeki absorpsiyonun kabul edilebilir düzeyde görünebilmesi açısından 40 µg/mL KRV çözeltisi kullanılmıştır.

İkinci parametre olarak optimum 1,2,5,8-tetrahidroksiantrakinon (KUİN) konsantrasyonu araştırılmıştır. Analitin çözeltide çok büyük bir kısmının kısa sürede komplekse dönüşümü yani yük transferinin dengeye hızla ulaşması ve kompleksin maksimum hassasiyetinin elde edilmesi reaktifin konsantrasyonuna da bağlıdır (Mohamed ve ark 2018, Gouda ve Malah 2013, Alzoman ve ark. 2013, Gouda ve Kassem 2012). Bu amaçla, ilaç konsantrasyonu sabit tutularak 1.10^{-3} , 2.10^{-3} ve 3.10^{-3} mol.L⁻¹KUİN çözeltileri ile çalışılmıştır. 1.10^{-3} , 2.10^{-3} mol.L⁻¹ KUİN çözeltilerinde sabit noktalar elde edilememiş ve 5 mL den sonra kompleksin çökelek oluşturduğu gözlemlenmiştir. Bu nedenle KUİN çözeltisinin konsantrasyonu artırılıp ortama çok daha düşük hacimlerde eklenmesine karar verilmiştir. 30 µg/mL KRV çözeltisine 3.10^{-3} mol.L⁻¹ KUİN çözeltisinden 0.25-2.25 mL arasında eklemeler yapılarak optimum konsantrasyon tespit edilmiştir. Çalışma sonunda 3.10^{-3} mol.L⁻¹ KUİN çözeltisinin optimum hacminin 1.25 mL olduğu bulunmuştur. Bu noktadan sonra absorpsiyonun çok fazla değişmediği ve artık maksimum yoğunluğa ulaştığı görülmüştür.

Son optimum parametre olarak kompleksin absorpsiyonuna üzerine sıcaklık-süre etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada 15-60 °C sıcaklık aralığı 5'er °C ardışık olarak

çalışılmıştır. Fakat ilk iki parametre 27 °C laboratuvar sıcaklığında çalışıldığı için 25 °C ve 30 °C çalışılmamış 120 dk boyunca 27 °C de gözlem yapılmıştır. Oluşan kompleksin 27 °C sıcaklığın altındaki ve üstündeki sıcaklıklarda başlangıç absorbansının düştüğü ve kararsızlaştığı görülmüştür. Optimum sıcaklık olarak deneyin yapıldığı oda sıcaklığı (27 °C) seçilmiştir. 120 dakika boyunca 27 °C’de absorbans değişimi oldukça azdır.

Metanol ortamında yük transfer kompleksinin stokiyometrisini belirlemek için Job'un sürekli varyasyon yöntemi (Vyas ve ark 2016, Yıldız ve ark 1997, Likussar ve Boltz 1971) kullanılmıştır. Bu çalışmaya göre KRV ile KUİN'in 1-2 oranında reaksiyona girdiği tespit edilmiştir. Yük aktarım kompleksinin ilacın –NH grubundaki yüklerin KUİN’deki yük eksikliği olan merkeze aktarılacak olduğu (n- π) düşünülmüştür. Literatüre göre n- π tipi etkileşimi ile ilgili mekanizma da önerilmiştir. (Gouda ve Kassem 2012, Gouda ve Malah 2013)

Kompleksin molar absorptivite katsayısının 2737 L.mol⁻¹.cm⁻¹ olduğu bulunmuştur. Molar absorptivite katsayısının 10³-10⁴ L.mol⁻¹.cm⁻¹ veya daha büyük olması geçişlerin olasılığının yüksek olduğunu göstermektedir. Literatüre uygun olarak önerilen mekanizmada n- π tipi yük aktarımının olasılığının yüksek olduğu söylenebilir (Erdik 2005).

Yöntemin validasyonu için önce Lambert-Beer yasasına uyumluluk gösteren çalışma aralığı belirlenmiştir. Bu aralığın 0,5-60 µg/mL olduğu tespit edilmiştir. Belirlenen çalışma aralığında 0,9981 korelasyon katsayısı ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin denklemi $y=0.0169x+0.0778$ ’dir. Korelasyon katsayısının 1’e yakınlığı lineerliğin yani absorbans ile konsantrasyon arasındaki ilişkinin iyi olduğunu göstermektedir (Gündüz 2010). Bu yöntemde %95 güven seviyesinde gözlenebilme sınırı 0,147 µg/mL, tayin sınırı ise 0,491 µg/mL bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemin doğruluğu geri kazanım, standart ekleme ve t-testi çalışması ile tespit edilmiştir (ICH-Q2). Saf KRV ile yapılan geri kazanım çalışmasında %98.8 ile 100.8 arasında değerler elde edilmiştir. Bölüm 3.4.5.2’de anlatılan şekilde yapılan standart ekleme yönteminde ise %98.4-%99.4 aralığında geri kazanım elde edilmiştir. Bu iki yöntemde de %BH %1.6’dan, %BSS % 1.5’ten düşük çıkmıştır. %BSS’nin ve %BH’nın düşük çıkması yöntemin doğruluğunun iyi ve yüksek olduğunu göstermektedir. 25 mg KRV içeren tablet formülasyonunda %95 güven seviyesinde ve 4 serbestlik

derecesinde t_i 2.777 alınmış, deneysel t 1.97, geri kazanım ise %100.7 bulunmuştur. Deneysel t değerinin t_i değerinden küçük çıkması yöntemde sistematik hatanın olmadığını ve tabletler üzerinde KRV'nin tayini için uygulanabilir olduğunu göstermektedir (Gündüz 2010).

Girişim çalışmasında tablette bulunan yardımcı maddelerden LHM, Sukroz, Povidon K25, Mg str absorbansa etkisi incelenmiştir. Bu yöntemde söz konusu yardımcı maddelerin absorbansa önemli etkilerinin olmadığı gözlemlenmiştir.

Dayanıklılık çalışmasında 15 µg/mL ve 45 µg/mL çözeltilerinin başlangıçtan itibaren 72 saat boyunca 24 saat aralıklarla ölçülen absorbanlarında çok fazla değişim görülmemiştir. Oluşan yük transfer kompleksinin dayanıklılığı oldukça iyidir.

Kesinlik çalışmasında tekrarlanabilirlik, ara kesinlik, tekrar elde edilebilirlik ölçütleri incelenmiştir. Bu çalışmalarda da genel olarak %BSS %2'den ve %BH %1'den oldukça düşük çıkmıştır. Elde edilen sonuçlara göre yöntem farklı zamanlarda, farklı cihazda birbirine yakın sonuçlar vermektedir. Geliştirilen yöntemin kesinliğinin iyi olduğu gösterilmiştir (Gündüz 2010).

Tekrar elde edilebilirlik çalışmalarında farklı bir laboratuvarda farklı bir cihazda sonuçların sadece ne kadar değişeceği incelenmiştir. Çok sayıda farklı laboratuvar çalışması yapılmamış sadece farklı bir laboratuvarda farklı bir cihazda deney tekrarlanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda da sadece % geri kazanım, %BSS ve %BH hesaplanmıştır.

Yöntemin sağlamlığı çalışmasında optimizasyon parametrelerinde küçük değişiklikler yapılmıştır. Çalışmada KUİN hacminde ± 0.05 mL ve sıcaklıkta ± 2 °C'lik değişimler incelenmiştir. Her iki parametredeki değişimde de geri kazanımlar % 99.00-100.22 aralığında elde edilmiştir. %BSS % 1'den ve %BH ise %1.05'ten düşük çıkmıştır. Yöntemin optimizasyon parametrelerindeki küçük değişimlerden etkilenmediği görülmüştür.

Çizelge 4.15'te verilen literatür çalışmaları ile tezdeki KRV için geliştirilen yöntem kıyaslandığında oldukça geniş bir aralıkta çok düşük konsantrasyonda KRV'nin tayininin yapılabildiği görülmektedir.

Nebivolol HCl ve Paroksetin HCl ilaçlarının tablet dozaj formlarından tayini için geliştirilen yöntem, bu ilaç etken maddelerinin yapısında bulunan sekonder amin grubunun bazik ortamda CS₂ ile ditiyokarbamat türevine dönüştürülüp Cu²⁺ ile kompleksleştirilmesine dayanmaktadır.

Alpdoğan ve Sungur (1999) antihipertansif metoprolol ilacını bazik ortamda ditiyokarbamat türevine dönüştürerek spektrofotometrik bir analiz yöntemi geliştirmişlerdir. Çalışmalarında önce çözücüye karar verip daha sonra optimum NH₃, Cu²⁺, CS₂ miktarlarını belirlemişlerdir. Tez çalışmasında NBV ve PRK için aynı prosedür uygulanmıştır. NBV ve PRK tayini için geliştirilen yöntemde literatüre uygun olarak önce çözücünün absorbansa etkisi incelenmiş daha sonra sırasıyla optimum NH₃, Cu²⁺, CS₂ miktarları belirlenmiştir. Bu çalışmalar 21 °C laboratuvar sıcaklığında yapılmıştır.

Nebivolol HCl (0.2 mM) için yapılan çalışmada en yüksek absorbans MIBK çözücüsünden alınsa da su fazında oluşan sarı kompleks MIBK'a ekstrakte edildikten sonra kompleksin sarı rengi 1 saat içinde kaybolduğu için çalışmalara bu çözücüyle devam edilememiştir. Bu yüzden 2. en yüksek absorbansı veren Etilasetat çözücüsü denenmiş fakat bir sonraki aşamalarda (NH₃ ve CS₂ konsantrasyonlarının belirlenmesi) elde edilen grafiklerin anlamlı olmaması nedeniyle 3. En iyi çözücü olan kloroforma geçilmiştir. Cu-NBV-ditiyokarbamat kompleksi kloroform içinde 437 nm'de maksimum absorbans vermiştir.

Alpdoğan ve Sungur (1999) ise metoprolol tartarat ile yaptıkları çalışmada 0.6 mL %25'lik NH₃ çözeltisi; El-Ries ve ark (2000) metoprolol tartarat ve propranolol HCl ile yaptıkları çalışmada 1.0 mL pH 10 amonyak tamponu kullanmışlardır. 0.2 mmol.L⁻¹ NBV çözeltisi için literatüre uygun olarak önce %25 lik NH₃ çözeltisi kullanılmış fakat absorbansın sürekli azaldığı gözlemlendiği için %10'luk NH₃ çözeltisi ile deneye devam edilmiştir. Bu çalışmada da absorbansın sürekli azalması nedeniyle %1'lik NH₃ çözeltisine geçiş yapılmıştır. 0.05-0.6 mL aralığında eklenen %1'lik NH₃ çözeltisinin optimum hacminin 0.2 mL olmasına karar verilmiştir. 0.2 mL'den sonra yapılan eklemelerin absorbansı çok değiştirmediği gözlemlenmiştir.

0.2 mmol.L⁻¹ NBV çözeltisi için 2*10⁻³ mol.L⁻¹ Cu²⁺ çözeltisinden 0.025-0.5 mL aralığında eklemeler yapılmış ve 0,15 mL'nin optimum hacim olduğuna karar

verilmiştir. 0,15 mL'nin üzerinde eklenen Cu^{2+} çalışmalarında çözeltinin sarı rengi kıızıla dönmüş ve kloroform fazına geçişi oldukça azalmış ve yapılan ölçümlerde düşük absorbanlar elde edilmiştir.

0.2 mmol.L⁻¹ NBV çözeltisi için optimum CS₂ miktarını belirleme çalışmasında 0.05-0.5 mL aralığında eklemeler yapılmış ve 0.1 mL'den sonraki eklemelerde absorbanstaki değişimin çok az olması nedeniyle optimum miktarın 0.1 mL olmasına karar verilmiştir.

0.2 mmol.L⁻¹ NBV çözeltisi ile yapılan sürenin absorban üzerine etkisi çalışmasında 30. dakikadan sonra absorbanın sabitlendiği görülmüştür. Optimum süre 30 dk olarak alınmıştır.

Yöntemin validasyonu için önce Lambert-Beer yasasına uyumluluk gösteren çalışma aralığı belirlenmiştir. Bu aralığın ile 0.01-0.20 mmol.L⁻¹ olduğu tespit edilmiştir. Belirlenen çalışma aralığında 0.9986 korelasyon katsayısı ile elde edilen kalibrasyon eğrisinin denklemi $y=5.3802x+0.0623$ 'tür. Korelasyon katsayısının 1'e yakınlığı lineerliğin yani absorban ile konsantrasyon arasındaki ilişkinin iyi olduğunu göstermektedir (Gündüz 2010). Bu yöntemde %95 güven seviyesinde gözlenebilme sınırı 0,0025 mmol.L⁻¹, tayin sınırı ise 0,0085 mmol.L⁻¹ bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemin doğruluğu geri kazanım, standart ekleme ve t-testi çalışması ile tespit edilmiştir (ICH-Q2). Saf NBV ile Bölüm 3.4.5.1'de anlatıldığı şekilde yapılan geri kazanım çalışmasında % 99.5 ile %100.3 arasında değerler elde edilmiştir. Bölüm 3.4.5.2'de anlatılan şekilde yapılan standart ekleme yönteminde ise % 98.9-% 100.9 aralığında geri kazanım elde edilmiştir. Bu iki yöntemde de %BSS 1.5'ten genel olarak %BH %1.0'dan düşük çıkmıştır. %BSS'nin ve % BH'nın düşük çıkması yöntemin doğruluğunun iyi ve yüksek olduğunu göstermektedir. 5.45 mg NBV içeren tablet formülasyonunda %95 güven seviyesinde ve 4 serbestlik derecesinde t_t 2.777 alınmış, deneysel t 1.36, geri kazanım ise %99.2 bulunmuştur. Deneysel t değerinin t_t değerinden küçük çıkması yöntemde sistematik hatanın olmadığını ve tabletler üzerinde NBV'nin tayini için uygulanabilir olduğunu göstermektedir (Gündüz 2010).

Girişim çalışmasında tablette bulunan yardımcı maddelerden LMH, Nişasta, MKS, HPMS ve Mg str absorban etkisi incelenmiştir. Bu yöntemde LMH'nin ve Mg

str'nin absorbası düşürdüğü gözlemlenmiş diğer söz konusu yardımcı maddelerin absorbansa önemli etkilerinin olmadığı gözlemlenmiştir.

Dayanıklılık çalışmasında 0.1 mmol.L^{-1} ve $0.075 \text{ mmol.L}^{-1}$ çözeltilerin 45. dk'dan itibaren 24 saat aralıklarla 72 saat boyunca ölçülen absorbanslarında çok fazla değişim görülmemiştir. Oluşan Cu-NBV-ditiyokarbamat kompleksinin dayanıklılığı oldukça iyidir.

Kesinlik çalışmasında tekrarlanabilirlik, ara kesinlik, tekrar elde edilebilirlik ölçütleri incelenmiştir. Bu çalışmalarda da genel olarak %BSS %2'den ve %BH %1'den oldukça düşük çıkmıştır. Elde edilen sonuçlara göre yöntem farklı zamanlarda, farklı cihazda birbirine yakın sonuçlar vermektedir. Geliştirilen yöntemin kesinliğinin iyi olduğu gösterilmiştir (Gündüz 2010).

Yöntemin sağlamlığı çalışmasında optimizasyon parametrelerinde küçük değişiklikler yapılmıştır. Çalışmada $\text{NH}_3 \pm 0.05 \text{ mL}$, CS_2 hacminde $\pm 0.01 \text{ mL}$ değişimler incelenmiştir. Her iki parametredeki değişimde de geri kazanımlar % 98.3-%99.9 aralığında elde edilmiştir. %BSS % 1'den ve %BH ise %1.7'ten düşük çıkmıştır. Yöntemin optimizasyon parametrelerindeki küçük değişimlerden önemli ölçüde etkilenmediği görülmüştür.

Çizelge 4.28'de görüldüğü gibi, NBV'nin diğer koordinasyon reaksiyonu ile yapılan çalışmaya kıyasla, tezde geliştirilen yöntem ile daha düşük konsantrasyonda tayin edilebildiği ve daha geniş bir çalışma aralığının elde edildiği açıktır. Karşılaştırmada kolaylık olması açısından geliştirilen yöntemin mM konsantrasyon birimi, $\mu\text{g/mL}$ ye çevrilerek verilmiştir.

PRK için optimum çözücü maksimum absorbansın alındığı MIBK olarak belirlenmiştir. PRK, MIBKçözücüsü içinde 435 nm'de maksimum absorbans vermiştir. El-Ries ve ark (2000) yaptıkları çalışmada Cu^{2+} ditiyokarbamat komplekslerinin MIBK içinde 435.4 nm'de karakteristik maksimum absorbans verdiğini belirtmişlerdir.

0.16 mmol.L^{-1} PRK çözeltisi için literatüre uygun olarak önce 0.025-0.3 mL %25 lik NH_3 çözeltisi kullanılmış fakat absorbansın sürekli azaldığı gözlemlendiği için %10'luk NH_3 çözeltisi ile deneye devam edilmiştir. Bu çalışmada da 0.025-0.2 mL arasında absorbansın sabitlendiği görülmüş ve %1'lik NH_3 çözeltisine geçiş yapılmıştır.

0.025-0.2 mL aralığında absorbandsın 0.025 mL'den sonra hemen artıp sabitlenmesi nedeniyle NH_3 derişimi daha da azaltılması gerektiği düşünölmüştür. % 0.1'lik NH_3 çözeltisi 0.1-0.8 mL aralığında eklenmiştir. 0.4 mL'den sonra yapılan eklemelerin absorbandsı çok değıştirmediğı gözlemlendiğı için optimum hacim 0.4 mL alınmıştır.

0.16 mmol.L⁻¹ PRK çözeltisi için $2 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ Cu^{2+} çözeltisinden 0.01-0.5 mL aralığında eklemeler yapılmış ve 0,2 mL'den sonra absorbandsların çok fazla değışmediğı gözlemlenmiştir. $2 \cdot 10^{-3}$ mol.L⁻¹ Cu^{2+} çözeltisinin optimum hacmi 0.2 mL alınmıştır.

0.16 mmol.L⁻¹ PRK çözeltisi için optimum CS_2 miktarını belirleme çalışmasında 0.01-0.5 mL aralığında saf CS_2 eklemeler yapılmış ve absorbansta herhangi bir değışim görölmemiştir. CS_2 konsantrasyonunu düşürmek için optimum çözücü olan MIBK içinde % 10'luk CS_2 hazırlanmıştır. 0.01-0.5 mL aralığında % 10'luk CS_2 çözeltisi ile yapılan çalışmada 0.01 mL'den sonra absorbandsın hemen artıp sabitlenmesi sebebiyle CS_2 konsantrasyonunun daha da düşürölmesine karar verilmiştir. MIBK içinde % 0.1'lik CS_2 ile çalışmaya devam edilmiştir. MIBK içinde % 0.1'lik CS_2 çözeltisinden 0.01-0.5 mL aralığında eklemeler yapılmış ve en iyi sonuçlar elde edilmiştir. 0.05 mL'den sonra absorbanstaki değışim fazla olmadığı için optimum miktarın 0.05 mL olmasına karar verilmiştir.

0.16 mmol.L⁻¹ PRK çözeltisi ile yapılan sürenin absorbands üzerine etkisi çalışmasında absorbandsın sürekli azaldığı gözlemlenmiştir. El-Ries ve ark (2000) yaptıkları çalışmada 1 ml % 25 (v:v)'lik asetik asit ile Cu-metoprolol-ditiyokarbamat kompleksinin kararlılığını MIBK içinde artırmayı başarmışlardır. Bu çalışmaya göre tez çalışmasında Cu-PRK-ditiyokarbamat kompleksinin kararlılığını artırmak için % 0.5'lik asetik asit çözeltisi 0.01-0.05 mL aralığında 0.16 mmol.L⁻¹ PRK çözeltisine eklenmiştir. Bu çalışmada ortama eklenen 0.03 mL % 0.5'lik asetik asit çözeltisinin ortama eklenmeden optimum koşullarda 0.16 mmol.L⁻¹ PRK çözeltisinden alınan başlangıç absorbandsını değıştirmeden sabitlediğı gözlemlenmiştir. Çözeltide tampon etkisi yaparak kompleksi kararlaştırdığı düşünölmüştür.

Yöntemin validasyonu için önce Lambert-Beer yasasına uyumluluk gösteren çalışma aralığı belirlenmiştir. Bu aralığın ile 0.005-0.16 mmol.L⁻¹ olduğı tespit edilmiştir. Belirlenen çalışma aralığında 0.9987 korelasyon katsayısı ile elde edilen

kalibrasyon eğrisinin denklemi $y=6.9023x-0.0147$ 'dir. Korelasyon katsayısının 1'e yakınlığı lineerliğin yani absorbans ile konsantrasyon arasındaki ilişkinin iyi olduğunu göstermektedir (Gündüz 2010). Bu yöntemde %95 güven seviyesinde gözlenebilme sınırı $0,0013 \text{ mmol.L}^{-1}$, tayin sınırı ise $0,0045 \text{ mmol.L}^{-1}$ bulunmuştur.

Geliştirilen yöntemin doğruluğu geri kazanım, standart ekleme ve t-testi çalışması ile tespit edilmiştir (ICH-Q2). Saf PRK ile Bölüm 3.4.5.1'de anlatıldığı şekilde yapılan geri kazanım çalışmasında % 99.7 ile %100.4 arasında değerler elde edilmiştir. Bölüm 3.4.5.2'de anlatılan şekilde yapılan standart ekleme yönteminde ise % 98.9-% 101.1 aralığında geri kazanım elde edilmiştir. Bu iki yöntemde de %BSS 1.3'ten genel olarak %BH %1.5'ten düşük çıkmıştır. %BSS'nin ve % BH'nın düşük çıkması yöntemin doğruluğunun iyi ve yüksek olduğunu göstermektedir. 20 mg PRK içeren tablet formülasyonunda %95 güven seviyesinde ve 4 serbestlik derecesinde t_0 2.777 alınmış, deneysel t 2.062, geri kazanım ise %99.2 bulunmuştur. Deneysel t değerinin t_0 değerinden küçük çıkması yöntemde sistematik hatanın olmadığını ve tabletler üzerinde PRK'nin tayini için uygulanabilir olduğunu göstermektedir (Gündüz 2010).

Girişim çalışmasında tablette bulunan yardımcı maddelerden LMH, Nişasta, HPMS ve Mg str absorbansa etkisi incelenmiştir. Bu yöntemde yardımcı maddelerin absorbası düşürdüğü gözlemlenmiştir.

Dayanıklılık çalışmasında 0.1 mmol.L^{-1} ve $0.075 \text{ mmol.L}^{-1}$ çözeltilerin 24 saat boyunca belirli aralıklarla ölçülen absorbansların 12. Saate kadar çok fazla değişmediği 24. saatte yapılan ölçümde absorbansın düştüğü tespit edilmiştir. Oluşan Cu-NBV-ditiyokarbamat kompleksinin dayanıklılığı 12. saate kadar iyidir.

Kesinlik çalışmasında tekrarlanabilirlik, ara kesinlik, tekrar elde edilebilirlik ölçütleri incelenmiştir. Bu çalışmalarda da genel olarak %BSS %1.1'den ve %BH %1.4'den düşük çıkmıştır. Elde edilen sonuçlara göre yöntem farklı zamanlarda, farklı cihazda birbirine yakın sonuçlar vermektedir. Geliştirilen yöntemin kesinliğinin iyi olduğu gösterilmiştir (Gündüz 2010).

Tekrar elde edilebilirlik çalışmalarında farklı bir laboratuvarda farklı bir cihazda sonuçların sadece ne kadar değişeceği incelenmiştir. Çok sayıda farklı laboratuvar çalışması yapılmamış sadece farklı bir laboratuvarda farklı bir cihazda deney

tekrarlanmıştır. Bu çalışmanın sonucunda da sadece %geri kazanım, %BSS ve %BH hesaplanmıştır.

Yöntemin sağlamlığı çalışmasında optimizasyon parametrelerinde küçük değişiklikler yapılmıştır. Çalışmada $\text{NH}_3 \pm 0.05 \text{ mL}$, CS_2 hacminde $\pm 0.01 \text{ mL}$ değişimler incelenmiştir. Her iki parametredeki değişimde de geri kazanımlar % 99.4-%100.5 aralığında elde edilmiştir. %BSS % 1.3'ten ve %BH ise %0.6'dan düşük çıkmıştır. Yöntemin optimizasyon parametrelerindeki küçük değişimlerden önemli ölçüde etkilenmediği saptanmıştır.

PRK için tezde geliştirilen yöntemin Çizelge 4.41'de verilen literatürdeki diğer çalışmalarla kıyaslandığında, çok daha düşük konsantrasyonlarda çalışma avantajını sağladığı söylenebilir. Karşılaştırmada kolaylık olması açısından geliştirilen yöntemin mM konsantrasyon birimi, $\mu\text{g/mL}$ ye çevrilerek verilmiştir.

6.KAYNAKLAR

- Abdelwahab, N.S., 2016. Spectrophotometric Methods For Simultaneous Determination Of Carvedilol And Hydrochlorothiazide in Combined Dosage Form, *Arabian Journal Of Chemistry*, 9, 355–360
- Abshangen, U., 1987, *J. Cardiovasc. Pharmacol* 10,11, 23
- Afaf Aboul-kheir Abdel-monem ve Eman A B, 2018. Microdetermination Of Carvedilol And Aripiprazole Using Haematoxylin Dye in Pure Form And Pharmaceutical Formulations Using Spectrophotometry, *Int. Res. J. Pharm.*, 9, 11
- Alhemiary Nabil, AF, 2017, New Spectrophotometric Determination Of Nebivolol İn Pharmaceutical Formulation Via Charge Transfer Complex, *Austin J Anal Pharm Chem*, 4, 2, 1-6,
- Al-Neaimy, U.I.S., Al-Delymi, A.M.S., 2013. Visible Spectrophotometric Determination of Ganciclovir in its Pharmaceutical Formulations Using Quinalizarin Reagent, *Jordan Journal of Chemistry* ,8, 2, 103-112
- Alpdoğan G. ve Sungur S., 1999, AAS and spectrophotometric methods for the determination metoprolol tartrate in tablets, *Spectrochimica Acta Part A*, 55, 2705-2709
- Alpman A., 2005, <http://www.ahmetalpman.com/defilacoku.asp?id=1547> Erişim tarihi: 05.12.2019
- Altınışık, M., 2004, Spektroskopik Analiz Yöntemleri, ADÜTF Biyokimya ABD Ders Notları
- Alzoman N. Z., M. A. Sultan 1, H. M. Maher 1,2, M. M. Alshehri, T. A. Wani ve I. A. Darwish, 2013, Analytical Study for the Charge-Transfer Complexes of Rosuvastatin Calcium with π -Acceptors, *Molecules*, 18, 7711-7725
- Anonim1, Erişim: [<https://www.galapharmaceuticals.com/2018/08/16/pharmaceutical-analysisimportantce methods/>] Erişim tarihi: 27.11.2019
- Anonim2, 2006, Spectroscopy, [<https://home.uni-leipzig.de/energy/pdf/freusel.pdf>] Erişim Tarihi; 29.11.2019
- Anonim3, 2017, Introduction to Spectroscopy and Applications, Erişim: [<https://oceanoptics.com/wp-content/uploads/Introduction-to-Spectroscopy-and-Applications.pdf>] Erişim Tarihi: 10.12.2019
- Anonim4, Thermo Spectronic, Basic UV-Vis Theory, Concepts and Applications, Erişim: [http://www.uni-salzburg.at/fileadmin/oracle_file_imports/359201.PDF] Erişim tarihi: 29.11.2019

- Anonim5, UV-Visible Spectroscopy, Erişim: [<http://web.iitd.ac.in/~sdeep/Electronic.pdf>]
Erişim tarihi: 29.11.2019
- Anonim6, Erişim: [anibal.gyte.edu.tr> hebe> AbIDrive > Storage > Downloads > cmb523-2]
Erişim Tarihi: 05.12.2019
- Arshiya F., Sayaji R. ve Venkateshwarlu G., 2011, Spectrophotometric determination of drugs using 2,3 Dichloro 5,6 dicyano PBenzoquinone as Analytical reagent, **International Journal of ChemTech Research**, 3, 4,1769-1780
- Arunadevi S. B., Meyyanathan S. N. ve Bhojraj S., 2011, Simultaneous Determination Of Nebivolol HCl And Valsartan in Solid Dosage Form By Spectrophotometric And Rp-Hplc Method, **IJPSR**, 2, 2, 424-43
- Ayad, M.A., Belal, S., El-Adl, S. M., Al-Kheir, A.A., 1984. **Analyst**, 109, 1417–1422
- Aydurmuş S., 2016. Paroksetin ve Venlafaksinin Morfin Toleransı Üzerine Etkisinin Farelerde Hot Plate Testi ile İncelenmesi, Yüksek lisans Tezi, Karadeniz Teknik Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü / Farmakoloji Anabilim Dalı
- Babalık E., 2005. Hipertansiyon Patofizyolojisi, Klinik Geliflim 18, 2, 25-32
- Bajia Subhash ve Ojha Krishan G., 2013. Synthesis, separation and determination of metal dithiocarbamates complexes by HPLC-ICP-MS, **Eurasian J Anal Chem**, 8, 3, 107-111
- Barnard, D, Huffman, Jh, Morris, J, Wood, S, Hughes, B, Sidwell, R, 1992, Evaluation Of The Antiviral Activity Of Anthraquinones, Anthrones And Anthraquinone Derivatives Against Human Cytomegalovirus, **Antiviral Research**, 17, 1, 63-77
- Bayraktar E., Saygılı, R. 1993, Depresyonun biyokimyası. Depresyon Monograf ları Serisi 4, Hekimler Yayın Birli ğ i, s.157-17
- Bayraktar, N. 2009. Kinonlar Ve Bazı Nükleofillerden Yeni Sübstitüe Kinonların Sentezi, Doktora Tezi, Kimya Anabilim Dalı Organik Kimya Programı, İstanbul Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü
- Belal T. S., El-Kafrawy D. S., Mahrous M. S., Abdel-Khalek M. M., Abo-Gharam A. H. 2016. Validated spectrophotometric methods for determination of sodium valproate based on charge transfer complexation reactions, **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy** 155, 47–53
- Birke, R. W.ve Mavrodineanu, R. 1983. Accuracy in Analytical Spectrophotometry, **NBS Specia Publication**, 1, 260-281

- Brian, Dulin, William T. Abraham, 2004, Pharmacology of Carvedilol, *Am J Cardiol*, 93, 3B–6B
- Broeders MAW, Doevendans PA, Bekkers BCAM, Bronsaer R, van Gorsel E, Heemskerk JW, Egbrink MG, van Breda E, Reneman RS, van Der Zee R., 2000. Nebivolol: a third-generation β -blocker that augments vascular nitric oxide release: endothelial β_2 -adrenergic receptor-mediated nitric oxide production. *Circulation*, 102, 677–684
- Cardoso, S.G, Ieggli C.V.S., Pomblum, S.C.G, 2007, Spectrophotometric determination of carvedilol in pharmaceutical formulations through charge transfer and ion pair complexation reaction, *Pharmazie*, 62,1, 34-7
- Dağlı, N., Karaca, I., 2006, Hipertansif Olgularda Nebivolol ve Telmisartan'ın Kan Basıncı, Diyastolik Fonksiyonlar, Lipid ve Glukoz Metabolizması Üzerine Etkileri, *Fır. Tıp Der.*, 11 (4), 201-209, S.201
- Darwish I. A., Heba H. Abdine, Sawsan M. Amer, Lama I. Al-Rayes, 2009, Simple Spectrophotometric Method For Determination Of Paroxetine in Tablets Using 1,2-Naphthoquinone-4-Sulphonate As A Chromogenic Reagent, *International Journal Of Analytical Chemistry*, 1-8
- Darwish İbrahim A., 2005, Development And Validation Of Spectrophotometric Methods For Determination Of Fluoxetine, Sertraline, And Paroxetine in Pharmaceutical Dosage Forms, *Journal Of Aoac International*, 88, 1, 38-45, 8
- De Paul, C. E. R., Almeida, V. G. K. ve Cassella, R. J., 2010, Novel Spectrophotometric Method for the Determination of Azithromycin in Pharmaceutical Formulations based on its Charge Transfer Reaction with Quinalizarin, *J. Braz. Chem. Soc.*, 21, 9, 1664-1671
- Dechant K. L. ve Clissold S. P., A, 1991, Review of its Pharmacodynamic and Pharmacokinetic Properties, and Therapeutic Potential in Depressive Illness, *Drugs*, 41, 2, 225-253,
- Demir, V. 2017. Rosuvastatin Kalsiyum Ve Ezetimib'in Kombine Tabletlerden Uv/Vis-Spektrofotometrik Yöntem Kullanılarak Birlikte Tayini, Marmara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi,
- Derayea S. M, Omar M. A, M. Aboel-K. Abdel-L., Hassan, A. I., 2016, Development and validation of a new spectrofluorimetric method for the determination of some beta-blockers through fluorescence quenching of eosin Y. Application to content uniformity test, *Open Chem.*, 14, 258–266

- Dhandapani B., K. Suresh kumar, R. Karthikeyan, M. Raja ve A. Somasundaram, 2008, Simultaneous spectrophotometric estimation of nebivolol hydrochloride and hydrochlorothiazide in tablets. *Asian J. Chem.* 20,7, 5192-5196
- E-Didamony, A., Hafeez, S., Saad, A. 2015, Application of Bromocresol Green and Bromothymol Blue for the Extractive Spectrophotometric Determination of Anti-hypertensive Drugs, *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 07, 122-129
- Elqudaby, H. M., Mohamed, G. G., Ghada M.G. E., 2014, Analytical studies on the charge transfer complexes of loperamide hydrochloride and trimebutine drugs. Spectroscopic and thermal characterization of CT complexes, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 129, 84–95
- Elqudaby, H. M., Fragb, E. Y. Z, Mohamed, G. G. ve Mohamed, M. A. 2012, Optimized And Validated Spectrophotometric Methods For The Determination Of Clomipramine And Paroxetine Hydrochloride In Drug Formulations, *International Journal Of Research in Ayurveda And Pharmacy*, 3(4):537-542
- El-Ries M.A., Abou-Attia F.M., Ibrahim S.A., 2000, AAS and Spectrophotometric Determination of Propranolol HCl and Metoprolol Tartarat, *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24, 179-187
- Erdik, E. 2005. Organik Kimyada Spektroskopik Yöntemler, Gazi Kitabevi, üçüncü baskı, Ankara, 531, S. 12-13, 30-39
- Erdoğan D., 2015, Hipertansiyon Çalışma Grubu’nun online yayımlanan , *Hipertansiyon Haber Bülteni*, 4
- Ertem, B., 2008, Primer Orta ve Hafif Hipertansiyonlu Hastalarda Karvedilol ve Nebivolol’ün Antihipertansif Etkinliğinin Karşılaştırılması, Trakya Üniversitesi Tıp Fakültesi Kardiyoloji Anabilim Dalı, Edirne
- Eurachem, Analitik Metotların Amaca Uygunluğu, Metodun Geçerli Kılınması ve İlgili Konular için Laboratuvar Kılavuzu, İngilizce İkinci Baskı 2014, Türkçe Çeviri 2018
- FDA, Paxil, Prescribing Information; <https://www.accessdata.fda.gov/> Erişim tarihi: 29.11.2019
- Fındıklı, E. K., 2009, Değişik Endikasyonlarla Antidepresan Kullanan Hastalarda Metabolik Sendrom, Uzmanlık Tezi, Fırat Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Psikiyatri Anabilim Dalı, Elazığ
- Gita, C., Bhadra, D, Bhadra S. ve Jain, N. K., 2005, UV Spectrophotometric Determination of Carvedilol, *Indian J. Pharm. Sci.*, 67, 606

- Gouda, A. A, Kasseem, M., 2012, Novel spectrophotometric methods for determination of desloratidine in pharmaceutical formulations based on charge transfer react, *Arabian Journal of Chemistry*, 9, S1712–S1720
- Gouda A. A, Malah Z. A., 2013, Development and validation of sensitive spectrophotometric method for determination of two antiepileptics in pharmaceutical formulations, *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 105, 488–496
- Gölcü A., Dolaz M. ve Serin S., 2001, Spectrophotometric Determination of Propranolol as Cu (II), Ni (II) and Co (II) Dithiocarbamate Complexes, *Turk J Chem*, 25, 485-490
- Gölcü A.ve Yavuz, P.2008, Spectral, Analytical, Thermal, and Antimicrobial Studies of Novel Sodium 2-[4 (2-Hydroxy-3-Izopropylaminopropoxy) Phenyl] Acetamide (Atenolol) Dithiocarbamate and its Divalent Transition Metal Complexes, *Russian Journal of Coordination Chemistry*, 34, 2, 106–114
- Gümüştas, K. M., <http://genderi.org/temel-prensipler.html> Erişim tarihi: 06.12.2019
- Gündüz T., 2010, Kimyacılar için İstatistik, İkinci baskı, Gazi Kitapevi Tic. Ltd. Şti. S. 141, 143, 292
- Gündüz T., 2012, İntrümental Analiz, Onbirinci baskı, Gazi Kitapevi Tic. Ltd. Şti. 1357, S.264
- Güven, E., 2015, Karvedilol’ün elektrokimyasal özelliklerinin incelenmesi ve tayini için elektrokimyasal yöntem geliştirilmesi, Yüksek lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ, 58 syf., S.1
- Harris, D. C., 2015, Nicel Kimyasal Analiz, Sekizinci baskı, Palme Yayıncılık, Editör: Türker A. R., 720, S.100
- Hiemke C., Härtter S., 2000, Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors, *Pharmacology & Therapeutics* 85, 11–28
- Huang, W., X.J. Liu, F.L. Zhao, 2006, Spectrophotometric determination of azithromycin by charge transfer reaction, *Spectrosc. Spectral Anal.* 26, 913–917
- ICH-Q2, 2005, International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration Of Pharmaceuticals For Human Use. Validation of analytical Procedures: Text And Methodology Q2 (R1), Step 4 Version
- Imran. M, Singh R.S, 2006, Chandran.S, stability indicating UV spectroscopic method for the estimation of ezetimibe, and carvedilol, *Pharmasize*, 61, 766-769

- Iturbide-Casas M., Molina-Recio G., Camara-Martos F., 2018, Manganese Preconcentration and Speciation in Bioaccessible Fraction of Enteral Nutrition Formulas by Cloud Point Extraction, food, *Analytical Method,s* 11, 2758-2766
- İlerigelen B., 2005, Hipertansiyon Tedavisi, *Klinik Gelişim*, 18 (2) - (33-41)
- Jain P.S., Talele G.S., Talele S.G. ve S.J. Surana, 2005, *Indian J. Pharm. Sci.*, 67, 358.
- Jat R. K., Chhipa, R. C., Sharma, S. 2010, Spectrophotometric Quantification Of Carvedilol in Bulk Drug And Tablets, *Pharmacophore*, 1 (2), 90-95
- Kalia, S.B. Kaushal, G. Kumar, M.. Cameotra, S.S. Sharma, A Verma, M.L., Kanwar, S.S, 2009, Antimicrobial and toxicological studies of some metal complexes of 4- methylpiperazine-1-carbodithioate and phenanthroline mixed ligands, *Braz. J. Microbiol.* 40, 916–922.
- Kamila, Mm, Mondal, N, Ghosh, Lk, Gupta Bk, 2007, A Validated UV Spectrophotometric Method For Estimation Of Nebivolol Hydrochloride in Bulk And Pharmaceutical Formulation, *Pharmazie*. 62, 7, 486-7
- Kanchi, S. Singh, P. Bisetty, K, 2014, .Dithiocarbamates as hazardous remediation agent: a critical review on progress in environmental chemistry for inorganic species studies of 20th century, *Arab. J. Chem.* 7, 11–25.
- Kanik B. 2010. Bazı İlaç Etken Maddelerinin Komplekslerinin Sentezi Ve Bu Komplekslerin Biyolojik Aktivitelerinin İncelenmesi, Trakya Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü Yüksek Lisans Tezi, , Edirne
- Kar, A., 2005, Pharmaceutical Drug Analysis, Revize edilmiş 2.Baskı, sayfa :4
- Kelani, K., Bebawy, L.I., Abdel-Fattah, L., Ahamad, A.S., 1997, Spectrophotometric Determination of Some n-Donating Drugs Using DDQ, *Anal. Letters*, 10, 30, 1843–1860.
- Keleş, İ. ve Ağaç M. T., 2005, İkincil Hipertansiyon, *Klinik Gelişim* 18, 2, 42-48
- Kıral, M., 2012. Nebivolol’ün Farmasötik Preparatlarında Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi Yöntemi İle Miktar Tayini, Yüksek Lisans Tezi, Anadolu Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Eskişehir,
- Kirtimaya M., B. Kumar K., Kumari M. M., Subrahmanyam B. S. S., 2016, New Analytical Method Development And Validation Of Chlorpheniramine Maleate By Using UV-Visible Spectrophotometry, *IAJPS*, 3, 7, 767-772

Korkmaz, D., Demir, C., Aydın, F., Ataman O. Y., 2005, Cold vapour generation and on-line trapping of cadmium species on quartz surface prior to detection by atomic absorption spectrometry *J. Anal. At. Spectrom.*, 20, 46-52

Kumar, Manish; Kumar, Chinmoy; Bhatt, Shailendra, Vipin Saini, Dr Pandurangan, 2018, Uv Spectrophotometric Method Development And Validation For Estimation Of Nebivolol Hydrochloride As API And in Pharmaceutical Dosage Form, *Research Journal Of Pharmaceutical Biological And Chemical Sciences*, 9, 5,1731-1737

Laila El-S., Abdel, F., Taghreed, A.M., Elham, A.T., Spectrofluorimetric Determination Of Carvedilol in Dosage Form And Spiked Human Plasma Through Derivatization With 1-Dimethylaminonaphthalene-5-Sulphonyl Chloride, *Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly* 16 , 1, 31–38, 2010

Legg T., Goldman L, 2019, What is depression and what can I do about it? <https://www.medicalnewstoday.com/kc/depression-causes-symptoms-treatments-8933>

Leggli, Carine Viana Silva; Cardoso, Simone Gonçalves; Belle, Luziane Potrich, 2005, Validation Of Uv Spectrophotometric And Nonaqueous Titration Methods For The Determination Of Carvedilol in Pharmaceutical Formulations *Journal Of Aoac International*, 88, 5, 1299-1303, 5

Likussar, W ve Boltz, D.,F., 1971, Theory of continuous variations plots and a new method for spectrophotometric determination of extraction and formation constants, *Anal. Chem.*, 43, 10, 1265-1272

Manohar S., D., Dhake Avinash Sridhar, Setty Chitral Mallikarjuna, 2013, UV Spectrophotometric Method For The Estimation Of Nebivolol HCl in Bulk And Pharmaceutical Formulations, *Journal Of Advanced Pharmacy Education & Research*, 3, 3, 244-247

Meera V., Farzana K. L., Subramanyam R., 2003, Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders:a comprehensive review, *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 27, 85–102

Megep, 2011, Spektrofotometre Cihazları, Biyomedikal Cihaz Teknolojileri, Ankara,

Merey G., 2019. Aletli Analiz Yöntemleri, Analiz Çeşitleri ve Temel Kavramlar, Ders Notları, Hitit Üniversitesi,

Merey, G. 2016, İlaç Kimyası Ve Endüstriyel Uygulamaları Ders Notları, Hitit Üniversitesi

Meyyanathan, S. N.;Birajdar, Arunadevi S.;Suresh, Bhojraj, 2010, Simultaneous Estimation Of Nebivolol Hydrochloride And Valsartan And Nebivolol Hydrochloride And

Hydrochlorothiazide İn Pharmaceutical Formulations By Uv Spectrophotometric Methods, *Indian Journal Of Pharmaceutical Education And Research*, 44, 2, 156-159,

Mishra Pradeep, Shah Kamal ve Gupta Alka, 2007, UV And Extractive Spectrophotometric Methods For The Determination of Nebivolol Hydrochloride in Tablets *Journal of The Indian Chemical Society*, 84, 12, 1242-1245,

Moffat A.C., Osselton, Widdop B., 2004. Clarke's Analysis of Drugs and Poisons. 3. baskı. *London: Pharmaceutical Pres;*

Mohamed E. M., Frag, Y.Z., Hathoot, A. A., Shalaby, E. A., 2018, Spectrophotometric determination of fenoprofen calcium drug in pure and pharmaceutical preparations. Spectroscopic characterization of the charge transfer solid complexes *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 189, 357–365

Murali, D.,Neeharika, T.,Rambabu, C. 2013, Spectrophotometric Determination Of Nebivolol Hydrochloride in Bulk And Pharmaceutical Formulations, *Asian Journal Of Chemistry*, 25, 6, 2981-2984,

Nishpa, P.J., 2012, Analytical Method Development And Validation Of Assay For Carvedilol Tablets By Rp-Hplc, Hptlc And Uv Spectroscopy, Master Of Pharmacy in Pharmaceutical

Nwodo, N. J., Ibezim A., 2013, Simple Spectrophotometric Method For Determination Of Paroxetine In Tablets Using Chloranilic Acid As Chromogenic Reagent, *World Journal Of Pharmaceutical Research*, 3, 1, 126-138,.

Oliveira, Paulo J.; Goncalves, Lino; Monteiro, Pedro; Providencia, Luis A.; Moreno, Antonio J. 2005, Are the Antioxidant Properties of Carvedilol Important for the Protection of Cardiac Mitochondria?, Current Vascular, *Pharmacology*, 3, 2, 147-158 (12)

Ortakçı Y, <http://web.karabuk.edu.tr/yasinortakci/dokumanlar/say> Erişim Tarihi:05.12.2019

Owen T., 1996 Fundamentals of UV-VISIBLE Spectroscopy, Erişim: [http://web.uni-plovdiv.bg/plamenpenchev/mag_books/spectroscopy/PRIMER.PDF] Erişim tarihi: 02.12.2019

Ökten F., Arslan M., Duymuş H., Küçükislamoglu M., 2003, Difenhidroamin Hidroklörür'ün Yük Transfer Kompleksinin İncelenmesi, *SAU Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 7, 2

Önal, A. Spectrophotometric And Spectrofluorimetric Determination Of Some Drugs Containing Secondary Amino Group In Bulk Drug And Dosage Forms Via Derivatization With 7-Chloro-4-Nitrobenzofurazon, *Quim. Nova*, 34, 4, 677-682, 2011

- Önal, A., Kepekçi, Ş. Evrim, Öztunç, Aysel, 2005, Spectrophotometric Methods For The Determination Of The Antidepressant Drug Paroxetine Hydrochloride in Tablets, ***Journal Of Aoac International***, 88, 2, 490-495(6)
- Öngen, Z., 2005, Çözümü Zor Bir Toplumsal Sorun: Hipertansiyon, Klinik Gelişim 18, 2, 4-7, S.5
- Özcan, M. Deneysel Verilerin Değerlendirilmesi, web.itu.edu.tr > ~ozcanm > kim Erişim tarihi:05.12.2019
- Packer, M, Coats AJS, Fowler MB, Katus HA, Krum H, Mohacsi P, Rouleau JL, Tendera M, Castaigne A, Roecker EB, Schultz MK, DeMets DL, 2001, Effect of carvedilol on survival in severe chronic heart failure. ***N Engl J Med***; 344, 1651, 8.
- Palak, Kriti Soni ve Kanchan Kohli, 2016, Development Of Ultraviolet Spectroscopic And Thin Layer Chromatography Method Of Broccoli Extract, ***IAJPS***, 3 (10), 1309-1314
- Parambi, D. Grace Thomas, Dr. Sr. Molly Mathew, Anila Jose , Dr. K.G. Revikumar, 2010, A Validated U.V. Spectrophotometric Determination Of An Antihypertensive Drug – Nebivolol From Tablet Formulations, ***International Journal Of Pharmaceutical Sciences Review And Research***, 3, 2, 026, 139-141,
- Patel, S.A ve Patel.N, 2011, Validated spectrophotometric methods for the determination of carvedilol in tablets, ***International research journal of pharmacy***, 2 (7), 171-175.
- Paula, Carlos E. R. de, Almeida V. G. K., Cassella R. J., 2010, Novel Spectrophotometric Method for the Determination of Azithromycin in Pharmaceutical Formulations based on its Charge Transfer Reaction with Quinalizarin, ***Chem. Soc.***, 21, 9, 1664-1671,
- Pujari, Vijayanand, Jagadevappa Patil, Manda Venkata Reddy, 2016, Formulation, characterization and *in vivo* evaluation of novel edible dosage form containing nebivolol HCl, ***Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences***, 52, 1
- Ragaa, El Sheik, Ayman A. G. ve Rham El-Azzazy, 2013, Spectrophotometric Study On The Charge Transfer Complex Between Sumatriptan Succinate And Some π -Acceptors And Alizarin Derivatives, ***Chemical Industry & Chemical Engineering Quarterly***, 19 , 4, 529–540
- Rani, P. J., Subbiah T., 2013, Synthesis characterization, cytotoxicity and antimicrobial studies on bis(N-furfuryl-N-(2-phenylethyl) dithiocarbamate -S,S0)zinc(II) and its nitrogen donor adducts, ***European Journal of Medicinal Chemistry*** 62,

- Rani, Y. N., Ravi B.V.V Kumar, Smitapadma M., 2013, Development And Validation Of New Analytical Methods For The Estimation Of Carvedilol In Bulk And Pharmaceutical Dosage, *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 6, 2
- Rao, A. L. Rajeswari, K. R, Sankar, G. G., 2010, Spectrophotometric Method For The Determination Of Nebivolol Hydrochloride in Bulk And Pharmaceutical Formulations, *E-Journal Of Chemistry*, 7, 2, 445-448
- Rojas, F.S. ve Ojeda C. B., 2009, Recent Development İn Derivative Ultraviolet/Visible Absorption Spectrophotometry. *Analytica Chimica Acta*, 635, 22–44.
- Rxlist, Bystolic Prescribes, <https://www.rxlist.com/bystolic-tablets> Erişim tarihi: 28.11.2019
- Sachin, S. Sule, ve William Frishman, 2006, Nebivolol, New Therapy Update, *Cardiology in Review*;14: 259–264,
- Sameer, A.M.A., Okram Z. D., Kanakapura B., Kanakapura B. V., 2016, Use of picric acid and iodine as electron acceptors for spectrophotometric determination of lansoprazole through a charge-transfer complexation reaction, *Journal of Taibah University for Science* 10, 80–91
- Shaza, W. S. 2019, Drug Analysis, Pharmaceutical Formulation Design - Recent Practices, Usama Ahmad and Juber Akhtar, <https://www.intechopen.com/books/pharmaceutical-formulation-design-recent-practices/drug-analysis>
- Shetty, Divya N., B. Narayana, 2012, Simple Methods For The Spectrophotometric Determination of Carvedilol, *International Scholarly Research Network Isrn Spectroscopy*, 1,6
- Shewkat, I. B., A Novel Spectorphotometric Method For Determination of Modafinil in Pharmaceutical Formulations Using Quinalizarin, Fırat Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2017
- Siladitya, B., Subhajit G., Fahad A., Saayak S., Sritoma B., 2012, UV-Visible Spectrophotometric Method Development and Validation of Assay of Paracetamol Tablet Formulation, *Analytical & Bioanalytical Techniques*, 3:6
- Singh, Ravi Pratap, Vinay Kumar Maurya, Biswajit Maiti, Kafeel Ahmad Siddiqui, Lal Bahadur Prasad, 2019, Synthesis, structure and thermogravimetric analysis of novel dithiocarbamate based Zn(II),Cd(II) and Hg(II) complexes, *Journal of Molecular Structure* 1198
- Sirisha, N, Haripriya A, Swetha Bhavani N, Bhagirath R, Satyanarayana M and Panikumar D Anumolu, 2013, Simultaneous quantification of nebivolol hydrochloride and hydrochlorothiazide by first derivative UV- Spectroscopy, *Der Pharmacia Lettre*, 5 ,2, 78-84

- Skoog, D.A., Holler, F.J., Nieman T. A., 1998, Enstrümantal Analiz İlkeleri, 5. Baskı çev., Editörler: Kılıç E., Köseoğlu F., Yılmaz H., Ankara, 849, S. 300-343
- Skoog, D.A., Holler, F.J., West, D. M., 1996, Analitik Kimya Temelleri, Editörler: Kılıç E., Köseoğlu F., Yılmaz H., Bilim Yayıncılık, 7. Baskı, Ankara, 496, S. 11-33
- Sreevidya, T. V., Narayana, B, 2009, Simple And Facile Methods For The Determination Of Carvedilol İn Pharmaceuticals. *Indian Journal Of Chemical Technology (Ijct)* 16, 16, 1
- Streim, K., G. Sponer, B. Muller-Beckmann ve W. Bartsch, 1987, *J. Cardiovasc. Pharmacol*, 10, 33
- Subaşı, E. 2003, Sytheses and Characterisation of Transition Metal Complex with Sulfur Donor Ligants, Doktora Tezi, Ege Üniversitesi, Anorganik Kimya Anabilim Dalı
- Subbayamma, A. V., Rambabu, C., 2009, Spectrophotometric Determination Of Oxidative Coupling Reactions Of Nebivolol And Trandolapril, *Asian Journal Of Chemistry*, 21, 6, 4280-4284
- Swamby, N., Basavaiah, K., 2014, Simple and rapid spectrophotometric assay of albendazole in pharmaceuticals using iodine and picric acid as CT complexing agents, *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 50, 4
- Şenol, O., 2015, Bazı İlaç Etkin Maddelerinin Antioksidan Aktivite/Kapasitelerinin Çeşitli Yöntemlerle Belirlenmesi Ve Kemometrik Hesaplamalarla Sınıflandırılması, Eczacılık Analitik Kimya Anabilim Dalı, Atatürk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Doktora Tezi, Erzurum
- Taddei, S., Viridis A., Ghiadoni L., Sudano I., Salvetti A., 2002, Effects of Antihypertensive Drugs on Endothelial Dysfunction, *Drugs*, 62, 2, 265–284
- Tamam, L., Zeren T., 2002, Depresyonda Serotonerjik Düzenekler, *Klinik Psikiyatri*; 4:11-18,
- Temel, S, 2019, Paroxetin Etken Maddesinin Tayini İçin Yeni Spektrofotometrik Yöntem Geliştirilmesi, Dicle Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Anabilim Dalı, Diyarbakır
- Ulu, S. T. ve Kel E., 2012, Spectrophotometric Determination of Bisoprolol in Pharmaceutical Preparations by Charge Transfer Reactions, *Optics and Spectroscopy*, 112, 6, 864–867
- Usanmaz, F. A., 2008, Bazı Yeni N,N-Disübitüe Ditiyokarbamat Türevleri Üzerinde Çalışmalar, Farmasötik Kimya Programı, Doktora Tezi, Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Ankara

- Üncüoğlu, E., 2009, Farmasötik Tablet Formunda Karvedilol ve Telmisartanın Fosforimetrik Tayini, Gazi Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yüksek Lisans Tezi, Ankara,
- Verma, J. K. ve H. A. Syed, 2007, Extractive spectrophotometric method for determination of carvedilol in tablets, *Indian J Pharm Sci*, 69 (2): 303-304
- Verma, N., Ghosh A. K. ve Chattopadhyay P. 2010. Simultaneous Spectrophotometric Determination of Carvedilol in Its Dosage Form, *IJPSR*, 1 (12): 188-190
- Vyas, A., Gidwani B. , Tripathi A. , Dhruve P. 2016, Significance of Jobs Plot in Cyclodextrin Complexation, *Research J. Pharm. and Tech.* 9(7)
- Walash, M. I. ,F. Belal,N. El-Enany, H. El-Mansi, 2010, Spectrophotometric Determination Of The Antidepressants Sertraline And Paroxetine Hcl Using 2,4-Dinitrofluorobenzene *Int J Biomed Sci.*, 6 (3): 252–259.
- Wanabe, T., Tokunaga R., Iwanaha T., Tati M., Ikeda M., 1978, Determination of Urinary Manganese by the Direct Chelation-extraction method and Flameless Atomic Absorption spectrophotometry, *British Journal of Industrial Medicine*, 35, 73-77
- Wang, H. Y., Xiao Y., Han J. X.SChang, 2005, Simultaneous Determination of Dopamine and Carvedilol in Human Serum and Urine by First-order Derivative Fluorometry, *Anal. Sci.*, 21, 1281-85
- WHO, Erişim: [<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/>] Erişim Tarihi: 02.12.2019
- wikiHow, Erişim: [<https://www.wikihow.com/Calculate-Molar-Absorptivity>] Erişim Tarihi: 09.09.2019
- Wikipedia, <https://tr.wikipedia.org/wiki/%C4%B0la%C3%A7> Erişim Tarihi: 02.03.2020
- Yaman, M., 2005, Enstrümental Analiz Ders Notları, <http://www.profdrmehmetyaman.com/> Erişim tarihi: 01.12.2019
- Yan-Qing Zang, Yan-Yu Feng, Ying-Hua Luo, Yu-Qing Zhai, Xue-Ying Ju, Yu-Chao Feng, Ya-Nan Sheng, Jia-Ru Wang, Chang-Qing Yu, Cheng-Hao Jin, 2019, Quinalizarin induces ROS-mediated apoptosis via the MAPK, STAT3 and NF-κB signaling pathways in human breast cancer cells, *Molecular Medicine Reports* 20: 4576-4586
- Yavaş U., Yüksek Tansiyon Tedavisinde Kullanılan Bazı İlaç Etken Maddelerinin Uv/Vis Spektrofotometrik Ve Yüksek Basıncılı Sıvı Kromatografik (Hplc) Yöntemlerle İncelenmesi Ve

- Elde Edilen Verilerin Kemometrik Yöntemlerle Değerlendirilmesi Süleyman Demirel Üniversitesi, Fen Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, Kimya Anabilim Dalı, Isparta, 2019
- Yıldız, A, Genç, Ö., Bektaş, S. 1997. Entrümantal Analiz Yöntemleri, Hacettepe Üniversitesi Yayınları, İkinci Baskı, S. 52, 64, Ankara
- Yılmaz A., Kimyasal Analizlerde Metot Validasyonu ve Verifikasyonu, Turklab Rehber, <http://turklab.org/tr/> Erişim tarihi: 2019
- Yiğit F., Atorvastatin Tayini için Yeni Bir Spektrofotometrik Yöntem, Dicle Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Analitik Kimya Anabilim Dalı, Yüksek lisans tezi, 2019
- Yuan Z, Shioji K, Yasuki Kihara, Hiroyuki T, Yoko O ve Chiharu K, 2004, Cardioprotective effects of carvedilol on acute autoimmune myocarditis: anti-inflammatory effects associated with antioxidant property, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H83–H90
- Yüksel Nevzat, Paroksetinin Nörofizyolojik Etkileri ve Klinik Farmakolojisi, *Klinik Psikiyatri*; 10, 9-16, 2007
- Zory Vlad Todres, Ion-Radical Organic Chemistry: Principles and Applications, Second Edition, CRC Press, Taylor & Francis Group, 2009



ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Figen EREK

Derece	Üniversite	Alanı	Yılı
Lisans	Çukurova Üniversitesi	Kimya	2008
Yüksek Lisans	Dicle Üniversitesi	Analitik Kimya ABD	2015
Doktora	Dicle Üniversitesi	Analitik Kimya ABD	2020

Akademik Unvanlar

Arş Gör :Dicle Üniversitesi Fen Fakültesi-2011- (devam etmekte)

Yüksek Lisans Tezi

Demir Cevherlerinde Bulunan Bakırın Kazanımı, 2015

Projeler

- **ECZACILIK.19.001**, Bazı İlaç Etken Maddelerinin Tayini için Spektrofotometrik Yöntem Geliştirilmesi, 2020
- **DUBAP Fen.16.011**, Asfaltit Külünde Şırnak Asfaltitlerinin Farklı Ekstraksiyon Yöntemleriyle Metalden Elde Edilmesi, Araştırmacı, 2017
- **DUBAP 14-FF-27**, Demir Cevherlerinde Bulunan Bakırın Kazanımı, 2015